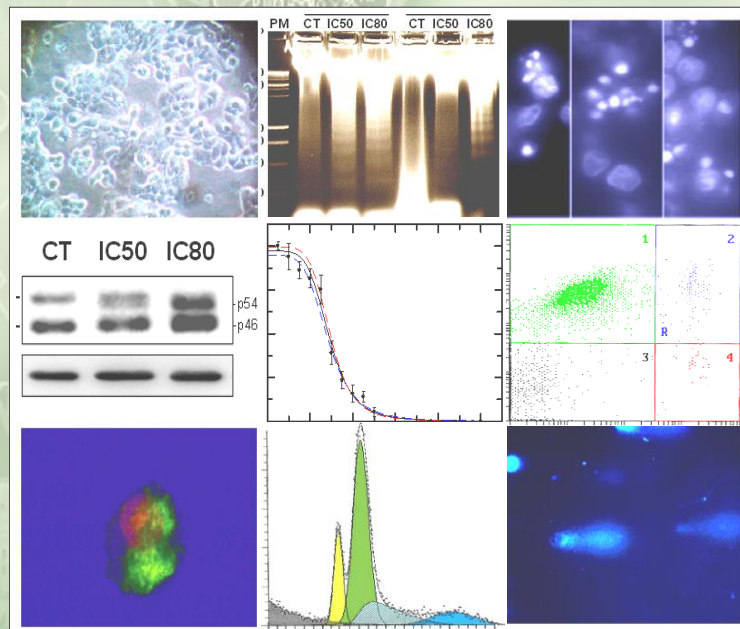
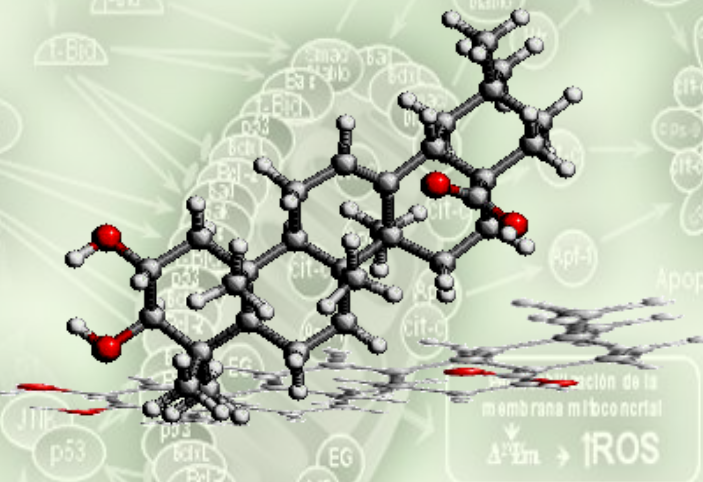




UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural



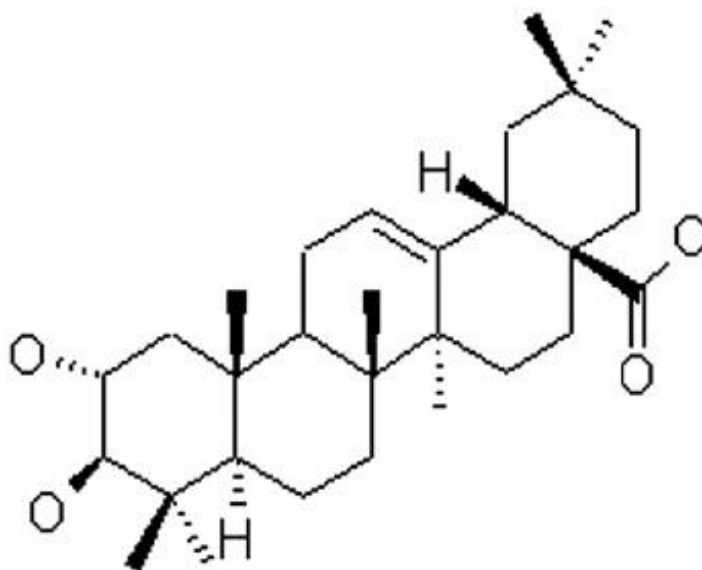
Fernando Jesús Reyes Zurita
Granada, 2007



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural



Ácido maslínico,
ácido (2 α , 3 β)-2,3-dihidroiolean-12-en-28-oico.

Fernando Jesús Reyes Zurita

TESIS DOCTORAL

2007

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Fernando Jesús Reyes Zurita
D.L.: Gr. 2085 – 2007
ISBN: 978 – 84 – 338 – 4469 – 9

**Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico,
triterpeno pentacíclico de origen natural.**

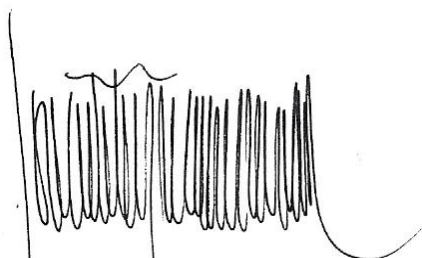
Memoria presentada por el licenciado en Ciencias Bioquímicas
Fernando Jesús Reyes Zurita para optar al grado de Doctor.



Fdo. Fernando Jesús Reyes Zurita.

VºBº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Fdo. José Antonio Lupiáñez Cara.
Catedrático en Bioquímica
y Biología Molecular
Universidad de Granada



Fdo. Marta Cascante Serratos.
Catedrática en Bioquímica
y Biología Molecular
Universidad de Barcelona.

Granada Julio 2007

El trabajo que se presenta en la presente Tesis Doctoral, ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Este trabajo ha sido subvencionado mediante la ayuda de los proyectos AGL2000-1534, PPQ 2003-06602-C04-04 y AGL2004-07579-C04-03, correspondientes al Ministerio de Educación y Ciencia; por la Junta de Andalucía a través del grupo de investigación CVI-157; y por la empresa Biomaslinic S.L. asociada a la OTRI de la Universidad de Granada.

En el comienzo de esta tesis no sabía realmente en qué iba a resultar mi trabajo. Sois muchos a los que os tengo que agradecer, no sólo el que hayáis colaborado durante su realización, si no el que me hayáis ayudado a seguir adelante, de una manera u otra. Vosotros más que nadie sabéis lo difícil que es este tipo de trabajo, sin más recompensa que la superación de uno mismo; a todos vosotros os doy las gracias. A continuación intentaré agradecer vuestra ayuda, pero si alguien falta (ya sabéis que mi cabeza no da para mucho) quiero que sepa que este primer párrafo va dirigido a él.

En primer lugar agradecer la inestimable ayuda de mis directores de tesis José Antonio Lupiáñez Cara y Marta Cascante Serratosa. A José Antonio Lupiáñez quiero agradecerle su ayuda en todo momento, sobre todo durante la redacción y corrección de esta tesis. A ti Marta, quiero darte muy especialmente las gracias ya que sin tu ayuda la realización de esta tesis no habría sido posible, y sobre todo quiero agradecerte tu confianza en mi capacidad y en mi persona.

Quiero agradecer a Ceci el haberme introducido en el maravilloso mundo de los cultivos celulares y de la citometría de flujo, y por haber confiado en mí como amigo. A Silvia por su inapreciable ayuda en cualquier tema de papeleo, por su ayuda en la redacción de mi primer artículo, por su extraordinario sentido del orden y por estar siempre dispuesta a echar una mano.

A Shirley (Chirléi para los amigos) por su inestimable compañía y simpatía, por ser buena persona y por acompañarme cuando ha podido a tomarnos el cafetito de la mañana o de la tarde. A Gisela (perdón a la D^{ra}. Gisela), quiero agradecerle el haber sido tan buena compañera de fatigas. Con los cultivos celulares, con el comet y con todo lo demás y por haberme echado una mano cuando ha hecho falta. A Dane, también quiero agradecerle el que me haya ayudado siempre que ha podido y el haber podido contar con ella. A las tres os agradezco vuestra amistad, apoyo y confianza, dentro y fuera del laboratorio. Cuando uno esta fuera de casa, vosotras sabéis bien lo duro que es (bastante mejor que yo), son muy necesarios.

A Joan Carles decirle que a pesar de la seriedad que le caracteriza ha sido un gran compañero. Agradecer a Pedro Vizán, sus chascarrillos, su buen sentido del humor y el ser un buen amigo. Y que junto con Antonio y Joan, el que los tres hayan compartido su experiencia de laboratorio conmigo. A Pedro Aauri quiero agradecerle el ser tan buena gente. Y a Fernando Ortega decirle que es el uruguayo mas simpático que haya conocido, *no he conocido a otro.*

A Joan, el técnico, quiero agradecerle el haberme ayudado a poner a punto aquellas técnicas para la determinación de actividades antioxidantes y que finalmente se han quedado fuera de esta tesis. Y a todos vosotros Carles Lozano, Miriam, Santi, Gema y María os agradezco vuestro apoyo y confianza. Espero no haber olvidado a nadie y si así es espero que me perdone *(es que sois muchos jod...)*

Quiero agradecer el apoyo de todo el Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Granada, y en especial a José Manuel el que siempre haya estado ahí cuando me ha hecho falta, por cualquiera que fuese el motivo. A Eva (la última incorporación del grupo) junto con Leticia quiero agradecerles su ayuda y apoyo, sobre todo en estos últimos momentos en los que parece que esto no tiene fin.

A Alfonso Carreras, a José Rafael Pedrajas y a Juan Bautista Barroso, junto con Luisa Saniger de la Universidad de Jaén quiero agradecerles el que me iniciasen en el terreno de la bioquímica experimental al comienzo del desarrollo de esta Tesis.

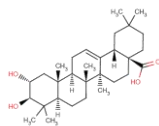
No puedo olvidarme aquí, de aquellas personas, que desde el comienzo de este camino han creído en mí, haciéndome apreciar la ciencia. Entre estas personas se encuentra la que siempre consideraré como mi tutor Hilario Ramírez Rodrigo que me introdujo en este mundo y al que siempre le estaré agradecido, espero algún día poder volver enfrentarme a la estructura de proteínas y programar de nuevo. También quiero agradecerle a la profesora Bori Segovia, sus siempre buenas palabras de aliento.

También tengo que agradecer la paciencia de las personas que aún estando a mi lado han sabido aguantarme (en el mejor sentido de la palabra se entiende: sostener, sustentar, no dejar caer, etc.) durante todo este tiempo, me refiero a mi familia y como no, a ti M^a José.

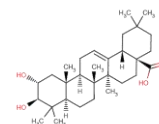
A mi sobrino Antonio Julián quiero agradecerle el que intentase comenzar junto a mí, una aventura parecida a la mía, aunque las circunstancias no fueron las idóneas y decirle que si el futuro lo permite y él lo desea lo intentaremos de nuevo. Y a toda mi familia por haberme apoyado de forma incondicional, por haberme alentado y por haber confiado en mí hasta llegar a este punto. A mis hermanos M^a Carmen, José y Juan (ya sabéis lo mucho que os quiero). Y por último quiero agradecer a mis padres Carmen y Enrique su aliento y apoyo, sobre todo a mi madre que en ningún momento desde que era sólo un chiquillo dudó de mí y que siempre ha respaldado de mis decisiones.

A TODOS GRACIAS.

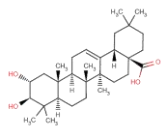
Dedicada
a mi Madre
a mi Mujer
y a mi Hija



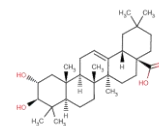
Capítulo 1.-	El ácido maslínico	1
1.1	Triterpenos en <i>Olea europea</i>	2
1.2	Estructura del ácido maslínico	7
1.3	Actividad anticancerígena del ácido maslínico	11
1.4	Actividad antioxidante del ácido maslínico	17
1.5	Otras propiedades mostradas por el ácido maslínico.....	20
1.5.1	Efecto inmuno-modulador.....	20
1.5.2	Efecto vaso-modulador.....	20
1.5.3	Efecto anabólico	21
1.5.4	Efecto anti-microbiano.....	21
1.5.5	Efecto anti-viral.....	22
1.5.6	Efecto sobre actividades enzimáticas	23
Capítulo 2.-	Triterpenos, estructuras y funciones	25
2.1	Los triterpenos	26
2.2	Estructura y clasificación de los triterpenos.....	28
2.3	Triterpenos y plantas.....	35
2.4	Propiedades anticancerígenas de los triterpenos.....	39
2.4.1	Grupo lupano.....	39
2.4.1.1	Ácido betulínico	39
2.4.1.1.1	Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido betulínico.....	42
2.4.1.1.2	Derivados del ácido betulínico	44
2.4.1.2	Lupeol.....	46
2.4.2	Grupos oleano y ursano.....	46
2.4.2.1	Ácido ursólico	48
2.4.2.1.1	Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido ursólico	50
2.4.2.1.2	Derivados del ácido ursólico	54
2.4.2.2	Ácido oleanólico	54
2.4.2.2.1	Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido oleanólico	56
2.4.2.3	CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico).....	57
2.4.2.3.1	Mecanismo molecular de inducción de apoptosis por el CDDO.....	58
2.4.2.3.2	Derivados del CDDO	61
2.4.2.4	Ácido boswéllico.....	62
2.4.2.4.1	Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido boswéllico	63
2.4.2.5	Ácido glicirrético y glicirrizina	64
2.4.2.6	Avicinas	65
2.4.2.6.1	Mecanismo de inducción de apoptosis por las avicinas.....	65
2.4.2.7	Taraxanos.....	66



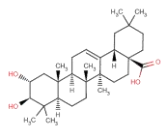
2.4.3	Grupo dammarano	67
2.4.3.1	Ginsenoides	67
2.4.3.1.1	Mecanismo de inducción de apoptosis por los ginsenoides.....	68
2.4.3.1.2	Derivados de los ginsenoides.....	69
2.4.4	Otros triterpenos.....	69
2.4.4.1	Iridiales.....	69
2.4.4.2	Gossypol	69
Capítulo 3.-	Mecanismos de inducción de apoptosis.....	71
3.1	Las caspasas.....	72
3.2	Rutas extrínsecas. Apoptosis inducida por receptores de muerte celular	76
3.2.1	Apoptosis mediada por el receptor CD95/Fas	77
3.2.2	Apoptosis mediada por los receptores TNFRs (TNFR1 /TNFR2)	79
3.2.2.1	Activación de TNFR1 y TNFR2	80
	▪ TNFR1	82
	▪ TNFR2	83
3.2.2.2	Proteínas mediadoras de la señal apoptótica inducida por TNFR.....	83
	▪ TRAFs.....	83
	▪ RIP.....	84
	▪ IAPs.....	84
	▪ A20	85
	▪ cFLIP	85
	▪ MAPKs.....	85
3.3	Ruta intrínseca. Vía mitocondrial de inducción de apoptosis	86
3.3.1	Familia de proteínas Bcl-2.....	89
3.4	JNK como regulador de apoptosis	92
3.5	Proteína tumoral p53	100
Capítulo 4.-	Objetivos.....	107
4.1	Determinación del potencial citotóxico del ácido maslínico.....	107
4.2	Determinación del efecto genotóxico del ácido maslínico en líneas tumorales.....	108
4.3	Análisis del efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular	108
4.4	Inducción de diferenciación celular en líneas cancerígenas	109
4.5	Cuantificación del grado y extensión de los procesos de apoptosis y/o necrosis.....	110
4.6	Mecanismos moleculares de inducción de apoptosis por el ácido maslínico	111
Capítulo 5.-	Materiales y métodos	113
5.1	Líneas celulares.....	113
	▪ Línea tumoral HT29	113



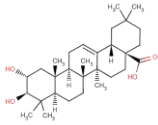
▪ Línea tumoral Caco-2	114
▪ Línea no transformada IEC-6	114
▪ Línea no transformada IEC-18	115
5.1.1 Subcultivos celulares.....	115
5.1.2 Almacenamiento celular y descongelación.....	115
5.2 Almacenamiento y vehiculización del ácido maslínico.....	116
5.3 Ensayos de citotoxicidad	117
5.4 Citometría de flujo	119
5.4.1 Análisis del ciclo celular.....	119
5.4.2 Análisis de apoptosis	122
5.5 Microscopía de fluorescencia.....	124
5.5.1 Tinción con anexina V-FICT / yoduro de propidio.....	124
5.5.2 Tinción con Hoechst.....	124
5.5.3 Electroforesis en microgel. 'Comet assay'	125
5.6 Electroforesis de DNA.....	126
5.7 Preparación de extractos.....	128
5.7.1 Preparación de extractos genéricos.....	128
5.7.2 Preparación de extractos para western de caspasas y proteínas apoptóticas.....	128
5.7.3 Preparación de extractos citosólicos para la detección de citocromo-c	130
5.8 Determinación de la concentración de proteínas	131
5.9 Actividad enzimática caspasa-3	131
5.10 Actividad enzimática fosfatasa alcalina	132
5.11 Análisis de expresión de proteínas. <i>Western blot</i>	133
Capítulo 6.- Resultados: Citotoxicidad y genotoxicidad.....	139
6.1 Citotoxicidad.....	139
6.1.1 Líneas tumorales.....	140
6.1.1.1 Línea tumoral HT29.....	140
6.1.1.2 Línea tumoral Caco-2	144
6.1.2 Líneas no transformadas.	145
6.1.2.1 Línea no transformada IEC-6	146
6.1.2.2 Línea no transformada IEC-18.....	148
6.2 Electroforesis en microgel. 'Comet assay'	150
6.2.1 Línea tumoral HT29.....	150
6.2.2 Línea tumoral Caco-2	153

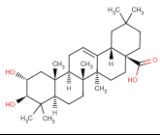


Capítulo 7.-	Resultados: Análisis del ciclo celular y diferenciación	157
7.1	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	157
7.1.1	Línea tumoral HT29	158
7.1.2	Línea tumoral Caco-2	162
7.1.3	Línea no transformada IEC-6	164
7.1.4	Línea no transformada IEC-18	166
7.2	Actividad enzimática fosfatasa alcalina	168
Capítulo 8.-	Resultados: Apoptosis	171
8.1	Análisis de apoptosis por citometría de flujo	171
8.1.1	Línea tumoral HT29	173
8.1.2	Línea tumoral Caco-2	174
8.1.3	Línea no transformada IEC-6	176
8.1.4	Línea no transformada IEC-18	178
8.2	Ensayos de microscopía	180
8.2.1	Microscopía óptica	180
8.2.1.1	Línea tumoral HT29	180
8.2.1.2	Línea tumoral Caco-2	181
8.2.2	Microscopía de fluorescencia	182
8.2.2.1	Tinción con Hoechst	183
8.2.2.1.1	Línea tumoral HT29	183
8.2.2.1.2	Línea tumoral Caco-2	183
8.2.2.2	Tinción con anexina V-FICT e yoduro de propidio	185
8.3	Electroforesis de DNA	187
8.4	Actividad enzimática caspasa-3	189
Capítulo 9.-	Resultados: Análisis de expresión de proteínas apoptóticas	191
9.1	Línea tumoral HT29	192
9.1.1	Niveles de expresión de caspasa-3	193
9.1.2	Niveles de expresión de caspasa-8	197
9.1.3	Niveles de expresión de caspasa-9	201
9.1.4	Niveles de expresión de caspasa-7	205
9.1.5	Niveles de expresión de citocromo-c citoplasmático	208
9.1.6	Niveles de expresión de Bcl-2	212
9.1.7	Niveles de expresión de Bax	215



9.1.8	Niveles de expresión de Bid	219
9.1.9	Niveles de expresión de p53	222
9.1.10	Niveles de expresión de JNK.....	226
9.2	Línea tumoral Caco-2.....	230
9.2.1	Niveles de expresión de caspasa-3	232
9.2.2	Niveles de expresión de caspasa-8	234
9.2.3	Niveles de expresión de caspasa-9	238
9.2.4	Niveles de expresión de Bid	242
9.2.5	Niveles de expresión de Bax	246
9.2.6	Niveles de expresión de Bcl-2	249
9.2.7	Niveles de expresión de JNK.....	252
Capítulo 10.-	Discusión.....	257
❖	El ácido maslínico.....	257
❖	Citotoxicidad inducida por el ácido maslínico	259
❖	El ácido maslínico produce un efecto genotóxico recuperable.....	264
❖	El ácido maslínico induce arresto celular en líneas tumorales	266
❖	El ácido maslínico induce diferenciación celular en líneas tumorales.....	272
❖	El ácido maslínico ejerce un efecto proapoptótico en líneas tumorales.....	274
❖	El ácido maslínico induce los cambios característicos de los procesos apoptóticos	278
❖	Mecanismo de apoptosis mediado por JNK y p53 en la línea tumoral HT29	282
❖	Mecanismo de apoptosis mediado por caspasa-8 y JNK en la línea tumoral Caco-2	290
❖	Mecanismo de apoptosis propuesto en las líneas tumorales de cáncer de colon HT29 y Caco-2	296
Capítulo 11.-	Conclusiones	301
Bibliografía.-	305
Apéndice I.-	Abreviaturas.....	335
Apéndice II.-	Índice de figuras y tablas	341
Apéndice III.-	Publicaciones	347

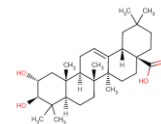




Capítulo 1

El ácido maslínico

Las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución mecanismos defensivos frente a patógenos, dando lugar a metabolitos secundarios capaces de comportarse como compuestos de alta actividad en una gran variedad de procesos biológicos. Estos procesos biológicos, aunque con maquinarias y funcionalidades diferentes, se ven afectados por la acción de estas moléculas, dando mayoritariamente una respuesta beneficiosa para la planta. El ácido maslínico (ácido 2- α , 3- β -dihidroxiolean-12-en-28-oico) es uno de estos fitometabolitos secundarios; se trata de un triterpeno pentacíclico de 472.7 g/mol, perteneciente al grupo de los oleano triterpenoides. En cuanto a su distribución, se encuentra poco repartido en la naturaleza (**García-Granados y col., 1998**), siendo particularmente abundante en la cera superficial del fruto y hojas del *Olea europea* (**Bianchi y col., 1994**). Aunque también ha sido descrita su presencia en otras plantas, como por ejemplo: *Cornus kousa* (**Sultana y Lee, 2007**), *Rhododendro collettianum* (**Ullah y col., 2007**), *Junellia aspera* (**Pungitore y col., 2007**), *Malus pumila* (**He y Liu, 2007**), *Hippophae rhamnoides* (**Yang y col., 2007**), *Durio zibetinus* y *Durio*

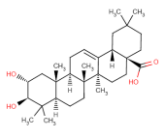


kutejensis (Rudiyansyah y Garson, 2006), *Punica granatum* (Wang R. y col., 2006), *Ulmus pumila* (Wang D. y col., 2006), *Galphimia glauca* (Nader y col., 2006), etc. aunque, en ninguna de estas plantas se encuentra en la misma cantidad que en *Olea europea*. La variedad de efectos causados por el ácido maslínico se explican por la gran cantidad de procesos biológicos que transcurren a través de rutas moleculares semejantes.

Los triterpenoides representan un amplio grupo de metabolitos secundarios de los que los ácidos triterpénicos son un subconjunto con una gran variedad de actividades biológicas. Los triterpenos pentacíclicos han sido identificados como los principales componentes de plantas medicinales utilizadas de forma tradicional y han mostrado, entre otros, efectos analgésicos, hepatoprotectores, antitumorales, anti-inflamatorios, antioxidantes y efectores del sistema inmune, tanto en su forma libre como formando aglicanos. De estos compuestos algunos de los más estudiados son los ácidos: betulínico, ursólico, oleanólico y boswélico, existiendo en la literatura científica abundantes trabajos sobre estos ácidos y sus derivados. El ácido maslínico, análogo estructural hidroxilado del ácido oleanólico, ha mostrado efectos parecidos e incluso en algunos casos más acentuados. Se han descrito multitud de actividades biológicas para el ácido maslínico entre otras: antioxidante, anti-inflamatoria, activador del sistema inmune, anticancerígena, antiviral, etc.

1.1 Triterpenos en *Olea europea*

Los triterpenoides son compuestos que se encuentran en abundancia en la piel del fruto de la *Olea europea*, protegiendo la integridad del fruto frente a insectos y agentes antimicrobiológicos (Bianchi, 2003). El consumo de aceite de oliva y de aceitunas de mesa está generalizado en la región mediterránea, siendo una rica fuente de compuestos con importantes propiedades biológicas (Owen y col., 2004). Los beneficios nutricionales de la oliva se han descrito tradicionalmente asociados a los ácidos monoinsaturados que posee, aunque actualmente se sabe que parte de estas propiedades probablemente se deben a muchos otros de sus micro constituyentes (Simopoulos, 2001). La proporción de triterpenos pentacíclicos presentes en *Olea europea*, ha sido descrita por varios autores (Bianchi y col., 1994; Saimaru y col., 2007; Stiti, Triki y Hartmann, 2007).



Así por ejemplo, **Stiti, Triki y Hartmann, (2007)** identificaron un total de dieciocho triterpenoides pentacíclicos presentes en el fruto de la *Olea europea* (**figura 1.1**). Estos tipos triterpenoides pueden clasificarse en función del esqueleto carbonado que poseen, encontrando que existen fundamentalmente cuatro grupos diferentes en *Olea europea*. En primer lugar tenemos los derivados del oleanano: β -amirina, β -amirona, 28-nor- β -amirina, δ -amirina, eritrodiool, ácido oleanólico y ácido maslínico; a continuación tenemos los derivados del ursano: α -amirina, 28-nor- α -amirina, uvaol, ácido ursólico; derivados del lupano: lupeol, lupenona, 3-epi-lupeol, 3-epi-betulina y ácido 3-epi-betulínico; y por último los derivados del taraxano: taraxerol, D-friedo-olean-14-ene-3 β -28-diol. Estos autores también hallaron trazas de butirospermol y bacchar-12,21-dien-3 β -ol, dos triterpenos tetracíclicos derivados de los esqueletos carbonados del eufano y baccharano, respectivamente. De todos estos triterpenos comentados, los derivados del oleanano son los que se encuentran en mayor proporción y dentro de estos el triterpeno mayoritario es el ácido maslínico.

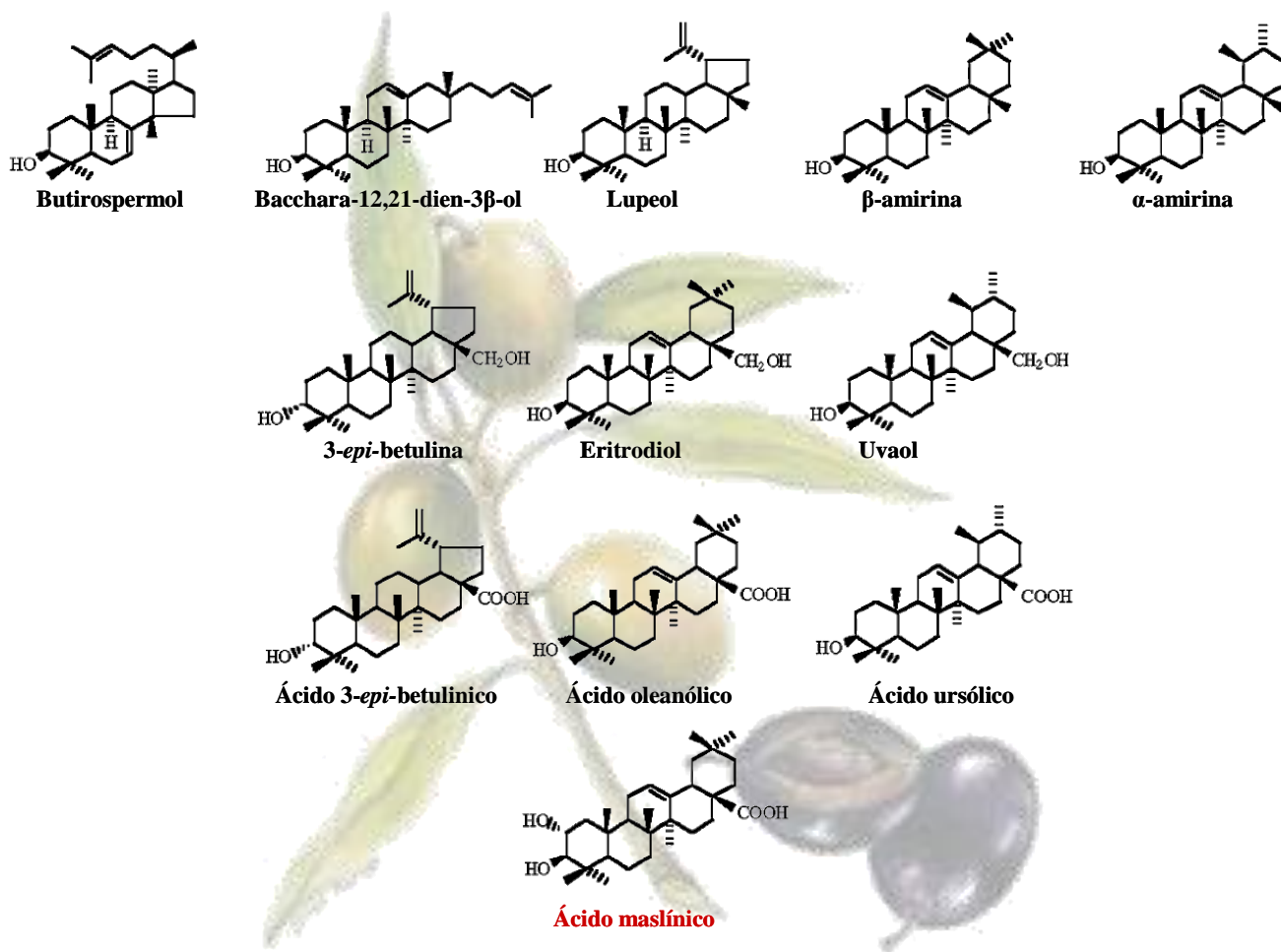
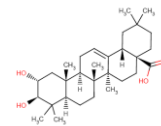
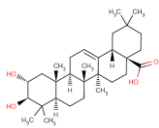


Figura 1.1 Estructura de los principales triterpenos tetra y pentacíclicos presentes en *Olea europea*. La proporción de triterpenos contenidos en el fruto maduro fue de: 0.2% de alcoholes triterpénicos, 0.6% de dialcoholes triterpénicos, 38% de ácidos triterpénicos y un 61% de ácido maslínico (**Stiti, Triki y Hartmann, 2007**).



Respecto a su síntesis, se ha descrito la obtención de triterpenos a partir de cultivos celulares de células de olivo (**Saimaru y col., 2007**). Tras inducir el crecimiento de los cultivos celulares, se estudió la proporción de triterpenos presentes en la suspensión de estos cultivos, se extrajeron un total de seis ursano derivados: ursólico, pomólico, rotúndico, torméntico, 2 α -hidroxiursólico y 19 α -hidroxiasiático, y dos oleanano derivados: ácido oleanólico y maslínico. Según estos autores, las cantidades de derivados del ursano fueron mayores que las cantidades de los derivados del oleanano. Refuerzan este hecho por la clonación a través PCR de una óxido escualeno ciclasa (OSC)-multifuncional denominada OEA partiendo de los mismos cultivos celulares. Según parece el principal producto de esta OEA es la α -amirina (esqueleto del ursano), mostrando una buena correlación con las altas concentraciones de triterpenos ursano derivados hallados. Lo que sugiere que esta OEA es la OSC que más contribuye a su producción. Aunque probablemente en los cultivos celulares *in vitro*, estos autores ciertamente obtuvieron grandes cantidades de ursano derivados, es indudable que en el fruto de la *Olea europea* los dos triterpenos mayoritarios son el ácido maslínico y el ácido oleanólico como indican diferentes autores (**Bianchi y col., 1994** y **Stiti, Triki y Hartmann, 2007**).

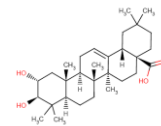
Estos últimos, **Stiti, Triki y Hartmann** en **2007**, describieron ampliamente la formación de triterpenoides a través de la ontogenia del fruto de la *Olea europea* (**tabla 1.1**). Seleccionaron frutos de *Olea europea* en 13 estados distintos de maduración y se cuantificaron los esteroides y triterpenos presentes en cada uno de estos estados. Esteroides y triterpenos son sintetizados a partir de una vía común acetato/mevalonato, compuestos que son los precursores comunes del óxido escualeno (OS). La posterior ciclación del óxido escualeno en cicloarterol o β -amirina constituye el punto divergente entre las rutas de síntesis de metabolitos primarios (esteroides) y secundarios (triterpenos). Los datos aportados por estos autores muestran que entre las semanas 12 y 18, los frutos poseen altas concentraciones de α y β -amirinas, así como una gran cantidad de compuestos oxigenados tales como los dioles triterpénicos: eritrodol y uvanol; así como los ácidos triterpénicos: oleanólico, ursólico y maslínico. En este estadio de desarrollo los precursores de esteroides fueron apenas detectables. A la semana 21, cuando el fruto alcanza su tamaño y su color final, disminuyeron las cantidades de α y β -amirinas, mientras que comienzan a formarse 4,4-dimetil y 4- α -metilesteroides, indicando una redirección del flujo metabólico de la ruta triterpenoide hacia la ruta de esteroides. Entre las semanas 21 y 30, los productos oxisteroides finales (mayoritariamente sitosterol) se acumularon, mientras que los dioles triterpénicos fueron reemplazados por los ácidos triterpénicos, esencialmente por el ácido maslínico.



Compuestos	Semanas de desarrollo				
	Semana 12 μg/g (p.s.)	Semana 18 μg/g (p.s.)	Semana 21 μg/g (p.s.)	Semana 30 μg/g (p.s.)	
Monoalcoholes	28-Nor-β-amirina	74	39	–	–
Triterpénicos	β-amirina	139	65	4	4
	28-Nor-α-amirina	25	11	–	–
	α-amirina	192	86	–	–
	Taraxerol	–	–	3	2
	Total	430 (13%)	201 (8%)	7 (0.2%)	6 (0.2%)
Dialcoholes	D-Friedo-olean-14-ene-3β-28-diol	8	7	1	1
Triterpénicos	Eritrodiol	401	253	14	13
	Uvaol	245	161	3	0,4
	3-epi-betulina	11	6	1	0,8
	Total	665 (21%)	427 (16%)	19 (0.5%)	15 (0.6%)
	Monohidroxiácidos	Ácido 3-epi-betulínico	21	15	25
Triterpénicos	Ácido oleanólico	1.257	932	1.616	929
	Ácido ursólico	6	6	9	4
	Total	1.285 (40%)	953 (37%)	1.650 (42%)	946 (38%)
Dihidroxiácidos	Ácido maslínico	830 (26%)	1.023 (39%)	2.250 (57%)	1.502 (61%)
Triterpénicos					
Cantidad total	3.210	2.604	3.926	2.469	

Tabla 1.1 Cambio en la proporción de triterpenoides durante el desarrollo del fruto de la *Olea europea*. Entre paréntesis las cantidades relativas de cada clase de compuesto. La desviación estándar S.D para las determinaciones cuantitativas fueron del ± 5% (Stiti, Triki y Hartmann, 2007).

Como puede observarse en la tabla superior en cualquier estadio de la planta los triterpenoides pentacíclicos representan la mayor cantidad de compuestos triterpénicos en el fruto de la *Olea europea* (Stiti, Triki y Hartmann, 2007). Los principales triterpenos en la piel del fruto de la oliva son el ácido maslínico y el ácido oleanólico con una concentración de 681 ± 63 mg/kg y 420 ± 20 mg/kg, respectivamente (Bianchi y col., 1994). Por tanto no es de extrañar que estos compuestos se encuentren de forma mayoritaria en los aceites obtenidos a partir de la molturación de la oliva, sin embargo, la proporción de triterpenos encontrada en el aceite es bastante menor que en el fruto (Pérez-Camino y col., 1999). Según estos autores la proporción de estos compuestos depende de la calidad del aceite. En el aceite oliva virgen extra con una acidez menor al 1%, el contenido de ácido maslínico es de 64.2 ± 8.1 mg/kg y de ácido oleanólico 57.3 ± 7.4 mg/kg, dependiendo de la variedad del fruto. Estos valores se incrementan hasta 193.9 ± 14.0 mg/kg para el ácido maslínico y 244.0 ± 28.1 mg/kg en el

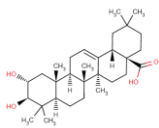


ácido oleanólico en el aceite virgen, esto se debe al proceso hidrolítico que tiene lugar durante su extracción, favoreciendo la eliminación de estos triterpenos de la piel. Mientras que el aceite de orujo contiene aproximadamente 721 mg/kg de ácido maslínico y 5.592 mg/kg de ácido oleanólico. El mayor incremento en triterpenos según disminuye la calidad del aceite se debe a que estos compuestos se encuentran sobre todo en la capa cerosa externa del fruto de la oliva, por lo que los sucesivos prensados y extracciones favorecen su eliminación. Este es el motivo por el que los compuestos triterpénicos se encuentran en mayor concentración en el aceite de orujo que en el aceite virgen, siendo por tanto el aceite de orujo una rica fuente de ácidos triterpénicos y compuestos esteroídicos. (Pérez-Camino y col., 1999).

Otros autores (Márquez-Martín y col., 2006a), describen que los principales triterpenos pentacíclicos presentes en la fracción no saponificable del aceite de orujo de oliva son el ácido oleanólico, maslínico, eritrodiol y uvaol. Todos estos compuestos poseen un grupo hidroxilo funcional en el C-3 en su estructura química, así como una función carboxílica o metanólica en la posición C-17. Según estos autores la proporción de ácido oleanólico y maslínico en el aceite de orujo es de un 0.1 % y de un 0.4 % respectivamente, estando las concentraciones de los triterpenos oleanólico, maslínico y eritrodiol entre 300-500 ppm.

Como muestran los datos aportados por Pérez-Camino y col. (1999), el ácido maslínico se encuentra a concentraciones elevadas, en la fracción no glicérica de aceite refinado de oliva, también llamado aceite de orujo. Este aceite es una mezcla de aceite refinado del bagazo de la oliva (residuo sólido obtenido después del primer prensado o centrifugación de la oliva, constituido por los residuos de las olivas, pieles y semillas) y aceite virgen. El aceite de orujo es el consumido de forma habitual en España y otros países mediterráneos (Pérez-Camino y col., 1999).

El consumo diario de estos triterpenos en aceitunas de mesa y en aceite de oliva podría ser de 34 mg de ácido maslínico y 25 mg de ácido oleanólico (Juan y col., 2006). La biodisponibilidad de este tipo de compuestos es de un 2.3 %, lo que ha sido confirmado para el ácido 23-hidroxibetulínico (Yang y col., 2005). Por tanto, el epitelio intestinal se vería expuesto a concentraciones elevadas de estos compuestos. Asumiendo que el 30 % de los mismos no son absorbidos en el intestino delgado la concentración de ácido maslínico y oleanólico en el colon sería de 86 μM y 66 μM respectivamente. Por otro lado, un consumo diario de 33 g de aceite de oliva virgen proporcionaría 6 mg de ácido maslínico y 8 mg de ácido oleanólico (Juan y col., 2006), mientras que un consumo diario de 33 g aceite de orujo proporcionaría 24 mg de ácido maslínico y 184 mg de ácido oleanólico. La determinación de la biodisponibilidad en

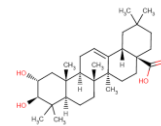


plasma de estos compuestos sería difícil de predecir, pero basándose en la biodisponibilidad del hidroxitirosol del aceite de oliva (Vissers y col., 2004), las concentraciones en plasma podrían ser de entre 1 a 5.5 μM (Márquez-Martín y col., 2006a).

Pese a que la extracción del aceite refinado de oliva, libera una cantidad superior de triterpenos pentacíclicos que la obtenida en la extracción del aceite de oliva virgen, la mayoría de estos compuestos continúan formando parte de los subproductos de molturación de la aceituna y de obtención del aceite (García-Granados y col., 2000). Entre estos subproductos se encuentran el alpechín, fracción acuosa de la aceituna con o sin adición de agua, orujos de diversos tipos, extraídos para el mejor aprovechamiento del aceite y en el caso de la extracción de aceite en dos fases se obtiene una masa o bagazo que contiene los restos de la pulpa, el hueso de la aceituna que junto con el agua de vegetación da lugar al subproducto conocido como alpeorujo (García-Granados y col., 1998). Estos autores han desarrollado un proceso de extracción de los ácidos oleanólico y maslínico, con valores de rendimiento muy elevados llegando a purzas superiores al 98% para cada uno de los compuestos. Las cantidades de ácido maslínico obtenidas por este procedimiento son considerables, permitiendo la explotación industrial del mismo (García-Granados y col., 1998).

1.2 Estructura del ácido maslínico

El ácido maslínico $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ (ácido (2 α ,3 β)-2,3-dihidroiolean-12-en-28-oico) es un triterpeno oleanano derivado de cinco anillos de seis elementos (figura 1.2). El precursor de este tipo de triterpenoides es el catión bacchareil, sobre el que se forma el anillo E de 6 elementos. El ácido maslínico como la mayoría de oleanano derivados posee una conformación con anillos 6-6-6-6-6 y configuración C-C-C-C(-C) (C: silla; B: bote). Posee dos sustituyentes hidroxilo en los carbonos C2 y C3, así como un grupo carboxilo en el carbono C28 y un doble enlace sobre los carbonos C12-C13. Según la nomenclatura de la IUPAC se trata del ácido (4aS, 6aR, 6aS, 6bR, 8aR, 10R, 11R, 12aR, 14bS)-10, 11-dihidroxi-2, 2, 6a, 6b, 9, 9, 12a-heptametil-1, 3, 4, 5, 6, 6a, 7,8, 8a, 10, 11, 12, 13, 14b -tetradecahidropiceno- 4a-carboxílico. Con nueve centros asimétricos, una masa molecular de 472,655 Da y un punto de fusión de 269-271 °C (Wen X. y col., 2005), posee una actividad óptica de +34° a una concentración de 0.20 g/100mL en metanol (Yamagishi y col., 1988) y una solubilidad molar



en agua pura a $\text{pH} = 7$ y $25\text{ }^\circ\text{C}$ de $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol/L, calculada utilizando el software ACD/Labs V8.14 (© 1994-2007 ACD/Labs). Químicamente, la estructura pentacíclica le confiere al ácido maslínico una gran estabilidad tanto desde el punto de vista químico como químico-físico, pero también cierta inercia química. Una característica común entre todos los ácidos triterpénicos, que relaciona sus estructuras y actividades biológicas, es la importancia del grupo carboxílico en la posición C-28 y el sustituyente, en este caso, el grupo hidroxilo en la posición C-3. (Serra y col., 1994).

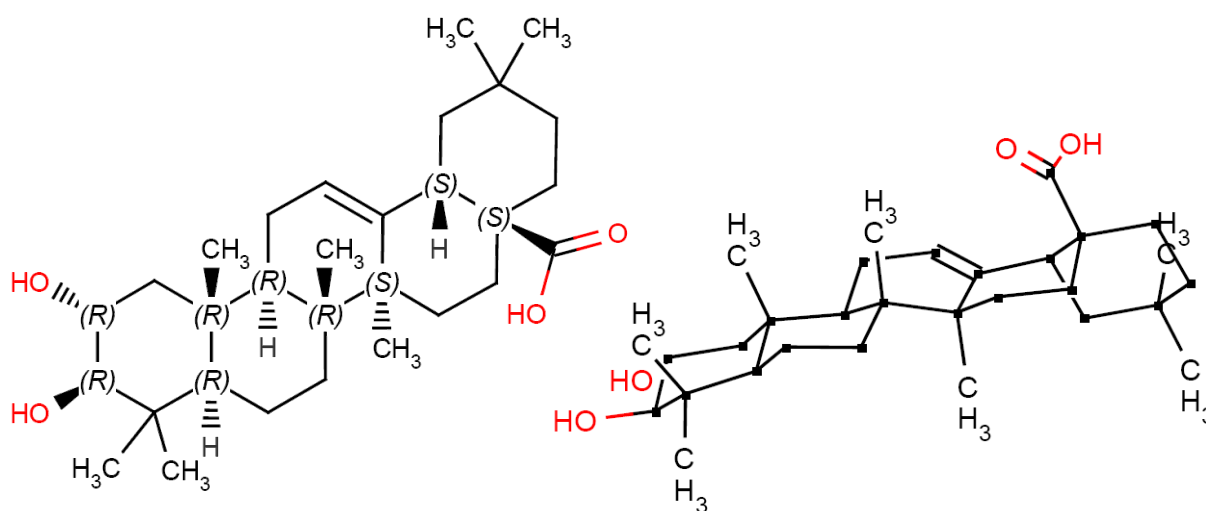
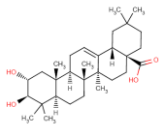


Figura 1.2 Estructura del ácido maslínico, en la que se muestra en primer lugar los sustituyentes y los centros quirales; en segundo lugar se muestra la conformación espacial (C-C-C-C(-C)) adoptada por la molécula de ácido maslínico.

Los diferentes oleanano triterpenoides de la *Olea europea* derivan de la formación de la β -amirina. Durante el proceso de síntesis de los triterpenos (figura 1.3), las diferentes óxido escualeno ciclasas (OSCs) generan numerosos derivados alcoholes triterpenos tetracíclicos, ya que los cationes tetracíclicos sufren frecuentemente reordenamientos electrónicos antes de neutralizarse por desprotonización o adición de una molécula de agua. La tetraciclación del (3S)-2,3-óxidoescualeno, por apertura del anillo del epóxido seguida por las ciclaciones catión \rightarrow π iniciales puede producir dos intermediarios catiónicos distintos que difieren en la configuración del anillo B, por un lado tenemos el catión protosteril con una conformación C-B-C y el catión dammarenil con una conformación todo-C. El esqueleto carbonado de los ácidos oleanólico y maslínico debe su conformación a la formación del catión dammarenil, a continuación la ampliación del cuarto anillo (anillo D) por la migración del C16 genera el catión baccharenil, que es seguida por la ciclación del anillo E hacia el C-18 β generando el catión lupenil. Por último, se produce la expansión del quinto anillo (anillo E) a través de la migración del C21, dando lugar al catión oleanil. Esta última expansión es seguida por una



serie de intercambios estereo-específicos y la neutralización del protón 12 α dando lugar a la β -amirina, con cinco anillos 6-6-6-6-6 y configuración C-C-C-C(-C), compuesto del que derivan la mayoría de los derivados oleano triterpenoides (Dzubak y col., 2006). En este proceso, la β -amirina sintasa, debe tener un control preciso sobre la geometría del plegamiento del sustrato acíclico dirigiendo la apertura del anillo del epóxido y las sucesivas ciclaciones catión \rightarrow π . Además debe estabilizar los intermediarios catiónicos y generar hasta ocho centros asimétricos durante la formación del sistema de cinco anillos carbocíclicos. (Kushiro, Shibuya y Ebizuka, 1998; Dzubak y col., 2006). La β -amirina tras sucesivas oxidaciones, catalizadas, probablemente, por enzimas del grupo de las p460-monooxigenasas genera el alcohol eritrodilol y los ácidos oleanólico y maslínico (Xu y col., 2004; Dzubak y col., 2006).

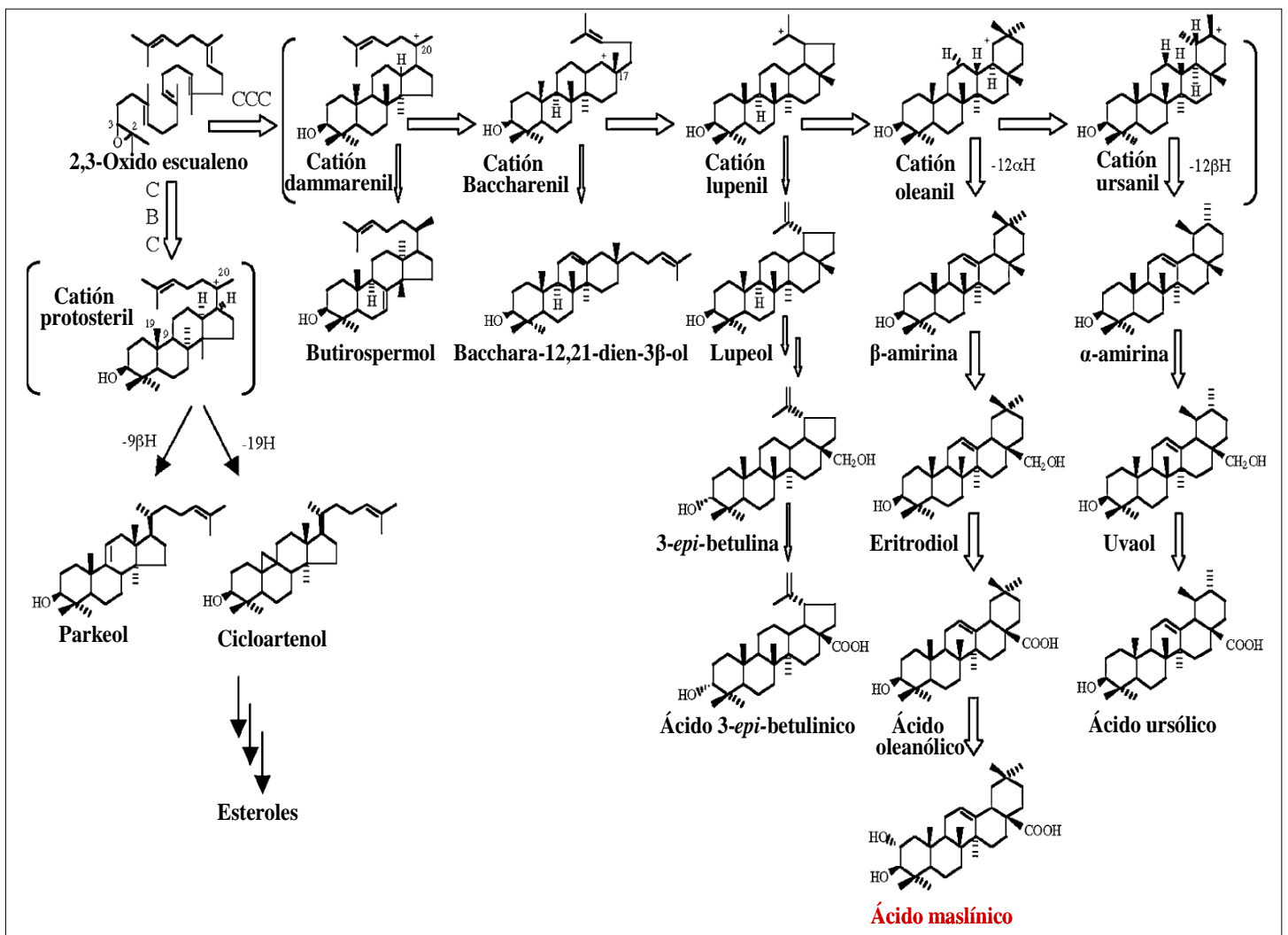
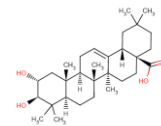


Figura 1.3 Ruta postulada para la biosíntesis de triterpenoides no esteroidicos en el fruto de *Olea europea*. Las siglas CCC y CBC hacen referencia a la conformación inicial del óxido escualeno (OS), todo pre-silla o pre-silla-bote-silla, dando lugar a los triterpenos esteroidicos y no esteroidicos, respectivamente. La magnitud de las flechas está en relación con las proporciones relativas en el flujo de carbonos entre las diferentes familias de compuestos (Stiti, Triki y Hartmann, 2007).



La presencia de un grupo hidroxilo adicional en el C-2 del ácido maslínico, podría conferir a este compuesto sus propiedades antioxidantes. Por ello y basándose en las características estructurales, el efecto antioxidante del ácido maslínico debería ser más potente que el del ácido oleanólico (**figura 1.4**) (Márquez-Martín y col., 2006a). Aunque esto en la práctica parece que no ocurre, debido a que el posible efecto antioxidante inducido por el ácido maslínico parece ser indirecto, no teniendo por si solo capacidad directa de captación de radicales libres (datos confirmados por nuestro grupo).

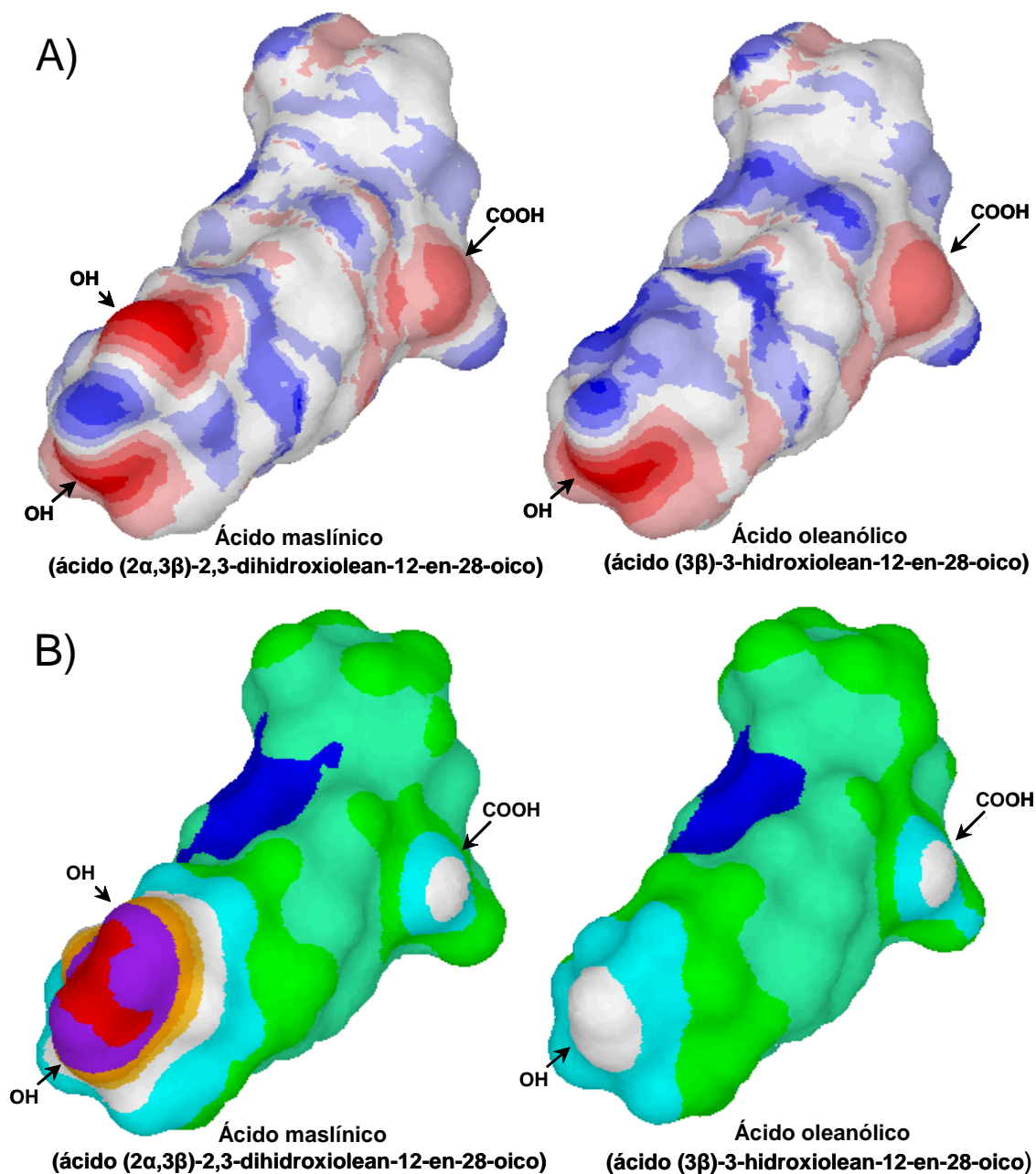
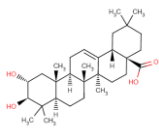


Figura 1.4 (A) Distribución superficial del potencial electrostático en las moléculas del ácido maslínico y del ácido oleanólico (**rojo**: zonas con mayor potencial de carga negativa; **azul**: zonas con carga positiva). (B) Distribución superficial del potencial hidrofóbico en las moléculas del ácido maslínico y del ácido oleanólico (**rojo**: zonas con menor potencial hidrofóbico, **verde-azul**: zonas con mayor potencial hidrofóbico).



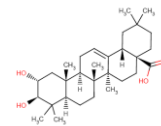
Modificaciones sobre la estructura de los oleanano triterpenoides, capaces de aumentar la electronegatividad del anillo A y C, tales como el derivado del ácido oleanólico CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico), incrementan significativamente el conjunto de sus bioactividades (Ito y col., 2000; Ito y col., 2001). En este sentido, el ácido maslínico podría ser un buen modelo para el posible desarrollo de agentes anti-inflamatorios (Márquez-Martín y col., 2006b). Se han sintetizado algunos derivados de este ácido, con el anillo A funcionalizado, añadiendo grupos, sulfitos, sulfato y epóxidos. También, se han obtenido varios derivados con el anillo A contraído, por diferentes tratamientos a partir de los grupos sulfato. Los triterpenos con el anillo A contraído se han aislado de forma natural. Estos son importantes sintones para la semisíntesis de derivados con el anillo A modificado los cuales muestran actividades biológicas, tales como el finastérido (García Granados y col., 2003).

Con el objetivo de obtener derivados con bioactividades potenciales, el grupo de García-Granados (García Granados y col., 2007), ha llevado a cabo la funcionalización del grupo gem-dimetil que se encuentra sobre el carbono C-4 en la estructura del ácido maslínico. Un derivado obtenido a partir de la oxidación del ácido maslínico sobre estos sustituyentes ha sido el ácido 24-hidroxi-maslínico o ácido hiptático-A (2α , 3β , 24-trihidroxiolean-12-en-28-oico) aislado previamente de *Hiptis capitata*. La regioselectividad de esta reacción se debe al grupo metilo axial sobre el C-4 del ácido maslínico, dando lugar al grupo C-24 hidroximetileno, esta regioselectividad también es debida a la presencia del sustituyente C-2-OR. En el caso del oleanólico, donde no existe el grupo C-2-OR, esta reacción forma hederagenina (23-hidroxi-oleanólico) (García-Granados y col., 2007).

Por oxidación continuada del ácido maslínico se han obtenido sesquiterpenos y nor-sesquiterpenos y a partir de la apertura oxidativa del anillo C de estos oleanotrienos, se generan diferentes sintones quirales, importantes para la síntesis de productos con actividades biológicas. (García-Granados y col., 2004).

1.3 Actividad anticancerígena del ácido maslínico

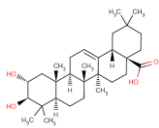
Muchos triterpenos pentacíclicos inducen apoptosis y poseen propiedades antitumorales. En esta tesis se ha estudiado el efecto anticancerígeno del ácido maslínico, así como el mecanismo molecular por el que tiene lugar, que además, podría ser común para un buen número de



triterpenos. En nuestro artículo, (Reyes y col., 2006) se describen parte de los resultados de la presente tesis al examinar la respuesta de las líneas celulares de carcinoma de colon, HT29 y Caco-2 al tratamiento con ácido maslínico. En resumen, a las concentraciones que el ácido maslínico inhibe la proliferación celular un 50% (IC₅₀) y un 80% (IC₈₀), se observaron los siguientes fenómenos (los cuales son ampliamente descritos en el resto de la presente tesis):

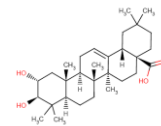
- a) Inhibición de la proliferación celular unida a un fuerte arresto en las fases del ciclo G₀/G₁, siendo este arresto más acentuado sobre la línea celular HT29. Este fenómeno junto con el incremento, concentración dependiente, de la actividad fosfatasa alcalina, indicó que el ácido maslínico también genera diferenciación celular en las células de carcinoma de colon, siendo más acentuada sobre las células HT29.
- b) En nuestro artículo también se describe la inducción de apoptosis por el ácido maslínico, cuantificada por tinción con anexina V-FICT e ioduro de propidio (IP). Esta inducción de apoptosis está unida a la aparición de fenómenos apoptóticos tales como: cambios morfológicos, disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y aparición de cuerpos apoptóticos, observados por microscopía de fluorescencia y tinción con Hoescht; fragmentación del DNA, visible por electroforesis en gel de agarosa, donde la fragmentación en escalera típica del DNA apoptótico es clara; por último incremento en la actividad enzimática y en la expresión del enzima caspasa-3.
- c) En este artículo se describe, además, parte del mecanismo molecular por el que tienen lugar estos eventos, haciendo hincapié en la participación de la ruta intrínseca de permeabilización de la mitocondria, lo que fue observado por la liberación de citocromo-c al citosol y teniendo en cuenta que la ruta de inducción de apoptosis ha de ser p53 independiente para el caso de las células Caco-2 (ya que este tipo celular es doblemente negativo para la expresión de esta proteína).
- d) Por último, se ha observado cierto efecto diferencial, en la acción del ácido maslínico, con respecto a las líneas no tumorales del epitelio intestinal de rata IEC-6 e IEC-18. La incubación con ácido maslínico no alteró el ciclo celular ni indujo apoptosis en estas líneas, no observándose expresión alguna de caspasa-3.

Estos hallazgos soportan el papel del ácido maslínico como supresor de tumoral, así como su posible uso terapéutico contra el carcinoma de colon. En este artículo se demuestra que el ácido maslínico induce un significativo efecto antiproliferativo a través de la inducción de



procesos apoptóticos caracterizados por la activación de caspasa-3, mediante un mecanismo molecular independiente de p53, el cual ocurre por la desorganización mitocondrial y la liberación de citocromo-c (Reyes y col., 2006). A pesar de ser publicado en octubre de 2006, este artículo se envió por primera vez en enero de 2005, aunque no fue publicado hasta que no se demostró parte del mecanismo molecular de inducción de apoptosis, el cual está completamente descrito en la presente tesis. Por todo ello consideramos que somos los primeros autores en demostrar los fenómenos apoptóticos y diferenciadores producidos por este compuesto. Posteriormente a nuestros ensayos, otros autores, pertenecientes al Instituto de la Grasa del CSIC en Sevilla, llevaron a cabo experiencias con un alto porcentaje de analogía a las realizadas por nuestro grupo, utilizando sólo el tipo celular HT29 y un extracto triterpénico derivado de la oliva que contenía una mezcla de los ácidos maslínico y oleanólico. En consecuencia estos autores afirman que la aparición de citotoxicidad inducida por este compuesto se debe a fenómenos de apoptosis y a cambios en la progresión del ciclo celular (Juan y col., 2006). Ni en ese artículo, ni en el publicado posteriormente por Martín y col., en 2007, se muestran evidencias del mecanismo molecular de inducción de apoptosis por el ácido maslínico.

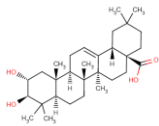
Juan y col. describen en octubre de 2006 el efecto sobre proliferación celular y apoptosis en la línea HT29 de un extracto de la piel del fruto de *Olea europea* compuesto por triterpenos pentacíclicos con un porcentaje muy elevado de los ácidos maslínico 73,2% y oleanólico 25,75%. Estos estudios muestran un efecto antiproliferativo con una IC_{50} , calculada en conjunto, de $73,96 \pm 3,19 \mu\text{M}$ para el ácido maslínico y $25,56 \pm 2,55 \mu\text{M}$ para el ácido oleanólico sin mostrar necrosis tras 72 h de incubación. Los autores afirman que ha de tratarse de apoptosis, porque la incubación de las células HT29 durante 3h a concentraciones de $10 \mu\text{M}$ a $250 \mu\text{M}$ de ácido oleanólico y de $3,7 \mu\text{M}$ a $92,5 \mu\text{M}$ de ácido maslínico produjeron una viabilidad del $96,8 \pm 0,3 \%$. Este porcentaje baja ligeramente a la concentración de $300 \mu\text{M}$ de ácido maslínico y $11 \mu\text{M}$ de ácido oleanólico. Sin embargo no especifican como evitaron que estos compuestos precipitaran tras ser diluidos en el medio de cultivo a las altas concentraciones empleadas. A continuación, realizaron un 'time course' para determinar cuando el ácido maslínico activaba la caspasa-3 exponiendo las células HT-29 a una concentración de $150 \mu\text{M}$ de ácido maslínico y $55,5 \mu\text{M}$ de ácido oleanólico, encontrando que esta era ya de un 400% respecto al control a las 24h de tratamiento, alcanzando un 600% después de 36h-48h. Otro extracto que contenía 250 y $92 \mu\text{M}$ de maslínico y oleanólico, respectivamente, activó la caspasa-3 a las 12h de tratamiento siendo el grado de activación con este extracto 18 veces respecto al control a las 48h de tratamiento. La activación de caspasa-3 también mostró ser



dosis dependiente. En este punto en el que las dosis utilizadas son de más del doble e incluso del triple de las IC_{50} encontradas, es lógico que observen unos índices elevados de apoptosis en periodos no muy largos de incubación. La apoptosis fue confirmada por la observación microscópica de cambios en la permeabilidad de la membrana pasando de un 8% de células teñidas a las 8h a un $40,9 \pm 3,9$ % de células teñidas tras 24h. La detección de la fragmentación del DNA fue de un $24,5 \pm 1,5$ % en las células HT29 incubadas durante 24h con el extracto de $150 \mu\text{M}$ y $55,5 \mu\text{M}$ de ácido maslínico y oleanólico, respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos por microscopía de fluorescencia mediante tinción con Hoechst.

Por otro lado, con un extracto diferente que contenía $200 \mu\text{M}$ de ácido maslínico y $75 \mu\text{M}$ de ácido oleanólico se incrementó seis veces la actividad caspasa-3 respecto al control. La apoptosis fue inducida por una ruta intrínseca como demuestra la producción de aniones superóxido en la mitocondria de las células tratadas con un extracto de $150 \mu\text{M}$ y $55,5 \mu\text{M}$ de ácidos oleanólico y maslínico, respectivamente. Según estos autores, su trabajo muestra por primera vez, la inhibición de la proliferación celular sin citotoxicidad y la inducción de apoptosis en las células de colon por los ácidos maslínico y oleanólico presentes en el fruto del olivo, aunque en realidad y como se ha mencionado anteriormente, nuestro trabajo fue enviado para su publicación con anterioridad al de estos autores. Además, en su trabajo hacen referencia a que la inducción de apoptosis fue precedida de un aumento del anión superóxido, por lo que afirman que ésta debe iniciarse a través de la ruta intrínseca o por un mecanismo efector mediado por la mitocondria (Juan y col., 2006). Todo esto, les lleva a hipotetizar sobre la activación de la ruta de apoptosis intrínseca clásica, sin aportar prueba alguna, como sería por ejemplo la liberación de citocromo-c, activación de caspasa-9, etc..

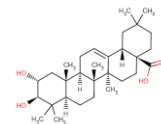
Durante el transcurso de la escritura de la presente tesis apareció el artículo publicado por Martin y col. (2007), en el que se muestra, mediante técnicas de citometría y microscopía de fluorescencia, que un extracto de los ácidos maslínico y oleanólico, produce apoptosis sobre células de astrocitoma, hipotetizando sobre el posible mecanismo molecular de estos compuestos. En ese artículo se examina como afectan, los ácidos oleanólico y maslínico, aislados de *Olea europea*, a la supervivencia y morfología de los astrocitos. Según estos autores la proliferación celular fue inhibida en la línea 1321N1 de astrocitoma utilizando de 1 a $50 \mu\text{M}$ de cada uno de los ácidos oleanólico o maslínico, con una IC_{50} de $25 \mu\text{M}$. La inhibición del crecimiento celular fue precedida por alteraciones morfológicas y del citoesqueleto asociadas con la pérdida de la morfología estrellada, caracterizada por una retracción del citoplasma y el colapso de las fibras de actina. Utilizando 4',t-diamino-2-



fenilindol y anexina V, mostraron que la muerte celular inducida por los ácidos oleanólico y maslínico fue mayoritariamente debida a apoptosis. La actividad caspasa-3 también se incrementó como consecuencia del tratamiento con estos triterpenos. La exposición de las células al oleanólico o al maslínico produjo un incremento significativo de las especies oxígeno reactivas intracelulares (ROS), seguida por una pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial. Por último, captadores de radicales libres enzimáticos como la catalasa o antioxidantes fenólicos, como el butirato-hidroxitolueno, impidieron la apoptosis mediada por estos triterpenos, sugiriendo que el efecto terapéutico potencial de estos ácidos triterpénicos depende del estrés oxidativo. La principal conclusión a la que estos autores llegan es que la inducción de apoptosis por los ácidos oleanólico y maslínico, sucede con un incremento importante de la producción de ROS. Hecho común para la práctica mayoría de los mecanismos de inducción de apoptosis descritos (ver capítulo 3).

Estos autores también apuntan a la falta de evidencias en la regulación de NF-kB en las células de astrocitoma por la presencia de estos ácidos triterpénicos. Sin embargo, según explican, la activación de NF-kB inducida por TNF α es potenciada o atenuada en presencia del ácido maslínico o del ácido oleanólico, demostrando a pesar de sus conclusiones, que estos compuestos afectan de alguna manera a esta ruta. La modulación de la ruta de NF-kB es un mecanismo clave en el proceso antitumoral inducidos por varios triterpenos, tales como el celastrol (Sethi y col., 2007) o como el CDDO (Stadheim y col., 2002), el CDDO-imidazol (Han y col., 2006) o el CDDO-Me (Shishodia y col., 2006). Este hecho es corroborado por nuestros resultados ya que la aparente activación o inhibición de NF-kB puede explicarse por un mecanismo inducción de apoptosis a través de la ruta de JNK. Según el mecanismo propuesto en la presente tesis, la activación temporal de JNK, induciría la activación de NF-kB inhibiendo el proceso de apoptosis y desencadenando fenómenos propios del proceso inflamatorio. Lo que ha sido descrito por estos mismos autores (Márquez y col., 2006b). Por otro lado, la activación continua de la ruta de inducción de apoptosis por JNK, soslayaría la inducción de NF-kB y daría lugar a los fenómenos apoptóticos descritos, así como a la inhibición de los procesos desencadenados por NF-kB.

La inducción de citotoxicidad por el ácido maslínico sobre diferentes líneas tumorales también ha sido descrita por otros autores, aunque sin aportar datos sobre como tiene lugar esta actividad anticancerígena. Así, se ha descrito la citotoxicidad producida por los triterpenos aislados de *Physocarpus intermedius* (Kim, Yoom y Ryu, 2000). Se aislaron un total de siete triterpenos, entre los que se encontraba el ácido maslínico, determinando su citotoxicidad frente

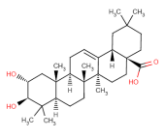


a cinco líneas tumorales humanas: A549 (cáncer de pulmón), SK-OV-3 (cáncer de ovario), SK-MEL-2 (melanoma), XF49 (cáncer del sistema nervioso central) y HCT-15 (cáncer de colon). Siendo los valores de concentración que causan el 50 % de la inhibición de la proliferación celular (ED_{50}), para el caso del ácido maslínico, los siguientes: ED_{50} (A549) = 19.4 ± 0.3 $\mu\text{g/mL}$; ED_{50} (SK-OV-3) = 18.4 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$; ED_{50} (SK-MEL-3) = 19.8 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$; ED_{50} (XF498) > 30 $\mu\text{g/mL}$; ED_{50} (HCT15) = 15.3 ± 0.3 $\mu\text{g/mL}$.

En el cultivo de tejido de *Eriobotria japonica*, se produjeron un total de nueve triterpenos en cantidades significativas, entre los que se encontraba el ácido maslínico (Taniguchi y col., 2002). Todos los triterpenos aislados mostraron un efecto inhibitorio sobre la activación del virus de Epstein-Barr inducida por TPA, así como sobre la carcinogénesis de dos estados en piel de ratón. También produjeron citotoxicidad sobre varias líneas celulares: HSC-2 (carcinoma oral escamoso humano), HSG (tumor de la glándula salivar) y la línea de fibroblastos gingivales, HGF. La CC_{50} (concentración citotóxica al 50%) para el caso del ácido maslínico fue de 21 $\mu\text{g/mL}$ en HSC-2, 26 $\mu\text{g/mL}$ en HSG y de 24 $\mu\text{g/mL}$ en HGF.

La actividad antiproliferativa del ácido maslínico, aislado de la flor de *Pumica granatum*, presentó una IC_{50} de 7,1 μM en células de leucemia humana CCRF-CEM y de 29,7 μM en la línea tumoral resistente a drogas CEM /ADR 5000. (Wang Y.F. y col., 2006). Se aislaron varios triterpenos de la raíz de *Ulmus pumila* entre los que se encontraba el ácido maslínico (Wang D. y col., 2006). La citotoxicidad determinada por estos autores para el ácido maslínico fue de 38,53 $\mu\text{g/mL}$ en células HeLa, 26,44 $\mu\text{g/mL}$ en células A375 y de 34,34 $\mu\text{g/mL}$ en células MCF-7. A partir de la piel de manzana, *Malus pumila*, se aislaron un total de 13 triterpenos, se determinó sus efectos antiproliferativos contra la línea de cáncer hepático HepG2, MCF-7. Los valores de EC_{50} (50% de actividad antiproliferativa) para el caso del ácido maslínico tras 96 h de incubación fueron: EC_{50} (HepG2) = $69,1 \pm 2,0$ μM ; EC_{50} (MCF7) = $136,0 \pm 2,3$ μM (He y col., 2007).

Además, se han desarrollado otros ensayos relacionados con la capacidad antitumoral, entre estos se encuentran la capacidad de inhibición de las DNA topoisomerasas y DNA polimerasas. Las DNA topoisomerasas y las DNA polimerasas son enzimas que juegan un papel crucial en eventos tales como replicación, transcripción, recombinación y segregación de los cromosomas durante la mitosis. Inhibidores de estas enzimas podrían tener un papel importante como antitumorales (Pungitore y col., 2007). El bloqueo selectivo de estas enzimas, capaz de reparar el DNA por agentes no tóxicos también podría potenciar el efecto de los antitumorales

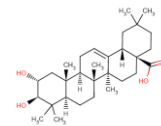


clásicos como la bleomicina (agente alquilante del DNA), el cisplatino, y la neocarzinostatina (Ma y col., 1999). Estos autores utilizaron el bioensayo de inhibición de la DNA polimerasa β , para orientar el aislamiento de los compuestos bioactivos de *Tetracera boliviana*. Se encontraron tres triterpenos entre ellos dos derivados del ácido maslínico: ácido 3-cis-p-coumaroil maslínico, y ácido 3-trans-p-coumaroil maslínico. La actividad inhibitoria sobre la DNA polimerasa β con el primer derivado presentó una IC_{50} (concentración que inhibe el 50% de actividad enzimática) de 15 μM en presencia de BSA y 7,5 μM en ausencia de la misma, para el segundo derivado la IC_{50} fue de 4,2 μM en presencia de BSA y 2,0 μM en su ausencia. La geometría del doble enlace del grupo coumaroil parece ser importante para la inhibición de la DNA polimerasa β . Además, potenciaron el efecto de la bleomicina sobre células P-388D1. La bleomicina no presenta citotoxicidad a concentraciones de 75 nM pero al añadir una concentración de 10 μM de estos compuestos se produjo una reducción cercana a un 30 % en el número de células del cultivo. Por último, se ensayaron distintos triterpenoides aislados de *Junellia aspera* frente a la DNA topoisomerasa I y Taq-DNA polimerasa (Pungitore y col., 2007). El ácido maslínico y su diacetil derivado mostraron actividad inhibitoria frente a la DNA topoisomerasa con una IC_{50} del rango de 76-80 μM así como una inhibición sobre el crecimiento de varias líneas tumorales con GI_{50} (concentración que inhibe el 50% de crecimiento) en un rango de 5-18 μM .

1.4 Actividad antioxidante del ácido maslínico

Aunque resultados relacionados con la propiedad antioxidante del ácido maslínico han sido obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis, no han sido reflejados en este trabajo final, debido fundamentalmente a motivos coyunturales (principalmente por carencia de tiempo). Asimismo, aunque las propiedades antioxidantes del ácido maslínico se han descrito por varios autores, no se ha determinado aun el mecanismo molecular responsable de estos resultados, llegando a ser en ocasiones incluso contradictorios.

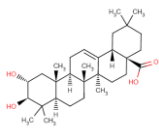
La oxidación forma parte de varios procesos degenerativos tales como la aterosclerosis y la edad. La susceptibilidad de un organismo al daño oxidativo depende del balance de prooxidantes y antioxidantes. Siendo el efecto de oxidantes sobre la susceptibilidad a la oxidación del plasma importante desde este punto de vista. (Montilla y col., 2003). Así, estos autores investigaron, en rata, el efecto del ácido maslínico sobre la susceptibilidad del plasma sanguíneo y de la membranas de hepatocitos a la peroxidación lipídica (LPO). El pretratamiento



con CCl_4 incrementó los niveles endógenos de LPO entre 3,4 a 1,5 veces, el pretratamiento con ácido maslínico a 50-100 mg/kg redujo estos niveles significativamente en un 18 %. Por otro lado, la susceptibilidad del plasma a la LPO inducida por el radical OH^\bullet , *ex vivo*, se redujo de forma dosis dependiente gracias al pretratamiento con el ácido maslínico, siendo de esta reducción de un 6,5 % a una dosis de 50 mg/kg y de un 19 % a una dosis de 100 mg/kg. La reducción obtenida con silimarina fue similar, lo que muestra que el ácido maslínico es capaz de activar mecanismos antioxidantes endógenos. Por último, estudios realizados sobre membranas de hepatocito, mostraron que la co-incubación del ácido maslínico con el sistema oxidante, Fe^{+3} /ascorbato previno de LPO, efecto mostrado por reducción de TBARS (sustancias tiobarbutirato reactivas) (Montilla y col., 2003).

El estrés oxidativo está íntimamente relacionado con los procesos inflamatorios. Los macrófagos que juegan un importante papel en los mecanismos defensa, generan, cuando son activados, especies oxígeno y nitrógeno reactivas, tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y nitrilo, sustancias mediadoras del proceso inflamatorio. Además, estas células sobreproducen citoquinas tales como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), durante el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Los triterpenos han sido descritos como importantes agentes anti-inflamatorios, siendo el ácido oleanólico uno de los más estudiados, este compuesto es un eficaz inhibidor de la ciclooxigenasa y de la 5-lipooxigenasa, enzimas presentes en la cascada del araquidónico (Márquez-Martín y col., 2006b). El ácido maslínico posee una estructura química que difiere del ácido oleanólico por la presencia de un grupo hidroxilo en la segunda posición, por lo que le sería de suponer propiedades similares frente a estos fenómenos. Tras el tratamiento con ácido maslínico de macrófagos de ratón, estimulados con LPS, se midieron las concentraciones de IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ en el medio de cultivo, siendo la secreción de estas citoquinas reduciéndose significativamente a las concentraciones de 50 μM y 100 μM de ácido maslínico, aunque de forma no claramente dosis dependiente (Márquez-Martín y col., 2006b).

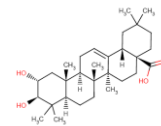
Por otro lado, estos autores no observaron inhibición por el ácido maslínico de la actividad radicalaria del NO, aunque si fue capaz de inhibir significativamente la producción de NO inducida por el lipopolisacárido (LPS), con una IC_{50} de 25.4 μM . Este efecto podría ser consecuencia de la inhibición en la expresión de iNOS más que una inhibición directa sobre esta enzima. Por último, el ácido maslínico inhibió la producción de nitritos de forma dosis dependiente, con un efecto similar al compuesto de referencia L-NAME. Una dosis de 100 μM suprimió completamente la producción de nitritos. Sin embargo esta dosis presentaba un 30 %



de citotoxicidad. Dado que la producción de NO está unida a la estimulación de la actividad de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y que las citoquinas estimulan la transcripción de esta enzima, la inhibición de la producción de TNF α e IL-6 podría ser la responsable de la inhibición de la producción de NO debida a la acción del ácido maslínico.

Con respecto a los radicales oxigenados, la preincubación de los macrófagos con maslínico tampoco afectó a la producción del anión superóxido inducido por la estimulación con PMA (12-miristato-13-acetato-forbol). Lo que indicó que las NADPH-oxidasas no son inhibidas por este compuesto, ni tampoco fue capaz de captar del radical superóxido. Sin embargo, el ácido maslínico redujo la formación de peróxido de hidrógeno, de forma similar a como lo haría la catalasa a una concentración de 1.250 U/mL. Esta inhibición se produjo de forma dosis dependiente con una IC₅₀ de 43,6 μ M. Por último, se comprobó que el ácido maslínico no ejerce una actividad *scavenger* directa sobre el H₂O₂. Lo que refuerza la teoría de que el ácido maslínico no posee una capacidad antioxidante *per se*, sino que estimula de alguna forma los sistemas antioxidantes celulares (Márquez-Martín y col., 2006a). Otros autores (Wang R y col., 2006) aislaron ácido maslínico del extracto etanólico de las flores de *Púnica grantum*. Este mostró actividad antioxidante evaluada por la susceptibilidad de la lipoproteína LDL a la oxidación. Los resultados mostraron que el ácido maslínico disminuyó en plasma la producción del dieno conjugado a LDL (CD) de forma dosis dependiente, siendo de 10,6 \pm 1,3 % a 50 μ g/mL, 39,7 \pm 1,8 % a 5 μ g/mL, y de 57,8 \pm 2,7 % a 0,5 μ g/mL.

Recientemente, Yang y col., (2007) han descrito las propiedades antioxidantes de dos derivados del ácido maslínico. Estos autores aislaron, a partir de la fracción cloroformo-soluble del extracto de *Hippofae ramnoides*, ácido maslínico y dos nuevos triterpenoides: el ácido 2-O-trans-p-coumaroil maslínico y el ácido 2-O-cafeoil maslínico. Estos compuestos fueron capaces de inhibir la producción de NO en células RAW 264.7 (macrófagos de ratón recombinantes activados tanto por LPS como por interferón γ), siendo los valores encontrados de IC₅₀: 43,8 μ M para el 2-O-trans-p-coumaroil maslínico y 50,7 μ M para el maslínico, produciendo la mayor inhibición el 2-O-cafeoil maslínico siendo su IC₅₀ de 7,6 μ M. Los dos primeros no manifestaron actividad como neutralizadores de radicales libres frente al DPPH (1,1-difenil-2-picrylhidrazil), sin embargo el 2-O-cafeoil maslínico fue capaz de neutralizar al radical DPPH con una IC₅₀ de 34,7 μ M. Por tanto, se puede concluir que la mayor capacidad antioxidante, así como la capacidad *scavenger* depende mayoritariamente de la presencia de un anillo aromático sustituido con grupos hidroxilo, variando su efectividad en función de la cantidad de grupos hidroxilo que posea (Yang y col., 2007).



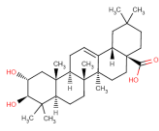
1.5 Otras propiedades mostradas por el ácido maslínico.

1.5.1 Efecto inmuno-modulador

Se ha investigado el efecto de los triterpenos presentes en la fracción no glicérica del aceite de orujo de oliva sobre la producción de citoquinas (glicoproteínas solubles, que participan en la inicialización, mantenimiento y regularización de la respuesta inmunológica, homeostasis y en procesos inflamatorios) en células mononucleadas de sangre periférica (PBM). Uvaol, eritrodíol y el ácido oleanólico disminuyeron significativamente la producción de $\text{TNF}\alpha$ a 100 μM ; sin embargo, a 10 μM , uvaol y oleanólico activaron la generación de $\text{TNF}\alpha$. Por otro lado, el ácido maslínico no alteró significativamente la concentración de citoquinas, con la excepción de una leve inhibición a 100 μM sobre la IL-6. En estos procesos inflamatorios participan también las quimioquinas (proteínas atrayentes, tales como I-309/CCL1 y monoquina inducida por $\text{IFN}\gamma$ o MIG/CXCL9). Los cuatro triterpenos inhibieron la producción de I-309, a 50 μM y 100 μM , sin embargo, el uvaol activó la producción de I-309 a 10 μM . Los dialcoholes triterpénicos tienen un efecto similar sobre la producción de MIG. Esta inhibición podría explicar el efecto anti-inflamatorio observado, y podría estar mediada por la inhibición de la ruta de NF-kB. Sin embargo, la naturaleza bifásica inducida por estos compuestos en la producción de $\text{TNF}\alpha$, MIG e I-309, sugiere que bajas concentraciones podrían activar las citoquinas en lugar de inhibirlas. Por tanto, se concluye que los triterpenos pentacíclicos ensayados muestran propiedades tanto anti-inflamatorias como proinflamatorias dependiendo de su estructura química y de la dosis empleada, aunque no explican el por qué se dan unas propiedades u otras (Márquez-Martín y col., 2006b).

1.5.2 Efecto vaso-modulador

Hasta ahora no había información disponible sobre las propiedades de los compuestos triterpénicos en la vasomodulación de animales hipertensos (Rodríguez-Rodríguez y col., 2006). Estos autores analizaron el efecto del ácido oleanólico, maslínico, eritrodíol y uvaol sobre la vasorelajación, en aorta aislada de ratas hipertensas (SHR). Todos los triterpenos aislados indujeron una vasorelajación dosis dependiente. En esta vasorelajación participó de alguna forma la producción de NO, ya que la respuesta disminuyó tras tratar con L-NAME, inhibidor de la NO sintasa. Por otro lado, la presencia de indometacina, inhibidor de la síntesis de



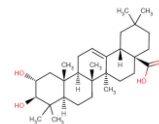
prostaglandinas, no tuvo efectos significativos. Tampoco lo tuvo el ICI-192.604, sustancia bloqueante de los receptores de tromboxanos A₂. Por último, la combinación de L-NAME e indometacina disminuyó la vasorelajación inducida por el ácido maslínico y el eritrodíol.

1.5.3 Efecto anabólico

Otros estudios, realizados en nuestro laboratorio, evaluaron los efectos del ácido maslínico sobre el crecimiento, recambio proteico y concentración de ácidos nucleicos en hígado de la trucha arcoiris (**Fernández-Navarro y col., 2006**). Partieron de peces de 20g, siendo alimentados durante 225 días con una dieta que contenía 0.1, 5, 25 y 250 mg de ácido maslínico por kg de dieta. Al final, se determinó el peso total, el peso del hígado y el coeficiente de crecimiento siendo mayor en truchas alimentadas con el ácido maslínico que en las truchas controles. El peso final en las truchas alimentadas con 250 mg/kg de ácido maslínico fue un 30 % superior al control. Además, el DNA total hepático, utilizado como marcador de hiperplasia, fue superior en un 37 % con la dosis de 25 mg/kg y un 68 % a la de 250 mg/kg respecto al control. La síntesis de proteína hepática fraccional y absoluta fue significativamente superior respecto al control. Este incremento se produjo también de forma significativa en la eficiencia de la capacidad de síntesis de proteínas. Los estudios de microscopía mostraron que los hepatocitos de truchas alimentadas con 25 y 250 mg/kg de ácido maslínico, parecían ser más compactos, con un mayor retículo endoplasmático rugoso y un mayor almacenaje de glucógeno que en truchas control. Todos estos resultados sugieren que el ácido maslínico puede actuar como un factor de crecimiento cuando es adicionado en la dieta. Resultados semejantes fueron encontrados en el músculo blanco de la trucha arcoiris (**Fernández-Navarro y col., 2008**). Desde el punto de vista antitumoral, esta propiedad del ácido maslínico podría ser importante, ya que este producto no sólo actuaría frente a los procesos cancerígenos, sino que además podría aportar propiedades anticarcinogénicas importantes para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

1.5.4 Efecto anti-microbiano

En los últimos años se ha determinado la capacidad inhibidora del ácido maslínico sobre la acción de distintos microorganismos (**García-Grandos y col., 1999**). Los resultados muestran que el ácido maslínico inhibe la infección de células MDCK por el parásito *Cryptosporidium parvum* en un 92,3% a una concentración de 37 mg/mL. Inhibe la infección de *Toxoplasma* en células

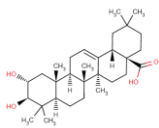


Vero, en un porcentaje del 87% a 30 mg/mL. Por último, también ha mostrado efectos inhibidores sobre los parásitos intracelulares *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani*. Según estos autores, la capacidad inhibidora del ácido maslínico sobre la infección de los distintos parásitos podría estar relacionada con una posible inhibición de las serín-proteasas utilizadas por estos parásitos para abrirse paso desde o hacia las células hospedadoras. Esta capacidad inhibidora sobre microorganismos también ha sido observada en derivados del ácido maslínico por otros autores (Braca y col., 2000) describiendo que dos derivados del maslínico, el 3 β ,O-trans-caumaroil maslínico y el 3 β ,O-cis-caumaroil maslínico, mostraron actividad antimicrobiana frente bacterias gran positivas y hongos, aunque no sobre bacterias gran negativas. Los valores encontrados de concentración que inhibieron el crecimiento de las distintas bacterias fueron para el ácido 3 β ,O-trans-caumaroil maslínico de 25 μ g/mL en *S. aureus*; 100 μ g/mL para *S. agalactiae*; 25 μ g/mL para *Candida albicans*. En el caso del segundo derivado el 3 β ,O-cis-caumaroil maslínico estos valores fueron de 100 μ g/mL para *S. capitis*; 25 μ g/mL para *S. agalactiae*; 25 μ g/mL para *Candida albicans* y 25 μ g/mL para *Candida krusei*.

1.5.5 Efecto anti-viral

Hace una década que diferentes autores describieron la inhibición de la serina proteasa del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV-1) por el ácido maslínico. Para llevar a cabo este estudio realizaron un extracto en metanol de *Geum japonicum* y a través del fraccionamiento dirigido por el correspondiente bioensayo de inhibición de esta serina proteasa, aislaron un total de 6 triterpenos activos. Entre ellos, los ácidos maslínico y el ursólico fueron dos de los compuestos con una mayor capacidad de inhibición de esta proteasa, siendo el ácido maslínico, a la concentración de 17,9 μ g/mL, el compuesto más activo (Xu y col., 1996).

Posteriormente, otros autores realizaron ensayos *in vitro* de inhibición del virus HIV-1 sobre células MT2 y células mononucleadas de sangre periférica (PBM). Los resultados en células MT2 muestran a las concentraciones de 25 y 30 μ g/mL la inhibición de la replicación del HIV. A 25 μ g/mL se detectó la disminución del efecto citopático y del nivel de antígeno p24 en el sobrenadante del cultivo; a 30 μ g/mL la ausencia del efecto citopático fue total y continuó la disminución del antígeno p24. Sobre las PBM infectadas con HIV-1, se consiguió una toxicidad del 50% a una concentración de 5 μ g/mL, tras 6 días de tratamiento. Sin embargo, concentraciones de maslínico de entre 5 y 20 μ g/mL no produjeron efecto inhibidor sobre la replicación en los cultivos infectados (Rivas y col., 2000).

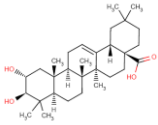


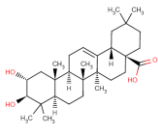
1.5.6 Efecto sobre actividades enzimáticas

El ácido maslínico ha mostrado, también, poseer efectos inhibidores sobre diferentes enzimas, utilizadas, fundamentalmente, como bioensayos para el aislamiento de compuestos de alta actividad biológica. Así, en el estudio de los compuestos bioactivos presentes en el extracto de *Campsis grandiflora*, realizado a partir de su efecto inhibidor sobre la enzima colesterol acil transferasa hACAT-1, que cataliza la acilación del colesterol para dar ésteres de ácidos grasos de larga cadena, se aislaron un total de siete triterpenos entre los que se encontraba el ácido maslínico (Kim y col., 2005). El ácido maslínico mostró a una concentración de 100 µg/mL una actividad inhibidora del 46,2 ± 1,1 % del enzima hACAT-1 y del 17,3 ± 1,1 % del enzima hACAT-2 respecto a los valores controles encontrados para ambos enzimas. La inhibición de las colesterol acil transferasas es un punto importante para el tratamiento de enfermedades como la hipercolesterolemia y la aterosclerosis, donde los inhibidores clásicos presentan inconvenientes por su biodisponibilidad oral y su toxicidad hepática o renal. Estos enzimas juegan además un papel crítico en la formación de células espumosas a partir de macrófagos.

Recientemente, otros investigadores determinaron que los ácidos triterpénicos corosólico y maslínico representan un nuevo tipo de compuestos inhibidores de la glucógeno fosforilasa (Wen y col., 2005). Según estos autores, estos compuestos inhiben, en ratones diabéticos, el incremento de glucosa sanguínea inducido por adrenalina, probablemente, a través de la inhibición de la glucógeno fosforilasa y por tanto de la degradación del glucógeno hepático. Estos autores, además sintetizaron distintos derivados del ácido maslínico, determinando sus efectos sobre la glucógeno fosforilasa de músculo de conejo (Wen y col., 2006).

Más recientemente, otros autores aislaron hasta un total de doce compuestos triterpénicos bioactivos a partir de un extracto de *Cornus kousa*, entre los que se encontraba el ácido maslínico (Sultana y Lee, 2007). Utilizando como bioensayo la inhibición de elastasas (enzimas diana importantes para la industria cosmética por su acción proteolítica sobre la elastina), el ácido maslínico presentó una IC₅₀ de 21,21 µg/mL.



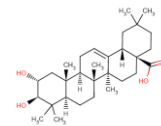


Capítulo 2

Triterpenos, estructuras y funciones

Los triterpenos son compuestos extremadamente comunes y se hallan en una amplia variedad de plantas. Hay al menos 4.000 triterpenos conocidos. Muchos de ellos se encuentran en su forma libre, mientras que otros se encuentran combinados formando las denominadas saponinas, en el caso de conjugarse con glucósidos, y otras formas combinadas especiales (Seigler, 1998). Se localizan especialmente en las ceras de hojas y frutas. Pudiendo tener una función protectora y repelente del ataque de microorganismos e insectos. Los triterpenos han sido además encontrados en resinas, cortezas de árboles y en el látex (*Euphorbia*, *Hevea*) (Harborne, 1998). Biosintéticamente, son producidos por el reagrupamiento del epoxiesqualeno siguiendo la conformación: C-C-C-(C,B) (donde C representa la conformación en forma de silla y B la conformación en forma de bote), esta ciclación es continuada por reagrupamientos estructurales dando lugar a una amplia variedad de triterpenos.

En cuanto a sus bioactividades, como en muchos componentes vegetales, la selección de la dosis apropiada es crítica en el efecto que producen. Aunque en principio los triterpenoides no son tóxicos, pueden serlo bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, bajas dosis de oleanólico son



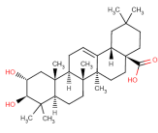
hepatoprotectoras mientras que altas dosis podrían producir colestasis y hepatotoxicidad. Las dosis bajas pueden producir respuestas adaptativas similares a la hormesis. Por lo que han de tenerse en cuenta que las dosis empleadas determinan en muchos casos, el modo de acción del compuesto (Liu, 2005). Paracelsus ya apuntaba en el año 1600 que “todas las sustancias son venenosas; no hay ninguna que no lo sea. Las dosis correcta diferencia a un veneno de un remedio”.

Los triterpenoides poseen un rango único y potencialmente útil de efectos biológicos. Las referencias al uso de plantas medicinales con altos contenidos de triterpenos o saponinas pueden encontrarse desde los primeros herbarios escritos, donde se aluden a plantas tales como el *Panax ginseng*, *Ganoderma lucidum*, *Platycodon grandiflorum* o *Boswellia serrata*, etc., que eran altamente apreciadas como panaceas por excelencia, debido a la amplia variedad de actividades que son capaces desplegar. (Dzubak y col, 2006).

En los últimos años el interés por los triterpenos naturales está creciendo rápidamente (Liu, 2005). Este interés no se debe tanto al aspecto científico de su aislamiento o a su análisis estructural, como al hecho del amplio espectro de actividades biológicas que presentan: antineoplásica, anticáncerígena, anti-angiogénica, citotóxica, anti-inflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, analgésica, cardiovascular, antialérgica, antimicrobiana, antidiabética, bactericida, fungicida, antiviral, anti-HIV, etc. Un considerable número de estudios realizados en gran cantidad de centros científicos se han dedicado especialmente a algunos de los compuestos de este grupo como son, entre otros, el ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido betulínico, betulina, lupeol, etc (Patočka, 2003).

2.1 Los triterpenos

Los triterpenos pertenecen al grupo de los terpenoides. Los terpenoides pueden ser considerados como sustancias con un considerable significado práctico. Diariamente nos encontramos con varios terpenos de forma directa o indirecta. Terpenos de todos los tipos están presentes en plantas superiores, tales como los monoterpenos y sesquiterpenos, que contribuyen a su aroma, tetraterpenos carotenoides que son abundantes en los vegetales de nuestra alimentación, así como los politerpenos, siendo el látex el más conocido. Los terpenos

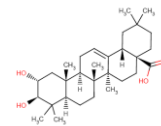


son utilizados por las plantas como metabolitos secundarios en la biosíntesis de muchos de sus compuestos tales como alcaloides, flavonoides, oligosacáridos etc. La mayoría de los terpenos poseen actividad biológica, jugando un papel muy significativo en la medicina. Desde este punto de vista el grupo más importante es el de los triterpenos y sus derivados, representando una de las clases más numerosa de compuestos naturales (**Sigler, 1998**).

La mayoría de los triterpenos se encuentran como metabolitos secundarios de plantas y regularmente se descubren y caracterizan nuevos compuestos (**Connolly y Hill, 1991**). Hay varios grupos importantes de triterpenos que incluyen: los triterpenos comunes, esteroides, saponinas, esterolinas y glucósidos cardiacos. En general, son compuestos con un esqueleto de carbono basado en seis unidades de isopreno las cuales derivan biosintéticamente del escualeno (acíclico C30 hidroxy-carbono). Poseen estructuras cíclicas relativamente complejas. La mayoría son, funcionalmente, alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos. Suelen ser compuestos coloreados, sólidos cristalinos, a menudo con un elevado punto de fusión, óptimamente activos, y generalmente difíciles de caracterizar debido a su inercia química.

El escualeno es considerado como precursor común de la biosíntesis de los sistemas esteroideo y triterpénico. Esteroles y triterpenos se basan en el sistema de anillos del perhidrofenantreno. Estos anillos pueden adoptar una conformación “bote” (B) o “silla” (C) minimizando la energía de la molécula. Los esteroles son considerados mayoritariamente como sustancias animales (tales como hormonas sexuales, ácidos biliares, etc) aunque recientemente, se ha incrementado el número de compuestos semejantes detectados en tejidos de plantas superiores, los fitosteroles (**Harborne, 1998, Kaufman y col, 1999**).

Además, otro grupo importante son las saponinas, triterpenos glicosilados de elevado peso molecular, formadas por un aglicano o genina unido a dos o más cadenas de azúcares. Estos aglicanos pueden ser triterpénicos o esteroideos, y se han encontrado en más de 17 familias de plantas. Pudiendo ser mono- o polidesmódicos, dependiendo del número de azúcares unidos, siendo los azúcares más comunes: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xylosa, D-fucosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (**Kaufman y col, 1999**). Poseen bastante interés terapéutico y comercial ya que pueden ser convertidos por síntesis química en esteroles animales (cortisona, estrógenos anticonceptivos, etc). Por último tenemos a los cardenólidos, en este grupo se encuentran gran cantidad de sustancias conocidas. Un cardenólido típico es la oleandrina, una característica inusual de este y otros muchos cardenólidos es la presencia de azúcares especiales que no se encuentran en otras partes del reino vegetal. Muchos de los cardenólidos son tóxicos y poseen actividad farmacológica.



2.2 Estructura y clasificación de los triterpenos

Existe una gran variedad estructural dentro del grupo de los triterpenoides, aunque esta inmensa variedad de tipos estructurales puede ser racionalizada siguiendo la regla del isopreno de Ruzicka. Sin embargo, hay cierto número de excepciones a la combinación regular de unidades de isopreno, las cuales están sometidas a la regla biogénica del isopreno, que contempla la posibilidad de reagrupamientos durante la biosíntesis. De este modo se puede entender como los terpenoides se forman a partir de reordenaciones de las unidades del isopreno llevadas a cabo por varias ciclaciones y reagrupamientos del esqueleto carbonado. Además, los terpenos pueden sufrir la pérdida o ganancia de átomos de carbono. Es útil clasificar los terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno, aunque algunos átomos de carbono pueden haberse adicionado o perdido. Lo que causa cierta incertidumbre es si el número de átomos perdidos es cinco o mayor, sólo el estudio de la biosíntesis del compuesto puede resolver esta cuestión. Como ocurre por ejemplo con los irones (C_{15}) que se derivan biosintéticamente desde el grupo iridal (C_{31}).

La regla biogénica del isopreno supone el compromiso de una unidad de cinco carbonos en la biosíntesis de los terpenoides. El isopreno, aunque es un producto natural, no es el precursor directo de los terpenoides. El origen biosintético de esta unidad es el ácido mevalónico que se convierte a isopentenil difosfato que es el precursor de cinco átomos de carbono de los terpenoides. Hasta la fecha, en el grupo de los terpenos se han identificado, aproximadamente, 30.000 compuestos (**figura 2.1**). Los terpenos pueden dividirse de acuerdo al número de moléculas estructurales de isopreno en mono-, sesqui-, di-, sester, tri-, tetra- y politerpenos y en asociación con esteroides forman el gran grupo de los isoprenos. El grupo de los triterpenoides pasaron a un primer plano de interés debido a sus diversos efectos biológicos al final de la pasada década. El amplio grupo de los triterpenoides cíclicos comprenden a más 4.000 compuestos diferentes dividiéndose en los triterpenoides libres (aglicanos), triterpenoides glicosilados (saponinas), fitosteroides y/o sus precursores. Además tenemos el grupo de saponinas esteroideas de plantas, estructuralmente relacionadas con el colesterol y las hormonas esteroideas pero sin poseer sus efectos hormonales. (**Dzubak P. y col, 2006**) En el sistema utilizado para la nomenclatura de los terpenoides se han propuesto varias denominaciones para los esqueletos carbonados, así como varios sistemas de numeración. Muchos terpenoides son denominados por las variaciones formales de sus estructuras esteroideas y su nomenclatura y numeración se siguen por tanto en el mismo orden que en las estructuras esteroideas.

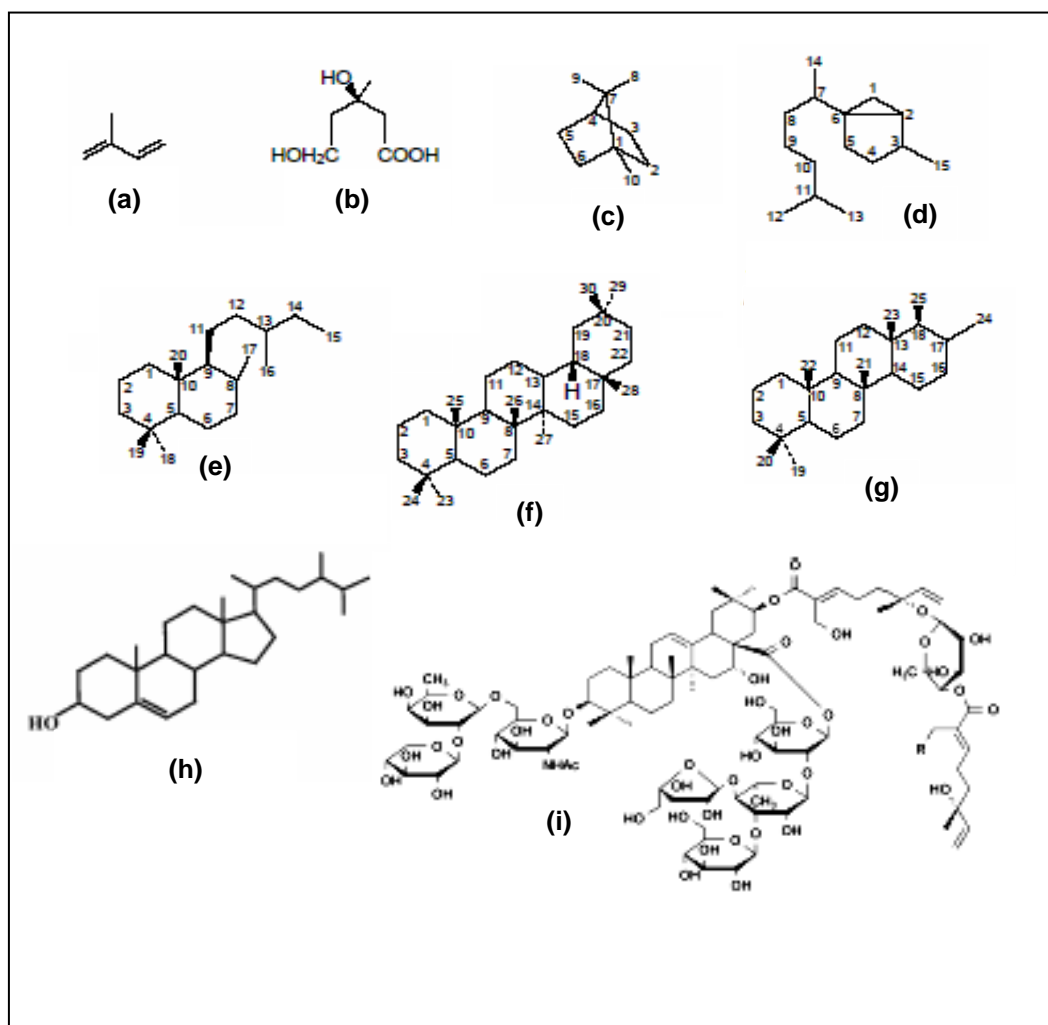
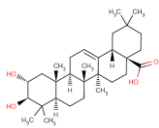
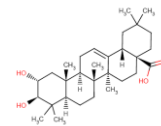


Figura 2.1 Estructura de algunos terpenos: a) Isopreno; b) Ácido mevalónico; c) Camfano, 1,7,7-trimetilbicyclo-(2,2,1) heptano; d) Sesquisabinano, 1-(1,5)-dimetilhexil)4-metilbicyclo (3,10)-hexano; e) Labdano, decahidro-1,1,4a,6-tetra-metil-5-(3-metil-pentil)naftaleno; f) Oleanano; g) Scalarano, 4,4,8,17,17a-pentametil-D-homoandrostano; h) Campesterol; i) Avicina

Los triterpenos pueden dividirse en varias familias estructurales. Las principales son las derivadas tetracíclicas del protostano, cicloartano, dammanrano, eufano, así como los derivados pentacíclicos del ursano, gammacerano, lupano y hopano. Muchos de estos poseen grupos metilo e hidruros en distintas posiciones con diferentes reagrupamientos del esqueleto para alcanzar su estructura final. (Connolly and Robert, 2005)

El esqueleto de los triterpenos pentacíclicos está basado en 30 átomos de carbono comprendiendo cinco anillos de seis elementos (ursanos y lanostanos) o cuatro anillos de seis elementos y un anillo de cinco elementos (lupanos y hopanos). En la literatura química, ambos, lupanos y hopanos, son a veces referidos como triterpenos esteroideos. Entre los compuestos anteriormente mencionados la betulina (betulinol) es el más abundante en la naturaleza. Es



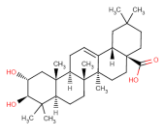
además precursor en la biosíntesis de compuestos biológicamente más potentes tales como el ácido betulínico. La betulina fue uno de los primeros productos naturales aislados de plantas químicamente puros. Siendo obtenido por Lowitz en 1788 por sublimación de la corteza de abedul, tecnología que se sigue utilizando actualmente. (Seigler, 1998)

La conformación que adopta el trans-escualeno 2,3-epóxido cuando tiene lugar la primera ciclación, determina estereoquímicamente las uniones en los anillos de los triterpenoides producidos. De forma que una ciclación “silla-bote-silla-bote” conforma el catión protostano que dará lugar a toda una familia, mientras que la ciclación “silla-silla-silla-bote” da lugar a la formación del catión dammerano. En la formación inicial del intermediario catiónico puede sufrir una serie de migraciones 1,2-hidruro y metilo, comúnmente denominados reagrupamientos estructurales, dando una amplia variedad en los diferentes tipos de esqueletos que conforman la gran diversidad de estos compuestos (tabla 2.1) (DNP, 2002).

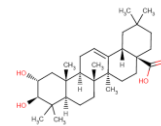
Las estructuras básicas más comunes son: 6-6-6-5 tetraciclos, 6-6-6-6-5 pentaciclos o 6-6-6-6-6 pentaciclos, aunque también se han identificado triterpenoides acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y hexacíclicos. Un complejo de transición inusual y mecanismo de reacción flexible genera estos sistemas de anillos. El sistema esteroideo de numeración es adoptado por el lanostano y los triterpenos tetracíclicos relacionados. Los principales esqueletos de los triterpenos tetracíclicos tienen numeración esteroide para el esqueleto incluyendo la cadena lateral y los grupos metilos (DNP, 2002).

Tabla 2.1 Clasificación estructural de los triterpenos cíclicos dependiendo de su estructura molecular. Dictionary of Natural Products on CD (DNP). Ed: Chapman & Hall (Electronic publishing division), England. ISBN: 0412491508.

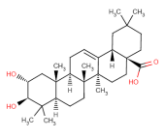
<p>Protostano y fusidano triterpenoides</p>	<p>Los protostanos, ej. protosterol, son un pequeño grupo formado por ciclación del escualeno 2,3-epóxido sin reagrupamiento estructural. Los fusidanos aunque no muy numerosos son bastante importantes por sus actividades antibióticas, ej. ácido fusídico, el cual ha perdido uno de los grupos metilos en el carbono 4.</p>	<p style="text-align: center;"> Protostano Fusidano </p>
--	--	---

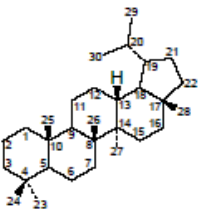
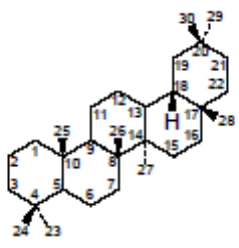
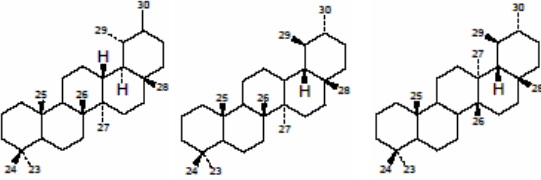
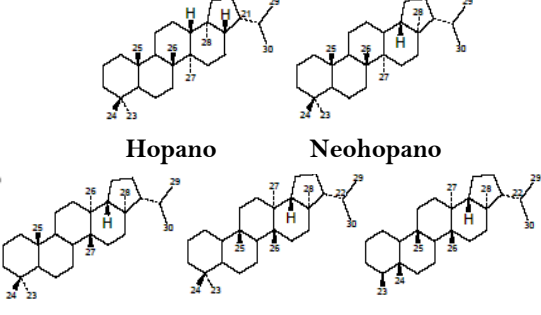


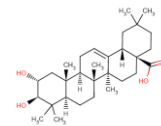
<p>Lanostano triterpenoides</p>	<p>El reagrupamiento del catión protostano da lugar al amplio grupo de los lanostanos. El lanosterol aparece también como intermediario en la biosíntesis esteroidea, por lo que no son comunes en plantas, pero si se encuentran en algunos hongos como el <i>Gonoderma lucidum</i>, el cual constituye una de sus principales fuentes.</p>	<p style="text-align: center;">Lanostano</p>
<p>Cicloartano triterpenoides</p>	<p>El reagrupamiento del catión prostostano incluyendo además la ciclación 9-19 produce la formación del esqueleto del cicloartano. Las plantas utilizan cicloarterol y no lanosterol para la biosíntesis de sus fitosteroles. Los cicloartanos son con frecuencia denominados en la literatura como 9,19-ciclolanostanos.</p>	<p style="text-align: center;">Cicloartano</p>
<p>Cucurbitano triterpenoides</p>	<p>Poseen el reagrupamiento estructural del catión protostano más extendido. Las cucurbitacinas, ej. cucurbitacina A, se encuentran en las Cucurbitáceas y son de gran interés por sus actividades biológicas, la mayoría de ellas se encuentran glicosiladas.</p>	<p style="text-align: center;">Cucurbitano</p>
<p>Dammarano triterpenoides</p>	<p>El catión dammarano (esteroisomero del protostano) sin reagrupamiento estructural da lugar al esqueleto de estos compuestos. Los dammaranos suelen encontrarse como glicósidos, siendo los más estudiados las saponinas del ginseng.</p>	<p style="text-align: center;">Dammarano</p>
<p>Eufano y tirucalano triterpenoides</p>	<p>El reagrupamiento estructural del catión dammarano (análogo al reagrupamiento del protostano-lanostano) produce el esqueleto del eufano y de su 20-epímero, el tirucalano. Hay confusiones frecuentes en la literatura sobre la estereoquímica del carbono 20 en estos compuestos.</p>	<p style="text-align: center;">Eufano Tirucalano</p>



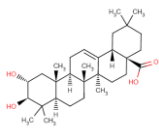
<p>Apotirucalano triterpenoides</p>	<p>Un nuevo reagrupamiento del esqueleto del tirucalano, un apo-reagrupamiento, da lugar al apotirucalano. La notación de estos compuestos sigue la de los tetranortriterpenoides (limonoides) y la de los quasínoides.</p>	<p style="text-align: center;">Apotirucalano</p>
<p>Nortriterpenoides quassinoides</p>	<p>Los quassinoides se encuentran en la familia de las <i>Simaroubaceas</i> y están estrechamente relacionadas con los tetranortriterpenoides. Esta relación está enfatizada por la presencia de precursores C₂₅ (ej. simarolides) que pierden los 5 carbonos más lejanos para dar el esqueleto C₂₀ del picrasano. También se conocen quassinoides de C₁₈ y C₁₉ pero son menos comunes. Los quassinoides han atraído muchos esfuerzos de síntesis por su actividad citotóxica.</p>	<p style="text-align: center;">Esqueleto C₂₅ Quassinoide Picrasano (C₂₀) numeración habitual</p> <p style="text-align: center;">Picrasano (C₂₀) numeración CA</p>
<p>Nortriterpenoides</p>	<p>Los tetranortriterpenoides (limonoides) están formados por la pérdida del cuarto carbono terminal en el esqueleto de los apotirucalanos. La cadena lateral esta normalmente β-sustituida por el furano, aunque existen otros niveles de oxidación. Los anillos son abiertos y reagrupados. Por ejemplo la ruptura de los anillos B y C pueden formar por ciclación el sistema biciclo[3,3,1] nonanoloide. El árbol del <i>neem</i> es una extraordinaria fuente de tetranortriterpenoides incluyendo la azadirachtina que es un potente insecticida.</p>	<p style="text-align: center;">Esqueleto tetranortriterpenoide Tetra nor triterpenoide con los anillos B y D abiertos</p> <p style="text-align: center;">Biciclo (3,3,1)nonanolido tetranortriterpenoide</p>
<p>Baccharano triterpenoides</p>	<p>La ciclación del escualeno o del 2,3-epoxiesqualeno en la conformación “silla-silla-silla-bote” permite la formación del esqueleto del baccharano. El reagrupamiento estructural da lugar a la formación de los lemnafillanos y shionanos . Esta ciclación del escualeno produce la formación de los triterpenos pentacíclicos.</p>	<p style="text-align: center;">Baccharano</p>



<p>Lupano triterpenoides</p>	<p>La formación del anillo E de cinco miembros desde el precursor baccherano produce la formación del esqueleto lupano. Las variaciones nor-, friedo-y seco- lupanos son clasificadas separadamente.</p>	 <p>Lupano (los sustituyentes 23/24 son especificados en CA como 4α/4β)</p>
<p>Oleanano triterpenoides</p>	<p>La formación del anillo E en este caso de seis miembros sobre el baccharano es el precursor de este grupo. Los oleananos son el mayor grupo de triterpenoides y están muy extendidos en el reino vegetal a menudo como glucósidos. A este grupo es al que pertenece el ácido maslínico. Los numerosos nor- seco- y abeo-oleananos son catalogados separadamente. Partiendo de un incremento en el grado de reagrupación del esqueleto del oleanano se forman los taraxeranos, multifloranos, glutiananos y friedelanos..</p>	 <p>Oleanano (los sustituyentes 23/24 son especificados en CA como 4α/4β y los 29/30, como 20α/20β)</p>
<p>Taraxastano, ursano y bauerano triterpenoides</p>	<p>La migración del grupo metilo en el anillo E del precursor oleanano permite la formación del esqueleto del taraxastano (con la pérdida de un protón) o a la formación del esqueleto de su estereoisómero ursano. Estos dos sistemas son confundidos frecuentemente en la literatura. El baureano está relacionado con el ursano por una reagrupación de su esqueleto.</p>	 <p>Taraxastano Ursano Bauerano</p>
<p>Hopano triterpenoides.</p>	<p>La ciclación del escualeno siguiendo la conformación "CCCCC" da lugar al esqueleto del hopano. La ampliación del anillo E a seis miembros da lugar al esqueleto del gammacerano. La degradación y extensión de los hopanos ocurre mayoritariamente en sedimentos naturales. Los moretanos son isómeros de los hopanos con una configuración 21α(H). El reagrupamiento del esqueleto del moretano permite la formación de los neohopanos (neomotianos), fernanos, adiananos y filicanos.</p>	 <p>Hopano Neohopano Fernano Adianano Filicano</p>



<p>Arborinano y estictano triterpenoides</p>	<p>La ciclación del escualeno, o de su 2,3-epóxido, en la conformación “silla-bote-silla-silla-bote” seguida de la ampliación del anillo E produce el esqueleto del estictano. El reagrupamiento de este último da lugar al esqueleto del arborinano.</p>	<p>Arborinano Estictano</p>
<p>Gammacerano triterpenoides</p>	<p>El esqueleto del gammacerano surge desde la misma ciclación del hopano. El derivado gammacerano más notable es el tetrahymenol, metabolito derivado del protozoo <i>Tetrahymena pyriformis</i>.</p>	<p>Gammacerano</p>
<p>Serratano y onocerano triterpenoides</p>	<p>La ciclación del escualeno, o más comúnmente de su bis-epóxido, desde ambos extremos da lugar a la formación del esqueleto del onocerano. Ciclaciones adicionales dan lugar a la aparición del esqueleto del serratano.</p>	<p>Serratano Onocerano</p>
<p>Polipodano, malabaricano y podiodano triterpenoides</p>	<p>Ciclaciones parciales del escualeno 2,3-epóxido en uno de sus extremos forman los grupos polipodano y malabaricano. Los podiopodanos son malabaricanos que han sufrido la migración de un grupo metilo.</p>	<p>Polipodano Podiodano</p> <p>Malabaricano</p>
<p>Norterpenoides iridales</p>	<p>Los iridales son constituyentes de la <i>Iris ssp.</i> los cuales sirven de precursores de importantes perfumes químicos, los irones. El sistema de numeración iridal está basado en el escualeno. Los irones también están incluidos en este grupo, su sistema de numeración está basado en los carotenoides.</p>	<p>Iridal Irona</p>
<p>Miscelánea</p>	<p>En este último grupo se incluyen los esqueletos triterpénicos que son difícilmente clasificables en los grupos anteriores. En el se incluyen compuestos tales como la sifolenona C de la esponja <i>Siphochalina siphonella</i>.</p>	

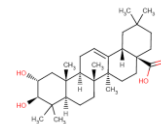


2.3 Triterpenos y plantas

Las plantas elaboran un vasto conjunto de productos naturales, muchos de los cuales son metabolitos secundarios que se han desarrollado para conferirles ventajas selectivas frente al ataque de microorganismos e insectos. Recientes avances, muestran la enorme y compleja maquinaria enzimática que utilizan las plantas para la biosíntesis de estos productos naturales, que tienen una enorme importancia en sus mecanismos de defensa. Actualmente, incluso se están utilizando técnicas de ingeniería metabólica sobre la rutas de síntesis de determinados productos para activar la resistencia a enfermedades concretas (Dixon, 2001).

La principal característica que convierte a un determinado metabolito en metabolito secundario es que a diferencia de los primarios, los secundarios, no son generalmente esenciales para los procesos metabólicos básicos de la planta. Entre estos compuestos se encuentran fenilpropanoides, alcaloides, derivados policetónicos de ácidos grasos y gran cantidad de isoprenoides de los que los triterpenos pentacíclicos forman parte. Esta diversidad es el resultado, en parte, de un proceso de evolución dirigido por la selección y adquisición de mejores defensas contra el ataque de microorganismos, insectos o la predación animal. Sin embargo, esta enormidad de productos hace difícil el uso de las técnicas genéticas y moleculares convencionales para conocer la funcionalidad de un determinado compuesto dentro de la defensa de la planta. Plantas de familias relacionadas, generalmente hacen uso de estructuras químicas relacionadas para la defensa de sus organismos. Algunas especies producen un amplio abanico de compuestos antimicrobianos. Por ejemplo, *Arabidopsis*, arroz, maíz y soja son ricas fuentes de indoles antimicrobianos, terpenoides, benzoxazinonas y flavonoides e isoflavonas. Por otra parte, muchos de estos productos antimicrobianos naturales poseen un amplio-espectro de actividad (Dixon, 2001).

Los análisis de genomas de plantas secuenciados hasta el momento revelan que muchos de los genes de las enzimas encargadas de la biosíntesis de productos naturales han surgido por procesos de duplicación y mutación, lo que provoca una amplia variabilidad genética que permite la elaboración de nuevas estructuras químicas (Dixon, 2001). Se conocen casi 200 esqueletos básicos de diferentes triterpenos. Determinados a partir de sus fuentes naturales o de reacciones enzimáticas que son estructuralmente consistentes con los productos de ciclación del escualeno, óxidoescualeno o bis-óxidoescualeno (Xu, 2004). Muchos de los detalles de la síntesis de estos productos, incluyendo las ciclasas involucradas, han sido determinados en los últimos años.



El mecanismo general en la síntesis de triterpenoides (**figura 2.2**) comienza a partir del escualeno (todo trans) o del oxidoescualeno que es activado por un ataque catiónico. A continuación, una cascada de ciclaciones intramoleculares catión-olefina genera como resultado un carbocatión cíclico, el cual puede reordenarse y ciclarse de nuevo. Las traslaciones antiperiplanales terminan con la pérdida de un protón dando lugar a una especie química neutra. Aunque sólo se ha investigado experimentalmente la formación de una pequeña parte del sistema de anillos triterpénicos, la ciclación, mediada por enzimas específicas del escualeno o del oxiesqualeno, puede confirmarse como el origen de todas las estructuras triterpénicas cíclicas.

Los enzimas que catalizan estas reacciones son conocidas como triterpeno sintasas y pueden ser clasificadas como escualeno ciclasas (SC) o también denominada terpeno sintasa g (tpsg) o como óxidoescualeno ciclasas (OSC) o también conocida como terpeno sintasa h (tpsh). Ambos tipos catalizan reacciones mecanísticamente similares pero filogenéticamente distintas (**Xu, 2004**). Las plantas biosintetizan diversos triterpenoides y codifican para múltiples enzimas OSC que conforman sus esqueletos. Por ejemplo se han encontrado hasta 13 genes que codifican para distintas OSC en *Arabidopsis thaliana* y nueve en *Oryza sativa* (**Xu, 2004, Dzubak y col, 2006**).

La ciclación del óxido escualeno puede tener lugar a través de varias vías. Por un lado, la cicloarterol sintasa (CAS) convierte el óxido escualeno en cicloarterol a través del catión intermediario protosteril. Por otra parte, la lupeol sintasa (que pertenece a una de las subfamilias OSCs que no utilizan el catión protoesteril como intermediario) cicla el óxidoescualeno para dar el catión dammarenil. Los carbocationes prosteril y dammarenil son complejos de transición comunes en la síntesis de la mayoría de los compuestos triterpénicos cíclicos. A continuación se promueve la ampliación de los anillos y finalmente la anulación del carbocatión por la substracción de un protón dando lugar a la especie neutra.

La lupeol sintasa se ha encontrado entre otras plantas en *Glycyrrhiza glabra*, *Betula platyphlla*, *T. officinale*, y *Olea europea*. Los genes que codifican para distintas CAS han sido clonados y caracterizados en numerosas eudicotiledoneas, algunas monocotiledoneas y gimnospermas. La similitud entre los genes CAS encontrados en plantas y los encontrados en bacterias o protozoos, sugiere que este gen es anterior a la aparición de las plantas superiores. En un primer momento la función de las enzimas CAS sería la de síntesis de moléculas tipo cicloartenol como precursor de la mayor parte de esteroides de membrana y brassinoesteroides manteniendo un porcentaje bastante alto de homología entre diferentes especies.

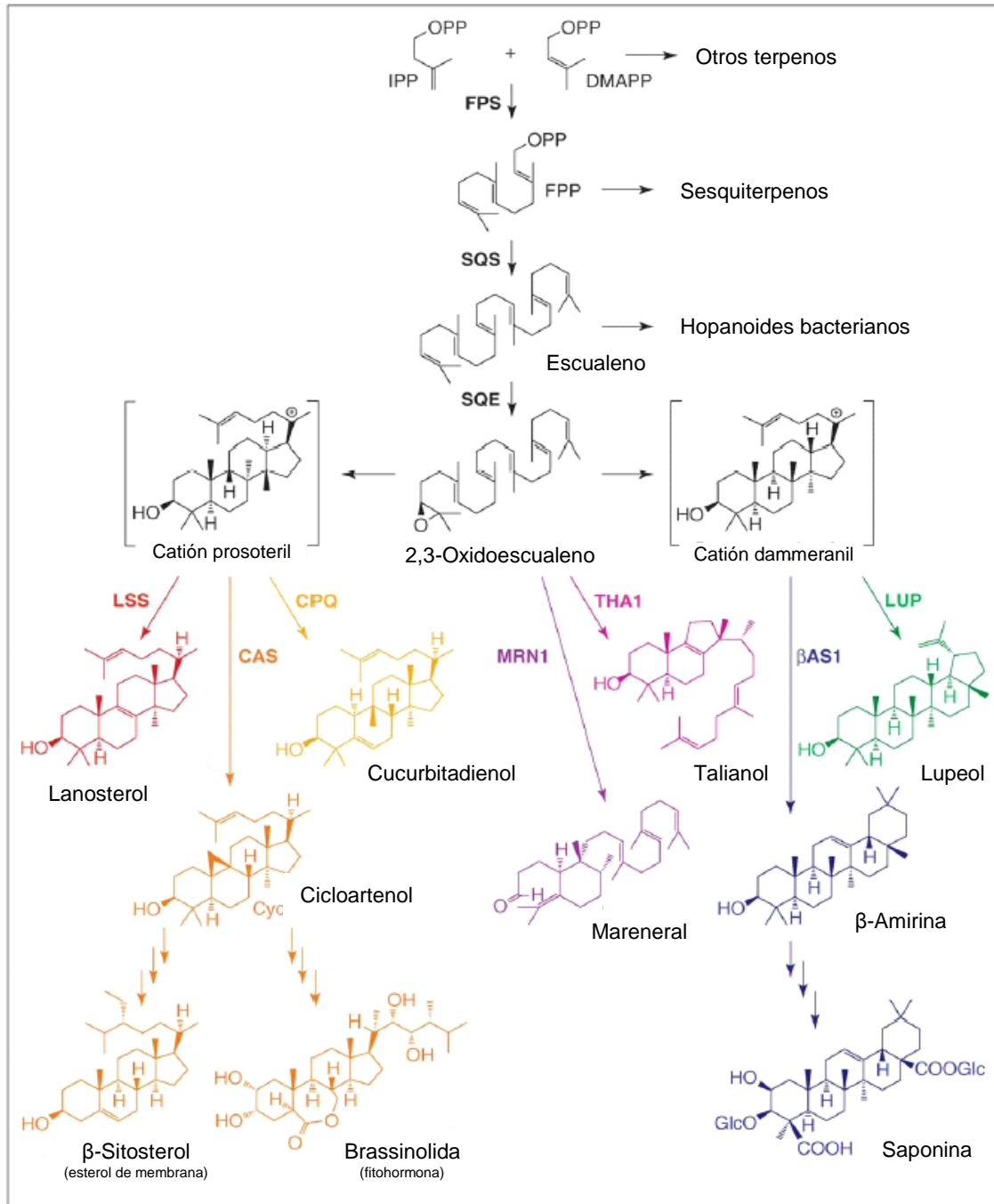
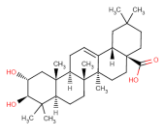
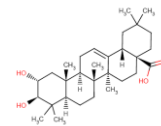


Figura 2.2 Biosíntesis de triterpenoides en plantas. La farnesil difosfato sintasa (FPS) isomeriza al isopentenil difosfato (IPP) y al dimetil-alil difosfato (DMAPP) a farnesil difosfato (FPP), convertido a escualeno por la escualeno sintasa, que es oxidado al 2,3-epóxido por la escualeno oxidasa. A partir de este compuesto por ciclaciones, catalizadas por óxido escualeno ciclasas, y reagrupamientos se obtienen el resto de los triterpenos. (BAS1, β-amirin sintasa; LUP, lupenol sintasa; MRN1, marenal sintasa; PP, difosfato; THA1, taliol sintasa; CAS, cicloarterol sintasa; LSS, lanosterol sintasa)

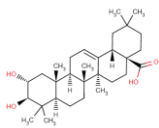
Al contrario, en las subfamilias OSCs que no utilizan el catión protoesteril como intermediario aparece una mayor especificidad propia de cada especie, lo que es consistente con el postulado papel defensivo de muchos de los triterpenoides no esteroideos y sugiere la ventaja que significa para la planta la síntesis de diversos triterpénicos (Dzubak y col., 2006).



La diversidad de los triterpenos vegetales no sólo se debe a la enorme variabilidad de la familia de genes OSC, sino de la capacidad de algunos de los miembros de esta familia en la síntesis de múltiples productos. Algunas subfamilias de triterpeno sintetas multifuncionales, que utilizan como intermediario el catión dammarenil, sintetizan gran variedad de compuestos dammarenil-derivados (en el caso de *Arabidopsis*, por ejemplo, sintetizan β -amirina, lupeol, taraxasterol, etc). Estas enzimas parecen haber surgido durante la evolución angiosperma (Xu, 2004, Dzubak y col, 2006). El porqué algunas OSCs producen múltiples productos no se conoce pero puede representar una “evolución en proceso”. Numerosos experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que pequeñas variaciones en la secuencia de estas enzimas dan como resultado un aumento en la diversidad de productos que sintetizan. Por último, se han observado que genes implicados en la biosíntesis de triterpenoides son inducidos bajo condiciones específicas, incluyendo diferentes tipos de estrés bióticos (Xu, 2004).

La biosíntesis de un triterpenoide puede ser más compleja que la ciclación del óxidoescualeno. La elaboración del esqueleto triterpenoide puede incluir hidroxilaciones catalizadas por P450-monooxigenasas, alquilaciones por metiltransferasas y glicosilaciones, en el caso de las saponinas, por glucosiltransferasas. Estas y otras modificaciones pueden ser esenciales para que el compuesto sea bioactivo. Aunque se han hecho grandes progresos en la identificación de la rutas de síntesis de los triterpenoides, muchos de los enzimas específicos que llevan a cabo estas reacciones continúan sin ser caracterizados (Xu, 2004; Dzubak y col, 2006).

Podemos concluir que aunque el papel biológico de los esteroides y brassinosteroides como componentes de las membranas en células vegetales es bien conocido, la función de otros esqueletos triterpenoides comienza a ser dilucidada. El examen de patrones de expresión de genes y proteínas implicados en la biosíntesis de triterpenos relacionados con plantas durante su desarrollo y en respuesta a cambios bióticos y abióticos proporcionará información necesaria para conocer la función natural de estos compuestos. Más aún, el análisis fenotípico de plantas que no expresan o que sobreexpresan genes implicados en la biosíntesis de un determinado triterpeno particular, será necesario para comprender esta función. Por ejemplo, la deficiencia en un gen de una OSC, la β -amirina sintasa en un mutante de *Avena*, produce una carencia en la acumulación de saponinas; esta deficiencia hace a la planta susceptible al ataque por *Gaeumannomyces graminis*, lo que prueba el papel natural de la β -amirina en la resistencia de enfermedades producidas por hongos. La enorme diversidad de los triterpenos en plantas descubiertos hasta el momento sugiere una enorme abundancia de funciones correspondientes que espera ser descubierta (Phillips, 2006).



2.4. Propiedades anticancerígenas de los triterpenos.

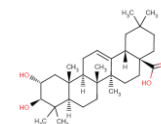
Desde un punto de vista biológico las estructuras triterpénicas más importantes son oleano, ursano, lupano, dammarano, eufano y sus derivados. Lo que evidencia el intenso interés por estas sustancias y sus derivados es el gran número de citas en la base de datos *Pubmed*. Excediendo de 154.067 para la palabra clave terpeno y 8.054 para triterpeno, hasta enero de 2006. Los triterpenoides son estudiados por sus efectos hepatoprotectores, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, inmunomoduladores, antimicóticos, virostáticos y tónicos. Actualmente, son utilizados en la prevención y tratamiento de la hepatitis, infecciones parásitas y de protozoos y sobre todo por sus efectos citostáticos. La principal desventaja en el uso de los triterpenos es de hecho la toxicidad asociada con sus propiedades hemolíticas y citostáticas. Por lo que junto con su obtención y aislamiento, se están desarrollando derivados sintéticos con menor toxicidad y mayor potencial terapéutico. (Dzubak y col, 2006)

2.4.1 Grupo lupano

2.4.1.1 Ácido betulínico

Los triterpenos pentacíclicos poseen un amplio espectro de actividades biológicas algunas de las cuales pueden ser utilizadas médicamente. El potencial terapéutico de los compuestos pertenecientes a este grupo: lupeol, betulina y ácido betulínico (figura 2.3, tabla 2.2), ha sido muy estudiado en los últimos años. El ácido betulínico es un compuesto especialmente prometedor. Este triterpeno es capaz de inducir apoptosis en células cancerígenas. Debido a su aparente especificidad por las células de melanoma, el ácido betulínico parece ser un anticancerígeno más prometedor que drogas tales como el taxól (Zuco y col. 2002)

Sus principales fuentes se encuentran en plantas de la familia *Betulaceae* como son *Betuna alba*, *Betuna pendula*, *Betuna pubescent*, *Betuna platyphylla*, *Corylus avellana*, *Carpinus betulus* y otras especies del género *Alnus*. El contenido de betulina en la corteza de abedul está entre un 10% y un 30% y se encuentra normalmente formando depósitos cristalinos en las capas externas de la corteza. El color blanco de la corteza de abedul es atribuido a la betulina, la cual ocupa casi por entero el interior de las células peridérmicas. La betulina ha sido utilizada en la producción de cosméticos y plásticos tales como el PVC. (Patočka 2003).



Trumbull y col. en 1976, publicaron el primer trabajo que describía las actividades citotóxicas del extracto de *Vauquelinia corymobsa* sobre células de leucemias linfocítica (línea P-388). Identificando al uvaol, ácido ursólico y ácido betulínico (ácido 3β-hidroxilup-20(29)-en-28-oico) como las sustancias activas. A este trabajo le siguieron una serie de publicaciones, en las que se dilucidaban los efectos de extractos con mezclas similares que contenían betulina y ácido betulínico (**Oruga y col., 1977**). Sin embargo, no fue hasta comienzos de los 90 en los que los efectos citostáticos del ácido betulínico fueron verificados (**Yasukawa y col., 1991**).

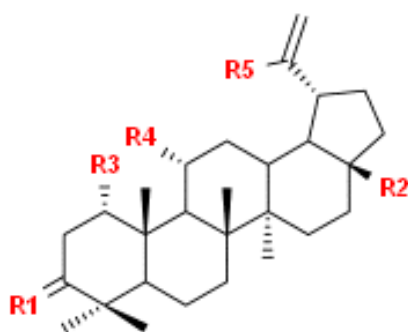
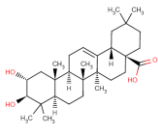


Figura 2.3 Estructura del ácido betulínico, lupeol y sus derivados.

	R1	R2	R3	R4	R5
Ácido betulínico	β-OH, H	COOH	H	H	CH ₃
Ácido 3-oxolup-20(29)-en-28-oico	O	COOH	H	H	CH ₃
Ácido 11α-hidroxi-3-oxolup-20(29)-en-28-oico	O	COOH	H	OH	CH ₃
Ácido 1a-hidroxi-3-oxolup-20(29)-en-28-oico.	O	COOH	H	H	CH ₃
Lupeol (lup-20(29)-en-3β-ol)	β-OH, H	CH ₃	H	H	CH ₃
3-oxo-lup-20(29)-en-30-al	O	CH ₃	H	H	CHO
28-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	O	CH ₂ OH	H	H	CH ₃
Betulina	β-OH, H	CH ₂ OH	H	H	CH ₃
Betulina diacetato	β-OAc, H	CH ₂ OAc	H	H	CH ₃

Tabla 2.2 Ácido betulínico y sus derivados. Lupeol y sus derivados

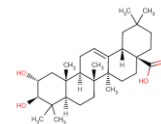
Pisha y col. (1995), publicaron un artículo clave informando sobre la citotoxicidad de este compuesto en líneas celulares de melanoma lo que causó un gran de interés hacia este ácido y sus derivados. Estos autores encontraron que la IC₅₀ (concentración que causa el 50% de inhibición en la viabilidad del cultivo) de este ácido sobre células de melanoma humano MEL-1,2 y 4, se encontraba en un rango de 0.5-1.6 µg/mL y que provocaba la formación de DNA apoptótico tras las 24h de tratamiento. Otros ensayos mostraron que sobre líneas celulares de neuroblastoma la citotoxicidad fue de: IC₅₀ = 14-17 µg/mL (**Schmidt y col., 1997**). También se ha determinado el efecto citotóxico sobre líneas de glioma con una IC₅₀ = 20 µM para la línea LN-229; IC₅₀ = 25 µM para las líneas U87, MG y T98G; IC₅₀ = 70 µM para la línea LN-18 y por último IC₅₀ = 100 µM para la línea LN-308 tras 24h de tratamiento (**Wick y col., 1999**). Trabajos más recientes muestran que el espectro de líneas transformadas sensibles a



estos compuestos es más amplio incluyendo líneas celulares de origen no-neuroectodérmico, líneas p53 deficientes como las células de ovario A2780, OVCAR-5, GROV-1, células pulmonares H460, carcinoma epidérmico A431, melanoma Me665/2/21, Me665/2/60, y microcitos pulmonares POGB y POGB/DX (microcitos pulmonares doxorubicina resistentes). Los rangos de IC_{50} encontrados se hallan entre 1.5-4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el estudio realizado por **Zuco y col.** en **2002** también fueron empleadas células control no tumorales, mostrando menor toxicidad, como son: fibroblastos dérmicos normales HDFC con una $IC_{50} = 10.2 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, y linfocitos sanguíneos periféricos PBL con una $IC_{50} = 50 \mu\text{g}/\text{mL}$, toxicidad bastante baja en comparación con la doxorubicina: IC_{50} (HDFC) = 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$; IC_{50} (PBL) = 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En ensayos *in vitro* con células de cáncer primario, aisladas a partir de un glioblastoma multiforme, el ácido betulínico fue marcadamente más efectivo que el cisplatino, doxorubicina, vincristina y la radiación ultravioleta (**Jermias y col., 2004**). Otros estudios han demostrado la diferenciación de queratinocitos humanos normales a corneocitos tras el tratamiento con concentraciones subcitotóxicas de ácido betulínico (**Galgon y col., 2005**).

Una propiedad interesante del ácido betulínico desde el punto de vista clínico es el aumento de su efectividad a pH menor de 6.8, lo cual ocurre en la mayoría de tumores (**Noda y col. 1997; Stubbs y col. 2000**). Las células cancerosas que sufren hiperplasia muestran una elevada sensibilidad al ácido betulínico, mientras que la sensibilidad en células no cancerosas permanece sin cambios. Esta característica hace del ácido betulínico único en comparación con otros compuestos que son normalmente utilizado en las terapias cancerígenas tales como el taxól, camptotecina, elipticina, etoposido, vinblastina o vincristina. Todos estos compuestos antitumorales son muy tóxicos e inhiben la replicación tanto de células cancerígenas como de células normales. Sin embargo, a pesar de su toxicidad siguen siendo usados hoy día preferentemente en quimioterapia (**Zuco y col., 2002**). El ácido betulínico ha mostrado poseer también efectos anti-angiogénicos que han sido asociados a su capacidad de inhibir la enzima aminopeptidasa N, con una $IC_{50} = 7.3 \pm 1.4 \mu\text{M}/\text{mL}$. Dicha enzima forma parte de la actividad angioproliferativa y metastásica en diferentes tipos de tumores (**Melzig y Bormann, 1998**). Aunque otros estudios asocian estos efectos antiangiogénicos con los niveles de citotoxicidad propios del producto, ya que dicho efecto inhibitorio no ha podido ser reproducido (**Kwon y col. 2002**).

Por último, en cuanto a la toxicidad *in vivo* del ácido betulínico, se han realizado ensayos en ratón demostrando que este compuesto es activo contra tumores inducidos por TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato), en cáncer de ovario y melanoma (**Pisha y col., 1995; Zuco y**



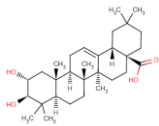
col., 2002). El betulínico no mostró efectos tóxicos en ratones hasta concentraciones de 500 mg/kg. Sin embargo, dosis de betulínico menores de 5mg/kg han sido suficientemente significativas para impedir el desarrollo de tumores. Los resultados mostraron que tras 41 días de administración (6 dosis diarias de 50 mg/kg), los ratones desarrollaron una regresión del tumor de hasta un 80% (Pisha y col., 1995).

2.4.1.1.1 Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido betulínico

En cuanto al mecanismo mediante el cual el ácido betulínico produce esta citotoxicidad, el estudio de la ruta de activación de apoptosis desencadenada por el betulínico no revela la activación de la proteína p53, que es un activador directo del gen bax (Liebermann, Hoffman y Steiman, 1995). Aunque los niveles de la proteína p21 (inhibidor natural de ciclina dependiente de quinasa) se incrementaron tras su administración (Rieber M. y Rieber S., 1998). Estos autores describieron un aumento en el cociente p53/p21 tras el tratamiento con betulínico en líneas celulares metastásicas C8161 y no metastásicas de melanoma humano Neo 6.3., lo que sugiere, que la citotoxicidad del ácido betulínico está mediada por la inducción de bax. Otros estudios sugieren que el ácido betulínico induce cambios en la regulación previa de la ruta de activación de p53 en células metastásicas de melanoma (Salti y col., 2001).

Ensayos llevados a cabo sobre líneas celulares de origen neuroectodérmico muestran que el ácido betulínico induce un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo cual ocurre gracias a la inhibición de la expresión de proteínas tales como Bcl-2 o Bcl-x_L, este aumento de la permeabilidad mitocondrial activaría finalmente a las caspasas y a otros marcadores de apoptosis (Fulda y col., 1998). La inhibición del aumento de la permeabilidad de la mitocondria por un inhibidor específico, el ácido bongkreico, reduce la apoptosis inducida por el ácido betulínico en células de meduloblastoma y glioblastoma (Fulda y col., 1999). Se ha observado también que el ácido betulínico es capaz de desencadenar el aumento de la permeabilidad en mitocondrias aisladas de una forma directa, por lo que se podría pensar que este compuesto produce apoptosis de forma directa a través de la desorganización de la mitocondria. (Fulda y Debatin, 2000)

En células de glioma, el tratamiento con ácido betulínico dio lugar a un incremento en los niveles de proteínas proapoptóticas tales como Bax. Así como, otras alteraciones que implican la inducción de especies oxígeno reactivas (ROS), dando lugar finalmente a la activación de caspasa-3 (Wick y col., 1999). Por otro lado, clones de estas células con altos niveles de Bcl-2,

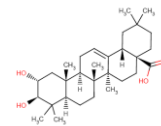


proteína antiapoptótica, mostraron niveles reducidos de ROS, sin que el tratamiento con betulínico indujese apoptosis, lo que está acorde con las propiedades antiapoptóticas de Bcl-2, ligadas a un mecanismo antioxidante. Esto subraya la importancia de la producción de ROS en la apoptosis inducida por el ácido betulínico. De hecho el efecto de protección del α -DL-tocoferol frente a la apoptosis inducida por betulínico en las células SK-N-MC parece deberse a las propiedades antioxidantes del tocoferol (Raghuvar y col. 2004).

Los efectos antiproliferativos producidos por el ácido betulínico están también asociados con la inhibición de la topoisomerasa I y la activación de las MAPK quinasas (Chowdhury y col. 2002; Tan y col. 2003). Otro hallazgo respecto al mecanismo de inducción de apoptosis por este producto fue el incremento de la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en líneas MES20, MES21, 518A2, A375A y Neo-II-tr después del tratamiento con ácido betulínico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Asimismo, se ha observado la capacidad del ácido betulínico de aumentar la concentración de Ca^{+2} intracelular, siendo liberado del retículo endoplasmático, lo cual es un importante factor de señalización e inductor de apoptosis (Chou y col., 2000).

Podemos decir por tanto que el ácido betulínico, posee citotoxicidad selectiva, independiente del estado de p53 y del histotipo celular, sobre las líneas celulares tumorales de melanoma, tumor neuroectodérmico y tumor cerebral maligno. No así sobre líneas normales o no neoplásicas y sobre linfocitos normales proliferantes. Experimentos *in vivo* confirman la actividad anti-neoplásica de este compuesto siendo relacionada con la inducción de apoptosis mediante una vía directa de alteración mitocondrial, formación de especies oxígeno-reactivas, modulación de Bcl-2 y de los niveles de Bax. Sugiriendo además, que las topoisomerasas I α y II α están involucradas en su mecanismo de acción. En diferentes líneas de melanoma, la apoptosis inducida por el ácido betulínico parece ser independiente de p53 y de sistemas ligando/receptor tales como CD95. Se ha detectado actividad citotóxica de este compuesto sobre neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma y sarcoma de Ewing. El tratamiento con el ácido betulínico dio lugar a la aparición de factores apoptóticos tales como citocromo-c o AIF (*apoptosis inductor factor*) mitocondrial, que inducen finalmente la activación de caspasas. La sobreexpresión de proteínas tales como Bcl-2 o Bcl-xL que bloquean la pérdida del potencial de membrana mitocondrial confieren resistencia a este producto (Zuco, 2002).

Estudios más recientes sobre células de melanoma humano, M4Beu, con una dosis efectiva al 50%, ED_{50} (M4Beu) = 20 μM , confirman la inducción de apoptosis por el ácido betulínico a través de una vía interna mitocondrial, mediada por el colapso del potencial de membrana y



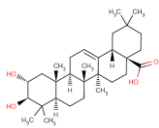
la alteración en el balance de Bax/Bcl-2, con el resultado de la activación de la caspasa-3 (Harmand y col., 2005). Otro estudio que apoya este mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido betulínico y sus derivados es el realizado por Gopal y col. en 2005. Según estos autores la apoptosis producida por el ácido betulínico está mediada por el incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, desorden del potencial transmembrana, que causa la liberación de citocromo-c y AIF, con el resultado final de la activación de las caspasas-3 y -8. Por último tras la activación de estas moléculas tiene lugar la fragmentación del núcleo.

2.4.1.1.2 Derivados del ácido betulínico

Los resultados alentadores obtenidos acerca del betulínico han hecho de este compuesto un buen candidato para el tratamiento clínico de varios tipos de cáncer. Además, se están llevando a cabo estudios sobre derivados sintéticos del betulínico para establecer significativamente la relación existente entre estructura-actividad. Tres posiciones en el ácido betulínico C-3 hidroxilo, C-20 alqueno y C-28 carboxílico (figura 2.3) son las principales dianas de estos estudios de derivatización (Cichewicz y Kouzi, 2004).

Sólo un limitado número de los derivados C-3 betulínicos han mostrado cierta citotoxicidad. Algunas de estas modificaciones incluyen la oxidación a cetona, acetilación y la formación de varios nitrógeno derivados (amina, oxiamina). Kim y col., en 1998, determinaron que aunque la introducción de una oxima en el C-3 no tiene un gran impacto sobre la citotoxicidad del betulínico si lo tiene sobre su selectividad frente a las células de melanoma. La oxidación de C-3 hidroxil a cetona da como resultado un aumento de su citotoxicidad (Kinoshita y col., 1999; Lee y col. 1996). Cambios menores en el C-29 tales como la introducción de un motivo cetona o oxima dan lugar a la pérdida completa de actividad (Kim y col, 2001). Sin embargo, la hidrogenación del doble enlace en el C-20 parece no tener efecto sobre la citotoxicidad del betulínico. En todos los casos un grupo carbonil en el C-28 fue esencial para preservar la citotoxicidad del compuesto (Kim y col., 1998; Jeong y col., 1999; Hata y col., 2002). Estos resultados demuestran que el grupo funcional C-28 es necesario para preservar la actividad biológica del ácido betulínico

Otros compuestos relacionados con el ácido betulínico son la betulina y los derivados de ésta. Se determinó la IC₅₀ de betulina y de sus derivados 3β-O-(E)-feruloilbetulina y 3β-O-(E)-coumaroilbetulina, en diferentes líneas cancerígenas Lu1 (cáncer de pulmón), Col2 (cáncer de



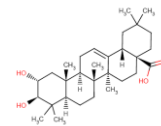
colon), KB (carcinoma epidérmico oral), LNCaP (cáncer de próstata hormonal dependiente), hTERT-RPE1 (células epiteliales pigmentadas), HUVEC (células del endotelio umbilical). Siendo la IC_{50} para cada tipo celular: Betulina: IC_{50} (Lu1) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (Col2) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (KB) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (LNCaP) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (hTERT-RPE1) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (HUVEC) > 20 $\mu\text{g/mL}$; 3β -O-(E)-feruloilbetulina: IC_{50} (Lu1) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (Col2) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (KB) = 7.7 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (LNCaP) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (hTERT-RPE1) = 11.2 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (HUVEC) > 20 $\mu\text{g/mL}$; 3β -O-(E)-coumaroilbetulina: IC_{50} (Lu1) = 18.1 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (Col2) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (KB) = 10 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (LNCaP) = 16 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (hTERT-RPE1) > 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} (HUVEC) = 13.8 $\mu\text{g/mL}$. (Hwang y col., 2003).

También se han descrito la síntesis y el comportamiento citotóxico de los derivados 3β -acetoxilupano con modificaciones oxidativas sobre el anillo E. Estos no sólo son efectivos sobre la mayor parte de los cánceres ensayados incluyendo líneas celulares con p53 mutado y/o pRb negativo, sino que además muestran una citotoxicidad menor sobre células no-cancerígenas (Sarek y col., 2003).

Además, se han descrito varios derivados del ácido betulínico como: talatos, ésteres y alcoholes capaces de presentar efectos citotóxicos y anticancerígenos (Urban y col., 2004; Urban y col., 2005; Kvasnica y col., 2005; Sarek y col., 2005). La síntesis y la actividad citotóxica del 3-O-acil, 3-hidrazona, 2-bromo y 20, 29-dibromo derivados y la actividades anti-angiogénicas del 3-O-acil, 3-benzilideno, 3-hidrazona, 3-hidrazina, 17-carboxiacroil éster del ácido betulínico han sido probadas con numerosos tipos de cáncer, teniendo una IC_{50} menor de 1 $\mu\text{g/mL}$ para la mayoría de ellos (Mukherjee y col., 2004a; Mukherjee y col., 2004b; Mukherjee y col., 2004c).

Además, nuevos derivados del ácido betulínico pueden producirse por biotransformación utilizando bacterias, como es el caso de *B. megaterium*. Algunos de los derivados producidos de esta forma son el ácido 3-oxolup-20(29)-en-28-oico, ácido 11α -3-oxolup-20(29)-en-28-oico y el ácido 1α -3-oxolup-20(29)-en-28-oico, mostrando unas IC_{50} frente a la línea MEL-2 por debajo de las mostradas por el ácido betulínico, siendo menores de 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Los modelos bacterianos de la transformación con citocromo P450, nos pueden ayudar a entender el metabolismo de estos compuestos. Este estudio subraya las limitaciones de la experimentación *in vitro* y la importancia de los estudios metabólicos para comprender mejor los efectos *in vivo* (Chatterjee y col., 2000)



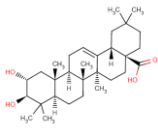
2.4.1.2 Lupeol

El lupeol se encuentra en una gran cantidad de frutas y de plantas medicinales. Posee efectos quimiopreventivos: Es capaz de suprimir la toxicidad inducida por el benzoilperóxido (BPO) en piel, activando una serie de enzimas antioxidantes inactivadas por el BPO, tales como la catalasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión-disulfito reductasa y glutatión transferasa (Saleem y col., 2001). Al mismo tiempo muestra una capacidad antioxidante directa. Sobre esta base, se ha propuesto el uso del lupeol contra enfermedades inducidas por radicales libres (Saleem y col., 2001). Otra actividad biológica del lupeol, son sus efectos antiangiogénicos. Derivados de este compuesto como el 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 28-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, han mostrado poseer efectos citotóxicos sobre distintas líneas cancerígenas NSCLC-N6 ($IC_{50} = 11-15 \mu\text{g/mL}$) (Mutai y col. 2004). La toxicidad del lupeol es muy baja. En cuanto a estudios *in vivo*, lupeol administrado oralmente en una dosis de 2g/kg no produjo efectos adversos en rata y ratón, durante 96 h de tratamiento (Geetha y Varalaxmi, 1998)

2.4.2 Grupos oleanano y ursano

A pesar de que estos dos grupos derivan de esqueletos carbonados diferentes, poseen una estructura muy similar (Ovesna, 2004), encontrándose de forma conjunta en muchas de sus fuentes naturales. Dentro de estos grupos se encuentran los triterpenos que junto con el betulínico han sido los más ampliamente estudiados: los ácidos oleanólico y ursólico (Liu, 1995; Liu, 2005). Estos triterpenoides están presentes en gran cantidad de alimentos, plantas medicinales y otros vegetales, son los mayores componentes de algunas hierbas medicinales de la medicina tradicional y de la medicina oriental, encontrándose ampliamente distribuidas por todo el mundo.

Ambos son efectivos frente a lesiones hepáticas inducidas en animales en laboratorio. Se han utilizado desde la antigüedad en Asia como fármacos orales contra los desordenes hepáticos. Los mecanismos de hepatoprotección de estos dos compuestos involucran la inhibición de la actividad tóxica de xenobióticos y la activación del sistema inmune del organismo. Oleanólico y ursólico son además ampliamente reconocidos como antiinflamatorios y antihiperlipidémicos (Liu, 1995; Liu, 2005). Algunas de las actividades que presentan, además de las ya mencionadas, son: antiulcérica, cardiovascular, gastroprotectiva, anti-HIV, antiaterosclerótica e

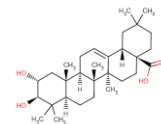


immunoreguladora. Aunque son especialmente interesantes por sus actividades anti-tumorales y quimiopreventivas. Ambos compuestos han mostrado actuar en varios estados en el desarrollo tumoral, incluyendo inhibición de tumorigénesis, inhibición de la promoción tumoral e inducción de la diferenciación celular. En efecto, inhiben la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis. Sin embargo, el mecanismo mediante el que actúan no se ha determinado de forma suficientemente clara. Los ácidos ursólico y oleanólico son relativamente no tóxicos, pudiendo ser utilizados clínicamente como agentes quimiopreventivos/quimioprotectores (**Ovesna, 2004**). Como la mayoría de los triterpenos pentacíclicos de origen natural estos compuestos han mostrado ser relativamente no tóxicos (**Liu, 1995; Liu, 2005**).

El uso de los ácidos ursólico y oleanólico ha sido recomendado como terapia contra el cáncer de piel (**Muto, 1990**). Preparaciones cosméticas que contienen ursólico y oleanólico han sido patentadas en Japón para la prevención del cáncer de piel por uso tópico. Preparaciones farmacéuticas que contienen ácido oleanólico están patentadas para el tratamiento de leucemia no linfática (**Ishida y col., 1990**).

Hay un interés creciente en la determinación del papel biológico de ambos compuestos triterpénicos, suscitando un gran interés en la comunidad científica por los efectos farmacológicos que presentan combinados con su baja toxicidad. Muchos de los efectos terapéuticos que muestran han sido confirmados por las investigaciones científicas que actualmente se están llevando a cabo (**Ovesna, 2004**). Los procesos de iniciación tumoral, tumorigénesis y desarrollo tumoral son inhibidos por ambos compuestos en diferentes grados, siendo en el desarrollo tumoral donde estos dos compuestos han mostrado una mayor efectividad (**Liu, 2005**).

Por último, también hay que tener en cuenta que la solubilidad en agua de estos dos ácidos, ursólico y oleanólico, así como de otros triterpenos es limitada, por lo que su biodisponibilidad también es limitada. Se ha intentado aumentar la solubilidad de estos compuestos mediante la síntesis de derivados modificados químicamente. Otro medio utilizado para incrementar la solubilidad de estos compuestos es la formación de complejos no covalentes con ciclodextrinas hidrofílicas. Consideraciones farmacocinéticas y farmacodinámicas son igualmente importantes para conseguir un aumento de la biodisponibilidad y en el efecto biológico de estos compuestos. (**Chem y col., 2005**).



2.4.2.1 Ácido ursólico

El ácido ursólico (ácido 3β-hidroxiurs-12-en-28-oico) es seguramente uno de los triterpenos pentacíclicos más extendido en el reino vegetal, se encuentra en altas concentraciones en plantas superiores tales como *Rosmarinus officinalis*, *Glechoma hederaceae* etc. Es inductor de diferenciación, antimutagénico, antiviral y evita la metástasis. Además, es capaz de inducir el proceso de apoptosis en células tumorales y previene la transformación de células normales en células malignas. Interfiere con numerosas enzimas incluidas algunas que actúan directamente sobre la síntesis de DNA (Novotny, Vacchalkova y Biggs, 2001).

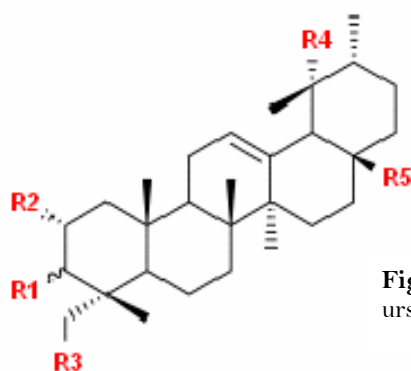
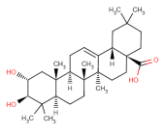


Figura 2.4 Estructura del ácido ursólico y sus derivados.

	R1	R2	R3	R4	R5
Ácido ursólico	α-OH	H	H	H	CO ₂ H
Ácido pomólico	β-OH	H	H	OH	CO ₂ H
Ácido 19α-hidroxi-ursólico	α-OH	H	H	OH	CO ₂ H
Ácido 19α-24β-dihidroxi-ursólico .	α-OH	H	OH	OH	CO ₂ H
Uvanol	β-OH	H	H	H	CH ₂ OH
Ácido asiático	β-OH	OH	OH	H	CO ₂ H

Tabla 2.3 Ácido ursólico y sus derivados.

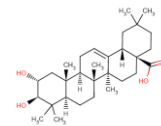
En suma, el ácido ursólico y sus derivados (figura 2.4, tabla 2.3) han mostrado efectos antitumorgénicos inhibiendo la promoción tumoral (Tokuda y col., 1986; Ohigashi y col., 1986; Nishino y col., 1988) y suprimiendo la angiogénesis (Sohn y col., 1995). El ácido ursólico también es capaz de inducir apoptosis en una gran variedad de líneas celulares cancerígenas incluyendo cáncer de mama, melanoma, hepatoma, carcinoma de próstata, y leucemia mieloide aguda (Es-Saady y col., 1996a; Es-Saady y col., 1996b; Choi B. y col., 2000; Choi Y. y col., 2000; Hollosy y col., 2000 y Hollosy y col., 2001; Choi y col., 2001; Konopleva y col., 2002). Estos procesos tienen lugar a través de la inhibición de la replicación de DNA (Kim D. y col., 2000), activación de caspasas (Choi Y. y col., 2000; Hollosy y col., 2001; Konopleva y col., 2002), inhibición de tirosín quinasas (Hollosy y col., 2000), e inducción de la liberación de Ca²⁺ (Baek y col., 1997; Lauthier F. y col., 2000).



En cuanto a la citotoxicidad producida por este producto sobre distintas líneas cancerígenas *in vitro*, **Min y col.** en **2000**, probaron la actividad citotóxica del ácido ursólico contra las líneas celulares L1210 de roedor y las líneas humanas A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 y HCT15 humanas. El ácido ursólico mostró una citotoxicidad moderada contra la línea L1210, mientras que la citotoxicidad fue baja contra las líneas cancerígenas humanas. Por otra parte el ácido ursólico posee una elevada actividad contra líneas celulares de leucemia y linfoma, siendo marcadamente efectivo contra la línea de linfoma IC_{50} (P3HR1) = 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y las células de leucemia mielógena crónica IC_{50} (K562) = 17.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Chiang y col.**, **2003**). Los valores de LD_{50} (LD , dosis letal al 50%, equivalente a IC_{50}) hallados para el ácido ursólico en distintas líneas celulares cancerígenas fueron los siguientes: LD_{50} (NUGC) = 30 μM , LD_{50} (HCT-15) = 3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LD_{50} (UI50) = 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y LD_{50} (OV50) = 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LD_{50} (SK-MEL-3) = 4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LD_{50} (XF498) = 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LD_{50} (HCT160) = 4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IC_{50} (HONE-1 y KB) = 8.8 μM (**Chiang y col.**, **2005**).

Li, Guo y Yang en **2002**, investigaron efectos inhibidores de los ácidos ursólico y oleanólico sobre la proliferación en la línea celular de carcinoma de colon HCT15. La citotoxicidad del ácido ursólico fue mayor que la del ácido oleanólico. Los valores de IC_{50} para los ácidos ursólico y oleanólico fueron de 30 y 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$, respectivamente. Cuando las células fueron tratadas a concentraciones de IC_{50} durante 36 y 72 h, las fases G_0/G_1 se incrementaron de forma gradual, con una concomitante disminución de la población en fase S, no detectándose fracción apoptótica.

Respecto a la promoción tumoral y tumorigénesis, los ácidos ursólico y oleanólico poseen efecto inhibitor *in vitro* sobre la activación del virus de Epstein-Barr inducido por el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) (**Ito y col.**, **1983**; **Ohigashi y col.**, **1986**) e *in vivo* (**Tokuda y col.**, **1986**). El ácido ursólico fue más efectivo aplicándolo inicialmente que durante el tratamiento con TPA. Mientras que el ácido oleanólico no fue efectivo sobre este tratamiento (**Tokuda y col.**, **1986**). Esto sugiere que el papel del ácido ursólico sobre la inhibición del desarrollo tumoral difiere de la acción del oleanólico (**Ohigashi y col.**, **1986**; **Tokuda y col.**, **1986**). En el modelo tumorigénico de dos estados sobre piel de ratón, donde la tumorigénesis se inicia por acción del DMBA (dimetil-benzantraceno) y se desarrolla por TPA, el porcentaje de ratones que desarrollaron papilomas y el número medio de papilomas por ratón se redujo notablemente por la aplicación tópica de ácido oleanólico y ursólico (**Tokuda y col.** **1986**), siendo el ácido ursólico más efectivo en aplicación simple. Este efecto es comparable al del



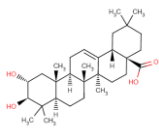
ácido retinóico o la vitamina D3, aunque estos inhibidores son excesivamente tóxicos y poseen una eficacia relativa menor. Posteriores estudios han confirmado y extendido estos hallazgos **(Hirota y col., 1990; Huang y col., 1994; Shibata y col., 1994)**

De forma similar al ácido oleanólico, el ácido ursólico inhibe *in vivo* el crecimiento de cáncer en modelos de ratón y posee efectos protectores frente a la radiación UV en tejido hematopoyéticos. Su efecto es mayor cuando la aplicación es de preirradiación. También se han encontrado efectos antioxidantes inducidos por el ácido ursólico, teniendo propiedades inhibitorias sobre la modulación de la ruta de transducción activada por rayos UV sobre la piel humana. El ácido ursólico suprime significativamente la producción de especies oxígeno reactivas (ROS) inducidas por UVA, así como la peroxidación lipídica, el tratamiento con ursólico inhibe la peroxidación de lípidos mitocondriales e incrementa los niveles de superóxido dismutasa. **(Sohn y col. 1995)**

Por último, como el ácido oleanólico, el ácido ursólico produce diferenciación en células F9 de teratocarcinoma humano induciendo la expresión de genes como laminina B1 y colágeno IV, propios de las células diferenciadas **(Lee y col., 1994)**. Otros de los efectos diferenciadores descritos están relacionados con su actividad antiangiogénica, aunque una observación detallada revela que tales efectos pueden ser debidos a la degradación de la matriz extracelular por la activación de la metaloproteinasas 2 y uroquinasa **(Cárdenas, Quesada y Medina, 2004)**.

2.4.2.1.1 Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido ursólico

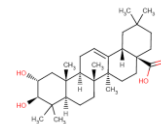
La acción directa sobre células tumorales, de los ácidos oleanólico y ursólico, induce inhibición del crecimiento en la fase G₁ del ciclo celular y apoptosis en ciertos sistemas de células cancerígenas, impidiendo la proliferación y diferenciación de las células malignas, aunque el mecanismo mediante el que tiene lugar esta actividad no está aún claro. Se han propuesto mecanismos que involucran la supresión en la expresión de ciertos oncogenes tales como c-jun y c-fos, así como la inducción de la diferenciación, en ocasiones relacionado con la remisión de ciertos tumores **(Rhew, 1993)**. Por otro lado el ácido ursólico es de forma directa efectivo contra la unión covalente del benzopireno con el DNA, así como frente al dimetil-benz[a]antraceno (DMBA) **(Huang, 1994)**. También es capaz de inhibir la mutagenicidad inducida por aflatoxina-B₁ en *Salmonella typhimurium* **(Young, 1994)**. Lo que sugiere que este



compuesto es capaz de interactuar directamente con el DNA, impidiendo la acción de mutágenos. Por último el ácido ursólico muestra actividad inhibitoria frente a las α - y β - DNA polimerasas y las DNA topoisomerasas I y II humanas. También inhibe la DNA polimerasa α bovina, polimerasa β murina, la HIV transcriptasa inversa y la DNA polimerasa II aunque en menor grado (Liu, 1995).

Los efectos antitumorales, antitumorgénicos y contra la promoción tumoral podrían estar mediados por la supresión de la expresión de distintos genes como los de la lipoxigenasa, COX-2, MMP-9, e iNOS (Simon y col., 1992; Najid y col., 1992; Cha y col., 1996; Cha y col., 1998; Ringbom y col., 1998; Subbaramaiah y col., 2000; Suh y col. 1998) todos ellos están regulados por el factor de expresión nuclear NF- κ B. Por tanto, el ácido ursólico induciría apoptosis a través de la inhibición de genes que anulan el proceso de apoptosis y que son activados por NF- κ B. Múltiples evidencias sugieren que COX-2 esta sobreexpresada en diferentes tipos de células transformadas y en varias formas de cáncer (Eberhart y col., 1994; Ristimaki y col., 1997; Parett y col., 1997; Chan y col., 1999; Tucker y col., 1999), donde los niveles de COX-1 permanecen prácticamente sin cambios. La deficiencia en COX-2 protege contra papilomas inducidos químicamente (Tiano y col., 1997). Resumiendo, COX-2 está evidentemente implicada en la tumorigénesis, por lo que inhibidores de COX-2 disminuyen la formación de tumores *in vivo*. El ácido ursólico, disminuye la transcripción de COX-2, inducida por PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) y de prostanglandia E₂; suprime, además, la síntesis del mRNA de COX-2. Este efecto sobre COX-2 tiene lugar a partir de la inhibición de la ruta de señalización de PKC y AP-1 (Ringbom y col., 1998). Inhibe la translocación de PKC activa desde el citosol a la membrana citoplasmática, así como la activación de ERK1/2, JNK y p38 MAPKs. En un buen número de tumores PKC y AP-1 están sobreexpresadas, apuntando al uso de estos compuestos en terapias antiproliferativas. El ácido ursólico es también capaz de inhibir las prostaglandinas (PGs) mediante la inhibición de la expresión del gen de COX-2. Las PGs son proinflamatorias y están involucradas en la predisposición a la inflamación crónica maligna. (Subbaramaiah y col., 2004).

El mecanismo mediante el cual los ácidos ursólico y oleanólico suprimen estos procesos puede estar relacionado con varios efectos: a) Inhibición de la inflamación producida por distintos promotores tumorales (Huang y col., 1994, Shibata y col., 1994); b) Inhibición de la actividad ornitina descarboxilasa producida por el promotor tumoral TPA en piel de ratón (Huang y col., 1994); c) Supresión en la expresión de ciertos oncogenes tales como c-jun y c-fos (Rhew y col. 1993); d) Inducción de diferenciación, efecto que puede estar relacionado con la remisión

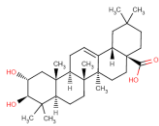


parcial de algunos tumores benignos (Lee y col., 1994); d) Modulación del sistema inmunológico, así como del potencial antioxidante (Dominic y col., 1993).

La mayoría de los procesos de tumorigénesis requieren transformaciones celulares, tales como hiperproliferación, invasión, angiogénesis, y metástasis. La regulación de los genes que median en estos procesos es llevada a cabo por factores de transcripción tales como NF- κ B activado por la ruta de señalización inflamatoria y AP-1 activado por fosforilación JNK dependiente. NF- κ B puede ser activado por diversos agentes carcinógenos, inflamatorios y promotores tumorales. Así que, agentes que puedan suprimir la activación de NF- κ B son potencialmente anti-carcinogénicos. En este sentido, el ácido ursólico se ha mostrado capaz de suprimir la expresión de algunos genes asociados con los procesos de tumorigénesis. El ácido ursólico suprime la activación de NF- κ B inducida por varios cancerígenos incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF- α), éster de forbol, ácido okadaico y peróxido de hidrógeno con una IC₅₀ próxima a 50 μ M (Shishodia y col., 2003).

El ácido ursólico inhibe la expresión de genes activados por el factor de transcripción NF- κ B, que es a su vez activado por la ruta de señalización inducida a través del receptor TNFR. En resumen, esta ruta comenzaría por la activación de TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) lo que movilizaría a TRADD (adaptador del TNFR asociado a dominio de muerte) y TRAF2 (Factor asociado a TNFR). Este proceso activaría a NIK (quinasa inductora de NF- κ B), la cual fosforila a IKK (quinasa del inhibidor de la quinasa B o I κ B α), que a su vez fosforila a I κ B α promoviendo su degradación y activando, también por fosforilación, a p65 (NF- κ Bp65), (Shishodia y col., 2003).

El ácido ursólico produce la inhibición de la expresión de los genes NF- κ B dependientes, impidiendo la activación de IKK, lo que impide la degradación de I κ B α evitando su fosforilación, lo que finalmente conduce a la supresión de: la fosforilación de p65, su translocación nuclear y la unión al DNA de NF- κ B, constituido por NF- κ B(p50) y NF- κ B(p65) (Shishodia y col., 2003), este efecto no es específico de una determinada línea celular. La inhibición de la activación de NF- κ B por el ácido ursólico produce la supresión de la expresión de la ciclina D1 NF- κ B-dependiente, la inhibición de la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y de la metaloproteínasa 9 (Shishodia y col., 2003; Ovesna y col., 2004). Por otra parte, el ácido ursólico no interfiere directamente en la unión de NF- κ B con el DNA. Sino que ésta ocurre mediante la inhibición de la activación de IKK (Ovesna y col., 2004).

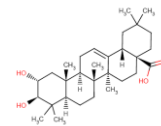


Para determinar el mecanismo del efecto antitumoral del ácido ursólico se investigaron los efectos de este compuesto sobre la liberación de óxido nítrico (NO) y TNF- α , así como, sobre los niveles de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y los niveles de RNAm del TNF- α en macrófagos de ratón arrestados (You y col., 2001). El ursólico indujo un aumento en los niveles de todos estos compuestos de forma dosis dependiente. Según estos autores estos incrementos estuvieron mediados por la transactivación del factor NF-kB, el cual juega un papel crítico en la activación del sistema inmunitario regulando la producción de citoquinas. Por tanto, estos autores hipotetizan que parte de los efectos antitumorales que presenta el ácido ursólico *in vivo* estarían relacionados con la producción de NO en macrófagos, los resultados sugieren que la secreción de NO y TNF α están reguladas por el mismo mecanismo produciendo en primer lugar TNF α , siendo el inductor de la producción de NO (You y col., 2001). El NO sintetizado por la iNOS media en una gran diversidad de funciones como la vasodilatación, neurotransmisión, inhibición de la agregación plaquetaria, respuesta inmune, inhibición de la producción de matriz extracelular. Además, es la principal molécula efectora involucrada en la destrucción de células tumorales por la activación de macrófagos, respuesta inmune inespecífica, inhibición de la proliferación de microorganismos y sobre células tumorales *in vitro* (Nathan C., 2006).

Respecto a las rutas clásicas de inducción de apoptosis Kim y col., en 2000, investigaron los efectos apoptóticos del ácido ursólico sobre la línea celular de hepatoblastoma HepG2. El tratamiento con ursólico disminuyó la viabilidad de las células HepG2 de forma concentración dependiente. Por otra parte, 30 μ M de ursólico indujo la fragmentación de DNA y activación de la liberación de citocromo-c, así como actividad caspasa-3. En el caso de líneas de leucemia HL-60, el ácido ursólico produjo apoptosis por vía mitocondrial (Fernandes y col., 2003; Fernandes y col., 2005).

Andersson y col., en 2003, estudiaron el efecto anticancerígeno del ácido ursólico sobre las células de cáncer de colon HT29. El tratamiento con ácido ursólico produjo una inhibición en la proliferación celular dosis dependiente, así como la inducción de apoptosis, acompañada por la activación de las caspasas 3, 8 y 9. Por último, el ácido ursólico incrementa selectivamente la actividad de la esfingomielinasa alcalina (Ovesna y col., 2004), lo cual ocurre de forma previa a la activación de las caspasas.

Otro efecto encontrado en la acción del ácido ursólico es la inhibición de la unión Balb/c al receptor TGF-1, (factor transformante del crecimiento), en fibroblastos de ratón 3T3 (Murakami



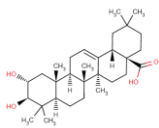
y col., 2004). El TGF-1, citoquina multifuncional, que se encuentra en la matriz extracelular, presenta un papel importante en la patogénesis y progresión de enfermedades fibróticas. El ácido ursólico inhibe la unión de Balb/c al receptor TGF-1 presentando una IC_{50} de $6.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$. El tratamiento con ácido ursólico reestableció de forma dosis-dependiente la proliferación reducida por 5nM de TGF-1 en células Minc, Mv1Lu y disminuyó la síntesis y producción de colágeno inducida por TGF-1 en fibroblastos humanos. Simulaciones biocomputacionales de dinámica molecular sugieren que el ácido ursólico podría interactuar con la región hidrofóbica de la superficie dimérica de este receptor.

2.4.2.1.2 Derivados del ácido ursólico

Derivados del ácido ursólico como el TP-72 inhibieron la activación de NF-kB en macrófagos de ratón, inducida por IFN- γ , lipopolisacárido, o TNF, con una IC_{50} próxima a $20 \mu\text{M}$ (Suh y col., 1998). Por último, los ácidos oleanólico y ursólico, así como sus derivados 2 α -hidroxiursólico, 2 α ,19 α -dihidroxi-3-oxo-urs-12-en-28-oico mostraron efectos citotóxicos frente a las líneas tumorales HSC-2 y HSG, con valores de IC_{50} comprendidos entre $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $48 \mu\text{g}/\text{mL}$. Estos compuestos produjeron efectos inhibitorios sobre la activación del antígeno temprano del virus de Epstein-Barr (EBV-EA) inducido por TPA, comparables al EGCG (epi-galocatequina-galato). El 2 α , 19 α -dihidroxi-3-oxo-urs-12-en-28-oico fue el inhibidor más potente causando un significativo retraso en la aparición de carcinogénesis sobre la piel de ratón, en el modelo de de dos etapas inducido por NO. El número medio de papilomas por ratón disminuyó un 40% respecto al control tras 20 semanas de tratamiento. (Taniguchi y col. 2002)

2.4.2.2 Ácido oleanólico

El ácido oleanólico es el principal aglicano encontrado en la mayor parte de las saponinas triterpenoides de plantas medicinales y ha sido aislado en más de 120 especies de plantas diferentes. (Liu, 1995; Liu, 2005). El ácido oleanólico (3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) (figura 2.5, tabla 2.4) está presente por ejemplo en altas concentraciones en la raíz del ginseng (Shibata, 1977). Como en el caso del ácido ursólico, el ácido oleanólico posee un amplio rango de efectos antitumorales. Induce diferenciación en células de teratocarcinoma F9 (Lee y col., 1994). Posee características anti-mutagénicas (Niikawa and col., 1993) y antiangiogénicas (Sohn y col., 1995).



Los valores de CC_{50} encontrados para el ácido oleanólico en las líneas cancerígenas HSC (carcinoma escamoso oral), HSG (tumor de la glándula salivar) y sobre la línea normal o no transformada HGF (fibroblastos gingivales), fueron: 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en HSC-2, 230 en HSG $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mayor de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en HGF. Aunque todos los valores encontrados fueron bastante altos, el valor de CC_{50} no pudo ser determinado en HGF por lo que podemos decir que este ácido tiene un comportamiento diferencial respecto a esta línea normal o no transformada (Taniguchi y col., 2002).

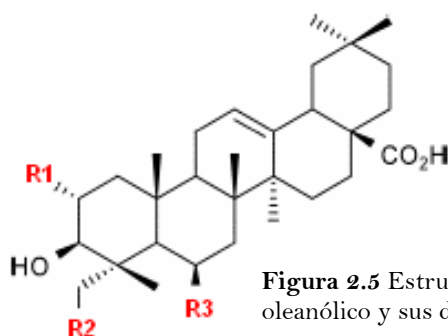


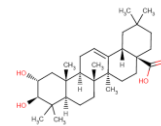
Figura 2.5 Estructura del ácido oleanólico y sus derivados.

	R1	R2	R3
Ácido oleanólico	H	H	H
Ácido maslínico	OH	H	H
Ácido ariulónico	OH	OH	OH
Ácido terminólico	OH	OH	H

Tabla 2.4 Ácido oleanólico y sus derivados.

El ácido oleanólico inhibe el crecimiento e induce apoptosis en la línea de eritroleucemia K562. Además, inhibe la proliferación de la líneas resistentes a otros compuestos como la línea celular derivada de K562 resistente a la vincristina (Fernandes y col., 2003). En células HeLa presenta una IC_{50} de 6,49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sun y col., 2006). Además, el ácido oleanólico es capaz de inhibir la mutagenicidad producida por el benzopireno en bacterias (Niikawa y col., 1993).

Aparte de sus efectos citotóxicos, los ácidos oleanólico y ursólico presentan efectos antiangiogénicos. La angiogénesis es un importante factor en el crecimiento progresivo de tumores y los capacita para poder extenderse por metástasis desde el tumor primario. Ha sido examinada la capacidad antiangiogénica de los ácidos oleanólico y ursólico sobre la membrana corioalantoica embrionaria de pollo (“CAM assay”). El tratamiento con los ácidos oleanólico y ursólico inhibe la angiogénesis de manera dosis dependiente; la dosis requerida para la mitad de la inhibición máxima (ID_{50}) fue de 40 μg para el oleanólico y de 5 μg para el ursólico. Por otro lado, los ácidos oleanólico y ursólico inhibieron la proliferación de las células endoteliales de aorta bovina de forma dosis dependiente siendo la ID_{50} de 20 μM



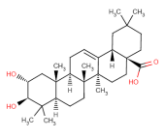
para el ácido oleanólico y de $5\mu\text{M}$ para el ácido ursólico (Sohn y col., 1995). Se ha descrito también que el ácido oleanólico inhibe significativamente la inducción de la expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) sobre células monocíticas de leucemia THP-1 (Ahn y col., 2002).

Por último, se ha determinado la toxicidad *in vivo* del ácido oleanólico sobre ratón (Astudillo y col., 2002). Dosis crecientes (200, 300, 400 y 600 mg/kg) de ácido oleanólico fueron administradas de forma intraperitoneal. Se seleccionó la ruta intraperitoneal porque permite una mayor cantidad en la administración del compuesto y debido también a la baja solubilidad del ácido oleanólico. Dosis superiores a 600 mg/kg, administradas de forma intraperitoneal no causaron toxicidad o mortandad alguna por lo que la LD_{50} del ácido oleanólico debe ser mayor a este valor. Singh y col., 1992, encontraron resultados similares en ratones y ratas con una LD_{50} superior a 2g/kg.

2.4.2.2.1 Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido oleanólico

En cuanto a sus efectos a nivel molecular, estos son comparables a los del ácido ursólico. Se ha descrito la inhibición de la producción de prostaglandina PGE_2 , por la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) por parte del ácido oleanólico con una IC_{50} de $295\mu\text{M}$ (Ringbom y col., 1998). Posee una actividad inhibitoria sobre NFAT (factor nuclear de activación de células T) con una IC_{50} mayor de $50\mu\text{M}$ (Dat y col., 2004). Al igual que ocurría con el ácido ursólico, se ha descrito que este ácido estimula la liberación de NO y $\text{TNF}\alpha$, incluyendo la inducción de expresión de iNOS y $\text{TNF-}\alpha$ en macrófagos (Choi, You y Jeong, 2001). Este artículo es prácticamente idéntico al publicado por You y col. en 2001, en el que sólo cambia el nombre del compuesto y los datos referentes al mismo, se describe el incremento en los niveles de NO y $\text{TNF}\alpha$, mediante la transactivación del factor NF- κB , por el ácido oleanólico.

Al igual que ocurre con el ursólico el mecanismo molecular del ácido oleanólico puede estar relacionado con la inhibición de la inflamación producida por promotores tumorales, supresión de la expresión de ciertos oncogenes, como c-jun y c-fox (Rhew y col., 1993) e inducción de diferenciación. El ácido oleanólico al igual que el ursólico causa cambios morfológicos de células F9 de teratocarcinoma a células endodérmicas, así como la expresión de los marcadores de diferenciación colágeno IV y laminina B1. Por último, el ácido oleanólico induce diferenciación sobre células M1 a macrófago (Umehara y col., 1992).



El mecanismo molecular por el que actúa este compuesto no está del todo claro, ya que la mayoría de los esfuerzos relacionados con este triterpeno se han concentrado en la caracterización de la actividad de su derivado ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico o CDDO, el cual es bastante más efectivo, aunque también posee una mayor toxicidad, produciendo los mismos efectos que el ácido oleanólico de forma mucho más acentuada y a concentraciones muy bajas.

2.4.2.3 CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico)

A pesar de tratarse de un derivado del ácido oleanólico, el 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) (figura 2.6, tabla 2.5) ha suscitado un gran interés en la comunidad científica siendo ampliamente estudiado, ya que muestran un amplio rango de efectos biológicos, a concentraciones extremadamente bajas. El CDDO es por tanto una molécula muy interesante capaz de inducir diferenciación celular y apoptosis por rutas dependientes e independientes de la permeabilización mitocondrial.

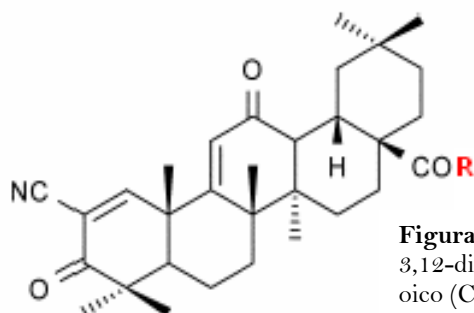
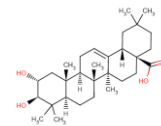


Figura 2.6 Estructura del 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) y sus derivados

	R
Ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO)	OH
CDDO metil éster	OCH ₃
CDDO imidazolío	

Tabla 2.5 CDDO y sus derivados.

Esta molécula multifuncional induce la diferenciación monocítica en células de leucemia mieloide humanas, CLLB (Pedersen y col., 2002), diferenciación adipogénica de fibroblastos de ratón 3T3-L1, diferenciación neuronal de células de rata PC12 (Suh y col., 1999). También induce inhibición de la proliferación en una amplia serie de líneas cancerígenas humanas por mecanismos apoptóticos dependientes e independientes de la ruta mitocondrial, incluyendo aquellas que derivan de carcinoma de mama y algunos carcinomas relacionados con



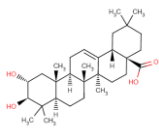
mutaciones en Smad-4 (Ito y col., 2000). Las concentraciones de IC₅₀ halladas para este compuesto se encuentran en un rango de 0.03-1 μ M. Bloquea la síntesis de iNOS y COX-2 a concentraciones menores de 1 μ M, e inhibe la producción de NO y prostaglandina E2 (PGE2) a concentraciones tan bajas como 1 pM (Honda y col., 2002; Suh y col., 1999). Respecto a ensayos *in vivo* en el modelo KBM-3 de leucemia de médula ósea, el CDDO administrado en dosis de 6mg/kg durante 10 días de tratamiento intravenoso disminuyó el porcentaje de células leucémicas 5 semanas después del trasplante del tumor en ratón (Konopleva y col. 2004).

Otros efectos desencadenados por este compuesto son la inhibición de varias citoquinas inflamatorias, tales como IFN- γ , interleukina-1, y TNF α . Este efecto ocurre a través de la supresión de la síntesis de las enzimas iNOS y COX-2. Resultados que han sido obtenidos en macrófagos peritoneales de ratón, en microglía de cerebro de rata y en fibroblastos humanos (Suh y col., 1999). Por último, CDDO puede proteger las neuronas del hipocampo en cerebro de rata de la muerte inducida por β -amiloide (Suh y col., 1999).

Una explicación interesante de la diferenciación adipogénica de los fibroblastos 3T3-L1 es la transactivación directa de PPAR γ (receptor gamma del peroxisoma activador de la proliferación) por el CDDO. Esta proteína forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR) que permite la activación de la transcripción del gen PPAR γ . Los estudios de “binding” y de transactivación mostraron que CDDO es un agonista parcial de PPAR γ , esta activación permite la inhibición de la proliferación y consecuentemente, la inducción de apoptosis (Lapillonne y col., 2003). Aunque, por otro lado CDDO también es capaz de inducir apoptosis de forma sinérgica con el compuesto ‘bexaroten’ el cual es un ligando de PPAR γ , este hecho fue observado en células de piel y linfoma. Lo que sugiere que la activación de PPAR γ no es, en este caso, el único mecanismo de inducción de apoptosis (Zhang y col., 2004). Como resultado de los estudios de citotoxicidad en células cancerígenas y en modelos *in vivo* de mamífero, se ha propuesto el CDDO como candidato para el tratamiento en cáncer de mama. En estas células CDDO activa la transactivación de PPAR γ , induciendo inhibición de crecimiento celular tiempo y dosis dependiente. En estos tipos celulares CDDO regula la expresión de p21 y de proteínas como la ciclina D1 y Bcl-2 (Lapillonne y col., 2003).

2.4.2.3.1 Mecanismo molecular de inducción de apoptosis por el CDDO

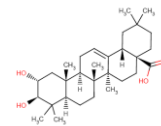
Se han realizado multitud de estudios encaminados a la dilucidación del mecanismo de apoptosis inducido por CDDO. Los resultados muestran que este compuesto puede inducir



apoptosis por un buen número de vías diferentes, dependiendo fundamentalmente del tipo celular al que se enfrente, del modelo de inducción de apoptosis estudiado, así como de las concentraciones empleadas.

Las evidencias disponibles indican que el derivado 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) induce apoptosis, al menos, en gran parte, por la activación de la ruta extrínseca mediada por caspasa-8 (Ito y col., 2000; Stadheim y col., 2002; Ito y col., 2001; Pedersen y col., 2002). Sin embargo, el mecanismo en el que se basa esta respuesta aún no es del todo claro (Ikeda, 2003). Así por ejemplo, la inducción de apoptosis por CDDO en las líneas celulares Saos-2, U2OS, U-937, HL-60 y AML aisladas de medula ósea, ocurre a través de la activación proteolítica de Bid dependiente de caspasa 8. Lo que finalmente provoca la liberación de citocromo-c desde la mitocondria y la activación completa de la cascada de caspasas (Ito y col., 2000, Ito y col., 2001; Konopleva y col., 2004; Lapillonne y col., 2003).

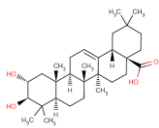
Otra hipótesis propuesta, en el mecanismo de activación de apoptosis por CDDO, ha sido la activación de la caspasa-3 a través de la caspasa-8 mediante un mecanismo independiente de citocromo-c (Ito y col., 2001). Esta activación podría ocurrir probablemente a través de la activación de un receptor tipo fas (o TNFR), reclutamiento del factor FADD lo que induciría el autoprocésamiento de la caspasa-8. Se ha demostrado que este sistema mediado por receptor puede inducirse independientemente del mecanismo mitocondrial (Muzio y col., 1996; Boldin y col., 1996), así como que la caspasa-8 puede activar directamente a la caspasa-3 (Stennicke y col., 1998). El tratamiento con CDDO en células de osteosarcoma no indujo la liberación de citocromo-c hasta las 18 o 24 h de tratamiento, mientras que la caspasa-8 era activa a las 3 horas. A continuación, tendría lugar la liberación de citocromo-c, desde la mitocondria, de forma dependiente de caspasa-8, amplificando así la señal apoptótica inicial. La asociación del citocromo-c con la proteasa apoptótica citoplasmática (Apaf-1) y la caspasa-9, dan lugar finalmente, a la activación de la caspasa-3. Este mecanismo fue confirmado por el bloqueo de la liberación de citocromo-c en respuesta a la sobre-expresión del inhibidor de caspasa-8, CrmA. Sin embargo, la sobre-expresión de Bcl-x_L, que bloquea la liberación de citocromo-c evitando la permeabilización de la mitocondria, produjo tan solo la inhibición parcial de caspasa-3. Podemos concluir por tanto que en estos tipos celulares la inducción de apoptosis por CDDO es dependiente de la activación de caspasa-8 y parcialmente dependiente de la liberación de citocromo-c (Ito y col., 2001). En este estudio se muestra además, la inducción de diferenciación en células de osteosarcoma por CDDO, como refleja en el incremento de actividad de la fosfatasa alcalina, así como la producción de osteocalcina.



Sin embargo otros estudios demuestran que CDDO puede inducir apoptosis en células deficientes tanto de caspasa-9 como de caspasa-8, sugiriendo por tanto un mecanismo de apoptosis, tanto dependiente como independiente de caspasas iniciadoras (**Konopleva y col. 2004**). Estos autores determinaron el mecanismo de inducción de apoptosis por el CDDO en células de leucemia aguda resistentes a fármacos, AML. CDDO indujo apoptosis en células deficientes en caspasa-9 y en caspasa-8. Sin embargo, células que sobre-expresaban Bcl-2 fueron marcadamente resistentes a la apoptosis inducida por CDDO. Lo que indica que en este tipo celular la permeabilización de la mitocondria es necesaria para la inducción de apoptosis por CDDO. Estos autores confirman a la mitocondria como diana de CDDO, ya que este triterpeno fue capaz de provocar la liberación de citocromo-c en mitocondrias aisladas, sugiriendo que podría activar directamente una ruta intrínseca mitocondrial de apoptosis (**Konopleva y col. 2004**).

Otras investigaciones han mostrado que el CDDO es capaz de activar la ruta mediada por JNK de forma sostenida, mientras que por ejemplo TNF activa esta ruta de forma transitoria. El que esta activación sea sostenida o transitoria, desencadena fenómenos muy diferentes e incluso contradictorios. Mientras que la activación sostenida de JNK es pro-apoptótica, la activación transitoria de esta ruta activa la expresión de genes mediada por NF- κ B.

Stadheim y col., 2002, mostraron que el tratamiento con CDDO combinado con TNF causó un dramático incremento de apoptosis en células de leucemia ML-1 asociado con la activación de caspasa-8, la activación de Bid, la translocación de Bax, la liberación de citocromo-c y la activación de caspasa-3. Experimentos con inhibidores demostraron que la activación de caspasa-8 se encuentra en el punto inicial de esta ruta. Según estos autores la activación de JNK fue, además, dependiente de caspasa-8. Por otro lado, la inhibición de JNK no previno de la translocación de Bax o de la liberación de citocromo-c, demostrando que la acción de JNK no es esencial en la apoptosis inducida por CDDO/TNF. Esta apoptosis fue muy acentuada en todas las líneas de leucemia humana ensayadas incluyendo aquellas que sobreexpresaban Bcl-x_L. Lo que implica que la ruta mitocondrial no es determinante en la inducción de apoptosis por la combinación CDDO/TNF. Estos resultados sugieren que el potencial apoptótico de CDDO ocurre por la inhibición selectiva de las proteínas anti-apoptóticas NF- κ B dependientes, evitando el mecanismo de resistencia mitocondrial. Por último el tratamiento con CDDO inhibió la expresión de genes mediada por NF- κ B. Este efecto parece ser específico para el NF- κ B, ya que el CDDO no inhibió la expresión de genes inducida por TPA. (**Stadheim y col., 2002**).



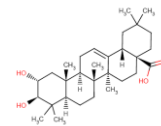
Una ruta de activación análoga ha sido descrita en la inducción de apoptosis por CDDO en células de leucemia U-937 (Ikeda y col. 2003). Según estos autores la inducción de apoptosis por CDDO se produjo a través de la activación de la ruta extrínseca de caspasa 8, activación de JNK y de p38. Además, el tratamiento con CDDO incrementó los niveles de ROS, disminuyendo la concentración de glutatión reducido GSH intracelular. La apoptosis inducida por CDDO podría esquematizarse según el siguiente mecanismo: a) activación de JNK; b) activación de caspasa-8; c) pérdida del potencial tranmembrana mitocondrial; d) liberación de citocromo-c; y e) activación de caspasa-3. Por último la activación de apoptosis fue bloqueada por el tratamiento con los antioxidantes N-acetil-L-cysteina y GSH. Por lo que se puede concluir que la alteración de los niveles oxidantes intracelulares e inducción señales redox son determinantes en la activación de la apoptosis inducida por CDDO.

2.4.2.3.2 Derivados del CDDO

El metil éster del CDDO, CDDO-Me (figura 2.6, tabla 2.5) induce citotoxicidad y diferenciación en células de leucemia mieloide, así como frente a líneas de cáncer de pulmón a concentraciones menores de 0,5 μM . (Kim y col., 2002). El mecanismo de inducción de apoptosis por este compuesto ésta mediado por la liberación de citocromo-c y la activación de las caspasas -9, -3 y -7, a pesar de la sobre-expresión de Bcl-2 (Kim y col., 2002). Según estos autores, a diferencia del CDDO, CDDO-Me ha resultado ser antagonista de PPAR γ .

Otros derivados del CDDO, el CDDO-imidazolido (figura 2.6, tabla 2.5), induce también apoptosis en la línea celular CLLB a concentraciones de 0.5 μM (Pedersen y col., 2004). Una combinación de CDDO-imidazolido con un inhibidor tumoral 'bortezomib', mostró efectos sinérgicos e indujo apoptosis en células de mieloma, en pacientes resistentes al tratamiento con 'bortezomib' (Pedersen y col., 2004).

Se ha demostrado que el CDDO-Me induce apoptosis vía JNK mediada por receptores de muerte (DR, *death receptor*), en células de cáncer de mama (Zou y col., 2004). Ciertas drogas anticancerígenas regulan la expresión de los receptores DR induciendo apoptosis o activando la apoptosis inducida por TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*). El CDDO-Me es capaz de activar una ruta extrínseca de apoptosis mediada por DR. CDDO-Me no sólo activa caspasa-8, sino que además induce la expresión de DR, particularmente de DR5, a través de un mecanismo independiente de p53 y por tanto aumentando la apoptosis inducida por TRAIL. La inhibición de la expresión de DR5 suprime únicamente la apoptosis



inducida por la combinación de CDDO-Me y TRAIL. CDDO-Me activa JNK de forma previa a la regulación de DR y a la activación de caspasa-8 (Zou y col., 2004). La participación de la ruta de las MAP quinasas (JNK) se ha demostrado en el mecanismo de inducción de apoptosis por CDDO-Me en células de cáncer de pulmón y células de leucemia (Zou y col., 2004). Existen otras observaciones que relacionan la actividad de estos triterpenos con esta ruta como son la inducción de las enzimas hemo-oxigenasa y NADPH-quinona-óxidoreductasa ambas dependientes de la activación de NF-kB (Dinkova-Kostova y col., 2005).

Por último, otros autores han descrito el incremento en la expresión de genes TGF- β dependientes por CDDO y su derivado imidazólico, CDDO-Im (Suh y col., 2003). La superfamilia TGF- β consiste en más de 40 miembros, incluyendo TGF- β s, activinas y BMPs; las moléculas pertenecientes a este grupo son citoquinas multifuncionales que afectan a la respuesta inmune e inflamatoria, crecimiento celular y diferenciación, apoptosis y morfogénesis. El mal funcionamiento de la ruta TGF- β /Smad ocurre frecuentemente en diversas enfermedades humanas. En este contexto es importante el desarrollo de agentes que modulen esta ruta y restaure su normal funcionamiento. Suh y col., en 2003 observaron que entre los genes activados por estos compuestos se encuentran los del inhibidor del activador de plasminógeno 1 y los del receptor de TGF- β tipo II. Además, CDDO-Im, tiene una acción sinérgica respecto a TGF- β , prolongando la activación de Smad-2 inducida por TGF- β y activando la unión de Smad-3 a su ligando.

2.4.2.4 Ácido boswéllico

Triterpenoides derivados de este ácido (figura 2.7, tabla 2.6) se han encontrado en altas concentraciones en la resina de *Boswellia serrata*, comúnmente conocido como incienso hindú. Esta resina ha sido utilizada como componente activo desde los días de Hipócrates y Dioscórides en mezclas con efectos anti-inflamatorios. Es utilizado como antiinflamatorio y como antiartrítico en la medicina tradicional asiática. (Dzubak y col., 2006). Los derivados del ácido boswéllico (ácido 3 α -acetoxi- α -boswéllico, 3 α -acetoxi- β -boswéllico y 3 α -acetoxi-11-oxo- β -boswéllico) presentaron efectos citotóxicos sobre líneas cancerígenas de glioma U87MG, U373MG y de leucemia HL-60 y CCRF-CEM (Hoernlein y col., 1999). En modelos animales en los que se implantó glioma maligno C6, se observó un incremento de apoptosis, una inhibición el crecimiento del tumor y un incremento de la supervivencia dosis dependiente (Winking y col., 2000).

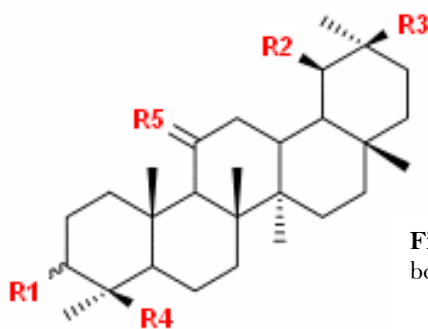
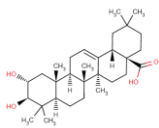


Figura 2.7 Estructura de los ácidos boswéllicos y sus derivados.

	R1	R2	R3	R4	R5
Ácido boswéllico-1	α -OH, H	CH ₃	H	CO ₂ H	H, H
Ácido boswéllico-2	α -OH, H	H	CH ₃	CO ₂ H	H, H
Ácido 3 α -acetoxi- α -boswellico	α -OAc, H	CH ₃	H	CO ₂ H	H, H
Ácido 3 α -acetoxi- β -boswéllico	α -OAc, H	H	CH ₃	CO ₂ H	H, H
Ácido 3 α -acetoxi-11-oxo-boswellico	α -OAc, H	H	CH ₃	CO ₂ H	O

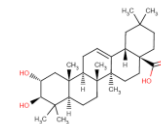
Tabla 2.6 Ácido boswéllico y sus derivados.

Además se ha descrito la inducción de diferenciación por parte de los ácidos 3 α -acetoxi- α -boswéllico y 3 α -acetoxi- β -boswéllico en células de leucemia HL-60, U937 y ML-1 a concentraciones menores de 24.4 μ M, mientras que la citotoxicidad fue inducida a concentraciones mayores de 38.8 μ M (Jing y col., 1999). Además, se han descrito efectos de inhibición sobre la migración y secreción de matriz de metaloproteinasas en células de fibrosarcoma HT-1080 y efectos de diferenciación, incluyendo inhibición de la migración en células de melanoma de ratón B16F10, producidos por los derivados 3 α -acetoxi- α -boswéllico y 3 α -acetoxi- β -boswéllico (Zhao y col., 2003).

2.4.2.4.1 Mecanismo de inducción de apoptosis por el ácido boswéllico

En cuanto al mecanismo molecular de la acción del ácido boswéllico los efectos antiproliferativos observados en estos derivados están relacionados con su capacidad de inhibir las topoisomerasas I α y II α , cuya actividad es crítica en la proliferación de las células cancerígenas (Zhao y col., 2003). Además, se ha descrito la inducción de la expresión de p21, por un mecanismo independiente de p53. Aunque la inducción de la proteína p21 no parece decisiva para los efectos citotóxicos. Los niveles de Bcl-2 y Bax no han mostrado cambios durante el proceso de apoptosis (Glaser y col., 1999).

Una considerable ventaja de los derivados del ácido boswéllico es su lipofilidad, permitiéndoles penetrar a través de la barrera hemato-encefálica y por tanto haciéndolos potencialmente útiles para el tratamiento de tumores malignos en el sistema nervioso central.



En este sentido, estudios *in vitro* mostraron un mayor efecto sobre las células del glioma que las camptotecinas y etopóxidos usados clínicamente. Esta información ha permitido el inicio de los primeros estudios clínicos (Hoernlein y col., 1999; Syrovets y col., 2000). Derivados del boswéllico están indicados para el tratamiento paliativo de tumores de cerebro progresivos (Streffer y col., 2001).

2.4.2.5 Ácido glicirrético y glicirrizina

La glicirrizina es el 3β-O-glucósido del ácido glicirrético (figura 2.8, tabla 2.7), es uno de los principales componentes de *Glicirrizia glabra* (regaliz). La glicirrizina puede ser hidroxilada por las bacterias en el tracto gastro-intestinal a su aglicano el ácido glicirrético, del cual existen los epímeros 18α- y 18β, siendo el 18α el que posee una mayor bioactividad.

El ácido glicirrético es un inhibidor específico de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD), la cual en condiciones normales es el principal factor implicado en el control de los niveles de cortisol circulante. Las sales de amonio y de calcio del ácido glicirrizínico son denominadas glicirrizinas. Son de unas 50 a 100 veces más dulces que la sucrosa y son los ingredientes activos de la raíz de regaliz con actividades como expectorante, bacteriostática y antiviral (Kaufman y col., 1999).

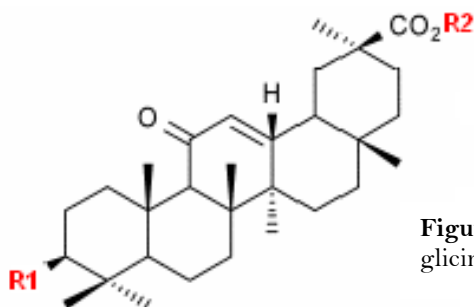
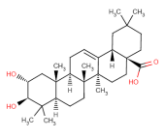


Figura 2.8 Estructura del ácido glicirrético y sus derivados

	R1	R2
Ácido glicirrético	OH	H
Glicirrizina: 3β-O-glucósido del ácido glicirrético		H
Carbenoxolona: sal disódica del 3β-hemisuccinato del ácido glicirrético	NaO ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂	Na

Tabla 2.7 Ácido glicirrético y sus derivados.



El ácido glicirrético ha mostrado propiedades antimutagénicas en modelos de mutagénesis inducida por benzapireno, 2-aminofluoreno (Zani y col., 1993; Wang y col., 1991; Ohtsuka y col., 1995). Estos efectos son probablemente debidos a la inhibición del sistema citocromo monooxigenasa P450. Conclusiones similares se obtuvieron sobre un modelo en roedor, en el que se inducía cáncer hepático mediante la administración de dietilnitrosamina, donde la glicirrizina inhibía la formación de cáncer hepático. Más aún, se ha encontrado que la glicirrizina inhibe la tumorigénesis en pulmón e hígado de ratón (Shiota y col., 1999).

Diversos estudios *in vitro* han demostrado el efecto quimiopreventivo del isómero 18 β y de la carbenoxolona (sal disódica del 3 β -hemisuccinato del ácido glicirrético) dan buenos resultados en modelos de carcinogénesis en glándulas mamarias de rata, colon e hígado de ratón y sobre cultivos de pulmón. Una desventaja en el uso del ácido glicirrético es la inhibición de la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD), lo que provoca un aumento en los niveles de cortisol endógenos dando lugar a hipertensión, hipercalcemia e hiperaldosterismo (Wang y Nixon, 2001). El mecanismo que explica el efecto anticancerígeno de estos compuestos se basan, al igual que en los casos anteriores, en el cambio del potencial mitocondrial y de la liberación de proteínas apoptóticas lo que da lugar a la desorganización mitocondrial y a la inducción de apoptosis.

2.4.2.6 Avicinas

Las saponinas triterpenoides aislados de *Acacia victoriae* (avicinas) (figura 2.9) posee efectos preventivos frente a procesos cancerosos. Protegen diferentes líneas celulares contra la mutación del gen H-ras y son capaces de cambiar el cariotipo en modelos aneuploides en los que se ha inducido químicamente carcinogénesis (Hanausek y col., 2001). Una mezcla de avicinas D y G, son capaces de inhibir el crecimiento en células Jurkat con una IC₅₀ = 0,16-0,47 μ g/mL. Resultados similares se han obtenido por otros investigadores, con IC₅₀ de 0,72 – 6,5 μ g/mL en varias líneas cancerígenas, aunque también se han descrito líneas resistentes a este tratamiento (Mujoo y col., 2001).

2.4.2.6.1 Mecanismo de inducción de apoptosis por las avicinas.

Justo después de su inicio del tratamiento con avicina se incrementó la concentración de citocromo-c en el citosol, lo cual provocó la activación de la caspasa-3 y por tanto del substrato de caspasa-3, PARP (poliADP-ribosa polimerasa).

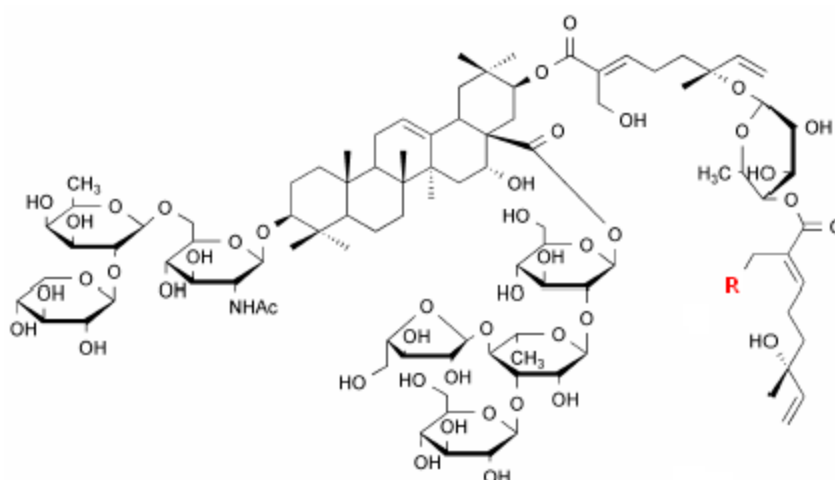
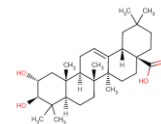
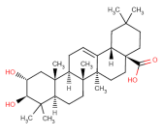


Figura 2.9 Estructura de las avicinas: **R**: H, avicina D; **R**: OH, avicina G

Aunque hay una liberación previa de citocromo-c, los cambios en el potencial de membrana mitocondrial no ocurren hasta pasadas 16h del tratamiento con avicina (**Haridas y col., 2001b**). Aparte de sus efectos protectores, las avicinas inhiben la activación del factor NF- κ B in células Jurkat. Dicho factor regula la transcripción de una serie de genes involucrados en las rutas de señalización del sistema inmune e inflamatorio, entre los que están: citoquinas, moléculas de adhesión y proteínas anti-apoptóticas. Estos compuestos no influyen sobre la degradación de I κ B, el cual es necesario para la liberación de NF- κ B desde el citoplasma, pero disminuyen la localización nuclear de su subunidad p65 de NF- κ B lo que inhibe la unión del factor NF- κ B al DNA. Probablemente como consecuencia de la regulación de NF- κ B, las avicinas disminuyen los niveles de iNOS y COX-2, incluyendo sus productos (**Haridas y col., 2001a**). En mitocondrias aisladas este producto ha provocado la liberación de citocromo-c, de forma directa. Los inhibidores de caspasas zVAD-fmk o DEVD no tuvieron ningún efecto sobre la liberación de citocromo-c, lo que sugiere que este proceso tiene lugar de forma independiente a la activación de las caspasas (**Mujo y col., 2001**).

2.4.2.7 Taraxanos

Este conjunto de triterpenos puede agruparse junto con los ursano triterpenos, debido a la gran similitud que presenta su esqueleto carbonado. En la fracción lipídica no hidrolizable del extracto de *Chrysanthemum morifolium*, se han identificado los siguientes compuestos como representativos del grupo taraxano: faradiol, heliantriol B, heliantriol C, 22 α -metoxifradiol, arnidiol y fradiol α -epóxido.



Estos compuestos inhiben la activación de EBVA-EA, con efectos comparables al ácido glicirrínico, mostrando actividad frente a otros promotores cancerígenos. Examinando las actividades citotóxicas de estos compuestos sobre un conjunto de 60 líneas cancerígenas humanas se observó que el arnidiol es el compuesto más citotóxico. Las IC_{50} de estos compuestos, con la excepción de las dos líneas celulares RPMI-8226 y SR, se encontraron por debajo de $10 \mu\text{M}$. El arnidiol fue efectivo contra la línea de leucemia HL-60 con un GI_{50} de $0,47 \mu\text{M}$. El faradiol presentó toxicidad frente a las líneas leucémicas CCRF-CEM, K-582 y SR y contra la línea celular de cáncer de pulmón EKVX, heliantirol B fue efectivo contra las líneas cancerígenas RXF 393 y MCF-7 de cáncer de mama (Bonfils y col., 2001)

2.4.3 Grupo dammarano

2.4.3.1 Ginsenoides

El ginseng, raíz de *Panax ginseng* ha sido muy utilizada por los pueblos del oriente asiático desde tiempos inmemoriales. Los principales efectos del ginseng son atribuidos a sus saponinas, siendo conocidas como ginsenoides R(x) (figura 2.10). Estas saponinas proceden de triterpenos pentacíclicos que estructuralmente derivan del dammarano, siendo los principales aglicanos en esta raíz el 20-S-protopanaxadiol, 20-S-protopanaxatriol y ácido oleanólico (Liu, 1995). Sólo el ginsenoide Ro es derivado del ácido oleanoico.

Se han identificado unos 25 ginsenoides en el ginseng rojo y blanco (Kubo y col., 1992). Los efectos quimiopreventivos del panax ginseng han sido probados en modelos de cáncer de mama, de colon, de hígado y cáncer cervical. Además ha mostrado ser eficaz, *in vivo*, en cáncer del sistema nervioso central, en animales y pacientes (Bespalov y col., 2001; Nishino y col., 2001).

El ginsenoide Rb-2 inhibe la angiogénesis tumoral tras su administración. Impide el crecimiento de líneas cancerígenas y mejora la supervivencia de ratones a los que se les ha implantado células HRA de cáncer de ovario. También se ha descrito la inducción de actividad inmunoestimuladora por estos compuestos (Kaufman y col., 1999). Desde 2003 se está llevando a cabo un estudio con el ánimo de evaluar la actividad preventiva del ginseng sobre la progresión del cáncer hepatocelular en pacientes con hepatitis-c crónica.

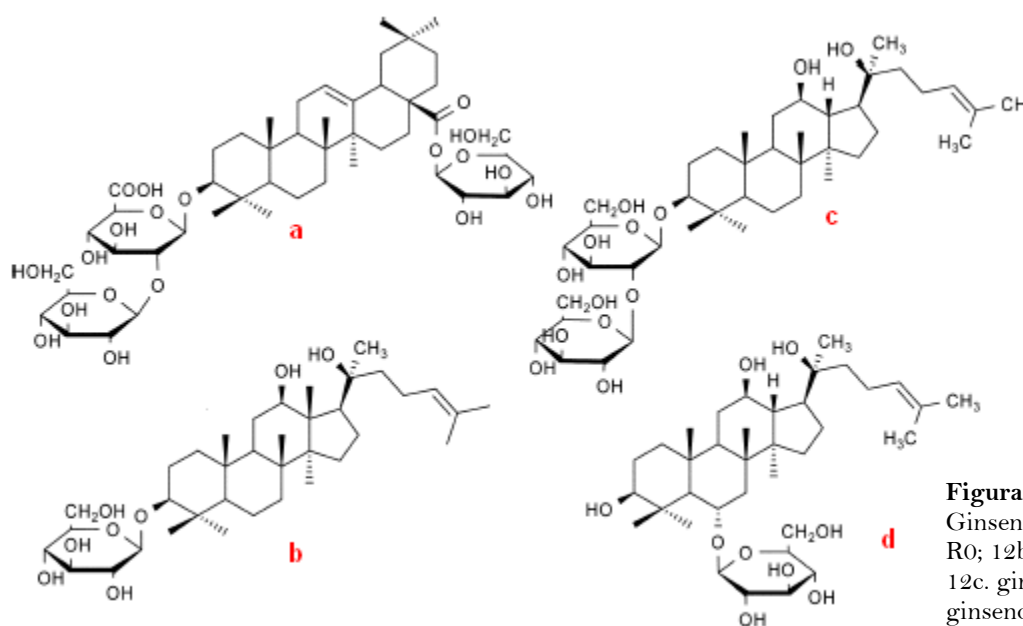
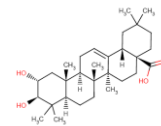
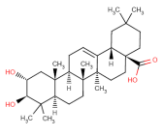


Figura 2.10 Estructura los Ginsenosides. 12a. ginsenoide R0; 12b. ginsenoide Rh-2; 12c. ginsenoide Rh-1; 12d. ginsenoide Rg-3.

2.4.3.1.1 Mecanismo de inducción de apoptosis por los ginsenosides.

Distintos ensayos han mostrado los efectos de los extractos o de las sustancias activas sobre diferentes líneas celulares. Inhiben la síntesis de DNA, disminuyendo de la frecuencia de mutación inducida por metil-mesilato e incrementan la frecuencia de reparación tras la aplicación de mutagénicos, incluyendo la disminución en la transformación de células normales a células neoplásicas (Rhee y col., 1991). La administración de Rh-1 activa la adenilato ciclasa y reestablece la producción de melanina en células de melanoma, lo que está relacionado con su diferenciación. Distintos ginsenosides han sido probados frente a la metástasis, siendo el más efectivo el ginsenoide Rg-3 (uno de los más abundantes en el ginseng) (Surh y col., 2001).

Por otra parte Rg-3 inhibe la expresión de la enzima pro-inflamatoria COX-2, inducida por TPA, en piel de ratón y sobre la línea de cáncer de mama MCF-10A. Estas enzimas juegan un importante papel en la tumorigénesis del cáncer de piel. También inhibe la activación de NF-kB inducida por TPA, así como la quinasa ERK que regula la activación de NF-kB. Esto sugiere que los efectos anticancerígenos observados en el tratamiento con Rg-3 están probablemente relacionados con la supresión de las señales intracelulares responsables de la activación de NF-kB. La expresión de COX-2 y su relación con la carcinogénesis, ha sido bien descrita en tumores de colon, siendo el efecto quimiopreventivo del ginseng consecuencia de estas actividades (Surh y col., 2001).



2.4.3.1.2 Derivados de los ginsenoides

Además de los ginsenoides antes descritos, se han investigado los efectos de diversos derivados como es el caso del 20-O-(β -D-Glucopiranosil)-20(S)-protopanaxadiol formado a partir de los ginsenoides Rb1, Rb2 y Rc por bacterias intestinales, es uno de los compuestos mayoritarios detectados en sangre y orina tras la administración de los ginsenoides mencionados. Se ha investigado su efecto sobre la línea de leucemia mieloide HL-60 con una $IC_{50} = 24,3 \mu M$ tras 96h de tratamiento. El tratamiento con este compuesto causó la activación de caspasa-3 y la liberación de citocromo-c al citoplasma pero no tuvo efecto sobre la expresión de Bcl-2 (Lee y col., 2000).

2.4.4 Otros triterpenos

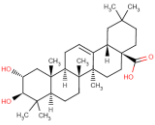
2.4.4.1 Iridiales

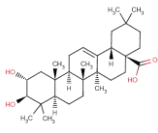
Son triterpenoides aislados de *Iris germanica*. Muestran citotoxicidad frente a las líneas cancerígenas humanas IC_{50} (A2780) = 3,59-0,17 $\mu g/mL$ y IC_{50} (K562) = 0,4-0,09 $\mu g/mL$. Todos los iridiales aislados poseen marcados efectos citotóxicos, aunque la línea K562 se mostró mucho más sensible frente a estas sustancias (Ukiya y col., 2002).

2.4.4.2 Gossypol

Tradicionalmente se ha utilizado este producto como anticonceptivo, pero ha mostrado tener propiedades anticancerígenas frente a las líneas de cáncer de colon HT29 ($IC_{50} = 1,8 \mu M$) y LoVo ($IC_{50} = 0,98 \mu M$), produciendo la fragmentación del DNA a las 24h y 48h y la inhibición de Bcl-2 de forma dosis dependiente (Wang y col., 2000).

Efecto anticancerígeno del ácido maslínico

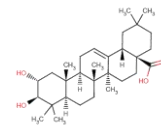




Capítulo 3

Mecanismos de inducción de apoptosis

La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular, la cual juega un importante papel en múltiples procesos biológicos de los organismos multicelulares. Estos organismos requieren una homeostasis celular que afecta tanto al número como al tipo de células y está involucrada en procesos tales como el desarrollo embrionario, respuesta inmune, homeostasis celular de tejidos, regeneración celular, etc (Kerr, Wyllie y Currie, 1972; Thompson, 1995; Rinkenberger y Korsmeyer, 1997; Jacobson, Weil y Raff, 1997). Además de estos procesos existen otros en los que una célula normal activa los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis en respuesta a una posible patología (como por ejemplo errores de duplicación durante la división celular, diferenciación errónea, etc.), o de acuerdo a la fisiología normal del tejido al que pertenece (linfocitos T en el sistema inmune, células epiteliales, etc.). Durante la división celular existen puntos de control en los que se revisa la integridad y la calidad del DNA, de forma que si ocurre alguna anomalía, ésta es reparada si es posible, activándose en caso contrario el proceso de muerte celular. Todas las células están programadas para destruirse por apoptosis en el caso de que hayan sufrido daño en su material genómico.

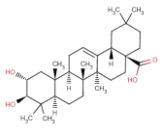


La desregulación de los mecanismos de apoptosis está implicada en la progresión de los procesos cancerosos, en los que la célula potencialmente tumoral puede poseer mutaciones en varios genes permisiblemente cancerígenos denominados por este motivo proto-oncogenes (Thompson, 1995; Rinkenberger y Korsmeyer, 1997). Algunos de los cambios en la fisiología celular ocurridos durante el proceso de apoptosis, que lo diferencian del proceso de necrosis, son entre otros: la disminución del volumen celular; adquisición de un aspecto vesiculado o *blebbing* de la membrana citoplasmática, distorsionándose sin llegar a romperse; condensación de la cromatina formando cúmulos cerca de la membrana nuclear, fenómeno denominado *picnosis*; y fragmentación del DNA en fragmentos cuyo tamaño es múltiplo del número de pares bases que se encuentran entre dos nucleosomas. Las células entonces pueden desintegrarse formando los denominados cuerpos apoptóticos, los cuales en principio mantienen la integridad de la membrana plasmática.

La iniciación y ejecución de la apoptosis, a nivel molecular, depende de la activación de las rutas extrínsecas y/o intrínsecas de muerte celular (Cohen, 1997; Ashkenazi and Dixit, 1998; Green y Reed, 1998; Thornberry and Lazebnik, 1998). El proceso apoptótico esta regulado por una gran cantidad de señales intracelulares. Hay dos importantes rutas de señalización en la inducción de apoptosis, la ruta dependiente de receptores de muerte celular y la ruta mitocondrial. Denominadas clásicamente como ruta extrínseca y ruta intrínseca de inducción de apoptosis (Ashkanazi y Dixit, 1998; Gupta, 2000; Kroemer y Reed, 2000; Gupta, 2001; Martinou y Green, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001; Gupta, 2002; Green y Evan, 2002).

3.1 Las caspasas

La apoptosis en ambas rutas, está mediada por la activación de una serie de aspartato proteasas, denominadas caspasas. Estas proteasas activan de forma proteolítica a gran variedad de substratos citoplasmáticos y nucleares, induciendo los fenómenos típicos y propios de la muerte celular por apoptosis. Las caspasas pueden dividirse en dos grupos: caspasas-iniciadoras y caspasas-ejecutoras o efectoras. Las caspasas-iniciadoras (entre las que se encuentran las caspasas-8 y -10), poseen un dominio DED (dominio efector de muerte o *death effector domain*) o un dominio CARD (dominio de incorporación de caspasas o *caspase recruitment domain*) como es el caso de la caspasa-9 (figura 3.1). Estos dominios interaccionan con otras moléculas adaptadoras, como es el caso de la proteína FADD (proteína Fas asociada a dominio de muerte o *Fas protein associated death domain*) en el caso de las



caspasas -8 y -10, o Apaf-1 (factor 1 activador de proteasa apoptótica o *apoptosis protease-activating factor 1*) para el caso de la caspasa-9, promoviendo la activación de los zimógenos de estas cisteín-proteasas (Chou y col., 1998). Por otro lado, las caspasas ejecutoras o efectoras como son las caspasas -3, -6 y -7 no poseen estos dominios (figura 3.1) y son activadas proteolíticamente por las caspasas iniciadoras.

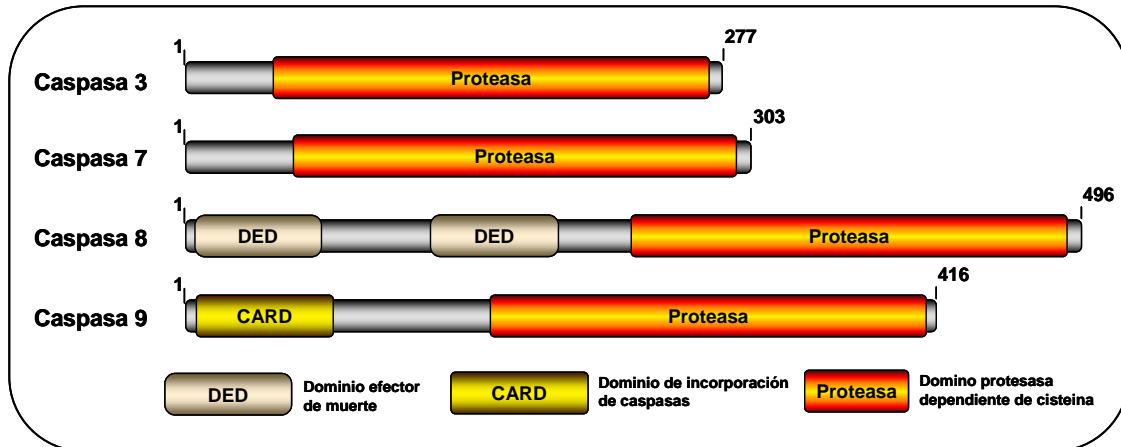
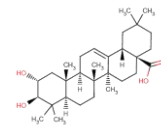


Figura 3.1 Dominios presentes en los distintos tipos de caspasas, caspasas efectoras 3 y 7; caspasas iniciadoras 8 y 9. DED (*death effector domain*); CARD (*caspase recruitment domain*); y dominio donde radica la actividad proteasa.

Aunque, la activación de de las caspasas ejecutoras involucradas en ambas rutas de apoptosis es común, las rutas intrínseca y extrínseca se diferencian en los mecanismos moleculares que las activan, así como en las caspasas iniciadoras responsables esta activación. Todas las caspasas están presentes de forma constitutiva en la célula, en sus formas inactivas como proenzimas o zimógenos. La caspasas iniciadoras se activan automáticamente por homodimerización sin la necesidad de que se lleve a cabo proteólisis, mientras que las caspasas ejecutoras son activadas por la proteólisis de sus zimógenos, a través de las caspasas iniciadoras. Tanto la ruta extrínseca como la intrínseca movilizan moléculas adaptadoras durante la activación de sus cascadas. Algunas de las dianas finales de las caspasas efectoras incluyen distintos procesos celulares (figura 3.2), como son la deformación y pérdida de volumen celular, desorganización de la membrana citoplasmática, condensación cromosomática, fragmentación del DNA, ciclo celular y estabilización del proceso de apoptosis:

- *Deformación, perdida de volumen celular y desorganización de la membrana citoplasmática:* En estos procesos las caspasas efectoras actúan activando o desactivando diferentes proteínas propias del citoesqueleto celular como son la presenelina 2 (involucrada en la organización del citoesqueleto y de los cinetocoros), la actina (proteína involucrada en la formación de filamentos, que son los mayores componentes del citoesqueleto), la laminina A (que conforma finas láminas en la matriz extracelular compuestas fundamentalmente por



tropocolágeno IV, separando a unas células de otras), la β -catenina (proteína multifuncional implicada en la adhesión celular y la activación transcripcional), queratina-18 (proteína que junto con la actina proporcionan firmeza al citoesqueleto), calpastatina (inhibidor de la calpaína, proteína Ca^{2+} dependiente que participa en la remodelación del citoesqueleto y de la membrana citoplasmática) (Goll y col., 2003), la proteína Rock-1 (proteína quinasa que regula el ensamblaje de la actina al citoesqueleto) que participa en procesos de migración celular y metástasis, cuya desactivación es necesaria para la desorganización de la membrana plasmática y la inducción de *blebbing* (Sebbagh y col., 2001), Gas2 (dominio específico de arresto celular, la activación de este dominio en varias proteínas tiene como consecuencia la inducción de arresto en el ciclo celular) y FAK (quinasa de adhesión focal, tirosina quinasa que interviene en la adhesión focal de proteínas de la matriz extracelular) (Hayashi y col., 2002).

- *Condensación cromosómica y fragmentación del DNA*: La desorganización del DNA producida durante el desarrollo de la apoptosis tiene lugar de forma ordenada y en ella las caspasas activan varios procesos: En primer lugar tenemos la inhibición de ICAD que es responsable de inhibir CAD, siendo esta última la enzima encargada de la fragmentación internucleosomal del DNA nuclear, lo cual origina el patrón característico de DNA “en escalera”. Activación de la endonucleasa G, nucleasa mitocondrial colocalizada junto con el citocromo-c en el espacio intermembranoso mitocondrial, esta proteína se transloca al núcleo durante el proceso de apoptosis fragmentando el DNA, al igual que CAD, (Li y col., 2001). Inhibición proteolítica de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) la cual en respuesta al daño en el DNA cataliza la poli-ADP-ribosilación de proteínas nucleares tales como p53, histonas, topoisomerasas I y II, DNA polimerasa α , estabilizándolas, siendo esencial para el mantenimiento del DNA en respuesta a genotóxicos (Simbulan-Rosenthal y col., 1998; Simbulan-Rosenthal y col., 1999). Otro sustrato de la caspasa-3 es la proteína quinasa DNA dependiente (DNA-pK) que en respuesta a daños genotóxicos es capaz de activar a p53 mediante fosforilación del residuo Ser15, el cual se encuentra en la región N-terminal de p53 y controla la interacción de p53 con la proteína MDM-2 (Woo y col., 1998). Durante el proceso de apoptosis las topoisomerasas I y II también son inhibidas por la actividad de las caspasas. Por último, las caspasas efectoras también inhiben la actividad gamma-transglutaminasa; esta enzima cataliza la formación de un enlace covalente entre un grupo amino libre y un grupo gamma-carboxamida de una glutamina, estos enlaces muestran gran resistencia a la degradación proteolítica (Fesus y Szondy, 2005).

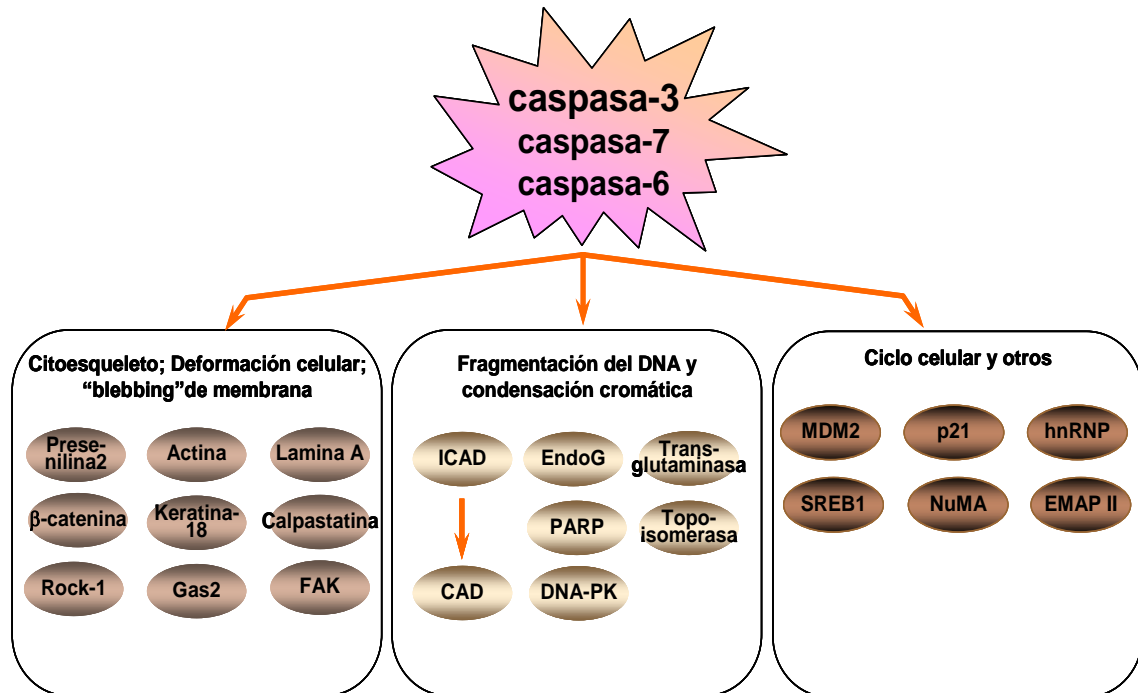
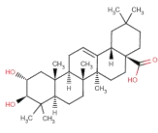
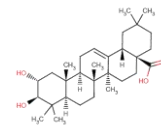


Figura 3.2 Principales proteínas dianas de las caspasas efectoras. Las cuales intervienen en los procesos de fragmentación del DNA, cambios morfológicos y alteraciones del ciclo celular ocurridos durante el proceso de apoptosis.

- *Ciclo celular y estabilización del proceso de apoptosis:* Durante el proceso de apoptosis se ven afectadas varias proteínas que controlan la división celular, amplificando la señal apoptótica, de forma que una vez llegado a este punto del proceso es prácticamente imposible la vuelta atrás. Algunas de estas proteínas son entre otras: MDM2 oncoproteína que actúa como inhibidor específico de p53, esta proteína se une al dominio de transactivación de p53 e inhibe su capacidad transcriptor. p21, proteína de 21 kDa que inhibe la actividad quinasa del complejo ciclina-cdk2 requerida para la transición de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular, su expresión esta directamente unida a la actividad de p53. hnRNP, ribonucleoproteínas heterólogas nucleares, proteínas implicadas en la regulación de *splicing* alternativos o que forman parte de las ribonucleoproteínas del RNA pequeño nucleolar. SREB1, elemento de unión regulado por esteroides, se trata de un factor de transcripción implicado en el mantenimiento de los niveles de lípidos intracelulares responsable de la regulación de los genes necesarios para la fabricación de ácidos grasos. NuMA, proteína de la matriz nuclear que es esencial para la organización de los husos mitóticos, su distribución cambia durante la apoptosis: en primer lugar NuMA se encuentra condensada, y se concentra en el centro del núcleo, siendo finalmente rodeada por fragmentos nucleares en la formación de los cuerpos apoptóticos (Taimen y Kallajoki, 2003). EMAP2, polipéptido endotelial activador de monocitos, citoquina atractora de monocitos que se activa en los procesos finales de apoptosis (Knies y col., 1998).



3.2 Rutas extrínsecas. Apoptosis inducida por receptores de muerte celular

Las rutas extrínsecas de inducción de apoptosis son iniciadas por ligandos extracelulares tales como TNF (*tumor necrosis factor*), FasL (*Fas ligand*) y Apo2L/TRAIL (*Tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-Inducing ligand*), cuyas señales se transmiten clásicamente por receptores de muerte celular, este tipo de receptores, pertenecen a las familias: CD95/Fas (*FS7 (foreskin cell strain) associated sAg*), TRAILRs/DR4 o DR5 (*death receptor*), TNFRs (*tumor necrosis factor receptors*) y NGFRs (*nerve growth factor receptors*) (Ashkenazi, 2002). Tras la interacción con el ligando, el dominio citoplasmático de muerte (DD, *death domain*) del receptor sufre un cambio conformacional, que permite la movilización de un conjunto de proteínas adaptadoras y de las caspasas iniciadoras formando el complejo señalizador de inducción de muerte celular o DISC (*death inducing signaling complex*) (figura 3.3). El complejo DISC sirve como plataforma para la activación de las caspasas que actuarán posteriormente en la ruta de señalización, desencadenando por homodimerización la proteólisis de las caspasas iniciadoras, fundamentalmente de las caspasa-8 y caspasa-10. Estas a su vez activan por proteólisis a las caspasas efectoras, fundamentalmente a la caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7. Las caspasas efectoras pueden activarse entre sí y también pueden potenciar la activación de las caspasas iniciadoras, de forma que la señal apoptótica queda amplificada. Existen varias rutas de activación de apoptosis mediada por receptores dependiendo de la familia a la que estos pertenezcan.

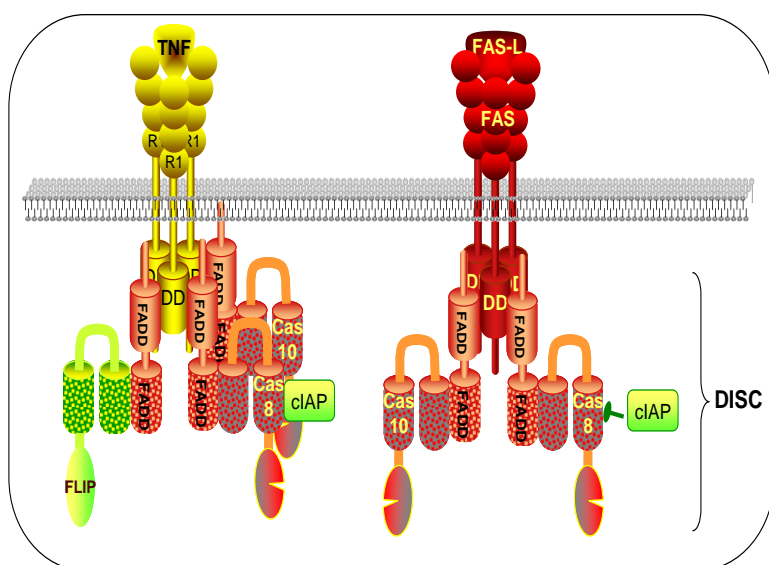
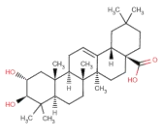


Figura 3.3 Estructura de los receptores de muerte celular, TNFR-1 y CD95/Fas. Puede apreciarse la semejanza de ambas estructuras en la formación del complejo DISC (*death inducing signaling complex*)



3.2.1 Apoptosis mediada por el receptor CD95/Fas

CD95/Fas es un receptor de membrana que se encuentra constitutivamente expresado en varios tipos celulares. Esta ruta de inducción de apoptosis (**figura 3.4**) se inicia cuando un ligando específico activa al receptor CD95/Fas induciendo su trimerización. El dominio DD de CD95/Fas recluta la proteína adaptadora FADD (proteína Fas asociada al dominio de muerte, *Fas-associated death domain*), la cual contiene un dominio efector de muerte, DED (*death effector domain*). FADD entonces media en la incorporación y activación de las procaspasas-8 y -10 mediante interacciones proteína-proteína formando el complejo señalizador de inducción de muerte celular, DISC. La procaspasa-8 presente en este complejo es automáticamente activada por homodimerización generando caspasa-8 activa.

Esta activación es inducida por la proximidad de varias moléculas de procaspasa-8, aumentando la concentración local de zimógeno. En estas condiciones, la baja actividad intrínseca del zimógeno procaspasa-8 es suficiente para permitir que varias moléculas inactivas se corten mutuamente y se activen unas a otras. Las caspasas-8 y -10 activas son liberadas al citoplasma donde proteolíticamente activan a las procaspasas efectoras (procaspasa-3, -6 y -7) generando la forma activa de estas caspasas, fundamentalmente de la caspasa-3. Por último las caspasas efectoras activan proteolíticamente a un buen número de sustratos generando finalmente las características morfológicas y bioquímicas propias de la apoptosis. Esta ruta clásica de activación ocurre en las células denominadas de tipo I. (**Scaffidi y col., 1998**)

En las células de tipo II, la activación de las caspasas claves es más débil y la señal apoptótica requiere ser amplificada por el entrecruzamiento con la ruta intrínseca (**figura 3.4**). La caspasa-8 activa proteolíticamente el dominio BH3 (*Bcl homology domain-3*) de la proteína Bid (*BH-3 interacting DD protein*), dando lugar al fragmento activo Bid truncado o tBid (*truncated bid*), el cual se transloca desde el citoplasma a la mitocondria y ejerce un efecto proapoptótico sobre distintas proteínas de la familia Bcl-2 (*B cell lymphoma-2proteins*), estas proteínas forman por homo o heterodimerización canales en la membrana mitocondrial, controlando el flujo de especies manteniendo o alterando la diferencia de potencial de la membrana mitocondrial. t-bid actúa inhibiendo a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-x_L (*B cell lymphoma protein x_L*) y estimulando la activación de las proteínas proapoptóticas Bax (*Bcl-2 associated x protein*) y Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) dando como resultado, finalmente, la permeabilización de la membrana mitocondrial, la liberación de citocromo-c y de Apaf-1

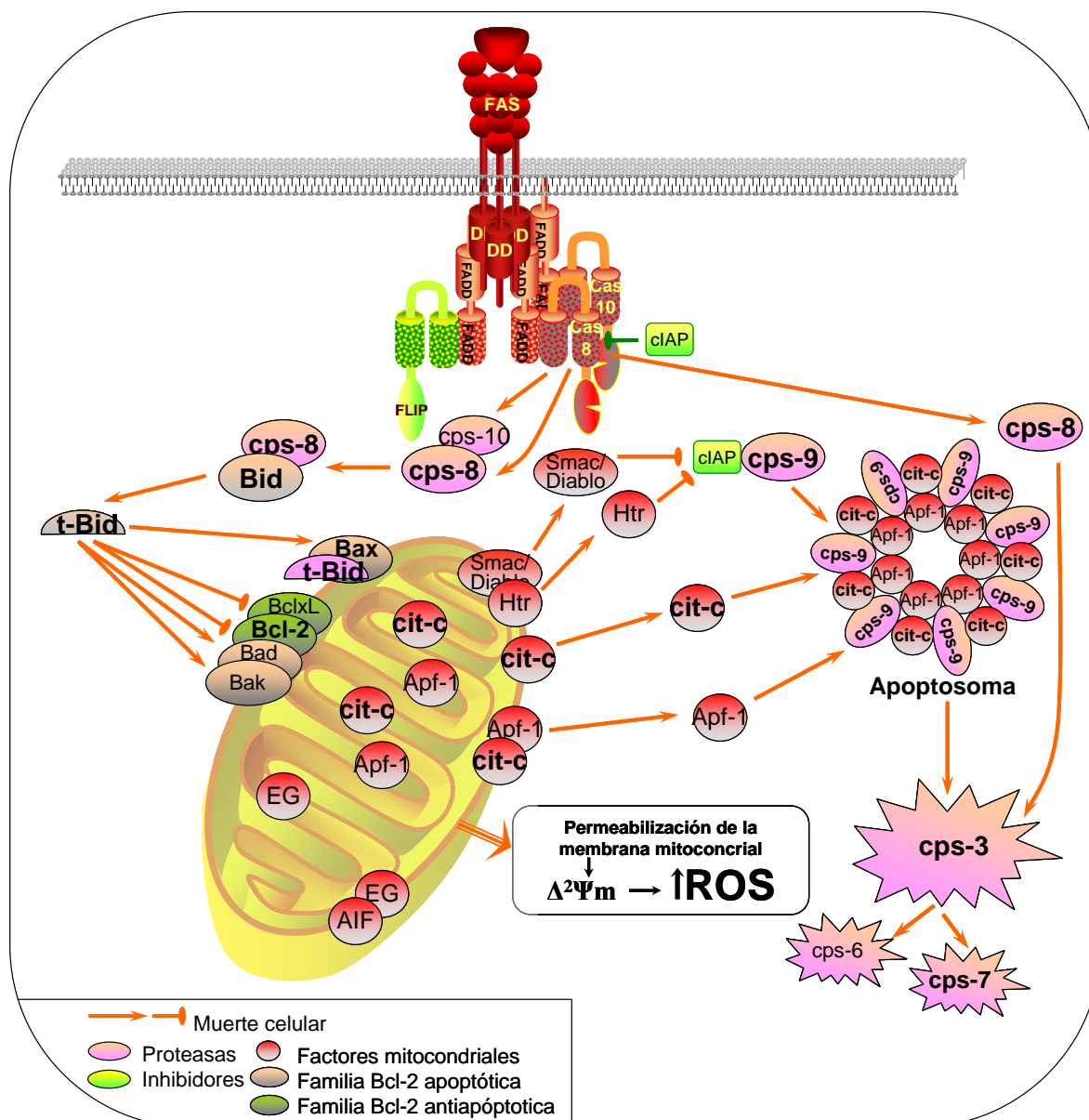
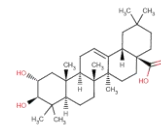


Figura 3.4 Ruta extrínseca de inducción de apoptosis a través del receptor de membrana FAS/CD95. En esta ruta la caspasa-8 puede activar directamente a la caspasa-3 y/o potenciar la señal apoptótica a través de la activación de Bid.

(*apoptotic protease activating factor*), lo cual es una potente señal apoptótica que permite la formación del apoptosoma (**figura 3.5**). Este complejo multiproteico con simetría heptagonal está compuesto por siete moléculas de Apaf-1, las cuales poseen un dominio N-terminal de incorporación de caspasas (CARD) responsable de la unión de la caspasa-9, un dominio de unión a nucleótidos, NOD (*nucleotide oligomerization domain*) responsable de la oligomerización del apoptosoma, dependiente de ATP, y una región de unión al citocromo-c, WD40 (motivo de unos 40 aminoácidos, a menudo terminado en un dipéptido triptofano (W) – aspártico (D)). La formación de este complejo permite la activación de la caspasa iniciadora 9, que por último activa al resto de caspasas efectoras potenciando la señal apoptótica. (Li y col., 1998; Peter y Kramer, 2003).

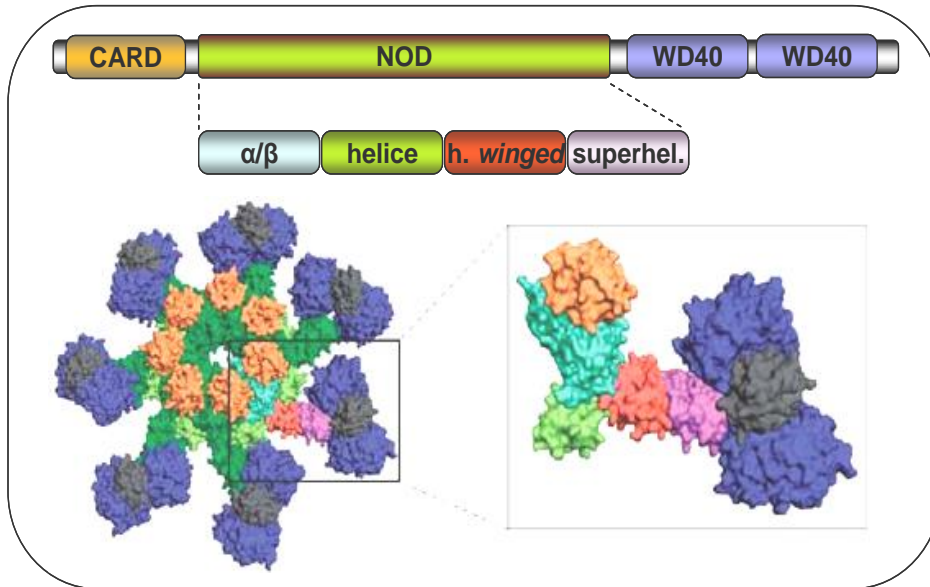
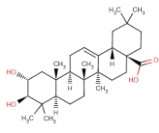


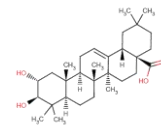
Figura 3.5 Estructura del proteosoma en la que se observan los segmentos de Apaf-1: CARD (*caspase recruitment domain*), NOD (*Nucleotide oligomerization domain*) y WD40, segmento de unión al citocromo-c, en negro.

La modulación de la ruta extrínseca ocurre a varios niveles. Por una parte, receptores trampa pueden competir con los receptores de muerte por la unión de los ligandos. Otras proteínas inhibitoras como por ejemplo la molécula c-FLIP (proteína celular inhibidora FLICE, o *celular FLICE inhibition protein*), sin capacidad catalítica compite con las caspasas-8 y -10 por la unión al complejo DISC (Thome y Tschopp, 2001). Posteriormente durante el proceso de activación, IAPs (*cellular inhibitor apoptosis proteins*) inhiben la activación de las caspasas efectoras (Salvesen y Duckett, 2002).

3.2.2 Apoptosis mediada por los receptores TNFRs (TNFR1/ TNFR2)

Los receptores TNFRs pertenecen a la familia TNFR/NGFR, pueden activar tanto inflamación, a partir de las rutas IKK (*I κ B* quinasa) /NF- κ B (*nuclear factor κ B*) y JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) /AP-1 (*activation factor 1*, formado c-Jun y c-Fos), como apoptosis a través de la ruta mediada por JNK y de la inducción de caspasa-8 (figura 3.6), pero el papel y la comprensión de estos mecanismos aún no es bien conocido. JNK parece jugar un importante papel a través de la regulación de la ruta de apoptosis TNF-dependiente. En la activación de esta ruta de apoptosis, la célula puede tomar la decisión de vivir o morir, aunque aún no esta claro de qué depende esta decisión (Locksley, Kileen, Lenardo, 2001).

Existen dos tipos de estos receptores, TNFR tipo I y TNFR tipo II. Los receptores de TNFR1 y TNFR2 se diferencian en primer lugar en que el primero puede encontrarse unido a membrana o internalizado, mientras el segundo es un receptor que se encuentra normalmente TNF unido

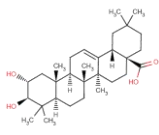


a membrana (**Wajant y col. 2003**). En la mayoría de los tipos celulares, la expresión de TNFR1 es constitutiva mientras que la expresión de TNFR2 está altamente regulada. Estructuralmente, ambos receptores son muy parecidos en sus dominios extracelulares, ricos en cisteínas. Por otro lado, TNFR1 contiene un dominio citoplasmático de muerte (DD) que se une al adaptador TRADD (*TNF receptor adaptador associated DD*). TNFR-2 carece de este dominio DD, pero posee un dominio citoplasmático de unión a TRAFs (*TNF receptor associated factor*). Por tanto TNFR-1 puede mediar simultáneamente en la señalización de supervivencia celular, como de muerte celular, mientras que TNFR-2 únicamente mediaría en señales de supervivencia celular. Sin embargo, estudios recientes señalan que TNFR-2 puede participar en la apoptosis y potenciar las señales de muerte celular mediadas por TNFR-1. La muerte y/o supervivencia celular mediadas por estos receptores requieren un conjunto distinto de adaptadores y de otras moléculas de señalización en la ejecución de sus rutas (**Gupta y col., 2005**). La activación de TNFRs incluye cambios conformacionales que activan sus motivos citoplasmáticos para unir a los adaptadores de señalización (**Locksley y col., 2001**), sufriendo trimerización cuando son activados (**Gupta y col., 2005**).

Inflamación celular: la ruta de activación de los TNFRs por $\text{TNF}\alpha$, su principal ligando, es decisiva para la inducción de genes proinflamatorios. $\text{TNF}\alpha$ juega un importante papel dirigiendo la respuesta inflamatoria en vertebrados. En relación con su actividad proinflamatoria y proliferativa estos receptores poseen una gran cantidad de dianas intracelulares incluyendo: IKK, JNK y las cascadas de las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) p38 y p42/44. Estas últimas controlan la expresión de genes por la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. *Muerte celular:* $\text{TNF}\alpha$ puede además actuar como un inductor de la muerte celular programada 'profesional' al igual que ligandos tales como FasL y Apo2L/TRAIL. La apoptosis puede ser inducida a través de esta ruta cuando la señal NF- κ B queda bloqueada.

3.2.2.1. Activación de TNFR1 y TNFR2.

Tras la activación de TNFR1 éste se une a TRADD. Complejo que puede a su vez unirse a los adaptadores secundarios RIP1 (*receptor interaction protein*), TRAF2 o TRAF5. La movilización de estas proteínas causa la activación del complejo IKK, compuesto por IKK α , β y γ (**Chen y Goeddel, 2002**). IKK, por su parte, estimula NF- κ B a través de la fosforilación y degradación de su inhibidor I κ B (*inhibitor of NF- κ B*), (**Karin y Lin, 2002**). Por otra parte, TNFR1 contiene un



dominio DD a diferencia de TNFR2, pudiendo activar simultáneamente la ruta de inducción de apoptosis a través de caspasa-8 (figura 3.6). TNFR2 se une directamente a TRAF2 activando a IKK y a JNK. La activación de TNFR2 produce la activación de TRAF2 junto con su degradación por lo que de esta manera podría incidir directamente sobre la inducción de apoptosis.

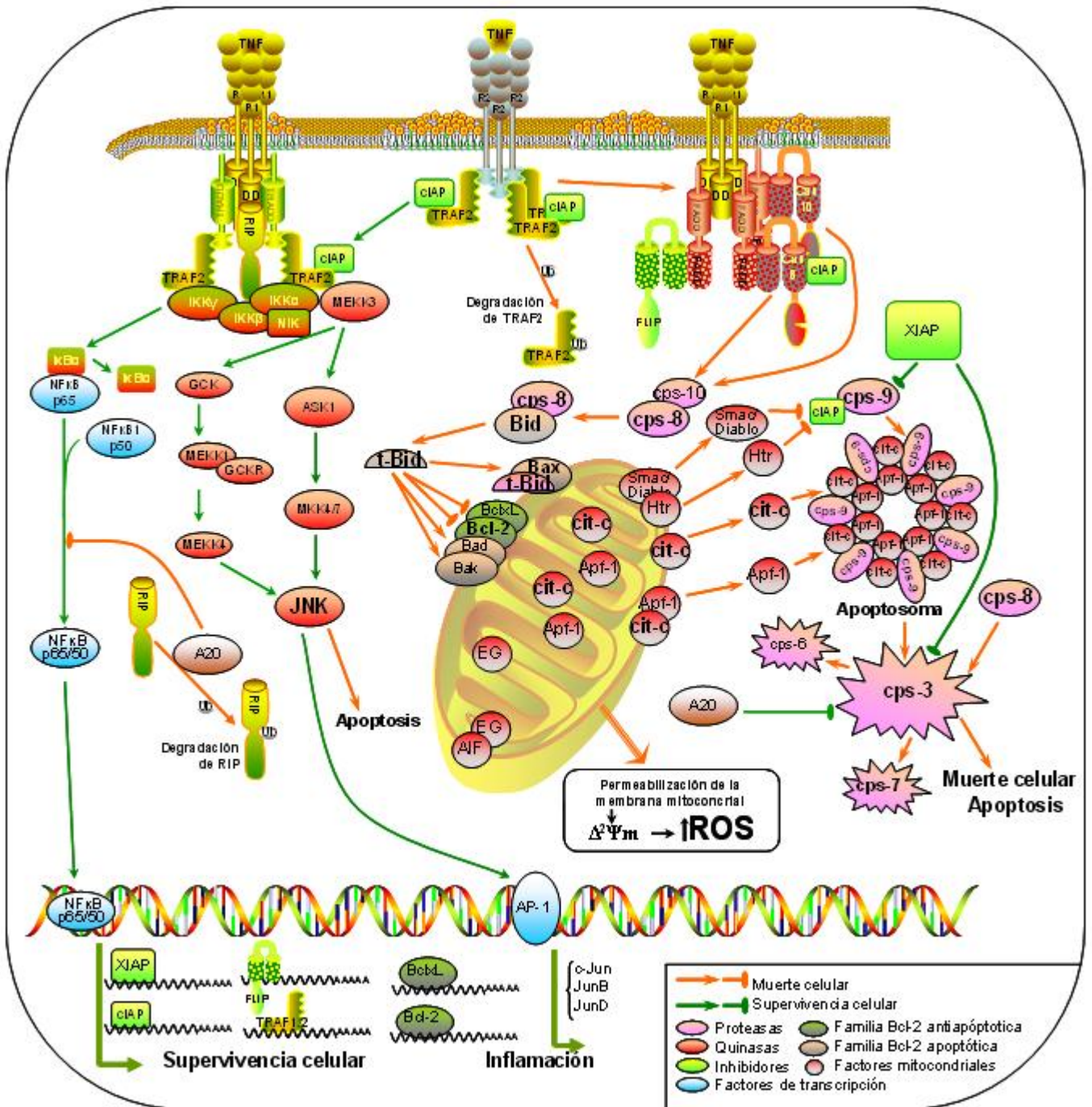
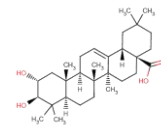
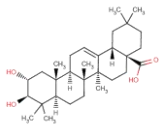


Figura 3.6 Apoptosis inducida a través de los receptores de muerte celular TNF-R1 y TNF-R2. Puede apreciarse la formación del complejo I (izquierda), encargado de mediar en las señales de supervivencia celular y del complejo II (derecha), encargado de mediar en la señal de muerte celular por apoptosis.



TNFR1: El mecanismo de acción de TNFR1 comparte algunos componentes propios con las rutas extrínsecas de inducción de apoptosis a través de Fas, DR4 o DR5. Estudios en fibroblastos embrionarios de ratón mostraron que FADD y caspasa-8 son necesarias para la inducción de apoptosis por $TNF\alpha$, células deficientes en estas proteínas fueron resistentes a la apoptosis inducida por $TNF\alpha$. Otros estudios con células transfectadas sugieren que TNFR1 se ensambla a DISC de forma similar a como lo hace Fas y DR4/5, excepto que en este caso ocurre directamente a través de TRADD (Che y Goeddel, 2002). Para explicar esta doble función del receptor TNFR1, en principio contradictoria, se ha propuesto la formación secuencial de dos tipos de complejos en la ruta de señalización de TNFR1:

- En el primero el ensamblaje de las distintas proteínas estaría mediado por TRADD, formando el complejo I (figura 3.6) asociado a TNFR1 y que contendría RIP1, TRAF2 y cIAP1. Este complejo sería el encargado de activar la ruta IKK/NF- κ B. La formación de este complejo tendría lugar durante los primeros minutos de la activación de TNFR1. NF- κ B media en esta ruta de apoptosis por su efecto represor, induciendo la expresión de un buen número de genes antiapoptóticos incluyendo cIAPs, FLIP, TRAF-1, TRAF2, Bcl-2, y Bcl-xL (Pahl, 1999; Karin y Lin, 2002; Ghosh y Karin, 2002).
- A continuación, el complejo I se internalizaría de forma que TRADD, RIP y TRAF2 sufrirían modificaciones bioquímicas disociándose del receptor TNFR1, moviéndose al citosol, esto ocurriría 2 horas después de iniciada la ruta de señalización, aunque este tiempo puede variar dependiendo de la línea celular. En la formación del segundo complejo FADD y caspasa-8 se unirían al receptor que se habría liberado de las moléculas adaptadoras anteriores, dando lugar al segundo complejo citosólico (complejo II) (figura 3.6), que sería el encargado de la inducción de apoptosis (Varfolomeev y Ashkenazi, 2004).
- En las condiciones de formación del complejo de señalización I, tendría lugar una fuerte activación de NF- κ B, induciendo la expresión de genes de proteínas antiapoptóticas, inhibiendo la activación de caspasas por el complejo II. Por el contrario, cuando las señales del complejo I resultasen débiles o deficientes en la activación de NF- κ B, la síntesis de proteínas antiapoptóticas no se llevaría a cabo y el complejo II podría desencadenar la señalización de apoptosis por activación de las caspasas.

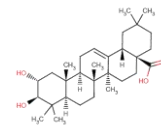


Se ha sugerido que c-FLIP, factor NF- κ B dependiente, juega un importante papel en la inhibición de la activación de las caspasas claves del proceso de apoptosis a nivel de formación del complejo II, posiblemente compitiendo por el sitio de unión de las caspasas-8 y de la caspasa-10 (Wang y col., 1998; Micheau y Tschopp, 2003). Según parece la activación simultánea de ambos TNFRs amplifica la apoptosis inducida por estos receptores (Wajant y col, 2003; Maeda y col 2003).

TNFR2: A diferencia de TNFR1, TNFR2 no posee en su región citoplasmática el dominio DD (figura 3.6). Cuando se produce la unión de TNF α a TNFR2 se induce la unión de la porción citoplasmática de TNFR2 con las proteínas adaptadoras TRAF2/TRAF5. La formación de este complejo moviliza a los inhibidores celulares de apoptosis cIAP1 y cIAP2 (Rothe y col., 1995; Deveraux y Reed, 1999). Por otro lado, algunos trabajos han demostrado que TNFR2 potencia la inducción de apoptosis producida por TNF α (Vandenabeele y col., 1995; Declercz y col., 1998; Haridas y col., 1998; Weiss y col., 1998; Chen y Lenardo, 2002), lo cual es contradictorio con la movilización de los inhibidores cIAPs. Se han propuesto varios mecanismos para explicar esta observación: en primer lugar la unión de TNF α a TNFR2 podría aumentar la afinidad de TNF α por TNFR1 (Tartaglia, Penca y Goddel, 1993), inducir o potenciar directamente la apoptosis a través del dominio citoplasmático de TNFR2 (Weiss y col., 1998; Grell y col., 1999). Otro mecanismo propuesto es que la activación simultánea de ambos TNFR-1 y TNFR-2 amplifica la señal apoptótica inducida por esta vía (Wajant y col., 2003; Maeda y col., 2003). Este efecto está correlacionado con la degradación de TRAF2 inducida por TNFR2. Ya que TRAF2 activa cIAPs, esta degradación facilitaría la apoptosis por la disociación de cIAP del complejo TRAF2-cIAP y, permitiendo la activación de la caspasa-8.

3.2.2.2 Proteínas mediadoras de la señal apoptótica inducida por TNFR

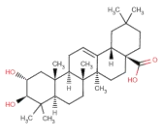
TRAFs: Las proteínas de la familia TRAFs (*TNFR associated factors*) funcionan como moléculas adaptadoras para los miembros de la superfamilia TNFR por su asociación con los dominios intracelulares de estas proteínas y por tanto por la mediación en los eventos subsiguientes de la ruta de señalización (figura 3.6). TRAF2 es un adaptador secundario, que tras su activación forma tanto homodímeros como heterodímeros, TRAF1:TRAF2. Estos a su vez, pueden asociarse con TNFR-2, lo que es necesario para la señalización y activación de NF- κ B (Rothe y col., 1994). Además, la activación TRAF2 es obligatoria para la activación de JNK a través de la MAPK7, promoviendo la fosforilación de c-Jun e incrementando la actividad AP-1 (Rothe y col., 1995). Por último, TRAF2 puede movilizar proteínas auxiliares que modulan la señal cada



receptor TNFR, como por ejemplo: cIAP (proteína inhibidora de la apoptosis celular) 1 y 2, TRAF1 y A20, pudiendo inhibir la señal apoptótica. Esta inhibición puede ocurrir de varias formas; directamente, por la acción de la proteína cIAP1 que es responsable de la ubiquitinización y degradación de TRAF2; por la activación de TRAF1, que a través de un mecanismo desconocido inhibe la ruta de señalización dependiente de TNFR2 (**Wajant y col 2003**); mediante la inhibición de la activación de las caspasas-8 y 10 por el complejo cIAP-TRAF2; o bien, por la ubiquitinización de RIP en el resto lisina 63, mediada por TRAF2, lo que ocurre sin degradación proteosómica e induce la activación de NF-KB.

RIP: La proteína receptora interactiva (RIP) es una serina/treonina quinasa, que forma parte del complejo de señalización de TNFR-1, siendo necesaria para la activación de NF-kB (**Hsu y col., 1996; Ting y col., 1996; Kelliher y col., 1998**). RIP contiene tres dominios, incluyendo un dominio N-terminal quinasa, un dominio intermedio (que interactúa con el dominio RING 'finger' de TRAF-2, este dominio es un motivo especial de dedos de zinc) y un dominio N-terminal DD. RIP interactúa con TRADD a través de sus respectivos DDs mediante interacciones proteína-proteína. La familia RIP consiste en 5 miembros, incluyendo RIP2, RIP3, RIP4 y RIP5 (**McCarthy y col., 1998; Sun y col., 1999; Chen y col., 2001; Meylan y col., 2002; Zha y col., 2004**). Todas las quinasas RIP comparten similitudes significativas en sus dominios N-terminales quinasas, pero difieren en sus dominios C-terminales. RIP, RIP2 y RIP4 están involucrados en la activación de NF-kB. RIP4 está, además, involucrado en la activación de JNK. Por último, se ha encontrado que RIP3 y RIP5 están involucrados en la apoptosis inducida por TNF α . RIP3 ejerce su actividad proapoptótica por la activación de caspasas y por la inhibición de la activación de NF-kB inducida por RIP y TNFR1.

IAPs: La familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), originalmente identificadas en el genoma de baculovirus, tienen un papel clave en la regulación negativa de la apoptosis (**Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2004**). cIAP1 y cIAP2, son dos proteínas estructuralmente homólogas, pertenecen a la familia de inhibidores de muerte celular compartiendo el dominio de inhibición encontrado en el baculovirus. Estas dos proteínas fueron originalmente aisladas por su interacción con TRAF-1 y TRAF-2 en el complejo de TNFR2 (**figura 3.6**). cIAP1 puede, además, ser incorporada para el complejo DISC de TNFR1 por TRAF-2. Por último cIAP1 y cIAP2, así como XIAP, poseen en el extremo C-terminal un dominio RING 'finger' conservado, (**Deveraux y col., 1997**). La sobre-expresión en mamíferos de estas proteínas confiere resistencia a la apoptosis. Estas proteínas suprimen la apoptosis previniendo la activación de procaspasas e inhibiendo directamente la actividad caspasa. XIAP es un

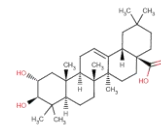


potente inhibidor del centro activo de la caspasa-3. Por último, el complejo TRAF-2-IAP inhibe la activación de la caspasa-8.

A20: A20 es una proteína RING 'finger', siendo inicialmente caracterizada como un inhibidor de la apoptosis inducida por $\text{TNF}\alpha$ (Opipari y col., 1992). Es peculiar por tener una actividad dual (figura 3.6) en la que inhibe apoptosis así como la activación de NF- κ B (Heyninck y Bayert, 2005). A20 inhibe la activación de NF- κ B por la desubiquitinización de RIP en lisina 63 y la subsiguiente ubiquitinización de la lisina 48 para la degradación proteosómica de RIP. El hecho de que A20 esté involucrado en la inhibición de NF- κ B, sugiere que está involucrado en la regulación por retroalimentación de la activación de NF- κ B. Por otro lado, A20 inhibe la apoptosis inducida por $\text{TNF}\alpha$, al menos parcialmente, por la unión con TXBP151 (*Tax binding protein 151*), esta última proteína es un sustrato específico de las caspasas efectoras -3, -6 y -7 (De Valck y col., 1999). Más aún, A20 y cIAP interactúan en una región común con TRAF2 (Rothe y col., 1995). La actividad antiapoptótica de A20 está restringida a ciertos tipos celulares y está asociada con el descenso de la activación de caspasa-3.

cFLIP: cFLIP (proteína celular inhibidora FLICE) es una de las moléculas reguladoras de apoptosis inducida por NF- κ B (Micheaue y col., 2001). Flip posee dos formas derivadas de distinto 'splicing', c-FLIP_L y c-FLIP_S. Las moléculas c-FLIP_S contienen dos tándem repetidos de dominios efectores de muerte e inhiben la activación de procaspasas por DISC. Por otro lado, c-FLIP_L comparte una homología bastante alta con la procaspasa-8, aunque es enzimáticamente inactiva (Irmeler y col., 1997). Además del efecto inhibitorio sobre la activación de la procaspasa-8 (figura 3.6), c-FLIP está asociada con Raf-1 (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*), la cual activa MEK1/2 (MAPK quinasa de ERK) que a su vez activa ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated quinasa*), y junto con TRAF1 y TRAF2 permite la activación de NF- κ B (van Drogen y col., 1997).

MAPKs: Las MAPK quinases pueden inhibir (Natoli y col., 1997) o activar apoptosis (Ichijio y col., 1997). El control sobre la activación o inhibición de apoptosis parece recaer sobre JNK, de forma que si JNK se activa transitoriamente se inhibe la apoptosis, mientras que si esta activación es continua y prolongada entonces se induce apoptosis. Recientemente se ha explorado el papel de JNK sobre la apoptosis inducida por $\text{TNF}\alpha$ (Varfolomeev y Askenazi, 2004). Señalando que la activación de JNK es necesaria para la inducción de apoptosis por esta vía. Deng y col. en 2003, demostraron que $\text{TNF}\alpha$ induce apoptosis a través de una activación prolongada de JNK.



JNK activa a Bid, de forma independiente a caspasa-8 dando lugar a un único producto de 21 kDa (β Bid) que es diferente a tBid, de 15 kDa, obtenido por la activación proteolítica de Bid a través de la caspasa-8. β Bid se transloca a la mitocondria para inducir la liberación preferente de Smac/Diablo (*second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-associated binding protein with low PI*), capaz de desorganizar la formación del complejo TRAF-2-clAP1 e inhibir la activación de la caspasa-8. La proteína Smac inhibe los efectos antiapoptóticos de clAP y XIAP uniéndose a estas proteínas.

3.3 Ruta intrínseca. Vía mitocondrial de inducción de apoptosis

La ruta intrínseca de activación de apoptosis puede ser iniciada por diferentes estímulos incluyendo: agentes quimioterapéuticos (Kroemer y Reed, 2000; Herr y Debatin, 2001), radiación UV, moléculas propias del estrés oxidativo ROS y NOs (especies oxígeno reactivas y especies nitrógeno reactivas), liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, así como por daños en el DNA y la retirada de factores de crecimiento (Martinou y Green, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001; Gupta, 2002; Green y Evan, 2002). Frecuentemente la resistencia a agentes citotóxicos, utilizados como anticancerígenos, en diferentes tipos de cáncer ha sido asociada con defectos en esta ruta intrínseca de inducción de apoptosis (Datta y col., 1995; Bunz, 2001).

Los daños intracelulares, desencadenados por los estímulos descritos, activan la apoptosis a través de la ruta mitocondrial. Esta vía de inducción de apoptosis (figura 3.7) es controlada por proteínas de la familia Bcl-2 (Puthalakath y Strasser, 2002; Cory y Adams, 2002). Los 'sensores' de daño intracelular activan las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bax, Bak, etc), e inducen la transcripción de proteínas de la subfamilia de Bcl-2 con un único dominio homología BH3 (Puma, Noxa, Bim, Bmf). Además, producen la inhibición de proteínas de la familia Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L). La actividad de las proteínas Bcl-2 desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial liberando factores mitocondriales que promueven la activación de caspasas en el citosol. Uno de los factores más importantes es el citocromo-c, que mediante la formación del apoptosoma, coopera con Apaf-1 en la activación de la caspasa-9 (Li y col., 1997; Srinivassula y col., 1998).

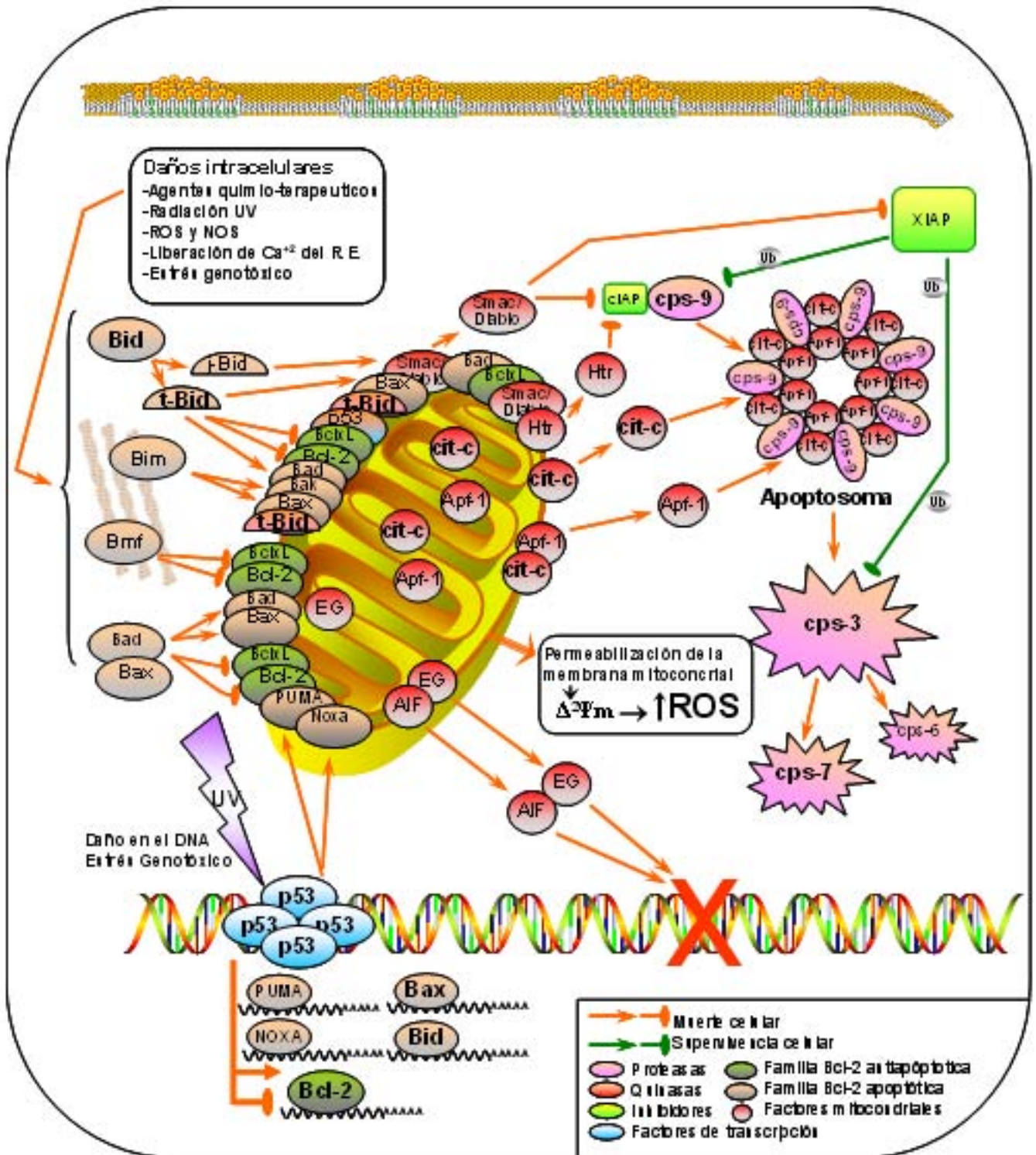
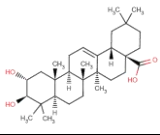
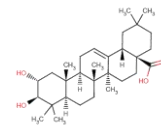


Figura 3.7 Ruta intrínseca de inducción de apoptosis. Puede apreciarse el importante papel que desempeñan las proteínas de la familia Bcl-2 en esta ruta de inducción de apoptosis

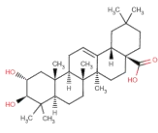
La caspasa 9 es clave en la ejecución de esta ruta, activando a las caspasas efectoras -3, -6 y -7 y por tanto, causando la muerte celular por apoptosis. Otros factores mitocondriales apoptóticos son Smac/Diablo y Omi/HtrA2, los cuales evitan la inhibición de la activación de las caspasas producida por las proteínas IAPs. En ciertos tipos celulares esta ruta mitocondrial puede proporcionar una amplificación del mecanismo de apoptosis mediado por receptores



(Luo y col., 1998; Li y col., 1998). La mitocondria contiene dos compartimentos bien definidos: la matriz, rodeada por la membrana interna y el espacio intermembrana rodeado por la membrana externa. La membrana interna, contiene varias moléculas, incluyendo la ATP sintasa, la cadena transportadora de electrones y el translocador del nucleótido adenina (ANT). Bajo condiciones fisiológicas estas moléculas componen la cadena respiratoria creando un gradiente electroquímico (potencial de membrana). Las proteínas de la familia Bcl-2 localizadas en la membrana interna parece jugar un importante papel en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). La membrana externa, contiene canales aniónicos voltaje dependientes (VDAC), que mantienen este potencial de membrana. Por último, el espacio intermembrana, contiene entre otras moléculas: holocitocromo-c, ciertas proteasas (Htra2/Omi), adenilato quinasa 2, Endo G, Smac/Diablo, y el factor de inducción de apoptosis (AIF). La permeabilización de la membrana externa da lugar, por tanto, a la liberación de estas moléculas al citosol y a la activación de apoptosis (Liu y col., 1996; Kluck y col., 1997).

La permeabilización de la membrana interna produce cambios en el potencial de membrana, $\Delta^2\Psi_m$ (figura 3.7), que posibilitan la liberación de los factores mitocondriales, así como el incremento de especies oxígeno reactivas ROS en el medio intracelular. El citocromo-c liberado se une a las moléculas adaptadoras Apaf-1 en presencia de ATP/dATP. La oligomerización de Apaf-1 moviliza a la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. La procaspasa 9 es activada por un proceso ATP dependiente, en el que Apaf-1 actúa como cofactor, la activación de caspasa-9 es debida a un cambio conformacional y no exclusivamente a un proceso proteolítico. A continuación la caspasa-9 activa puede a su vez activar a las caspasas efectoras dando lugar a la ejecución de la apoptosis.

Existe varias moléculas presentes en el espacio intermembrana de la mitocondria, capaces de producir apoptosis de forma caspasa-independiente: Htra2/Omi, que además de su capacidad para bloquear IAPs, parece promover la apoptosis independiente de caspasas a través de su actividad serina proteasa (Suzuki y col., 2001; Hegde y col., 2002). El factor inductor de apoptosis (AIF) es un efector de apoptosis independiente de caspasas, el cual puede inducir apoptosis translocándose del espacio intermembranoso al núcleo donde causa la condensación de la cromatina y a mayor escala la fragmentación del DNA. Por último, la proteína Endo G, tras su liberación del espacio intermembrana, aparece mediando directamente la fragmentación del DNA nuclear de forma independiente de caspasas (Li, Luo y Wang, 2001).



3.3.1 Familia de proteínas Bcl-2

La permeabilización de la membrana mitocondrial está controlada por una amplia variedad de miembros de la familia Bcl-2 (Reed, 1997; Kroemer y Reed, 2000; Martinou y Green, 2000; Zamzami y Kroemer, 2001; Gupta, 2002; Green y Evan, 2002; Walensky, 2006). Todas estas proteínas presenta, como mínimo, de uno a cuatro dominios homólogos Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, y BH4), lo que les permite interactuar entre ellas formando heterodímeros y homodímeros (Oltvai y col., 1993). Existen al menos 20 miembros de la familia Bcl-2 (figura 3.8) que pueden dividirse en tres grupos, proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w, y A1), estas proteínas conservan los cuatro dominios BHs; proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas con los tres dominios BH1, BH2 y BH3 (Bax, Bak, Bok y Bcl-X_s); y pro-apoptóticas con un único dominio BH3 (Bid, Bim, Bik, Bmf, Bad, Hrk, BNIP3, Noxa y Puma).

Las proteínas de la familia Bcl-2 son capaces de formar canales o poros en la membrana mitocondrial por homodimerización o heterodimerización (figura 3.9), estos poros regulan el potencial de la membrana mitocondrial a través del control del flujo de especies cargadas y radicales libres. Algunos de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, incluyendo a Bax, Bak, Bad, Bid y Bim, inician la permeabilización de la membrana mitocondrial por la formación de estos canales o poros. Para producir estos efectos estas proteínas proapoptóticas deben unirse a la membrana mitocondrial externa. Durante la apoptosis, Bax presente en el citoplasma en forma de monómero, es translocado a la membrana mitocondrial para formar dímeros u oligómeros de mayor orden. A diferencia de Bax, Bak se encuentra asociada a la membrana mitocondrial externa (Griffiths y col., 1999), cambiando de conformación y formando multímeros en respuesta al estímulo apoptótico. Bim, molécula proapoptótica dependiente de calcio, presente en los microtúbulos, también se transloca a la membrana mitocondrial externa durante el proceso de apoptosis.

Por otro lado, Bcl-2 y Bcl-x_L inhiben la liberación de citocromo-c formando también poros, pero en este caso, reequilibrando el potencial de membrana mitocondrial. En condiciones normales, las proteínas Bcl-2 o Bcl-x_L se encuentran ancladas a la membrana mitocondrial, al retículo endoplasmático o la membrana nuclear (Krajewski y col., 1993). Ambas proteínas actúan inhibiendo a los miembros pro-apoptóticos a través de la heterodimerización (Merry y Korsmeyer, 1997).

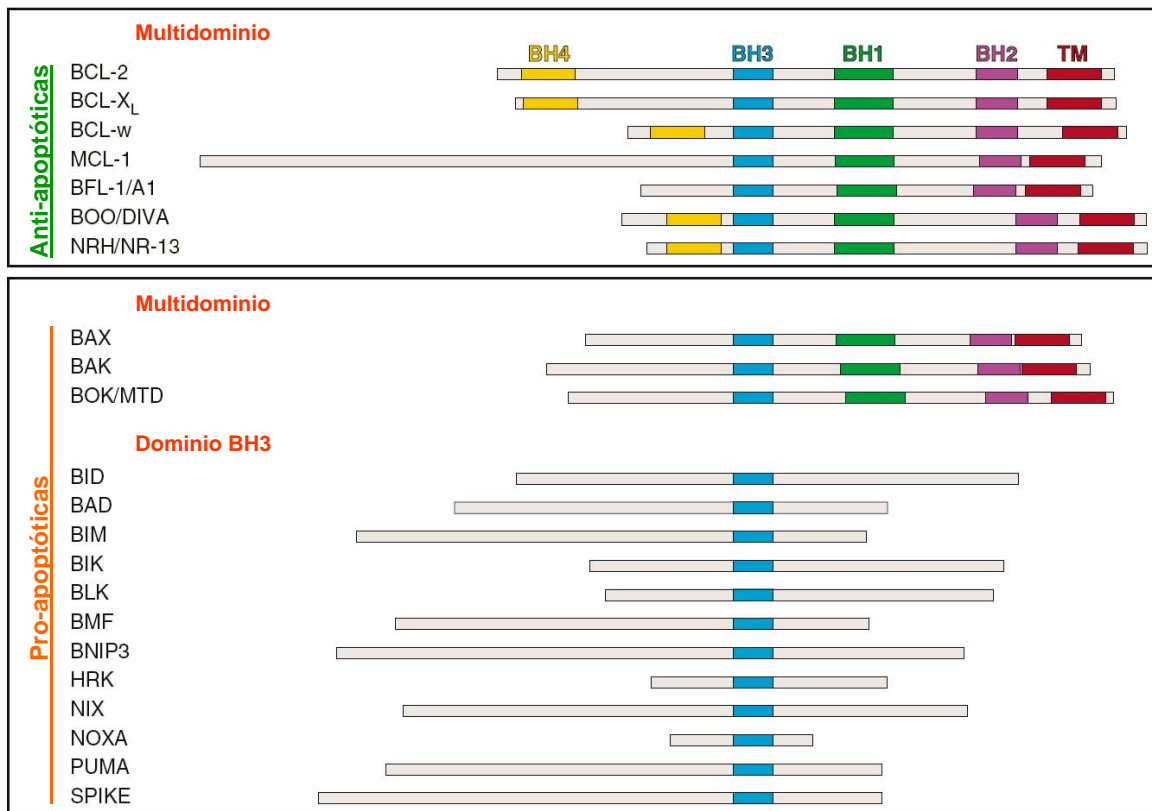
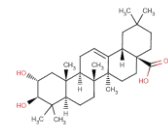


Figura 3.8 Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2, según su homología y la capacidad de inhibir o activar apoptosis. La longitud del rectángulo es proporcional a la longitud de la secuencia. Se pueden observar los dominios BH1, BH2, BH3, BH4 y la secuencia de anclaje transmembrana, TM. Los polipéptidos han sido alineados según el dominio BH3 (Walensky, 2006).

Los cambios en la dimerización pueden ser regulados por fosforilación, así la fosforilación de la serina 87 de Bcl-2 se ha relacionado con la inactivación de esta proteína (Korhonen y col., 2003). Por el contrario, la fosforilación en el residuo serina 70 puede incrementar el efecto antiapoptótico de Bcl-2 en células mieloides dependientes de interleuquina-3 (Zhao y col., 2001). Las proteínas de la familia Bcl-2 también se pueden regular a nivel transcripcional y post-transcripcional, mediante cambios conformacionales y más frecuentemente por fosforilación. La fosforilación de miembros de la familia Bcl-2 produce normalmente su inactivación. En respuesta a agentes genotóxicos, las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK y JNK) se translocan a la mitocondria y fosforilan a Bcl-2 y Bcl-x_L, provocando su inactivación y la inducción de apoptosis.

Varios estudios demuestran que también se produce una regulación a nivel transcripcional de miembros de la familia Bcl-2 en respuesta a estímulos apoptóticos, disminuyendo la expresión de Bcl-2 y de Bcl-x_L y aumentando la expresión de Bax (Krajewski y col., 1995; Ghribi y col., 2002; Korhonen y col., 2003).

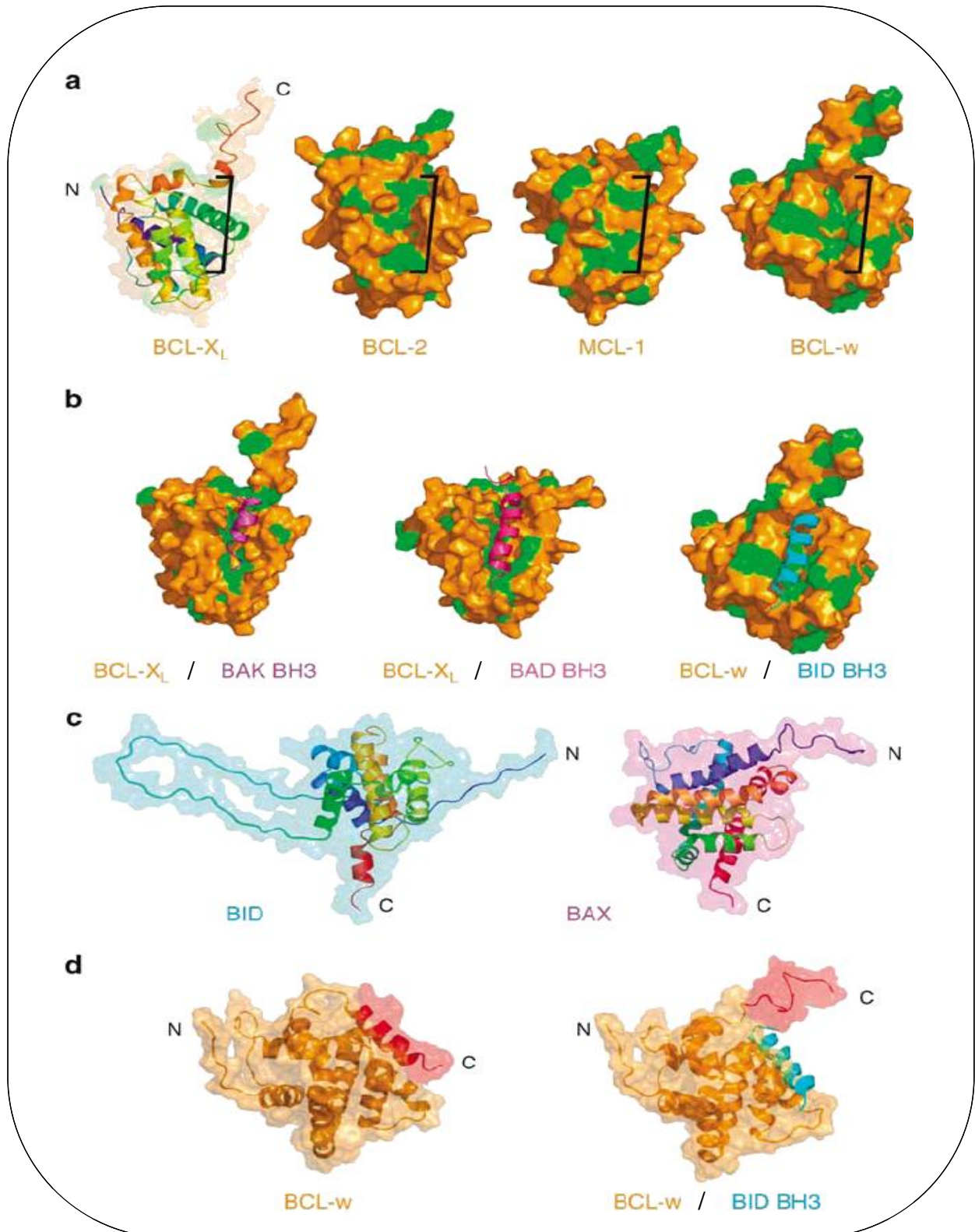
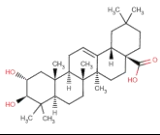
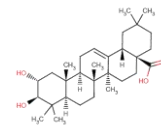


Figura 3.9 (a) Estructura de los miembros apoptóticos de la familia Bcl-2. (b) Miembros proapoptóticos acomplejados con el segmento BH3 de miembros proapoptóticos. (a,b) Los residuos hidrofóbicos son indicados en verde. (c) Únicamente Bid posee un dominio BH3 con el extremo amino terminal extendido que contiene el sitio proteolítico de caspasa-8. (c,d) Bax y Bcl-w contienen un dominio carboxi-terminal definido que regula el acceso a BH3. (d) Cambio conformacional de Bcl-w cuando se une al dominio BH3 de Bid. (Walensky, 2006).



Las proteínas con un sólo dominio BH3, Bim, Noxa, Puma y Hrk también son reguladas a nivel transcripcional. La expresión de las proteínas Noxa y Puma depende del factor de transcripción p53 en respuesta a daños genotóxico (Oda y col., 2000; Yu y col., 2001). La activación transcripcional de Hrk requiere la activación de SAPK/JNK quinasa, así como en el caso de Bim (Putcha y col., 2001), estando implicada la vía de ERK/MAPK. (Shinjyo y col., 2001; Reginato y col., 2003). En cuanto a la regulación postranscripcional por fosforilación: puede producir la inactivación de Bad (Zha y col., 1996), el incremento de la actividad de Bik (Verma y col., 2001) y de Bim, siendo esta última fosforilada por JNK.

Tras ser activadas, las proteínas con sólo un dominio BH3, migran a la mitocondria formando heterodímeros con Bcl-2 y Bcl-x_L, inhibiendo su acción, o uniéndose a proteínas como Bax formando los poros de membrana (Wangy col., 1996; Hsu y col., 1998). Existe la teoría de que las proteínas con un sólo dominio BH3 son necesarias para la activación o inhibición del resto de proteínas de la familia Bcl-2. De forma que estas proteínas actuarían como 'sensores' de daño intracelular. Es importante remarcar que las proteínas con un solo dominio BH3 no son capaces de desencadenar apoptosis sin la presencia de Bax y Bak (Zong y col., 2001). La inducción de Bax y Bak es un requisito necesario para la entrada en apoptosis a través de la ruta intrínseca de inducción de apoptosis mitocondrial (Wei y col., 2001).

3.4 JNK como regulador de apoptosis

JNK (c-Jun N-terminal quinasa) es un regulador clave de muchos eventos celulares, incluyendo la muerte celular programada. En ausencia de activación de NF- κ B, la activación prolongada de JNK contribuye a la apoptosis inducida por TNF α (figura 3.10). JNK es esencial para la apoptosis inducida por UV. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que JNK también puede suprimir apoptosis en células hematopoyéticas dependiente de interleuquina-3 vía fosforilación de la proteína Bad, perteneciente a la familia proapoptótica de Bcl-2. Así que JNK puede tener funciones proapoptóticas o antiapoptóticas dependiendo del tipo celular, naturaleza del estímulo de muerte, duración de su activación y de la actividad de otras rutas de señalización. La comprensión del mecanismo molecular por el que JNK regula la apoptosis puede resultar muy importante en el tratamiento y prevención del cáncer. (Davis, 2000; Chang y Karin, 2001; Shaulian E y Karin, 2002; Lin, 2003)

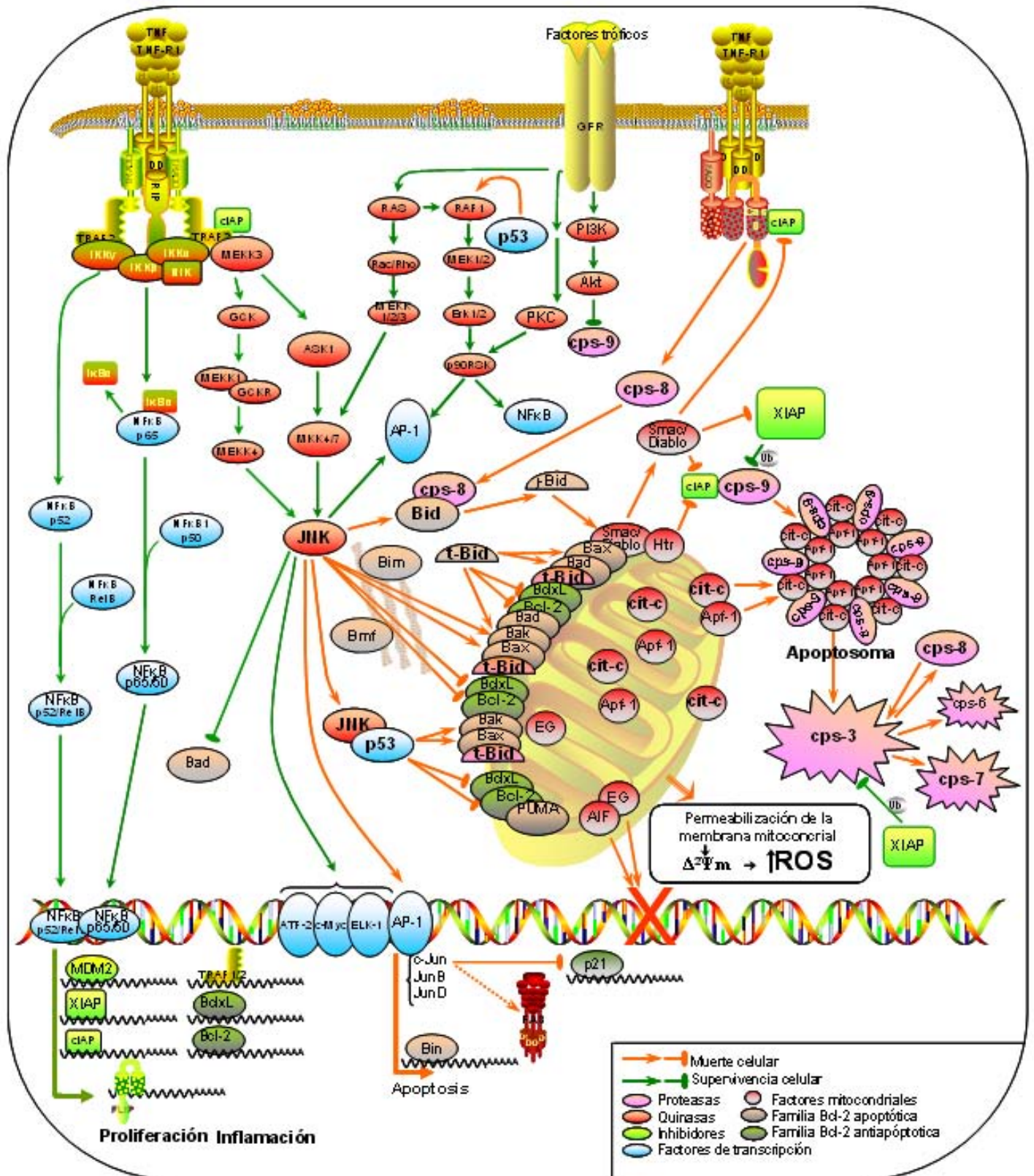
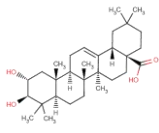
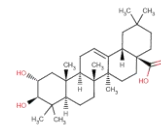


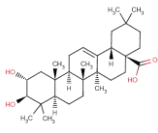
Figura 3.10 Participación de JNK en las rutas de inducción de apoptosis (naranja), de inflamación y supervivencia celular (verde). JNK puede ser activada tanto por señales de supervivencia celular como de muerte celular, participando en ambos fenómenos. Se ha propuesto que el desenlace de uno u otro fenómeno depende de la prolongación del estímulo y por tanto de la prolongación en la activación de JNK. Si la activación es transitoria las señales de supervivencia celular predominarán. Mientras que si la activación es prolongada las señales apoptóticas inducidas por JNK se imponen a las de supervivencia dando lugar al desenlace de muerte celular.



JNK pertenece a la familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Se han encontrado tres isoformas de JNK: JNK-1 y JNK-2 que son expresadas por todas las células, y JNK-3 que es expresada mayoritariamente en neuronas y células del tejido cardiaco. Las diferentes isoformas de JNK difieren en la especificidad de sustrato *in vitro* (Yu y col., 2004). Sin embargo, cada isoforma de JNK puede fosforilar indistintamente a miembros del grupo de factores de transcripción AP-1 (c-Jun, c-Fox, JunB y JunD) (figura 3.10) y al factor de transcripción relacionado con AP-1, ATF2 (Davis, 2000). JNK, además, fosforila y regula la actividad de otros factores de transcripción como Elk-1, p53 y c-Myc (Karin, 1995; Davis, 2000; Chang y Karin, 2001; Lin, 2003).

La fosforilación de estos factores de transcripción ocurre dentro de su dominio de activación NH₂-terminal e incrementa su actividad de transcripción (Davis, 2000), activando genes que controlan diversas funciones celulares incluyendo proliferación, diferenciación y apoptosis. JNK también es capaz de regular por fosforilación la actividad de otras proteínas, que no son factores de transcripción (figura 3.10) en respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares, como son las proteínas miembros de la familia de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bim y Bad) (Maundrell y col., 1997; Yamamoto y col., 1999; Yu y col., 2004). El papel preciso de JNK durante la apoptosis es controvertido ya que parece ser contradictorio según la especie, tipo de células o naturaleza del estímulo apoptótico.

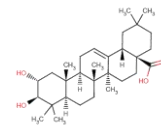
JNK fue originalmente identificada por su capacidad de fosforilar el factor de transcripción c-Jun sobre su dominio de transactivación NH₂-terminal (Hibi y col., 1993). La activación de JNK está mediada por un conjunto de MAPK quinasas a través de fosforilaciones secuenciales, p.e. MAP3K → MAP2K → MAPK (Karin, 1995). Así se han identificado dos quinasas, MAP2K, para JNK (JNKK1/MKK4/SEK1 y JNKK2/MKK7). JNKKs/MKKs son proteínas quinasas dobles que fosforilan a JNK en los residuos Thr183 y Tyr185, permitiendo su activación. Pero estas dos quinasas de JNK parecen tener preferencia por sitios diferentes: JNKK1/MKK4 prefiere el residuo Tyr185 (Lin y col., 1995; Fleming y col., 2000) y JNKK2/MKK7 prefiere el residuo Thr183 (Tournier y col., 2001). Aunque para la completa activación de JNK se requiere la activación de los dos sitios, en la activación de JNK inducida por TNF α , la fosforilación ocurre preferentemente sobre el residuo Tyr185. El significado biológico de la fosforilación diferencial de JNK por JNKK1/MKK4 y JNKK2/MKK7 no está claro. JNK activo es regulado, además, por proteínas fosfatasa como JIP, β -arrestina y JSAP2, además de por la actividad de NF- κ B (Lin, 2003). La función y regulación de JNK ha sido objeto de varias revisiones recientes.



En este capítulo se enfoca el papel de JNK en la apoptosis, haciendo énfasis en los mecanismos moleculares por los que JNK puede promover o suprimir apoptosis. La función fisiológica de la ruta de señalización de apoptosis por JNK no está clara. Sin embargo, JNK se requiere para la viabilidad embrionaria y recientes estudios han demostrado el papel de JNK en múltiples procesos fisiológicos de apoptosis (Weston y col., 2002). Se sabe que JNK es esencial para la apoptosis inducida por estrés (Xia y col., 1995; Dickens y col., 1997;). JNK3 es determinante para la apoptosis de las neuronas del hipocampo. JNK1 y JNK2 se requieren para la apoptosis en timocitos en respuesta a su unión con el receptor de células T *in vivo* (Sabapathy y col., 2001). Más aún, compuestos que actúan sobre JNK1 y JNK2 reducen la apoptosis en el desarrollo del neuroepitelio del cerebro posterior (Kuan y col., 1999; Sabapathy y col., 1999).

Trabajos con neuronas muestran el papel apoptótico de JNK sobre estas células (Le-Niculescu, 1999). Aunque también está involucrado en la apoptosis inducida por la radiación UV en otros tipos celulares (Chang y Karin, 2001), en los que se ha observado que a través de la activación de c-Jun por JNK se inhibe el arresto celular inducido por p53 y se induce la apoptosis también mediada por p53 (figura 3.10) (Shaulian y Karin; 2002). Fibroblastos primarios aislados de embriones de ratón JNK deficientes, se mostraron resistentes a la apoptosis inducida por estrés (Tournier y col., 2000). Todos estos datos apoyan el papel de JNK en la respuesta apoptótica, mostrando su función como quinasa proapoptótica (Davis, 2000; Lin, 2003). Aunque otros estudios muestran que la apoptosis inducida por el factor de crecimiento del nervioso (NGF) puede ser inhibida a través de la acción de JNK (Minden y col., 1994; Xia y col., 1995).

JNK media en la apoptosis inducida por $TNF\alpha$. $TNF\alpha$, como ya se ha mencionado es un citoquina proinflamatoria la cual ejerce sus efectos activando múltiples rutas incluyendo: las caspasas, a la quinasa de $I\kappa\beta$ (IKK) y a JNK (Baud y Karin, 2001; Karin y Lin, 2002; Lin, 2003). Mientras que la activación de caspasas es necesaria para la apoptosis, la activación de IKK inhibe la apoptosis vía factor de transcripción NF- κ B, cuyas dianas, como se vio anteriormente, incluyen a la familia IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis). Así que $TNF\alpha$ no induce apoptosis a menos que NF- κ B esté inhibido (Karin y Lin, 2002). Aunque el mecanismo por el que NF- κ B inhibe la activación de JNK no se conoce, la mediación de NF- κ B en la acción de JNK es crítica para la supervivencia celular (Tang y col, 2002; Maeda y col., 2003). La inhibición prolongada de la activación de JNK, utilizando un inhibidor específico de JNK (SP600125), suprime la apoptosis inducida por $TNF\alpha$.



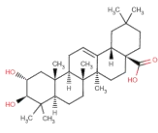
El papel de JNK en la inducción de apoptosis por $\text{TNF}\alpha$ es, por tanto, altamente controvertido, se ha sugerido que posee un papel proapoptótico, antiapoptótico o incluso ninguno de ambos. Se han propuesto varias hipótesis para explicar como la activación de JNK puede contribuir a la inducción de apoptosis. La mayor diferencia entre estas hipótesis es si la activación de JNK es suficiente para inducir apoptosis o si solo la promueve de forma indirecta:

Según una de estas hipótesis JNK podría causar muerte celular por la regulación de la expresión de ligandos de unión a receptores de muerte (**Faris y col, 1998a**). En este sentido, se ha identificado un elemento JNK-dependiente en la promoción del ligando Fas cuya expresión está unida a la actividad c-Jun y ATF2 (**Faris y col., 1998b**), siendo posible que JNK pueda inducir apoptosis por un sistema autocrino o paracrino, estando involucrado en la expresión de ligandos de unión a receptores de muerte celular.

Otra de estas hipótesis establece que la ruta de señalización mediada por JNK es necesaria para la liberación de citocromo-c, en la inducción de apoptosis por estrés. Siendo JNK por si solo suficiente para inducir la liberación de citocromo-c y producir apoptosis.

Esta última hipótesis está apoyada por ensayos llevados a cabo en fibroblastos de ratón $\text{JNK1}/2^{-/-}$ (**Tournier y col., 2000**), estas células se mostraron resistentes a la apoptosis inducida por radiación UV. La radiación UV fue incapaz de producir liberación de citocromo-c o despolarización de la membrana mitocondrial, lo que sugiere que JNK es un componente intrínseco de la ruta de apoptosis dependiente de la mitocondria. Estos fibroblastos $\text{JNK1}-2^{-/-}$, poseen severos defectos en la ruta de apoptosis mitocondrial. Sin embargo, estas células deficientes en JNK no mostraron problemas en la respuesta apoptótica inducida a través de receptores de muerte celular, lo que indica que JNK contribuye a la respuesta apoptótica por la regulación de la ruta intracelular que involucra a la mitocondria.

Otro hecho que apoya esta teoría es que JNK activo fue incapaz de causar muerte celular en células deficientes en proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Más aún, en células JNK deficientes, la exposición a estrés no pudo activar Bax, causar la liberación de citocromo-c e inducir la muerte celular. Estos datos demuestran que los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 son esenciales para la inducción de apoptosis dependiente de JNK. En células CHO, la constitución de una proteína de fusión activa MKK7-JNK fue suficiente para inducir apoptosis activando la ruta mitocondrial intrínseca (**Lei y col., 2002**). Las células transfectadas con la proteína de fusión MKK7-JNK murieron a las 4h de iniciar el tratamiento. Esta muerte celular fue inhibida por el uso del inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD-fmk.

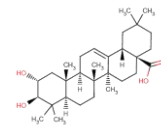


Además se detectaron todas las características de muerte celular por apoptosis. Según estos resultados la activación de JNK puede ser suficiente para la inducción de apoptosis. Por último, la apoptosis estimulada por JNK fue inhibida por la sobre-expresión de Bcl-2, lo que demuestra que el incremento de señales de supervivencia elimina la apoptosis JNK inducida. En resumen, JNK puede inducir apoptosis modulando la actividad de las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 (Lei y col., 2000).

Se han detectado un buen número de moléculas inductoras de apoptosis liberadas desde la mitocondria en respuesta a la activación de la ruta: JNK \rightarrow Bim \rightarrow Bax \rightarrow mitocondria. Estas moléculas son entre otras: la flavoproteína AIF, que causa condensación cromosómica del DNA y su fragmentación (Susin y col., 1999); endonucleasa G, que degrada el DNA cromosómico (Li y col., 2001; Parrish y col., 2001); Smac/Diablo, el cual antagoniza la acción de los inhibidores c-IAPs (Du y col., 2000); la proteasa Omi/HtrA2, que antagoniza la función c-IAP (Hegde y col., 2002; Martins y col., 2002) y el citocromo-c, que activa el complejo Apaf-1/caspasa-9 (Li y col., 1997; Li y col., 2000). Fibroblastos primarios JNK $^{-/-}$ fueron incapaces de liberar estas moléculas desde la mitocondria (Tournier y col., 2000).

Por tanto, más que como un activador de factores de transcripción relacionados con los componentes de la maquinaria apoptótica, JNK actúa de forma directa inhibiendo a inhibidores de apoptosis como Bcl-2 o Bcl-x_L, y activando a inductores tales como Bim o Bax (figura 3.10). Mientras que la activación de caspasas inicia y ejecuta la apoptosis de forma inmediata, la inducción de apoptosis por JNK requiere una activación prolongada, promoviendo la apoptosis por inactivación de supresores y la activación de inductores de la ruta apoptótica mitocondrial. Por otro lado, si la activación de JNK es transitoria, ésta puede no ser lo suficientemente efectiva para desencadenar los fenómenos apoptóticos mencionados.

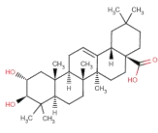
Debido a la participación de JNK en la ruta de inducción del factor de transcripción NF- κ B (figura 3.10), su activación transitoria puede activar también a este dicho factor de transcripción, bloqueando la activación de caspasas iniciada por la señal TNFR, e inhibiendo la señal apoptótica. La inhibición de NF- κ B permite la activación de JNK y de caspasas, llevando a fin la apoptosis inducida a través de TNFR (Karin y Lin, 2002; Tang, 2002; Lin, 2003). La activación de JNK sólo contribuye a la inducción de apoptosis si el proceso es continuado. Esta idea está también apoyada por el mecanismo en el que la activación prolongada de JNK resulta en la producción de jBID (Deng y col., 2003).



Se ha descrito que la estimulación de apoptosis dependiente de MKK7/JNK media, presumiblemente a través de la activación proteolítica del dominio BH3 de la proteína Bid (Deng y col., 2003). Según estos autores, el procesamiento proteolítico de Bid por MKK7/JNK genera un único producto, un fragmento de 21 kDa denominado, γ Bid (figura 3.10). Este fragmento es distinto al que se genera habitualmente por la activación proteolítica de Bid, a través de la caspasa-8, tBid. Una de las pruebas que apoya este mecanismo es la liberación selectiva de la proteína Smac, pero no de citocromo-c, debida a la acción de un fragmento de Bid similar a γ Bid en tamaño. La inhabilitación de Smac por siRNA (pequeño RNA interferente o *small interference RNA*) previno el procesamiento e inducción de la caspasa-8 y por tanto, de la apoptosis inducida por TNF α . La transfección con Smac aumentó los efectos de TNF α , sugiriendo que Smac actúa regulando la activación de caspasa-8. Por último, un péptido basado en Smac, bloqueó la interacción de cIAP con las caspasas, inhibiendo la asociación de cIAP1 y TRAF2. Estos datos sugieren un modelo en el cual TNF α activa la caspasa-8 por la inhibición del inhibidor cIAP por Smac, que a su vez es liberado gracias a la formación de γ Bid dependiente de la ruta MKK7/ JNK.

Sin embargo, existen algunos puntos controvertidos en esta ruta. Por un lado, pese a las evidencias de la inhibición de la asociación de cIAPs con las caspasas-3, -7 o -9, la interacción con la caspasa-8 (o -10) es escasa (Salvesen y Puckett, 2002). El mecanismo de generación de γ Bid por la activación de MKK7/JNK no está completamente explicado. Existiendo además otras dudas, ¿cómo es la estructura N-terminal de γ Bid? ¿cómo γ Bid libera de forma selectiva Smac de la mitocondria sin afectar a la liberación de citocromo c? ¿está involucrada γ Bid en la apoptosis inducida por TNF α en células del tipo I o del tipo II? Así que aún no está claro como γ Bid promueve la activación de la caspasa-8 a través de Smac.

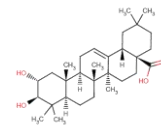
Además de Bid, existen otras proteínas de la familia Bcl-2 que juegan un papel importante en la respuesta apoptótica de JNK. Entre otras, se encuentran las proteínas de la subfamilia de Bcl-2 con un único dominio BH3 (Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Noxa, Puma y otras) (Gross y col., 1999; Davis, 2000) y las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL son fosforiladas por JNK e inactivadas (Maundrell y col., 1997; Yamamoto y col., 1999; Fan y col, 2000, Kharbanda y col., 2000; Deng y col., 2001). Aunque algunos autores sostienen lo contrario, según estos JNK fosforila Bcl-2 estabilizándolo (Dimmeler y col., 1999; Breitschopf y col., 2000). Fuere como fuere los datos indican que Bcl-2 y Bcl-xL representan sitios potenciales de regulación por JNK. Lo que es consistente con la hipótesis de que la expresión de JNK causa un incremento de la fosforilación de Bcl-2, siendo posible que Bcl-2



medie en parte de la apoptosis producida por JNK. Si la fosforilación de Bcl-2 inhibe las señales de supervivencia, está puede disminuir los niveles de Bcl-2 funcional incrementando la permeabilización de la membrana mitocondrial.

Otros autores sostienen que la sobre-expresión de JNK activo permite sólo la fosforilación parcial de Bcl-2, observándose fosforilación de Bcl-2 sólo a niveles bajos de expresión (**Lei y col., 2002**). Estos datos sugieren que la fosforilación de Bcl-2 correlaciona más con la apoptosis que con la activación de JNK, lo que es consistente con la hipótesis de que la activación de JNK por radiación UV no resulta en un aumento de los niveles de Bcl-2 fosforilado (**Tournier y col., 2001**). Esto podría indicar que JNK no es directamente la quinasa responsable de la fosforilación de Bcl-2, sino que JNK activa otras quinasas responsables de la fosforilación de esta proteína. Algunos estudios implican a miembros de la subfamilia de un único dominio BH3 en la apoptosis dependiente de JNK. Se ha publicado que fibroblastos deficientes en JNK exhiben defectos en el procesamiento y activación independiente de caspasas y de Bid (**Tournier y col., 2000**). Sin embargo, fibroblastos Bid^{-/-} no corroboran el papel de la activación directa de Bid en la apoptosis inducida por JNK. Otros estudios muestran que la expresión de Bim, proteína de la subfamilia Bcl-2 de un solo dominio BH3, puede ser dependiente de JNK (**Whitfield y col., 2001**). No obstante, estos estudios indican que JNK no se requiere para la expresión de Bim aunque sí para su funcionalidad.

Por otro lado, se ha publicado (**Lei y col., 2002**), que la subfamilia Bax de las proteínas Bcl-2 es esencial para la activación de apoptosis JNK dependiente. Los miembros de la familia Bax, incluyendo Bax y Bak, son proteínas citoplasmáticas que sufren un cambio conformacional en respuesta al estrés ambiental y se redistribuyen hacia la mitocondria (**Gross y col., 1999**). La redistribución de Bax no ha sido observada en células JNK-deficientes expuestas a estrés (**Lei y col., 2002**). La función de Bax es parcialmente redundante con la de proteínas relacionadas como Bak (**Lindsten y col., 2000**). Estudios en fibroblastos Bax deficientes, Bax^{-/-} y Bak^{-/-}, muestran deficiencias en la apoptosis inducida por estrés (**Wei y col., 2001**) similares a las producidas por fibroblastos deficientes en JNK (**Tournier y col., 2001**). Más aún, los fibroblastos Bax^{-/-} y Bak^{-/-} son resistentes a la apoptosis inducida por JNK. Otros hallazgos muestran que la fosforilación dependiente de JNK del dominio BH3 de las proteínas Bim y Bmf causa su disociación de los complejos motores dineína y miosina, como ocurre con la luz UV. Esta liberación de Bim y Bmf activa la apoptosis a través de la ruta de Bax y Bak. (**Lei y Davis 2003**). JNK promueve, además, la transcripción de Bin a través de c-Jun (**Shaulian y Karin, 2002**). Junto con la actuación directa o indirecta de JNK sobre los niveles de modificaciones



postranscripcionales en proteínas señalizadoras, JNK puede, además, modular apoptosis a través de la transcripción de genes dependientes de AP-1, como es el caso de la regulación de Bim JNK dependiente, a través de c-Jun. Por último, los niveles de c-Jun están controlados por ubiquitinización y consiguientemente por la degradación proteosomal. (Nateri et al. 2004)

3.5 Proteína tumoral p53

El antígeno tumoral p53, conocido también como Tp53 o TRP53 se encuentra sobreexpresado en una amplia variedad de células transformadas o tumorales. Esta proteína ha sido, además, detectada en una gran variedad de células no transformadas pero proliferantes, no siendo detectable o encontrándose a niveles muy bajos en células normales. En células tumorales o transformadas, p53 suele encontrarse mutado o delecionado con muy baja afinidad hacia su sitio de unión denominado PBS (*p53 binding site*), impidiendo la normal realización de su función. Si se produce la pérdida de la función de p53, la célula pasa a ser potencialmente cancerígena. Más del 50% de los cánceres presentan p53 mutada. Si p53 no se expresa la posibilidad de que la célula entre en apoptosis es menor, permitiendo la supervivencia de la célula tumoral y la resistencia a los diversos tratamientos antitumorales.

La proteína p53 es un factor de transcripción que induce arresto del ciclo celular o apoptosis en respuesta a daños genotóxicos o daños severos en el DNA. Estos procesos son inducidos mediante la transcripción diferencial de genes diana, así como mediante funciones apoptóticas independientes de transcripción (**figura 3.11**) (Rinaldo et al, 2007). La proteína p53 contiene 393 aminoácidos, con una región central de unión al DNA que se encuentra aproximadamente entre los aminoácidos 10 al 300. Esta región central es resistente a la proteólisis y está rodeada por el extremo C-terminal que media en la oligomerización de p53, mientras que el extremo N-terminal contiene una región que es una fuerte señal de transcripción.

Vogelstein y Kinzler, 1992, revisaron la funcionalidad del gen p53. Se ha postulado que p53 se une al sitio de unión de p53 (PBS) como tetrámero y activa la expresión de los genes adyacentes, los cuales inhiben la proliferación celular y/o la invasión. Hay varios mecanismos implicados en la pérdida de funcionalidad de p53:

- Mutaciones que debilitan o afectan al 'splicing' durante la síntesis de la proteína, dando lugar a su truncamiento e impidiendo la oligomerización. Mutaciones de este tipo son familiares en cánceres de pulmón, esófago, y otros.

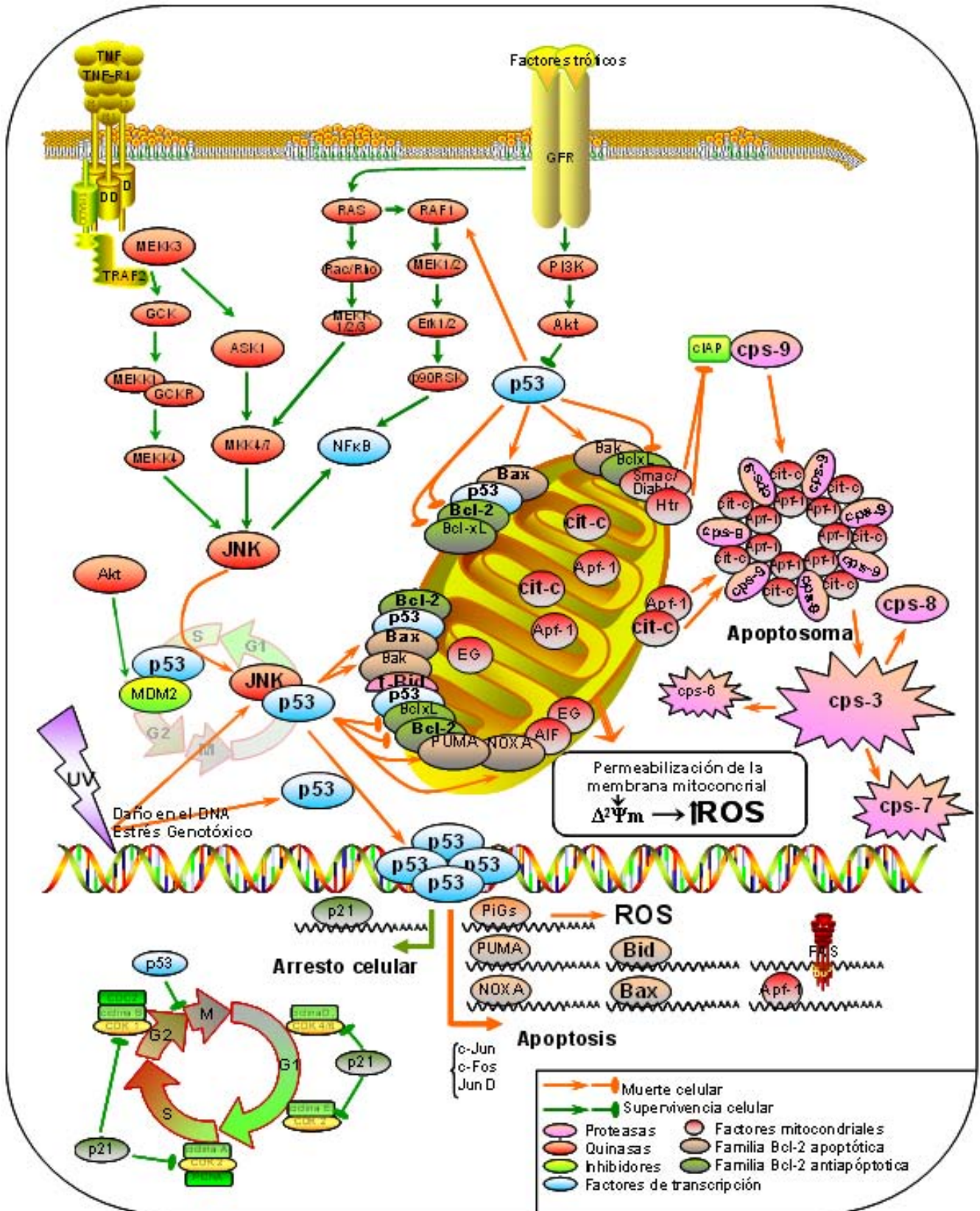
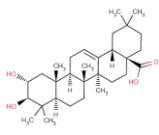
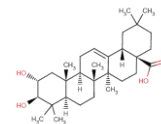


Figura 3.11 Apoptosis inducida por la activación de p53. p53 posee la capacidad de inducir tanto arresto celular fundamentalmente en las fases G0/G1 del ciclo celular como apoptosis, dependiendo de la integridad del genoma. La apoptosis p53 dependiente es mediada por la activación directa y transcripcional de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. El arresto en el ciclo p53 dependiente, ocurre a través de la activación transcripcional de la proteína p21. Ambos fenómenos son inducidos por la activación de p53, JNK dependiente o por estrés genotóxico.

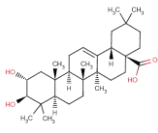


- Mutaciones que debilitan o afectan al 'splicing' durante la síntesis de la proteína, dando lugar a su truncamiento e impidiendo la oligomerización. Mutaciones de este tipo son familiares en cánceres de pulmón, esófago, y otros.
- Otro mecanismo involucrado en la pérdida de funcionalidad de p53 son las deleciones, las cuales son comunes en colon, cerebro, pulmón, piel y otros cánceres.
- Un tercer mecanismo encontrado en el cáncer de cerviz, es la expresión del gen E6 del virus del papiloma humano (VPH), dando lugar a la inactivación funcional de p53 a través de su unión con la proteína viral, lo que provoca su posterior degradación.
- La ruta de p53 puede ser interrumpida además por alteraciones en la proteína MDM2 (Oliner y col., 1992. Shieh y col., 1997). MDM2 actúa como inhibidor de p53, en respuesta a daños en el DNA, p53 es fosforilado en la serina 15 sufriendo cambios conformacionales que impiden su unión con MDM2.

La proteína p53 juega un importante papel en la reparación del DNA. Más aún, p53 posee una función como punto de control del ciclo celular tras la radiación con UV (Lee y Bernstein, 1993). Estos autores, hablan de p53 como 'el guardián del genoma', previniendo la proliferación en caso de de daño génico. La activación de la transcripción de determinados genes por p53 sugiere que estos pueden mediar en la supresión tumoral.

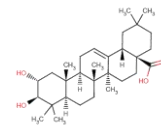
La activación del gen WAF1/CIP1 (p21) por p53 (figura 3.11), da lugar a la formación de complejos con las ciclinas que inhiben la función de las quinasas dependientes de ciclinas, bloqueando la progresión del ciclo celular (El-Deiry y col., 1993; Harper y col., 1993). Normalmente, p53 no es necesario para el normal desarrollo del ciclo celular pero en ciertos ambientes relacionados con daño genotóxico (radiación UV, estrés celular) se induce la expresión de p53, bloqueando la progresión del ciclo celular, induciendo arresto celular y la reparación del DNA.

En el caso de que esta reparación no sea posible p53 puede inducir el proceso de apoptosis celular. En las líneas tumorales con p53 inactivo o de baja funcionalidad, estas rutas podrían ser defectuosas, permitiendo un crecimiento celular descontrolado, sin tener en cuenta la integridad del DNA. Bunz y col., 1998, demostraron que el arresto en el ciclo celular debido a p53 está mediado por la transcripción de p21, inhibidor de quinasas ciclina dependientes, cuya transcripción es llevada a cabo por p53.



Ryan y col., 2000, examinaron el efecto de p53 sobre la inducción de NF- κ B. Según estos autores en células sin actividad NF- κ B la apoptosis inducida por p53 es inhibida. Bajo circunstancias especiales p53 parece ser capaz de activar NF- κ B, a través de la ruta RAF/MEK1/ p90 (rsk) en lugar de la ruta TNFR1/ TRAF2/ IKK utilizada por TNFR. Estos autores mostraron que la inhibición de MEK1 inhibe la activación de NF- κ B inducida por p53. Aunque normalmente, p53 reduce la activación de NF- κ B. Bajo circunstancias especiales, la apoptosis inducida por p53 puede involucrar la activación de NF- κ B. Estas circunstancias son similares a las situaciones en la que NF- κ B puede promover apoptosis, NF- κ B inducido por p53 no involucra a la ruta clásica de activación a través de IKK e I κ B. Consecuentemente, NF- κ B dependiente de p53 induce genes regulados por p53 tales como PUMA y p21 (Waf1) (**Fujioka y col., 2004**). Sin embargo, la observación más común, realizada *in vivo*, es que la activación de NF- κ B contrarresta la apoptosis inducida por p53, desestabilizando p53, quizás a través de la activación de MDM2 (**Tergaonkar y col., 2002; Bohuslav y col., 2004**).

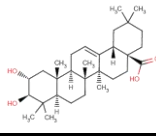
Fuchs y col., 1998, pusieron en evidencia la asociación de JNK y p53. De manera que JNK tiene un papel no activo en la regulación de la estabilidad de p53. Los resultados hallados muestran que la cantidad de complejo p53-JNK se correlaciona inversamente con los niveles de p53 nativa. Otro resultado interesante es que p53 unido a JNK exhibe una vida media mayor que p53 libre. Los complejos JNK-p53 y MDM2-p53 se encuentran preferentemente en las fases del ciclo G₀/G₁ y S/G₂M respectivamente (**figura 3.10**). Existen otras proteínas inhibitoras de p53 como es TAF9 (**Lu y Levine, 1995**). Otro hecho que relaciona la activación de p53 con JNK es la inducción de la apoptosis p53-dependiente en respuesta al tratamiento con FDH (10-formiltetrahydrofolato deshidrogenasa) (**Oleinik, Oncogene, 2007**). Esta activación es llevada a cabo por la fosforilación de p53 en la Ser 6 a través de JNK1 y JNK2. El tratamiento con FDH en células tratadas con SP600125, inhibidor específico de JNK, previene de la fosforilación de p53 en la Ser 6 y protege de la inducción de apoptosis. Hecho que también ocurre si JNK1 y JNK2 son inactivados por siRNA (*small interference RNA*). La inactivación de JNK1 impide la fosforilación de p53 por JNK2 en respuesta a FDH. Mientras que el bloqueo de la transcripción de JNK2 por siRNA, no impide la fosforilación de p53 por JNK1. Por último, según estos autores JNK2 se asocia físicamente con p53 pero no JNK1. Otro hecho que apoya la relación de p53 con JNK es que la inhibición de JNK, por oligonucleótidos antisentido, inhibe el crecimiento de células tumorales p53-deficientes, hecho que no ocurre en células p53 positivas (**Potapova y col, 2002**). Se ha demostrado que la activación de JNK puede inhibir el arresto del ciclo celular inducido por p53, promocionando la apoptosis p53 inducida. (**Shaulian y col., 2000; Lin, 2002**).



Mihara y col., 2003, mostraron que p53 es capaz de sufrir translocación hacia la mitocondria, induciendo directamente la permeabilización de la membrana mitocondrial externa por la formación de complejos con Bcl-x_L y con Bcl-2, dando lugar a la liberación de citocromo-c. La unión con Bcl-x_L parece producirse a través del dominio de unión al DNA de p53. **Chipuk y col., 2004**, encontraron que la translocalización citosólica de p53 es suficiente para la inducción de apoptosis. Según estos autores, p53 inhibe directamente Bcl-2 y activa Bax en ausencia de otras proteínas (**figura 3.10**), permeabilizando la mitocondria y activando el proceso de apoptosis. Aparte de la activación transcripcional de Bax, p53 puede promover la oligomerización de Bax lo que ocurre con cinéticas y concentraciones similares a la oligomerización de Bax producidas por Bid (**Chipuk y col., 2004**). Por último, estos autores propusieron que cuando p53 se acumula en el citosol, puede funcionar de forma análoga a la subfamilia de proteínas proapoptóticas de Bcl-2 con un único dominio BH3, activando Bax y conduciendo a la apoptosis. Existen evidencias de que Bid es una de las proteínas que regulan las dianas de p53, por lo que su inducción y procesamiento media en la apoptosis p53 inducida (**Sax y col., 2002**).

Cuando p53 se transloca hacia el núcleo actúa como factor de transcripción, regulando la expresión de genes proapoptóticos. **Chipuk y col., 2005**, demostraron que existe un nexo triple entre Bcl-x_L, p53 citoplasmática y la proteína PUMA, la cual coordina la función citoplasmática de p53. Según estos autores, p53 nuclear induce la expresión de PUMA, lo que desplaza la unión de p53 con Bcl-x_L, que la mantiene secuestrada, permitiendo así la permeabilización de la mitocondria. **Sykes y col., 2006**, mostraron que una mutación en p53 bloquea la transcripción de genes apoptóticos tales como Bax y PUMA. La acetilación de p53 también inhibe la capacidad de p53 de activar la transcripción de Bax y PUMA.

Genes antiapoptóticos como Bcl-2 y proapoptóticos como Bax regulan su expresión a través de p53. El gen que codifica Bax posee sitios de unión a p53 en su promotor y su expresión está regulada por el daño en el DNA y el incremento de p53. Por otro lado, la apoptosis producida por p53 puede ser inhibida por Bcl-2/Bcl-x. p53 ha mostrado tener actividad represora sobre la transcripción de Bcl-2. Por último, las especies oxígeno reactivas (ROS), son poderosas activadoras del daño en la mitocondria y la producción de apoptosis. Un gran número de genes, que incrementan la producción de ROS y por tanto del estrés oxidativo, son inducidos por p53 (PIGs, *p53 induces genes*). La apoptosis producida por Fas/FasL también parece ser dependiente de p53, aunque el mecanismo por el que esto ocurre aún no está claro.



Mecanismos de inducción de apoptosis

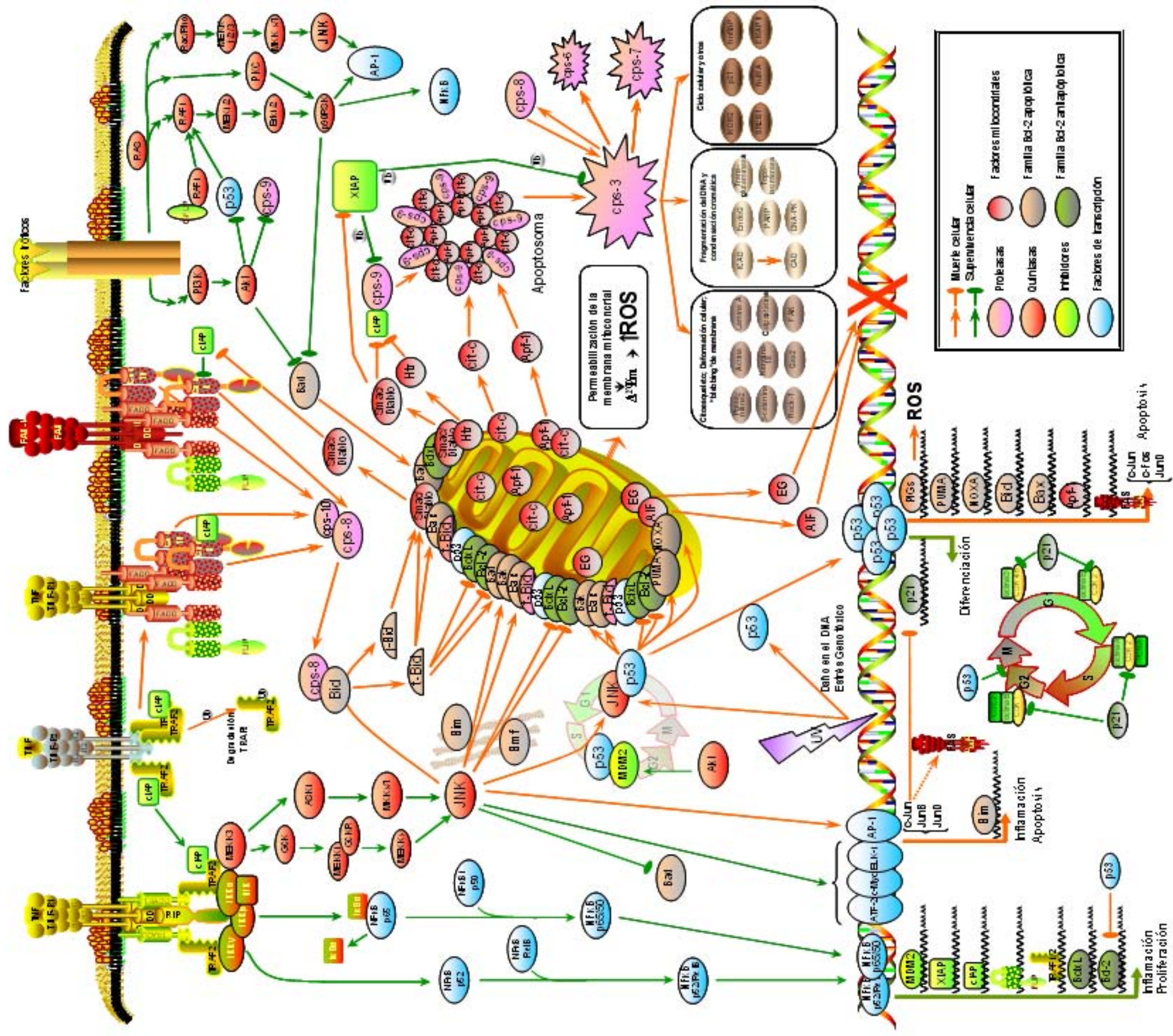
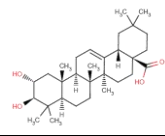
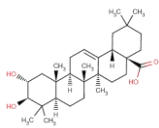


Figura 3.12 Esquema-resumen de los principales procesos de apoptosis comentados en este capítulo: Rutas clásicas de inducción de apoptosis extrínsecas. Ruta clásica de inducción de apoptosis intrínseca o ruta mitocondrial. Mecanismos de apoptosis JNK dependientes. Mecanismos de apoptosis p53 dependientes. En relación con estos mecanismos de apoptosis, también se han incluido algunas de las rutas de supervivencia celular e inflamación relacionadas con la activación de JNK y NF-κB, así como con la activación de los receptores de factores de crecimiento.



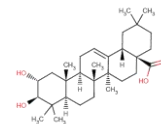


Capítulo 4

Objetivos

4.1 Determinación del potencial citotóxico del ácido maslínico

Se determinará el potencial citotóxico del ácido maslínico frente a las líneas celulares de carcinoma de colon HT29 y Caco-2, así como sobre las líneas normales o no transformadas IEC-6 e IEC-18. Los ensayos de citotoxicidad serán llevados a cabo mediante el método de determinación de la viabilidad celular con MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) que es transformado a formazán en las células con capacidad metabólica siendo proporcional al número de células viables. Los triterpenos pentacíclicos, grupo al que pertenece el ácido maslínico, son compuestos capaces de inducir citotoxicidad sobre una gran variedad de líneas tumorales independientemente de su histotipo y fenotipo. Para determinar el rango efectivo de citotoxicidad del ácido maslínico sobre líneas tumorales se seleccionaron las líneas de carcinoma de colon HT29 y Caco-2. Estas líneas tumorales difieren en la expresión de ciertos oncogenes tales como p53, implicados en los mecanismos de inducción de apoptosis.



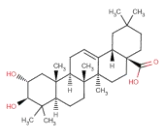
Algunos triterpenos pentacíclicos han mostrado cierta citotoxicidad selectiva sobre líneas cancerígenas frente a células normales, como es el caso del ácido betulínico (Zuco y col., 2002). Se determinará, si el ácido maslínico presenta esta citotoxicidad selectiva. Para ello se examinará la citotoxicidad del ácido maslínico sobre las líneas de epitelio intestinal IEC-6 e IEC-18, estas líneas a pesar de ser líneas inmortalizadas o establecidas, han sido calificadas como líneas normales o no transformadas, aunque no pueden ser equiparadas con células tisulares en cultivo primario.

4.2 Determinación del efecto genotóxico del ácido maslínico en líneas tumorales.

Durante el desarrollo de la citotoxicidad de un determinado producto, éste puede deteriorar directamente o a través de mecanismos secundarios la integridad del DNA celular. Para evaluar el posible daño genotóxico inducido por el ácido maslínico sobre las líneas tumorales HT-29 y Caco-2 se realizará una electroforesis en microgel o 'comet assay'. En este ensayo es posible determinar la integridad del DNA celular, a nivel de células individuales y poder cuantificar de esta forma la extensión del proceso genotóxico. Un análisis temporal de este proceso nos permitirá conocer hasta que punto la genotoxicidad acepta a la maquinaria celular, así como el grado de recuperación de las células que aún continúen viables tras el tratamiento.

4.3 Análisis del efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular

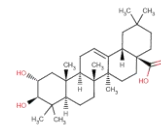
Se realizará el análisis del ciclo celular por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio. El yoduro de propidio se une de forma proporcional a la cantidad de DNA celular, por lo que la determinación de la intensidad debida al yoduro de propidio incorporado proporciona información sobre la fase del ciclo celular en el que se encuentra la célula. Esta intensidad puede ser cuantificada de forma individual para cada célula mediante citometría de flujo FACS (*fluorescence activated cell sorter*). El análisis del ciclo celular puede proporcionar información sobre varios de los efectos producidos por el ácido maslínico: citotoxicidad, efecto diferenciador y apoptosis.



- En primer lugar, el descenso de la proliferación celular, como respuesta al tratamiento con el ácido maslínico, puede deberse no sólo a un posible efecto citotóxico sino que además puede responder a un posible efecto citostático. Este efecto citostático podría verse reflejado en el análisis del ciclo celular como un arresto en algunas de sus fases. Aunque el efecto citostático también podría mostrarse como una disminución en la tasa global de división celular sin que hayan cambios en la proporción de células en cada una de las fases del ciclo.
- Por otra parte, las líneas tumorales presentan una tasa de división más elevada que las células diferenciadas. Esta mayor tasa de división, a costa de la pérdida de la capacidad de diferenciación, confiere a las líneas cancerígenas un mayor grado de supervivencia. Las células diferenciadas presentan un importante arresto celular en las fases del ciclo G_0/G_1 durante el cual desarrollan la funcionalidad y características propias del tejido al que pertenecen.
- Por último, en la fase final del proceso de apoptosis las células apoptóticas se fragmentan generando los denominados cuerpos apoptóticos, los cuales pueden ser identificados y cuantificados por la aparición de un pico sub G_0/G_1 en el análisis del ciclo celular. Estas anomalías también pueden deberse a otras causas por lo que unido al análisis del ciclo celular se realizará un estudio específico para la determinación y cuantificación de apoptosis por citometría de flujo mediante tinción con anexina V-FICT.

4.4 Inducción de diferenciación celular en líneas cancerígenas

La inducción de diferenciación celular por parte de los compuestos triterpénicos pentacíclicos ha sido descrita en varios de estos compuestos sobre distintas líneas tumorales como es el caso de los ácidos oleanólico y ursólico sobre células de teratocarcinoma humano (Lee y col., 1994); el derivado del ácido oleanólico CDDO sobre células de rata PC12 (Suh y col., 1999), células de osteosarcoma (Ito y col., 2001) y células de leucemia mieloide (Pedersen y col., 2002); los derivados acetoxi-boswéllicos sobre células de leucemia (Jing y col., 1999); y el ácido betulínico sobre queratinocitos humanos (Galgon y col., 2005).



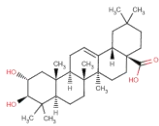
Un marcado arresto del ciclo celular en las fases G₀/G₁ es una de las principales características que puede indicar la diferenciación celular. En caso de observarse tal arresto tras el análisis del ciclo celular, se determinará la posible inducción de diferenciación. Para determinar si efectivamente el ácido maslínico es capaz de inducir esta diferenciación se realizará la medida de la actividad fosfatasa alcalina, esta enzima es un importante marcador de diferenciación enterocítica, habiendo sido descrita como marcadora de diferenciación en células HT29 y Caco-2 (Liu y col., 2006; Dihal y col., 2007; Lea y col., 2007).

4.5 Cuantificación del grado y extensión de los procesos de apoptosis y/o necrosis

Se cuantificará el grado y la extensión de los procesos de apoptosis y/o necrosis por los que el ácido maslínico ejerce su efecto citotóxico. Se utilizarán técnicas de microscopía y citometría de flujo para evaluar estos fenómenos. La existencia de apoptosis será confirmada mediante electroforesis de DNA en gel de agarosa, así como por la actividad caspasa-3.

Se determinará la existencia de apoptosis mediante técnicas de microscopía óptica. Los cambios morfológicos producidos durante el proceso de apoptosis pueden ser observados mediante técnicas de microscopía de fluorescencia por tinción con Hoechst o con anexina-V/IP, las cuales pueden revelar información tanto cualitativa como cuantitativa.

Una vez confirmada la presencia de apoptosis, ésta será evaluada por ensayos de citometría de flujo. Durante el desarrollo del proceso de apoptosis ocurren cambios en la fisiología celular que pueden ser utilizados para la cuantificación de la extensión de este proceso como es la exposición de fosfatidilserina en la monocapa externa de la membrana plasmática. La cuantificación mediante citometría de flujo de las células con una elevada proporción de este fosfolípido en la monocapa externa puede realizarse por la unión específica de la fosfatidilserina con la anexina V-FICT. Esta técnica permite, además, determinar y cuantificar la posible necrosis producida durante el tratamiento. Los ensayos citométricos serán realizados, además, sobre las líneas no transformadas IEC-6 e IEC-18, lo que permitirá determinar en qué extensión aceptan los procesos de apoptosis y/o necrosis desencadenados por el ácido maslínico a estas líneas celulares no transformadas, las cuales presentan características con un mayor grado de semejanza a las células normales del tejido intestinal.

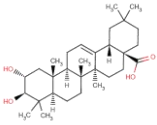


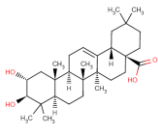
Para asegurar que efectivamente el ácido maslínico es capaz de desencadenar estos procesos de apoptosis sobre líneas tumorales se realizará una electroforesis de DNA en gel de agarosa. Este DNA deberá mostrar el típico patrón en escalera en caso de haber sufrido ruptura apoptótica. Por último, se confirmará el proceso de apoptosis a nivel molecular mediante la determinación de la actividad caspasa-3, que como se ha explicado en el capítulo 3 es una de las principales moléculas efectoras en el desarrollo habitual de los procesos de apoptosis.

4.6 Mecanismos moleculares de inducción de apoptosis por el ácido maslínico.

Por último, se determinará a través de qué mecanismos moleculares de inducción de apoptosis podría llevar a cabo el ácido maslínico sus efectos apoptóticos y/o citotóxicos. Para la consecución de este objetivo se determinarán los niveles de expresión de proteínas claves en los procesos de inducción de apoptosis comentados en el capítulo 3. Por su participación en estos procesos, se ensayarán las siguientes proteínas claves: caspasas iniciadoras 8 y 9; caspasas efectoras 3 y 7; proteínas de la familia Bcl-2 con distintas funcionalidades: Bcl2 (antiapoptótica), Bax (proapoptótica con 3 dominios BH) y Bid (proapoptótica con un sólo dominio BH3); citocromo-c como factor mitocondrial mediador en la inducción de apoptosis a través de la mitocondria, p53 factor de transcripción profundamente implicado en las rutas de inducción de apoptosis, arresto y diferenciación celular. Por último, se eximirá la expresión de la quinasa JNK, proteína implicada tanto en procesos de inflamación, como de apoptosis, ya que se ha descrito la capacidad de estos compuestos triterpénicos en la participación de ambos fenómenos.

El estudio de inducción de las diferentes proteínas se realizará de forma temporal, en orden a determinar la secuenciación en la activación de las rutas apoptóticas implicadas en la acción del ácido maslínico. Se intentará evaluar si los efectos mostrados por el ácido maslínico pueden ser explicados a partir de los resultados hallados en este estudio y se propondrá un mecanismo molecular que pueda aunar todos los resultados encontrados. Por último, se evaluará si los resultados hallados en esta caracterización molecular son comparables a los observados en otros compuestos análogos descritos en la bibliografía.





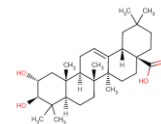
Capítulo 5

Materiales y Métodos

5.1 Líneas celulares

Para llevar a cabo la determinación de la capacidad anticancerígena del ácido maslínico, así como su extensión se realizaron distintos ensayos utilizando como modelo las siguientes líneas celulares: Líneas celulares de adenocarcinoma colon-rectal HT29 (ECACC n°. 91072201) y Caco-2 (ECACC n°. 8610202). Líneas celulares normales de epitelio intestinal de rata IEC-6 (ECACC n°.88071401) y IEC-18 (ECACC n°. 88011801).

Línea tumoral HT29 (ATCC: HTB-38) (**figura 5.1a**). Originalmente aislada a partir del cáncer de colon de una mujer caucásica de 44 años de edad. Estas células son comúnmente utilizadas en estudios de cáncer de colon. Su capacidad tumorigénica ha sido mostrada en ratón (*nude mice*) formando adenocarcinomas bien diferenciados, consistentes con colon primario (grado I). Además son capaces de formar tumores en hámsters tratados con esteroides. Esta línea celular es positiva para la expresión de los siguientes oncogenes: *myc+*, *ras+*, *myb+*, *fos+*, *p53+*, *abl-*, *ros-*, *src-*. El tiempo que estas células tardan en doblar su población es de aproximadamente 48h en condiciones normales de cultivo.



Línea tumoral Caco-2 (ATCC: HTB-37) (**figura 5.1b**). Originalmente aislada a partir del cáncer de colon de un varón de 72 años de edad. Su capacidad tumorigénica al igual que en el caso de las células HT-29 ha sido probada en ratón (*nude mice*) formando adenocarcinomas moderadamente bien diferenciados, consistentes con colon primario (grado II). Cuando llegan a la confluencia, estas células se diferencian expresando características propias de los enterocitos. El tiempo en el que doblan su población es de unas 62h aproximadamente. Esta línea es positiva para la expresión de los siguientes oncogenes: p53-, ras+, myc+.

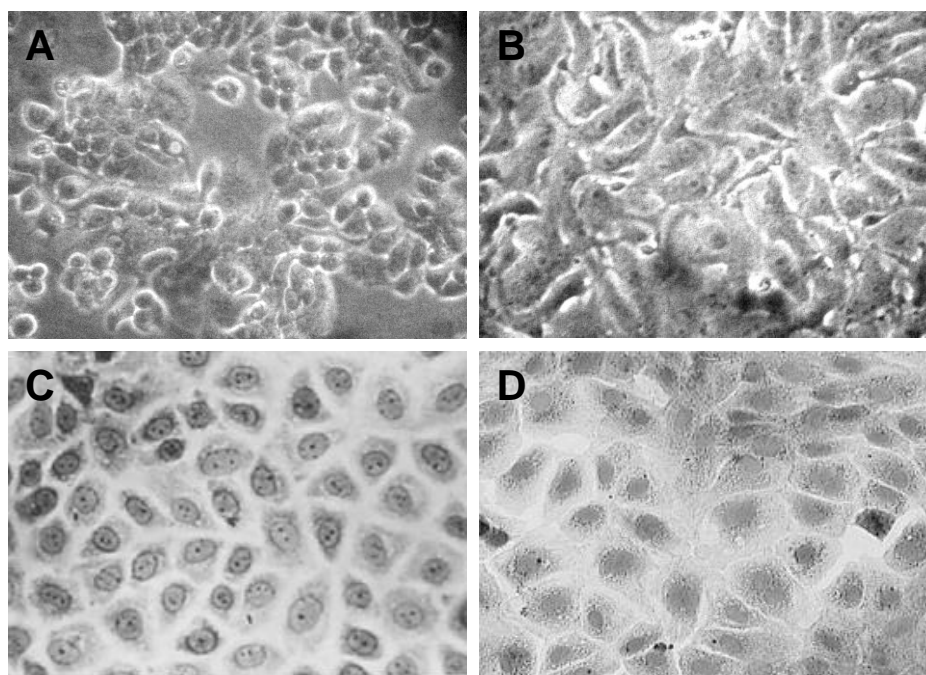
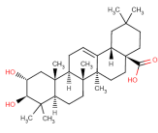


Figura 5.1 Imágenes de microscopía óptica de las células HT29 (A), Caco-2 (B), IEC-6 (C) e IEC-18 (D). En las que puede apreciarse la diferente morfología de cada una de estas líneas intestinales.

Línea no transformada IEC-6 (ATCC: CRL 1592). Aisladas a partir de epitelio intestinal de rata, son descritas como una población homogénea con características de células epiteliales, con núcleos alargados y ovalados, crecen formando colonias confluentes (**figura 5.1c**), adoptando formas poligonales entre células adyacentes (**Quaroni y col., 1979; Wood y col., 2003**). Sus características ultraestructurales incluyen: microvellosidades en la región perinuclear, numerosas mitocondrias, formación de complejos *gap-junction*, microfilamentos especialmente prominentes en la superficie y en las zonas de contacto célula-célula. Todas estas características son consistentes con las células intestinales. Desde el establecimiento y caracterización de estas líneas celulares, las células IEC-6 han sido utilizadas en numerosos estudios relacionados con la determinación de mecanismos de diferenciación (**Sterling y col., 2002; Ray y col. 2003**).



Línea no transformada IEC-18 (ATCC: CRL 1589) (**figura 5.1d**). Al igual que las IEC-6, fueron aisladas a partir de epitelio intestinal de rata, poseen características propias de células normales, ya que inhiben su crecimiento por contacto, no forman colonias en agar semisólido y no son tumorgénicas cuando son inyectadas en ratón (*nude mice*). Poseen un cariotipo diploide normal, así como una tasa de crecimiento y antígenos de superficie similares a las células epiteliales intestinales *in vivo*. Tanto las células IEC-6 como las IEC-18 expresan características antigénicas del epitelio intestinal. Han sido calificadas en numerosos artículos como células intestinales normales o como células intestinales no transformadas. (**Wineset y col., 1996; Ringear y col., 1996; Ramachandran y col., 2000; Sterling y col., 2002; Yamada y col., 2003; Hausott y col., 2004**).

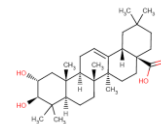
5.1.1 Subcultivos celulares

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en flascos de 74 cm² y en placas de 100 cm o 180 cm de diámetro. Crecidas en DEMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) conteniendo glucosa (25 mM) y L-glutamina (4mM) (Sigma, St. Louis, MO (USA)), suplementado con suero bovino fetal (FCS, *fetal calf serum*) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, (Austria)) y 0.1% de los antibióticos penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina) (Gibco-BRL, Eggenstein (Germany)), siendo incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad.

En todas las líneas celulares se realizaron un máximo de 12 sub-cultivos, en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar. Cuando las células se encontraron próximas a la confluencia, entorno a un 90%-95%, fueron subcultivadas. Para lo cual se les retiró el medio, siendo lavadas 2 veces con PBS (*phosphate buffert saline*). Inmediatamente después, la células fueron despegadas del soporte por incubación con tripsina-EDTA durante 5-10 minutos (0,25% tripsina, 1 mM EDTA) (GibcoBRL) en un incubador humidificado al 5% de CO₂. La tripsina fue inactivada añadiendo medio de cultivo suplementado con FCS. A continuación las células fueron recogidas por centrifugación y subcultivadas o sembradas para la realización de los distintos ensayos.

5.1.2 Almacenamiento celular y descongelación.

Todas las líneas celulares fueron congeladas en suero con un 10% de DMSO (dimetil sulfóxido). En primer lugar se congelaron a -80°C utilizando un crioc-contenedor de congelación

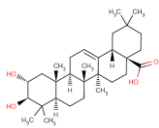


gradual y a continuación fueron almacenadas a -196°C en nitrógeno líquido. Para una descongelación rápida, los criotubos fueron inmersos en un baño a 37°C . A continuación, las líneas celulares fueron diluidas en 10 mL de medio de cultivo al 10% de FCS, e incubadas a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO_2 , salvo en la línea Caco-2 la cual fue cultivada durante su primer y segundo pase en 5 mL de medio de cultivo al 20% de FCS, para asegurar la división de las células recientemente descongeladas.

5.2 Almacenamiento y vehiculización del ácido maslínico

El ácido maslínico (ácido $(2\alpha,3\beta)$ -2,3-dihidroxiolean-12-en-28-oico, derivado triterpénico hidroxipentacíclico natural) fue obtenido a partir de los restos de molturación de la oliva (*Olea europaea*), utilizando el método de extracción descrito por **García-Granados y col., 1998**. El extracto utilizado es un polvo químicamente puro compuesto por un 98% de ácido maslínico, siendo estable almacenado a 4°C . El ácido maslínico fue disuelto previamente a su uso a una concentración de 10 mg/mL en 50% de DMSO y 50% de PBS. La solución *stock* fue almacenada en frío a -20°C . Para los distintos tratamientos, esta solución fue diluida en medio de cultivo celular hasta alcanzar las concentraciones necesarias en cada caso.

En un primer momento se filtró la disolución de maslínico en DMSO y PBS, pero dado que se trataba de una emulsión, la disolución inicial de aspecto lechoso y completamente opaca tras el filtrado aparecía transparente con un tono amarillento parecido al del DMSO puro. Tras pasar cierto volumen el filtro parecía taponarse, por tanto se decidió no filtrar la disolución inicial, ya que el DMSO puro es suficientemente tóxico como para permitir la esterilización de la droga, por lo que el ácido maslínico fue en primer lugar disuelto en DMSO y a continuación se le añadió el PBS en condiciones de esterilidad. Previamente a la realización de los ensayos se comprobó que las concentraciones de DMSO que resultan ser tóxicas para los distintos tipos celulares se encuentran por encima del 0.5%, la concentración final de este compuesto no fue nunca superior a esta concentración, en todos los ensayos realizados. A concentraciones elevadas de ácido maslínico del orden de 0.25, 0.5 y 1 mg/mL puede observarse la precipitación del mismo. Tras una revisión bibliográfica, respecto a compuestos análogos al ácido maslínico, no se encontraron referencias sobre la aparición del precipitado de los mismos y su probable insolubilidad, por tanto, el problema de la concentración real parece obviarse. En estos casos los disolventes más utilizados son DMSO y alcoholes, así como mezclas de estos últimos en agua con diferentes proporciones.



5.3 Ensayos de citotoxicidad

Para establecer el número óptimo de células necesario para llevar a cabo los estudios de viabilidad celular, se realizó previamente un *screening* para determinar el número de células sembradas que tras ser crecidas proporcionaba una absorbancia óptima entre valores de 1 a 1.5, obtenida por el ensayo con MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*), que se describirá a continuación, rango en el que la absorbancia es proporcional con la cantidad de células presentes.

Tras determinar el número óptimo de células a sembrar en cada línea celular, se procedió a la realización de los distintos ensayos de citotoxicidad en orden a establecer el efecto antitumoral del ácido maslínico. Para ello se realizaron diferentes curvas de citotoxicidad sobre las líneas celulares anteriormente descritas, determinándose, en cada línea celular, la concentración de compuesto a la que se produce una inhibición del crecimiento del cultivo de un 50% o IC_{50} (*inhibitory concentration of 50%*).

Para los ensayos de citotoxicidad las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos con $0.31 \text{ cm}^2/\text{pozo}$, en los que no se utilizaron las hileras de los bordes para evitar contaminaciones. Se sembraron por pocillo $6 \cdot 10^3$ células HT29, $15 \cdot 10^3$ células Caco-2, $5 \cdot 10^3$ células IEC-6 y $1.2 \cdot 10^3$ células IEC-18. Todos los tipos celulares se hicieron crecer en $200 \mu\text{L}$ de DMEM suplementado con glutamina 2 mM, 10% en FBS y 0.1% de estreptomicina/penicilina (S/P), a 37°C y bajo una atmósfera del 5% CO_2 . Se utilizó DMSO como agente vehiculizante del maslínico, ya que ésta es una sustancia parcialmente soluble en medio acuoso. Tras 24h de la siembra se retiró el medio, añadiendo medio nuevo junto con las distintas concentraciones de ácido maslínico hasta un volumen final de $200 \mu\text{L}$.

La puesta a punto del método así como el rango efectivo de citotoxicidad del compuesto se determinó en células HT29. En primer lugar, para encontrar el rango de efectividad del ácido maslínico, se probaron concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 mg/mL. Tras una incubación de 72h se examinó el aspecto presentado por las células a las distintas concentraciones. En las tres diluciones más concentradas 0.25, 0.5, 1 mg/mL se observó la precipitación del compuesto. Ya que a 0.1 mg/mL las células estaban totalmente despegadas se acotó el rango en el que podría encontrarse la IC_{50} entre 0 y $100 \mu\text{g/mL}$, rango que fue probado en todas las líneas celulares.

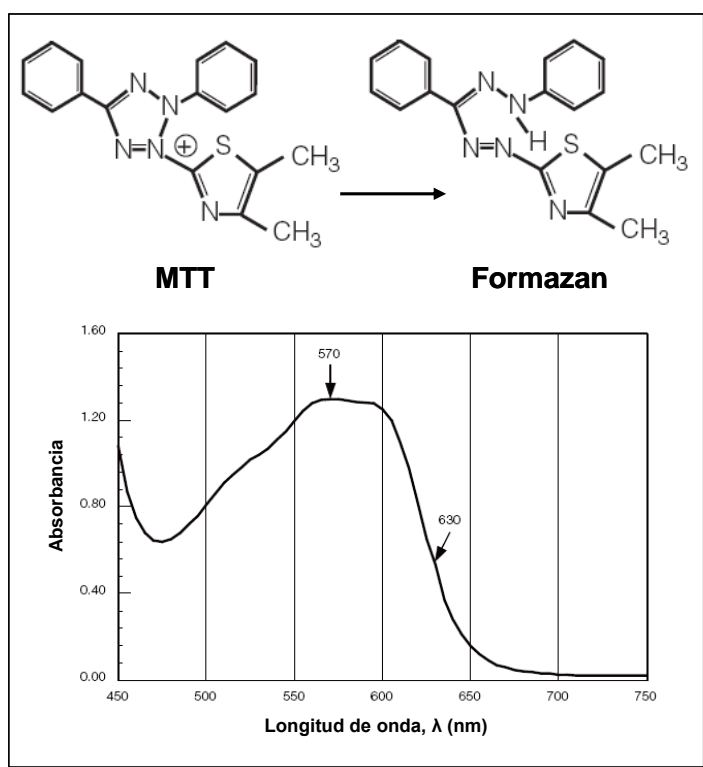
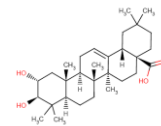
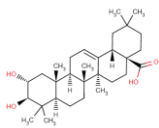


Figura 5.2 Transformación del MTT a formazán. Espectro de absorción del formazán en disolución con DMSO, en la cual presenta un máximo de absorbancia a 570 nm.

Finalmente, se obtuvieron las correspondientes curvas de citotoxicidad mediante el ensayo de viabilidad con metil-tiazol-difenil tetrazolium (MTT), método derivado del ensayo colorimétrico descrito por **Mosmann, 1983**. El MTT es una sal de tetrazolium blanco amarillenta que es transformada en las mitocondrias de las células con capacidad metabólica a formazán (**figura 5.2**), compuesto azul oscuro con un máximo de absorbancia a 570 nm. Esta reacción tiene lugar cuando el MTT acepta electrones de un agente reductor o de determinadas coenzimas (tales como el NADH y el NADPH), pudiendo ser cuantificado por colorimetría (**figura 5.2**) (**Mosmann, 1983; Pauwels y col., 1988**).

El procedimiento seguido, para la determinación de las curvas de citotoxicidad, fue el siguiente: Tras 24h de la siembra, se les retiró el medio añadiendo medio fresco, en el que se incubaron las células con las siguientes concentraciones de ácido maslínico: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80, 90, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células fueron incubadas con las distintas concentraciones de ácido maslínico durante 72h. A continuación se les retiró el medio de cultivo añadiendo medio fresco con un 50% PBS y MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL, incubándose durante 1h en condiciones de esterilidad en un incubador humidificado y bajo una atmósfera del 5% en CO_2 , por último, se retiró el medio y se solubilizó el formazán incorporado por las células en 100 μL de DMSO. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas tipo ELISA. (Merck ELISA System MIOS versión 3.2.)



Dicho ensayo se repitió hasta un total de ocho veces. Los resultados se muestran como porcentaje de células vivas respecto al control. Estos valores fueron determinados como porcentaje de absorbancia respecto al valor de absorbancia control para cada concentración de compuesto en cada una de las líneas celulares, ya que los valores de absorbancia se encuentran en proporción directa con el número de células viables. Para todas las concentraciones se realizaron seis réplicas por placa.

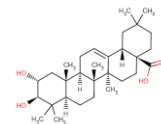
5.4 Citometría de flujo

La citometría de flujo es uno de los métodos más específicos en el estudio integrado de los eventos morfológicos y moleculares ocurridos durante la muerte y proliferación celular. En teoría estos métodos muestran de forma simultánea información sobre la morfología, fenotipo, estatus de la cromatina y del DNA e incluso la expresión intracelular de proteínas, habiendo sido marcadas previamente con un fluoróforo, lo que hace posible determinar el mecanismo de muerte celular y la posición del ciclo celular en las que las células se encuentran. Todo ello hace posible determinar la aparición de distintas poblaciones celulares, ya que la presencia de aneuploidía es frecuente en células cancerígenas.

Mediante citometría se pueden resolver minúsculas diferencias en el tamaño celular, así como la detección de células apoptóticas basada en la aparición de hipodiploidía, que se traduce en la aparición de irregularidades en el número de eventos que se encuentran en fases sub G_0/G_1 del ciclo celular. Estas irregularidades también pueden suceder por la presencia de fragmentos nucleares, cromosomas simples, grupos de cromosomas, fragmentos celulares, contaminación bacteriana, etc.. Por este motivo, es preferible combinar simultáneamente este análisis con otros como, en nuestro caso, el marcaje con anexina V-FICT, que se une específicamente a la fosfatidilserina de la monocapa externa de la membrana plasmática.

5.4.1 Análisis del ciclo celular

En el análisis del ciclo celular, la cantidad de yoduro de propidio (IP) incorporado en cada célula es proporcional a su contenido en DNA para cada una de las diferentes fases del ciclo celular. La intensidad debida al IP incorporado puede ser cuantificada por citometría (**figura 5.3**). Sin embargo, mediante citometría de flujo no es posible diferenciar las fases G_2 y M , ya que en estas fases el contenido en DNA es el mismo. Se han desarrollado modelos



matemáticos para establecer el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M) a partir de los datos citométricos. La medida del contenido en DNA se ha utilizado también para determinar el grado de haploidía de las células malignas, así como su grado de proliferación según el porcentaje de células que se encuentran en fase S.

En una población de células normales, el porcentaje de células en fase G_0/G_1 se encuentra cercano al 90%. En el estadio G_0/G_1 del ciclo celular la carga cromosómica está formada por el número de cromosomas propio de la especie a la que la población celular pertenece, en el resto de fases se está adquiriendo material cromosómico o se ha alcanzado la cantidad doble para entrar en mitosis, estas son las fases S y G_2/M . Por lo que un histograma representativo de una población normal posee un pico alto a un valor de $2c$ correspondiente a G_0/G_1 , una fase de meseta correspondiente a la fase S, en la que se encuentran sintetizando DNA y un tercer pico G_2/M en el que las células se encuentran en el estadio próximo a la mitosis. Además de la determinación cuantitativa del contenido en DNA, el citómetro de flujo proporciona otras informaciones cualitativas obtenidas por los valores y ángulos de dispersión de la luz desviada por cada célula al pasar por el haz lumínico de rayos láser. Estos son los parámetros FS (*forward scatter*) y SS (*side scatter*) (**figura 5.3**).

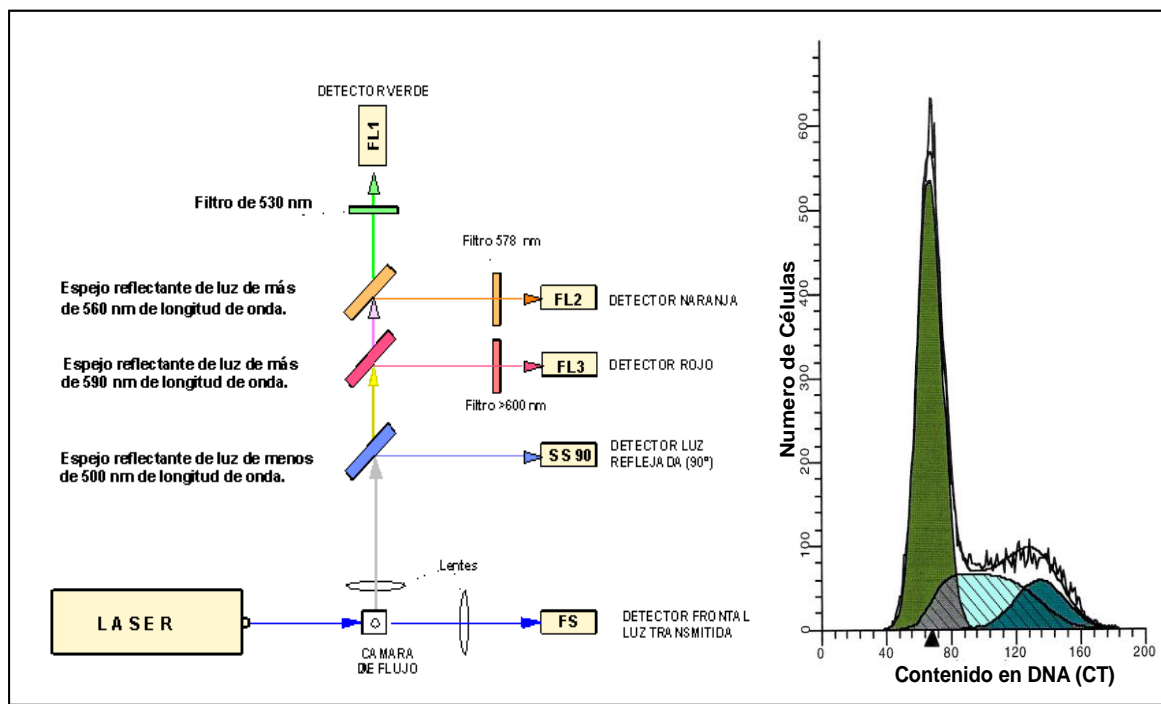
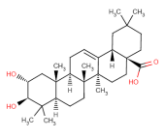


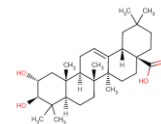
Figura 5.3 (Derecha) Esquema de detección de las distintas intensidades de fluorescencia por un citómetro tipo FACS, en el que pueden detectarse hasta 5 señales diferentes provenientes de la misma partícula (FS, SS, FL1, FL2, FL3). (Izquierda) Histograma del ciclo celular de una población normal de células.



El parámetro FS (*forward scatter*), que determina la dispersión frontal, es proporcional al tamaño relativo de la célula, así como a la forma o heterogeneidad celular. Se detecta a lo largo del eje del rayo incidente en dirección delantera a ángulos de desviación bajos, que oscilan entre 1° y 10° . El parámetro SS (*side scatter*), que determina la dispersión lateral, es proporcional a la granulosidad de la célula o complejidad interna, siendo detectado a un ángulo de 90° del eje del haz de luz incidente.

El ciclo celular fue analizado por citometría de flujo, utilizando un contador activado por fluorescencia (FACS, *fluorescence activated cell sorter*). Mediante este análisis podemos determinar el número de células en cada uno de los tres estados del ciclo celular: G_0/G_1 , S y G_2/M (Lodish y col., 1995). El ensayo fue llevado a cabo tras 72h de tratamiento con ácido maslínico a la dosis de IC_{50} y a la dosis superior IC_{80} (concentración en el se inhibe el crecimiento celular en un 80%). Este ensayo fue realizado en las cuatro líneas celulares descritas, HT29, Caco-2, IEC-6 e IEC-18. Todas las líneas celulares fueron cultivadas con 2 mL de medio (DMEM, 10% FBS, 0.1% S/P) en placas de 6 pocillos de fondo plano, con $9.03 \text{ cm}^2/\text{pozo}$. Se determinó el número de células a sembrar por la relación entre el número de células y el área encontrada en el *screening*, realizado previamente en las placas de 96 pocillos. Según esta relación, el número de células por unidad de área debe ser: $19 \cdot 10^3$ células/ cm^2 HT29, $48 \cdot 10^3$ células/ cm^2 Caco-2, $16 \cdot 10^3$ células/ cm^2 IEC-6 y $4 \cdot 10^3$ células/ cm^2 IEC-18. Por tanto, el número de células sembradas en cada caso fueron: $175 \cdot 10^3$ células HT29/pozo, $4 \cdot 10^5$ células Caco-2/pozo, $150 \cdot 10^3$ células IEC-6/pozo y $50 \cdot 10^3$ células IEC-18/pozo. Tras 24h de la siembra, se les cambió el medio, añadiendo medio fresco con ácido maslínico, siendo incubadas durante 72h. Las dosis utilizadas fueron los respectivos valores de IC_{50} e IC_{80} para las líneas tumorales HT29 y Caco-2. Las líneas IEC-6 e IEC-18 fueron incubadas a las concentraciones correspondientes a la IC_{50} e IC_{80} determinadas en células HT29 tras 72h de incubación. Por último, las células HT29 fueron incubadas durante 96h a sus concentraciones de IC_{50} e IC_{80} , para la posible observación de picos $\text{sub}G_0/G_1$.

Tras la incubación, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas siendo recogidas por centrifugación a 500 g. El pellet fue resuspendido en 500 μL de TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM), seguidamente se añadió 25 μL de solución de yoduro de propídio a 1 mg/mL (IP) y se les adicionó 500 μL de solución de Vindelov/ IP (Tris 10 mM, NaCl 10 mM, RNasa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Igepal 0.01%), siendo la concentración final de IP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tras incubar las muestras durante 1 h a 4°C , se analizaron por citometría de flujo a 488 nm. El análisis FACS fue realizado en un citómetro de flujo *Epics XL* (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). El



porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculado utilizando el programa *Multicycle* (Phoenix Flow System, San Diego, CA, USA). El ensayo fue realizado cinco veces con dos réplicas por experimento.

5.4.2 Análisis de apoptosis

Durante el proceso de apoptosis se producen una serie de cambios morfológicos que pueden ser detectados mediante citometría de flujo: Disminución del volumen celular como consecuencia de la pérdida de agua; plegamiento de la membrana plasmática ‘blebbing’ o zeiosis, colapso del núcleo en una esfera densa, picnosis; fragmentación del núcleo, y por último fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos rodeados de membrana plasmática. Los cuerpos apoptóticos mantienen el gradiente osmótico y no vierten el contenido celular al medio, por tanto no provocan inflamación.

Aparte de los procesos anteriormente mencionados, durante el proceso de apoptosis ocurren cambios específicos en la superficie de la célula apoptótica como por ejemplo la exposición de proteínas con carbohidratos que mantienen el ácido siálico terminal (proteínas inmaduras), así como la alteración en la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática. La fosfatidilserina es expuesta en esta fase de la apoptosis en una proporción mayor a lo habitual en la monocapa externa de la membrana plasmática de la célula apoptótica. La interacción de la fosfatidilserina en la superficie de estas células con los receptores de fosfatidilserina que se encuentran en los macrófagos, indican a estos últimos el inicio de la fagocitosis de la célula apoptótica.

Esta exposición de fosfatidil-serina es utilizada para la cuantificación, por citometría de flujo, del número de células apoptóticas, así como del grado de apoptosis que estas presentan (**figura 5.4**). La fosfatidilserina interacciona de forma específica con la anexina, pudiendo cuantificarse el grado de apoptosis determinando la extensión del marcaje con anexina, para ello se utilizó anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína, FITC (*fluorescein isothiocyanate*). La apoptosis se detectó por citometría de flujo (FACS) mediante el ensayo de unión específica de la anexina V-FICT a la fosfatidilserina (Anexina V-FITC kit; Bender MedSystems, Vienna, Austria), combinado junto con el marcaje con IP. Utilizando este método puede distinguirse entre células con apoptosis temprana (anexina V positivas, IP negativas), apoptosis tardía (anexina V positivas, IP positivas) y necrosis (anexina V negativas, IP positivas) (**figura 5.4**), (**Fadok y col., 1992**).

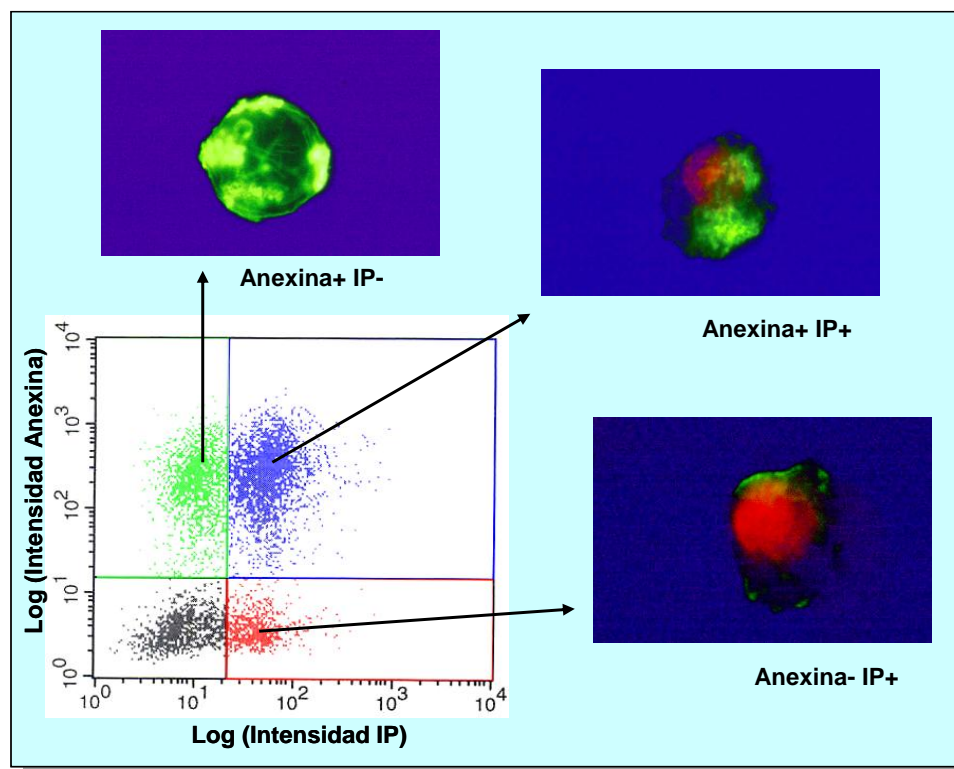
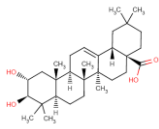
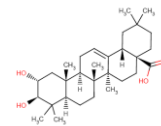


Figura 5.4 Diagrama en el que se observa los datos de apoptosis obtenidos por citometría de flujo, mediante el marcaje con anexina V-FITC/ ioduro de propidio (IP). Los puntos en verde se corresponden con células en apoptosis temprana (anexina+, IP-); los puntos en azul se corresponden con células en apoptosis tardía (anexina+, IP+); y los puntos en rojo se corresponden con células necróticas o con fragmentos de DNA libres.

Al igual que en el análisis del ciclo celular se sembraron $175 \cdot 10^3$ células HT29/pozo, $4 \cdot 10^5$ células Caco-2/pozo, $150 \cdot 10^3$ células IEC-6/pozo y $50 \cdot 10^3$ células IEC-18/pozo, en placas de 6 pocillos. Tras 24h de la siembra se adicionó el ácido maslínico, siendo incubadas durante 72h. Como en el análisis del ciclo celular las dosis utilizadas fueron los respectivos valores de IC_{50} e IC_{80} para las líneas tumorales. Las líneas IEC-6 e IEC-18 fueron incubadas con las concentraciones correspondientes a IC_{50} e IC_{80} determinadas para las células HT29 a 72h de incubación con ácido maslínico. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en 2 mL de medio (DMEM, 10% FBS, 0.1% S/P). Tras la incubación las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas siendo recogidas por centrifugación a 500 g (incluyendo las presentes en el medio de cultivo), a continuación las células fueron resuspendidas en 95 μ L de 'binding buffer 1x' (10 mM hepes/NaOH, pH 7.4; 140 mM NaCl y 2 mM $CaCl_2$), al que se le adicionó 3 μ L de anexina V-FITC, tras incubar 30 minutos, se le adicionó 0.8 mL de 'binding buffer' y un minuto antes de la lectura 20 μ L de ioduro de propidio (1 mg/mL). El análisis FACS fue realizado a 488 nm en un citómetro de flujo Epics XL. Todos los experimentos fueron realizados al menos cinco veces en células HT-29 y Caco-2 y al menos tres veces en células IEC-6 e IEC-18, con dos réplicas por experimento.



5.5 Microscopía de fluorescencia

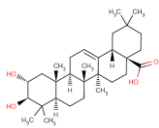
Durante el proceso de apoptosis tienen lugar una serie de cambios morfológicos que son englobados en las etapas finales de los procesos de apoptosis. Estos cambios incluyen la disminución del volumen celular como consecuencia de la pérdida de agua, agrupación de los orgánulos y de la cromatina nuclear, así como el plegamiento de la membrana plasmática que pasa a tener un aspecto vesiculado, fenómeno denominado *blebbing*. Por último, el núcleo se colapsa en una esfera densa (picnosis) que es fragmentada. A continuación, la célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos, rodeados de membrana plasmática. La mayoría de estos cambios pueden ser visualizados mediante el uso de técnicas de microscopía.

5.5.1. Tinción con anexina V-FICT / yoduro de propidio

La microscopía de fluorescencia permite visualizar como tienen lugar los cambios morfológicos a nivel de membrana y del núcleo celular durante el proceso de apoptosis. Se realizó un análisis de este proceso mediante la tinción con yoduro de propidio (IP) y anexina V-FICT. Tras incubar con anexina una alícuota de unas 2.500 células HT29, siendo fijadas con paraformaldéhidro al 4% en PBS durante unos 15 minutos. El DNA fue teñido con IP durante 3 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las células fueron contabilizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Este ensayo fue realizado dos veces por duplicado.

5.5.2 Tinción con Hoechst

Los cambios morfológicos a nivel nuclear pueden ser observados mediante microscopía de fluorescencia utilizando la tinción con Hoechst, este producto penetra en el interior celular tiñendo la cromatina nuclear permitiendo su observación. Poniendo de manifiesto fenómenos tales como la condensación de la cromatina o picnosis, fragmentación del núcleo, así como la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos, dando una imagen de los procesos nucleares que están teniendo lugar. Los cambios morfológicos ocurridos durante la apoptosis fueron analizados mediante microscopía de fluorescencia utilizando la tinción con Hoechst en las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2. Para este ensayo se sembraron $175 \cdot 10^3$ células HT29/pozo y $4 \cdot 10^5$ células Caco-2/pozo, en placas de 6 pocillos. Ambas líneas celulares



fueron cultivadas con 2 mL de medio (DMEM, 10% FBS, 0.1% S/P). Después de 24h se les cambió el medio, adicionando medio con ácido maslínico, a la concentración de IC₈₀ obtenida para ambas líneas celulares a 72 h (HT29 IC₈₀ = 28 µg/mL, y en Caco-2, IC₈₀ = 20 µg/mL). Las células fueron incubadas a estas concentraciones durante 24h, 48h y 72h, con objeto de visualizar la evolución de la apoptosis inducida por el ácido maslínico.

Se recogieron las células a diferentes tiempos mediante tripsinización, tras lavarlas con PBS fueron resuspendidas en 500 µL de MeOH frío al 100% e incubadas durante 3' a -20°C, se lavaron de nuevo con PBS, tras lo que se resuspendieron en 500 µL de solución de Hoechst a 50 ng/mL en PBS, siendo incubadas en esta solución durante 15' en oscuridad. Tras ser lavadas de nuevo, fueron resuspendidas en 10 µL de PBS. A continuación se dispuso todo el volumen sobre un porta dejándolo secar, tras lo que se añadió medio de montaje (Fluoprep, Biomeriex), se cubrió la muestra con un cubre y se selló utilizando parafina. Por último, las muestras fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con aceite de inmersión y filtro DAPI.

5.5.3 Electroforesis en microgel. 'Comet assay'

Para determinar si el ácido maslínico debe su acción a la aparición de genotoxicidad se realizó una electroforesis en microgel, también denominada 'ensayo cometa'. Este ensayo consiste en una electroforesis en gel de agarosa del DNA de cada una de las células presentes en la muestra (**figura 5.5**). Si la célula mantiene funcional su maquinaria de reparación de DNA, ésta quedaría reflejada en un análisis en función del tiempo.

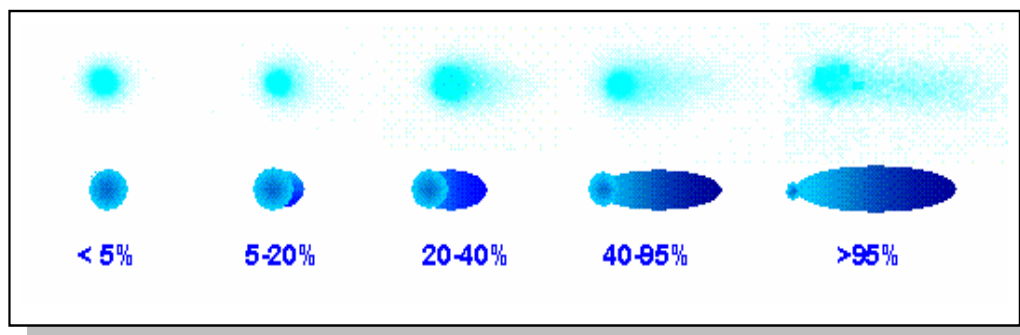
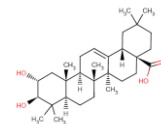


Figura 5.5 Distintos tipos de cometa en función del tamaño de sus colas o "tail moment". El tamaño de la cola está directamente relacionado con el porcentaje de cromatina que se encuentra en un estado laxo y por tanto con la extensión del daño genotóxico sufrido.



Se ha adaptado el ensayo de electroforesis por célula individual, descrito por **Singh y col., 1988**, como método para determinar la integridad del DNA. Esta técnica conocida comúnmente como ensayo del cometa, es una forma rápida y sensible de medir la integridad de las hebras cromosómicas a nivel de células individuales. Las células fueron resuspendidas en 160 μL de agarosa de bajo punto de fusión disuelta en PBS a 37°C, a continuación se colocó la muestra sobre un portaobjetos, tratado anteriormente con agarosa de bajo punto de fusión al 1% en PBS.

Se dejó solidificar la agarosa en una delgada capa, formada entre porta-objetos y cubre-objetos, durante 10 minutos a 4°C. Tras retirar el cubre-objetos se sumergieron los portaobjetos en solución de lisis (1% Triton X-100, 2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM de Tris y 1% de laureil sulfato, pH 10.0) a 4°C durante 1h. Tras la lisis, se sometieron las muestras a electroforesis en condiciones alcalinas a 25 v y 4°C durante 30 min (tampón de electroforesis: 0.3 M NaOH y 1 mM EDTA). El DNA es atraído por el ánodo, pero sólo los segmentos laxos pueden migrar libremente, extendiéndose desde el núcleo (**figura 5.5**). Tras lavar los portaobjetos con tampón de neutralización (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), fueron incubados durante 15 minutos con DAPI (Molecular Probes). A continuación, los portaobjetos fueron observados utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon E600, Nikon Instruments Europe B.V., The Netherlands). La cuantificación fue realizada tomando 100 imágenes al azar de los geles, cuantificándose el tamaño de la colas (*tail moment*) utilizando software de adquisición y análisis de imágenes (Nis-Elements, Nikon imaging software, Nikon Instruments Europe B.V., The Netherlands).

5.6 Electroforesis de DNA

En las fases finales del proceso de apoptosis el DNA es fragmentado por las enzimas efectoras. Los fragmentos de DNA siguen un patrón característico debido a que la fragmentación tiene lugar a nivel de los nucleosomas que se localizan de forma equidistante unos de otros a lo largo de las hebras genómicas (**figura 5.6**). Los nucleosomas están formados por la asociación de DNA e histonas, esta fragmentación es llevada a cabo por endonucleasas como son la calpaína (CAD) endonucleasa Ca^{2+} dependiente y la endonucleasa G. Este patrón característico de apoptosis se muestra al correr las muestras en un gel de agarosa, dando lugar al denominado patrón en 'escalera'.

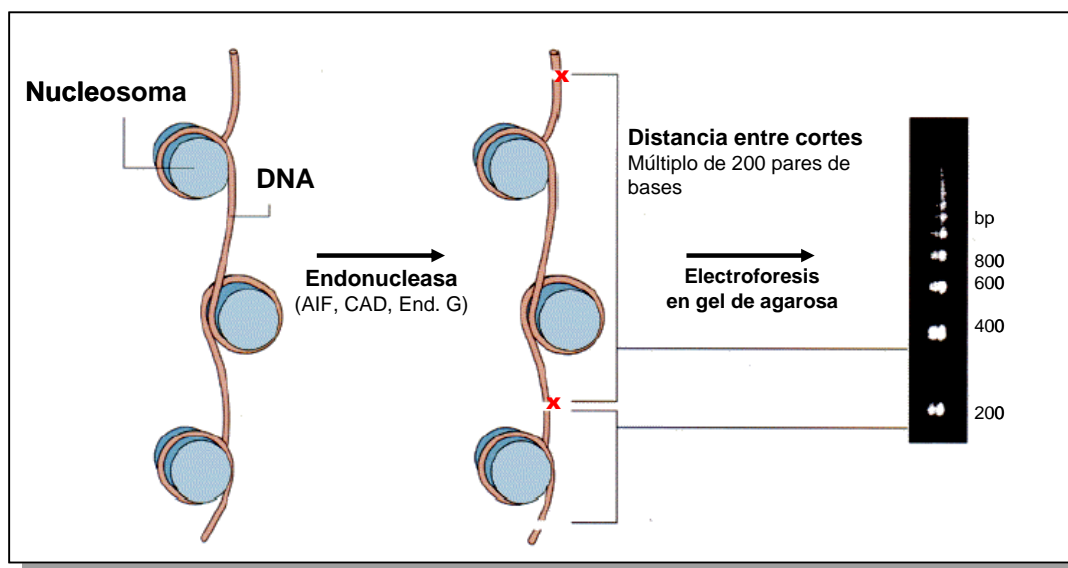
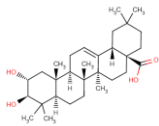
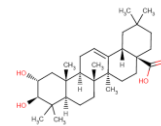


Figura 5.6 Fragmentación del DNA a nivel de los nucleosomas dando lugar, tras la realización de la electroforesis en gel de agarosa, a la aparición del patrón típico en escalera propio del DNA apoptótico.

En dicho patrón aparecen bandas separadas de forma equidistante, de 180 a 200 pares de bases o múltiplos de hasta cinco a seis veces de dicho número (**figura 5.6**), lo que hace imposible la transcripción de forma irreversible. Se sembraron un total de $2.7 \cdot 10^6$ de células Caco-2 por placa y $1.2 \cdot 10^6$ de células HT29 por placa, sobre placas de 9.6 cm de diámetro y 60.1 cm^2 de superficie, con un volumen total de medio de 10 mL. Se dejaron crecer los cultivos celulares durante 24h tras las que se les cambió el medio añadiendo medio nuevo con las diferentes concentraciones de ácido maslínico, siendo las concentraciones de ácido maslínico utilizadas para cada tipo celular: $IC_{50,HT29} = 28 \text{ } \mu\text{g/mL}$; $IC_{80,HT29} = 36 \text{ } \mu\text{g/mL}$; $IC_{50,Caco-2} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e $IC_{80,Caco-2} = 55 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Tras 72 h de incubación con el producto, las células fueron recogidas por ‘scraping’ en 5mL de PBS, tras lavar las células de nuevo con PBS se procedió a la extracción del DNA utilizando el kit de extracción de DNA (Realpure Durviz, Valencia, España)

Se les añadió a las células 900 μL de solución de lisis (Tris, EDTA y SDS dodecil sulfato sódico), siendo incubadas durante una hora a 55°C con $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$ de proteinasa K. A continuación se les añadió 3 μL de RNasa A (1 mg/mL), siendo incubadas durante una hora a 37°C , tras lo que se eliminaron las proteínas añadiendo 400 μL de solución de eliminación (acetato amónico), la mezcla se centrifugó a $14 \cdot 10^3 \text{ g}$ durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante añadiéndole 600 μL de isopropanol y se centrifugó a 14.000 g durante 3 minutos.



Se recogió el precipitado de DNA, lavándose con 600 μL de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 14.000 g durante 2 minutos. Los precipitados de DNA se rehidrataron en 100 μL de tampón de hidratación (Tris 20 mM, EDTA 1 mM). La concentración y la pureza del DNA fueron determinadas por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Tras el aislamiento del DNA para cada una de las condiciones (control, IC₅₀ e IC₈₀), se realizó la separación electroforética en un gel de agarosa al 1.5%, el cual contenía 3 μL de yoduro de propidio (1 mg/mL), siendo las condiciones de electroforesis 80 voltios durante 45 minutos y el tampón de electroforesis TBE (0.45 M Tris, 0.45 M ácido bórico y 0.5 M de EDTA, pH 8), adicionando a las muestras tampón de carga *blue/orange loading dye* (Promega, Madison, WI, (USA)). El DNA fue visualizado y fotografiado bajo luz ultravioleta (Vilber Lourmat).

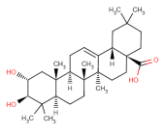
5.7 Preparación de extractos

5.7.1 Preparación de extractos genéricos

Se recogieron las células por tripsinización o por 'scraping' en 5 mL de PBS, siendo lavadas de nuevo en PBS. A continuación, fueron centrifugadas a 1.500 rpm, durante 5 minutos. Seguidamente se les añadió 0.5 mL de tampón de lisis compuesto por 20 mM de Tris/HCl pH=7.5, 1 mM de ditioneitol (DTT), 1 mM de EDTA, 0.2 g/L Triton X-100, 0.2 g/L deoxicolato sódico y 0.2 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*). Se resuspendieron las muestras en tampón de lisis, siendo sonicadas durante 5 minutos en baño de hielo utilizando un sonicador Brason (momento en el que los extractos pueden ser guardados a -20°C, hasta una semana). Por último, se centrifugaron los extractos a 4°C durante una hora a 35.000 rpm. Finalmente, se descartó el precipitado, utilizando el sobrenadante para la realización de *western* y la determinación de las diferentes actividades enzimáticas, etc.

5.7.2 Preparación de extractos para *western* de caspasas y proteínas apoptóticas

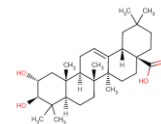
Para definir como ocurre la activación del proceso de apoptosis sobre las líneas tumorales HT29 y Caco-2, se determinaron los niveles de expresión de distintas proteínas claves implicadas en los diferentes procesos de apoptosis revisados en el capítulo 3, a diferentes tiempos de incubación. Las proteínas ensayadas fueron:



- Caspasas iniciadoras: caspasa-8 y caspasa-9; caspasas efectoras: caspasa-3 y caspasa-7.
- Proteínas de la familia Bcl-2: Bcl-2, proteína antiapoptótica; Bax, proteína proapoptótica con 3 dominios BH; y Bid, proteína proapoptótica con un solo dominio BH3.
- Factores mitocondriales: citocromo-c.
- Factores de transcripción: p53.
- Proteínas quinasas: como la activación de la quinasa JNK, cuya actividad esta implicada en determinados procesos de inducción de apoptosis.

Sobre las líneas tumorales HT29 y Caco-2 se realizó, mediante análisis de *western-blot*, un seguimiento en la activación de estas proteínas a diferentes tiempos 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Las dosis de ácido maslínico utilizadas en las líneas HT29 y Caco-2 correspondieron a sus respectivas concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ halladas a 72h de incubación. Para comprobar que el proceso de apoptosis no ocurría de igual forma en las líneas normales IEC-6 e IEC-18, se determinó la activación de caspasa-3 a 6h, 12h, 48h y 72h, sobre estas líneas celulares. Las dosis de ácido maslínico utilizadas en este caso fueron las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ halladas en HT29 a 72h de tratamiento.

Se sembraron $1.2 \cdot 10^6$ células HT29, $2.7 \cdot 10^6$ células Caco-2, $1.0 \cdot 10^6$ células IEC-6 y $3.0 \cdot 10^6$ células IEC-18 en placas de 60.1 cm² de área. Tras 24h de la siembra, se retiró el medio de cultivo, añadiendo medio fresco con las diferentes concentraciones de ácido maslínico descritas en el párrafo anterior. Tras incubar durante los tiempos descritos, se procedió a la realización de los extractos celulares y *western* en un tiempo menor a 24h, evitando la posible degradación de caspasas y otras proteínas de bajo peso molecular. Células Jurkat tratadas durante 3h con estaurosporina a 0.5 μM fueron utilizadas como control positivo de los *western*. La estaurosporina provoca sobre las células Jurkat la activación de forma inmediata de toda la cascada apoptótica. Después del tratamiento en condiciones de esterilidad en un incubador humidificado a 37°C con un 5% de CO₂, se recogió el medio de cultivo en tubos de 15 mL. Posteriormente, las células fueron despegadas por 'scraping' en 5 mL de PBS, el cual fue reunido junto con el medio de cultivo inicial, siendo centrifugados a 600 g durante 5', para obtener el pellet de células totales. Siguiendo este procedimiento quedarán en el precipitado tanto las células adheridas como las que se encuentran en suspensión. A continuación, el precipitado de células se lavó dos veces con 1 mL de PBS (o el volumen necesario en función del volumen de precipitado).



Los extractos fueron centrifugados de nuevo a 600 g durante 5', siendo resuspendidos en un volumen de tampón de extracción próximo al 100%-150% del tamaño del pellet. El tampón de extracción estuvo compuesto por 20 mM Tris / Acetato pH=7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.27 M Sucrosa, 1% Triton X-100, 10 mM de orto-vanadato sódico, 10 mM glicerofosfato sódico, 50 mM NaF, 5 mM pirofosfato sódico, 1% β -mercaptoetanol, 1 mM benzamidina, 35 μ g/mL PMSF (fenil-metil-sulfonil fluorato), 5 μ g/mL leupeptina.

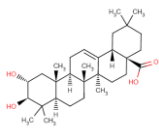
A continuación cada muestra fue sonicada directamente en el sonicador de tungsteno durante 5 segundos en hielo, limpiando el sonicador con agua destilada entre muestra y muestra. Una vez sonicados los extractos fueron incubados a 4°C durante 30 minutos, como mínimo, en el tampón de extracción. Por último, se centrifugaron a 13.200 rpm durante 12 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante para la realización de los westerns desechando el precipitado. Estos extractos pueden ser almacenados a -80°C para su posterior análisis, aunque no es recomendable en el caso de proteínas de bajo peso molecular como ocurre con las caspasas.

5.7.3 Preparación de extractos citosólicos para la detección de citocromo-c

Este ensayo fue llevado a cabo sobre la línea de cáncer de colon HT29, para lo cual se sembraron $1.2 \cdot 10^6$ células HT29 en placas de 9.5 cm de diámetro. Tras 24h de la siembra, se añadió medio fresco adicionado con ácido maslínico a las concentraciones correspondientes a IC₅₀ e IC₈₀ encontradas para este tipo celular a las 72h de tratamiento. Las células fueron incubadas durante 24h, 48h y 72h, tras lo que se procedió a la realización de los distintos extractos citosólicos.

Tras retirar el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS frío y resuspendidas a 4°C en tampón de lisis, compuesto por 20 mM HEPES-KOH pH = 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrosa, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1 μ g/mL de pepstatina A, 2 μ g/mL de leupeptina y 10 μ g/mL de aprotinina.

Tras ser incubadas durante 30 minutos a 4°C en tampón de lisis, se homogenizaron las células en un homogenizador de vidrio (Sigma, St Louis, MO, USA), con 15 golpes de émbolo. A continuación, los homogenizados fueron centrifugados a 25.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron centrifugados de nuevo a 25.000 g durante otros 30 minutos a 4°C. Los extractos fueron almacenados a -80° para su posterior análisis.



5.8 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) para placas ELISA de 96 pocillos. En primer lugar, se preparó una curva estándar con BSA (Bovine Serum Albumin) a distintas concentraciones que oscilaban de 0 a 2 mg/mL. A continuación, se diluyeron las muestras en agua destilada de forma que la concentración de las mismas estuviese próxima al rango de la recta patrón. Por último, se les añadió la mezcla del reactivo A: 1% de bizinconinato sódico (BCA- Na_2), 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.16% tartrato sódico, 0.4% NaOH, 0.95% NaHCO_3 , pH = 11.25, y del reactivo B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en una proporción 50:1. Las placas fueron incubadas en agitación constante a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se leyó la absorbancia a 562 nm en un lector de placas ELISA (Merck ELISA System MIOS versión 3.2.)

5.9 Actividad enzimática caspasa 3

La caspasa-3, que junto con la caspasa-6 y -7 forman parte de las denominadas caspasas efectoras, es activada en las últimas fases del proceso apoptótico y desencadena todos los fenómenos anteriormente descritos, tales como la translocación de fosfatidilserina dentro de la membrana citoplasmática, la ruptura apoptótica del DNA, etc..

En orden a determinar la actividad de esta enzima, se utilizó un ensayo colorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato peptídico sintético N-Acetil-Aspartil-Glutamil-Valil-Aspartil-para-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) (**figura 5.7**) que es hidrolizado por la caspasa-3, resultando la liberación de la para-nitroanilida (pNA). Este último compuesto presenta un máximo de absorbancia a 405 nm.

Para este ensayo, se sembraron $2.7 \cdot 10^6$ células Caco-2 y de $1.2 \cdot 10^6$ células HT29 en placas de 60.1 cm^2 de superficie. Las células fueron tratadas con ácido maslínico a sus respectivas concentraciones de IC_{50} e IC_{80} durante un periodo de 72h de tratamiento. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino. Se preparó un extracto citosólico por incubación durante 20 minutos en hielo con tampón de lisis formado por 50 mM de HEPES, pH = 7.4, 5 mM de CHAPS, 5 mM de DTT, y posterior centrifugación a 18.000 g durante 15 minutos a 4°C. Los lisados celulares fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para su posterior análisis.

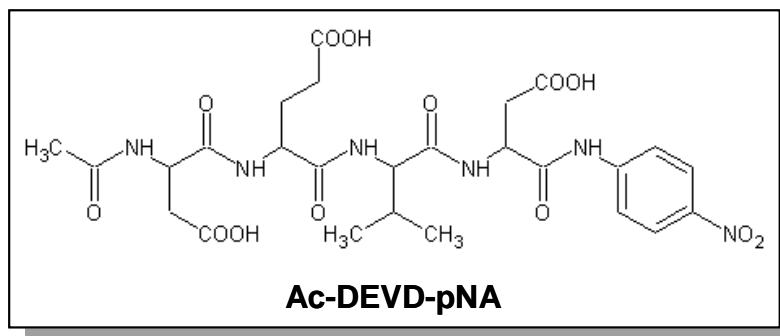
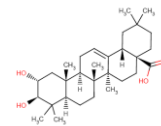


Figura 5.7 Substrato peptídico con la secuencia diana (DEVD) típica de unión a caspasas, tras la hidrólisis de este substrato se libera p-nitroanilina que presenta un máximo de absorbancia a 405 nm, siendo utilizada para el seguimiento de la reacción.

El ensayo de caspasa-3 se realizó en placas de 96 pocillos, los lisados celulares fueron diluidos en tampón de reacción (20 mM de HEPES, pH 7.4, 0.1% de CHAPS, 5 mM de DTT y 2 mM de EDTA) hasta un volumen final de 100 μ L. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 37°C, en presencia de 0.2 mM del substrato para la caspasa-3 (Ac-DEVD-pNA). Tras esta incubación, se determinó la concentración de para-nitroanilina, midiendo la absorbancia de las muestras a 405 nm, para lo cual se utilizó un lector de placas tipo ELISA (Merck ELISA System MIOS versión 3.2.). Este ensayo fue realizado un total de cuatro veces, siendo cada una de las muestras analizada por duplicado.

5.10 Actividad enzimática fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra habitualmente de forma constitutiva en las células epiteliales de colon. Cuando estas células se diferencian por procesos tumorgénicos, pierden gran parte de sus funciones, dejando de expresar esta actividad. Si las células tumorales provenientes de estos tejidos consiguen diferenciarse de nuevo, vuelven a mostrar la actividad fosfatasa, siendo, por tanto, un indicador de diferenciación en estas células.

En nuestro caso, pretendemos observar si el ácido maslínico es capaz de desencadenar estos efectos diferenciadores sobre las líneas tumorales de colon HT29 y Caco-2. Para ello, se midió la actividad fosfatasa alcalina basándose en la formación de para-nitrofenol a partir de hidrólisis del sustrato sintético para-nitrofenol fosfato catalizada por esta enzima (**figura 5.8**). El para-nitrofenol presenta un máximo de absorbancia a 405 nm. Para este ensayo se cultivaron las células en las mismas condiciones que en los ensayos anteriores, $2.7 \cdot 10^6$ células Caco-2 y $1.2 \cdot 10^6$ células HT29.

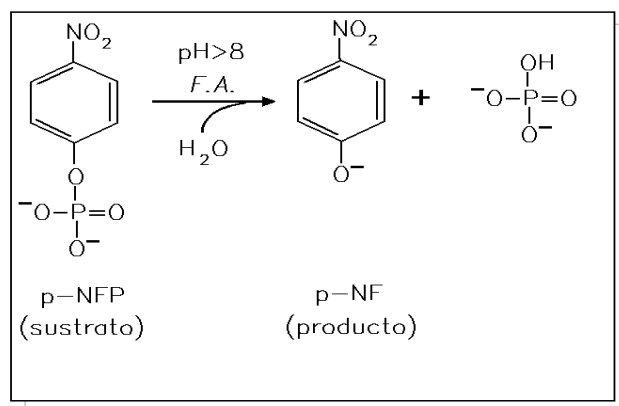
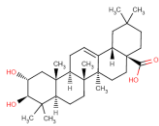


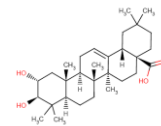
Figura 5.8 Reacción de hidrólisis del paranitrofenol fosfato catalizada por la fosfatasa alcalina, dando lugar a fosfato y paranitrofenol, el cual presenta un máximo de absorbancia a 405 nm, lo que permite el seguimiento de la reacción.

Las células fueron sembradas en placas de 60.1 cm² de superficie, siendo tratadas con ácido maslínico durante 72h a las siguientes concentraciones: para las células HT29, IC_{50/2} = 14 µg/mL e IC₅₀ = 28 µg/mL, y para las células Caco-2, IC_{50/2} = 20 µg/mL e IC₅₀ = 40 µg/mL. Tras recoger las células por ‘scraping’, fueron lavadas con tampón fosfato salino y a continuación fueron lisadas añadiendo 1 mL de tampón de lisis a cada muestra, que contenía 20 mM de Tris pH = 7.5, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 0.2 g/L de Triton X-100, 0.2 g/L de deoxicolato sódico y 0.2 mM de PMSF.

Las muestras fueron sonicadas durante 5 minutos y centrifugadas a 35.000 rpm durante 1h a 4°C, se tomó el sobrenadante descartando el precipitado. La medida de actividad fosfatasa se realizó tomando 200 µL de muestra, 150 µL del reactivo A, a pH=9.8, que contenía 0.102 mg/mL de MgCl₂, dietanolamina en proporción 1:10 y 30 µL del reactivo B que contenía 40 mg/mL de para-nitrofenol fosfato, sustrato de la fosfatasa. La mezcla de los reactivos A+B se realizó a 37°C, durante 1h antes de comenzar la reacción. El ensayo fue llevado a cabo un total de tres veces, siendo cada una de las muestras medida por duplicado.

5.11 Análisis de expresión de proteínas: *Western Blot*

A partir de los extractos celulares, preparados según el protocolo descrito en el apartado 5.7.2, se determinaron las concentraciones de proteínas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.8. Posteriormente, se procedió a la realización de los distintos *westerns* siguiendo paso a paso el protocolo que se describe continuación (**figura 5.9**):



Preparación de las muestras: Conocida la concentración de proteínas, se preparan las muestras para ser cargadas. En cada gel se igualó la cantidad de proteína cargada por muestra. Las muestras fueron preparadas en tampón de carga (50 mM de Tris pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10 mM DTT, 10% (v/v) glicerol y 0.2% (p/v) de azul de bromofenol). Se completó con agua miliQ para obtener el mismo volumen en todas la muestras. La cantidad de proteína cargada dependió del anticuerpo y de la muestra analizada, siendo de 25 μg o 50 μg , salvo en los controles positivos donde se cargaron 10 μg de proteína. Por último, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 100°C antes de ser cargadas en los geles.

Preparación del gel: Las proteínas fueron separadas mediante el método SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*), siendo el porcentaje de acrilamida utilizado para el gel separador del 15% y para el gel concentrador del 4%. Gel separador: 5 mL Tris / HCl 0.75 M (pH=8.8, 0.29% SDS), 5 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 14 μL TEMED, 65 μL APS (*Amonium persulfate*) 10%. Gel concentrador: 360 μL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 1,5 mL de Tris / HCl 0.25 M (pH = 6.8, 0.2% SDS), 7,5 μL TEMED, 30 μL APS, 1.2 mL de agua miliQ. Para evitar deformaciones en la polimerización del gel separador se le añade un frente de 0.5 mL de isopropanol. Tras polimerizar se retira el isopropanol y se añade el gel separador. Los geles se polimerizaron utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories, CA, (USA)).

Electroforesis: Las muestras fueron cargadas utilizando una jeringa Hamilton. Tras cargar las muestras en el gel se corrió la electroforesis, fijando la intensidad de corriente a 35mA por gel durante unos 110 minutos o hasta que el frente llegase al limite inferior del gel separador. El tampón de electroforesis utilizado fue: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS. Para conocer los pesos moleculares de las proteínas ensayadas, así como para la calibración realizada en el análisis informático de los distintos *westerns*, se utilizó un marcador de pesos moleculares comercial de amplio espectro (10 – 250 kD, RainBow, Amersham Bioescience, UK).

Transferencia: Una vez se ha completado la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, Bio-Rad Laboratories, CA, (USA)) de 5.5 x 8 cm. Para ello, en primer lugar, se hidrata la membrana de PVDF con metanol al 100%. A continuación se sumerge en tampón de transferencia junto con dos rectángulos de papel Beckman de 6 x 8.5 cm y dos esponjas planas de aproximadamente 0.75 cm de grosor. Se separa el gel concentrador del gel separador, siendo este último rehidratado en el mismo tampón de transferencia.

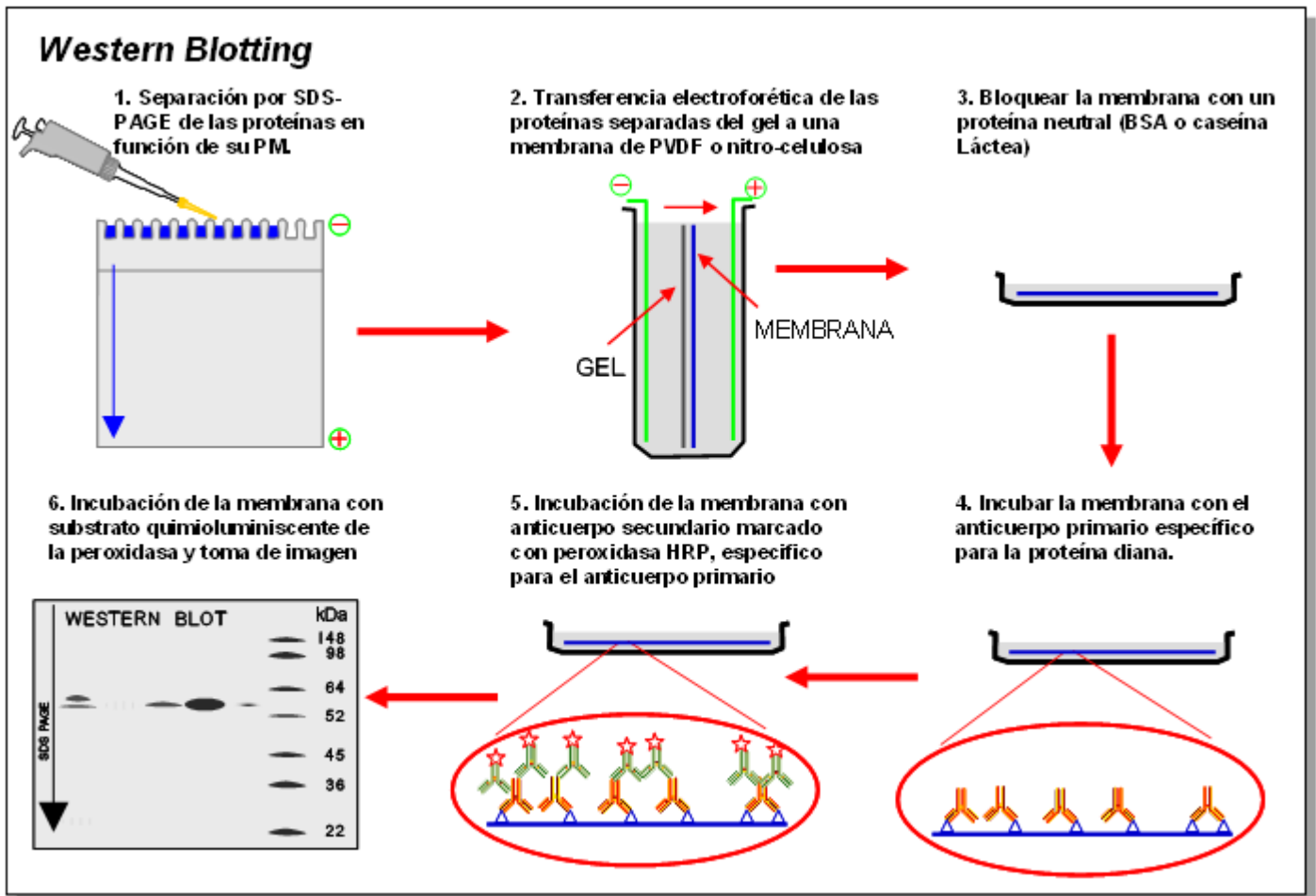
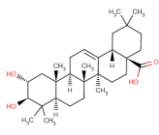
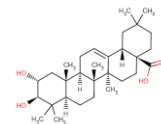


Figura 5.9 Esquema general de realización de *western blotting* en el que se hace hincapié en los pasos determinantes del proceso: transferencia, bloqueo, hibridación con los anticuerpos primario y secundario y revelado.

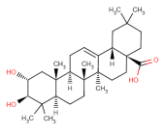
Por último, se procedió a la elaboración del 'sandwich' típico de la transferencia con el siguiente orden desde el ánodo hacia el cátodo: en primer lugar la esponja, a continuación papel Beckman, el gel y la membrana de PVDF, de nuevo papel Beckman y, por último, la segunda esponja. La transferencia húmeda fue llevada a cabo con el sistema Mini-Trans Blot Cell System (Bio-Rad) durante 2h a 60 V y a 4°C. El tampón de transferencia está compuesto por: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y un 20% de metanol.

Cuando las proteínas fueron transferidas a las membranas, se dejaron secar al aire entre dos papeles de filtro. Una vez secas, estas membranas pueden guardarse para su posterior análisis. Tras rehidratar las membranas con metanol, fueron lavadas en agua destilada. A continuación, fue examinada la eficacia de la electroforesis y transferencia tiñéndolas con rojo Ponceau (Sigma, Adrich, St. Louis, MO (USA)), tras lo cual, las membranas fueron lavadas en tampón TBS (132 mM de NaCl, 20 mM de Tris pH = 7.5).



A continuación, las membranas fueron bloqueadas durante 1h a temperatura ambiente en agitación en TBS-Tween (TBS con Tween al 0.1%), con un 5% (p/v) de BSA (*bovine serum albumine*) o con un 5% de leche en polvo dependiendo del anticuerpo utilizado. La BSA fue utilizada para la incubación con anti-caspasa-8, anti-citocromo c y anti-JNK; y la leche en polvo para la incubación con anti-caspasa-9, anti-caspasa-3, anti-caspasa-7, anti-Bid, anti-Bax, anti-Bcl-2 y anti-p53. Tras el bloqueo de las membranas, se procedió a la incubación con los distintos anticuerpos en disolución de BSA o leche en polvo, ambos en TBS-T. Para los distintos anticuerpos las diluciones, tiempos de incubación y temperaturas utilizadas fueron:

- Anti-caspasa 8: anticuerpo policlonal de BD Bioscience/ Pharminger. Dilución 1:3.000 en TBS-T al 3% (p/v) de BSA. La incubación se realizó durante 1h a temperatura ambiente. Se cargaron 25 µg de proteína total.
- Anti-caspasa 9: anticuerpo policlonal de Cell Signaling. Dilución 1:1.000 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.
- Anti-caspasa 3: anticuerpo policlonal de Cell Signaling. Dilución 1:1.000 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.
- Anti-caspasa 7: anticuerpo monoclonal de BD Bioscience/ Pharminger. Dilución 1:3.000 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.
- Anti-citocromo c: anticuerpo monoclonal de BD Bioscience/ Pharminger. Dilución 1:3.000 en TBS-T al 3% (p/v) en BSA. La incubación se realizó durante 1h a temperatura ambiente. Se cargaron 25 µg de proteína total.
- Anti-Bid: anticuerpo policlonal de BD Bioscience/ Pharminger. Dilución 1:3.000 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 25 µg de proteína total.
- Anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology): anticuerpo policlonal de conejo, contra el extremo N-terminal de Bax de origen humano. Dilución 1:200 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.



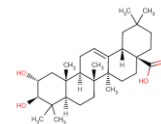
- Anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology): anticuerpo monoclonal de ratón, contra el péptido correspondiente a los residuos 41-54 de la proteína de origen humano. Dilución 1:200 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.
- Anti-p53 (Calbiochem): anticuerpo monoclonal de ratón. Dilución 1:100 en TBS-T al 5% (p/v) de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.
- Anti-fosfo-JNK (*Cell signalling*): anticuerpo monoclonal de ratón. Dilución 1:500 en TBST con 1% (p/v) de BSA y un 0,5 % de leche en polvo. La incubación se realizó durante una noche a 4°C. Se cargaron 50 µg de proteína total.

Aunque la cantidad de proteína cargada fue la misma para todas las muestras dentro de un mismo gel, pueden existir variaciones debidas al error experimental inherente en cada ensayo (errores de pipeteo, determinación de concentración, etc.). Para soslayar esta fuente de error se normalizó la señal detectada en la proteína de interés, respecto a la dada por una proteína constitutiva, cuya expresión sea invariable e independiente del tratamiento sufrido por las células de partida. Una de las proteínas más utilizadas, en esta corrección, es la α -actina. Se determinó por tanto la actina correspondiente a cada muestra, incubando las membranas con el anticuerpo policlonal anti- α -actina (Sigma, St. Louis, MO (USA)) en TBS-T al 5% (p/v) de BSA a una dilución de 1:1000 durante 1h a temperatura ambiente.

Después de la incubación con el anticuerpo primario (o con la actina), las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 5 minutos cada vez. A continuación fueron incubadas con el anticuerpo secundario adecuado, diluido en TBS-T al 2% de leche en polvo a una concentración de 1:3000 durante 1h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- Anticuerpo caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (HPR, *horseradish peroxidase*), (Amersham Biosciences AB, Uppsala, (Sweden)), para anticuerpos primarios policlonales.
- Anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con HPR (DAKO, Copnhagen, (Denmark)), para anticuerpos primarios monoclonales.

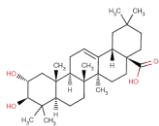
Tras marcar las proteínas con el anticuerpo secundario se realizaron nuevos lavados de 5 minutos, tres veces con TBST-T y una vez más con TBS. A continuación se procedió al revelado.



Revelado: Los *westerns* fueron revelados por quimioluminiscencia, siguiendo el método desarrollado por **Thorpe y Kricka**, 1986, utilizando el kit EZ-ECL (Biological Industries, Israel, Beit Haemek Ltd.) en presencia de peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza la oxidación de diacil-hidrazidas cíclicas, tales como el luminol. Durante la reacción de oxidación, el luminol pasa por un estado excitado (intermedio de reacción), el cual pasa a un estado estable emitiendo energía de forma lumínica. Esta emisión de luz puede ser potenciada por activadores tales como compuestos fenólicos. Mediante este método es posible detectar proteínas marcadas de forma directa o indirecta con HPR.

Una vez lavadas las membranas fueron incubadas durante 5 minutos con 2 mL de la mezcla de los reactivos A (luminol y potenciador) y B (solución de peróxido de hidrógeno). Por último, se detectó la quimioluminiscencia utilizando el sistema de captación de imágenes LAS-3000 (Fuji Photo Film (Europe), TK Tilburg, The Netherlands).

Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas utilizando el programa *Multi Gauge* (Fuji Film Europe, TK Tilburg, The Netherlands). Todos los *westerns* fueron cuantificados mediante el procedimiento '*Profile*' del programa, restando el fondo del *western*. La intensidad de cada banda fue normalizada por la intensidad de la α -actina correspondiente. El estudio de activación o inducción de las distintas proteínas en función del tiempo se realizó refiriendo las intensidades normalizadas de cada una de las muestras dentro de un mismo ensayo respecto a la intensidad normalizada de la banda control del correspondiente ensayo. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a los controles de células sin tratar.

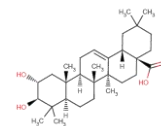


Capítulo 6

Resultados: Citotoxicidad y genotoxicidad

6.1 Citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad del ácido maslínico se examinó su efecto sobre la proliferación celular en las líneas de adenocarcinoma de colon HT29 y Caco-2, así como sobre las líneas normales de epitelio intestinal IEC-6 e IEC-18. Tras incubar durante 72h cada una de estas líneas celulares con concentraciones crecientes de ácido maslínico se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de viabilidad con MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*), compuesto que es transformado a formazán en los peroxisomas de las células con capacidad metabólica o viables. El formazán puede entonces ser disuelto con DMSO dando una disolución azul-violácea en la que presenta un máximo de absorbancia a 550 nm. La viabilidad fue determinada midiendo la absorbancia correspondiente siendo ésta proporcional al número de células viables. El ensayo se llevó a cabo tanto en las líneas cancerígenas, como en las líneas normales o no transformadas con el objeto de comprobar la posible existencia de efectos diferenciales en la toxicidad del ácido maslínico.



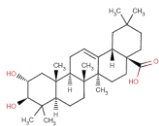
6.1.1 Líneas tumorales

Se comprobó el potencial citotóxico del ácido maslínico como anticancerígeno sobre las líneas tumorales HT29 y Caco-2. Aunque ambas líneas son provenientes de cáncer de colon, difieren en la expresión de ciertos oncogenes tales como p53. Estas líneas difieren, además, en su tasa de división, mientras que las células HT29 doblan su población en 48h, las células Caco-2 no doblan su población hasta transcurridas 62h, lo que podría estar relacionado con los valores de los resultados encontrados.

6.1.1.1 Línea tumoral HT 29

El ensayo fue puesto a punto con la línea tumoral HT29. Se probaron las siguientes concentraciones de ácido maslínico: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL. Las disoluciones fueron preparadas a partir de un stock de 10 mg/mL de ácido maslínico y 50% en DMSO, en 1 mL de PBS, éste fue diluido 10 veces en medio de cultivo teniendo una disolución final de 1 mg/mL de ácido maslínico y de un 5% en DMSO (S0). En un primer momento, se filtró la disolución de DMSO y maslínico en PBS, pero dado que se trata de una emulsión y el tamaño de poro utilizado para la esterilización era demasiado pequeño, la disolución inicial de aspecto lechoso y completamente opaca tras el filtrado aparecía transparente con un tono amarillento parecido al del DMSO puro, tras filtrar cierto volumen el filtro parecía taponarse, por lo que se decidió no filtrar la disolución inicial ya que el DMSO puro es suficientemente tóxico como para permitir la esterilización de la droga.

A concentraciones elevadas de ácido maslínico, del orden de 0.25, 0.5 y 1 mg/mL, pudo observarse la precipitación del mismo. Tras una incubación de 72h se examinó el aspecto presentado por las células a las distintas concentraciones. En las tres disoluciones más concentradas, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL, se observó un precipitado que iba en aumento en función de la concentración, en las dos menos concentradas, 0.1, 0.05 mg/mL, se observaron multitud de puntos, debidos también a la precipitación del ácido maslínico. Para descartar que se tratase de contaminación se repitió el experimento en placas petri individuales de 9.2 cm², utilizando 3 condiciones de concentración 0.025, 0.05, 0.1 mg/mL, así como distintos controles (**tabla 6.1**): Control de células sin solución de droga (Ct); control de células con DMSO y sin ácido maslínico (Cd); control con ácido maslínico 0.1 mg/mL y DMSO filtrado (Cf); y por último, control sin células, con DMSO y ácido maslínico a 0.1 mg/mL (Cp). Se sembraron $46 \cdot 10^3$ células



por placa en un volumen final de 5mL, tras 24h de la siembra todas las placas se dejaron incubar al menos durante una semana con la droga, siendo revisadas periódicamente.

[maslínico] mg/mL	[DMSO] % (v/v)	μL S0	μL Medio
0.1	0.5	500	4500
0.05	0.25	250	4750
0.025	0.125	125	4875
Cf	0.5	500	4500
Cp	0.5	500	4500
Cd	0.5	----	4175+25μL DMSO
Ct	----	----	5000

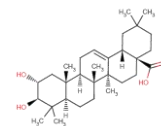
Tabla 6.1 Concentraciones de ácido maslínico y DMSO correspondientes los distintos volúmenes de S0 (1 mg/mL de ácido maslínico y un 5% de DMSO) y DMEM utilizados para la determinación del rango de citotoxicidad del ácido maslínico en células HT29.

Los resultados obtenidos en Ct, Cd, Cf, tras las 72h de incubación no presentaron ningún tipo de precipitado, ni de contaminación, mientras que en los tres casos la confluencia fue parecida, por lo que el número de células debió ser similar. En Cp se observaron multitud de puntos de diferente tamaño. A la concentración de 0.025 mg/mL de ácido maslínico la confluencia fue menor que en los controles. A las concentraciones de 0.05 y 0.1 mg/mL de ácido maslínico las células se encontraron totalmente despegadas y el número de puntos fue parecido a Cp. Se mantuvieron las placas durante algo más de una semana y los resultados respecto a las anomalías observadas en el medio no cambiaron. Por lo que podemos concluir que se trataba de la precipitación de ácido maslínico, ya que, de tratarse de contaminación, ésta hubiese seguido aumentando e igualándose en todas las placas.

[maslínico] mg/mL	[DMSO] % (v/v)	μL S1	μL Medio
0.1	0.5	200	----
0.05	0.25	100	100
0.025	0.125	50	150
0.01	0.05	20	180
Control	----	----	200

Tabla 6.2 Concentraciones de ácido maslínico y DMSO correspondientes los distintos volúmenes de S1 (0.1 mg/mL de ácido maslínico y un 0.5% de DMSO) y DMEM utilizados para la determinación del rango de citotoxicidad del ácido maslínico.

Ya que a 0.1mg/mL las células estaban totalmente despegadas se acotó el rango en el que podría encontrarse la concentración de IC₅₀ (*inhibitory concentration of 50%*) del ácido maslínico en células HT29 entre 0 y 100 μg/mL. Se realizó un primer ensayo por duplicado utilizando concentraciones de ácido maslínico de 10, 25, 50 y 100 μg/mL (**tabla 6.2**). En este caso se diluyó 100 veces la solución inicial de 10 mg/mL hasta una concentración de 0.1 mg/mL (S1) y un 0.5% en DMSO. Tras 24h se adicionó el medio con droga. Los resultados



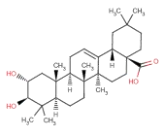
obtenidos fueron una confluencia en torno a un 80% a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una confluencia en torno a un 60% a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, encontrándose las células totalmente despegadas a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego la concentración de IC_{50} habría de encontrarse entre 0 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y no en rangos superiores.

Acotado el rango de donde debía encontrarse la IC_{50} en las células HT29, el resto de los ensayos para la determinación de la viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando MTT (metiltetrazodim) que es fijado y transformado en los peroxisomas a formazán, cuya absorbancia depende directamente del número de células viables. Los resultados se muestran como porcentaje de células vivas respecto al control, considerando éste como el 100% de viabilidad celular. Este ensayo fue repetido un total de ocho veces, con seis réplicas por concentración. Al igual que en el caso anterior se diluyó la disolución inicial de 10 mg/mL con medio, hasta una concentración de 0.1 mg/mL (S1). A continuación se tomaron distintos volúmenes de esta disolución para obtener las siguientes concentraciones finales de ácido maslínico: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tabla 6.3). Transcurridas 24h de la siembra, en las que las células se adhieren a la placa, se les cambió el medio de cultivo, siendo incubadas con el ácido maslínico durante 72 h.

[maslínico] $\mu\text{g}/\text{mL}$	[DMSO] % (v/v)	μL S1	μL Medio
Control	----	----	200
10	0.05	20	180
15	0.075	30	170
20	0.1	40	160
25	0.125	50	150
30	0.15	60	140
35	0.175	70	130
40	0.2	80	120
45	0.225	90	110
50	0.250	100	100
100	0.5	200	---

Tabla 6.3 Concentraciones de ácido maslínico y DMSO utilizadas para la determinación de la IC_{50} del ácido maslínico en la línea tumoral HT29. S1 (0.1 mg/mL de ácido maslínico y un 0.5% de DMSO).

En todos los ensayos se analizaron los resultados, así como la dispersión de los mismos determinándose la media de las absorbancias para cada una de las distintas concentraciones, refiriéndola al control sin tratar, los porcentajes de viabilidad encontrados de esta forma, así como sus desviaciones estándares, se muestran en la tabla 6.4.



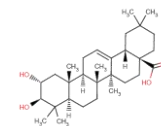
[Maslínico] µg/mL	% Viabilidad	Desv. estándar
0	100.0	0.0
5	80.2	1.9
10	75.2	5.9
15	69.0	4.0
20	65.2	4.3
25	60.2	6.5
30	31.2	5.4
35	18.7	3.8
40	12.6	4.0
45	11.2	2.6
50	4.1	2.0
100	0.0	0.0

Tabla 6.4 Efecto del ácido maslínico sobre el porcentaje de células viables HT29 tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia respecto a las células control no tratadas, junto con la desviación estándar correspondiente

El efecto, producido por un citotóxico, sobre la viabilidad celular puede ajustarse a una curva sigmoidea la cual viene dada por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{L}\right)^s}$$

Donde 'y' representa la viabilidad como porcentaje de células vivas respecto al control y 'x' la concentración de maslínico utilizada. Siendo 'a', 'L' y 's', los parámetros ajustables de la curva. En esta curva pueden distinguirse claramente tres zonas: En primer lugar, una zona plana, donde la concentración de droga no es lo suficientemente elevada para producir efectos citotóxicos apreciables; en segundo lugar, una zona de transición, en la cual pequeñas variaciones de la concentración provocan importantes efectos en la viabilidad celular, siendo ésta la zona donde suele encontrarse la IC₅₀; y por último, una segunda zona plana donde la concentración de maslínico se encuentra por encima de la IC₅₀, en la que la citotoxicidad es lo suficientemente elevada como para que la viabilidad se acerque asintóticamente al 0%. Tras ajustar los datos obtenidos experimentalmente a la curva teórica por regresión no lineal, se obtuvieron los distintos valores para los parámetros ajustables, así como sus desviaciones estándares (tabla 6.5).



Los resultados muestran que el ácido maslínico induce un decremento dosis-dependiente en el número de células HT29 viables capaces de acumular formazán tras 72h de tratamiento (**figura 6.1**). La concentración de ácido maslínico que provoca la inhibición del crecimiento del cultivo celular en un 50%, IC₅₀, puede determinarse a partir del parámetro L de la curva, que en este caso fue de $28.8 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$. La IC₈₀, concentración de ácido maslínico que provoca la inhibición del crecimiento del cultivo celular en un 80% puede determinarse a partir de la interpolación en la gráfica o utilizando la ecuación de la curva siendo de $37.5 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$. Tras acotar los valores de concentración entre los cuales el ácido maslínico ejerce su efecto citotóxico en células HT29 se ensayó este mismo rango en el resto de líneas celulares. Tanto el ajuste no lineal, como las interpolaciones se realizaron utilizando el programa Grafit 3.0 (Erithacus software Ltd. Microsoft corp. 1984-1992)

	Parámetros	Desv.est.
α	77.83	1.91
L	28.85	0.61
s	5.25	0.49

Tabla 6.5 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad celular frente a concentraciones crecientes de ácido maslínico en células HT29

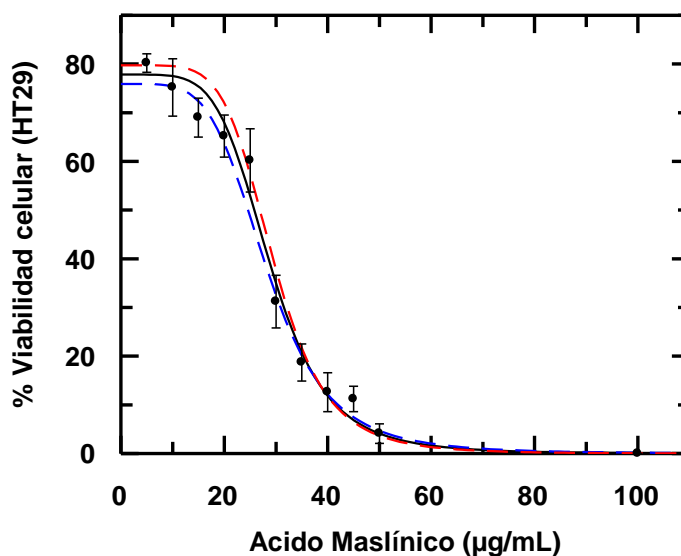
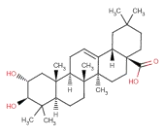


Figura 6.1 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en células HT29, tras 72h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo de MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control \pm S.D.

6.1.1.2 Línea tumoral Caco-2

En la determinación de la curva de viabilidad o de citotoxicidad de las células Caco-2 frente al ácido maslínico, se ensayaron concentraciones crecientes de este compuesto dentro del rango de concentraciones de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Los ensayos sobre este tipo celular fueron realizados del mismo modo a los realizados en células HT29. Tras 24h de la siembra las



células fueron incubadas con concentraciones crecientes de ácido maslínico durante 72h determinándose a continuación la viabilidad celular (**tabla 6.6**).

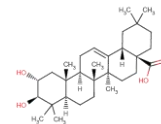
[Maslínico] μmL	% Viabilidad	Desv. estándar
0	100.0	0.0
5	100.0	0.0
10	99.0	1.0
15	98.5	1.3
20	89.0	5.8
25	82.7	4.9
30	76.2	5.5
35	67.5	5.1
40	55.7	3.4
45	37.8	3.7
55	19.7	2.9
60	14.7	2.2
100	0.0	0.0

Tabla 6.6 Efecto del ácido maslínico sobre el porcentaje de células viables Caco-2 tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia respecto a las células control no tratadas, junto con la desviación estándar correspondiente

Transcurridas 72h, se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo con MTT. Los resultados encontrados se muestran en la **tabla 6.6**. Los valores de los parámetros obtenidos por regresión no lineal, así como sus desviaciones se muestran en la **tabla 6.7**. Los resultados en la línea tumoral Caco-2 muestran como el ácido maslínico induce, al igual que en la línea tumoral HT29, un decremento en la viabilidad celular dosis-dependiente (**figura 6.2**). Tanto la IC_{50} como la IC_{80} obtenidas en este caso, $IC_{50} = 40.7 \pm 0.4 \mu\text{mL}$, $IC_{80} = 56.8 \pm 0.1 \mu\text{mL}$, fueron superiores a las encontradas en las células HT29, aunque estos valores están dentro del mismo rango de concentración.

6.1.2 Líneas no transformadas.

Para determinar si el ácido maslínico ejercía su acción citotóxica de forma diferencial sobre distintos tipos celulares, se planteó la realización de este mismo ensayo sobre las líneas celulares no transformadas IEC-6 e IEC-18. Las líneas IEC-6 e IEC-18, corresponden a células normales de epitelio intestinal del intestino delgado de rata (*Rattus norvegicus*). Si bien no se



	Parámetros	Desv.est.
α	98.15	2.17
L	40.72	0.95
s	4.07	0.36

Tabla 6.7 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad celular frente a la concentración de ácido maslínico en células Caco-2

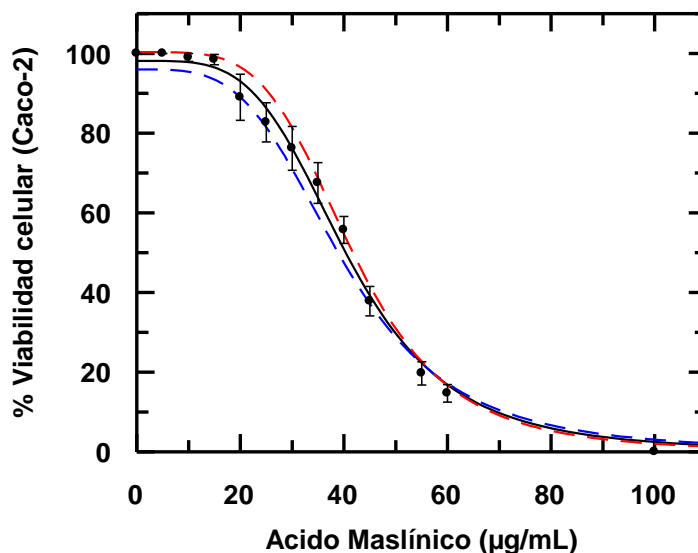
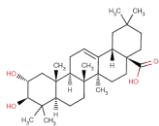


Figura 6.2 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en células Caco-2, tras 72h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo de viabilidad con MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control \pm S.D.

tratan de cultivos primarios, sino que conservan muchas propiedades del tejido de partida. Estas líneas celulares pueden considerarse próximas a las células tisulares al ser no transformadas. Estas líneas, fueron obtenidas en un primer momento, a partir de subcultivos procedentes de un cultivo primario (Sterling y col., 2002). Por tanto, podríamos suponer que la expresión de oncogenes y/o genes tumorales, en principio, debe estar atenuada en estas líneas celulares. A pesar de no ser un cultivo primario, el efecto del ácido maslínico podría darnos una idea aproximada del posible comportamiento diferencial de este compuesto frente a líneas normales o no transformadas, más cercanas al comportamiento celular de los tejidos *in vivo*.

6.1.2.1 Línea no transformada IEC-6.

Para determinar la citotoxicidad del ácido maslínico sobre estas líneas normales se incubaron las células IEC-6 a concentraciones crecientes de ácido maslínico en un rango de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Tras 24h de la siembra se añadió medio fresco con ácido maslínico en diferentes concentraciones (tabla 6.8), a continuación las células fueron incubadas durante 72h, tras lo cual se determinó viabilidad celular mediante el método del MTT.



[Maslínico] µg/mL	% Viabilidad	Desv. estándar
0	100.0	0.0
25	89.8	5.1
29	77.8	3.8
35	69.1	3.2
37.5	63.1	4.1
45	28.5	3.4
50	14.7	3.5
60	9.9	2.7
80	8.7	1.6
90	9.0	1.6
100	8.3	1.5

Tabla 6.8 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-6, tras 72h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo de MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control ± S.D.

Con los datos anteriores se analizó la curva de viabilidad celular, determinándose los parámetros correspondientes para la regresión no lineal, así como sus desviaciones estándares (**tabla 6.9**). Los resultados muestran como el ácido maslínico induce al igual que en las líneas tumorales un decremento en la viabilidad celular dosis-dependiente (**figura 6.3**). La IC_{50} obtenida en este caso es similar a la obtenida para Caco-2, aunque superior a la obtenida en HT29, siendo de $39.7 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$. Por otra parte, los valores de viabilidad obtenidos a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} halladas para HT29, fueron de un 78% y 63% respectivamente. Siendo la viabilidad de las células IEC-6 a la concentración de IC_{50} de HT29 un 28% superior y a la concentración de IC_{80} de HT29 un 43% superior respecto a la viabilidad determinada en células HT29 a las mismas concentraciones. La citotoxicidad del ácido maslínico encontrada en células IEC-6 es parecida a la hallada en células Caco-2. Este resultado podría estar relacionado con la menor tasa de división celular en las células Caco-2, ya que el efecto diferencial de la acción de los compuestos triterpénicos parece estar unido a su mayor efectividad a pH ácido, lo que sucede en tumores con tasas de división elevadas (**Noda y col., 1997; Stubbs y col., 2000**).

	Parámetros	Desv.est.
a	97.79	5.41
L	39.70	1.45
s	5.64	0.88

Tabla 6.9 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad celular con la concentración de ácido maslínico en células IEC-6

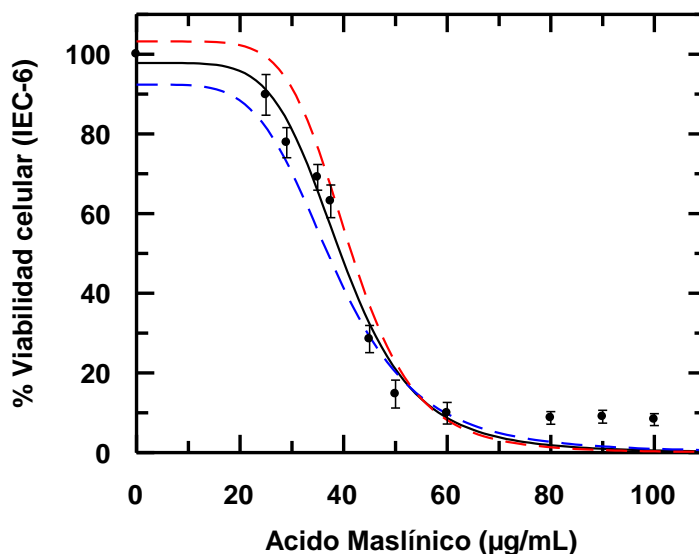
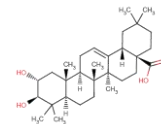
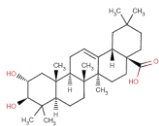


Figura 6.3 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-6, tras 72h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo de MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control \pm S.D.

6.1.2.2 Línea no transformada IEC18

Se ensayó la citotoxicidad del ácido maslínico sobre la línea celular no transformada IEC-18. Para ello se incubaron estas células durante 72h con cantidades crecientes de ácido maslínico dentro del rango de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Pasadas las primeras 24h se les cambió el medio, adicionando medio fresco con concentraciones crecientes de ácido maslínico (**tabla 6.10**). La viabilidad celular fue determinada por el método del MTT. La cantidad de ácido maslínico necesaria para producir el 50% de inhibición en el crecimiento celular fue de $51.3 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ (**tabla 6.11**). Esta cantidad, aunque dentro del mismo rango, es superior a la encontrada en el resto de líneas celulares, por tanto el ácido maslínico presenta una menor citotoxicidad en esta línea celular. Este resultado podría estar relacionado con un comportamiento diferencial en respuesta de líneas tumorales y no tumorales a la acción del ácido maslínico.

En las células IEC-18 los valores de viabilidad encontrados para las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} hallados en HT29 a 72h de incubación, fueron un 68% a IC_{50} y un 62% a IC_{80} (**figura 6.4**). Estos porcentajes son respectivamente un 18% y un 42% superiores a los encontrados en HT29. Podemos concluir, por tanto, que el ácido maslínico posee una citotoxicidad mayor en la línea celular HT29 que en el resto de líneas celulares siendo su IC_{50} prácticamente la mitad de la encontrada en células IEC-18. Por otra parte, la IC_{50} del ácido maslínico para Caco-2 es un 25% inferior a la encontrada en la línea no transformada IEC-18, siendo por tanto, su citotoxicidad menor en esta última que en el resto de las líneas celulares.



[Maslínico] µg/mL	% Viabilidad	Desviación est.
0	100.0	4.3
10	83.4	4.3
20	76.8	2.8
25	74.5	5.3
29	68.2	3.5
37,5	61.6	5.1
45	52.4	4.5
60	28.3	4.7
70	21.0	4.6
80	16.2	5.3
90	14.2	4.8
100	13.2	4.4

Tabla 6.10 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-18, tras 72h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo de MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control ± S.D.

	Parámetros	Desv.est.
α	82.86	2.18
L	51.18	1.65
s	3.02	0.21

Tabla 6.11 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad celular con la concentración de ácido maslínico en células IEC-6

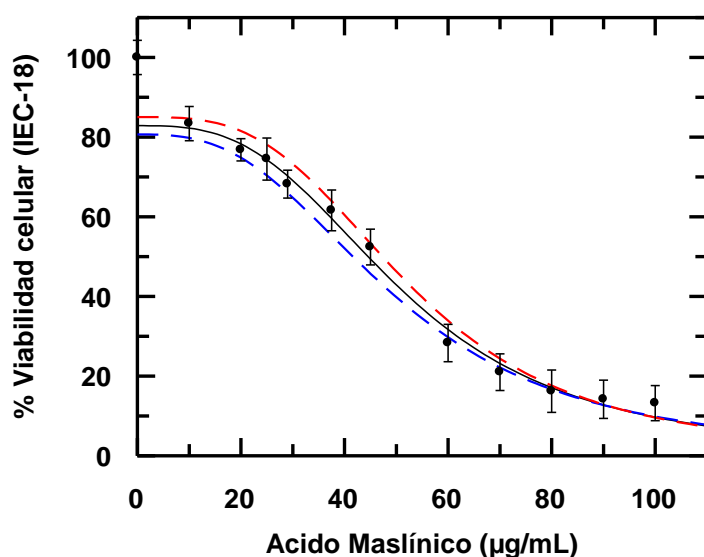
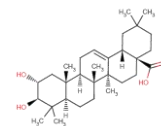


Figura 6.4 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-18, tras 72h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo de MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control ± S.D.



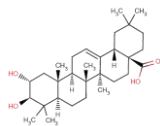
Con respecto a la citotoxicidad del ácido maslínico encontrada sobre la línea tumoral Caco-2, podemos decir que es próxima a la encontrada en la línea normal IEC-6, este resultado puede deberse a varios factores. Como ya se ha comentado, la tasa de división en las células Caco-2 es bastante baja con respecto a otras líneas tumorales, además, esta línea celular puede presentar cierta diferenciación al llegar a la confluencia, lo que estaría relacionado con la menor citotoxicidad del ácido maslínico sobre esta línea. El comportamiento diferencial del efecto citotóxico del ácido maslínico en la línea tumoral HT29 y en las líneas normales IEC-6 e IEC-18, unido a la baja toxicidad que el producto presenta respecto a otros compuestos anticancerígenos (gracias a su origen natural y a su estructura triterpénica) hacen del ácido maslínico un compuesto interesante como potencial agente anticancerígeno.

6.2 Electroforesis en microgel. 'Comet assay'

Con el objeto de evaluar la posible genotoxicidad que podría mediar en el efecto citotóxico del ácido maslínico se efectuó este ensayo de electroforesis en microgel utilizando distintos tiempos de incubación. En este ensayo se realiza una electroforesis en gel de agarosa pero a nivel del DNA de las células individuales, permitiendo observar la posible genotoxicidad causada por el producto. Por la forma que adoptan las células y la disposición de las hebras de DNA tras la realización del ensayo también es denominado ensayo del cometa o 'comet assay'. Mediante este procedimiento se puede determinar de una forma rápida y sensible la integridad de las hebras cromosómicas. Aunque no puede distinguirse entre células apoptóticas y no apoptóticas, sí puede cuantificarse la extensión de los daños genotóxicos causados por un determinado producto, así como la recuperación de los mismos.

6.2.1 Línea tumoral HT29

Las células HT29 fueron incubadas con las concentraciones de ácido maslínico iguales a la IC_{50} e IC_{80} halladas para 72h. Los tiempos de incubación utilizados fueron 24h, 48h y 72h. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia, aceite de inmersión y filtro DAPI. El tamaño de las colas de los cometas o '*tail moment*', así como su número, fueron determinados de forma computerizada tomando 100 imágenes aleatorias y cuantificándolas utilizando el software de adquisición y análisis de imágenes (*Nis-Elements, Nikon imagin software*). Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**tabla 6.12**).



HT29	Maslínico (µg/mL)	24 h	48 h	72 h
CT	0.0	117.73 ± 4.36	163.32 ± 5.87	133.71 ± 6.33
IC ₅₀	28.8	139.48 ± 5.98	963.71 ± 70.44	319.10 ± 17.59
IC ₈₀	37.5	82.77 ± 5.60	209.09 ± 8.10	226.07 ± 31.13
% IC ₅₀		118.48 ± 5.08	590.07 ± 43.13	238.64 ± 13.15
% IC ₈₀		70.30 ± 4.76	128.02 ± 4.96	169.07 ± 23.28

Tabla 6.12 Resultados obtenidos en la determinación del tamaño de las ‘colas de los cometas’ o ‘tail moment’, observados en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a 24h, 48h y 72h. En estos resultados puede verse un incremento de prácticamente el 600% en este parámetro tras 48h de tratamiento, así como su rápida recuperación hasta valores de un 200% a las 72h.

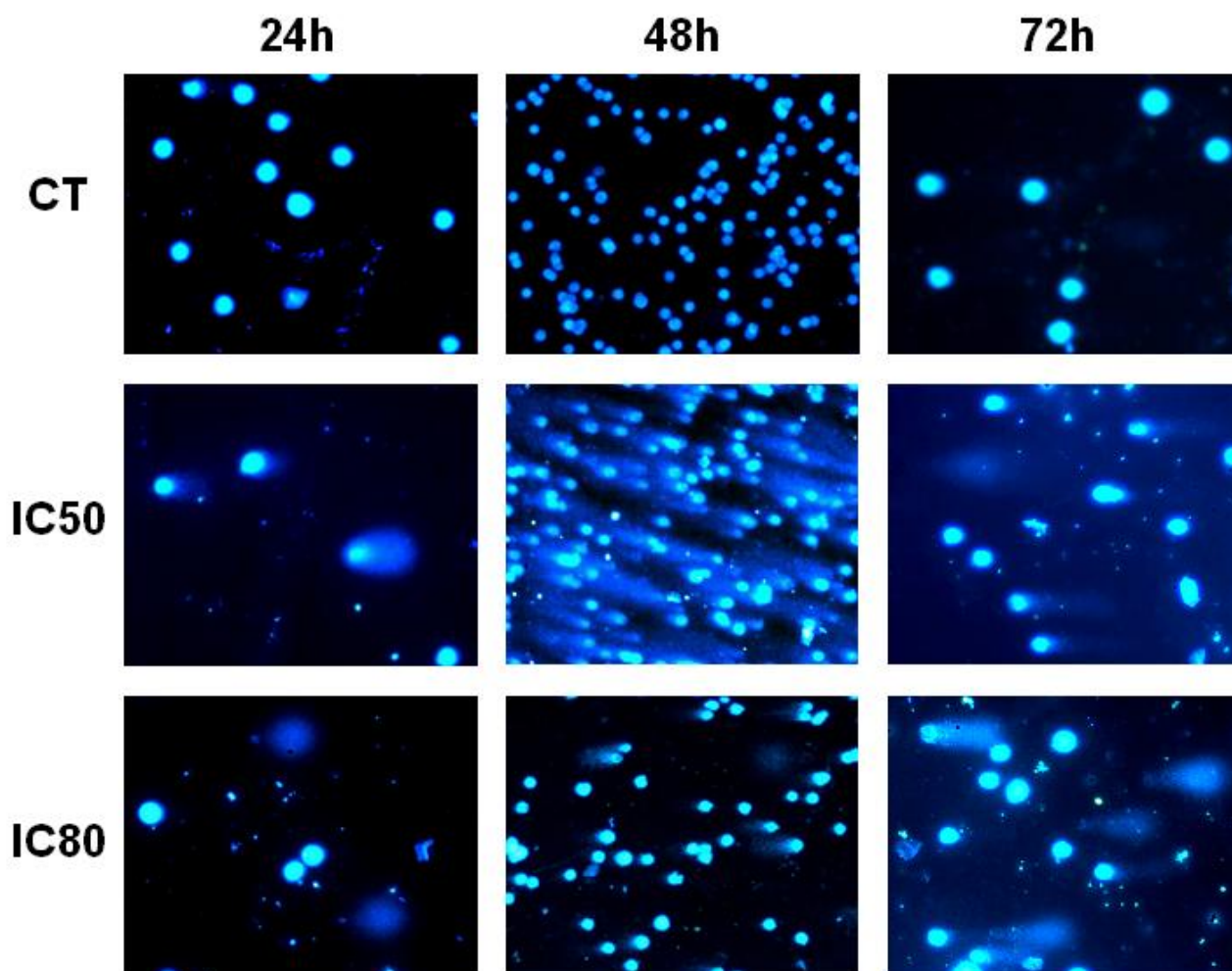
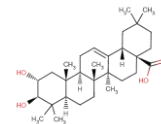


Figura 6.5 Imágenes de electroforesis en microgel de células HT29, incubadas con ácido maslínico a sus respectivas concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ durante 24, 48, 72 h. Puede observarse como a la concentración de IC₅₀ y a 48h de incubación hay un dramático incremento, tanto en el número de células con elevada genotoxicidad, como en la longitud del tamaño de las colas (*‘tail moment’*)



Tras las primeras 24h de incubación, las células HT29 no mostraron un incremento significativo en el grado de genotoxicidad. El máximo incremento fue de tan solo un 18% respecto al control a la concentración de IC₅₀. A las 48h se produjo un drástico aumento de la genotoxicidad, siendo el valor del *tail moment* de un 590% respecto al control, este incremento se produjo tanto en el tamaño de las colas, como en el número de células que presentaron genotoxicidad. A la concentración de IC₈₀ el incremento fue bastante menor, de tan solo un 28% respecto al control. Por último, tras las 72h de incubación también se observó un incremento en el tamaño de las colas, así como en su número, pero éste fue menor al encontrado a las 48h, siendo de tan solo un 138% a la concentración de IC₅₀ y de un 69% a la concentración de IC₈₀. Estos resultados pueden observarse en las imágenes tomadas a los distintos tiempos y concentraciones (**figura 6.5**).

A partir de estos resultados se puede concluir que el ácido maslínico produce una elevada genotoxicidad en las células HT29 tras 48h de tratamiento, ésta es recuperada por las células que aún continúan viables tras 72h de tratamiento remitiendo en parte los daños sufridos (**figura 6.6**). A IC₈₀ también se observan valores significativos de genotoxicidad a partir de las 48h de tratamiento, pero éstos son bastante menores a los encontrados a IC₅₀, esto puede deberse a que a esta concentración el ácido maslínico es demasiado tóxico como para que el efecto sea mostrado por este ensayo, ya que se requiere que el DNA continúe manteniendo parte de su integridad, de forma que el producto sea lo suficientemente tóxico como para producir genotoxicidad, pero no tanto como para producir citotoxicidad.

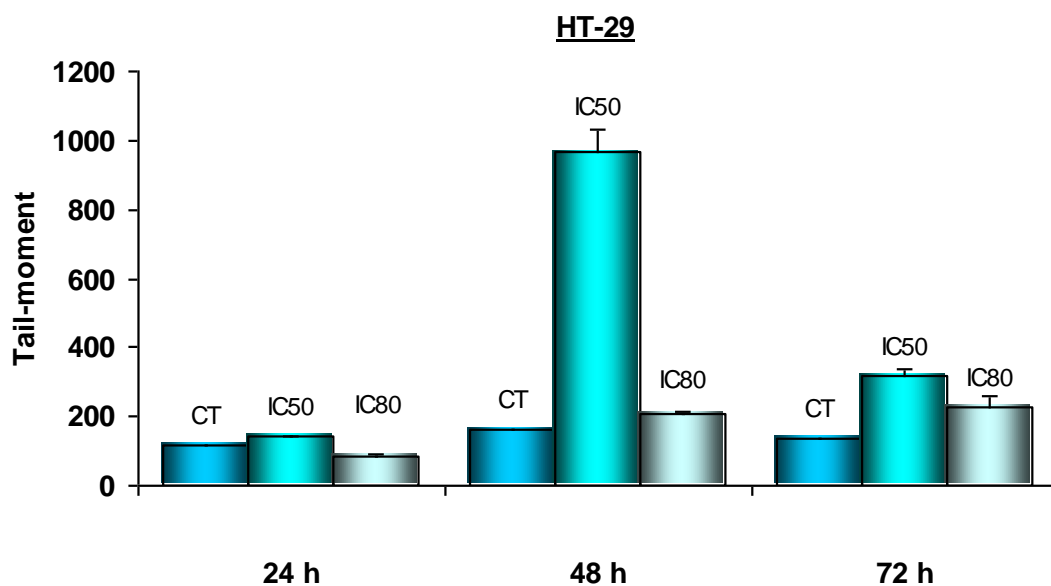
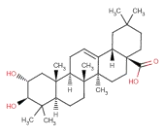


Figura 6.6 Representación del tamaño de las colas o '*tail moment*' observado en células HT-29. El ensayo se realizó tomando imágenes al azar y examinándolas a continuación con el software adecuado. Los resultados muestran un repentino incremento en el valor del '*tail moment*', a las 48h de incubación que disminuyó de nuevo a las 72h de incubación



6.2.2 Línea tumoral Caco-2

Al igual que en el caso de la línea celular tumoral HT29, se incubaron las células de la línea tumoral Caco-2 con ácido maslínico durante 24h, 48h y 72h. a sus respectivas concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ determinadas para las 72h de tratamiento. Como en el caso anterior, las imágenes se tomaron utilizando un microscopio de fluorescencia con filtro DAPI, siendo analizadas a continuación de forma computerizada, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.13.

Caco-2	Maslínico (µg/mL)	24 h	48 h	72 h
CT	0.0	166.06 ± 7.45	140.01 ± 8.68	263.39 ± 17.10
IC ₅₀	40.7	1797.35 ± 87.17	1172.12 ± 63.20	802.08 ± 41.60
IC ₈₀	56.8	1533.44 ± 163.14	1133.81 ± 93.24	654.57 ± 60.26
% IC ₅₀		1082.33 ± 52.49	837.17 ± 45.14	304.52 ± 15.80
% IC ₈₀		923.41 ± 98.24	809.81 ± 66.60	248.51 ± 22.88

Tabla 6.13 Resultados obtenidos en la determinación del tamaño de las ‘colas de los cometas’ o ‘tail moment’ en células Caco-2 tras 24h 48h y 72h de tratamiento con ácido maslínico. En estos resultados puede observarse un claro incremento de este parámetro a las 24h de tratamiento alcanzando valores próximos a un 1800%, así como su disminución paulatina hasta valores de un 250% tras las 72h de tratamiento.

Desde las 24h de tratamiento las células Caco-2 mostraron un importante y significativo incremento en el tamaño y número de las colas de los cometas ‘tail moment’ en comparación con las células control (**figura 6.7**). Este incremento, se produjo de forma tanto tiempo como dosis-dependiente, alcanzando su valor máximo a tiempo inicial y disminuyendo con el transcurso del tratamiento. Por tanto, el mayor incremento se produjo a la dosis de IC₅₀, tras las primeras 24h de incubación con ácido maslínico, siendo de un 982% respecto al control de células sin tratar.

A 48h de tratamiento y a la concentración de IC₅₀ el incremento fue de un 737%. Por último, a 72h y a esta misma dosis el incremento fue de un 204%. Los incrementos encontrados a dosis de IC₈₀ también fueron significativos aunque algo menores siendo: un 823% a las 24h de tratamiento, de un 709% a las 48h y de un 148% a las 72h.

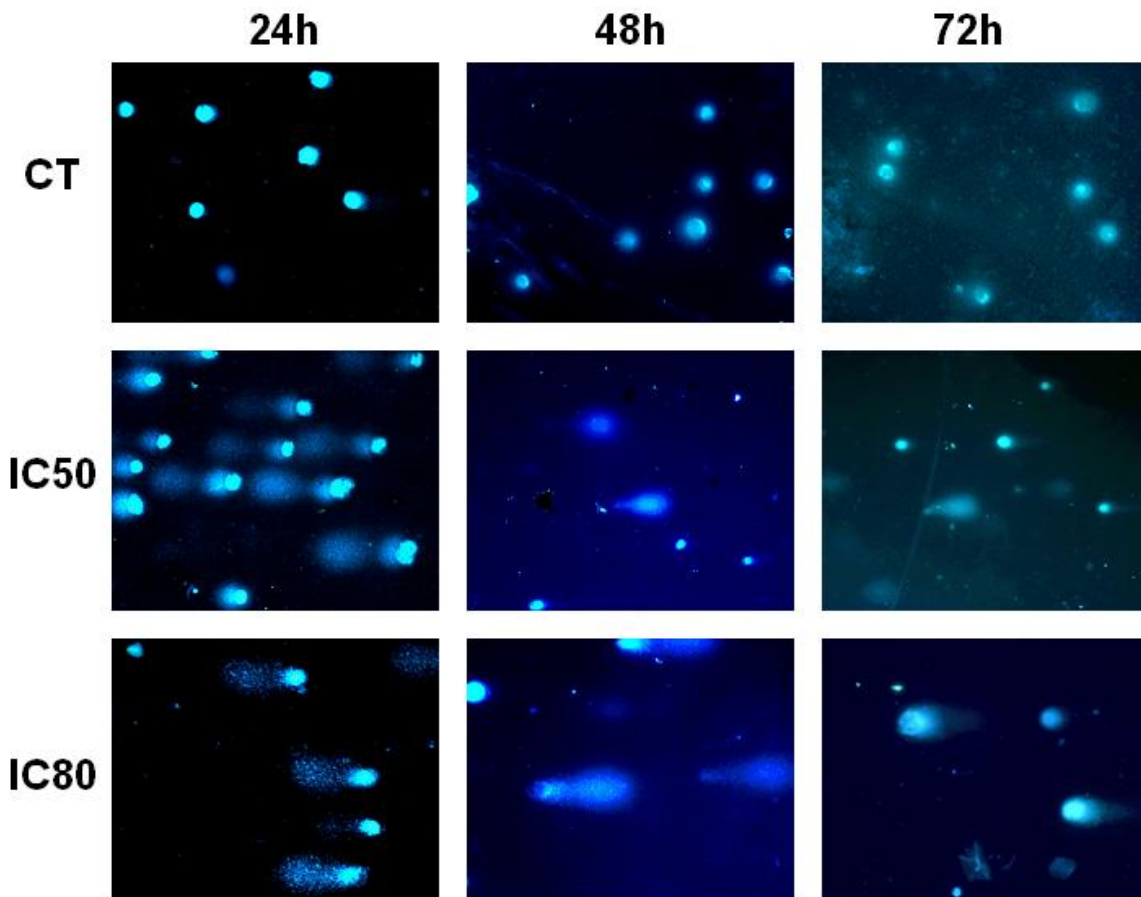
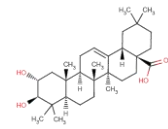


Figura 6.7 Imágenes de electroforesis en microgel de células Caco-2, incubadas con ácido maslínico a sus concentraciones de IC_{50} e IC_{80} durante 24h, 48h y 72h. Puede observarse como a la concentración de IC_{50} y a 24h de incubación hay un claro incremento en la longitud del tamaño de las colas (*'tail moment'*).

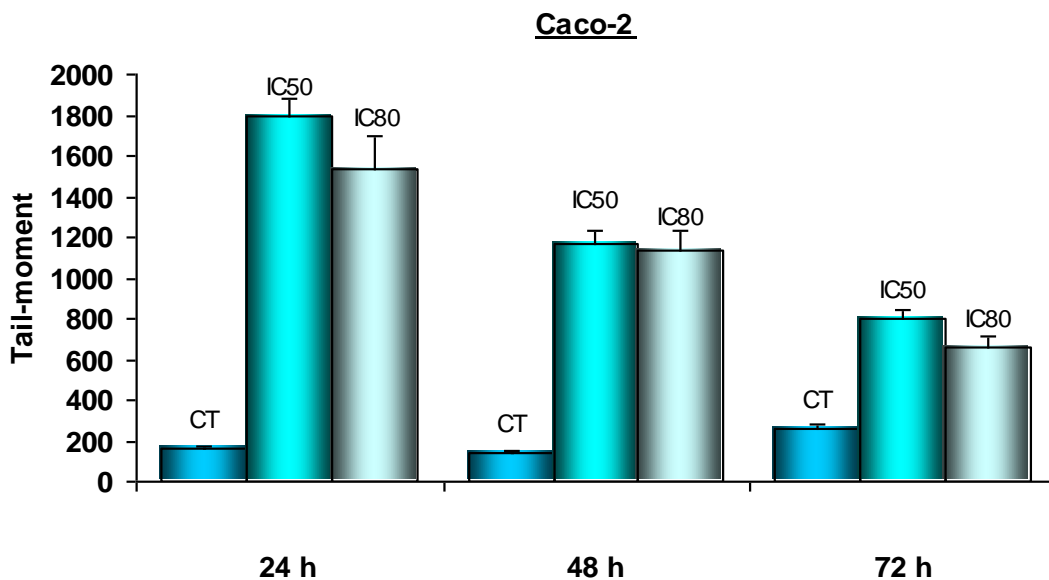
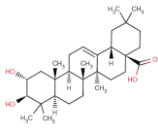
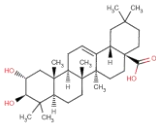


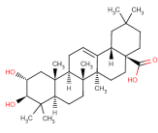
Figura 6.8 Representación del tamaño de las colas o *'tail moment'* observado en células Caco-2. El ensayo se realizó tomando imágenes al azar y examinándolas a continuación con el software adecuado. Los resultados muestran un claro incremento en el valor del *'tail moment'* a las 24h de incubación que va disminuyendo paulatinamente hasta las 72h de incubación.



Al igual que en la línea celular HT29, la línea celular Caco-2 parece ser capaz de reparar los daños producidos a nivel genotóxico tras las 72h de incubación (**figura 6.8**). Esta reparación es ya visible en las células que aún continúan siendo viables a las 48h de tratamiento. Los incrementos encontrados en los valores de *'tail moment'* son bastante superiores en células Caco-2 que los encontrados en células HT29. Esta diferencia podría estar relacionada con la posible deficiencia en la reparación de su DNA que presentan las células Caco-2 al ser p53 deficientes, ya que el factor de transcripción p53 es determinante para este tipo de procesos.

Efecto anticancerígeno del ácido maslínico



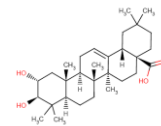


Capítulo 7

Resultados: Análisis del ciclo celular y diferenciación

7.1 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Se ha estudiado el efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular en las líneas cancerígenas de carcinoma de colon HT29 y Caco-2, así como en las líneas normales de epitelio intestinal IEC-6 e IEC-18, con el fin de obtener información sobre los distintos aspectos de la acción anticancerígena del ácido maslínico. El efecto sobre el ciclo celular fue analizado por la incorporación de yoduro de propidio (IP), cuya concentración en el interior celular es proporcional a la cantidad de DNA celular. La intensidad del IP incorporado por cada célula fue analizada mediante citometría de flujo. Durante el proceso de apoptosis ocurre la fragmentación del núcleo y la aparición de los denominados cuerpos apoptóticos, estos fragmentos poseen una cantidad de DNA menor a la dotación normal de la célula, así como un menor tamaño. En el estudio del ciclo celular esta fragmentación se ve reflejada por la aparición de picos con menor intensidad que los correspondientes a G_0/G_1 .



Este análisis permite determinar, además, el comportamiento celular que puede verse reflejado en dicho ciclo, así si la célula se encuentra diferenciada, disminuirá su tasa de división, por lo que el número de células en las fases S o G₂/M también disminuirá, con el consiguiente aumento del número de células en la fase G₀/G₁. Por último, la funcionalidad celular se suele desarrollar previo arresto de la célula en fase G₀, por tanto un aumento en el número de células que se encuentren en esta fase del ciclo es indicativo de una posible diferenciación celular.

7.1.1 Línea tumoral HT29

Se ha estudiado la evolución del ciclo celular sobre la línea celular HT29, en función de las concentraciones de ácido maslínico correspondientes a IC₅₀ e IC₈₀ determinadas para esta línea celular a 72h. Este análisis fue llevado a cabo tras 72h y 96h de incubación. Los porcentajes de células en cada una de las diferentes fases del ciclo celular fueron calculados utilizando el programa Multicycle (Phoenix Flor Systems, San Diego, CA, USA). Se realizaron un total de 9 ensayos por duplicado a 72h y 3 ensayos por duplicado a 96h, obteniéndose los siguientes resultados (**figura 7.1**).

El análisis del ciclo celular en las línea HT29, mostró un incremento dosis dependiente en el número de células en la fase G₀/G₁ (**figura 7.2**), indicando un marcado arresto celular en esta fase del ciclo, con prácticamente un 85% del total de células a la concentración de IC₈₀ (**tabla 7.1**). Además, el tratamiento con ácido maslínico produjo el decremento, dosis dependiente, del porcentaje de células en las fases S y G₂/M, siendo esta disminución de más de un 18% respecto al control en la fase S y de un 3% en la fase G₂/M.

Representando gráficamente los parámetros *forward scatter* (FS), proporcional al tamaño relativo de las partículas, frente al *side scatter* (SS), proporcional a la granulosidad de las mismas, pueden distinguirse las distintas poblaciones celulares (**figura 7.3**). En esta representación se observa un desplazamiento y ensanchamiento de la población celular correspondiente a las células en las fases G₀/G₁. Estas gráficas no están aceptadas por la interpolación matemática utilizada para la determinación del porcentaje de células en cada fase, por lo que reflejan fehacientemente el comportamiento del cultivo celular.

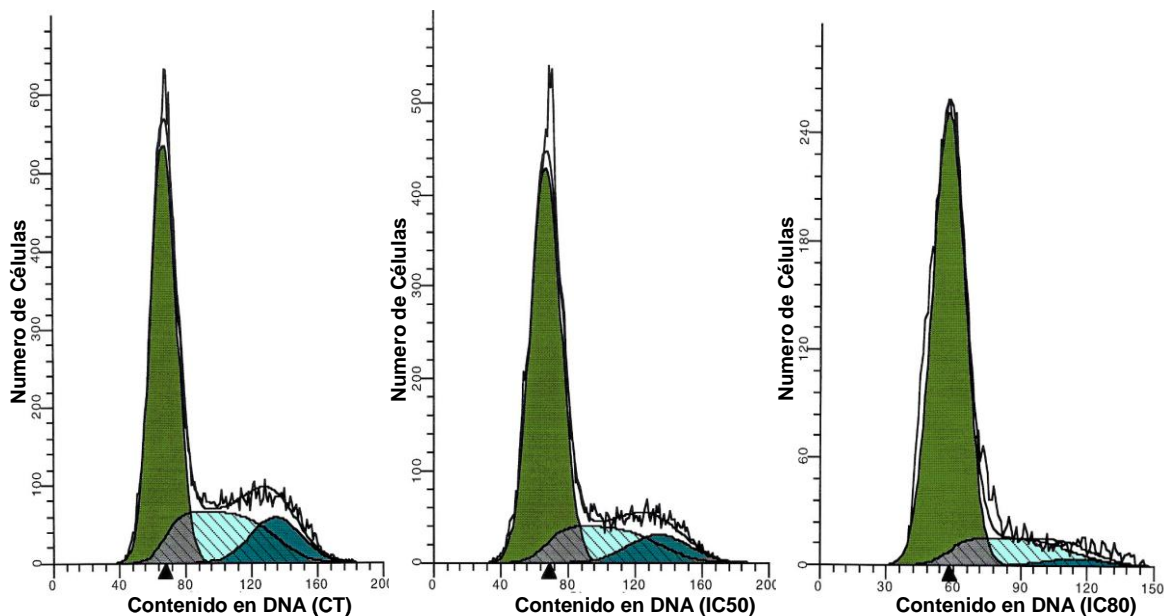
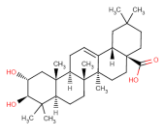


Figura 7.1 Histogramas del ciclo celular de células HT29 incubadas con ácido maslínico, a las concentraciones CT, IC₅₀ e IC₈₀ durante 72 h. En los que se representa el número de células frente a la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio.

HT29	Maslínico(µg/mL)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
Control	0.0	62.5 ± 5.2	29.7 ± 5.7	7.8 ± 3.1
IC ₅₀	28.8	75.1 ± 4.9 **	20.3 ± 4.4 **	4.5 ± 4.3 *
IC ₈₀	37.5	83.9 ± 6.0 **	12.0 ± 6.4 **	4.1 ± 1.5 **

Tabla 7.1 Porcentaje de células HT29 en cada una de las distintas fases del ciclo celular, en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 72h de incubación. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

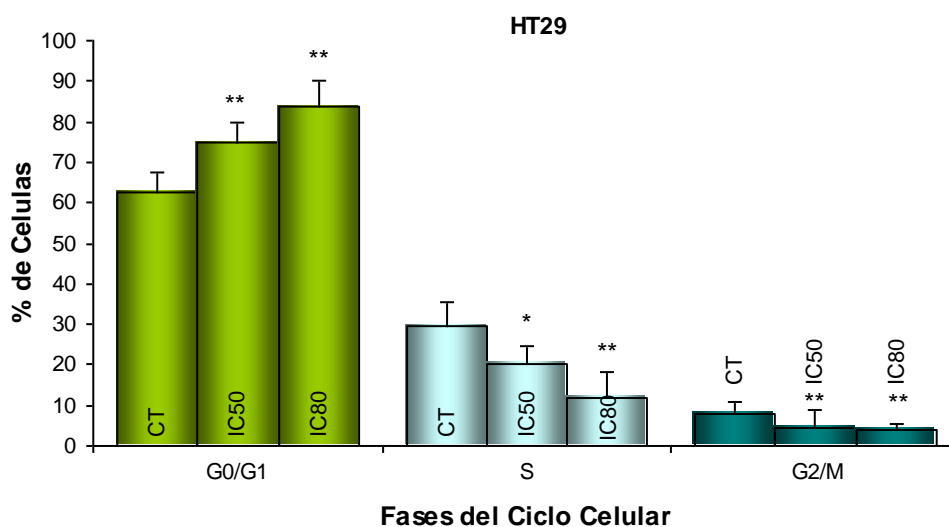


Figura 7.2 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células HT29 a las 72h de tratamiento. Puede apreciarse claramente el incremento de la fase G₀/G₁ y la disminución de las fases G₂/M y S. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

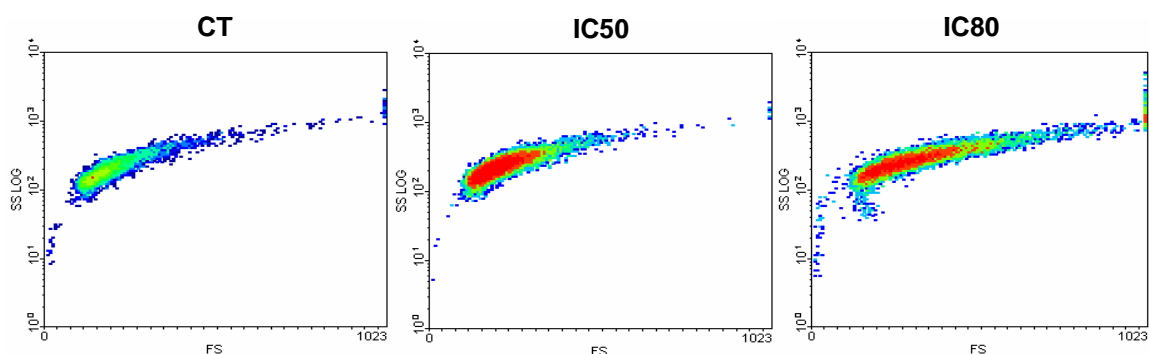
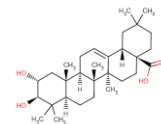


Figura 7.3 Representación de los parámetros FS (*forward scatter*) frente a SS (*side scatter*), en células HT29 tras 72h de tratamiento. Puede observarse como en respuesta al tratamiento con el ácido maslínico se incrementa la población central de células (rojo), correspondiente a las células en fase G₀/G₁.

Los resultados indican que existe un incremento significativo en el número de células en la fase G₀/G₁ junto con la disminución de la fase S y G₂/M, de forma dosis dependiente. Este comportamiento es indicativo de una posible diferenciación celular inducida por el ácido maslínico. Este hecho ha sido confirmado por un aumento en la actividad fosfatasa alcalina, enzima marcadora que ve incrementada su actividad cuando la célula sufre diferenciación enterocítica.

A las 72h de incubación no se observó la aparición de picos sub G₀/G₁, los cuales señalan la presencia de apoptosis celular. A pesar de la no presencia de dichos picos, otros ensayos indicaron que esta apoptosis realmente sucedía, por lo que se decidió aumentar el tiempo de incubación durante 24h más, siendo en este caso de 96h.

En el resultado obtenido puede observarse como el ciclo celular se ve afectado por el ácido maslínico, apareciendo anomalías visibles por debajo de la fase G₀/G₁, a la concentración de IC₈₀. Por tanto, a 96h de tratamiento la aparición de un pico subG₀ fue evidente (**figura 7.4**). Este pico es un claro reflejo de las últimas fases de la apoptosis celular (apoptosis tardía) ya que la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos ocurre en las etapas finales del proceso de apoptosis. Además de la aparición del pico subG₀/G₁, tras las 96h de tratamiento, el porcentaje de células HT29 en arresto celular disminuyó con respecto a los resultados obtenidos a 72h, probablemente debido a un notable incremento de restos celulares como consecuencia final de los fenómenos de apoptosis (**tabla 7.2; figura 7.5**).

En la representación gráfica del *forward scatter* (FS) frente al *side scatter* (SS), se observó la aparición de una subpoblación de corpúsculos a valores bajos de FS (parámetro proporcional al tamaño de las partículas) que se corresponde con la aparición de fragmentos y restos celulares, así como con los cuerpos apoptóticos (**figura 7.6**).

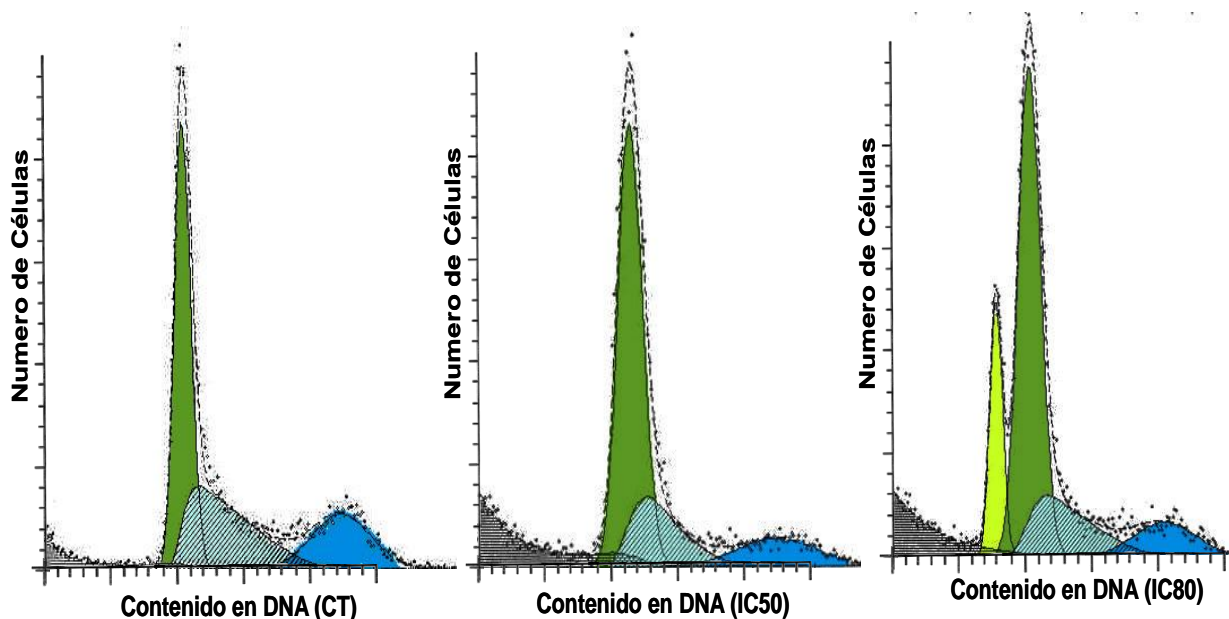
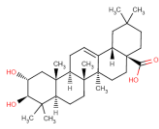


Figura 7.4 Histogramas del ciclo celular de células HT29 incubadas con ácido maslínico, a las concentraciones CT, IC₅₀ e IC₈₀ durante 96 h. La aparición de un pico aneuploide, subG₀/G₁, es claramente visible, a la concentración de IC₈₀.

HT29	Maslínico(µg/mL)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M	%Aneuploide
Control	0.0	55.2 ± 4.9	29.0 ± 4.8	15.7 ± 7.1	---
IC ₅₀	28.8	67.9 ± 2.6 *	20.0 ± 1.5 **	12.0 ± 1.1	---
IC ₈₀	37.5	66.7 ± 1.9	20.8 ± 1.1 *	12.5 ± 0.8	14.45 ± 2.5

Tabla 7.2 Porcentaje de células HT29 en cada una de las distintas fases del ciclo celular, así como el porcentaje de aneuploidía en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 96h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. $p < 0.075$ (*), $p < 0.05$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

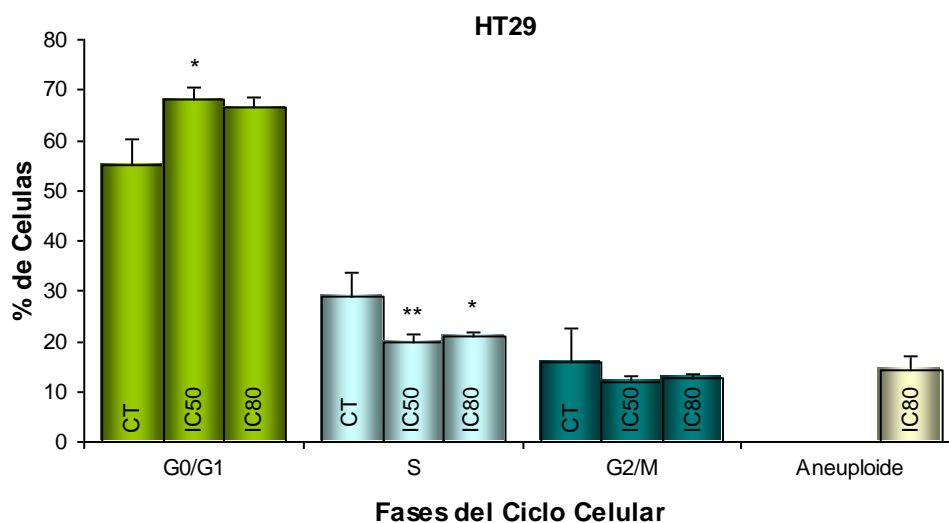


Figura 7.5 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células HT29 a las 96h de tratamiento. Puede apreciarse que el arresto en la fase G₀/G₁ se mantiene, pero además a la concentración de IC₈₀, aparece un pico aneuploide, probablemente debido a la formación de cuerpos apoptóticos. $p < 0.075$ (*), $p < 0.05$ (**), con respecto al control de células no tratadas.

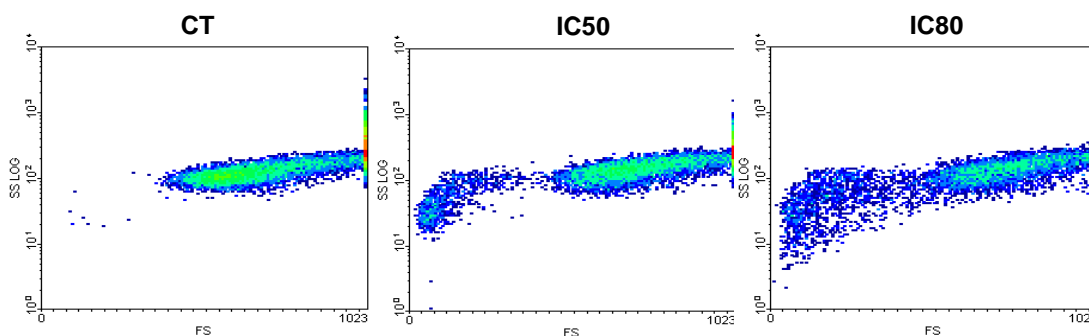
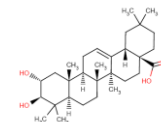


Figura 7.6 Representación de los parámetros FS (*forward scatter*) frente a SS (*side scatter*), en células HT29 tras 96h de tratamiento. Puede observarse como en respuesta al tratamiento con el ácido maslínico a parece una nueva subpoblación heterogénea de corpúsculos de menor tamaño a la izquierda de la población inicial, que se incrementa de forma concentración dependiente

En resumen, podemos concluir que tras la incubación de 72h probablemente, nos encontramos ante una apoptosis temprana y por este motivo no detectable en los análisis del ciclo celular. Sin embargo, a 96h de tratamiento, la apoptosis ha ido en aumento dando lugar a la aparición de fragmentos y restos celulares, así como cuerpos apoptóticos que son claramente detectables mediante este análisis del ciclo celular.

7.1.2 Línea tumoral Caco-2

El análisis del ciclo celular en la línea Caco-2 se llevó a cabo a las concentraciones de ácido maslínico IC₅₀ e IC₈₀ determinadas para esta línea celular. El análisis del ciclo celular se realizó tras 72h de incubación, con un total de 9 ensayos independientes por duplicado. Los resultados fueron analizados utilizando el programa Multicycle (Phoenix Flor Systems, San Diego, CA, USA), obteniéndose los siguientes resultados (**figura 7.7**).

Al igual que en la línea celular HT29 los resultados encontrados en las células Caco-2 mostraron un marcado arresto celular en la fase del ciclo G₀/G₁, así como la disminución de células en la fase S (**figura 7.8**). El porcentaje de células en la fase G₀/G₁ fue de casi un 90%, siendo de un 10% a un 15% mayor a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ que en el control de células sin tratar. En la fase S, este incremento disminuyó hasta un 14% respecto al control de células sin tratar, a la concentración de IC₈₀. Por último, el porcentaje de células en la fase G₂/M disminuyó de forma significativa a la concentración de IC₅₀, viéndose incrementado a la concentración de IC₈₀, aunque este incremento fue de tan sólo un 2% no siendo significativo (**tabla 7.3**).

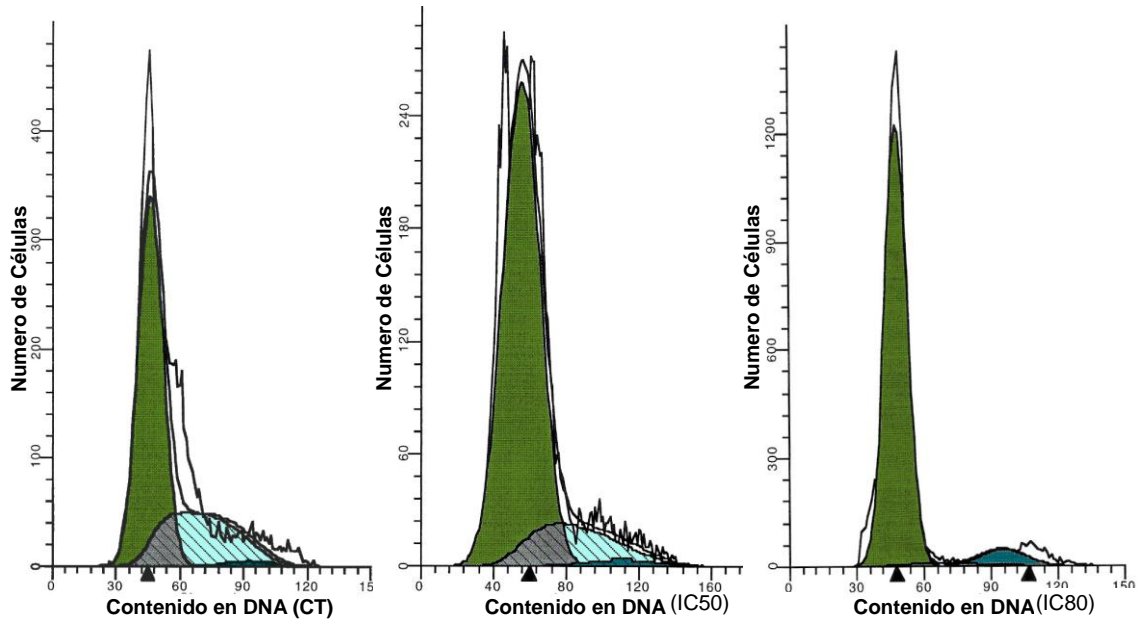
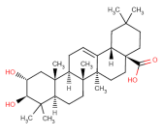


Figura 7.7 Histogramas del ciclo celular de células Caco-2 incubadas con ácido maslínico, a las concentraciones de CT, IC₅₀ e IC₈₀ durante 72 h. En los que se representa el número de células frente a la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio.

Caco-2	Maslínico(μg/mL)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
Control	0.0	75.6 ± 4.8	21.1 ± 8.6	5.0 ± 3.6
IC ₅₀	40.7	89.3 ± 5.1 **	9.1 ± 5.1 **	1.6 ± 1.4*
IC ₈₀	56.8	87.1 ± 3.0 *	6.3 ± 5.1**	6.6 ± 5.3

Tabla 7.3 Porcentaje de células Caco-2 en cada una de las distintas fases del ciclo celular, en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 72h. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

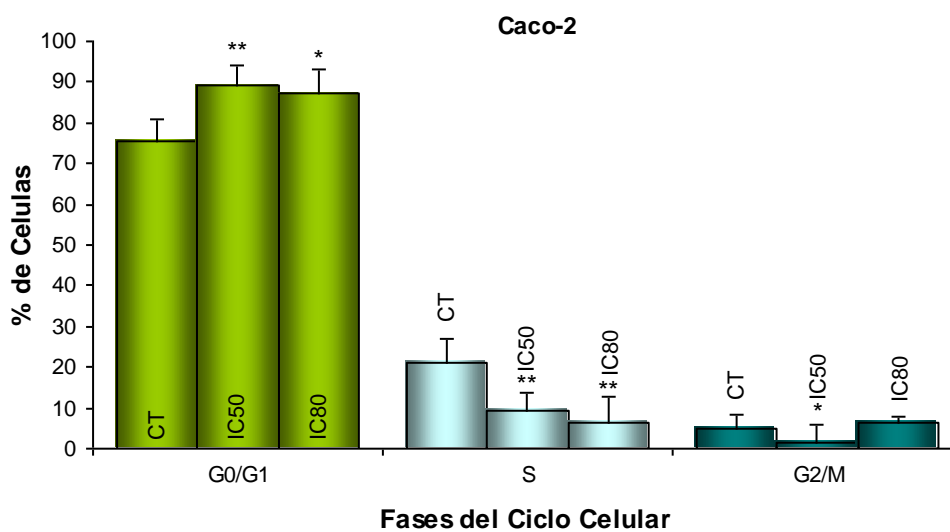
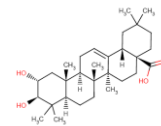


Figura 7.8 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células Caco-2 a las 72h de tratamiento. También Puede apreciarse cierto incremento de la fase G₀/G₁, así como una clara disminución de las fase S. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.



Al igual que en las células HT29, el marcado arresto de las células Caco-2 en la fase G_0/G_1 del ciclo celular, así como la disminución del número de células en la fase S, podría ser representativo de la inducción de cierta diferenciación celular en respuesta a la acción del ácido maslínico. Esta diferenciación podría ocurrir de forma simultánea con la inducción de apoptosis por parte del ácido maslínico.

Los resultados obtenidos indican que el ácido maslínico produce dos efectos significativos sobre el comportamiento celular en las células cancerígenas: arresto celular y apoptosis. Por otro lado, aunque la aparición de picos aneuploides no ha sido evidente en este análisis del ciclo celular a las 72 h de incubación, otros ensayos como el marcaje con anexinaV-FICT han permitido identificar y cuantificar la proporción de células que sufren el proceso de apoptosis a las 72h de incubación, tanto en células HT29, como en células Caco-2. La no aparición de células apoptóticas en los ensayos de ciclo celular probablemente se deba a que tras las 72h de tratamiento el proceso de apoptosis aún no ha llegado a sus estadios finales, que es cuando puede verse reflejado en el análisis del ciclo celular por la generación de picos aneuploides. Estos picos hipoploides pueden ser claramente identificados en las células HT29 tras 96h de tratamiento.

7.1.3 Línea no transformada IEC-6

Para determinar si los efectos encontrados en líneas tumorales eran reproducibles sobre las líneas no transformadas IEC-6 e IEC-18, se determinó el comportamiento del ciclo celular en estas líneas normales a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} halladas para la línea tumoral HT29 tras 72h de incubación. A estas concentraciones el ácido maslínico ha mostrado efectos sobre el ciclo celular en las líneas tumorales HT-29 y Caco-2 (ya que la concentración de IC_{80} de la línea HT29 se encuentra próxima a la concentración de IC_{50} de la línea Caco-2). Al igual que en las líneas tumorales el porcentaje de células en cada fase del ciclo se determinó por citometría de flujo, siendo calculado utilizando el programa Multicycle (Phoenix Flor Systems, San Diego, CA, USA).

Tras 24h de la siembra, se incubaron las células IEC-6 a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} correspondientes a la línea celular HT29. Se realizaron un total de 5 ensayos por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**figura 7.9**). Según estos resultados, el número de células en las fases G_0/G_1 y S prácticamente permanecen constantes, mientras que en la fase G_2/M su porcentaje disminuye aunque de forma no significativa (**tabla 7.4**).

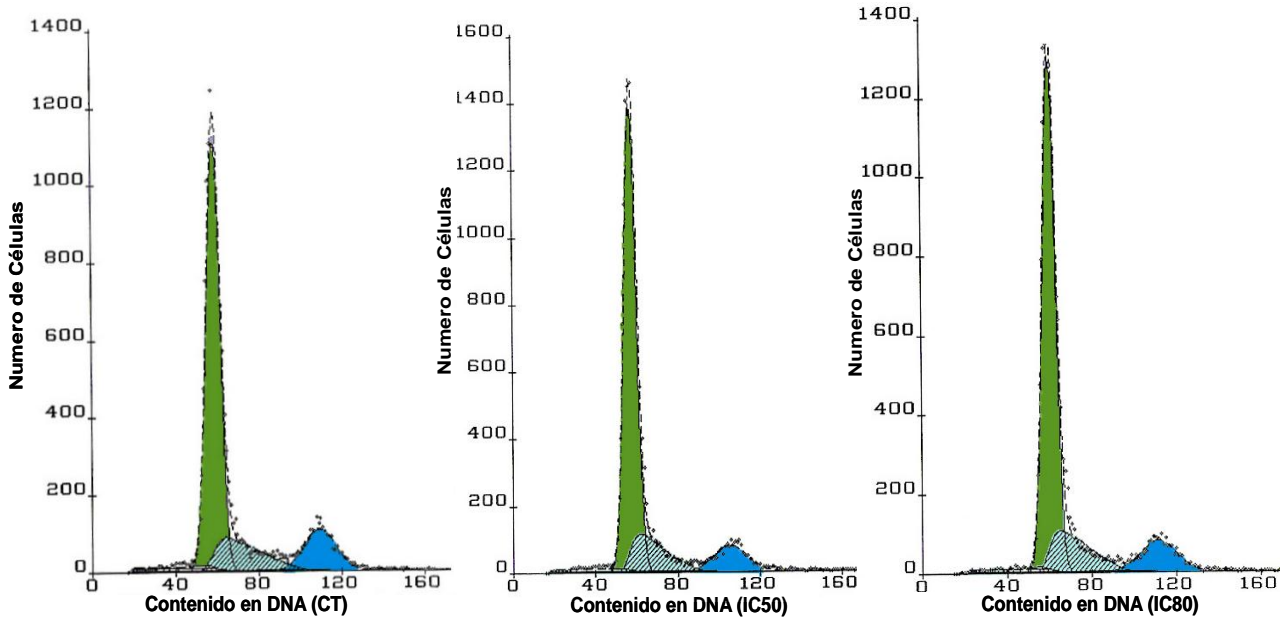
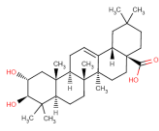


Figura 7.9 Histogramas del ciclo celular de células IEC-6 incubadas con ácido maslínico, a las concentraciones IC₅₀ e IC₈₀ de HT29, durante 72 h. Como puede observarse a las concentraciones y tiempos de incubación utilizados no hay cambio aparente del ciclo celular en este tipo celular.

IEC-6	Maslínico(µg/mL)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
Control	0.0	68.2 ± 6.5	19.6 ± 5.2	12.3 ± 4.1
IC ₅₀	28.8	69.9 ± 6.3	21.4 ± 3.2	8.7 ± 4.1
IC ₈₀	37.5	70.2 ± 2.5	21.1 ± 3.1	8.7 ± 2.2

Tabla 7.4 Porcentaje de células IEC-6 en cada una de las distintas fases del ciclo celular, en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 72h. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar.

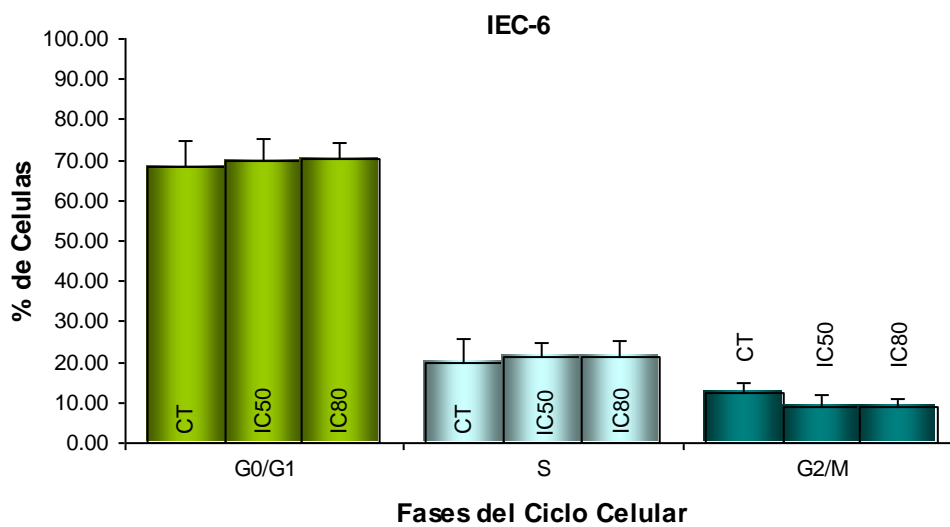
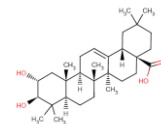


Figura 7.10 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células IEC-6 a las 72h de tratamiento. Como puede verse no existe respuesta en el ciclo celular respecto a la incubación con ácido maslínico.



Los resultados muestran que prácticamente no suceden cambios en las fases del ciclo celular en respuesta a la adición del ácido maslínico (**figura 7.10**). A diferencia con las líneas tumorales no se observa arresto celular en ninguna de las fases del ciclo, manteniéndose los porcentajes de células en cada fase del ciclo dentro de los valores normales, correspondiente a los controles, independientemente de la concentración de ácido maslínico utilizada.

7.1.4 Línea no transformada IEC-18

Al igual que las células IEC-6 las células IEC-18 fueron incubadas durante 72h a los valores de concentración de ácido maslínico correspondientes a la IC_{50} e IC_{80} encontrados para HT29 tras este tiempo de incubación. Se realizaron un total de 5 ensayos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**figura 7.11**).

En estos resultados puede observarse la ausencia de cambios apreciables en las diferentes fases del ciclo celular, de forma similar a los resultados encontrados para la línea IEC-6. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular permanecen prácticamente constantes independientemente de la concentración de ácido maslínico utilizada (**tabla 7.5; figura 7.12**). En ambas líneas, IEC-6 e IEC-18, se pueden apreciar algunas pequeñas variaciones en estos porcentajes pero estas variaciones no son significativas.

En resumen, podemos concluir que el ácido maslínico causa arresto celular en las líneas tumorales HT29 y Caco-2 tanto a concentraciones de IC_{50} como a IC_{80} tras 72 h de incubación. A 96h de incubación la apoptosis es claramente visible en los análisis del ciclo celular de las células HT29 a la concentración de IC_{80} . Por otro lado, en las líneas de células normales o no transformadas, IEC-6 e IEC-18, no se apreciaron efectos visibles en el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular, tras la incubación con ácido maslínico durante 72h a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} correspondientes a HT29. Sobre estas líneas normales tampoco se apreció la aparición de fragmentos o restos celulares que fuesen visibles en estos análisis.

Por tanto podemos concluir que los efectos del ácido maslínico parecen restringirse a las líneas tumorales Caco-2 y HT29 mientras que en las líneas normales IEC-6 e IEC-18 tales efectos no ocurren o no pueden ser apreciados a las concentraciones de ácido maslínico utilizadas. Por lo que el ácido maslínico parece tener un comportamiento diferencial respecto al análisis del ciclo celular en las líneas cancerígenas y líneas normales utilizadas.

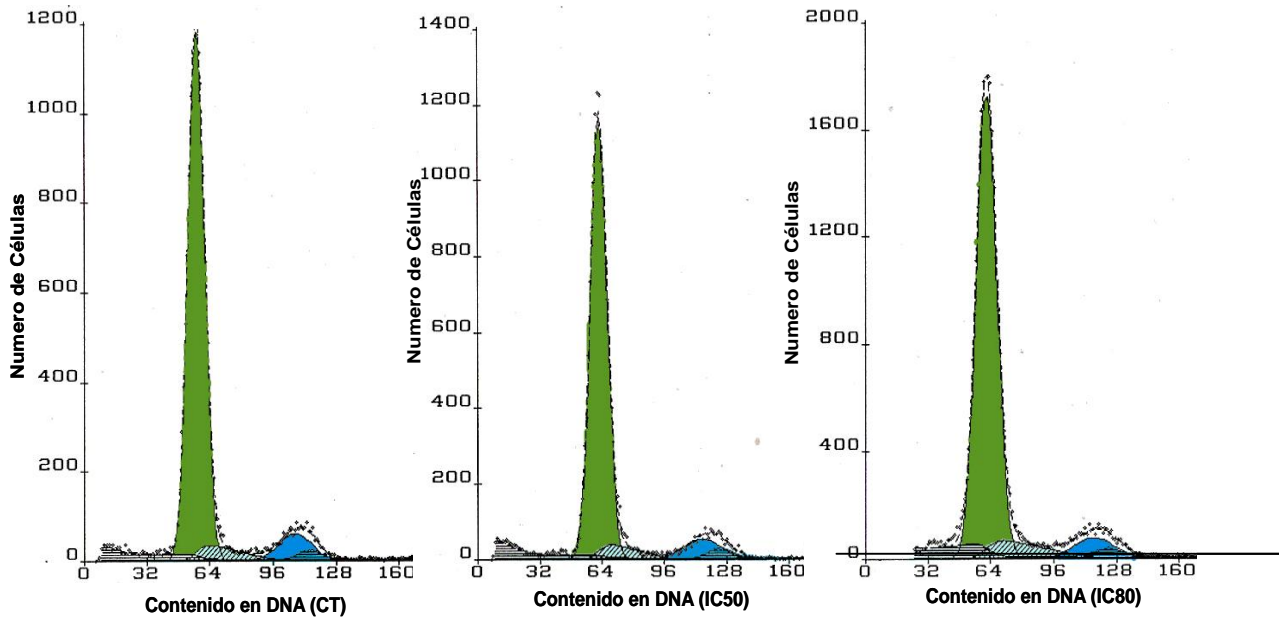
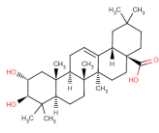


Figura 7.11 Histogramas del ciclo celular de células IEC-6 incubadas con ácido maslínico, a las concentraciones IC₅₀ e IC₈₀ de HT29, durante 72 h. Como puede observarse a las concentraciones y tiempos de incubación utilizados no hay cambio aparente del ciclo celular en este tipo celular.

IEC-18	Maslínico(µg/mL)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂ /M
Control	0.0	77.5 ± 8.7	12.7 ± 6.8	9.7 ± 2.5
IC ₅₀	28.8	78.9 ± 10.1	11.2 ± 8.1	9.8 ± 2.4
IC ₈₀	37.5	82.5 ± 4.6	8.0 ± 3.1	9.5 ± 2.1

Tabla 7.5 Porcentaje de células IEC-18 en cada una de las distintas fases del ciclo celular, en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 72h. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar.

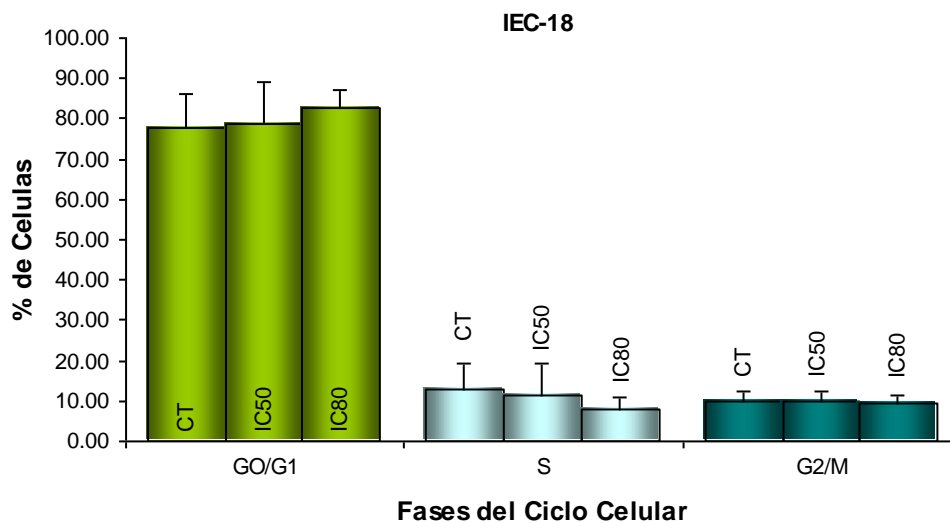
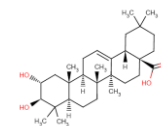


Figura 7.12 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células IEC-18 a las 72h de tratamiento. Como puede verse no existe respuesta en el ciclo celular respecto a la incubación con ácido maslínico.



7.2 Actividad enzimática fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina intestinal (IAP, *intestinal alkaline phosphatase*) es una enzima marcadora de diferenciación enterocítica que limita la absorción de ácidos grasos. Se encuentra habitualmente de forma constitutiva en las células del tracto intestinal. En líneas tumorales las células se desdiferencian debido a los procesos tumorgénicos. Generalmente por un aumento en la tasa de división celular, la célula pierde la funcionalidad propia del tejido de partida. Esta desdiferenciación parece estar ligada con la salida de la fase G_0/G_1 del ciclo celular en líneas tumorales. Si la célula tumoral logra diferenciarse de nuevo puede recuperar parte de las características propias de su linaje. La actividad fosfatasa alcalina es uno de los marcadores más utilizados en el estudio de la diferenciación tumoral de células de carcinoma de colon, a las que corresponden las líneas HT29 y Caco-2 (Liu y col., 2006; Dihal y col. 2007; Lea y col. 2007). Por último, la actividad de la fosfatasa alcalina intestinal se ha relacionado en carcinoma de colon, así como en la línea tumoral HT29 (Liu JJ y col., 2006), con la expresión de las proteínas p21 y p53 (Izawa y col., 2005).

El incremento de esta actividad unido al arresto del ciclo celular es un claro indicativo de diferenciación celular. Para determinar el efecto del ácido maslínico sobre la diferenciación en cáncer de colon se cuantificó la actividad fosfatasa alcalina sobre las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2 a la concentración de ácido maslínico correspondiente a sus respectivas IC_{50} y a la mitad de estas $IC_{50/2}$. Tras determinar la actividad enzimática específica en cada caso, ésta fue referida a los controles, dando el resultado como porcentaje respecto al control (tabla 7.6). Este ensayo fue realizado un total de cuatro veces por duplicado.

Actividad fosfatasa alcalina (% respecto al CT)	$IC_{50/2}$	IC_{50}
HT29	109.84 ± 21.95	$484.31 \pm 28.19^{**}$
Caco-2	125.22 ± 26.13	$212.05 \pm 99.5^*$

Tabla 7.6 Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina, respecto al control de células sin tratar, inducida por el ácido maslínico en células HT29 y Caco-2 tras 72h de tratamiento a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} . (Media \pm desviación estándar; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**)) respecto al control de células no tratadas)

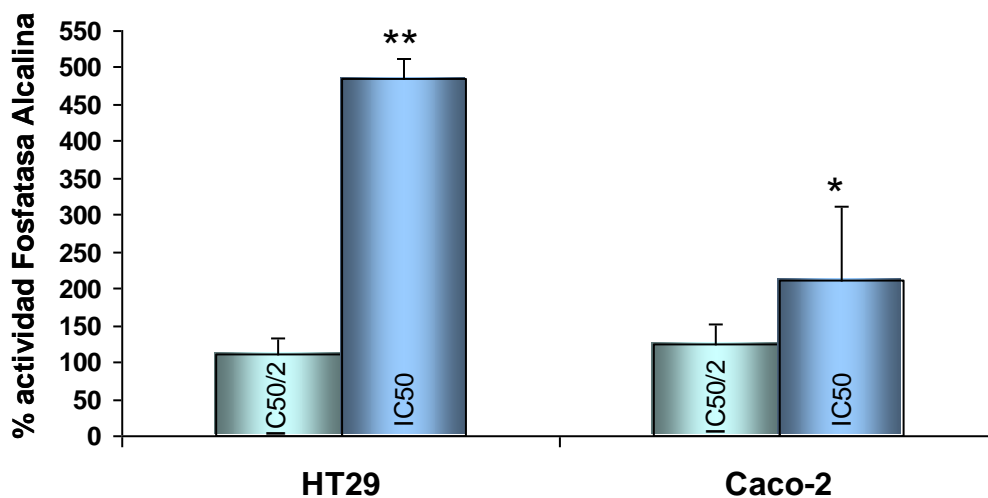
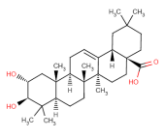
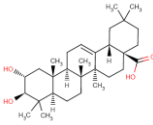


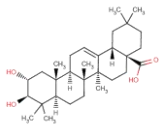
Figura 7.13 El ácido maslínico induce la actividad fosfatasa alcalina intestinal tras tratar las células HT29 y Caco-2 durante 72h con sus correspondientes IC_{50/2} e IC₅₀. Los valores representan la media \pm desviación estándar; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) respecto al control de células no tratadas.

Los resultados muestran un incremento en la actividad fosfatasa alcalina de forma dosis-dependiente a las 72h de tratamiento, siendo mayor a IC₅₀ que a IC_{50/2} (**Figura 7.13**). En HT29 el incremento fue de 4 veces respecto al control a la concentración de IC₅₀, mientras que en Caco-2 este incremento fue algo menor y menos significativo, siendo de tan solo dos veces respecto al control. Esta mayor actividad IAP en células HT29 podría estar relacionada con la activación de la proteína p53, la cual es capaz de inducir diferenciación y arresto celular, ambos fenómenos observados en esta línea celular. En células Caco-2 la inducción de la actividad IAP es menor, lo que se correlaciona con la no expresión de p53 en esta línea celular y su rápida entrada en apoptosis en respuesta al tratamiento con ácido maslínico, así como con el menor arresto observado en la fase del ciclo celular G₀/G₁.

Estos datos pueden también correlacionarse con la menor genotoxicidad del ácido maslínico en la línea HT29 así como con su rápida recuperación, mientras que en la línea Caco-2 la genotoxicidad se genera de una forma más rápida y su recuperación es más lenta. De forma que esta menor genotoxicidad así como su recuperación en células HT29, podría estar también relacionada la actividad p53, la cual enlazaría con la mayor capacidad de diferenciación de estas células.

Efecto anticancerígeno del ácido maslínico



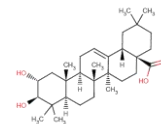


Capítulo 8

Resultados: Apoptosis

8.1 Análisis de apoptosis por citometría de flujo

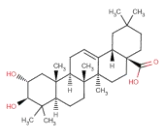
Del estudio del ciclo celular por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio (IP) es posible obtener una gran cantidad de información, pero debido a las limitaciones inherentes de este método no es posible determinar si la información obtenida hace referencia exclusivamente a procesos de apoptosis o, si por el contrario, puede deberse a otros procesos, ya que procesos tales como la contaminación bacteriana, desuniformidad en la población celular, fragmentación celular, necrosis, etc., también pueden generar la aparición de anomalías subG₀/G₁. Además, el estudio del ciclo celular sólo revela la aparición de apoptosis si ésta se encuentra en sus estadios finales, por lo que es recomendable combinar simultáneamente este análisis con otros ensayos. En este caso se cuantificó la apoptosis producida por el ácido maslínico mediante el marcaje con anexina V-FICT.



La anexina V posee una elevada afinidad por aminofosfolípidos como la fosfatidilserina que se encuentra en la zona externa de la bicapa lipídica en la membrana de las células apoptóticas, en las células normales dicho aminofosfolípido suele encontrarse en mayor proporción en la monocapa interna de la membrana, pero debido a los procesos que sufre la célula apoptótica, la proporción de aminofosfolípidos a ambos lados de la membrana cambia respecto a una célula normal. La anexina V se une específicamente a la membrana de la célula apoptótica. En este caso, además la anexina V está marcada con isotiocianato de fluoresceína (FICT) pudiendo ser cuantificada por citometría de flujo. El cambio de proporción en los aminofosfolípidos suele ocurrir de forma previa a la formación de los cuerpos apoptóticos, por lo que es posible determinar la aparición de apoptosis temprana.

Mediante el uso del citómetro de flujo, podemos clasificar las células en función de un marcaje doble con anexina y ioduro de propidio (IP), en este método aquellas células que posean un alto marcaje con IP serán las que tengan su membrana suficientemente desorganizada como para permitir que el IP penetre en su interior, en su mayoría células que se encuentren al final del proceso de apoptosis o necrosis. Si las células quedan marcadas únicamente con anexina-V significa que la membrana plasmática está sufriendo la alteración en la proporción de fosfolípidos propia de la apoptosis temprana. Un marcaje doble con ambos fluoróforos, indica que las células poseen alta concentración en la membrana externa de fosfatidilserina, y se encuentran con la membrana plasmática suficientemente alterada como para que penetre el IP, es decir, se corresponderían con las etapas finales del proceso de apoptosis, por tanto a una apoptosis tardía.

Para determinar la población de células apoptóticas representamos el logaritmo de la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína frente al logaritmo de la intensidad de fluorescencia del ioduro de propidio. A partir de las células control marcamos dos umbrales de forma arbitraria, dividiendo el diagrama en cuatro cuadrantes. De forma que si las células tratadas tienen un marcaje mayor en anexina se encontrarán por encima del umbral de anexina, igual ocurre con el marcaje con ioduro de propidio. Estos cuatro cuadrantes se corresponden con: células con elevado marcaje en anexina V-FITC y bajo en IP, células apoptóticas (apoptosis temprana); células con elevado marcaje en anexina V-FITC y en IP, células en las etapas finales del proceso de apoptosis (apoptosis tardía); células con bajo marcaje en anexina V-FITC y en IP, células normales; y por último, células con bajo marcaje en anexina V-FITC y elevado marcaje en IP, células necróticas.



8.1.1 Línea tumoral HT29

La capacidad de inducción de apoptosis por parte del ácido maslínico fue estudiada en las mismas condiciones en las que se realizaron los análisis del ciclo celular. Se incubaron las células HT29 durante 72h a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. A continuación se marcaron las células con anexina V-FICT y yoduro de propidio. Los porcentajes celulares con diferentes marcajes fueron cuantificados por citometría de flujo, utilizando un cuantificador activado por fluorescencia (FACS, *fluorescent activated cell sorter*). Se realizaron un total de 9 ensayos por duplicado a 72h. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**tabla 8.1**).

Los resultados obtenidos a 72h muestran la clara aparición de apoptosis en las células HT29, mediante este método podemos diferenciar entre apoptosis temprana y apoptosis tardía (**figura 8.1**). El tratamiento con ácido maslínico generó un 25% de células apoptóticas a la concentración de IC₅₀, siendo un 14% apoptosis temprana y un 11% apoptosis tardía. A la concentración de IC₈₀ el porcentaje de células apoptóticas fue de un 38%, siendo un 27% apoptosis temprana y un 11% apoptosis tardía (**tabla 8.1; figura 8.2**).

Esta apoptosis no se ve reflejada en los análisis del ciclo celular por lo que es probable que en este punto no se hayan generado aún cuerpos apoptóticos detectables por tinción con IP. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en el análisis del ciclo celular ya que como puede observarse a las 72h la mayor parte de la población celular se encuentra en el estadio de apoptosis temprana no detectables en los análisis del ciclo, que más adelante dará lugar a la formación de los cuerpos apoptóticos detectados en los análisis del ciclo a las 96h.

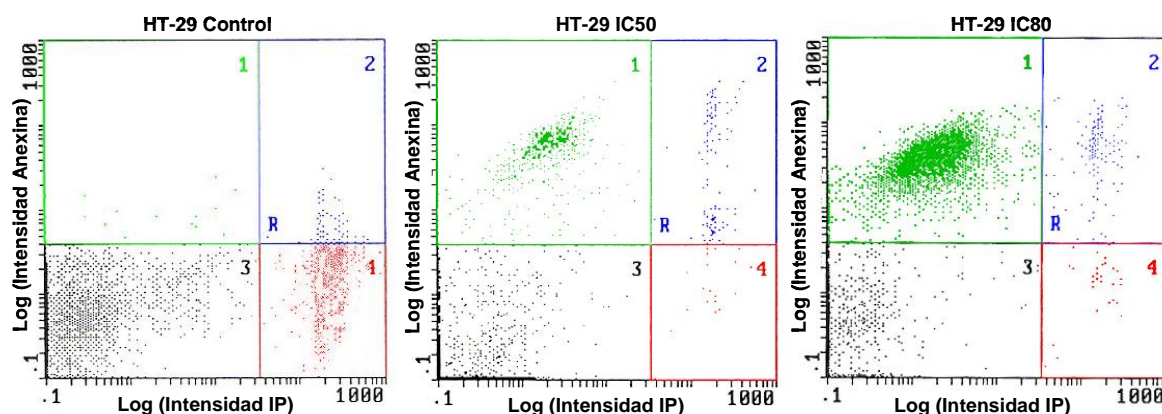
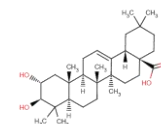


Figura 8.1 Representación del logaritmo de la intensidad de la anexina V-FICT frente al logaritmo de la intensidad del yoduro de propidio, en células HT29 a las concentraciones CT, IC₅₀, IC₈₀ tras 72h de incubación. Este tipo de representación nos permite visualizar las poblaciones celulares en función de su tinción con anexina o con yoduro de propidio. (Verde- apoptosis temprana; azul-apoptosis tardía; negro-células normales; rojo-necrosis)



HT29	Ácido Maslínico (µg/mL)	Normales	Apoptosis Temprana	Apoptosis Tardía	Necrosis
Control	0.0	92.01 ± 5.84	2.20 ± 1.40	3.46 ± 1.37	1.58 ± 1.90
IC ₅₀	28.8	73.01 ± 6.76 **	14.32 ± 4.13 **	10.86 ± 4.13 **	1.15 ± 0.77
IC ₈₀	37.5	59.73 ± 4.18 **	27.15 ± 7.60 **	10.49 ± 2.85 **	3.08 ± 3.12

Tabla 8.1 Porcentaje de células HT29 en cada una de las distintas poblaciones celulares en respuesta a la apoptosis inducida por el ácido maslínico durante 72h. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

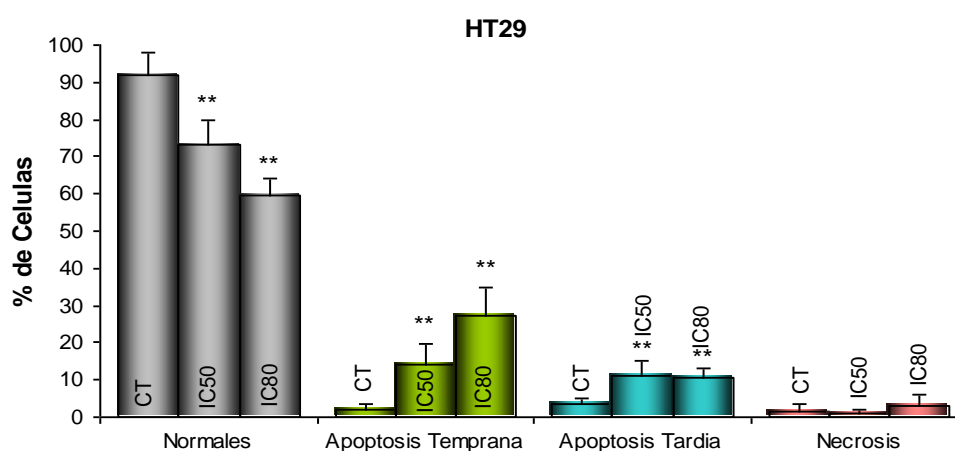


Figura 8.2 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida en células HT29 a las 72h de tratamiento. Puede apreciarse el incremento en la inducción de apoptosis temprana y tardía junto con una disminución del número de células de la población normal. Los resultados se dan como la media ± desviación estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

8.1.2 Línea tumoral Caco-2

Al igual que en el caso anterior, se incubaron las células Caco-2 con las concentraciones de ácido maslínico iguales a sus respectivas IC₅₀ e IC₈₀ determinadas para 72h. Se realizaron un total de 9 ensayos por duplicado. Tras la incubación con el ácido maslínico, las células fueron incubadas con anexina V-FICT e IP. Por último se llevó a cabo el análisis FACS, los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 8.2**. Estos resultados muestran un 14% de apoptosis a la concentración de IC₅₀, siendo un 7% apoptosis temprana y otro 7% apoptosis tardía, mientras que a la concentración de IC₈₀ el porcentaje de apoptosis aumentó drásticamente hasta un 60%, siendo un 15% apoptosis temprana y un 45% apoptosis tardía. En este caso, el porcentaje de células apoptóticas a IC₈₀ fue muy superior al encontrado en HT29, otra diferencia respecto a las células HT29 es que prácticamente la mitad de las células apoptóticas se encontraban en apoptosis tardía tras 72h de incubación.

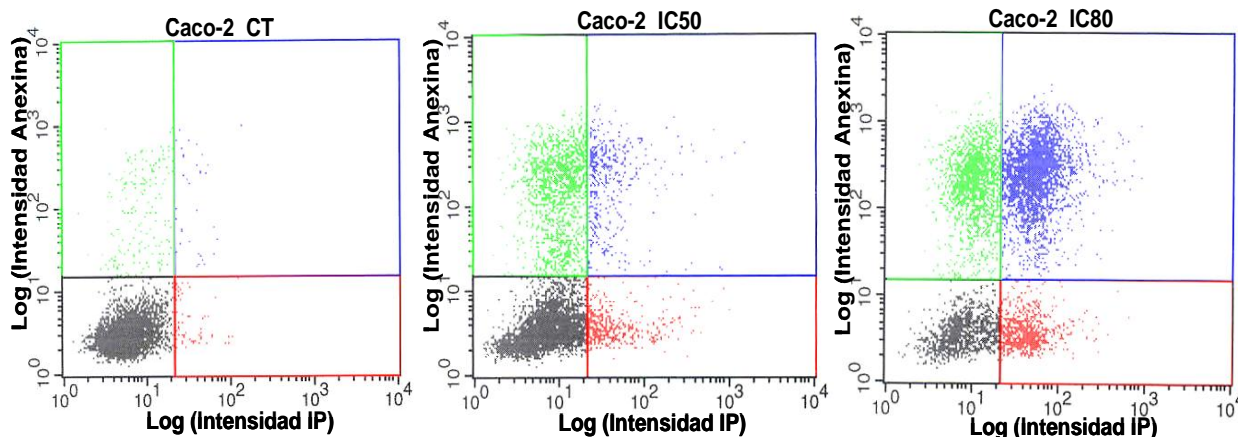
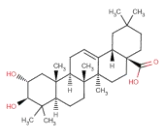


Figura 8.3 Representación del logaritmo de la intensidad de la anexinaV-FICT frente al logaritmo de la intensidad del yoduro de propidio, en células Caco-2 a las concentraciones de CT, IC₅₀, IC₈₀ y 72h de incubación. (Verde- apoptosis temprana; azul-apoptosis tardía; negro-células normales; rojo-necrosis)

Caco-2	Ácido (µg/mL)	Normales	Apoptosis Temprana	Apoptosis Tardía	Necrosis
Control	0.0	99.30 ± 1.11	1.63 ± 1.54	0.34 ± 0.21	1.59 ± 0.68
IC50	40.7	70.19 ± 7.19 **	6.76 ± 3.12 *	6.89 ± 2.67 **	12.81 ± 5.72 *
IC80	56.8	21.62 ± 4.68 **	15.05 ± 5.48 **	44.87 ± 2.97 **	18.23 ± 9.70 *

Tabla 8.2 Porcentaje de células Caco-2 en cada una de las distintas poblaciones celulares, en respuesta a la apoptosis inducida por el ácido maslínico durante 72h. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), con respecto a las controles de células no tratadas.

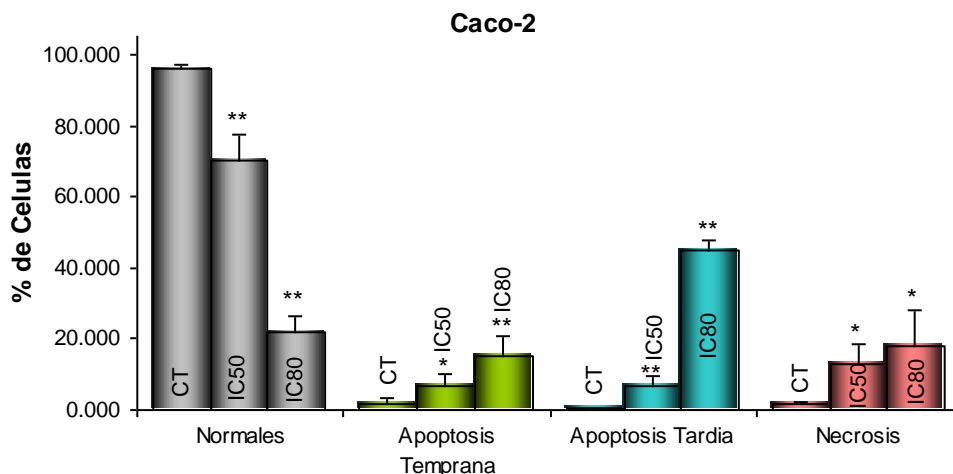
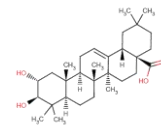


Figura 8.4 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida en células Caco-2 a las 72h de tratamiento. Puede apreciarse el incremento en la inducción de apoptosis tardía (anexina +; yoduro de propidio +) y en menor grado de apoptosis temprana, junto con una acentuada disminución del número de células en la población normal. Los resultados se dan como la media ± la desviación estándar.



Por último, el porcentaje de células teñidas exclusivamente con yoduro de propidio fue mayor al encontrado en células HT29 (**tabla 8.2, figura 8.4**). Como ocurre en HT29, a 72h aún no se ha desencadenado la formación de cuerpos apoptóticos detectables por análisis del ciclo celular.

Todos estos resultados podrían indicar que las células Caco-2 son más sensibles a la inducción de apoptosis por parte del ácido maslínico que las células HT29, mientras que estas últimas parecen tener una respuesta mayor al efecto diferenciador del ácido maslínico. Estos resultados podrían estar relacionados con el genotipo diferencial de estos dos tipos celulares ya que las células Caco-2 son p53 deficientes, mientras que HT29 sobreexpresa p53. Se sabe que p53 es una proteína que desencadena, por una parte fenómenos de arresto y diferenciación celular, y por otra contribuye a la entrada en apoptosis de la célula cuando esta diferenciación no se ha conseguido. Si el ácido maslínico induce de alguna manera la expresión de este factor de transcripción, este hecho podría estar relacionado con la entrada tardía de las células HT29 en apoptosis ya que éstas intentarían diferenciarse y evitar, por tanto, la muerte celular. Mientras que las células Caco-2 entran directamente en apoptosis ya que han perdido la capacidad de diferenciarse mediante este mecanismo.

8.1.3 Línea no transformada IEC-6

Ya que los análisis del ciclo celular mostraron un comportamiento diferencial en respuesta al tratamiento con ácido maslínico entre las líneas tumorales HT29 y Caco-2, y las líneas normales IEC-6 e IEC-18, se ha estudiado la posible inducción de apoptosis del ácido maslínico sobre estas líneas normales. Al igual que en las líneas cancerígenas se trataron las líneas normales, o no transformadas, con ácido maslínico durante 72h. A continuación las células fueron marcadas con un doble marcaje anexina V-FICT e yoduro de propidio. Por último, se cuantificó la apoptosis por citometría de flujo, utilizando un contador activado por fluorescencia (FACS, *fluorescent activated cell sorter*).

Se determinó el porcentaje de células IEC-6 apoptóticas tras ser incubadas durante 72h a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ halladas para la línea tumoral HT29 tras 72h de incubación. Se realizaron un total de 5 ensayos por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**Figura 8.5**).

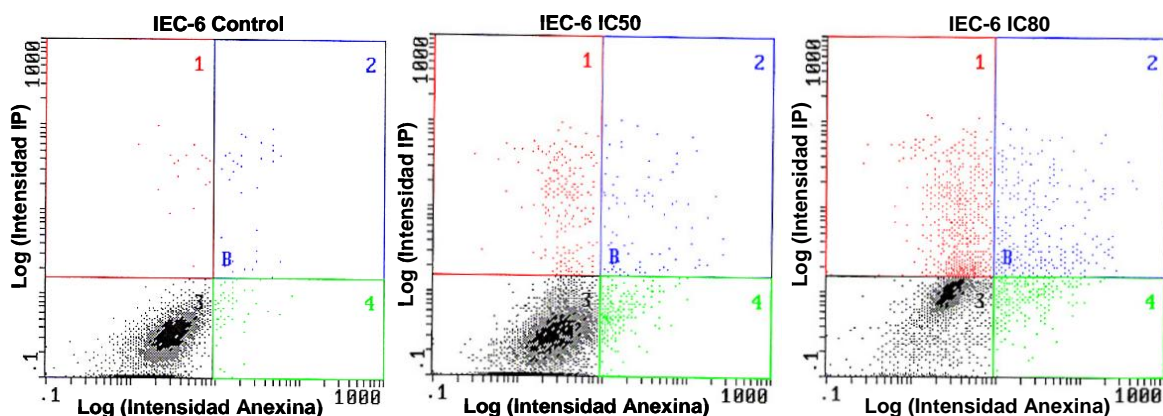
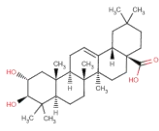


Figura 8.5 Representación del logaritmo de la intensidad de la anexinaV-FICT frente al logaritmo de la intensidad del yoduro de propidio, en células IEC-6 a las concentraciones CT, IC₅₀, IC₈₀ y 72h de incubación. (Verde- apoptosis temprana; azul-apoptosis tardía; negro-células normales; rojo-necrosis)

IEC-6	Ácido (µg/mL)	Normales	Apoptosis Temprana	Apoptosis Tardía	Necrosis
Control	0.0	85.64 ± 7.02	5.83 ± 3.86	4.75 ± 2.39	3.76 ± 0.67
IC50	28.8	82.88 ± 4.38	8.82 ± 4.31	2.81 ± 1.57	5.46 ± 2.68
IC80	37.5	75.26 ± 7.89	3.38 ± 1.78	5.66 ± 4.23	14.07 ± 3.22

Tabla 8.4 Porcentaje de células IEC-6 en cada una de las distintas poblaciones celulares, en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 72h. En este caso los resultados no fueron significativos, respecto a las controles de células no tratadas.

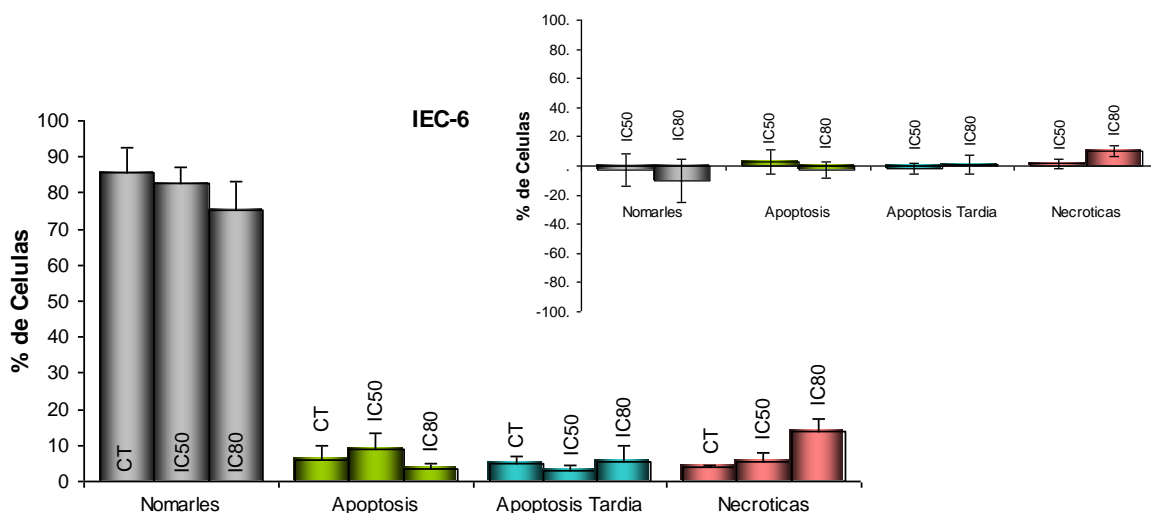
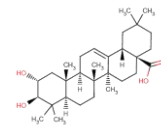


Figura 8.6 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida sobre células IEC-6 a las 72h de tratamiento. A la derecha incremento de las poblaciones respecto a los valores control. Los resultados se dan como la media ± la desviación estándar.



Como se puede observar en los resultados obtenidos existe una proporción muy baja de células que entran en apoptosis (verde) y en necrosis (rojo), manteniéndose el grueso de la población sin cambios (negro) (**figura 8.6**). Aunque en un primer momento podría pensarse que existen valores elevados de células apoptóticas y necróticas, estos valores no son significativos respecto al control ($p > 0.05$). En este tipo celular parece haber cierta población de células necróticas y apoptóticas presente en los controles (**tabla 8.4**). Por lo que si observamos el incremento respecto al control los valores encontrados son muy bajos, no existiendo variación dentro del error experimental (gráfica superior derecha **figura 8.6**).

8.1.4 Línea no transformada IEC-18.

Al igual que en la línea celular IEC-6, las células IEC-18 fueron incubadas durante 72h, a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} obtenidas para HT29 tras 72h de incubación. Se realizaron un total de 5 ensayos por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**Tabla 8.5**).

Al igual que en las células IEC-6, en las células IEC-18 parece haber, cierta inducción en la población de células necróticas en respuesta al tratamiento con el ácido maslínico. Aunque si nos fijamos en el valor de la población de células necróticas en los controles puede apreciarse que este incremento no es significativo (**Figura 8.8**, gráfica superior derecha). Este elevado porcentaje de células necróticas puede explicarse por la presencia basal de este tipo de población. Aunque, probablemente, estos resultados pueden deberse a una mala calibración en los umbrales de los límites en los distintos tipos de poblaciones celulares, tomando como referencia las células control (**Figura 8.7**).

En resumen, podemos concluir que, en cuanto a la inducción de apoptosis, el ácido maslínico parece tener un efecto distinto sobre las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2, que sobre las líneas normales IEC-6 e IEC-18, a las concentraciones y tiempos ensayados. Por tanto, la inducción de citotoxicidad en estas líneas normales es probable que medie a través de fenómenos distintos o incluso mediante la inducción de apoptosis, pero a concentraciones superiores de ácido maslínico.

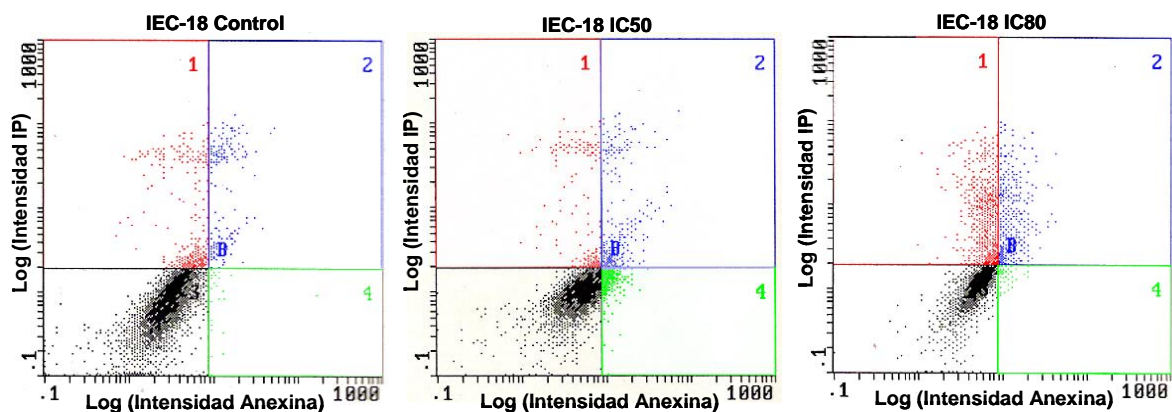
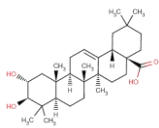


Figura 8.7 Representación del logaritmo de la intensidad de la anexinaV-FICT frente al logaritmo de la intensidad del yoduro de propidio, en células IEC-18 a las concentraciones CT, IC₅₀, IC₈₀ y 72h de incubación. (Verde- apoptosis temprana; azul-apoptosis tardía; negro-células normales; rojo-necrosis)

IEC-18	Ácido (µg/mL)	Normales	Apoptosis Temprana	Apoptosis Tardía	Necrosis
Control	0.0	87.38 ± 4.06	0.46 ± 0.37	2.61 ± 2.28	9.54 ± 2.38
IC50	28.8	81.43 ± 9.34	7.12 ± 4.36	7.06 ± 3.75	4.32 ± 1.67
IC80	37.5	78.17 ± 5.76	2.13 ± 0.93	3.50 ± 2.65	16.70 ± 4.94

Tabla 8.5 Porcentaje de células IEC-18 en cada una de las distintas poblaciones celulares, en respuesta al tratamiento con ácido maslínico durante 72h. En este caso los resultados no fueron significativos respecto a los controles de células no tratadas.

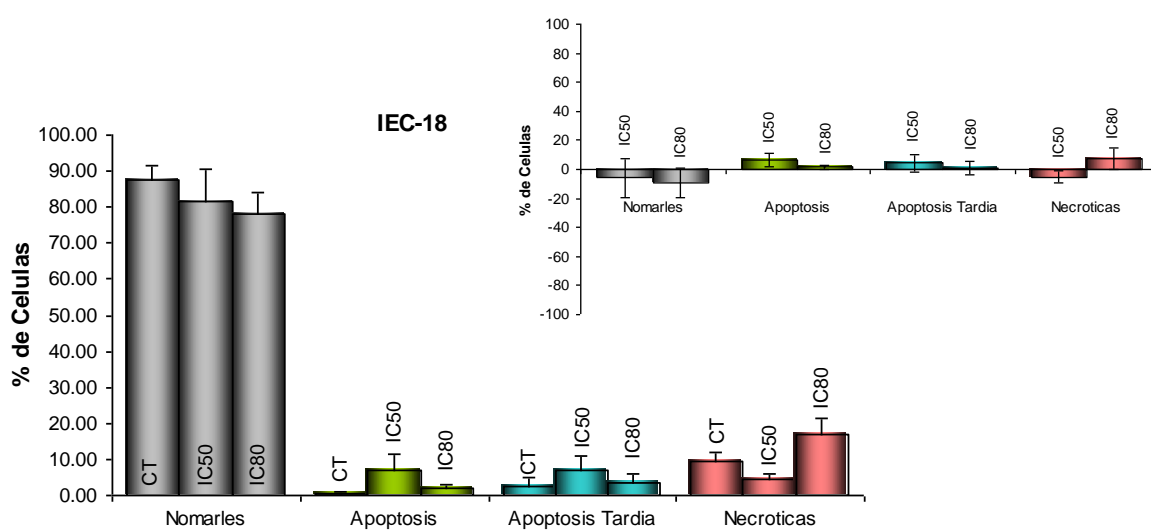
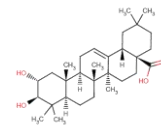


Figura 8.8 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida sobre células IEC-18 a las 72h de tratamiento. A la derecha incremento de las poblaciones respecto a los valores control. Los resultados se dan como la media ± la desviación estándar.



8.2 Ensayos de microscopía

8.2.1 Microscopía óptica

Durante las etapas finales del proceso de apoptosis ocurren una serie de cambios morfológicos que pueden ser observados por microscopía óptica o de fluorescencia. Entre estos cambios se encuentran la disminución del volumen celular, agrupación de los orgánulos y de la cromatina nuclear, así como la adquisición de un aspecto vesiculado de la membrana plasmática (*blebbing*), condensación del núcleo en una esfera densa (picnosis) y, por último, la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos. A través de la microscopía óptica pueden observarse aquellos fenómenos que son más claramente visibles como son: el descenso en la proliferación del cultivo, pérdida del volumen celular, fragmentación celular y cambios en el tamaño y morfología de aquellas células que aún continúan viables durante el tratamiento.

8.2.1.1 Línea tumoral HT-29

Se tomaron varias imágenes de microscopía óptica de las células HT29 durante su incubación con el ácido maslínico a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} determinadas para este tipo celular a 72h. Las imágenes fueron tomadas a los tiempos de incubación: 24h, 48h y 72h, utilizando un microscopio óptico invertido de contraste de fase (*Olympus ck2, Olympus Europa, Hamburg*) con un objetivo del 40x y una cámara digital Fujifilm A205S (*Fuji Photo Film CO., LTD.*).

En las imágenes tomadas (**figura 8.9**) se puede observar la disminución de la confluencia celular de forma dosis y tiempo dependiente, así como la aparición de fragmentos celulares y/o cuerpos apoptóticos que aparecen en las imágenes como cuerpos refringentes. Por otro lado, resulta muy interesante la aparente diferenciación morfológica de las células que aún continúan viables con respecto a las células controles (**figura 8.9, 72h- IC_{50}/IC_{80}**). Estos cambios morfológicos son más evidentes cuanto mayor es el tiempo de incubación. Las células que aún continúan viables parecen tener un mayor volumen celular y presentan ciertas proyecciones de la membrana plasmática, que pueden observarse en las imágenes. Aunque esta morfología podría deberse a la menor confluencia del cultivo, no ha sido observada en células control durante los primeros estadios del desarrollo del cultivo celular.

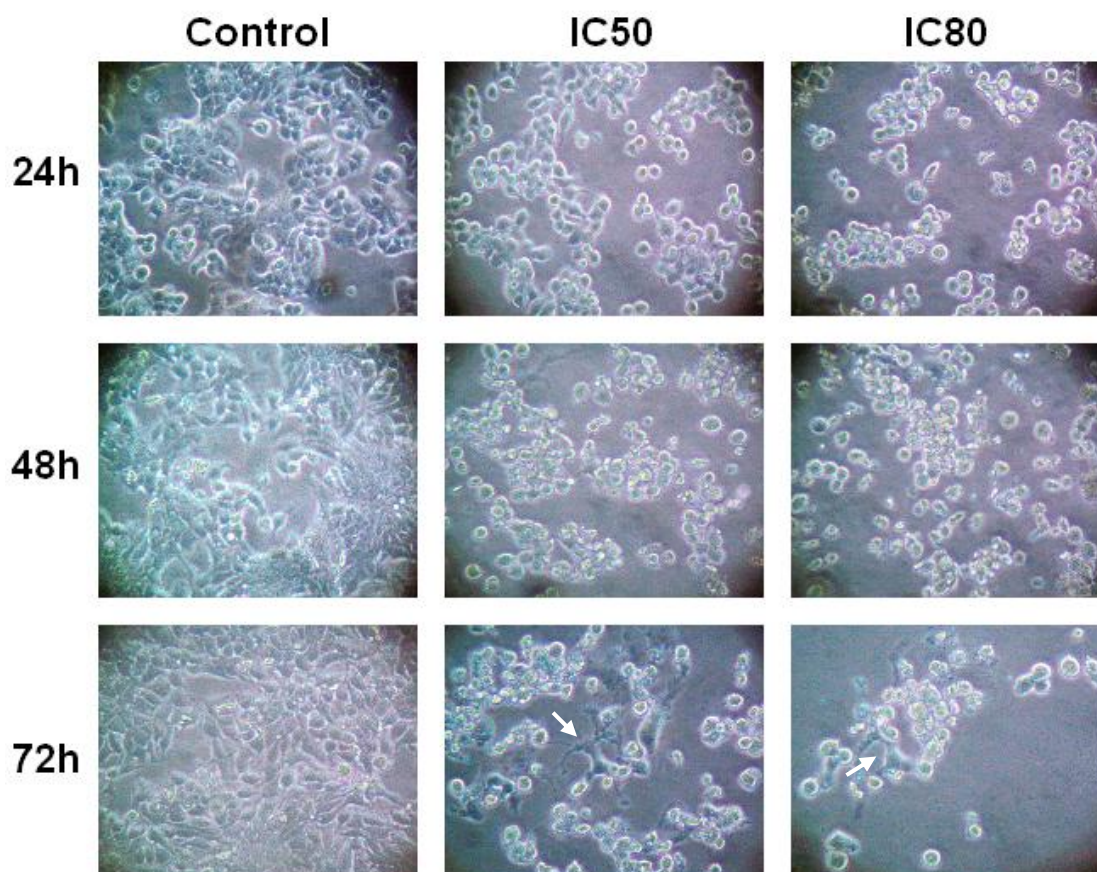
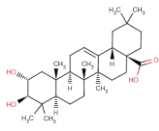


Figura 8.9 Imágenes de microscopía óptica de células HT29 incubadas a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} de ácido maslínico durante 24, 48, 72h. Se puede observar el aumento de cuerpos refringentes, así como el descenso de la confluencia del cultivo.

8.2.1.2 Línea tumoral Caco-2

Al igual que en el caso de las células HT29 se tomaron varias imágenes durante el cultivo de células Caco-2 incubadas con sus respectivas concentraciones de IC_{50} e IC_{80} determinadas a 72h. Las imágenes fueron tomadas transcurridas 24h, 48h y 72h. En estas imágenes (**figura 8.10**), se puede observar la aparición de fragmentos y cuerpos refringentes correspondientes a restos celulares y/o cuerpos apoptóticos, simultáneamente aparece también la disminución en la densidad del cultivo de forma dosis y tiempo dependiente.

Comparando estas imágenes con las obtenidas en células HT29 se pueden observar varias características diferenciales en la acción del ácido maslínico sobre estos dos tipos celulares. El efecto citotóxico del maslínico sobre las células Caco-2 ocurre de una forma más inmediata que sobre las células HT29. También en este caso puede apreciarse cierto cambio morfológico en las células tratadas (24h- IC_{80} ; 48h- IC_{50} ; 72h- IC_{50}) respecto a las células controles (**figura 8.10**).

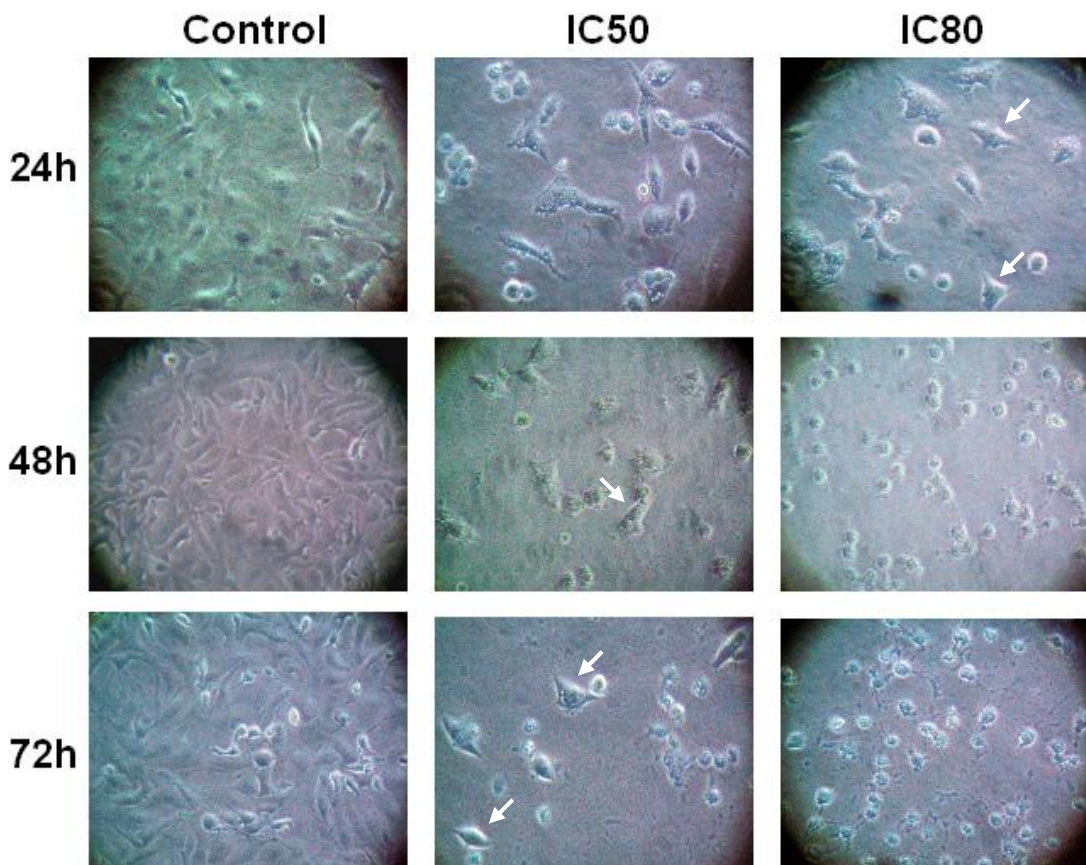
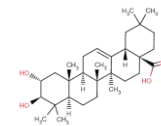
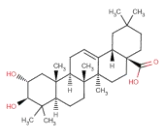


Figura 8.10 Imágenes de microscopía óptica de células Caco 2 incubadas con concentraciones IC 50 e IC 80 de ácido maslínico durante 24, 48, 72h. Puede observarse la disminución de la confluencia tiempo y dosis dependiente

Al igual que en el caso anterior, también ocurre un aumento de volumen en las que continúan viables, pero al contrario que en células HT29 las células Caco-2 parecen adquirir un aspecto más poligonal cuanto mayor es el tiempo de incubación. Ambas líneas celulares disminuyen su confluencia y aparentemente cambian su morfología, aunque este cambio podría estar relacionado con la disminución de la confluencia del cultivo.

8.2.2 Microscopía de fluorescencia

Mediante microscopía de fluorescencia pueden observarse componentes subcelulares de una forma más nítida y clara que con la microscopía óptica de interferencia de fase. En este tipo de microscopía la muestra es tratada con un fluoróforo, el cual absorbe intensidad lumínica a una determinada longitud de onda y emite intensidad lumínica a una longitud mayor, pudiendo ser visualizada a través del filtro adecuado, el cual deja pasar únicamente la longitud de onda de la luz emitida.



Los fluoróforos utilizados en los ensayos realizados han sido: Hoechst que permite la visualización de los cambios que tienen lugar a nivel nuclear durante el proceso de apoptosis, isotiocianato de fluoresceína (FIT) que unido a anexina V, permite la visualización de los cambios que tienen lugar a nivel de la membrana plasmática. Este último junto con la tinción con yoduro de propidio (IP) permite la identificación de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. Y por último se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilidol) que permite la visualización de las hebras de DNA de doble cadena, para revelar la integridad de las hebras cromosómicas en los ensayos de electroforesis en microgel (capítulo 7).

8.2.2.1 Tinción con Hoechst

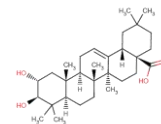
8.2.2.1.1 Línea tumoral HT29

Se incubaron las células HT29 con ácido maslínico durante 24h, 48h y 72h a la concentración de ácido maslínico igual a la IC_{80} hallada para 72h. A continuación tras ser incubadas con Hoechst se visualizó la muestra en un microscopio de fluorescencia utilizando aceite de inmersión y filtro DAPI. El Hoechst tiñe con mayor intensidad aquellos núcleos que contienen la cromatina más condensada, una característica típica que muestran las células durante el proceso de apoptosis (**Figura 8.11**).

Después de 24h de exposición al ácido maslínico, las células mostraron los cambios apoptóticos típicos, incluyendo la reducción del volumen celular, pérdida de la arquitectura nuclear normal, comenzando a apreciarse la condensación de la cromatina nuclear, aunque a este tiempo aún no se aprecia la aparición de cuerpos apoptóticos. A las 48h de incubación fue evidente la disrupción en la integridad de la membrana celular así como la visualización de algunos cuerpos apoptóticos. A las 72h de incubación se aprecia claramente la condensación de la cromatina, así como un importante aumento en el número de cuerpos apoptóticos.

8.2.2.1.2 Línea tumoral Caco-2

Al igual que las células HT29, las células Caco-2 fueron incubadas durante 24h, 48h y 72h con la concentración de ácido maslínico correspondiente a su IC_{80} para 72h. Las imágenes fueron tomadas al igual que en el caso anterior mediante microscopía de fluorescencia utilizando aceite de inmersión y filtro DAPI (**figura 8.11**).



En el caso de las células Caco-2 puede apreciarse como tras 24h del comienzo del tratamiento se dan los cambios típicos asociados a los fenómenos de apoptosis (pérdida del volumen celular y de la arquitectura nuclear), condensación de la cromatina nuclear y la aparición de algunos cuerpos apoptóticos. A 48h de incubación el número de cuerpos apoptóticos es mayor, así como el número de células con núcleos condensados, siendo todos estos fenómenos claramente visibles tras las 72h de incubación.

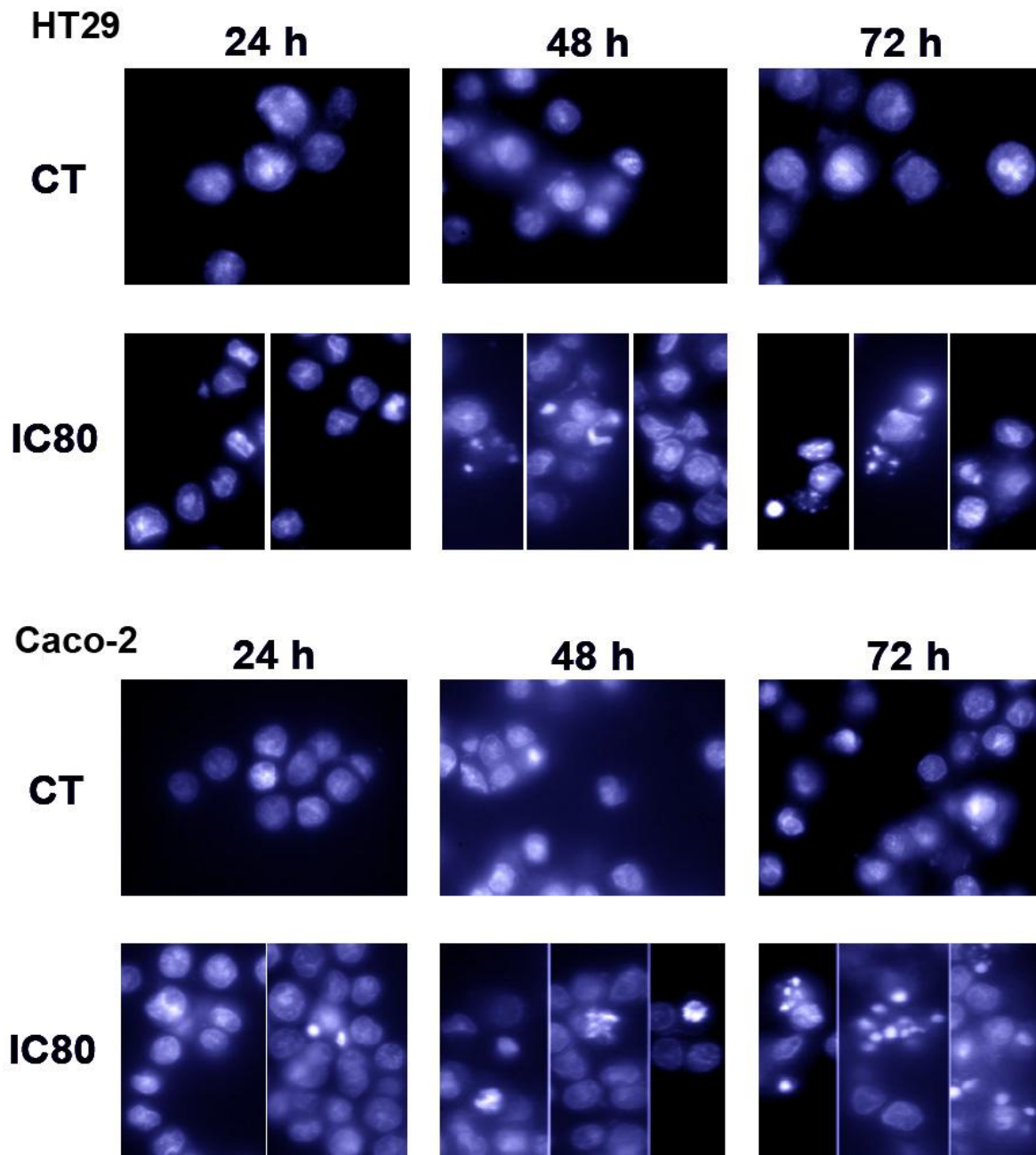
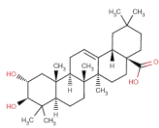


Figura 8.11 Cambios morfológicos en células de carcinoma de colon, HT29 y Caco-2 tras ser tratadas con ácido maslínico a las concentraciones de IC_{80} durante 24h, 48h y 72h. Imágenes obtenidas por tinción Hoechst y microscopía fluorescencia. Puede observarse un aumento en los cuerpos apoptóticos en HT29 y Caco-2 tanto tiempo como concentración dependiente.



8.2.2.2 Tinción con anexina V-FICT e yoduro de propidio

Además del ensayo de citometría de flujo por tinción con anexina V-FICT e yoduro de propidio, se realizó un análisis por microscopía de fluorescencia de los efectos del ácido maslínico sobre la línea celular HT29, utilizando estos mismos compuestos, con objeto de corroborar visualmente los resultados obtenidos por citometría de flujo, pudiendo apreciar los cambios morfológicos desencadenados durante el proceso de apoptosis.

Se incubaron las células HT29 con ácido maslínico a las concentraciones de IC₈₀ e IC₅₀ durante 72h. Se contabilizó el número de células vivas por marcaje con eosina. A continuación las células fueron marcadas con anexina V-FICT e yoduro de propidio (IP). En los resultados puede observarse las distintas poblaciones celulares: células vivas (aparecen claras en el marcaje con eosina); células muertas (aparecen oscuras en el marcaje con eosina); células apoptóticas: en apoptosis temprana (células marcadas únicamente con anexina V-FICT), apoptosis tardía (células marcadas con anexina V-FICT e IP) y células necróticas (células marcadas con IP). A continuación se hizo un recuento de células teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: El porcentaje de células viables se contabilizó por el marcaje con eosina, así como el porcentaje de células no viables, siendo consideradas como necróticas. En el porcentaje de células apoptóticas se consideraron aquellas células marcadas con anexina V-FICT (anexina+) y aquellas marcadas con anexina e yoduro de propidio (anexina+, IP+) (**tabla 8.6**). Los resultados obtenidos fueron:

HT29	% Apoptóticas	% Necróticas	% Vivas
Control	7.59 ± 0.22	2.76 ± 0.17	89.65 ± 3.04
IC ₅₀	31.11 ± 1.36	16.66 ± 0.46	52.22 ± 4.53
IC ₈₀	45.58 ± 2.77	22.91 ± 2.11	31.51 ± 0.37

Tabla 8.6 Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas (anexina+), células muertas y células vivas. Los contajes fueron realizados manualmente, con el uso de un microscopio de fluorescencia (DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Morfológicamente se observa claramente la tinción de la membrana plasmática con anexina-V en las células apoptóticas, así como la desorganización de la membrana celular externa y la entrada del yoduro de propidio en el interior celular tiñendo el DNA. Por último, también se visualizaron células teñidas únicamente con yoduro de propidio. Estas células a pesar de haber sido consideradas como células necróticas, también pueden provenir de células que han pasado y finalizado el proceso de apoptosis (**figura 8.12**).

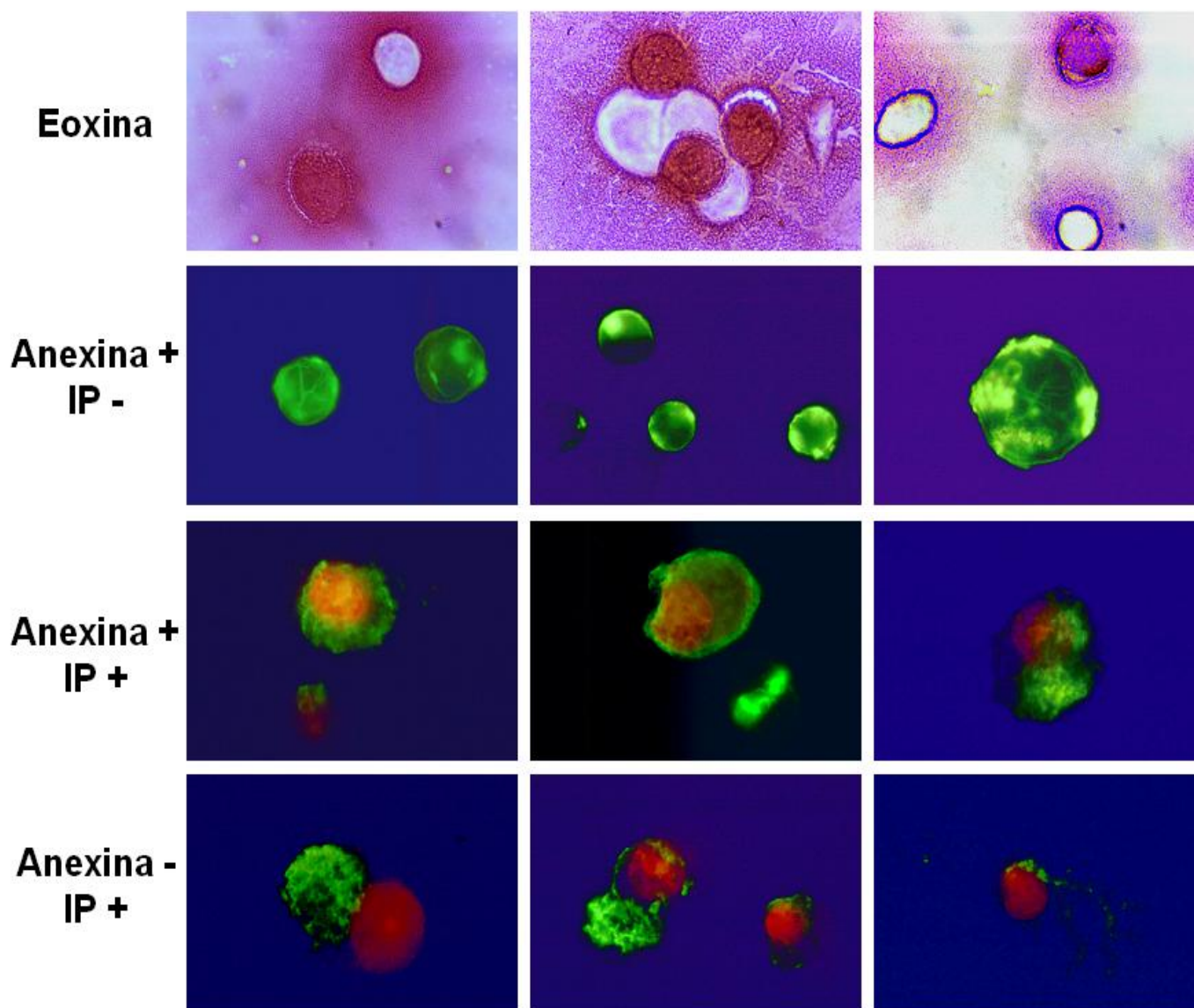
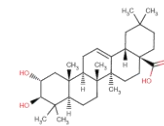
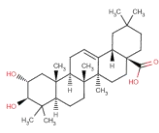


Figura 8.12 Imágenes de microscopía de fluorescencia en células HT 29 tras 72h de incubación con ácido maslínico. Tinción con eosina; células vivas en blanco, células muertas en rojo. Tinción Anexina⁺ Ioduro de propidio⁻: Apoptosis temprana Anexina⁺ Ioduro de propidio⁺ Apoptosis tardía. Anexina⁻ Ioduro de Propidio⁺: Necrosis.

Como puede observarse los resultados obtenidos concuerdan bastante bien con los encontrados por citometría de flujo, aunque siendo algo superiores, entran dentro del rango de error de los ensayos citométricos. Quizás el porcentaje de células necróticas es más elevado debido probablemente a que en la tinción con eosina también aparecen como no viables aquellas células que se encuentran en los estadios finales del proceso de apoptosis. Las imágenes obtenidas (**figura 8.12**) ilustran claramente el proceso de apoptosis inducido en células HT29 como respuesta a la acción del ácido maslínico.



8.3 Electroforesis de DNA

Uno de los ensayos que más claramente demuestran la existencia de apoptosis celulares es la fragmentación internucleosomal del DNA nuclear. Esta ruptura internucleosomal hace que el DNA fragmentado adopte un patrón característico cuando es sometido a electroforesis en gel de agarosa. Los nucleosomas están formados por la asociación entre DNA e histonas, estos complejos se encuentran separados por un número aproximadamente constante de pares de bases de entre 180 a 200 pares de bases. De forma que cuando el DNA es fragmentado a la altura de los nucleosomas los fragmentos que se forman poseen este tamaño, 180-200 pb o múltiplos del mismo de hasta 5 a 6 veces dicho número, lo que produce una imposibilidad de la transcripción de forma irreversible. Al correr este DNA en un gel de agarosa, los fragmentos de distinto tamaño quedan separados de forma equidistante entre sí adoptando el típico patrón en escalera del DNA apoptótico. Este proceso de fragmentación se debe en última instancia a la activación de la caspasa-3. La caspasa-3, miembro de la familia de las cisteínproteasas, es como ya se ha comentado, la principal caspasa efectora. Entre otros fenómenos desencadenados por esta enzima hay dos directamente relacionados con la aparición del DNA apoptótico. Por un lado, inhibe la actividad de la enzima nuclear poli-ADP-polimerasa (PPARP), encargada de reparar el DNA. Y por otro, inhibe ICAD (inhibidor del complejo DNasa activado por caspasa) que es el responsable de inhibir CAD (complejo DNasa activado por caspasa) la cual es la enzima encargada de fragmentar el DNA nuclear dando lugar al DNA apoptótico.

Se determinó la aparición de DNA apoptótico tanto en células HT29, como en células Caco-2. Tras las 24h de la siembra se incubaron estas líneas celulares con ácido maslínico durante 72h a sus respectivas concentraciones de IC_{50} e IC_{80} , halladas en cada línea celular para este tiempo de incubación, tras lo cual se extrajo el DNA nuclear, siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, siendo separado electroforéticamente. Por último, el DNA fue visualizado y fotografiado bajo luz ultravioleta. Se realizaron, al menos, 5 ensayos por duplicado para cada línea celular. Los resultados se muestran en las siguientes imágenes (**figura 8.13**). Como puede observarse en los resultados obtenidos, el ácido maslínico induce una clara ruptura del DNA a nivel internucleosomal en ambas líneas celulares HT29 y Caco-2. Esta fragmentación sucede tanto a concentraciones de IC_{50} , como de IC_{80} . En el caso de las células Caco-2 la aparición del típico patrón en escalera fue evidente en todos los ensayos realizados.

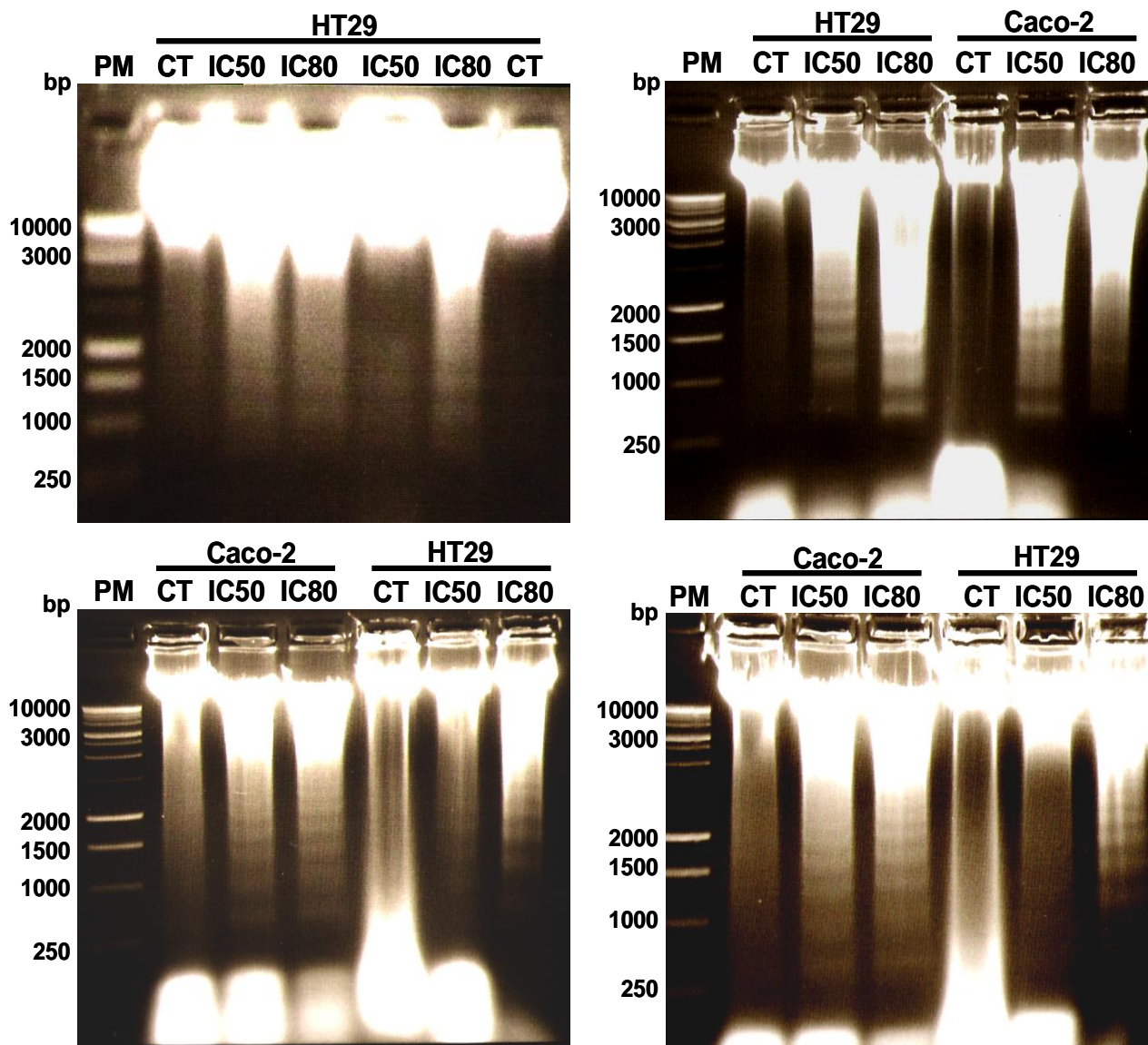
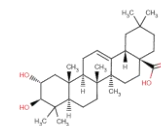
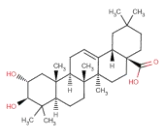


Figura 8.13 Fragmentación del DNA, tras la exposición de las células HT29 y Caco-2 al ácido maslínico durante 72h, a sus respectivas concentraciones IC₅₀ e IC₈₀. Las electroforesis fueron realizadas en gel de agarosa al 1.5%, siendo visualizadas por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

Sin embargo, en las células HT29, en algunos ensayos realizados, la aparición de este patrón en escalera a la concentración de IC₅₀ fue menos intensa. Siendo claramente visible a la concentración de IC₈₀. Este resultado indica que los niveles de apoptosis alcanzados en las células HT29 a la concentración de IC₅₀ tras 72h de incubación son menores que los observados en células Caco-2, lo que podría indicar una menor proporción de células HT29 en los estadios finales de apoptosis tras 72h de incubación. En estos estadios se produce la fragmentación internucleosomal del DNA, circunstancia confirmada por los resultados de los ensayos con anexina V-FICT.



8.4 Actividad enzimática caspasa-3

La presencia de actividad caspasa-3 es junto con la fragmentación internucleosomal del DNA una de las evidencias más claras de la activación de apoptosis. Esta proteína perteneciente al grupo de las aspartato proteasas, es la principal caspasa efectora pudiendo desencadenar gracias a su actividad proteolítica gran parte de los fenómenos observados en los estadios finales del proceso de apoptosis, activando o inhibiendo de forma proteolítica a las enzimas claves en la ejecución de estos procesos. El ensayo de actividad caspasa-3, como se ha comentado en la sección de materiales y métodos, se llevó a cabo mediante la utilización de substrato diana, que tras ser hidrolizado por la caspasa-3, da un producto coloreado capaz de absorber la intensidad de lumínica a 405 nm. Se trata del péptido acetil-Asp-Glu-Val-Asp para-nitroanilina (Ac-DEVD-pNA) que tras su hidrólisis produce la liberación de para nitroanilina (pNA) la cual tiene un máximo de absorbancia a 405 nm.

La actividad caspasa-3 fue determinada en las células HT29 y Caco-2. Tras 24h de su siembra estas líneas celulares fueron incubadas con ácido maslínico a sus respectivas concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ durante 72h. A continuación se preparó un lisado citosólico que fue incubado con Ac-DEVD-pNA durante 24h a 37°C. Por último, se determinó la concentración pNA utilizando un lector de placas tipo ELISA (Merck ELISA System MIOS versión 3.2.). Este ensayo fue realizado un total de cuatro veces por duplicado.

Tras referir la actividad caspasa-3 obtenida a la cantidad de proteína presente en cada muestra, se dio el resultado como porcentaje de actividad caspasa-3 respecto a los respectivos controles de células sin tratar (**tabla 8.7**). El ensayo se repitió un total de siete veces por duplicado en ambos tipos celulares.

Actividad Caspasa-3 (% respecto al CT)	IC50	IC80
HT29	164.19 ± 13.24 **	253.17 ± 24.26 **
Caco-2	172.12 ± 11.82 **	198.34 ± 22.72 *

Tabla 8.7 Activación de caspasa-3 inducida por el ácido maslínico en células HT29 y Caco-2 tras 72h de incubación a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los valores se dan como porcentaje respecto al control sin tratar (media ± desviación estándar; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**)) respecto al control de células no tratadas).

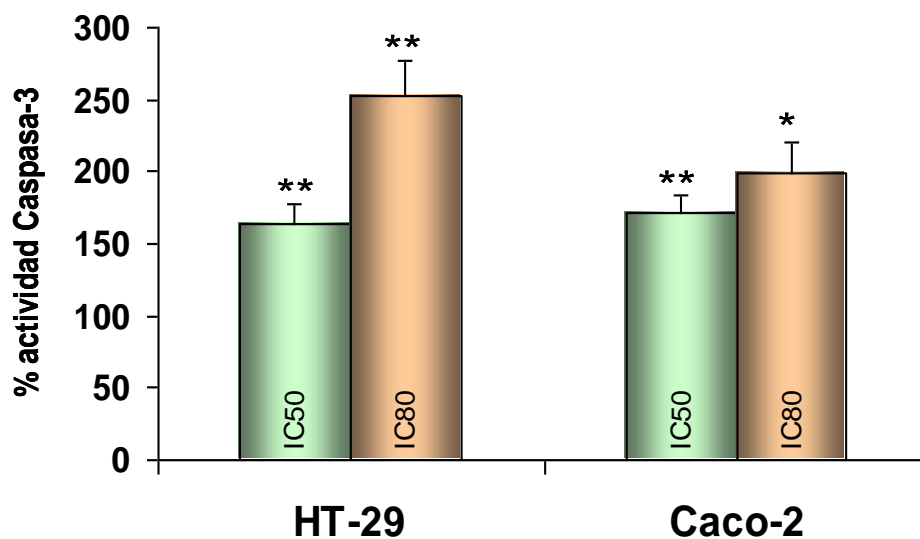
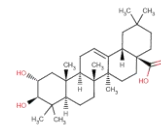
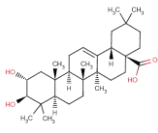


Figura 8.14 El ácido maslínico induce apoptosis a través de la activación de caspasa-3. Las células HT29 y Caco-2 fueron tratadas durante 72h con sus correspondientes IC50 e IC80. Los valores representan la media \pm desviación estándar de siete experimentos. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) respecto al control de células no tratadas.

Como puede observarse en los resultados obtenidos existe un incremento en la actividad específica de la caspasa-3 de forma concentración dependiente en ambas líneas celulares tras las 72h de tratamiento (**figura 8.14**), siendo más marcada en las células HT29 que en las células Caco-2. Este resultado podría deberse a que la apoptosis fuese mayor en las células HT29 que en las células Caco-2 a este tiempo de incubación. Como ha sido confirmado por otros ensayos, la inducción de apoptosis por el ácido maslínico en células Caco-2 es más temprana que en células HT29. Por tanto, el que la actividad caspasa-3 a 72h en células HT29 sea algo mayor, podría significar que las células HT29 a 72h de incubación, se encuentran en plena actividad apoptótica, mientras que las células Caco-2 se encontrarían a 72h, en los estadios finales de apoptosis, teniendo su maquinaria celular inutilizada.

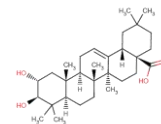


Capítulo 9

Análisis de expresión de proteínas apoptóticas

Para determinar el tipo o tipos de proteínas que intervienen en las rutas de inducción de apoptosis activada por el ácido maslínico, así como los eventos moleculares implicados en dicha inducción apoptótica en las células de las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2, se evaluó tanto la activación como la expresión de diversas proteínas claves en las distintas rutas de inducción de apoptosis. Esta evaluación se llevó a cabo a diferentes tiempos y con distintas concentraciones de ácido maslínico. En el análisis de los resultados, los valores de expresión fueron referidos al control, permitiéndonos comparar los resultados obtenidos entre los distintos ensayos realizados. En principio se estudiaron en ambas líneas celulares las dos rutas de inducción de apoptosis clásicas, la ruta o mecanismo extrínseco y la ruta o mecanismo intrínseco.

Como se comentó en el capítulo 3, la ruta extrínseca de inducción de apoptosis se inicia por la activación de un receptor de membrana del tipo Fas, TNFR o TRAILR. Estos receptores inducen, a su vez, la activación de la caspasa-8, la cual puede activar directamente a la caspasa-3, o permitiendo la liberación de citocromo-c de la mitocondria así como la desorganización de la misma mediante la activación de Bid pasando a t-Bid. El citocromo-c liberado se une a la caspasa-9 formando el denominado apoptosoma que a su vez activa a la caspasa-3. Esta



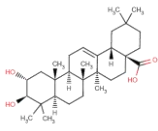
última proteína es la principal caspasa efectora encargada de desencadenar todos los fenómenos apoptóticos ya descritos. Todas estas caspasas pertenecen a la misma familia de cisteína proteasas y ejercen su efecto mediante la activación proteolítica de diferentes procesos asociados con la apoptosis celular.

Por otro lado, la ruta de activación intrínseca puede desencadenarse por múltiples causas, las cuales producen finalmente la activación de factores de transcripción tales como p53, lo que a su vez produce ajustes en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2, como es la disminución de los niveles de la propia Bcl-2 (canal de membrana mitocondrial que reajusta el equilibrio en las concentraciones de radicales libres y especies cargadas presentes en el interior de la mitocondria, evitando la entrada en apoptosis, siendo considerada, por tanto, como una proteína antiapoptótica), y el aumento de la expresión de Bax (canal de membrana mitocondrial perteneciente a la familia de Bcl-2, que también reajusta las concentraciones de radicales libres, pero, en este caso, produciendo el desequilibrio mitocondrial dando lugar a la aparición de apoptosis).

Por último, este proceso tiene como consecuencia la desorganización de la membrana mitocondrial y la consiguiente liberación de citocromo-c que junto con la caspasa-9 forma el apoptosoma, complejo multiproteico que activa a la caspasa-9, que finalmente activa a la caspasa-3. Se examinó, en primer lugar, los niveles de expresión de las caspasas iniciadoras -8 y -9, así como de las caspasas efectoras -3 y -7, para determinar, en una primera aproximación, a través de que ruta de inducción de apoptosis tenía lugar el efecto apoptótico del ácido maslínico.

9.1 Línea tumoral HT29

En estos experimentos, se incubaron las células HT29 con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ halladas para las 72h de incubación, tal y como se indica en la sección de materiales y métodos. Los tiempos de incubación a los que se examinó la expresión de las distintas proteínas fueron de 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los extractos celulares fueron realizados inmediatamente tras cada tiempo indicado y a continuación fueron llevados a cabo los diferentes *westerns* evitando de esta forma la posible degradación de las muestras, ya que debido al bajo peso molecular de las caspasas activas y de otras proteínas examinadas se degradan rápidamente.



9.1.1 Niveles de expresión de caspasa-3

La caspasa-3 (también llamada CPP-32, Apoptatina, Yama, SCA-1), es la principal caspasa efectora, pudiendo ser por sí misma la responsable completa de los fenómenos apoptóticos macroscópicos observados. Esta tarea es llevada a cabo mediante la activación o desactivación proteolítica de la mayoría de los enzimas claves responsables de estos procesos apoptóticos, tales como la desactivación de la enzima nuclear poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), encargada de reparar el DNA; la inhibición de ICAD responsable de inhibir CAD que es, a su vez, el enzima encargado de la fragmentación internucleosomal del DNA nuclear, etc..

La activación de la caspasa-3 requiere el procesamiento proteolítico de su zimógeno inactivo, procaspasa-3, (p35 kDa) en los fragmentos activos p17 y p12 respectivamente. Esta fragmentación ocurre gracias a la presencia de un residuo de aspártico en la posición P1. El anticuerpo de caspasa-3 utilizado detecta los niveles endógenos de procaspasa, así como los fragmentos resultantes de su activación proteolítica. La caspasa-3 fue la primera proteína apoptótica en ser examinada, ya que su activación es un claro e indiscutible indicio de la presencia de apoptosis celular. Las bandas encontradas fueron analizadas determinando su intensidad en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda correspondiente a la actina (u.a.b./u.a.a.). Los westerns fueron, en este caso, realizados por triplicado.

Los resultados obtenidos así como sus análisis, se muestran en la **figura 9.1** y la **tabla 9.1**. En cuanto a los niveles de procaspasa-3 parecen mantenerse estables a las 6h, 12h y 48h. Mientras que a las 4h, 24h y sobre todo a las 72h, se observa una clara disminución dosis dependiente. Aunque los niveles de procaspasa-3 disminuyen no lo hacen claramente de forma tiempo dependiente. Esta aparente constancia puede deberse a que los niveles relativos de procaspasa frente a los de caspasa activa son muchos mayores por lo que si existe variación puede no verse claramente reflejada. En todos los casos, las bandas de procaspasa llegan a la saturación. También es posible que, durante el proceso de apoptosis, la activación de factores de transcripción como p53 mantengan estables las concentraciones de procaspasa-3. En relación con los niveles de caspasa-3 a las 4h parece haber cierta inducción a la concentración de IC₅₀, aunque tras corregirla por los valores de actina, dicha inducción no se ve reflejada en el análisis de las bandas. Tras 6h de incubación la inducción dosis dependiente de la caspasa-3 es clara, esta inducción se mantiene a todos los tiempos ensayados, siendo mucho mayor tras las 72h de tratamiento.

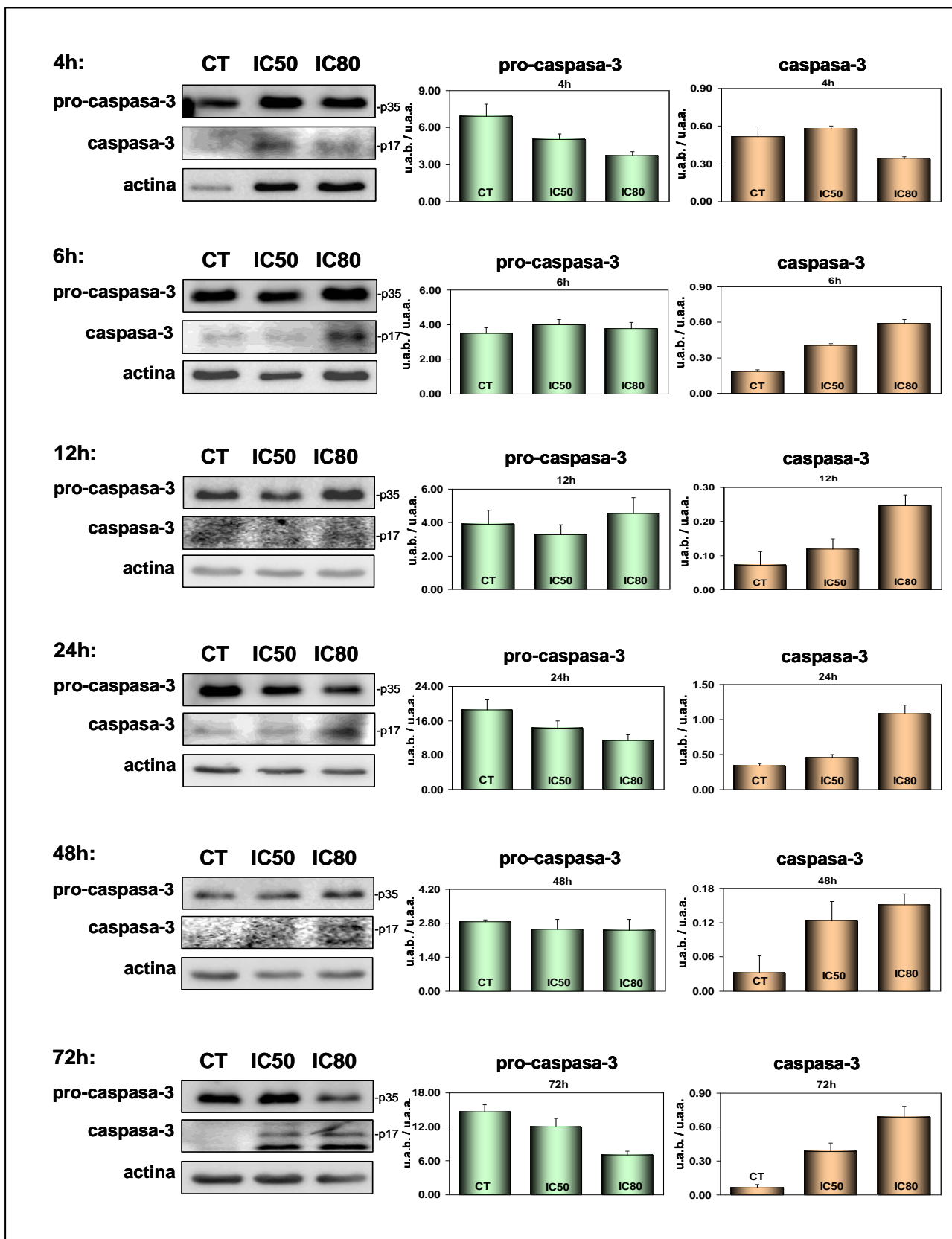
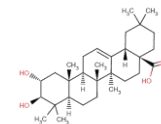
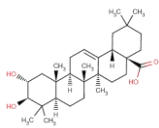


Figura 9.1 Westerns y niveles de caspasa-3 (p17) y pocaspasa-3 (p35) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



% Procasasa-3	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 14.22	72.81 ± 6.58	53.83 ± 4.96
6h	100.00 ± 8.86	113.45 ± 9.29	107.82 ± 9.68
12h	100.00 ± 22.16	84.67 ± 15.07	116.99 ± 24.30
24h	100.00 ± 12.26	76.89 ± 9.26	61.22 ± 7.11
48h	100.00 ± 2.66	88.91 ± 14.23	87.71 ± 15.59
72h	100.00 ± 8.34	81.90 ± 10.16	48.05 ± 4.39

% Caspasa-3	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 14.85	111.77 ± 4.75	65.92 ± 2.66
6h	100.00 ± 6.89	219.09 ± 8.16	320.46 ± 16.46
12h	100.00 ± 57.82	168.10 ± 42.05	346.88 ± 44.68
24h	100.00 ± 10.10	136.49 ± 11.67	321.39 ± 36.85
48h	100.00 ± 95.02	387.97 ± 103.61	474.28 ± 58.91
72h	100.00 ± 50.23	621.42 ± 124.17	1122.13 ± 149.77

Tabla 9.1 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

A continuación, y tras corregir las intensidades de las bandas encontradas por las intensidades de las bandas correspondientes a actinas, se refirieron los valores obtenidos a los controles respectivos de cada ensayo, permitiendo, así, la comparación en la expresión observada a los diferentes tiempos analizados (**figura 9.2**). Los resultados obtenidos se muestran como porcentajes respecto al valor control. Los resultados de este ‘time course’ muestran que existe una significativa activación tiempo dependiente de la caspasa-3 prácticamente desde el inicio del tratamiento.

A partir de las 6h, existe cierta inducción de la caspasa-3 activa, incrementándose de forma exponencial a partir de las 24h hasta alcanzar su máximo valor a las 72h de tratamiento. Estos resultados se ven claramente reflejados en las imágenes de los distintos westerns (**figura 9.1**). Dicha activación indica que, a la concentración de IC₈₀, la caspasa-3 se activa manteniendo sus niveles constantes durante las primeras 24h-48h; pasado este tiempo los niveles de caspasa-3 aumentan de forma exponencial. A la concentración de IC₅₀, no se observa de una forma tan clara la presencia de estos niveles constantes de caspasa-3 durante las primeras 24h. Aunque, a partir de las 24h se observa un notable incremento de la misma hasta el final del tratamiento.

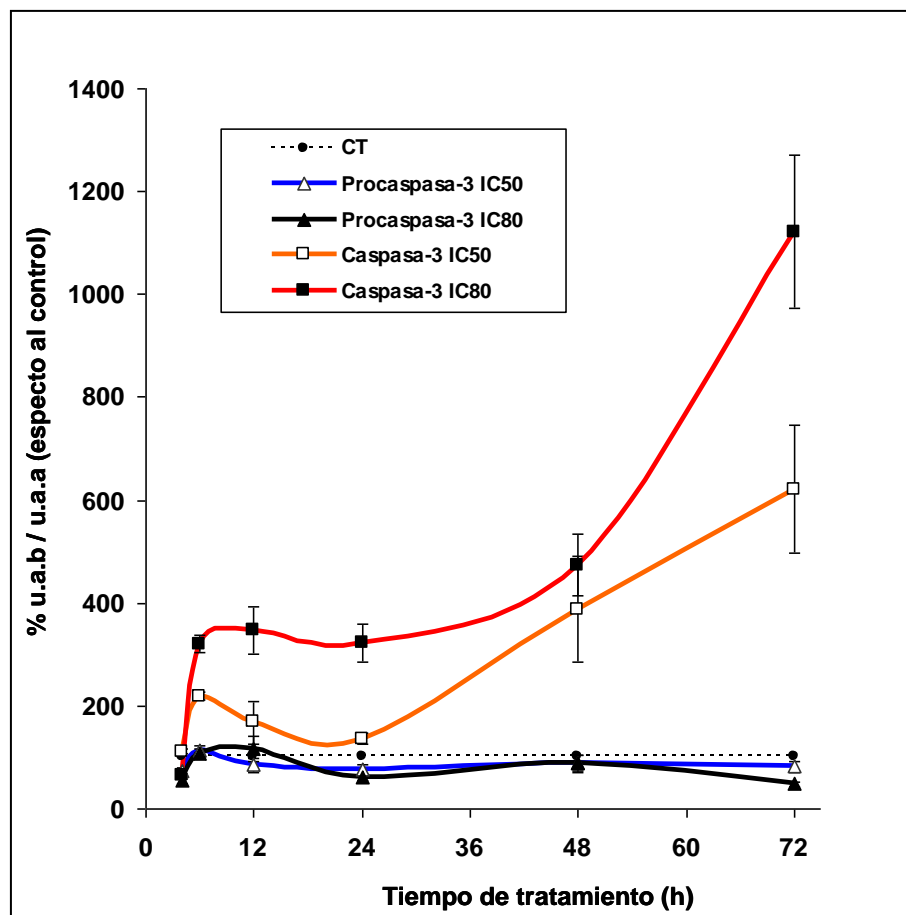
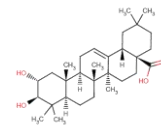
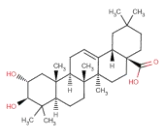


Figura 9.2 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} . Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

El mantenimiento constante de los niveles de caspasa-3, activos pero no elevados, durante las primeras 6h-24h, podría estar relacionado con la generación y la recuperación de la genotoxicidad observada en otros ensayos realizados, y que a su vez podría relacionarse con la inducción de diferenciación celular por parte del ácido maslínico. De esta manera, en un primer momento, se activarían los procesos de apoptosis y diferenciación celular y tras las primeras 24h-48h de tratamiento, aquellas células que no hubiesen conseguido recuperarse de la genotoxicidad, incrementarían de forma notable los niveles de caspasa-3 activa, finalizando el proceso de apoptosis.

Tras observar la activación de caspasa-3, que confirma la inducción de apoptosis por parte del ácido maslínico, se procedió a investigar el aumento de niveles de caspasa-8 y caspasa-9. Dependiendo de cómo tenga lugar este incremento, nos indicará que ruta clásica de inducción de apoptosis esta implicada en la actividad citotóxica desencadenada por el ácido maslínico sobre las células HT29.



9.1.2 Niveles de expresión de caspasa-8

La caspasa-8 (conocida también como FLICE/ MACH-1) es una proteína citosólica de 50-55 kDa, con una importante homología con las proteínas CD95 (transductor de señales asociado a Fas), FADD/MORT-1, así como con otras proteínas de la familia de las caspasas. La región N-terminal de la caspasa-8 contiene una secuencia de aminoácidos denominada 'death domain', que facilita la interacción directa entre la caspasa-8 y FADD. Por su parte, FADD actúa como una molécula adaptadora, permitiendo que la región citoplasmática de Fas llegue a reclutar a la caspasa-8, continuando la señal activada por este receptor.

La caspasa-8 es producida como pro-enzima o zimógeno el cual, tras agregarse en torno al receptor, es activado proteolíticamente dando lugar a dos fragmentos de 40 y 36 kDa que migran como doblete durante la electroforesis, y a un fragmento de 23 kDa. Estas subunidades forman un heterodímero activo capaz de activar proteolíticamente otros miembros de la familia de las caspasas, y a substratos tales como PARP. A diferencia de otras proteínas de la familia de las caspasas, la sobre-expresión de la caspasa-8 es suficiente para la inducción de apoptosis en ciertas líneas celulares como la MCF-7. Este fenotipo puede ser bloqueado por la sobre-expresión de inhibidores de la caspasa-3 como CrmA.

La caspasa-8 fue la segunda proteína en ser investigada, ya que de dar positivo completaría directamente el mecanismo de inducción de apoptosis celular. Como ya se ha comentado, la caspasa-8 es activada a través del receptor de membrana, y esta, a su vez, puede inducir la activación de la caspasa-3, bien directamente o, como se ha dicho anteriormente, mediante la desorganización de la membrana mitocondrial y la activación de caspasa-9. El anticuerpo de caspasa-8 utilizado, es capaz de reconocer tanto a la forma inactiva de la proteína que migra como doblete a 50-55 kDa, como a los fragmentos activos de 36 y 40 kDa (doblete), así como el fragmento de 23 kDa.

Las diferentes bandas fueron analizadas determinando su intensidad en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda correspondiente a la actina (u.a.b./u.a.a.). Los *westerns* fueron realizados por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9.3** y la **tabla 9.2**. Como puede observarse en las imágenes de las bandas, la activación de la caspasa-8 no ocurre hasta prácticamente transcurridas 48h-72h de tratamiento, resultado que se ve reflejado en el análisis de la intensidad de las bandas.

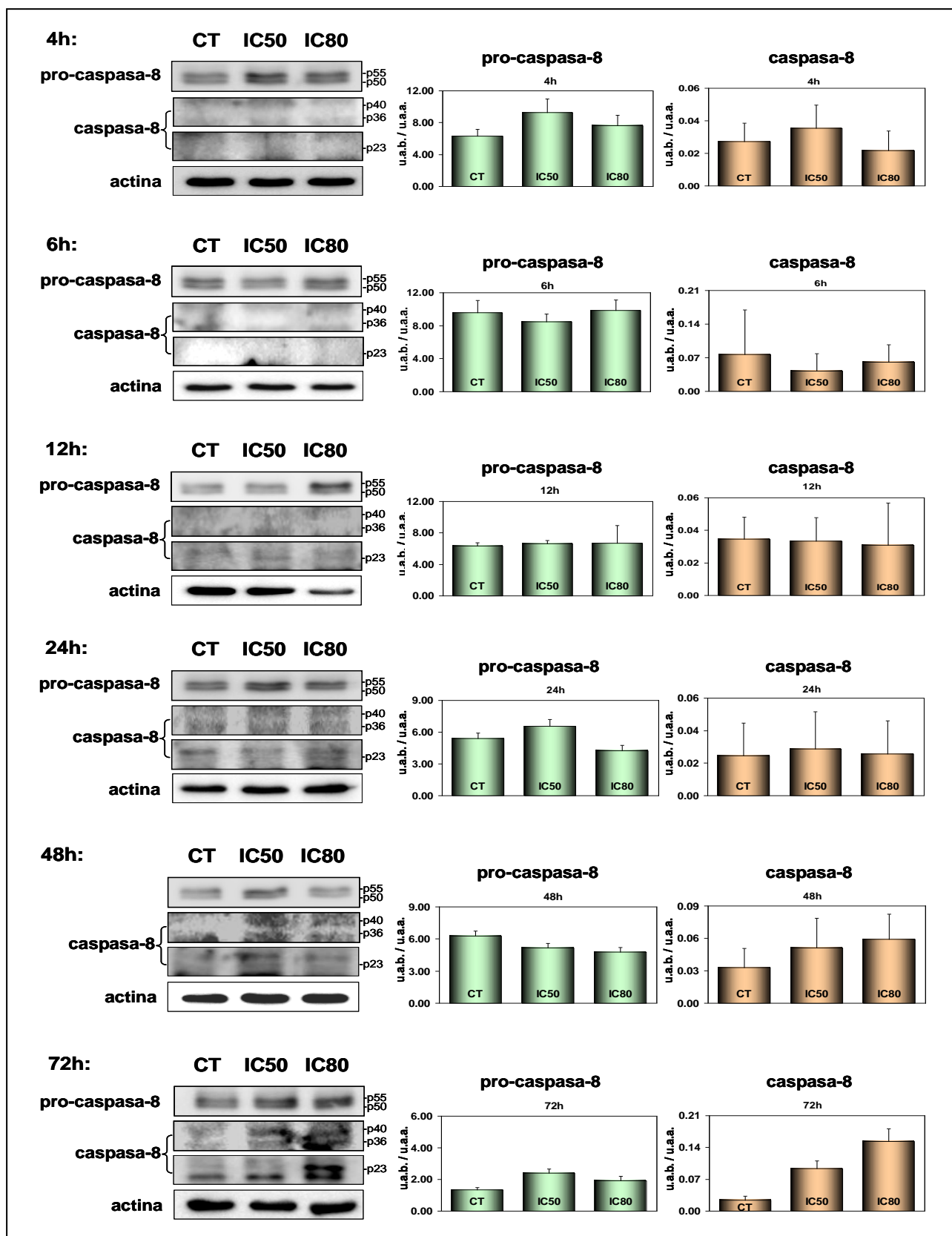
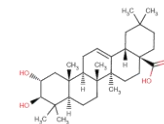
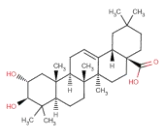


Figura 9.3 *Westerns* y niveles de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p50/55) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



% Procapasa-8	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 13.23	146.38 ± 26.88	120.39 ± 20.50
6h	100.00 ± 15.53	88.58 ± 9.87	102.70 ± 13.24
12h	100.00 ± 6.13	104.16 ± 6.53	105.25 ± 35.57
24h	100.00 ± 9.70	121.20 ± 12.04	78.42 ± 9.68
48h	100.00 ± 7.51	82.43 ± 6.90	76.46 ± 6.54
72h	100.00 ± 9.39	177.66 ± 18.87	142.17 ± 20.18

% Caspasa-8 p40/36	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 40.74	129.27 ± 51.97	79.64 ± 44.23
6h	100.00 ± 121.13	54.92 ± 47.44	78.95 ± 47.22
12h	100.00 ± 38.39	95.85 ± 41.87	88.87 ± 74.77
24h	100.00 ± 83.18	117.78 ± 93.45	105.04 ± 83.01
48h	100.00 ± 54.14	155.91 ± 83.97	179.97 ± 71.44
72h	100.00 ± 36.03	385.75 ± 67.84	632.13 ± 113.81

% Caspasa-8 p23	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 62.32	140.59 ± 64.57	123.42 ± 43.73
6h	100.00 ± 221.51	166.24 ± 159.44	189.70 ± 200.81
12h	100.00 ± 88.31	234.33 ± 146.82	130.87 ± 106.75
24h	100.00 ± 26.43	174.65 ± 20.73	83.02 ± 12.91
48h	100.00 ± 89.05	164.38 ± 68.10	224.07 ± 73.30
72h	100.00 ± 43.26	199.69 ± 62.14	998.70 ± 231.39

Tabla 9.2 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-8 (p23, p36/40) y procaspasa-8 (p50/55) en células HT29 tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

Aunque podría apreciarse la posible aparición del fragmento de 23 kDa a las 12h-24h, tras corregirlo por los valores de actina y realizar la media de los ensayos, el valor encontrado no es suficientemente alto, existiendo una gran dispersión en los resultados. Hasta las 72h de tratamiento no se aprecia de forma clara y rigurosa la aparición de este fragmento de 23 kDa, correspondiente al fragmento menor del procesamiento proteolítico de la caspasa-8. En cuanto a los valores de la procaspasa-8, estos se mantienen prácticamente constantes respecto a los valores obtenidos en los controles, aumentando incluso respecto al control a las 72 h de tratamiento.

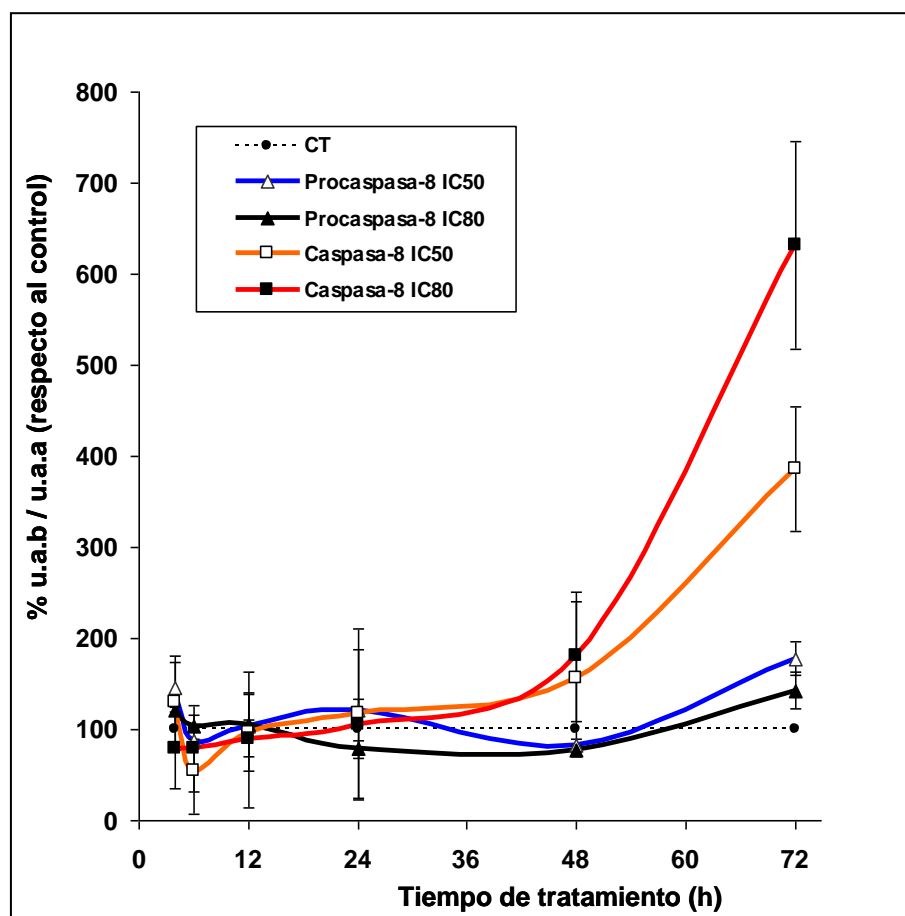
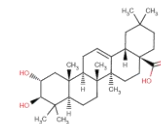
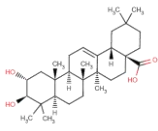


Figura 9.4 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p50/55) a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

Tras referir los valores de las intensidades corregidas a los respectivos controles, podemos comparar los niveles de procaspasa-8 y caspasa-8 entre los distintos tiempos ensayados. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control (**tabla 9.2; figura 9.4**). Según estos resultados los valores de la caspasa-8 activa comienzan a aumentar a partir de las 48h de tratamiento, llegando a su valor máximo a la concentración de IC₈₀ tras las 72h. Esto se ve claramente reflejado en la aparición de la banda de 23 kDa a este tiempo de incubación.

Esta activación tardía de la caspasa-8, ya que el primer indicio de actividad caspasa-3 comienza a las 6h de tratamiento, ha sido como una retroalimentación del mecanismo de apoptosis de forma que la señal apoptótica es amplificada e intensificada. Además, la caspasa-8 no es sólo una proteína iniciadora del proceso de apoptosis, sino que posee cierta actividad proteolítica, pudiendo colaborar en las actividades efectoras de las caspasa-3 y -7.



En resumen, esta activación tardía podría no ser debida tanto al efecto directo del ácido maslínico sobre la línea celular HT29, sino más bien a una consecuencia del proceso de apoptosis celular ya iniciado, descartando por este motivo la vía extrínseca de iniciación. Por tanto, para determinar cómo tiene lugar la iniciación de este proceso la siguiente proteína en ser examinada fue la caspasa-9.

El aumento en los niveles de expresión de la proteasa caspasa-9, en ausencia de la caspasa-8, confirmaría la inducción de la ruta o mecanismo intrínseco de apoptosis, el cual puede ser desencadenado por un gran número de factores como son el aumento de los niveles de calcio citoplasmáticos, el daño en la molécula del DNA o la inducción de factores de transcripción como p53, etc..

9.1.3 Niveles de expresión de caspasa-9

La caspasa-9 (también conocida como ICE-LAP6, Mch6) es una importante caspasa iniciadora que se activa a través de la ruta intrínseca de inducción de apoptosis. La liberación de citocromo-c de la mitocondria está asociada con la activación de la pro-caspasa-9 (zimógeno de 47 kDa). Esta activación, como se detalla en el capítulo 3, está mediada por la proteína Apaf 1 que junto con el citocromo-c forma el apoptosoma, complejo multiproteico, a través del cual la procaspasa-9 se transforma en la caspasa-9 activa.

El procesamiento de la pro-caspasa-9 da lugar a dos fragmentos, uno mayor de 35/37 kDa y otro más pequeño de 10 kDa. La activación proteolítica tiene lugar por el autoprosesamiento de la pro-caspasa-9 a nivel del residuo Asp315. La activación de la caspasa-9 desencadena la activación de otros miembros de la familia de las caspasas, incluidas las caspasas efectoras -3 y -7, iniciando la cascada apoptótica. Además del autoprosesamiento de la pro-caspasa-9, esta proteína también puede activarse *in vivo* por la proteólisis mediada por la caspasa-3 sobre el residuo Asp330 del zimógeno.

Esta activación, por parte de la caspasa-3, podría tener una función de retroalimentación positiva, amplificando la señal apoptótica. El anticuerpo de caspasa-9 utilizado detecta los niveles endógenos de procaspasa-9 (47 kDa) y del fragmento mayor de 35/37 kDa. Este anticuerpo fue obtenido a partir de un péptido con la secuencia correspondiente a los residuos que rodean el aspártico 315, no reconociendo a otras caspasas.

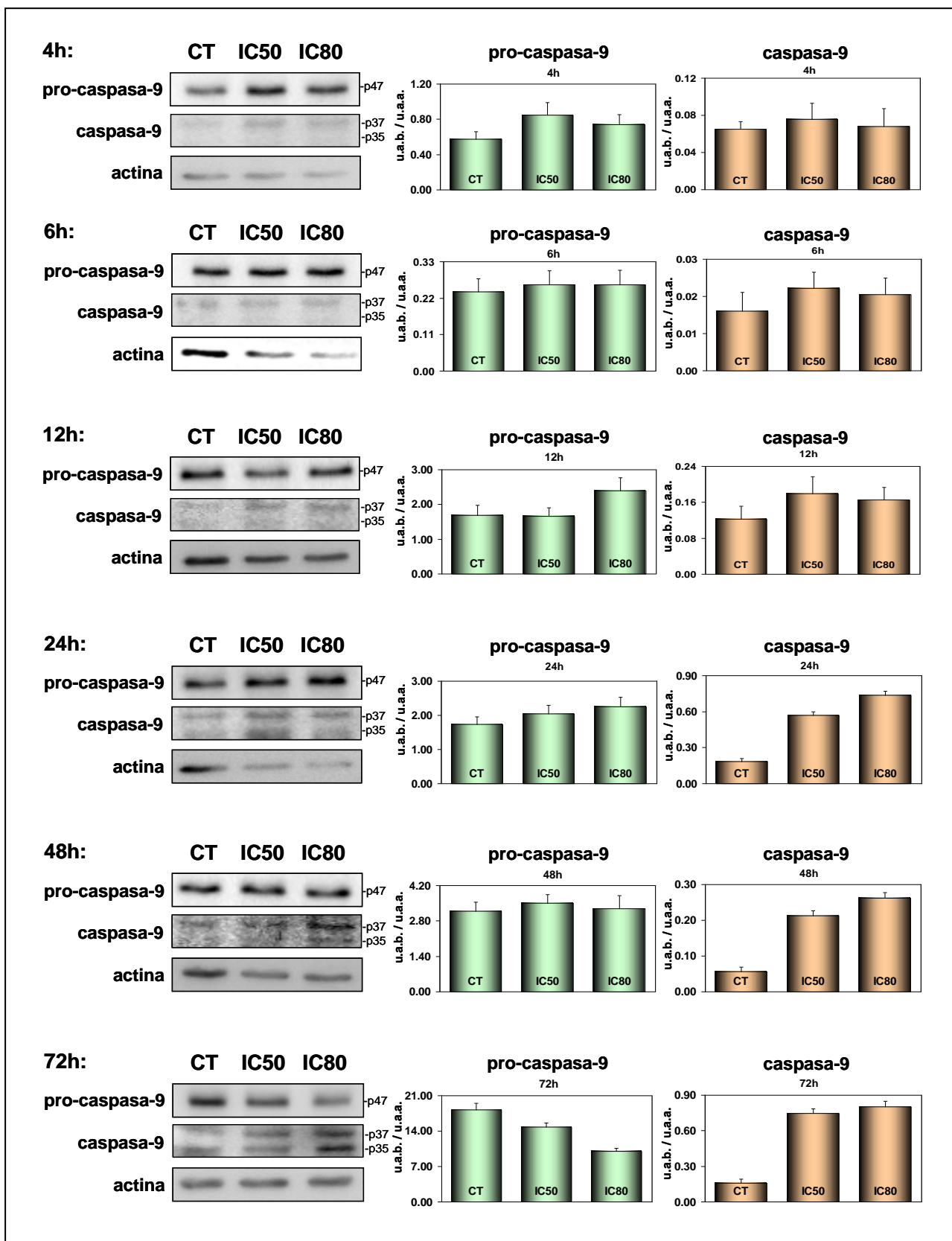
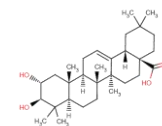
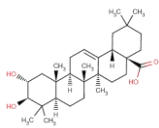


Figura 9.5 Westerns y niveles de caspasa-9 (p37) y pocaspasa-9 (p47) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



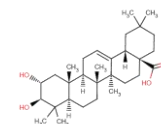
% Procaspasa-9	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 14.99	148.22 ± 24.57	129.29 ± 19.87
6h	100.00 ± 16.44	108.87 ± 17.83	108.86 ± 18.17
12h	100.00 ± 16.91	98.73 ± 14.16	142.17 ± 22.03
24h	100.00 ± 12.35	117.97 ± 14.08	129.53 ± 16.72
48h	100.00 ± 10.95	109.90 ± 10.11	102.53 ± 16.28
72h	100.00 ± 6.80	81.07 ± 4.66	54.97 ± 3.47

% Caspasa-9 p37kDa	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 12.44	116.26 ± 26.17	104.08 ± 29.40
6h	100.00 ± 31.97	138.80 ± 26.73	128.38 ± 27.17
12h	100.00 ± 23.65	146.21 ± 31.51	134.70 ± 22.97
24h	100.00 ± 12.69	309.00 ± 16.72	400.44 ± 17.82
48h	100.00 ± 22.34	379.65 ± 23.80	465.63 ± 29.05
72h	100.00 ± 22.18	472.29 ± 24.26	507.47 ± 29.71

Tabla 9.3 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

Las bandas encontradas fueron analizadas determinando su intensidad en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda de la actina (u.a.b./u.a.a.). Los westerns fueron realizados por triplicado. Según los resultados obtenidos, puede observarse una activación dosis dependiente de la caspasa-9 a partir de las 24h-48h de tratamiento. El análisis de intensidad de las bandas muestra que desde las 24h de tratamiento los niveles de caspasa-9 aumentan de forma dosis dependiente (**figura 9.5; tabla 9.3**). Esta inducción se ve reflejada tanto en la banda correspondiente al fragmento de 35 kDa como en la de 37 kDa, siendo utilizada esta última para la cuantificación. Además existe cierta inducción, aunque bastante tenue, a las 12h de tratamiento.

Por otra parte, la procaspasa parece mantener sus niveles constantes independientemente de la concentración utilizada. Esto ocurre así a todos los tiempos ensayados salvo a las 72h, donde la disminución de los niveles de procaspasa es evidente tanto en los resultados del análisis de las bandas como en las imágenes de los westerns. La razón por la que estos niveles parecen constantes podría ser que los niveles de procaspasa son mucho mayores a los



hallados para la caspasa activa, llegando a la saturación, por lo que su variación no se aprecia de forma clara siendo éste el motivo más probable. Aunque por otro lado podrían existir factores de transcripción que mantuviesen constantes estos niveles durante el proceso.

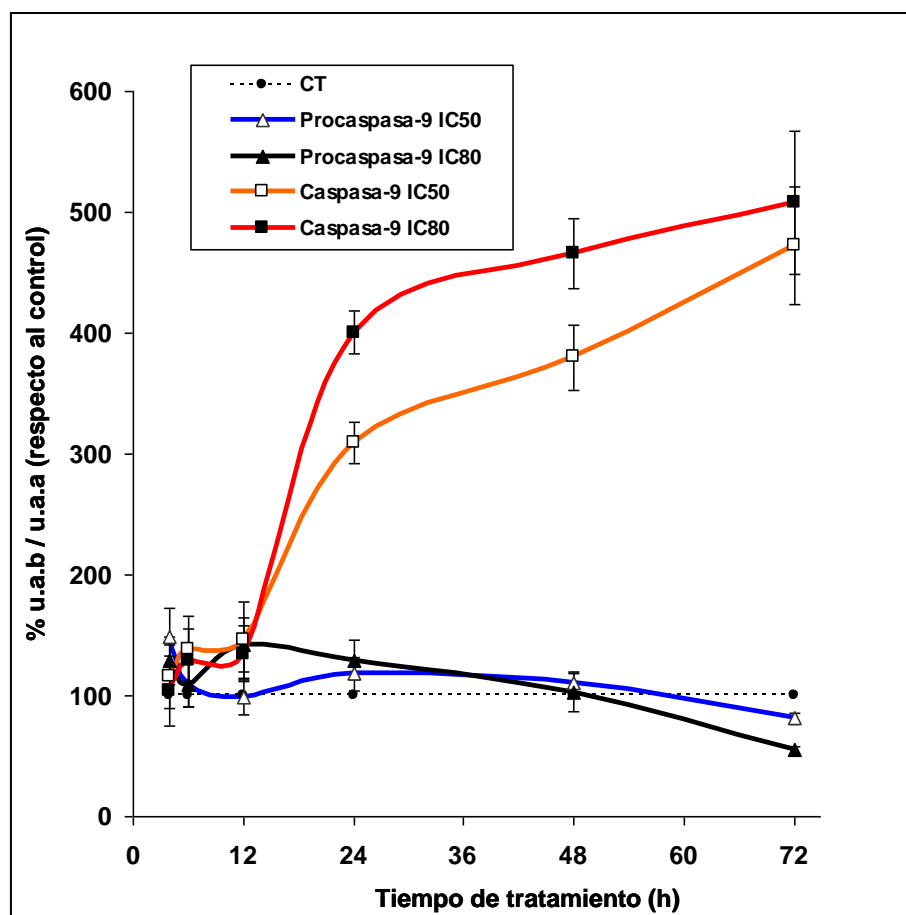
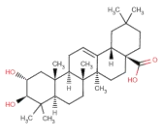


Figura 9.6 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} . Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

Una vez corregidas las intensidades encontradas de cada banda por la intensidad de las actinas y relativizando los resultados a los valores controles, podemos comparar los niveles de procaspasa-9 y caspasa-9 obtenidos a diferentes tiempos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control (**tabla 9.3**). Según estos resultados a partir de las 24h hay un importante incremento de los niveles de caspasa-9 (**figura 9.6**), tanto a la concentración IC_{50} como a la concentración IC_{80} , siendo mayor a esta última concentración, y que se mantiene hasta el final del tratamiento. En cuanto a los niveles encontrados de procaspasa-9 permanecen prácticamente constantes independientemente del tiempo ensayado, aunque terminan disminuyendo claramente a las 72h de tratamiento.



La activación a las 24h de la caspasa-9 ocurre de forma previa la activación de la caspasa-8, así como a la elevación significativa en los niveles de caspasa-3, lo que sucede a partir de las 24h-48h. Estos resultados concuerdan con un mecanismo de activación de apoptosis por el ácido maslínico a través de la ruta clásica intrínseca en la que tiene lugar la permeabilización de la mitocondria, liberación de citocromo-c y la activación de la caspasa-9. Para confirmar este punto se procedió a la determinación de los niveles de citocromo-c citoplasmático como se verá más adelante.

9.1.4 Niveles de expresión de caspasa-7

Para terminar el estudio con el grupo de las diferentes caspasas, se examinó el aumento de los niveles de caspasa-7 y procaspasa-7. La caspasa-7 es una caspasa efectora, y, actuando de forma conjunta con la caspasa-3, desencadena gran parte de los procesos finales asociados a la activación de la cascada apoptótica. Esta caspasa es activada a través de la caspasa-3, aunque, como se sabe, su activación tampoco es determinante para el transcurso de los procesos apoptóticos finales, ya que la actividad caspasa-3 es necesaria y suficiente para que tales fenómenos ocurran.

Estructuralmente y funcionalmente la caspasa-7 es muy parecida a la otra caspasa efectora, la caspasa-3. Esta proteasa al igual que el resto de las caspasas se produce por la célula de forma constitutiva como procaspasa inactiva o zimógeno, y durante el proceso de apoptosis es activada proteolíticamente por la acción directa de la caspasa-3, lo cual genera dos subunidades que se asocian formando la enzima activa. La caspasa-7 puede existir con dos formas alternativas de 'splicing', Mch3 α y Mch3 β . Se ha descrito que la forma Mch3 α y la subunidad de 17 kDa de la caspasa-3 pueden interaccionar, produciendo, finalmente, una enzima heterodimérica proteolíticamente activa (Fernández-Alnemri y col., 1995).

La caspasa-7 activa puede migrar hacia la fracción mitocondrial en células que han sufrido apoptosis mediada por Fas, en las que la caspasa-3 activa se encuentra principalmente en la fracción citosólica. Además de ser activada por la caspasa-3, esta caspasa-7 también puede activarse por la granzima B (una serina-proteasa liberada por macrófagos y que induce directamente el proceso de muerte celular programada). La caspasa-7 activa ejerce su actividad proteolítica sobre el substrato nuclear PARP y sobre el SREBP-1, (*sterol regulatory element-binding protein 1*) entre otros.

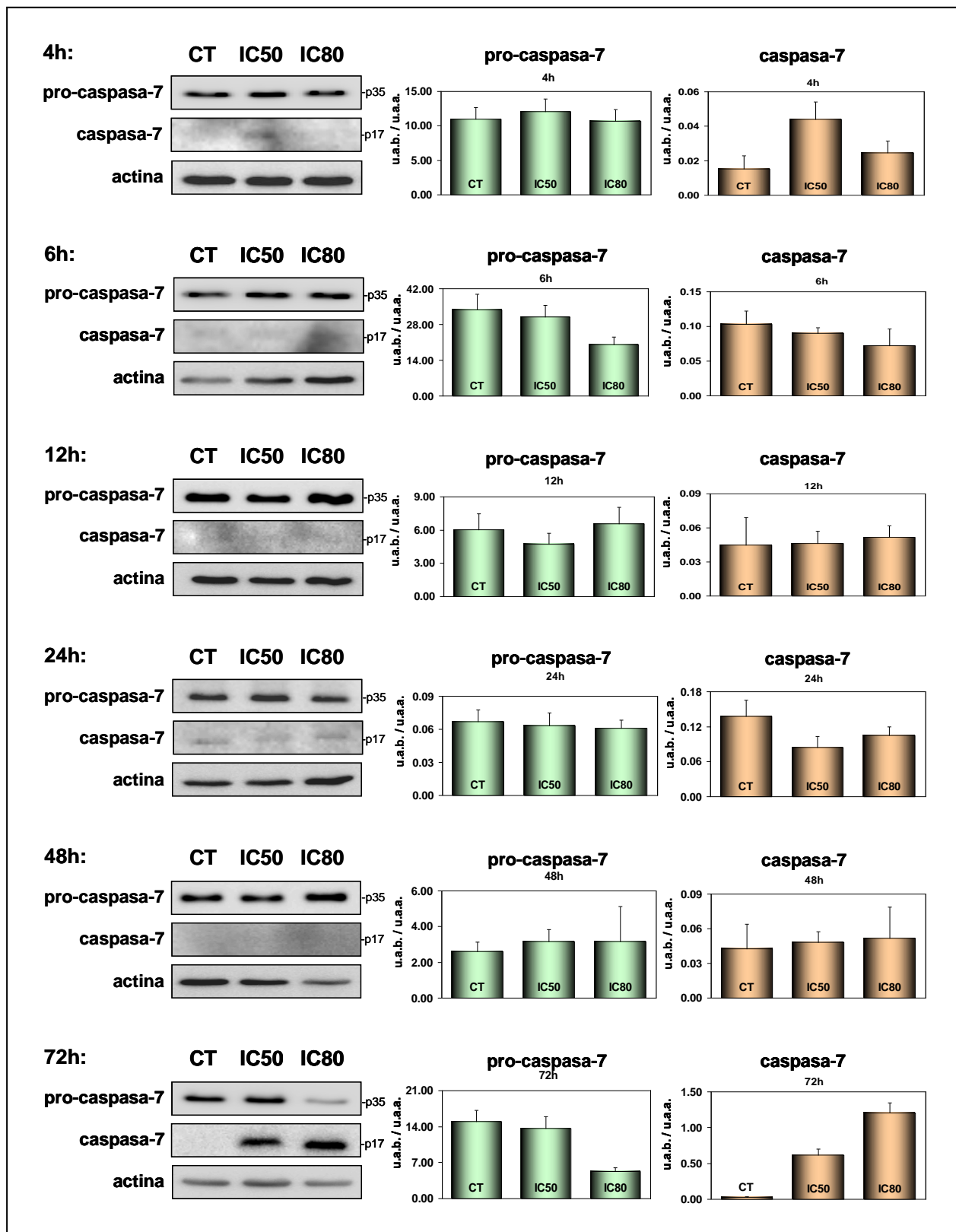
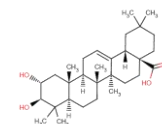
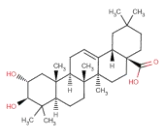


Figura 9.7 Westerns y niveles de caspasa-7 (p17) y procaspasa-7 (p35) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina (u.a.a.) expresados como la media ± desviación estándar.



% Procaspasa-7	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 15.50	110.33 ± 16.63	97.64 ± 15.35
6h	100.00 ± 18.40	92.12 ± 13.14	59.89 ± 8.86
12h	100.00 ± 23.79	78.00 ± 16.86	108.60 ± 24.86
24h	100.00 ± 15.93	94.38 ± 17.83	91.25 ± 11.31
48h	100.00 ± 19.86	120.92 ± 25.12	121.09 ± 74.45
72h	100.00 ± 14.72	91.11 ± 15.12	35.11 ± 4.67

% Caspasa-7	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 49.00	288.23 ± 66.84	160.58 ± 44.85
6h	100.00 ± 18.77	87.21 ± 8.00	70.05 ± 23.37
12h	100.00 ± 53.54	102.75 ± 24.17	115.28 ± 21.83
24h	100.00 ± 19.67	61.12 ± 13.84	75.90 ± 10.63
48h	100.00 ± 49.65	113.24 ± 21.52	121.27 ± 63.25
72h	100.00 ± 25.07	2281.13 ± 316.07	4458.16 ± 538.01

Tabla 9.4 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-7 (p17) y procaspasa-7 (p35) en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

El anticuerpo utilizado reconoce a los fragmentos de 35 y 17 kDa de la caspasa-7 humana. Este anticuerpo fue obtenido a partir de un péptido con la secuencia correspondiente de los aminoácidos 25 a 42 de la caspasa-7 humana. La intensidad de las bandas fue determinada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda analizada dividida por la intensidad de la actina correspondiente (u.a.b./u.a.a.). Los westerns fueron realizados por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9.7** y la **tabla 9.4**.

Según los resultados obtenidos, no hay inducción de caspasa-7 hasta transcurridas 72h de tratamiento, tiempo en el que se hace claramente evidente. Esta inducción es concentración dependiente, siendo prácticamente inexistente en el control. En cuanto a los niveles de procaspasa-7 disminuyen a las 72h de forma concentración dependiente siendo esta disminución muy marcada a la concentración de IC₈₀.

Tras corregir las intensidades de las bandas y por las actinas correspondientes, se refirió el resultado al control de cada ensayo, permitiéndonos comparar los niveles de caspasa-7 y procaspasa-7 encontrados a los distintos tiempos (**tabla 9.4**). Los niveles de procaspasa-7 se mantienen prácticamente invariables a lo largo del tiempo (**figura 9.8**), salvo a las 72h donde disminuyen de forma muy acentuada a la concentración de IC₈₀.

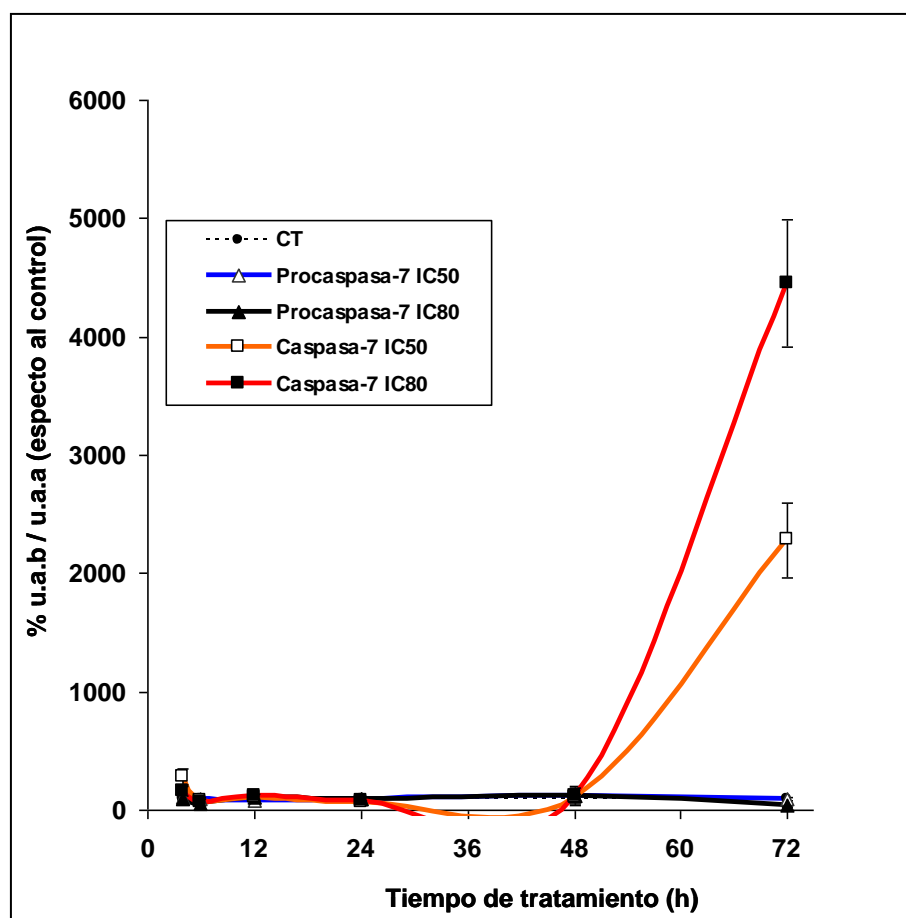
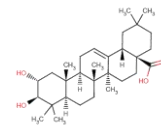
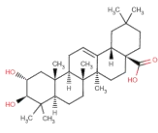


Figura 9.8 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-7 (p17) y procaspasa-7 (p35) a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

En cuanto a los niveles de caspasa-7, estos son prácticamente inexistentes a todos los tiempos ensayados, salvo para las 72h donde la aparición de la banda de 17 kDa es evidente tanto a concentración de IC₅₀ como a la concentración de IC₈₀, siendo de 23 a 45 veces superior al control de células sin tratar, estos valores tan elevados se deben a que la banda de 17 kDa es prácticamente inexistente en el control.

9.1.5 Niveles de expresión de citocromo-c citoplasmático

El citocromo-c es una proteína de membrana mitocondrial con un grupo hemo, y desempeña su función habitual como proteína transportadora de electrones en la mitocondria. Los citocromos se conocen como componentes esenciales de esta cadena transportadora de electrones desde 1925.



Estas proteínas pueden clasificarse en cuatro grupos o series (a, b, c y d) de acuerdo con sus características espectroquímicas. En total existen 5 citocromos en la cadena transportadora de electrones, entre el coenzima QH₂ y el O₂. El citocromo-c es una proteína periférica de membrana, soluble en agua, la cual se encuentra en la mitocondria transportando electrones entre la coenzima QH₂ y el complejo citocromo-c reductasa, al complejo citocromo-c oxidasa.

En la mayoría de las rutas de inducción de apoptosis independientemente de cual haya sido el origen desencadenante del proceso, tiene lugar la permeabilización mitocondrial y la liberación de especies radicalarias oxígeno reactivas (ROS), aunque esto, no ocurre en todos los casos. Previamente a estos fenómenos o de forma simultanea, el citocromo-c es liberado desde la mitocondria hacia el citosol perdiendo incluso parte de su segmento de anclaje a membrana. En este punto, el citocromo-c deja de desempeñar su función habitual como transportador de electrones, pasando a convertirse en una proteína de señalización de la cascada apoptótica formando parte y activando el apoptosoma (complejo proteico formado por Apaf-1, caspasa-9 y citocromo-c). El citocromo-c liberado de la mitocondria migra a un peso molecular muy bajo de unos 15 kDa.

Tras observar la activación de la caspasa-9 a las 24h, se procedió a la determinación de citocromo-c citoplasmático. Para ello se obtuvieron los extractos citoplasmáticos de las células HT-29 correspondientes a tres tiempos de incubación 24h, 48h y 72h, con dos concentraciones de ácido maslínico IC₅₀ e IC₈₀, así como de sus respectivos controles. El anticuerpo utilizado en este caso reconoce a la forma desnaturalizada del citocromo-c en mamífero, no reconociendo a la forma nativa. La secuencia antigénica, reconocida por el epítipo, se encuentra entre los aminoácidos 93 al 104. Las intensidades de las bandas fueron determinadas en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda analizada dividida por la intensidad de la actina correspondiente (u.a.b./u.a.a.). Los westerns fueron realizados en este caso por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9.9** y la **tabla 9.5**.

El incremento más importante en los niveles de citocromo-c citoplasmático se observa a las 24h de tratamiento y a la concentración de IC₈₀, esto se hace evidente tanto en las imágenes como en el análisis de las bandas, llegando a ser de 21 veces mayor respecto al control sin tratar. En el resto de tiempos ensayados, aunque existe cierto incremento concentración dependiente, éste es bastante menor al observado inicialmente. Tras corregir las intensidades de las bandas por las actinas correspondientes se refirió los resultados a los controles correspondientes permitiéndonos comparar los resultados obtenidos a los distintos tiempos (**tabla 9.5; figura 9.10**).

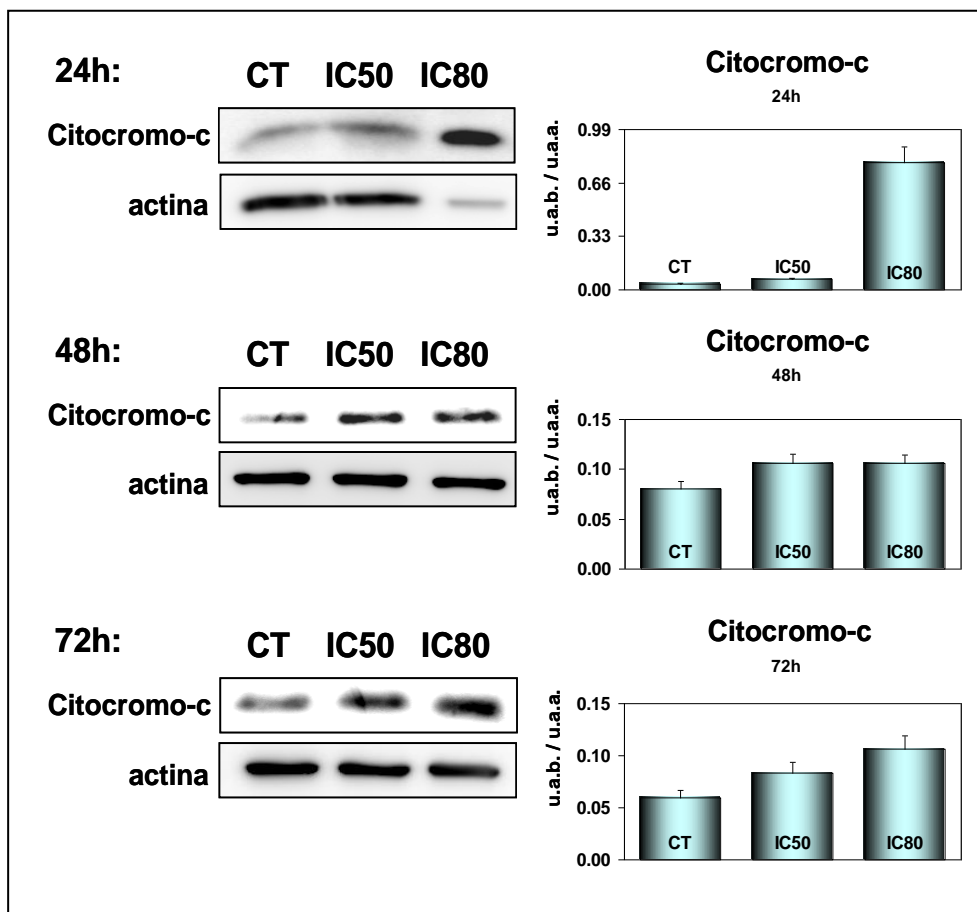
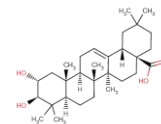


Figura 9.9 *Westerns* y niveles de citocromo-c citoplasmático en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresado como la media \pm desviación estándar.

El aumento del nivel de citocromo-c no parece ser tiempo dependiente, al menos a los tiempos ensayados. Ya que según los resultados obtenidos nos encontramos con un pico de inducción muy significativo a las 24h de tratamiento y tan solo un aumento del 30% al 80% en el resto de tiempos ensayados. Estos incrementos no aparecen claramente reflejados en la grafica, debido al factor de escala.

% Citocromo-c	CT	IC50	IC80
24h	100.00 \pm 13.51	179.19 \pm 16.69	2160.73 \pm 273.61
48h	100.00 \pm 9.69	132.61 \pm 11.03	132.59 \pm 9.50
72h	100.00 \pm 11.99	140.62 \pm 17.31	179.58 \pm 21.37

Tabla 9.5 Porcentajes de los niveles de citocromo-c citoplasmático en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

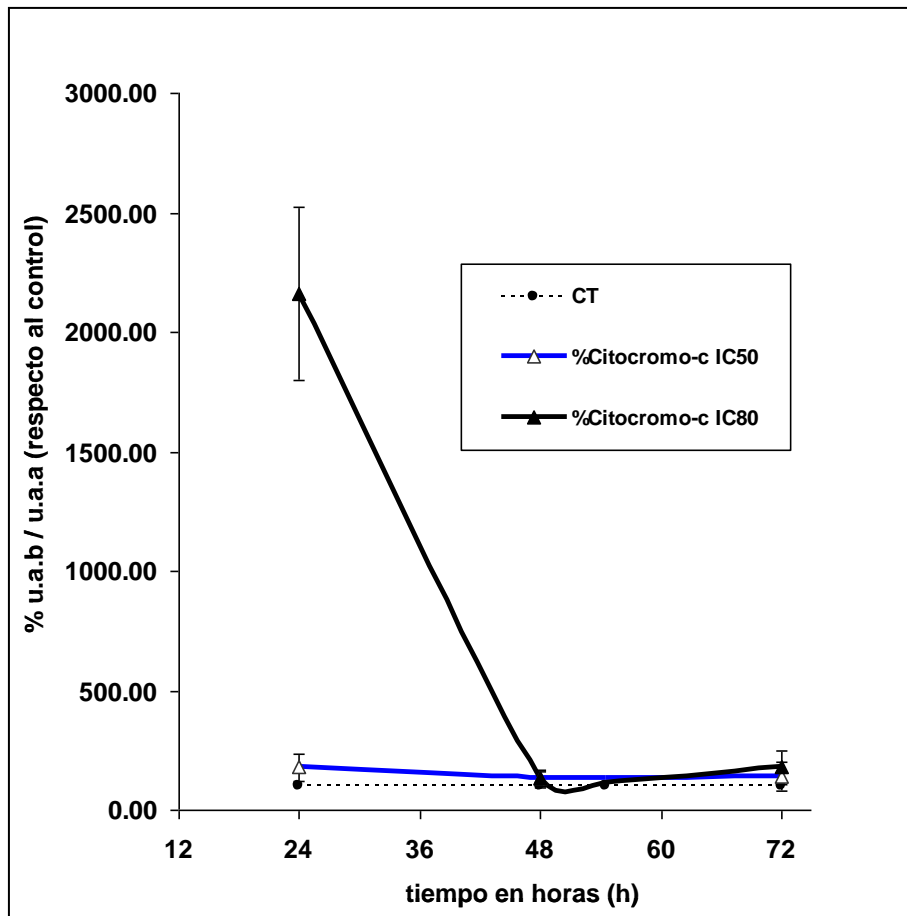
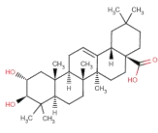
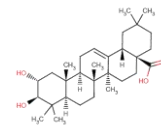


Figura 9.10 Variaciones de los porcentajes de los niveles de citocromo-c citoplasmático a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

En resumen, los resultados muestran un claro incremento de los niveles de citocromo-c a las 24h de tratamiento (**figura 9.10**), este resultado está de acuerdo con los resultados de inducción obtenidos para la caspasa-9. De manera que el aumento de niveles de citocromo-c ocurre de forma simultánea a la inducción de la caspasa-9, que a partir de este momento mantiene una elevación muy clara en sus niveles. Como ya se ha comentado, el incremento de citocromo-c va unido con una desorganización en la membrana mitocondrial. Este sería el punto de inicio de la ruta intrínseca clásica de inducción de apoptosis. Esta permeabilización de la membrana mitocondrial suele estar mediada por cambios en la expresión de diferentes proteínas de la familia Bcl-2, las cuales constituyen canales de membrana mitocondrial, siendo capaces de desequilibrar o reequilibrar las concentraciones de metabolitos presentes en la mitocondria. Entre estas diferentes proteínas se encuentran la proteína antiapoptótica Bcl-2 y las proteínas proapoptóticas Bax y Bid, cuyos niveles de expresión serán analizados a continuación.



9.1.6 Niveles de expresión de Bcl-2

La proteína Bcl-2 es una proteína canal de membrana mitocondrial, que da nombre a una familia completa de proteínas. Bcl-2 se encuentra entre los reguladores claves de los fenómenos de apoptosis. La Bcl-2 humana es una proteína de 26 kDa, asociada a membrana, con un marcado carácter antiapoptótico. Su principal función es evitar la desorganización de la mitocondria reequilibrando las concentraciones de metabolitos y especies oxígeno reactivas entre el exterior y el interior de la membrana mitocondrial.

Esta proteína se encuentra sobre-expresada en una gran variedad de tumores, confiriendo a la célula cancerígena la capacidad de evitar la desorganización de la membrana mitocondrial y el normal desarrollo del proceso de apoptosis, lo que proporciona carácter oncogénico y antiapoptótico a la línea tumoral, evitando los mecanismos apoptóticos fisiológicos. Siendo por tanto una oncoproteína que puede promover la inmortalidad de las células tumorales. Esta proteína ejerce su acción por sí misma o interaccionando con otros miembros de la familia a la que da nombre. Entre estas proteínas con carácter antiapoptótico se encuentran Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w y A1. La función anti-apoptótica de la proteína Bcl-2 puede, además, ser regulada a través de su procesamiento proteolítico y por fosforilación. Bcl-2 promueve la supervivencia celular interfiriendo en la formación del apoptosoma, por la estabilización de la membrana mitocondrial evitando la desorganización mitocondrial y la liberación de citocromo-c.

A la familia Bcl-2 también pertenecen otros miembros, que aunque también son canales de membrana mitocondrial, en este caso promueven la desorganización de la misma. Lo que tiene lugar promoviendo el desequilibrio de las concentraciones de metabolitos y especies oxígeno reactivas entre el interior y el exterior de la mitocondria. Entre estas proteínas con carácter proapoptótico se encuentran Bax, Bak, Bok, Bik, Bad y Bid. El anticuerpo utilizado reconoce al antígeno correspondiente a los aminoácidos 41-54 de la cadena polipeptídica de la Bcl-2 humana. El análisis de los *westerns* se llevó a cabo midiendo la intensidad de las bandas en unidades arbitrarias y refiriendo ésta a las intensidades de las actinas correspondientes (u.a.b./u.a.a.). En este caso los *westerns* fueron realizados por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (**figura 9.11; tabla 9.6**). Las intensidades normalizadas por la actina se refirieron a los respectivos controles permitiendo comparar los resultados obtenidos a los distintos tiempos ensayados (**figura 9.12**). En estos resultados puede observarse que, prácticamente, desde el inicio del tratamiento, a 6h en el caso de IC₅₀ y a 12h en el caso de IC₈₀, los niveles de Bcl-2 disminuyeron de forma clara (**figura 9.12**).

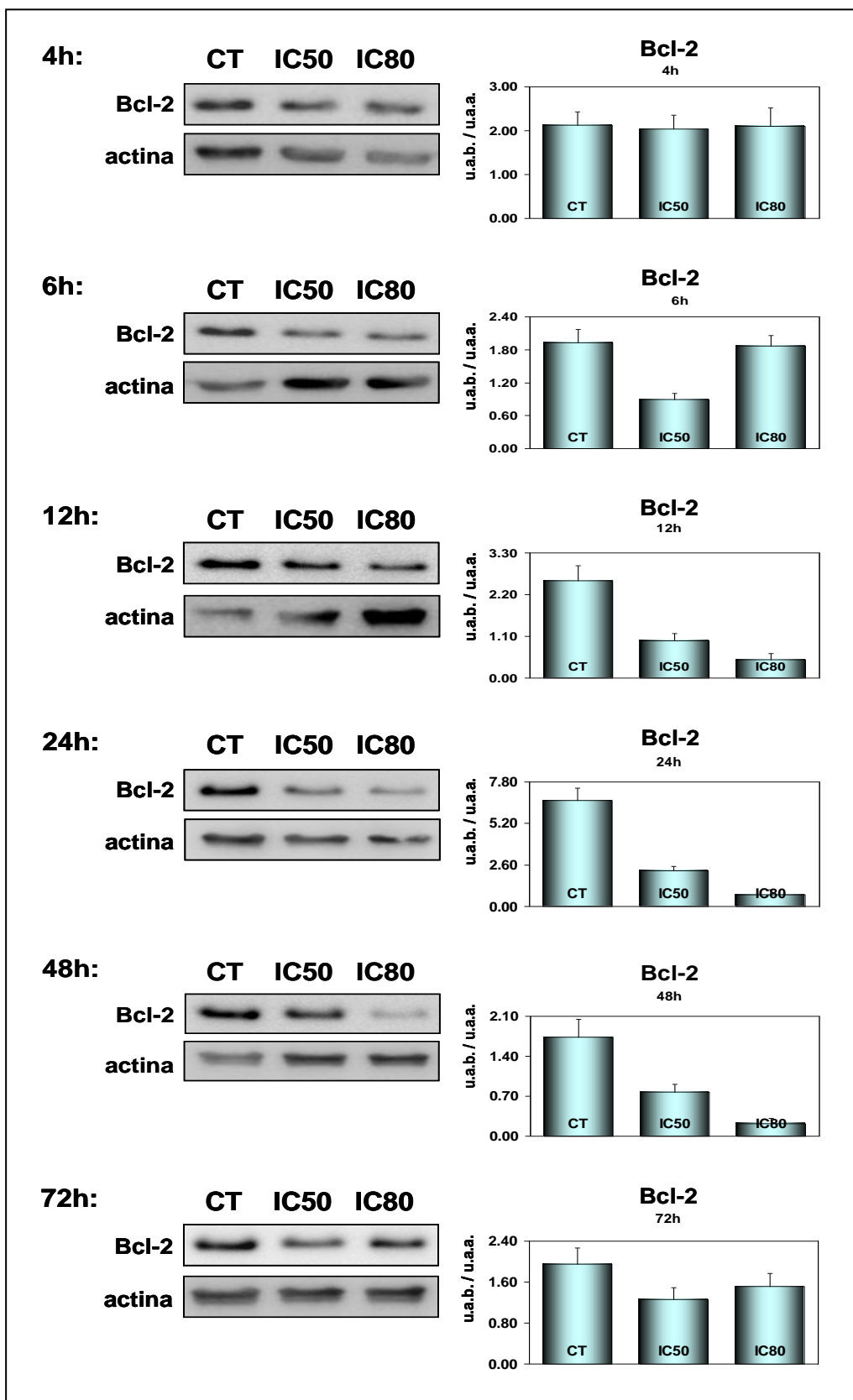
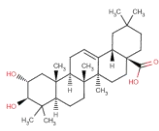
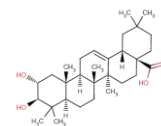


Figura 9.11 *Westerns* y niveles de Bcl-2 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



% Bcl-2	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 13.97	95.69 ± 15.03	98.74 ± 19.69
6h	100.00 ± 12.51	46.25 ± 6.06	96.81 ± 9.98
12h	100.00 ± 15.10	38.12 ± 7.42	18.98 ± 6.03
24h	100.00 ± 11.18	33.43 ± 4.28	10.96 ± 4.83
48h	100.00 ± 18.10	44.74 ± 7.79	12.92 ± 5.04
72h	100.00 ± 15.91	64.66 ± 11.41	77.13 ± 13.58

Tabla 9.6 Porcentajes de Bcl-2 en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

Siendo esta disminución observada concentración dependiente en, prácticamente, todos los tiempos ensayados, salvo para 6h y 72h donde los niveles a la concentración de IC₈₀ se encuentran por encima de los encontrados a la concentración de IC₅₀. Esta diferencia encontrada en los tiempos inicial y final podría explicarse por una disminución de Bcl-2 previa en la concentración de IC₅₀ que a la concentración de IC₈₀, o más probablemente porque el momento en el que disminuyen los niveles de Bcl-2 se encuentra entre estos dos tiempos 6h y 12h. La expresión de Bcl-2 disminuye de forma considerable llegando a ser hasta 9 veces inferior al control a las 24h de incubación y a la concentración de IC₈₀.

Los niveles mínimos de Bcl-2 se alcanzan entre las 24h y 48h de tratamiento, estos datos están en consonancia con los obtenidos en el inicio de liberación del citocromo-c y de activación de la caspasa-9. La disminución en los niveles de Bcl-2 (**figura 9.12**) se mantiene prácticamente hasta el final del tratamiento, aunque a las 72h estos niveles comienzan a aumentar, aunque manteniéndose por debajo del control en todo momento. Dentro del grupo de las proteínas de la familia Bcl-2, existen proteínas proapoptóticas como Bax. Cuando la inducción de apoptosis celular esta mediada por la activación de la expresión de p53, este factor de transcripción suele inhibir la expresión de Bcl-2 e incrementar la expresión de Bax. Esta inhibición de Bcl-2 e inducción de Bax ocurre igualmente en la apoptosis mediada por JNK y en general en cualquier mecanismo que medie con la desorganización mitocondrial.

Estos dos efectos en su conjunto potencian la señal apoptótica de forma que la inhibición de la proteína inhibitoria de apoptosis y la sobre-expresión de la proteína pro-apoptótica hacen que la señal se incremente provocando, de forma irreversible, la permeabilización mitocondrial y la entrada en apoptosis de la célula.

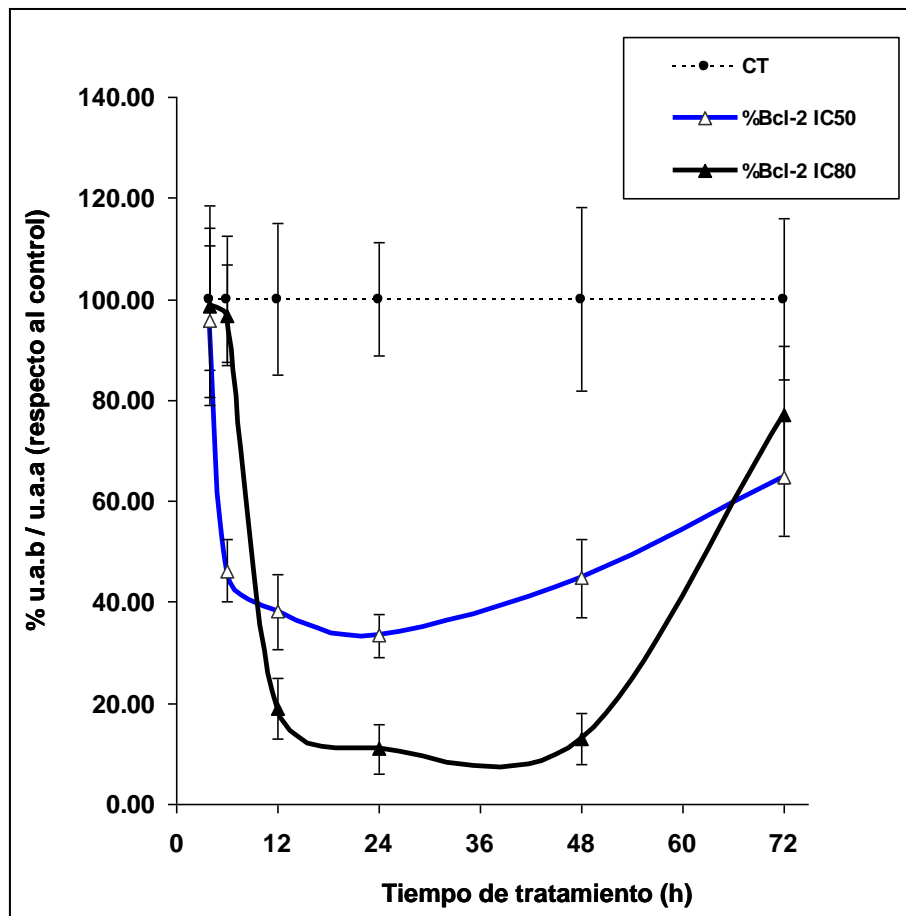
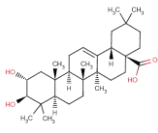
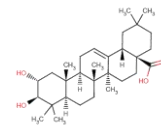


Figura 9.12 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bcl-2 a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC50 e IC80. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

9.1.7 Niveles de expresión de Bax

Bax es una proteína proapoptótica perteneciente a la familia Bcl-2, con función contraria a la realizada por Bcl-2. Posee una alta homología con Bcl-2 y ambas son capaces de formar homodímeros o incluso heterodímeros entre ellas. La sobre-expresión de Bax acelera, por ejemplo, la muerte celular en células dependientes de IL-3 (interleuquina-3), así como en otras dependientes de citoquinas. Se ha descrito la intervención de Bax en una gran variedad de rutas de inducción de apoptosis, entre las que se encuentra la producida por la liberación de la proteína Smac/Diablo en la apoptosis inducida por TRAIL (Deng y col., 2002). También se ha descrito que la calpaína-1 regula la expresión de Bax y consecuentemente la liberación de Smac/Diablo en la apoptosis de neutrófilos. (Alznaver y col., 2004). La expresión de Bax está ligada a la inducción de apoptosis a través del factor de transcripción p53 (Berns, 2004).



El anticuerpo utilizado se obtuvo contra un péptido N-terminal de la proteína Bax de origen humano. Las bandas fueron analizadas determinando su intensidad en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda de la actina (u.a.b./u.a.a.). Los *westerns* fueron realizados en este caso por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9.13** y **tabla 9.7**.

En respuesta al tratamiento con el ácido maslínico sobre las células HT29, Bax se activó tanto de forma concentración dependiente como tiempo dependiente, llegando a su máxima activación tras las 72h de tratamiento y a la concentración de IC₈₀. El incremento de los niveles de Bax se observa de forma clara en las imágenes de los *westerns* y en el análisis de las bandas, desde las 12h del comienzo del tratamiento a la concentración de IC₈₀ o desde las 24h a la concentración de IC₅₀. Los niveles de Bax aumentan de forma lineal hasta 8 o 10 veces al final del tratamiento respecto a los controles (**figura 9.14**). La inducción de Bax comienza aproximadamente a las 12h de tratamiento, en el mismo momento que ocurre la inhibición de Bcl-2.

La activación de Bax a las 12h-24h de tratamiento está en consonancia con los datos encontrados para el resto de proteínas analizadas. De forma que durante las primeras 6h a 12h comienza la inhibición de Bcl-2, a las 12h - 24h se activa Bax, a las 24h se libera citocromo-c y al mismo tiempo se activa la caspasa-9, que a su vez produce la activación exponencial de la caspasa-3, y por último, a las 72h de tratamiento, se induce la activación de la caspasa-7 y de la caspasa-8.

Se han descrito varios mecanismos de activación de Bax y de inhibición de Bcl-2, siendo quizás el más importante, por su significado, el inducido a través de la proteína p53, ya que p53 es una proteína capaz de provocar varios fenómenos muy importantes en la fisiología celular. Por un lado, desencadena la reparación del DNA y la diferenciación celular. Si estos procesos no han tenido éxito entonces es capaz de provocar el inicio de los fenómenos de apoptosis y por tanto la muerte celular programada. Por otro lado, ha sido descrita la activación de p53 como uno de los procesos finales de activación de la ruta apoptótica de JNK.

También se ha descrito la activación de Bax e inhibición de Bcl-2 por la acción directa de JNK sobre estas proteínas. Otra proteína que también es capaz de incrementar los niveles de Bax es Bid (**Rocou y col., 2002**). Bid es, también, una proteína perteneciente a la familia de Bcl-2, aunque en este caso se trata de una proteína de un solo dominio BH3, soluble, citosólica y que puede ser activada normalmente a través de la caspasa-8 o de JNK en su papel apoptótico.

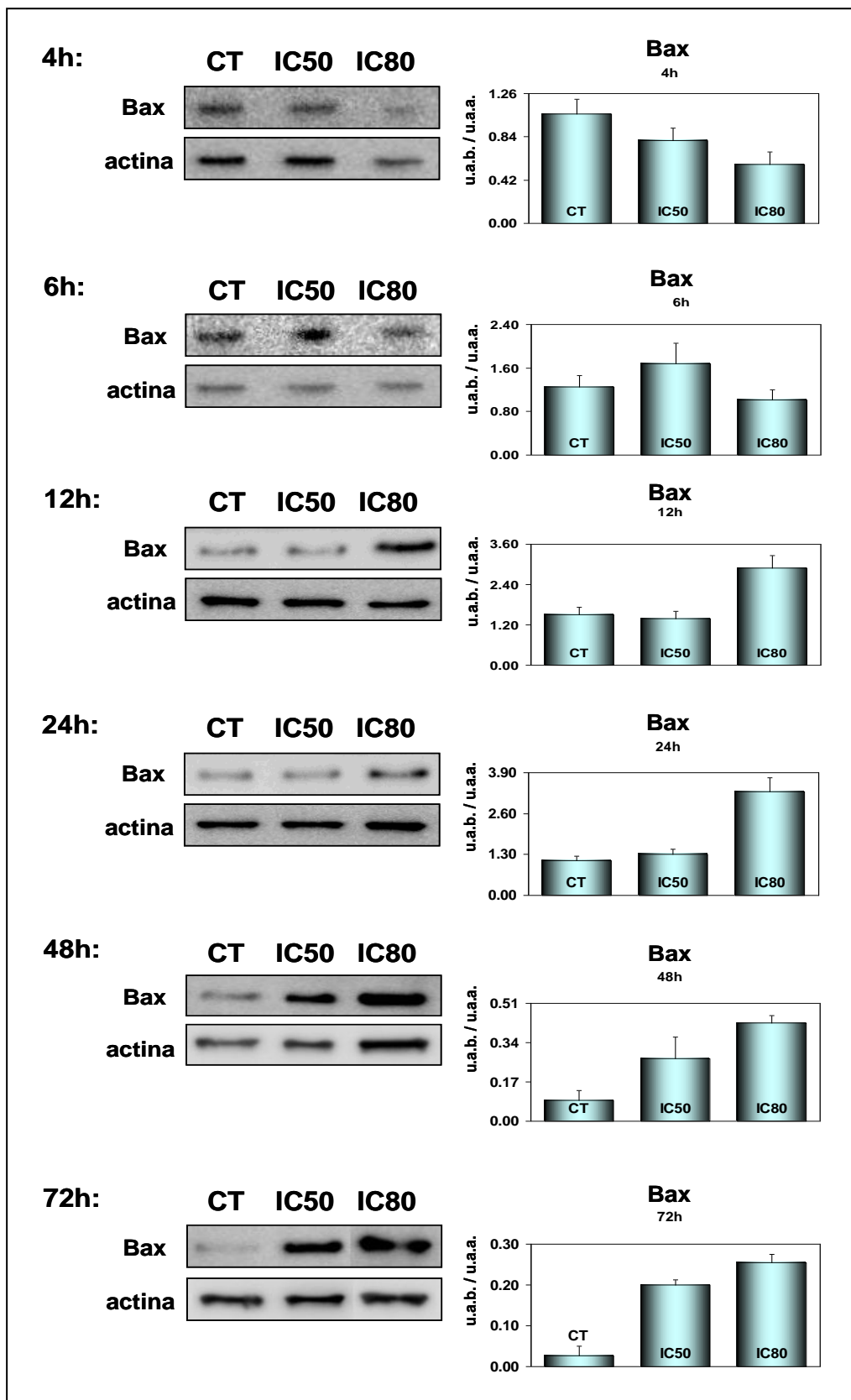
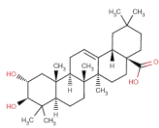
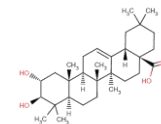


Figura 9.13 *Westerns* y niveles de Bax en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



% Bax	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 13.51	76.00 ± 11.38	54.23 ± 11.14
6h	100.00 ± 16.57	134.34 ± 29.90	80.56 ± 15.58
12h	100.00 ± 14.19	91.56 ± 14.46	191.33 ± 25.19
24h	100.00 ± 14.37	119.12 ± 15.56	301.40 ± 39.12
48h	100.00 ± 49.90	304.16 ± 102.49	475.23 ± 35.30
72h	100.00 ± 92.86	766.97 ± 47.44	971.51 ± 76.35

Tabla 9.7 Porcentajes de los niveles de Bax en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

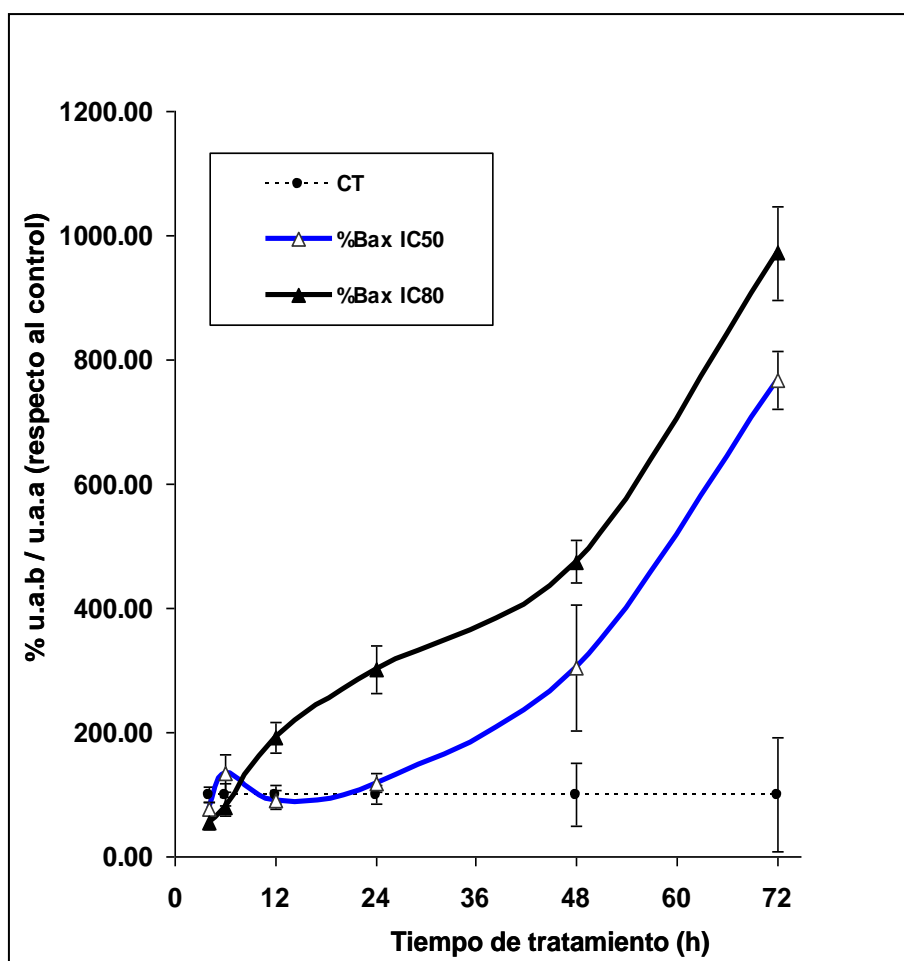
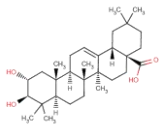


Figura 9.14 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bax a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



9.1.8 Niveles de expresión de Bid

Para terminar con el grupo de proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2 se examinó la variación en los niveles de Bid. Como ya se ha mencionado Bid al igual que Bcl-2 y Bax pertenece a la misma familia. En este caso, Bid es una proteína pro-apoptótica capaz de activar a Bax o de liberar directamente el citocromo-c mitocondrial al citoplasma. Los miembros de la familia Bcl-2 presentan una homología conservada en cuatro dominios, BH1, BH2, BH3 y BH4. Sin embargo un subgrupo comparte homología sólo en el dominio BH3 (Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Hrk y Egl-1). Bid es sintetizada como una proteína de 195 aminoácidos (el dominio BH3 comprende a los aminoácidos del 86 al 100). Esta proteína es activada proteolíticamente a través de varios residuos de Asp (aminoácidos 59, 75 o 98 en el caso de la Bid de ratón).

La activación proteolítica de Bid es llevada a cabo, normalmente, a través de la caspasa-8. Aunque también se ha descrito la activación de Bid por parte de JNK (Yibin y col, 2003). Tras la activación proteolítica de Bid se generan varios fragmentos de distinto tamaño, un fragmento amino-terminal de 6.5 kDa y un fragmento en el extremo carboxilo-terminal que contiene el dominio BH3 de 15 kDa, aunque también aparecen de fragmentos de 13 y 11 kDa. La presencia del dominio BH3 intacto es necesaria para que Bid pueda ejercer su función pro-apoptótica. Bid activo o t-Bid (Bid truncado), induce la liberación de citocromo-c de la mitocondria, así como la activación de Bax e inhibición de Bcl-2. Bid completo o pro-Bid es una proteína de 22-26 kDa que se localiza en el citosol. El segmento activo t-Bid de 15 kDa se transloca a la mitocondria donde ejerce su función. El papel de los fragmentos menores de 13 y 11 kDa permanece aún sin ser caracterizado.

El anticuerpo utilizado reconoce la proteína completa y el fragmento activo t-Bid. Sin embargo la forma activa de Bid puede tener una vida media corta por lo que fácilmente puede no ser detectable. Los resultados se muestran a continuación (figura 9.15; tabla 9.8). Los datos obtenidos para cada tiempo fueron referidos a sus respectivos controles, permitiéndonos comparar los resultados obtenidos para los distintos tiempos (figura 9.16). En los westerns realizados no se pudo detectar t-Bid por lo que se analizaron los niveles de pro-Bid o Bid completo. Las imágenes de los westerns y las gráficas correspondientes al análisis de las bandas nos muestran un marcado descenso concentración y tiempo dependientes en los niveles de Bid, siendo más marcado a la concentración de IC₈₀ que a la concentración de IC₅₀. Este descenso comenzó a las 12h-24h de tratamiento, siendo el máximo descenso alcanzado a las 48h de tratamiento, prolongándose hasta el final del mismo.

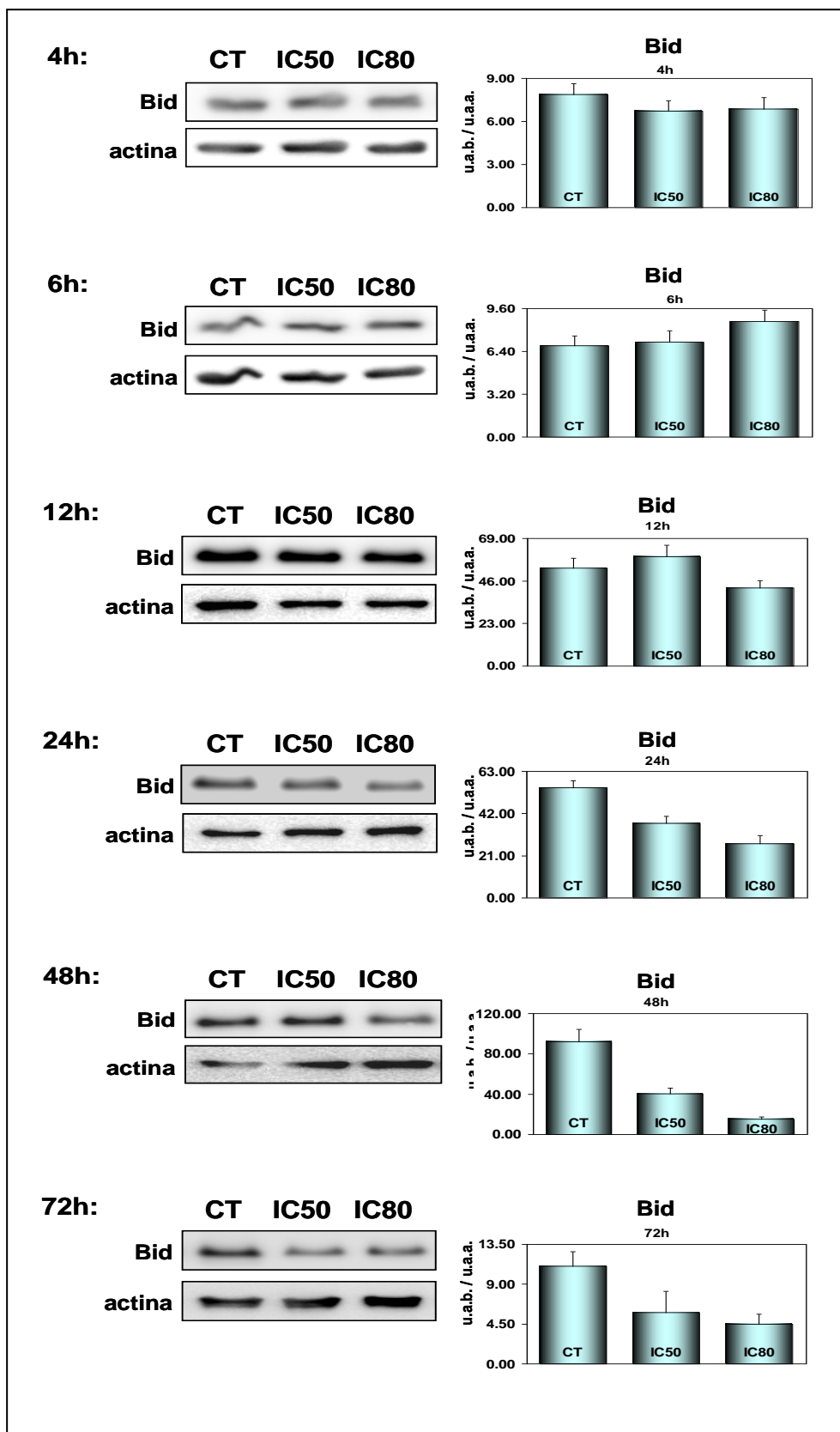
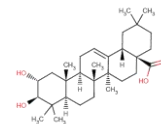
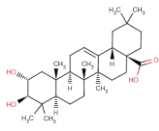


Figura 9.15 Westerns y niveles de Bid en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



%Bid	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 9.71	85.52 ± 9.13	87.28 ± 9.84
6h	100.00 ± 10.47	103.43 ± 12.37	126.14 ± 12.25
12h	100.00 ± 9.98	111.87 ± 11.43	79.86 ± 7.64
24h	100.00 ± 6.58	67.80 ± 6.62	49.40 ± 7.12
48h	100.00 ± 13.42	43.94 ± 5.69	16.45 ± 2.53
72h	100.00 ± 14.49	52.34 ± 21.74	40.20 ± 10.67

Tabla 9.8 Porcentajes de los niveles de Bid en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

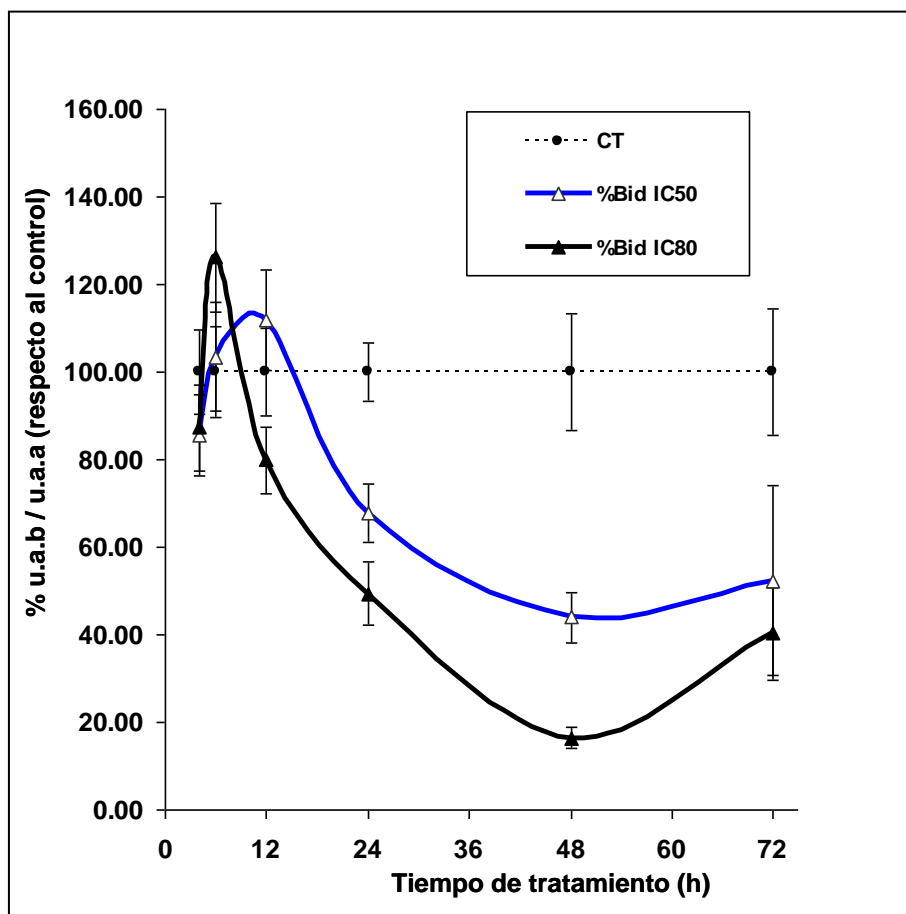
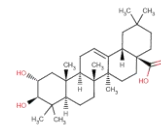


Figura 9.16 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bid a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



Los tiempos encontrados en el descenso de los niveles de Bid cuadran con los de activación o inhibición encontrados en el resto de proteínas examinadas, de forma que la activación de Bid a t-Bid, la inhibición de Bcl-2 y la activación de Bax ocurren entre las 6h y 24h de tratamiento.

La activación de Bax y la inhibición de Bcl-2 puede producirse por la acción directa del fragmento t-Bid que se transloca a la mitocondria, el dominio BH3 de este fragmento puede formar heterodímeros produciendo su activación en el caso de Bax o su inhibición en el caso de Bcl-2. De esta forma, la acción de t-Bid produce la permeabilización de la membrana mitocondrial y la activación del resto de la cascada apoptótica. Por otra parte, se ha descrito la liberación específica de Smac/Diablo por la acción del fragmento j-Bid dependiente de JNK. Smac/Diablo activaría a su vez a la caspasa-8 lo que finalmente produciría la activación del resto de la cascada apoptótica, aunque este mecanismo de inducción de apoptosis no está aún del todo claro.

9.1.9 Niveles de expresión de p53

HT-29 posee p53 aunque de baja afinidad. Por tanto, si el ácido maslínico estimula la sobreproducción de esta proteína es especialmente importante, ya que a pesar de su baja afinidad, si su concentración es lo suficientemente elevada será capaz de desempeñar su función en los procesos para los que esta proteína es necesaria. El gen de la proteína supresora de tumores p53 codifica una fosfoproteína de 393 aminoácidos que muestra una secuencia específica de unión al DNA y que interactúa directamente con varias proteínas celulares y virales. p53 es el gen más comúnmente mutado en cáncer humano, dando lugar en la mayoría de mutaciones a la sustitución de aminoácidos.

La función normal de p53 es llevar a cabo la parada del ciclo celular o arresto celular en los puntos de control G_1 y G_2 en respuesta al daño del DNA. Esta función de control sobre el ciclo celular es llevada a cabo por una acumulación de p53 debida a la inducción de los genes GADD45, WAF1 y MDM2. El modelo actual del funcionamiento de p53 postula que p53 'siente' el daño en el DNA y arresta el ciclo celular en cualquiera de las dos fases G_1 o G_2 , para que tenga lugar la reparación del DNA. Si esta reparación no es lograda con éxito, p53 inducirá la muerte celular programada, para prevenir la propagación de defectos genéticos a las sucesivas generaciones celulares.

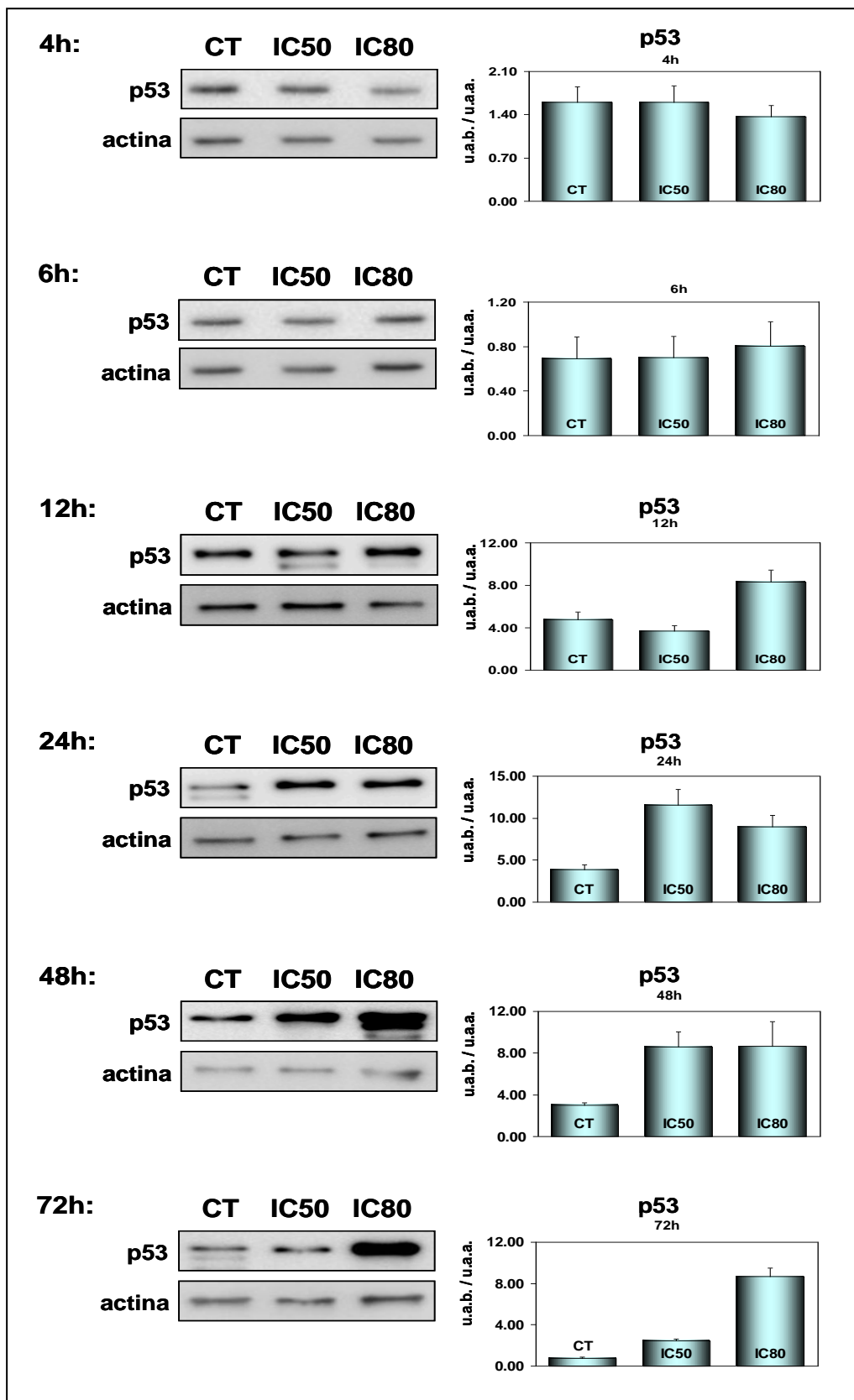
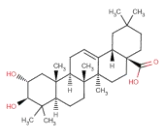
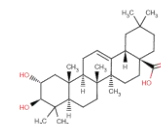


Figura 9.17 Westerns y niveles de p53 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



%p53	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 15.54	99.79 ± 16.43	85.31 ± 11.26
6h	100.00 ± 28.88	101.49 ± 27.83	117.00 ± 31.43
12h	100.00 ± 15.12	76.85 ± 11.24	173.28 ± 23.77
24h	100.00 ± 16.74	301.69 ± 47.65	232.77 ± 35.76
48h	100.00 ± 7.95	286.84 ± 48.49	288.92 ± 79.75
72h	100.00 ± 18.98	333.91 ± 18.27	1182.72 ± 107.35

Tabla 9.9 Porcentajes de los niveles de p53 en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

Para determinar si los niveles de expresión de esta proteína se ven afectados por el tratamiento con el ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29, se determinó su expresión a los tiempos ensayados de 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h, así como a las concentraciones de ácido maslínico de IC₅₀ e IC₈₀. El anticuerpo utilizado posee un epítipo contra los residuos 46-55 de la proteína p53 humana. p53 reacciona con ambos tipos proteínas nativa y mutada. El análisis de los *westerns* se llevó a cabo midiendo la intensidad de las bandas en unidades arbitrarias y refiriendo éstas a las intensidades de las actinas correspondientes (u.a.b./u.a.a.). Los *westerns* fueron realizados en este caso por triplicado. Por último, referimos los valores de intensidades corregidas por actina a los controles correspondientes, pudiendo comparar los distintos ensayos entre si (**tabla 9.9**).

En las imágenes de los *westerns* (**figura 9.17**) se observa claramente como la incubación de las células tumorales con el ácido maslínico produce la sobre-expresión de la proteína p53 de forma concentración dependiente. Esta sobre-expresión se hace más evidente a partir de las 12h de tratamiento en el caso de la concentración de IC₈₀ y de las 24h en el caso de la concentración de IC₅₀, llegando a su máximo tras las 72h de tratamiento. Los resultados del 'time course' (**figura 9.18**) muestran como a partir de las 12h-24h la inducción de la sobre-expresión de p53 producida por el ácido maslínico es muy alta, llegando a ser, en el caso de IC₈₀ de hasta 12 veces respecto al control tras las 72h de tratamiento. Para el caso de IC₅₀ también existe sobre-expresión pero ésta es algo menor, siendo de unas 4 veces respecto al control a las 72h de tratamiento. En ambos casos parece ser que tras su activación los niveles de p53 se mantienen constantes durante las primeras 24h-48h, aumentando a partir de este punto de forma exponencial hasta las 72h de tratamiento.

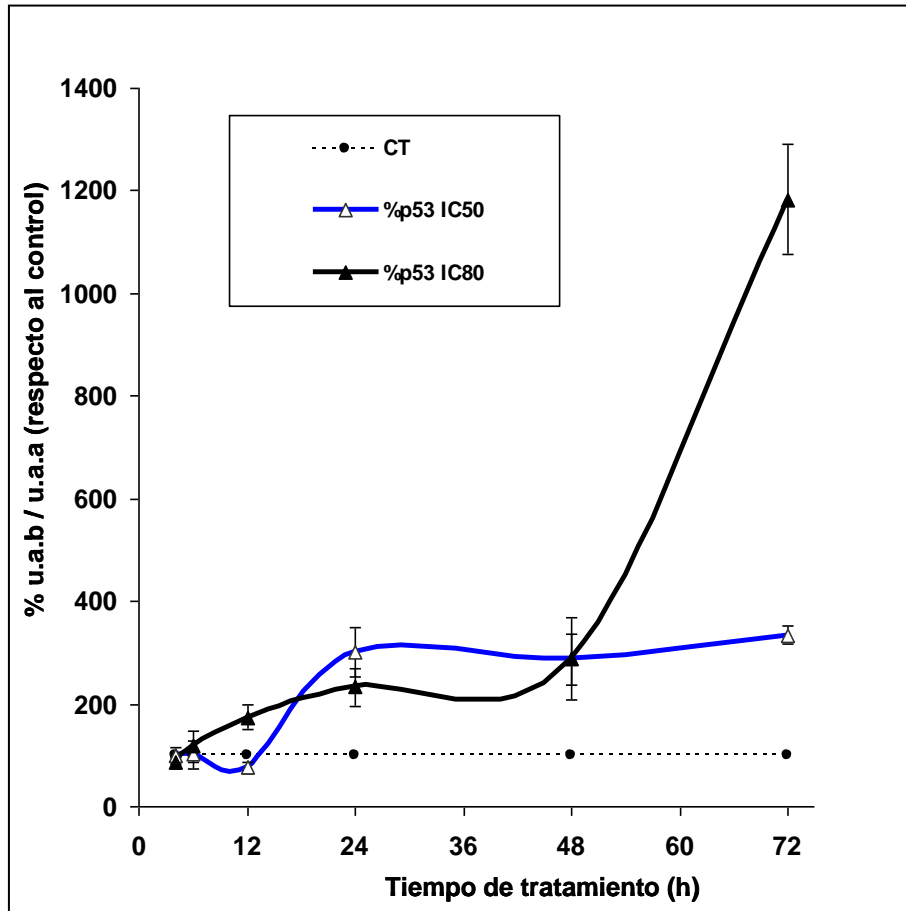
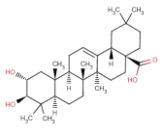
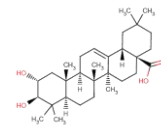


Figura 9.18 Variaciones de los porcentajes de los niveles de p53 a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

De hecho estos resultados están en estrecha relación con los obtenidos en el análisis del ciclo celular, en los que el ácido maslínico produce el arresto celular en la fase del ciclo G₀/G₁, así con los resultados mostrados por el ensayo del ‘comet’ en los que se muestra como el ácido maslínico produce genotoxicidad de la que las células viables consiguen recuperarse y con el aumento de actividad fosfatasa alcalina lo que indica la inducción de diferenciación celular. Todos estos resultados pueden estar relacionados con este incremento substancial en los niveles de p53. Indicando que el ácido maslínico es capaz de inducir la diferenciación de la célula tumoral y en el caso de no ocurrir correctamente, es capaz de provocar la apoptosis de la célula cancerígena.

p53 provoca la entrada en apoptosis celular mediante la inducción de la expresión de proteínas apoptóticas como Bax y la inhibición en la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, aunque también es capaz de actuar sobre estas proteínas de forma directa translocándose a la mitocondria (ver capítulo 3 de la introducción). Los resultados obtenidos en



la sobre-expresión de p53 en respuesta a la acción del ácido maslínico, concuerdan con los resultados obtenidos para la expresión de Bax e inhibición de Bcl-2. Por todo esto, podemos considerar este punto como uno de los puntos más importantes en el proceso de inducción de apoptosis del ácido maslínico en la línea tumoral HT29.

9.1.10 Niveles de expresión de JNK

La proteína quinasa activada por estrés, Jun N-terminal quinasa o SAPK/JNK es potencialmente activada por gran variedad de procesos de estrés ambiental, incluido el daño por las radiaciones UV y gamma, ceramidas, citoquinas inflamatorias y en algunos casos por factores de crecimiento y agonistas de GPCR. Como ocurre con otras MAPK quinastas, la activación de esta proteína en procesos de estrés es debida a un MAPKKK (MAPK quinasa de quinasa), normalmente MEKK1-4 o por variedad de enzimas que derivan su activación de las quinastas (MLKs), las cuales fosforilan y activan a la MKK4/7, éstas a su vez pueden fosforilar y activar la quinasa SAPK/JNK.

Se ha descrito la activación de JNK en procesos de apoptosis a través de varias vías, por una parte su activación a través de la MKK7 que es a su vez activada por ASK1 y ésta es activada a través de un mecanismo ligado al receptor de membrana FAS/CD95 o TNFR-1. Una segunda vía en la que JNK es activado por SEK, que a su vez es activado por MEKK1 y ésta por el receptor NTR (ver capítulo 3 de la introducción). Por otro lado, cuando JNK es activado por NIK, ésta continúa por la ruta habitual de las MAPKs, NIK puede activar a su vez a las proteínas IKKs que activarían a NF-kB dando como resultado en la inhibición del proceso de apoptosis celular.

El balance de estos dos procesos, en principio antagónicos, junto con la activación de factores de transcripción tales como p53 y NF-kB puede estar relacionado con el éxito de la diferenciación celular, por tanto, con la supervivencia de la célula o con su fracaso, y por consiguiente, con la activación de los procesos de apoptosis celular (Luo y col., 2005). Existen tres genes que codifican para SAPK/JNK, lo cual da una mayor diversidad, resultando en 'splicing' alternativos. Cuando SAPK(JNK-1) y/o JNK-2 son activos forman dímeros que pueden translocarse al núcleo donde regulan la expresión de múltiples factores de transcripción como son c-Jun, ATF-2, p53 y otros.

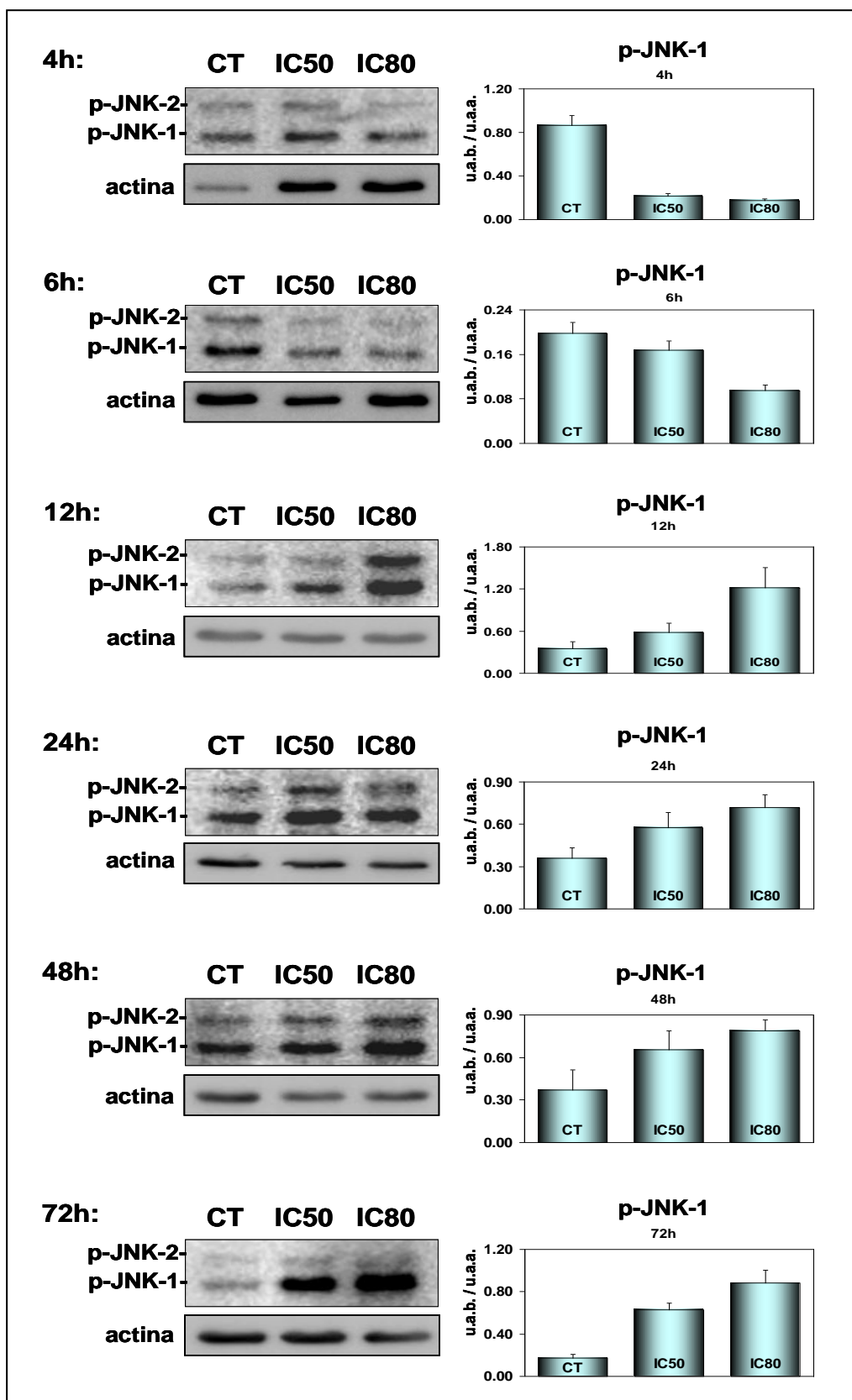
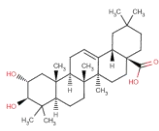
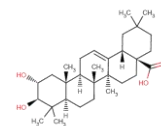


Figura 9.19 Westerns y niveles de JNK (p-JNK-2: p54; p-JNK-1: p46) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



% p-JNK-1	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 10.41	24.73 ± 2.76	19.99 ± 2.07
6h	100.00 ± 9.86	84.28 ± 8.47	48.17 ± 4.84
12h	100.00 ± 27.02	165.36 ± 36.68	346.41 ± 80.39
24h	100.00 ± 20.80	160.26 ± 30.48	200.09 ± 25.77
48h	100.00 ± 38.83	177.48 ± 36.71	214.02 ± 21.20
72h	100.00 ± 20.13	364.80 ± 37.11	510.97 ± 72.45

% p-JNK-2	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 10.42	23.02 ± 2.37	10.21 ± 1.48
6h	100.00 ± 10.05	63.37 ± 7.32	34.29 ± 4.98
12h	100.00 ± 31.09	128.47 ± 30.54	341.66 ± 72.30
24h	100.00 ± 25.18	155.19 ± 26.59	239.99 ± 25.91
48h	100.00 ± 39.85	202.84 ± 38.19	283.34 ± 34.17
72h	100.00 ± 32.48	194.43 ± 30.04	274.99 ± 37.65

Tabla 9.10 Porcentajes de los niveles de JNK en células HT29 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

En relación con la apoptosis, como ya se ha mencionado, JNK puede activar directamente p53, inhibir Bcl-2 a través de Hrk/DP5, activar Bax y promover la activación proteolítica de Bid. Por lo tanto, se examinó la expresión de esta proteína a los tiempos y concentraciones descritos anteriormente. El anticuerpo utilizado reconoce a la proteína SAPK (JNK-1)/JNK-2 fosforiladas (proteínas de 46 y 54 kDa respectivamente) en los residuos Thr183 y Tyr185, no reconociendo a los niveles endógenos de la proteína no fosforilada. Los resultados se muestran en la **figura 9.19; tabla 9.10**. Los westerns fueron realizados por triplicado.

Dado que las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ fueron calculadas para un tiempo de 72h, a los tiempos del proceso en los que se observa la disminución de los niveles de p-JNK-1 y p-JNK-2, el ácido maslínico aún no ha ejercido su efecto citotóxico sobre la línea tumoral HT-29. De forma que durante las primeras horas del tratamiento la ruta de NF-κB podría verse potenciada, inhibiendo la activación de JNK así como el proceso de apoptosis durante estos primeros instantes, por lo que la apoptosis en las células HT29 tendría lugar a un tiempo de incubación más largo respecto a las células Caco-2.

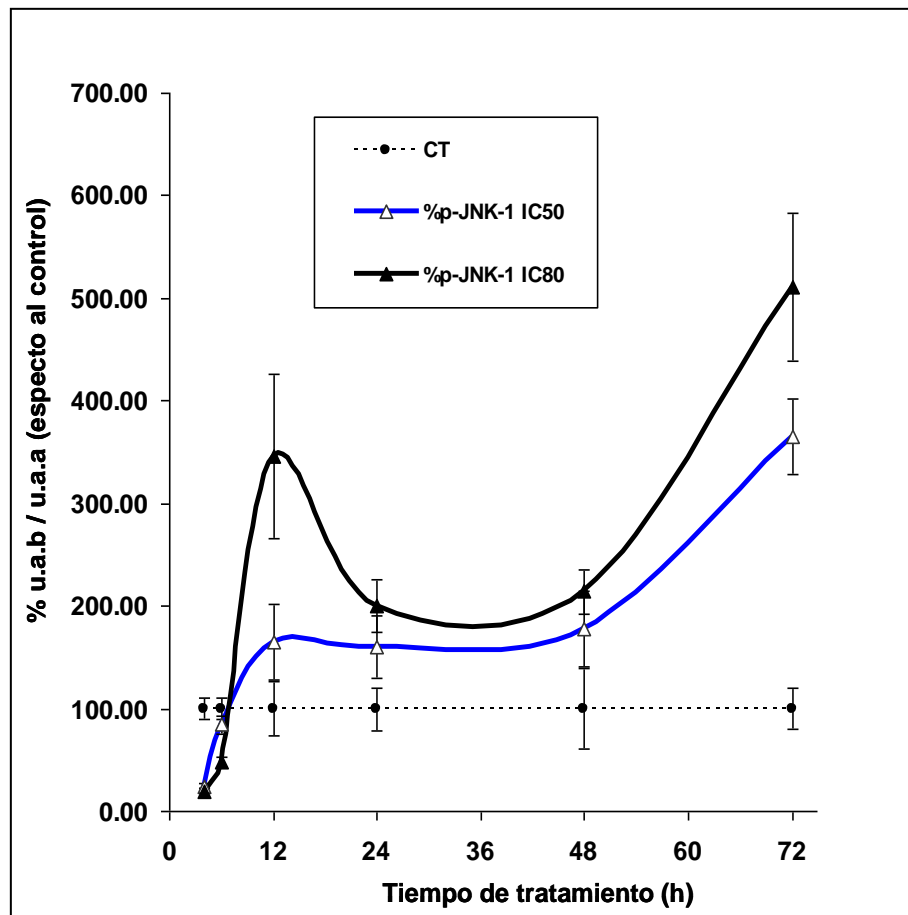
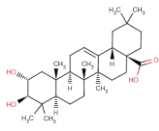
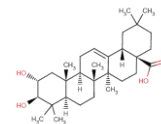


Figura 9.20 Variaciones de los porcentajes de los niveles de JNK-1 a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

La variación en los niveles de JNK puede observarse más claramente si referimos los valores de las intensidades corregidas y los comparamos entre sí (**figura 9.19; tabla 9.10**). Como puede verse existe un aumento de los niveles de p-JNK-1 y p-JNK-2 tanto tiempo como dosis dependiente desde las 12 h de tratamiento. Los niveles aumentan a partir de ese momento y se mantienen elevados, existiendo un pico de inducción a las 12h y a la concentración de IC₈₀ que disminuye a las 24h estabilizándose en este punto hasta las 48h y elevándose de nuevo de forma exponencial hacia el final del tratamiento (**figura 9.20**). En el caso de los niveles de p-JNK-2, tras el pico de inducción observado a las 12h, estos se mantienen estables hasta el final del tratamiento. Debido a que los niveles de caspasa-8 no aumentan hasta transcurridas 72h, la disminución de los niveles de Bid puede deberse probablemente al aumento de la expresión de JNK. Este aumento en la expresión de JNK durante las 6h-12h y el mantenimiento o incluso aumento de los niveles del mismo durante el resto de tratamiento hace pensar que el mecanismo de inducción propuesto transcurre a través de una ruta mediada por esta proteína, lo que concuerda perfectamente con el resto de los resultados encontrados.



9.2 Línea tumoral Caco-2

Las células Caco-2 fueron incubadas con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ halladas para 72h. A continuación, se examinó la expresión de las proteínas apoptóticas ya descritas en el apartado anterior a los tiempos de incubación de 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los extractos celulares se realizaron inmediatamente después de transcurrido el tiempo de incubación para evitar la posible degradación de las muestras, ya que algunas de las proteínas analizadas poseen un peso molecular muy bajo degradándose rápidamente. El ácido maslínico indujo apoptosis tanto en células cancerígenas HT29 con un p53 funcional, como en las células Caco-2 las cuales son p53 deficientes, siendo la apoptosis inducida en células Caco-2 superior y más rápida a la hallada en HT29. Por tanto, la ruta de inducción de apoptosis en este tipo celular, aunque seguramente ligada a la ruta de inducción de apoptosis encontrada en HT29, transcurrirá a través de algún paso diferencial, lo que podría explicar las diferencias encontradas en el resto de los ensayos realizados en los dos tipos celulares.

9.2.1 Niveles de expresión de caspasa-3

Como ya se explicó en el estudio llevado a cabo en HT29, la caspasa-3 es la principal proteína efectora de la apoptosis. El análisis de esta proteína fue llevado cabo en primer lugar ya que el aumento en los niveles de caspasa-3 es necesario y suficiente para desencadenar los procesos apoptóticos, luego su activación nos indicará de forma clara la capacidad del maslínico en inducir apoptosis sobre la línea celular Caco-2. Al igual que en HT29, los resultados se muestran como la intensidad de la banda normalizada a la encontrada con la actina. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

En este caso, la inducción de apoptosis es mucho más clara, al comienzo del tratamiento, que en células HT29. La sobre-expresión de la caspasa-3 se produce a partir de las primeras 4h y se prolonga durante el resto del tratamiento. Además existe una clara disminución en los niveles de procaspasa-3 a todos los tiempos ensayados. Estos resultados son visibles tanto en las imágenes de los *westerns* como en el análisis de las intensidades de las bandas (**figura 9.21** y **tabla 9.11**). A continuación y tras corregir las intensidades de las bandas por las intensidades de las actinas correspondientes se refirieron estos valores a los respectivos controles de cada ensayo, permitiendo así la comparación entre la expresión observada a distintos tiempos (**figura 9.22; figura 9.23**).

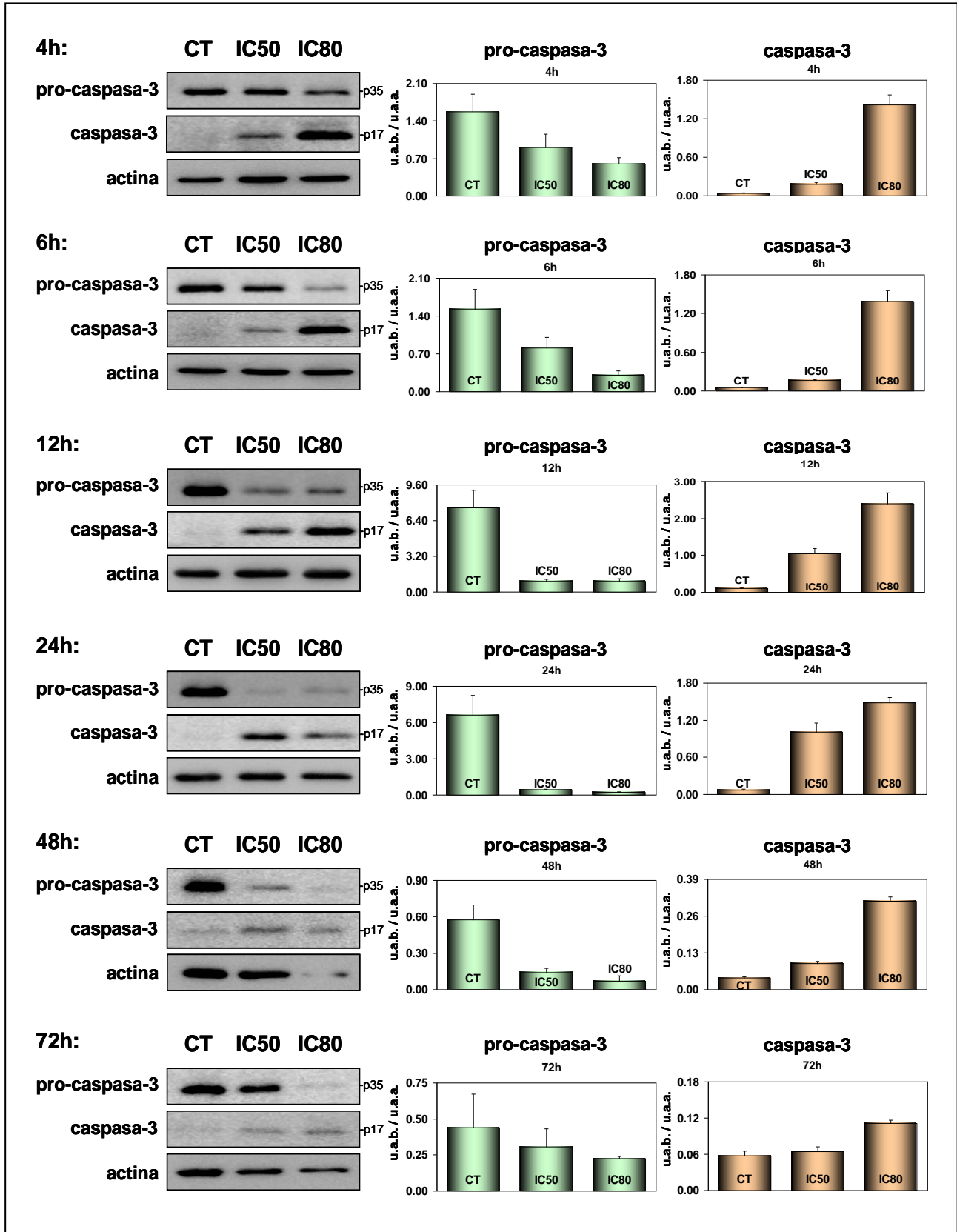
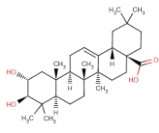
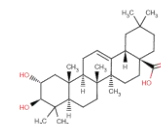


Figura 9.21 *Westerns* y niveles de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



% Procaspasa-3	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 13.66	57.67 ± 15.92	37.91 ± 7.59
6h	100.00 ± 15.90	52.84 ± 13.17	19.99 ± 4.92
12h	100.00 ± 13.89	12.42 ± 2.74	12.47 ± 3.25
24h	100.00 ± 16.02	6.89 ± 0.66	3.07 ± 0.98
48h	100.00 ± 8.52	24.74 ± 5.93	12.43 ± 7.09
72h	100.00 ± 10.72	70.37 ± 5.70	51.09 ± 3.95

% Caspasa-3	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 17.07	474.20 ± 62.80	3714.07 ± 403.01
6h	100.00 ± 13.00	321.10 ± 34.09	2757.24 ± 340.47
12h	100.00 ± 14.79	1061.10 ± 145.40	2444.52 ± 311.28
24h	100.00 ± 18.05	1388.19 ± 209.49	2052.57 ± 116.86
48h	100.00 ± 10.58	222.51 ± 18.23	749.85 ± 38.18
72h	100.00 ± 10.39	120.94 ± 8.89	82.42 ± 6.80

Tabla 9.11 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

Podemos observar la dependencia entre los niveles de caspasa-3 y la concentración de ácido maslínico siendo estos niveles menores a la concentración IC₅₀ que a la IC₈₀. Esta dependencia también ocurre, aunque de forma inversa, en los niveles de procaspasa-3. En cuanto a la dependencia entre los niveles de caspasa-3 y los tiempos de incubación (**figura 9.23**), a la concentración de IC₈₀ el máximo de inducción se da justo al comienzo del tratamiento. A partir de las 6h estos niveles disminuyen hasta los 72 h, próximos a los encontrados en los controles. En cuanto a los resultados encontrados a IC₅₀, los niveles de caspasa-3 también aumentan pero de forma más pausada. Estando desde el inicio del tratamiento, por encima del nivel control, alcanzan el máximo de activación a las 24h de tratamiento, momento a partir del cual descienden llegando a niveles próximos al control tras las 72h de tratamiento.

En el caso de las células Caco-2 existen cambios significativos en las concentraciones de procaspasa-3 en función del tiempo, estos cambios se muestran más claramente en la grafica de la **figura 9.22**. A diferencia con las células HT29, en las células Caco-2 la disminución de los niveles de procaspasa-3 es claramente visible, llegando a un mínimo cercano al 3% respecto al control a las 24h de tratamiento. A continuación estos niveles aumentan hasta las 72h de tratamiento, encontrándose en todo momento por debajo del 60% respecto al control.

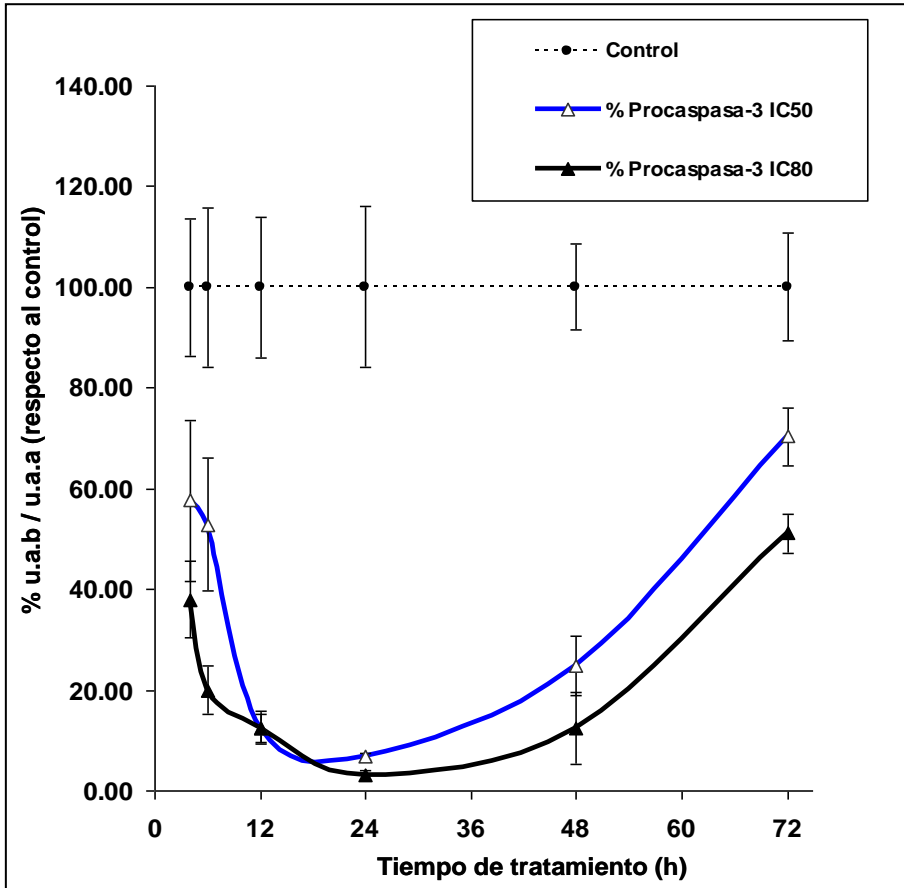
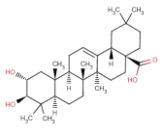


Figura 9.22 Variaciones de los porcentajes de los niveles de procaspasa-3 (p35) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

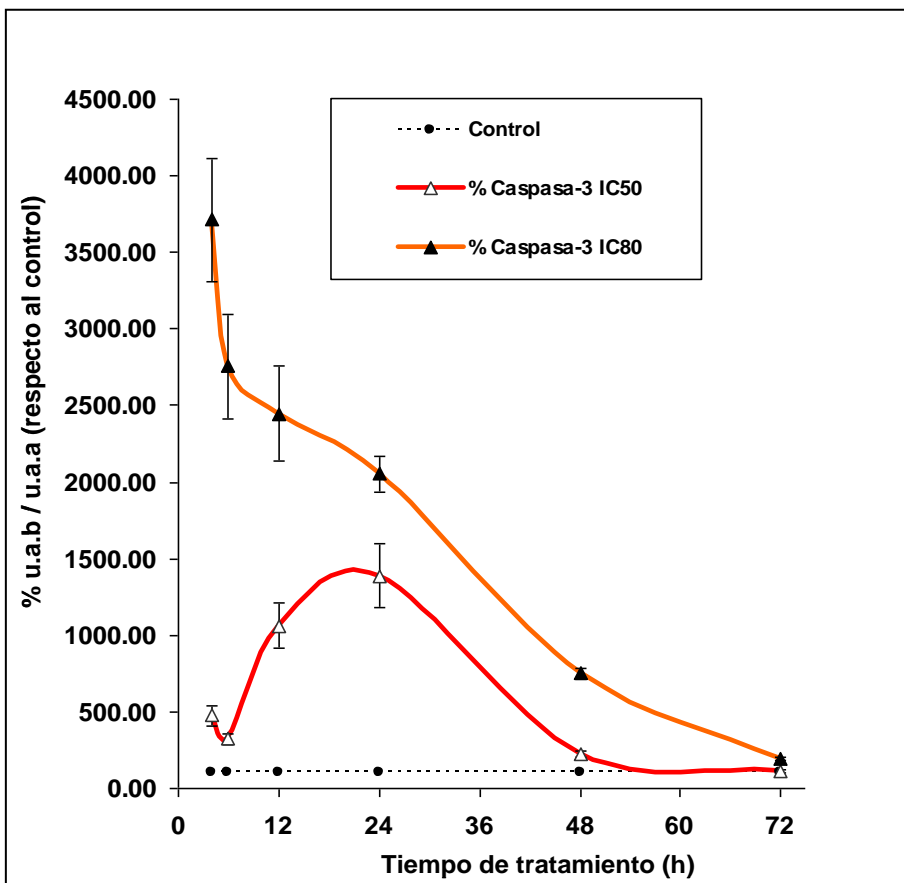
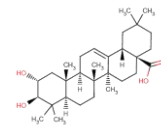


Figura 9.23 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-3 (p17) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



Comparando estas dos graficas (**figura 9.22, figura 9.23**) puede observarse que, a IC_{50} , el tiempo en el que se alcanza la máxima activación de la caspasa-3, coincide con el mínimo encontrado para la procaspasa-3. El comportamiento en los niveles de caspasa-3 en Caco-2 respecto al tiempo es claramente el opuesto al encontrado en HT29, alcanzando el máximo de inducción justo al inicio del tratamiento. Esta diferencia podría responder a variaciones en el mecanismo molecular de inducción de apoptosis en Caco-2 con respecto al hallado en HT29.

Otras diferencias significativas halladas en los resultados del efecto del ácido maslínico entre estos dos tipos celulares, podrían explicarse por variaciones en el mecanismo de inducción de apoptosis, como son: la menor recuperación de la genotoxicidad en células Caco-2; un mayor arresto celular en la fase G_0/G_1 en las células HT29; y por último una mayor actividad fosfatasa alcalina en células HT29 respecto células Caco-2, lo que implica una diferenciación celular menor en las células Caco-2.

9.2.2 Niveles de expresión de caspasa-8

Tras comprobar que la activación de la caspasa-3 en células Caco-2 tiene lugar al comienzo del tratamiento con ácido maslínico, pasamos a determinar que mecanismo de apoptosis está implicado en esta activación. Se examinaron los niveles de caspasa-8 a los tiempos de 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. La caspasa-8 puede activar de forma directa a la caspasa-3, aunque esta activación puede ocurrir también a través de la caspasa-9 mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial, en respuesta a la activación de Bid, que a su vez puede ser activado por la caspasa-8. Este mecanismo indirecto de activación de caspasa-3 refuerza la señal apoptótica inducida a través de la caspasa-8. Cuando la caspasa-8 actúa como caspasa iniciadora de la señal apoptótica, su activación ocurre normalmente a través de receptor de membrana tipo Fas o TNFR-1, capaces de activar tanto la vía mediada por caspasa-8 como la mediada por JNK (**Wen- y col., 2004; Deng y col., 2003**).

Los resultados se muestran como intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.b./u.a.a.) (**Figura 9.24**). Los westerns fueron realizados, en este caso, por duplicado. Tras normalizar los valores de intensidad por las actinas se refirieron estos valores a los respectivos controles, lo que nos permitió poder comparar los niveles de procaspasa-8 y caspasa-8 entre los distintos tiempos ensayados. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control (**tabla 9.12**).

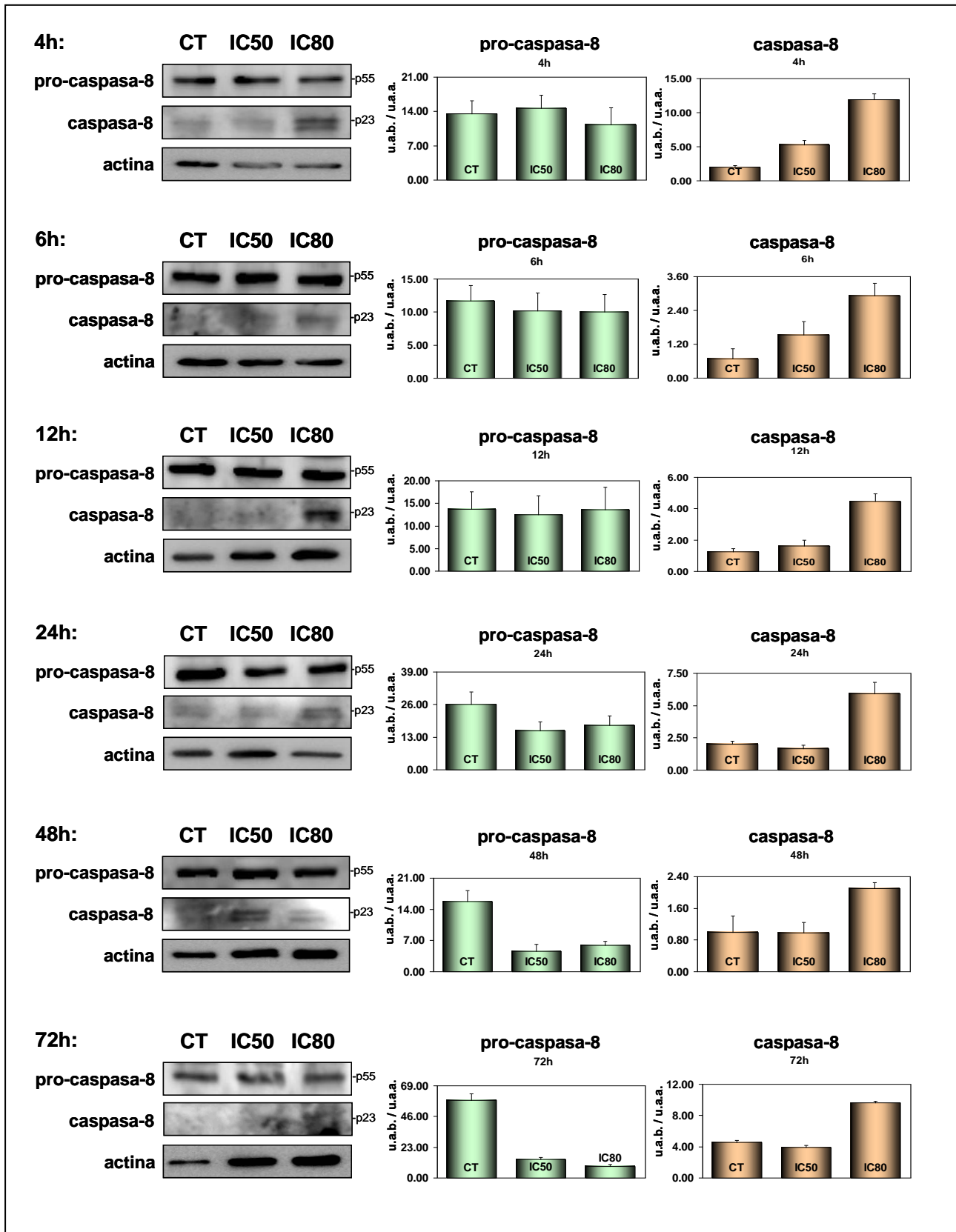
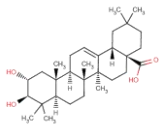
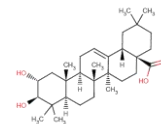


Figura 9.24 Westerns y niveles de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p55) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



% Procaspasa-8	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 19.10	107.71 ± 20.15	83.14 ± 25.73
6h	100.00 ± 19.61	86.99 ± 23.17	85.26 ± 22.71
12h	100.00 ± 28.00	91.41 ± 30.60	98.74 ± 36.69
24h	100.00 ± 19.50	59.91 ± 13.24	68.06 ± 14.17
48h	100.00 ± 15.53	28.87 ± 9.96	37.54 ± 6.08
72h	100.00 ± 8.50	24.19 ± 2.54	14.85 ± 2.26

% Caspasa-8	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 15.02	265.15 ± 36.46	604.00 ± 42.48
6h	100.00 ± 54.85	228.45 ± 69.89	434.44 ± 65.35
12h	100.00 ± 16.49	129.18 ± 31.19	356.80 ± 39.16
24h	100.00 ± 10.18	82.63 ± 12.93	293.44 ± 43.69
48h	100.00 ± 42.15	98.87 ± 26.75	211.44 ± 14.26
72h	100.00 ± 6.38	86.19 ± 6.17	212.73 ± 4.41

Tabla 9.12 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p55) en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

Según estos resultados se comprueba claramente que hay una sobre-expresión de los niveles de la caspasa-8 activa justo desde el inicio del tratamiento (**figura 9.26**), alcanzando el máximo de inducción a las 4h de tratamiento y a la concentración de IC₈₀. La sobre-expresión de caspasa-8 es proporcional a la concentración de ácido maslínico disminuyendo en función del tiempo de incubación llegando a niveles próximos al control al final del tratamiento (72h). A la concentración de IC₅₀ los niveles de caspasa-8 también se encuentran elevados desde el inicio del tratamiento (4h), aunque a partir de las 24h de tratamiento se alcanzan valores próximos al control.

Por otro lado, los niveles de procaspasa-8 no presentan cambios importantes al inicio del tratamiento, sin embargo, a partir de las 24h, estos valores disminuyen tanto de forma concentración como tiempo dependientes (**figura 9.25**). No obstante ello, este resultado no se ve claramente reflejado en las imágenes de los *westerns* probablemente por errores de carga, que pueden evidenciarse comprobando la corrección por actinas. Además como ocurría en las células HT29 los niveles de procaspasa están muy por encima de los de caspasa activa, lo que interfiere para su correcto análisis.

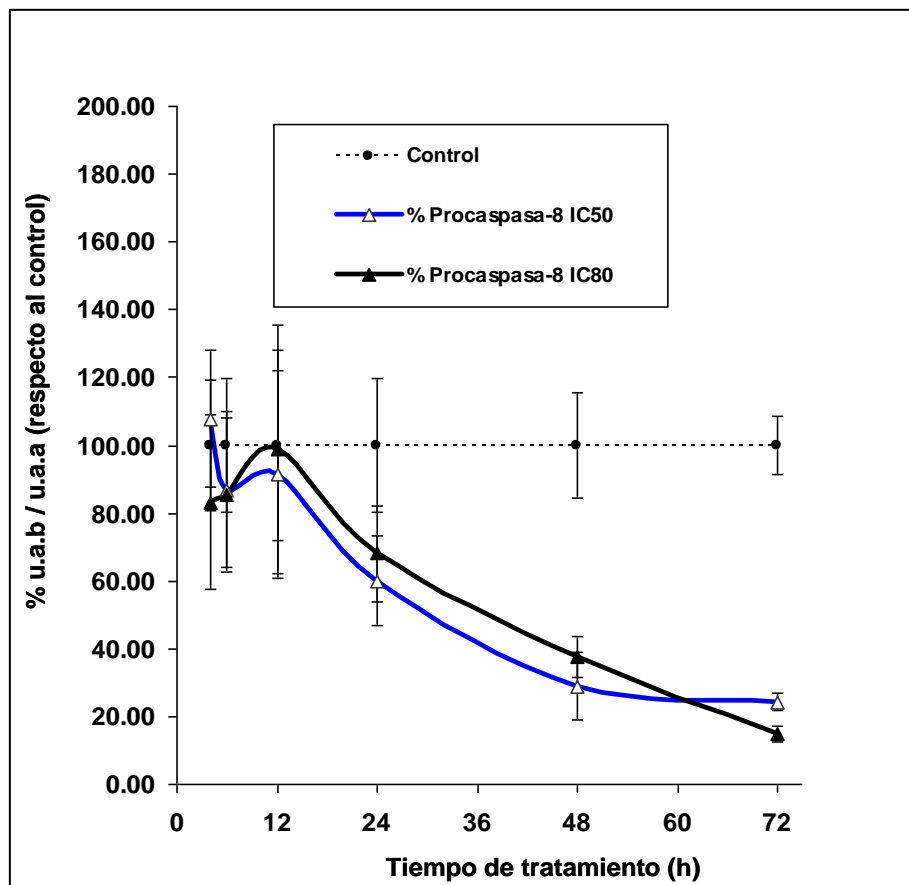
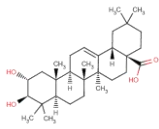


Figura 9.25 Variaciones de los porcentajes de los niveles de procaspasa-8 (p55) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

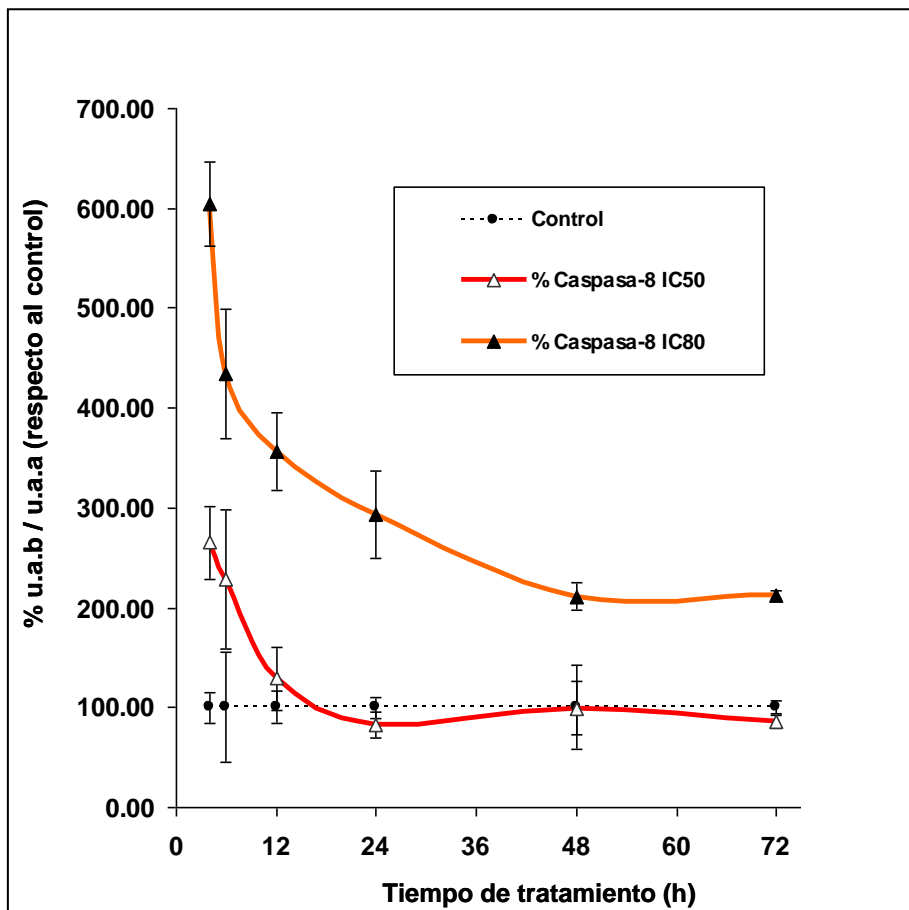
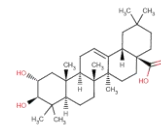


Figura 9.26 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-8 (p23) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



La activación temprana de la caspasa-8 explica los altos niveles iniciales de caspasa-3, lo cual responde a un mecanismo de inducción de apoptosis a través de receptor de membrana, que concuerda con una ruta extrínseca de inducción de apoptosis. En resumen, la activación temprana de la caspasa-8 y de la caspasa-3, hacen pensar que nos encontramos con un mecanismo de inducción de apoptosis clásicamente extrínseco en el cual el ácido maslínico estimula a un receptor de membrana tipo Fas o TNFR-1 desencadenando la activación de la caspasa-8. Mecanismo que también podría explicar los resultados obtenidos en la línea celular HT29, ya que estos tipos de receptores de membrana también pueden inducir la ruta apoptótica a través de la kinasa JNK (fundamentalmente en células de tipo II), así como la activación de p53. Aunque la activación de la ruta mediada por JNK puede, finalmente, activar a la caspasa-8, existen otros mecanismos que en el caso de las células HT29 sostendrían la inducción de apoptosis a través de JNK sin la necesidad de la participación de esta caspasa (ver capítulo 3).

9.2.3 Niveles de expresión de caspasa-9

Después de observar la inducción temprana de apoptosis en Caco-2 por el ácido maslínico a través de un mecanismo dependiente de caspasa-8, nos propusimos comprobar si también tenía lugar la activación de la caspasa-9, ya que ésta puede ser inducida a través del mecanismo propuesto, siempre que esté implicada la permeabilización de la membrana mitocondrial. La desorganización de la membrana mitocondrial puede estar mediada por la activación de Bid dependiente de caspasa-8, el cual pasa a t-Bid. El fragmento t-Bid migra a la mitocondria donde produce la activación de Bax, inhibición de Bcl-2 y la liberación de citocromo-c que finalmente activa a la caspasa-9. La desorganización de la mitocondria provoca el aumento de los niveles de citocromo-c citoplasmático que finalmente junto con Apaf-1 y la caspasa-9 forman el apoptosoma, activando a esta caspasa.

Al igual que en los casos anteriores las bandas fueron analizadas determinando su intensidad en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda. Los *westerns* fueron realizados, en este caso, por duplicado. Siendo los resultados obtenidos mostrados en la **figura 9.27**. Una vez corregidas las intensidades de cada banda por la intensidad de la actina y haciendo relativo el resultado al valor del control, comparamos los niveles de procaspasa-9 y caspasa-9 obtenidos en los ensayos a distintos tiempos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control (**tabla 9.13**).

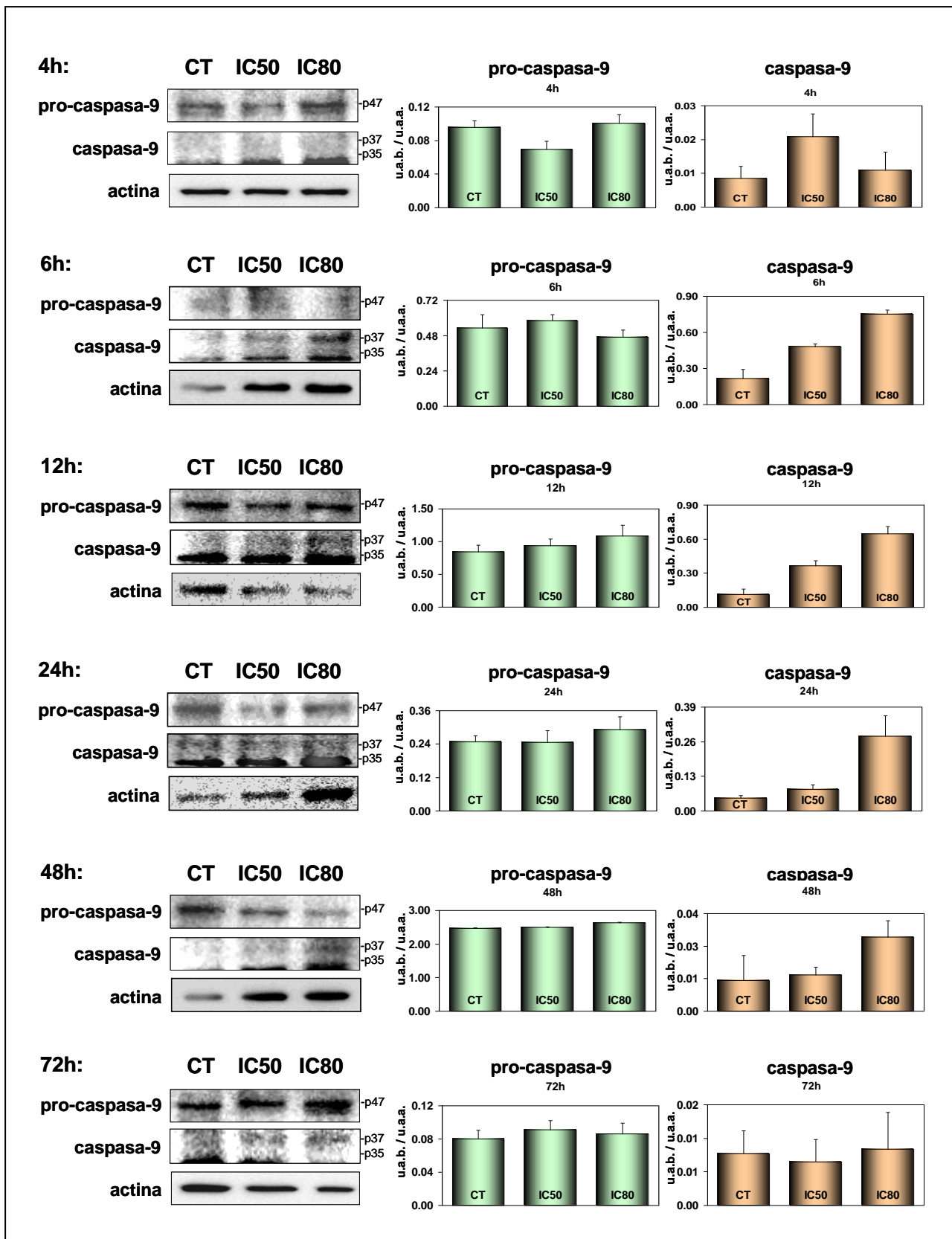
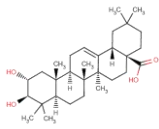
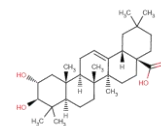


Figura 9.27 Westerns y niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



% Procaspa-9	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 8.33	72.24 ± 10.30	104.65 ± 10.96
6h	100.00 ± 16.75	108.72 ± 8.11	88.11 ± 9.11
12h	100.00 ± 11.70	110.88 ± 12.06	128.57 ± 19.57
24h	100.00 ± 8.73	99.00 ± 17.17	118.06 ± 18.11
48h	100.00 ± 0.76	101.26 ± 0.37	106.98 ± 0.46
72h	100.00 ± 13.14	113.64 ± 13.56	107.28 ± 16.65

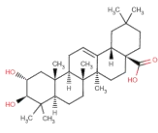
% Caspasa-9	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 41.50	243.75 ± 79.83	127.99 ± 62.61
6h	100.00 ± 34.03	222.34 ± 8.96	345.54 ± 14.61
12h	100.00 ± 46.72	328.51 ± 41.55	583.57 ± 57.13
24h	100.00 ± 18.05	165.54 ± 33.63	574.27 ± 155.30
48h	100.00 ± 81.85	118.83 ± 24.94	241.69 ± 54.25
72h	100.00 ± 44.98	83.83 ± 44.34	108.41 ± 72.06

Tabla 9.13 Porcentajes de los niveles de inducción de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

Según estos resultados (**tabla 9.13**) la activación de la caspasa-9 comienza a partir de las 4h a 6h del tratamiento pero no se alcanza el máximo hasta alcanzarlo a las 12h, siendo este de más de tres veces y manteniéndose elevada durante las siguientes 12h a 24h. A partir de este momento los niveles de caspasa-9 descienden hasta llegar valores próximos al control tras las 72h de tratamiento.

Podemos comprobar, de acuerdo con los resultados mostrados, que los niveles de caspasa-9 inducidos son además concentración dependiente, siendo mayores a la concentración de IC₈₀ que a la concentración de IC₅₀. A la concentración de IC₅₀, los niveles de caspasa-9 comienzan descender a partir de las 12h de tratamiento hasta las 48h donde alcanzan valores próximos al control.

Respecto a los niveles de la procaspasa-9, resultados mostrados en la **figura 9.28**, estos no parecen presentar una variación significativa en su análisis respecto a los niveles controles de este zimógeno, aunque pueden apreciarse ciertas variaciones cuando se analizan las imágenes de los *westerns*, lo que puede explicarse por un error en la carga o bien porque los niveles de procaspasa se encuentran muy por encima de los niveles de la caspasa activa.



Los resultados encontrados para la activación de la caspasa-9 están en consonancia con los encontrados para la caspasa-3 y la caspasa-8. El máximo de inducción de la caspasa-9 se alcanza de forma posterior al de caspasa-8, por lo que la activación de esta última probablemente suceda de forma previa a la caspasa-9, lo que es indicativo de un mecanismo de apoptosis clásicamente extrínseco.

La activación de la caspasa-9 tiene lugar, como ya se ha mencionado, por la permeabilización de la mitocondria y la posterior liberación al citoplasma de citocromo-c. Es conocido que existen varias vías de inducción de apoptosis que resultan en la permeabilización mitocondrial, en este caso y siguiendo con el mecanismo propuesto, es probable que esta permeabilización sea llevada a cabo por t-Bid en respuesta a la activación de la caspasa-8. La proteína t-Bid puede inducir la permeabilización mitocondrial bien directamente y/o mediante la inducción de Bax y la inhibición de Bcl-2.

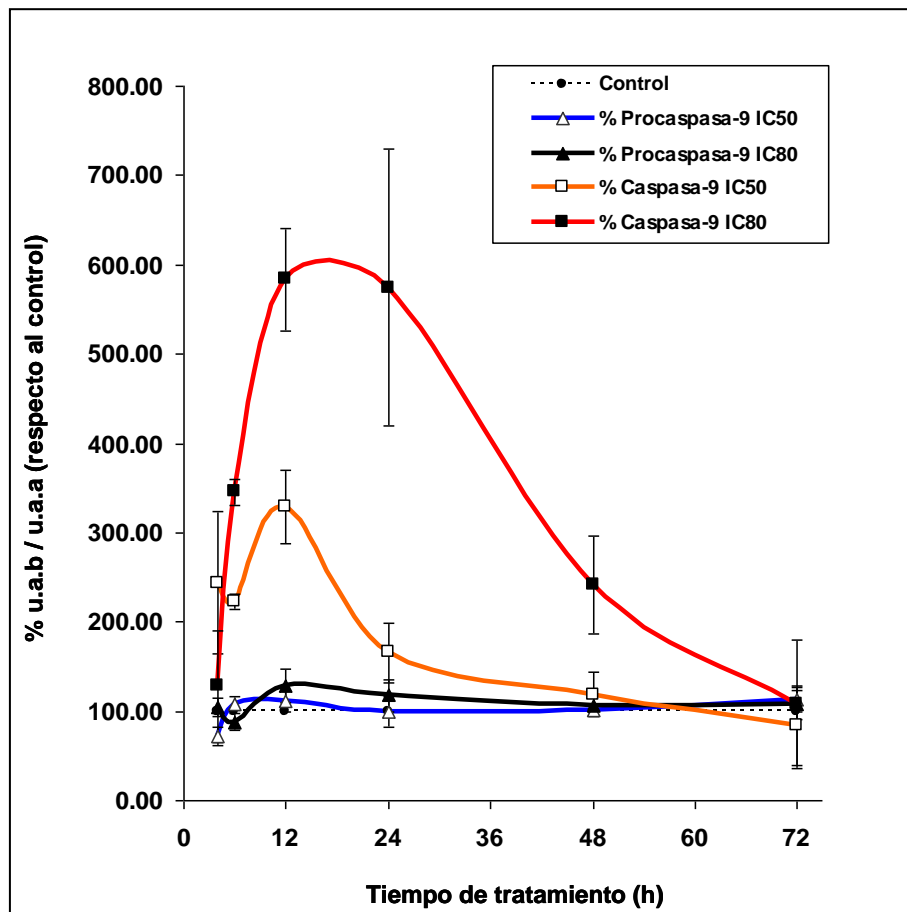
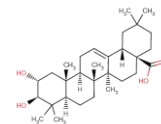


Figura 9.28 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



9.2.4 Niveles de expresión de Bid

Bid es, como se ha dicho, una proteína de la familia de Bcl-2 que es homóloga en su dominio BH3 con el resto de proteínas pertenecientes a esta familia. Esta proteína se activa proteolíticamente por la caspasa-8 dando lugar al fragmento t-Bid, que posee este dominio activo BH3. A su vez, esta proteína es capaz de activar a la proteína Bax e inhibir Bcl-2, lo que conduce a la permeabilización de la mitocondria y a la liberación de citocromo-c activando el apoptosoma y por tanto provocando la activación de la caspasa-9. Se ha descrito además la activación de Bid dependiente de JNK (ver capítulo 3). El anticuerpo utilizado reconoce la proteína completa y el fragmento activo t-Bid. Sin embargo, la forma activa de Bid puede tener una vida media corta por lo que puede ser no detectable. Los *westerns* fueron realizados, en este caso, por triplicado.

Los resultados se muestran como intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda correspondiente a la actina (u.a.b./u.a.a.) (**figura 9.29**). A continuación, se refirieron los resultados a sus respectivos controles, permitiéndonos la comparación entre los distintos tiempos (**tabla 9.14; figura 9.30; figura 9.31**). En este caso si fue posible la detección de t-Bid al menos en 4 de las muestras, las correspondientes a las 4h, 6h, 12h y 24h. Sin embargo, a las 48h y 72h no se observó la presencia de t-Bid, lo que podría deberse a la degradación de este fragmento en las muestras o a la no generación del mismo.

Según los resultados obtenidos tanto la disminución de los niveles de Bid como el incremento de los niveles de t-Bid son concentración dependiente siendo sus valores más acentuados a la concentración de IC₈₀ que a la concentración de IC₅₀. La activación de t-Bid y la disminución de Bid comienzan desde el principio del tratamiento, llegando a su valor máximo para el caso de IC₈₀ durante las 24h y para el caso de IC₅₀ durante las 12h. Los niveles de Bid, aunque son bajos en todo momento, parecen aumentar de nuevo hacia las 48h de tratamiento volviendo a descender a las 72h, no sobrepasando en ningún momento el 70% a la concentración de IC₈₀ y llegando al 100% en el caso de la concentración de IC₅₀.

La disminución de los niveles de Bid y el aumento de los niveles de t-Bid ocurren de forma simultánea, aunque la máxima disminución se da a las 6 horas de tratamiento, mientras que el máximo incremento en los niveles de t-Bid ocurre a las 24h de tratamiento para el caso de IC₈₀ y a las 12h para el caso de IC₅₀. A estos tiempos, los niveles de Bid continúan bajos y estables en torno a un 65% para IC₈₀ y un 70% para IC₅₀.

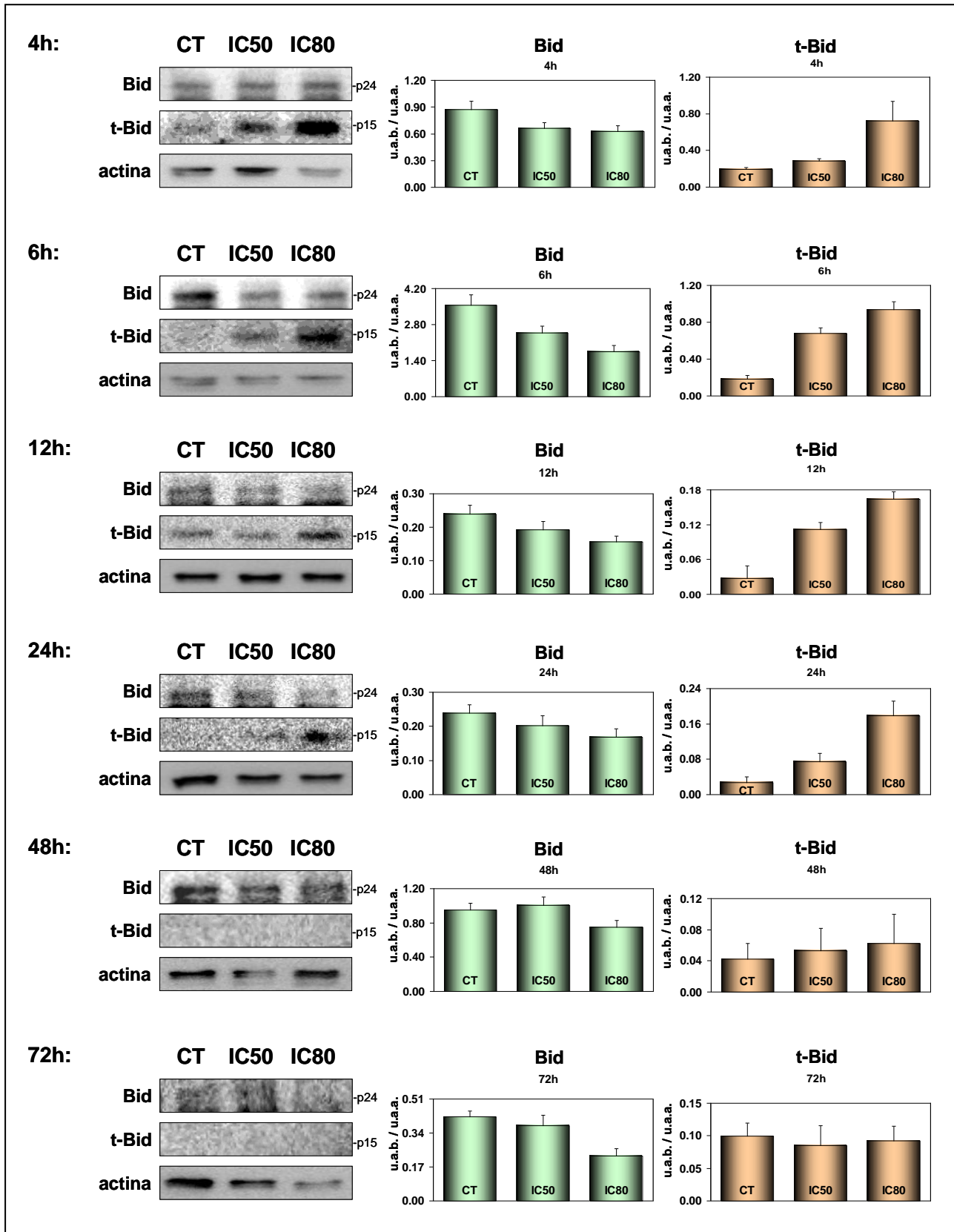
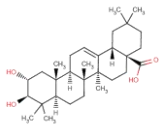
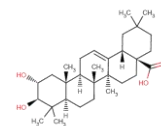


Figura 9.29 Westerns y niveles de Bid (p24) y t-Bid (p15) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como la de la intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



% Bid	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 10.33	75.73 ± 7.56	71.32 ± 7.61
6h	100.00 ± 11.63	69.55 ± 7.49	48.88 ± 7.05
12h	100.00 ± 11.43	80.67 ± 10.68	65.85 ± 7.13
24h	100.00 ± 10.28	84.53 ± 12.34	70.55 ± 10.09
48h	100.00 ± 8.25	105.79 ± 9.62	78.54 ± 8.72
72h	100.00 ± 7.10	89.76 ± 12.37	53.40 ± 8.71

% t-Bid	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 11.95	149.06 ± 14.09	376.33 ± 113.11
6h	100.00 ± 21.43	371.38 ± 33.21	511.30 ± 47.69
12h	100.00 ± 81.45	409.17 ± 45.97	603.14 ± 46.68
24h	100.00 ± 48.98	273.44 ± 69.80	655.69 ± 122.42
48h	100.00 ± 48.06	125.33 ± 68.24	148.68 ± 88.41
72h	100.00 ± 19.89	85.03 ± 30.70	92.75 ± 22.74

Tabla 9.14 Porcentajes de los niveles de inducción de Bid (p24) y t-Bid (p15) en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina respecto al control de células no tratadas.

A diferencia con las células HT29 la activación de Bid pasando a t-Bid comienza en células Caco-2 inmediatamente después de tratar las células con el ácido maslínico. El incremento de los niveles de t-Bid y el descenso de los niveles de Bid concuerda con los máximos alcanzados durante la activación de la caspasa-8 y la caspasa-9. Es más, las curvas de activación de caspasa-9 (**figura 9.29**) y las curvas de inducción de t-Bid son muy semejantes haciendo ver la relación directa entre la inducción de estas dos proteínas. Otra diferencia substancial encontrada en este mecanismo de inducción de apoptosis en células Caco-2 con respecto al mecanismo encontrado en las células HT-29 es la rapidez con la que se da todo el proceso, disminuyendo a las 48h de tratamiento los niveles de muchas de las proteínas estudiadas.

Mientras que en HT29 estos niveles continuaban aumentando a las 72h de tratamiento. Estos datos están en consonancia con los resultados de los ensayos de determinación de apoptosis por microscopía y citometría de flujo detallados en el capítulo 8. La inducción de Bid a través de la caspasa-8 ha sido descrita como una de las pruebas del mecanismo de inducción de apoptosis ligada a receptor de membrana. También se ha descrito la activación de Bax e inhibición de Bcl-2 por parte de Bid, de forma que la señal apoptótica queda potenciada por la permeabilización de la membrana mitocondrial amplificando enormemente la señal apoptótica.

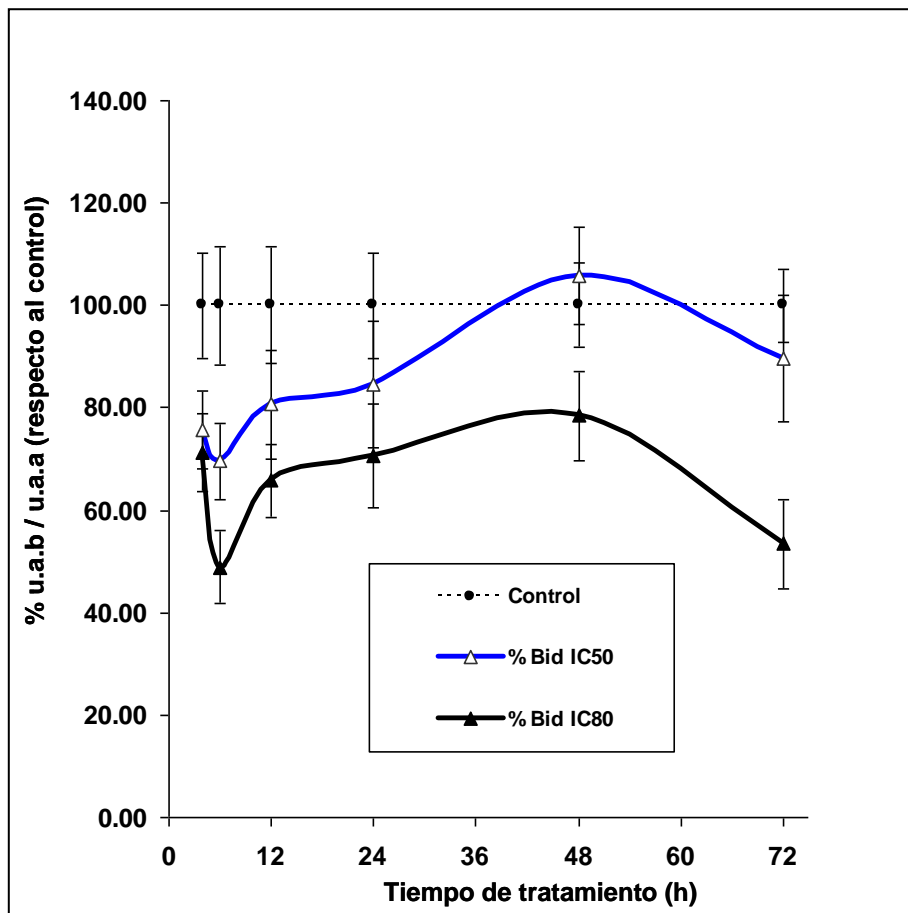
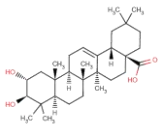


Figura 9.30 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bid (p24) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

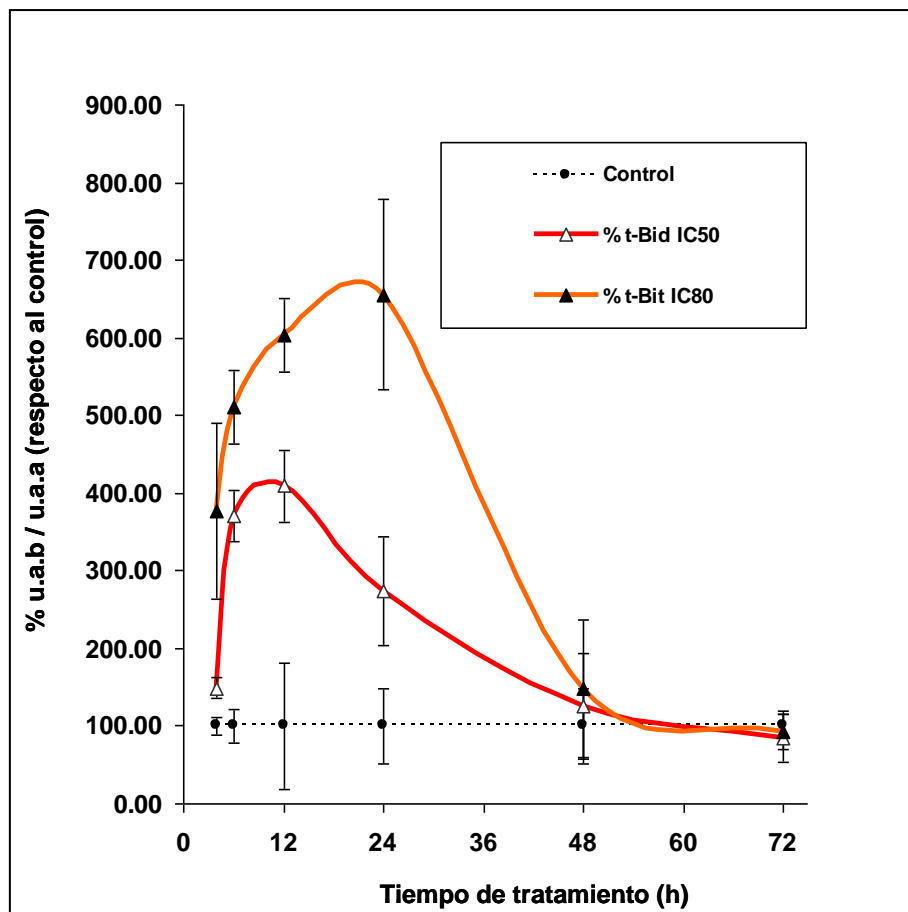
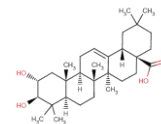


Figura 9.31 Variaciones de los porcentajes de los niveles de t-Bid (p15) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



9.2.5 Niveles de expresión de Bax

Bax es, como ya se ha comentado, una proteína pro-apoptótica, perteneciente, también a la familia de Bcl-2 y que se encuentra normalmente en el citosol pero que se transloca a la membrana de la mitocondria formando oligopolímeros en respuesta a la señal apoptótica, incrementando la permeabilidad de la mitocondria a solutos de bajo peso molecular. La proteína Bax, además, puede reducir el efecto anti-apoptótico ejercido por Bcl-2. Se ha descrito la oligomerización de Bax gracias a la presencia de tBid, *in vitro*. El mecanismo aún no está claro (Roucou y col., 2002).

Las bandas fueron analizadas determinando su intensidad en unidades arbitrarias. Los *westerns* fueron realizados en este caso por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9.32**. Tras corregir las intensidades de las bandas por las actinas correspondientes, se refirió el resultado al control de cada ensayo (**tabla 9.15**), permitiéndonos comparar los niveles de Bax entre los distintos tiempos (**figura 9.33**). Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control. Como puede observarse en las imágenes de los *westerns* y en el análisis de la intensidad de las bandas prácticamente no hay activación de Bax a tiempo inicial. A las 24 h de tratamiento se observa una importante activación de Bax, momento en el que a pesar de los errores de carga en el gel, visibles por las diferencias en la intensidad de las bandas de actina, los niveles de Bax alcanzan su máximo, descendiendo de nuevo hasta niveles próximos al control a las 48h. No hay grandes diferencias entre los niveles a IC₅₀ o a la de IC₈₀, teniendo un comportamiento similar en ambas concentraciones. Se observa cierta inducción a 48h y 72h pero bastante menor que la obtenida a las 24h de tratamiento.

Esta activación puntual de Bax puede ocurrir como respuesta a la inducción de t-Bid observada. Según los resultados obtenidos en el análisis de activación de Bid, el máximo de activación encontrado para Bax coincide además con la máxima inducción hallada para t-Bid que ocurre a las 24h. La principal diferencia con las células HT29 es que en éstas los niveles de Bax se incrementaban de forma gradual y no puntual como ocurre en las células Caco-2. Hay que tener en cuenta que el incremento de los niveles de Bax en las células HT29 probablemente no sólo se deba a la presencia de Bid activo, sino que, además, también existe una fuerte sobre-expresión de p53, que como se ha comentado es un factor de transcripción responsable del incremento substancial de los niveles de Bax. Estos resultados unidos a la inducción de caspasa-9 indican que en la activación de la ruta apoptótica en células HT29 no sólo interviene el mecanismo extrínseco mediado por la caspasa-8, sino que además se produce la activación secundaria del mecanismo mitocondrial de inducción de apoptosis.

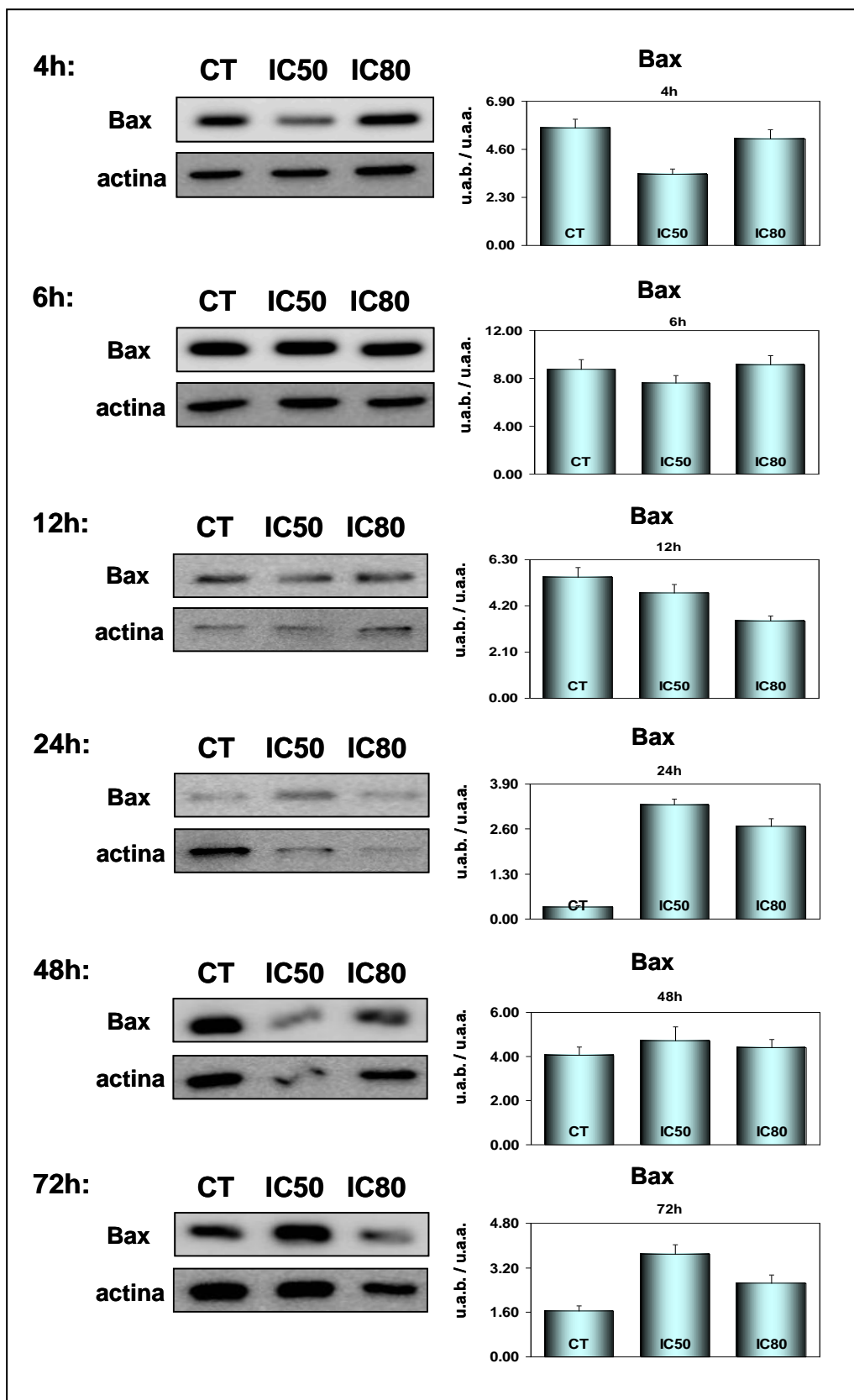
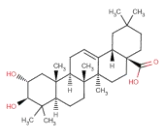
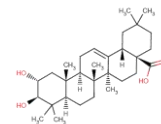


Figura 9.32 *Westerns* y niveles de Bax en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



%Bax	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 7.83	60.71 ± 4.68	91.01 ± 7.96
6h	100.00 ± 9.44	87.24 ± 7.07	104.42 ± 9.13
12h	100.00 ± 7.89	86.76 ± 7.09	63.78 ± 4.02
24h	100.00 ± 7.62	936.35 ± 50.63	764.06 ± 57.70
48h	100.00 ± 8.88	115.89 ± 15.95	108.42 ± 9.00
72h	100.00 ± 10.88	223.97 ± 20.30	161.18 ± 17.41

Tabla 9.15 Porcentajes de los niveles Bax en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

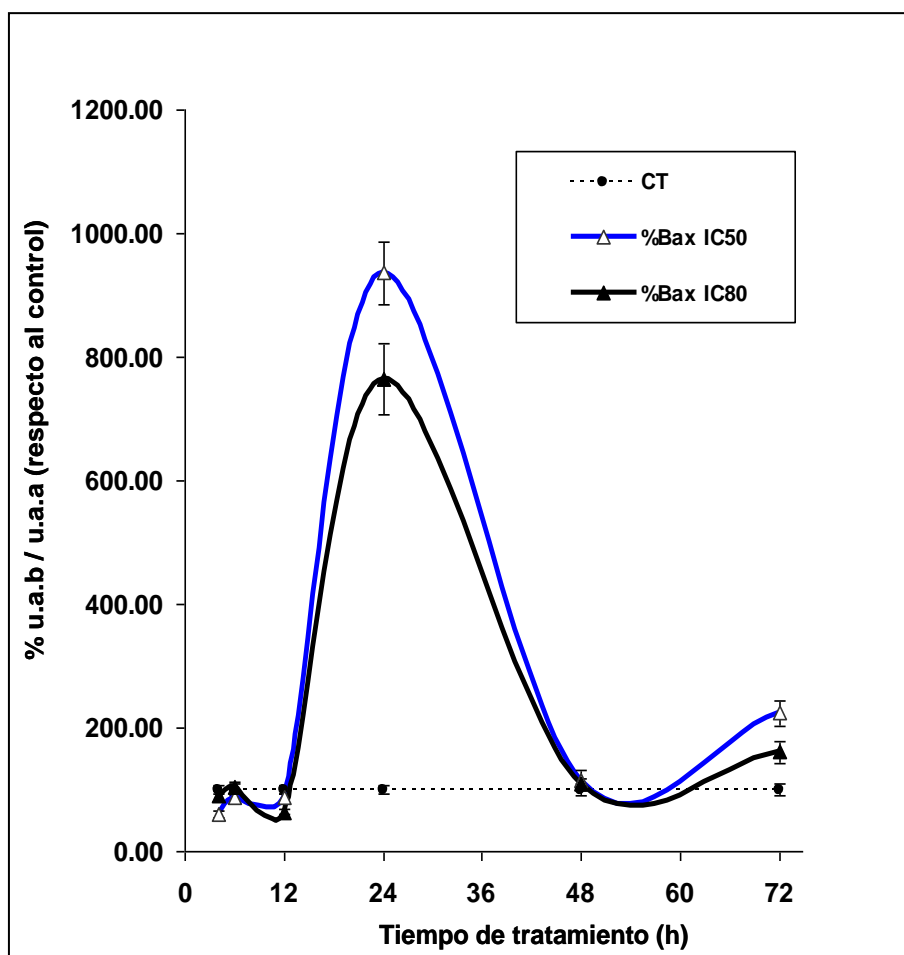
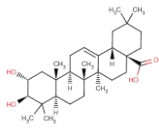


Figura 9.33 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bax en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



9.2.6 Niveles de expresión de Bcl-2

Bcl-2 es, como ya se ha comentado en secciones anteriores, una proteína anti-apoptótica de membrana mitocondrial, la cual forma poros en la mitocondria revirtiendo el desequilibrio generado por otras proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, equilibrando los niveles de solutos entre el exterior y el interior mitocondrial, evitando de esta manera la permeabilización de la mitocondria y la entrada en apoptosis de la célula.

Se han descritos varias vías de inhibición de la proteína Bcl-2 entre las que se encuentran: la inhibición directa causada por la fosforilación JNK dependiente, o bien a través de Hrk/DP5 que es también activado por JNK; la producida por la acción de t-Bid; y la generada en respuesta a la activación de Bax. La inhibición de la actividad de Bcl-2 y el aumento de Bax son fenómenos que frecuentemente han sido referidos como responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial.

Con el objeto de determinar la participación de la proteína Bcl-2 en el mecanismo de inducción de apoptosis en células Caco-2 en respuesta al tratamiento con el ácido maslínico, se midieron, por tanto, los niveles de inducción de Bcl-2 a los diferentes tiempos indicados anteriormente, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de tratamiento, completando así el mecanismo de inducción de apoptosis propuesto.

El análisis de los *westerns* se llevó a cabo midiendo la intensidad de las bandas en unidades arbitrarias y refiriendo éstas a las intensidades de las actinas correspondientes (u.a.b./u.a.a.). A continuación, se compararon las intensidades normalizadas por las actinas de forma relativa a los controles, resultados mostrados en la **tabla 9.16**, lo que nos permitió evaluar la evolución de los niveles de Bcl-2 a lo largo del tratamiento con ácido maslínico (**figura 9.34**). Los *westerns* fueron realizados en este caso por triplicado.

Los resultados muestran una clara inhibición de Bcl-2 tanto concentración como tiempo dependiente, siendo esta inhibición más acentuada cuanto mayor es la concentración de ácido maslínico. Como puede observarse en la gráfica de la **figura 9.35**, la inhibición de Bcl-2 se produce desde el comienzo del tratamiento llegando a un mínimo entorno al 45% tras 12h. Esta disminución se produce tanto a la concentración de IC₈₀ como a la concentración de IC₅₀. A continuación, los niveles se mantienen bajos hasta las 24h, momento a partir del cual aumentan manteniéndose a la concentración de IC₈₀ en un porcentaje entorno al 65-70% y alcanzando a la concentración de IC₅₀, niveles próximos a los valores controles.

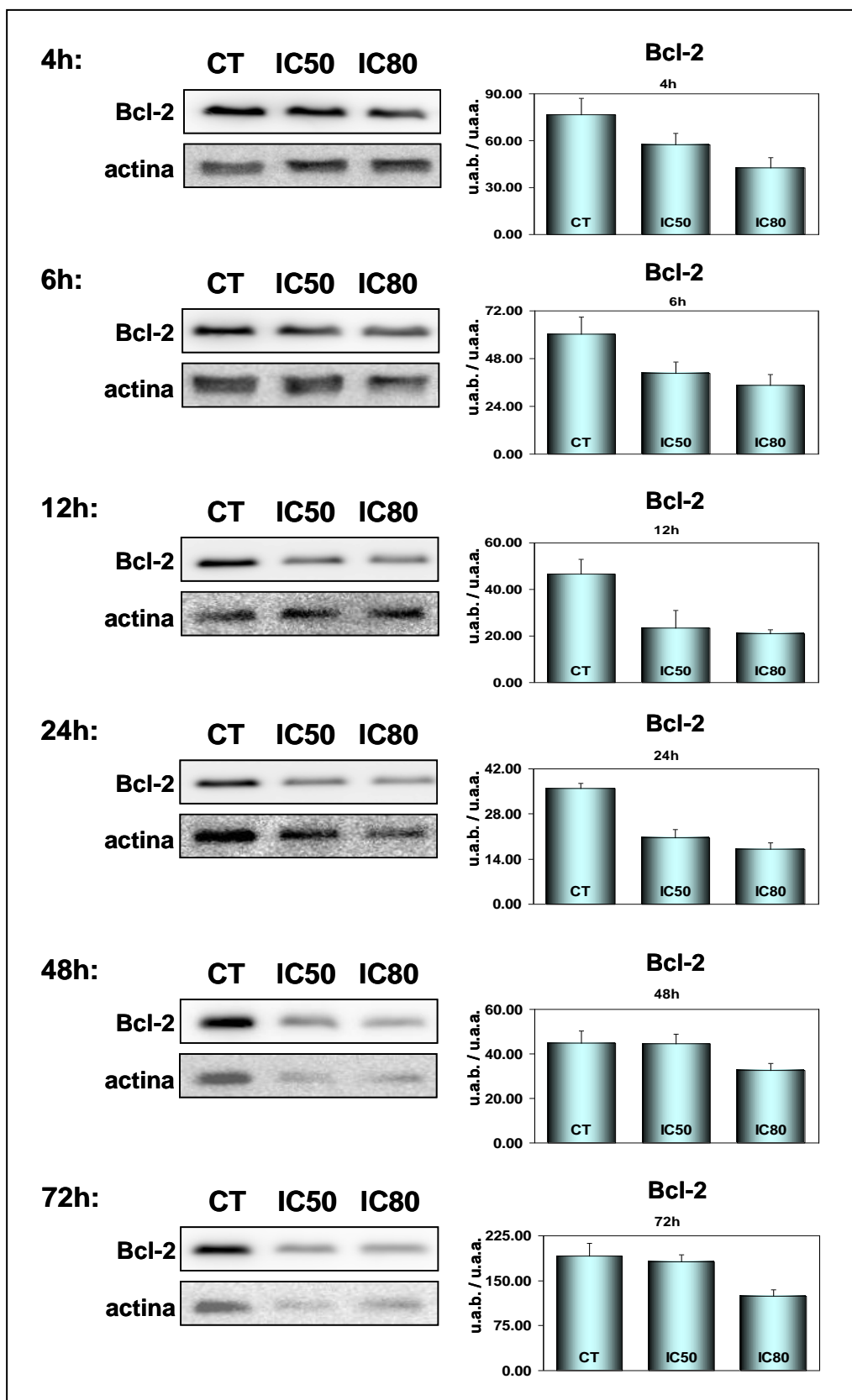
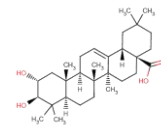
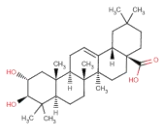


Figura 9.34 Westerns y niveles de Bcl-2 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media ± desviación estándar.



%Bcl-2	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 13.93	75.37 ± 9.44	55.78 ± 8.50
6h	100.00 ± 13.99	67.28 ± 9.63	57.47 ± 9.03
12h	100.00 ± 13.38	50.39 ± 15.92	44.95 ± 3.78
24h	100.00 ± 3.93	57.34 ± 7.10	47.33 ± 5.47
48h	100.00 ± 11.89	99.41 ± 9.53	72.41 ± 6.78
72h	100.00 ± 11.55	94.95 ± 6.43	65.33 ± 5.47

Tabla 9.16 Porcentajes de los niveles Bcl-2 en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h , 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

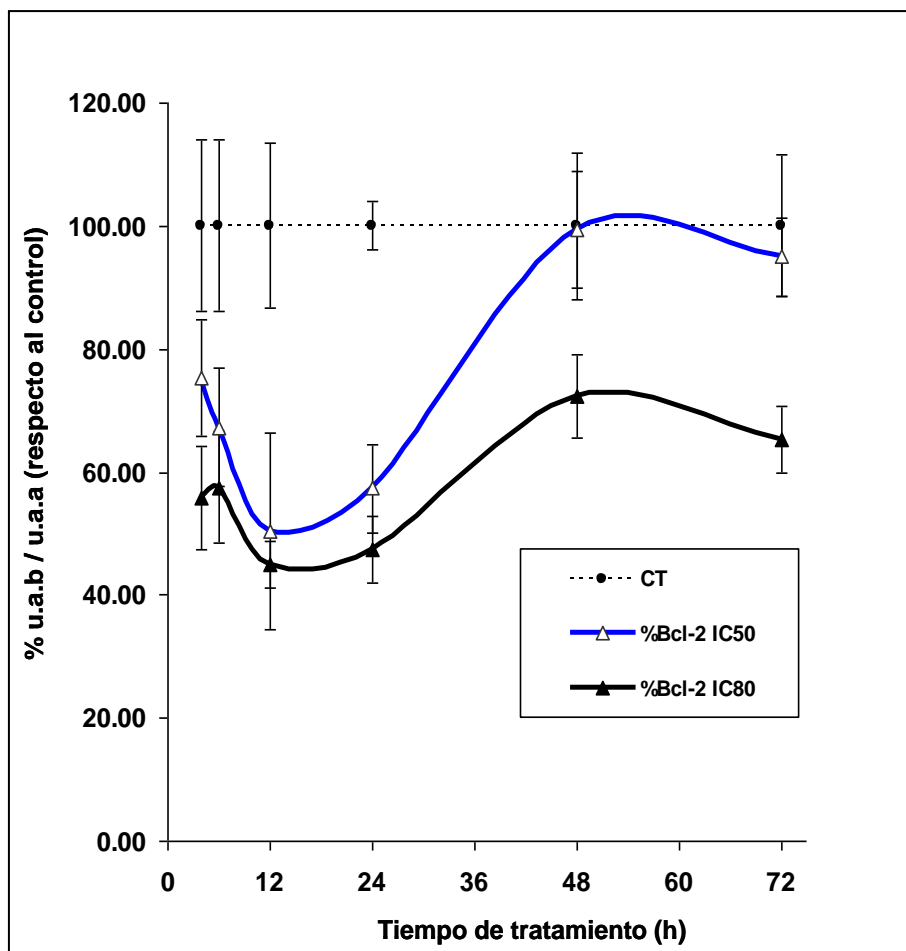
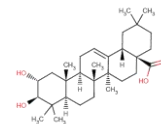


Figura 9.35 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bcl-2 en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).



Estos resultados concuerdan perfectamente con los hallados en el análisis del resto de proteínas tanto en los niveles de expresión como en los tiempos de inducción. Según estos resultados, en el mecanismo de inducción de apoptosis propuesto, el ácido maslínico induciría la apoptosis a partir de un receptor tipo TNFR-1 o Fas, el cual activaría a la caspasa-8 y pudiendo incrementar los niveles de JNK. De forma que finalmente, ya fuese por una vía u otra, o incluso por ambas, se afecten los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2, potenciando la señal apoptótica inicial.

9.2.7 Niveles de expresión de JNK

Por último, y para completar el mecanismo molecular propuesto, se investigó la activación de JNK en este tipo celular, ya que de producirse un aumento en los niveles de esta proteína nos indicaría un punto de unión entre los mecanismos propuestos para ambas líneas celulares HT29 y Caco-2. El resultado positivo en la inducción de esta proteína en la línea celular Caco-2 nos permitirá relacionar el mecanismo de apoptosis planteado en células Caco-2 con el mecanismo encontrado en la línea celular HT29, cerrando de esta manera el mecanismo molecular de inducción de apoptosis por el ácido maslínico.

Aunque con los resultados obtenidos en el resto de proteínas ensayadas se podría completar el mecanismo de inducción de apoptosis del ácido maslínico sobre la línea celular Caco-2, JNK puede inducir el proceso de apoptosis celular mediante la activación por fosforilación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 tales como Bax e inhibir a las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. Por estos motivos nos planteamos determinar el cambio de los niveles de JNK en este tipo celular.

Se determinaron los niveles de JNK en la línea celular Caco-2 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico a 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h, siendo las concentraciones utilizadas las IC₅₀ e IC₈₀ obtenidas para este tipo celular a las 72h de tratamiento. Los *westerns*, en este caso, fueron realizados por triplicado. Se determinó la intensidad de las bandas en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como intensidad de la banda dividida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.b./u.a.a.) (**figura 9.36**). A continuación se refirieron estos resultados a los respectivos controles de células no tratadas (**tabla 9.17**), lo que nos permitió comparar entre los distintos tiempos ensayados, determinando la evolución en los niveles de JNK respecto al tiempo (**figura 9.37**).

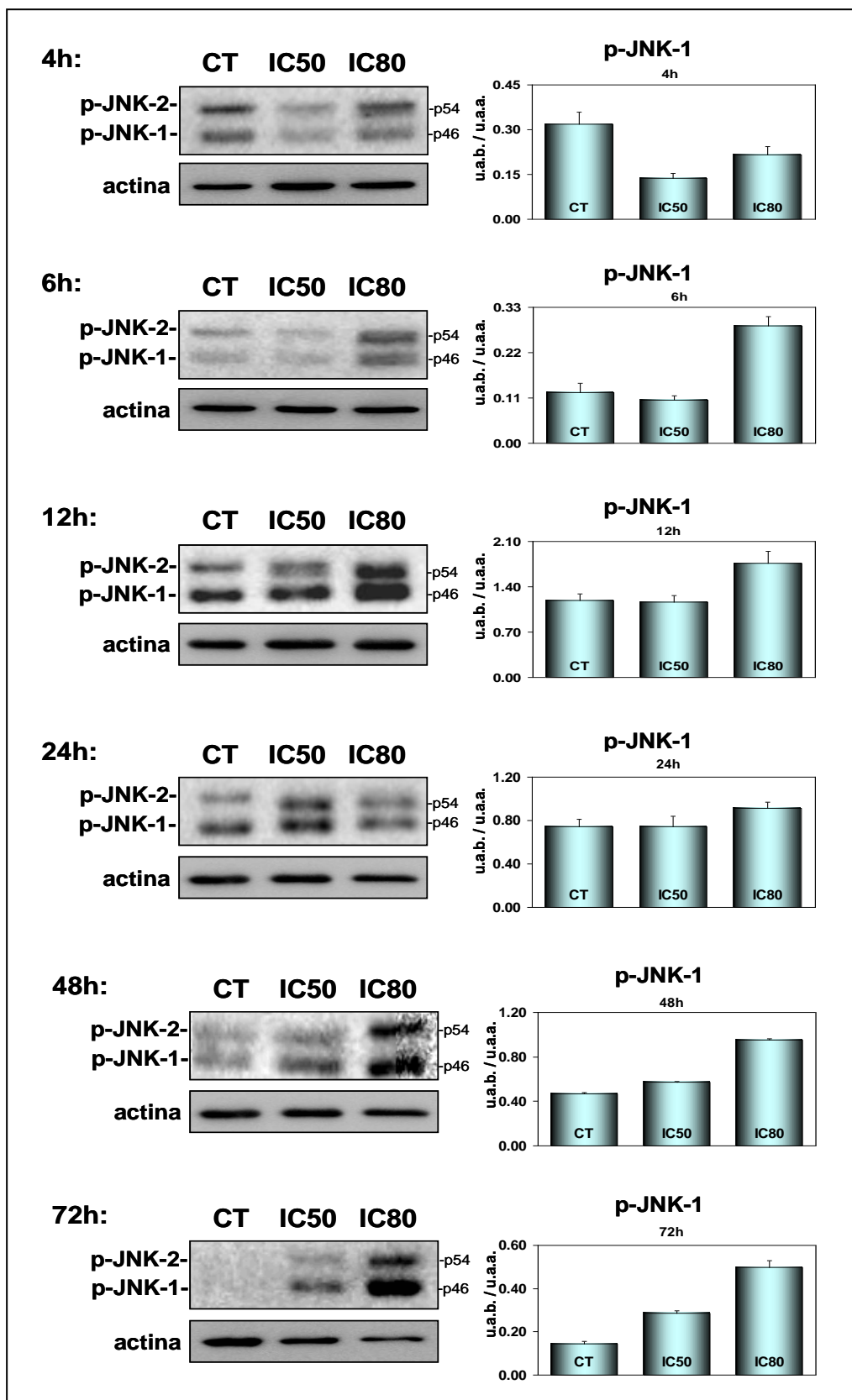
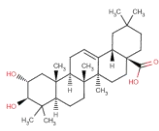
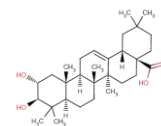


Figura 9.36 Westerns y niveles de JNK (p-JNK-1, p46) en respuesta al tratamiento con ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2 a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, tras 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h de incubación. Los niveles de inducción se dan como intensidad de la banda (u.a.b) partida por la intensidad de la banda de la actina correspondiente (u.a.a.) expresando el resultado como la media \pm desviación estándar.



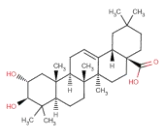
p-JNK-1	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 8.73	42.94 ± 3.61	67.66 ± 6.75
6h	100.00 ± 10.28	85.28 ± 7.35	231.82 ± 19.78
12h	100.00 ± 15.25	98.42 ± 15.17	148.92 ± 24.18
24h	100.00 ± 14.27	99.36 ± 9.96	122.56 ± 15.80
48h	100.00 ± 8.35	121.51 ± 3.12	202.53 ± 9.25
72h	100.00 ± 33.66	198.73 ± 64.47	346.73 ± 58.47

p-JNK-2	CT	IC50	IC80
4h	100.00 ± 11.06	36.61 ± 4.77	86.31 ± 7.66
6h	100.00 ± 14.45	51.56 ± 6.46	176.75 ± 14.53
12h	100.00 ± 13.94	102.49 ± 13.69	158.70 ± 24.16
24h	100.00 ± 15.86	170.82 ± 24.43	155.33 ± 13.50
48h	100.00 ± 18.84	136.97 ± 19.53	169.56 ± 19.69
72h	100.00 ± 11.51	184.59 ± 13.08	294.06 ± 34.30

Tabla 9.17 Porcentajes de los niveles de JNK (p-JNK-1, p46; p-JNK-2, p54) en células Caco-2 tras el tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀, durante 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar del porcentaje de intensidad de cada banda corregida por actina, respecto al control de células no tratadas.

Como puede observarse, (**tabla 9.17; figura 9.36**), existe un incremento de los niveles de JNK dosis dependiente, siendo mayores a la concentración de IC₈₀ que a la concentración de IC₅₀, salvo a las 4h de incubación, donde estos niveles parecen disminuir. También se observa la variación de estos niveles con el transcurso del tiempo (**figura 9.37**). En un primer momento, los niveles de JNK parecen disminuir en respuesta al tratamiento con el ácido maslínico, tanto a la concentración de IC₅₀ como a la de IC₈₀. A continuación, aumentan, en el caso de IC₈₀, alcanzando un pico de inducción a las 6h de tratamiento, disminuyendo de nuevo a las 12h y aumentando a partir de este momento los niveles de hasta las 72h de tratamiento. En el caso de IC₅₀, los niveles de JNK varían de forma gradual sin apreciarse pico de inducción, tras disminuir a las 4h de tratamiento estos niveles aumentan alcanzando su máximo al final del tratamiento.

Los resultados muestran que en ambas concentraciones parece haber cierta disminución de los niveles de p-JNK-1 a las 4h de incubación que más adelante es rápidamente recuperada y sobrepasada. Este efecto en el que los niveles de JNK primero disminuyen y a continuación alcanzan un pico de inducción también ha sido observado en las células HT29. La activación de JNK es coherente con el resto del mecanismo propuesto en células Caco-2. De forma que la



acción del ácido maslínico en primer lugar activaría la caspasa-8 y a continuación, a partir de las 4h-6h de tratamiento, se inducirían la activación de JNK y Bid. JNK tendría un efecto proapoptótico co-activando junto con Bid la ruta de inducción de apoptosis mitocondrial mediante la activación de Bax y la inhibición de Bcl-2 incrementando la señal apoptótica, desencadenada por la caspasa-8.

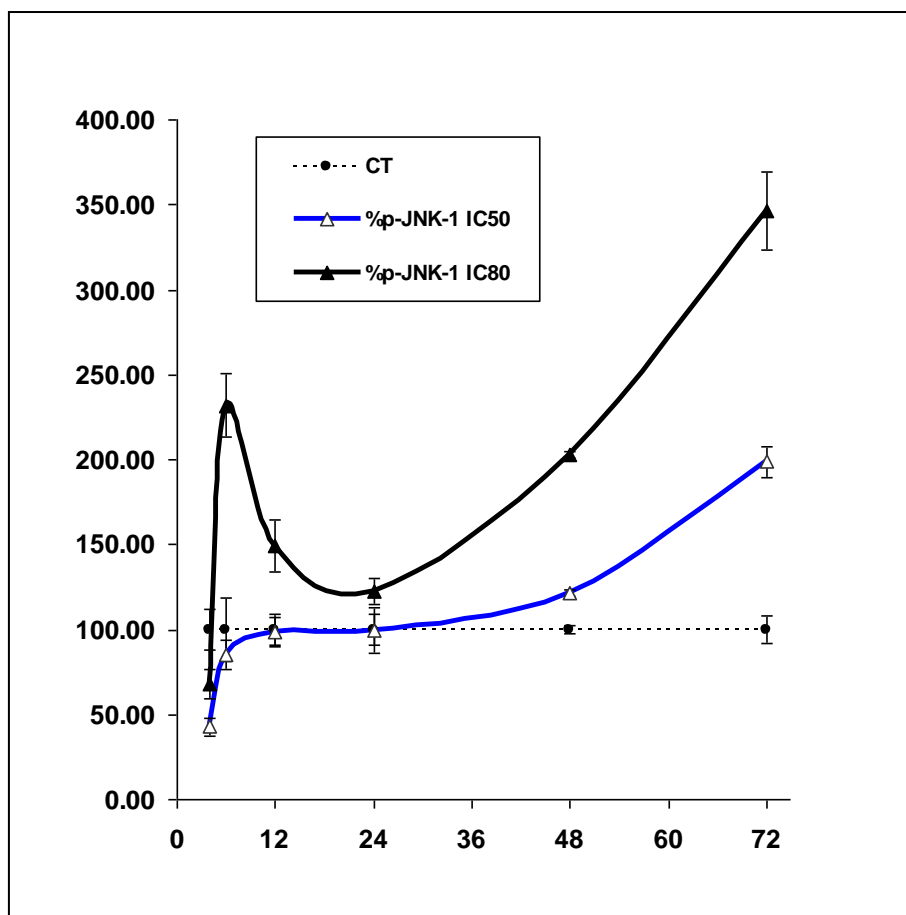
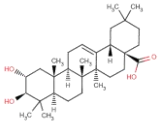
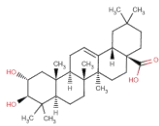


Figura 9.37 Variaciones de los porcentajes de los niveles de p-JNK-1(p46) en células Caco-2, a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀. Los puntos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje de cada banda corregida por actina (líneas continuas) respecto al control de células no tratadas (línea punteada).

La presencia de JNK en el mecanismo de apoptosis inducido por el ácido maslínico podría explicar la inducción de apoptosis en las células HT29 por la activación de la ruta apoptótica mitocondrial y de la proteína p53 en el caso de las células HT29 y por tanto su mayor diferenciación y una mayor recuperación contra la genotoxicidad inducida por el ácido maslínico. Estos resultados que no se dan en las células Caco-2 lo se podrían atribuir a su deficiencia en p53. Además, la disminución de los niveles de JNK observada a tiempos iniciales, estarían en concordancia con la inducción de inflamación y la producción de citoquinas descritas como respuesta a la acción de este tipo de compuestos triterpénicos.





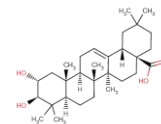
Capítulo 10

Discusión

El ácido maslínico

Muchas drogas modernas conocidas, o no, son metabolitos secundarios con una alta actividad biológica. Estos metabolitos secundarios han sido desarrollados, en principio, con un claro objetivo de defensa y son fundamentales para las plantas que lo desarrollan, prueba de ello es la enorme y compleja maquinaria que emplean para su biosíntesis. Los metabolitos secundarios, son como ya se ha mencionado en la introducción, aquellos que aún no perteneciendo a procesos básicos o primarios, confieren al organismo que los desarrollan ciertas ventajas selectivas (**Dixon, 2001**).

El desarrollo selectivo de estos productos con una elevada bioactividad, por parte de las plantas, es muy ventajoso desde un punto de vista humano, ya que permite poder utilizarlos, bien directamente, contra aquellos procesos por los que la selección natural los ha seleccionado, o indirectamente, lo que en la actualidad es más frecuente, contra procesos que aunque no estén relacionados con su bioactividad natural, si que se pueden ver afectados de forma claramente determinante por estos compuestos.

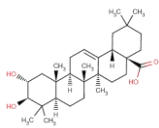


Entre muchos de estos compuestos de origen natural, se encuentran los triterpenos pentacíclicos, grupo al que pertenece el ácido maslínico. Estos compuestos han presentado multitud de propiedades bioactivas y/o biofuncionales altamente provechosas, como se refleja en la introducción, con unos índices de eficacia muy elevados. Entre estas propiedades una de las más importantes y prioritarias para el desarrollo humano actual son sus cualidades como anticancerígenos, antitumorales, efectos de diferenciación sobre células malignas y de protección frente al cáncer (Hsu y col., 2000; You y col., 2001; Mujo y col., 2001; Liu y col., 2002; Pacha y col., 2002; Hata y col., 2005, Pathak y col.; 2007).

En esta tesis se ha pretendido caracterizar, o al menos proponer, la ruta molecular por la que el ácido maslínico ejerce estos efectos beneficiosos, ruta que por analogía podría extenderse a muchos de estos compuestos triterpénicos pentacíclicos.

El ácido maslínico es un triterpeno pentacíclico de origen natural que se encuentra en concentraciones muy elevadas en la capa cerosa externa de protección de la oliva (*Olea europaea*), llegando a ser un 80% del total de los componentes de esta capa. En nuestro caso, el ácido maslínico fue obtenido a partir del alpeorujo del aceite de oliva. El alpeorujo, derivado de los restos de la molturación de este fruto en la producción del aceite, presenta además el inconveniente de ser altamente contaminante. Por tanto, el ácido maslínico obtenido a partir de estos restos cumple, por tanto, con los requisitos de producto de valor añadido. Por una parte, es un producto con una elevada bioactividad en muchos procesos biológicos, y por otra parte, se obtiene gracias al aprovechamiento de un residuo altamente contaminante, como es el alpeorujo. (García-Granados y col., 1998)

Otra ventaja inherente a este tipo de compuestos triterpénicos pentacíclicos es su baja toxicidad *in vivo* sobre organismos (Dzubak y col., 2006). Estudios *in vivo* en ratón, muestran una baja toxicidad tanto de triterpenos, como de sus derivados. En el caso del ácido betulínico no mostró efecto tóxico alguno a concentraciones de 500 mg/kg, mostrando efecto antineoplásico a partir de los 5 mg/kg (Pisha y col., 1995). Por su parte, el oleanólico no mostró toxicidad alguna a dosis superiores a los 600 mg/kg (Singh y col, 1992; Astudillo y col., 2002). Podemos suponer, aunque los estudios sobre este tema se están realizando actualmente, que la toxicidad relativa del maslínico debe ser parecida a la de estos compuestos ya que comparten gran parte de sus estructuras químicas. El ácido maslínico es un derivado hidroxílico del ácido oleanólico. En cuanto a los ensayos *in vitro* la toxicidad relativa de los triterpenos pentacíclicos es variable, encontrándose, en la mayoría los casos, valores de IC₅₀ en torno a las decenas de µg/mL. El valor concreto de este parámetro va a depender del tipo celular



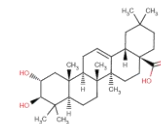
ensayado, así como de la duración del tratamiento. En muchos casos los valores de IC_{50} de estos compuestos triterpénicos para células no tumorigénicas o normales se encuentran por encima de los valores encontrados en líneas celulares cancerígenas (Rhee y col., 1991; Novotny, Vacchalkova and Biggs, 2001; Zuco y col., 2002; Galgon y col., 2005), resultados que podrían explicarse en función del mecanismo molecular propuesto en este trabajo.

Un factor importante a tener en cuenta a la hora de precisar la dosis utilizada para estos compuestos, es la determinación de la dosis efectiva real que pueda llegar a las células. Los triterpenos pentacíclicos son compuestos con muy baja solubilidad en medio acuoso, como se ha puesto de manifiesto para el caso del ácido maslínico en los resultados de los ensayos de citotoxicidad, por lo que la biodisponibilidad va a estar también limitada. Actualmente, se está intentando incrementar la solubilidad del ácido maslínico mediante la síntesis de derivados modificados químicamente y la formación de complejos no covalentes con ciclodextrinas hidrofílicas, así como las sales sódica y potásica del mismo.

Citotoxicidad inducida por el ácido maslínico

Nuestros resultados evidencian que el ácido maslínico ejerce un potente efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico sobre las líneas de carcinoma de colon HT29 y Caco-2. De forma interesante, este efecto es más atenuado sobre las líneas de células intestinales normales IEC-6 e IEC-18. A su vez, es notable que el efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis sean claramente selectivos para las células malignas, ya que no altera el ciclo celular, ni induce apoptosis sobre las células intestinales normales IEC-6 e IC-18. Este efecto diferencial y selectivo del ácido maslínico sobre rutas pro-apoptóticas específicas en células malignas podría significar un compuesto de gran interés para el tratamiento del cáncer.

El efecto citotóxico del ácido maslínico fue determinado en dos líneas humanas de adenocarcinoma de colon, HT29 y Caco-2, así como en las líneas normales de epitelio intestinal múrido, IEC-6 e IEC-18. Se eligieron estos tipos celulares para poder comparar el efecto de nuestro compuesto tanto sobre líneas cancerígenas tumorigénicas, como sobre líneas establecidas normales o no tumorigénicas. El ensayo fue realizado tras 72h de tratamiento. Se seleccionó este tiempo de incubación, aparte de por ser común en este tipo de estudios, por el hecho de que una incubación larga permitiría estudiar, con una mayor precisión, las vías a través de las cuales nuestro compuesto podría llevar a cabo su efecto citotóxico. Bajo estas condiciones se



determinaron en todas las líneas celulares estudiadas, las concentraciones de IC₅₀ y de IC₈₀, siendo utilizadas como concentraciones objetivas en el resto de los ensayos.

Como se ha comentado en el capítulo de resultados en todas las líneas celulares utilizadas, el ácido maslínico mostró una disminución, dosis dependiente, en el número de células viables tras 72h de tratamiento, incluidas las líneas IEC-6 e IEC-18 derivadas del epitelio intestinal de rata. Aunque en estas últimas la citotoxicidad mostrada fue menor, la IC₅₀ determinada en estas líneas, está dentro del mismo rango que las halladas en las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2 (figura 10.1).

Para el caso de las células de la línea tumoral HT29, la concentración de ácido maslínico que provoca la inhibición del crecimiento del cultivo celular en un 50%, IC₅₀, fue de 28,8 ± 0,9 µg/mL mientras que la IC₈₀, concentración que provoca la inhibición del crecimiento del cultivo celular en un 80%, fue de 37,5 ± 0,2 µg/mL. Los resultados obtenidos en la línea celular HT29 fueron utilizados sistemáticamente para acotar los valores de concentración en los que el ácido maslínico ejerce su citotoxicidad, siendo utilizado este mismo rango en el resto de líneas celulares estudiadas.

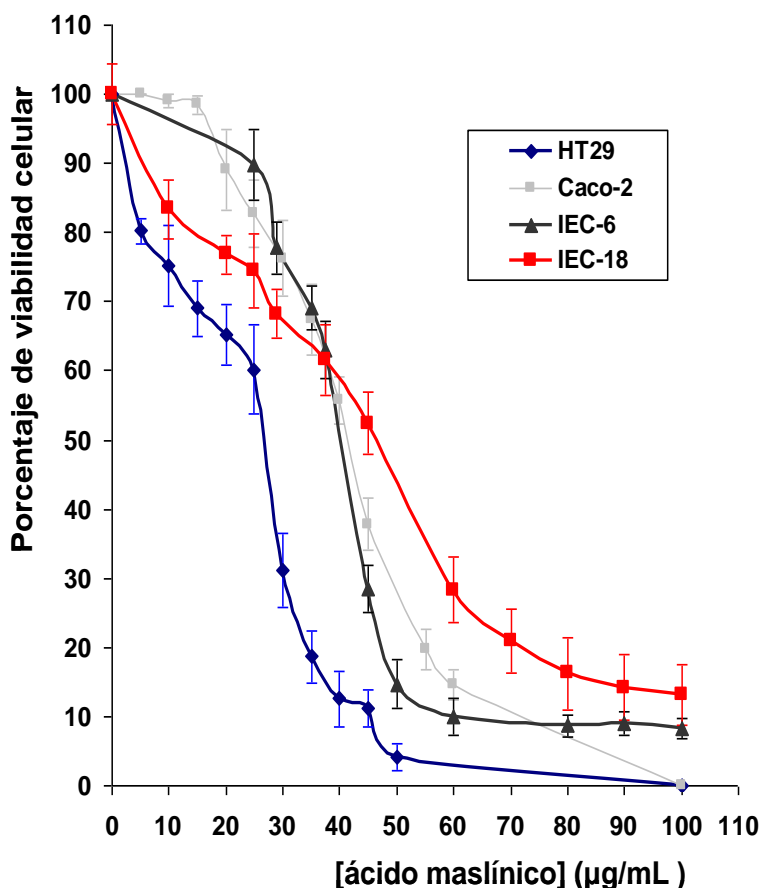
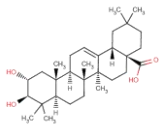


Figura 10.1 Variación de los porcentajes de viabilidad celular en las distintas líneas ensayadas frente a concentraciones crecientes de ácido maslínico. Puede observarse como aunque todas las curvas se encuentran dentro del mismo rango los valores de IC₅₀ varían debido a la forma sigmoideal de las mismas.



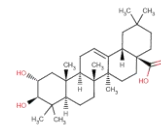
Para el caso de Caco-2, la concentración de IC_{50} fue de $40,7 \pm 0,4$, siendo la concentración IC_{80} de $56,8 \pm 0,1$. Podemos concluir, a partir de estos valores, que las células Caco-2 podrían ser posiblemente algo más resistentes a la citotoxicidad inducida por el ácido maslínico que las células HT29, aunque esta diferencia no es del todo significativa ya que se encuentra dentro del mismo rango.

Como se muestra en la sección de resultados, la caída en la viabilidad de las células Caco-2 es menos acentuada que en las células HT29, por lo que el valor de concentración de IC_{50} es superior en unos $10 \mu\text{g/mL}$. Este resultado podría explicarse por una mayor resistencia de las células Caco-2 a la acción citotóxica del ácido maslínico, que probablemente sea debida a la existencia de ciertas diferencias en los mecanismos de respuesta de ambos tipos celulares, diferencias que han sido puestas de manifiesto en el resto de los ensayos realizados. También hay que observar que estas dos líneas celulares expresan distintos oncogenes, que son, finalmente, los responsables de mantener la supervivencia de la línea tumoral.

Aunque habría sido deseable obtener valores de citotoxicidad aún más bajos que los encontrados, hay que tener en cuenta que al tratarse de un producto natural, la toxicidad inherente del ácido maslínico debe ser bastante baja. Esto, unido a la baja solubilidad del compuesto, provoca que la dosis efectiva o real que actúa sobre la célula no se corresponda exactamente con la dosis añadida. Esta limitación en la biodisponibilidad también ha sido observada en compuestos triterpénicos como el ácido ursólico y oleanólico (**Chatterjee y col., 2000, Dzubak y col., 2006**).

Otra cuestión a reseñar es que la concentración de ácido maslínico que puede alcanzarse en el colon estará siempre por encima de la concentración del compuesto en sangre, haciendo, por tanto, que las concentraciones de IC_{50} determinadas en estas líneas tumorales sean lo suficientemente bajas como para considerar al ácido maslínico como un buen candidato como agente anticancerígeno frente a los carcinomas de colon (**Juan y col., 2006**).

Por lo que respecta a las líneas establecidas IEC-6 e IEC-18, el ácido maslínico también produjo una disminución en la viabilidad celular, dosis dependiente, aunque algo menos acentuada que en las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2. Siendo la IC_{50} en las células IEC-6 de $39,7 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$, similar a la hallada para la línea Caco-2, aunque superior a la encontrada en la línea HT29, y la IC_{50} en las células IEC-18, $51,3 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$, siendo superior a la encontrada en el resto de las líneas celulares. A pesar de tener un grado de citotoxicidad parecido al obtenido en las líneas cancerígenas, ésta parece mediar por

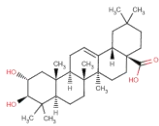


mecanismos distintos ya que en estas líneas, como se verá más adelante, no median los fenómenos de apoptosis descritos para las líneas HT29 y Caco-2. También hay que recordar que la línea tumoral Caco-2 se diferencia espontáneamente a células enterocíticas con el envejecimiento del cultivo (**Pshezhetsky y col., 2007**) este hecho podría estar relacionado con los resultados obtenidos en la curva de citotoxicidad en esta línea. Otro hecho que podría explicar estos resultados y al que probablemente sean debidos, es la mayor efectividad citotóxica descrita en este tipo de compuestos triterpénicos a pH bajo (**Noda y col., 1997; Stubbs y col., 2000**).

Las células cancerígenas poseen, habitualmente, tasas de división elevadas, así como un metabolismo exacerbado, lo cual provoca un incremento de los intermediarios metabólicos de carácter ácido, lo que trae consigo que el pH fisiológico en estos tipos celulares malignos sea menor al encontrado en células normales o no transformadas (**Andreev y col., 2007; Stubbs y col., 2000**). En el caso de las células Caco-2, su tasa de división es bastante menor a la encontrada en las células HT29, ya que necesitan al menos entre 62h y 72h para doblar su población, mientras que las células HT29 lo hacen en menos de 48h. Esta menor tasa de división en células Caco-2 produciría consecuentemente un pH más elevado que el que se consigue en las células HT29 y, por tanto, próximo al de las células normales por lo que la efectividad en cuanto al comportamiento citotóxico del ácido maslínico sería menor.

Otro resultado interesante es que los valores de viabilidad obtenidos con las células de la línea IEC-6, a las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ halladas para HT29, son respectivamente un 78% y un 63%. Estos resultados muestran que mientras en la línea tumoral HT29 la viabilidad es de un 50% con la misma concentración de ácido maslínico la viabilidad en la línea celular IEC-6 es un 28% superior. Para el caso de la IC₈₀, la viabilidad en las células HT29 es de un 20%, mientras que con la misma concentración de ácido maslínico la viabilidad en las células IEC-6 es un 43% superior.

En células IEC-18, el valor de IC₅₀ determinado fue de $51.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$. Este valor, a pesar de estar en el mismo rango que el resto de las IC₅₀s hallados, está muy por encima de los demás valores encontrados, mostrando claramente el comportamiento diferencial del ácido maslínico frente a las líneas cancerígenas y a las líneas no tumorales. Los valores de viabilidad obtenidos en este tipo celular para las concentraciones de IC₅₀ e IC₈₀ correspondientes a la línea HT29 fueron de un 68% a IC₅₀ y de un 62% a IC₈₀. Estos porcentajes representan un incremento del 18% y del 42%, respecto a la viabilidad encontrada en la línea celular HT29 con las mismas concentraciones de ácido maslínico.

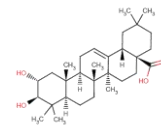


A la vista de estos resultados, podemos concluir, que el ácido maslínico posee una mayor citotoxicidad en la línea celular HT29 que en el resto de las líneas celulares ensayadas siendo su IC_{50} próxima a la mitad de la encontrada en la línea de epitelio intestinal IEC-18. Tanto en la línea celular IEC-18, como en la línea IEC-6, los valores de viabilidad hallados para las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} , determinadas en HT29, están muy por encima de los encontrados en la línea HT29, a pesar de poseer valores de IC_{50} del mismo rango que los encontrados en las líneas cancerígenas. Este resultado podría explicarse por el comportamiento sigmoideo que siguen los datos de viabilidad, lo que permite que, aunque con valores de IC_{50} cercanos, pequeñas variaciones en la concentración de ácido maslínico producen grandes diferencias en los porcentajes de viabilidad.

El comportamiento diferencial del efecto citotóxico del ácido maslínico es claro entre la línea tumoral HT29 y las líneas normales IEC-6 e IEC-18, no siendo así entre la línea tumoral Caco-2 y las líneas normales (**figura 10.1**), lo que podría explicarse por la dependencia del pH encontrada en la citotoxicidad de los compuestos triterpénicos unida a una menor tasa de división en la línea tumoral Caco-2, y junto a la diferenciación espontánea que pueden sufrir estas células cuando el cultivo llega a la confluencia. Este comportamiento diferencial entre la línea tumoral HT29 y las líneas normales IEC-6 e IEC-18, junto a la baja toxicidad que los compuestos triterpénicos presentan respecto a otros anticancerígenos, debida probablemente a sus origen natural y a la estabilidad química que les confiere la estructura policíclica triterpénica, hacen del ácido maslínico un compuesto muy interesante desde el punto de vista anticancerígeno y farmacológico.

En comparación con los resultados obtenidos para otros compuestos triterpénicos, los valores de IC_{50} hallados se encuentran dentro de los rangos hallados para este grupo de compuestos, así por ejemplo, el ácido betulínico presenta IC_{50} s que van de los 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en células de melanoma humano MEL-1 (**Schmidt y col., 1997**) a los 100 μM en la línea de glioma LN-308 (**Wick y col., 1999**), en el caso del ácido oleanólico, sus IC_{50} s van de los 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la línea P3HR1 de linfoma (**Min y col., 2000**) a los 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ encontrado para la línea tumoral de la glándula salivar HSG (**Tanguchi y col., 2002**).

El efecto diferencial de estos compuestos triterpénicos sobre líneas no cancerígenas ha sido observado desde que comenzaron a investigarse sus propiedades anticancerígenas. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por **Zuco y col.** en **2002**, muestran como el ácido betulínico presenta una IC_{50} de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la línea pulmonar cancerígena POGB/DX, frente



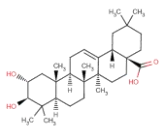
a la de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ encontrada en linfocitos sanguíneos periféricos o PBLs, utilizados en ese estudio como control de células no cancerígenas; valor de IC_{50} bastante alto, frente al de 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrado por la doxoubicina para estos mismos PBLs, indican la baja toxicidad inherente de este tipo de compuesto frente a líneas no transformadas. Todo ello presenta una gran ventaja con respecto a los anticancerígenos clásicos como son la doxoubicina, taxol, camptotecina, elipticina, etopóxido, vinblastina o vincristina. Todos estos compuestos antitumorales son muy tóxicos e inhiben la replicación tanto de células cancerígenas, como de células normales. Sin embargo, a pesar de su toxicidad, siguen siendo usados hoy día preferentemente en quimioterapia (Zuco y col., 2002). También, ha sido hallado este comportamiento diferencial frente a líneas no cancerígenas en otros derivados triterpénicos como el 3- β -acetoxilupano (Sarek y col., 2003) o derivados del lupano (Hata y col., 2006).

Por último, aunque el rango de citotoxicidad del ácido maslínico en las células no transformadas y en células cancerígenas es parecido, como ya se ha comentado, esta citotoxicidad ocurre por vías distintas, ya que sobre las líneas normales no se ha observado ningún indicio de apoptosis en cualquiera de los ensayos realizados: estudio del ciclo celular, tinción con anexina e yoduro de propidio (IP) y *western* de caspasa-3. Estos ensayos fueron realizados a las concentraciones y tiempos en las que el ácido maslínico presentaba una clara citotoxicidad e inducción de apoptosis sobre la línea cancerígena HT29.

El ácido maslínico produce un efecto genotóxico recuperable

Para determinar los niveles de genotoxicidad, desencadenados por el ácido maslínico, se realizó una electroforesis en microgel a nivel de células individuales, ensayo conocido como 'comet assay' o ensayo del cometa (Singh. y col., 1988; Ovesná y col., 2006). Estos ensayos nos permitió cuantificar la extensión con la que se producía esta genotoxicidad en función del tiempo de incubación con el ácido maslínico a las concentraciones de IC_{50} y de IC_{80} . La cuantificación de la genotoxicidad se determina a partir del tamaño de las colas de DNA, o 'tail moment' tras someter las células a la electroforesis en microgel de agarosa durante 24h, 48h y 72h.

Los resultados obtenidos (figura 10.2) muestran que durante las primeras 24h de incubación con el ácido maslínico las células HT29 prácticamente no sufren incremento en el número o tamaño de las colas de DNA. Sin embargo, tras 48h de tratamiento a la concentración de IC_{50} , estas células sufren un dramático incremento en el tamaño de las colas, así como en el número



de células que las presentan. Este incremento disminuye rápidamente tras las 72h de incubación, aunque continúa siendo significativo quedando por encima de los valores control. Este efecto se observó en las células HT29 sólo a las concentraciones de IC₅₀. A la concentración de IC₈₀ hubo cierto incremento en los valores de 'tail moment', pero fue menos significativo. Estas diferencias podrían deberse a que para poder realizar este ensayo el DNA celular se debe mantener, al menos en parte, su integridad por lo que es posible que la concentración de IC₈₀ sea demasiado citotóxica para poder ser mostrada por este ensayo.

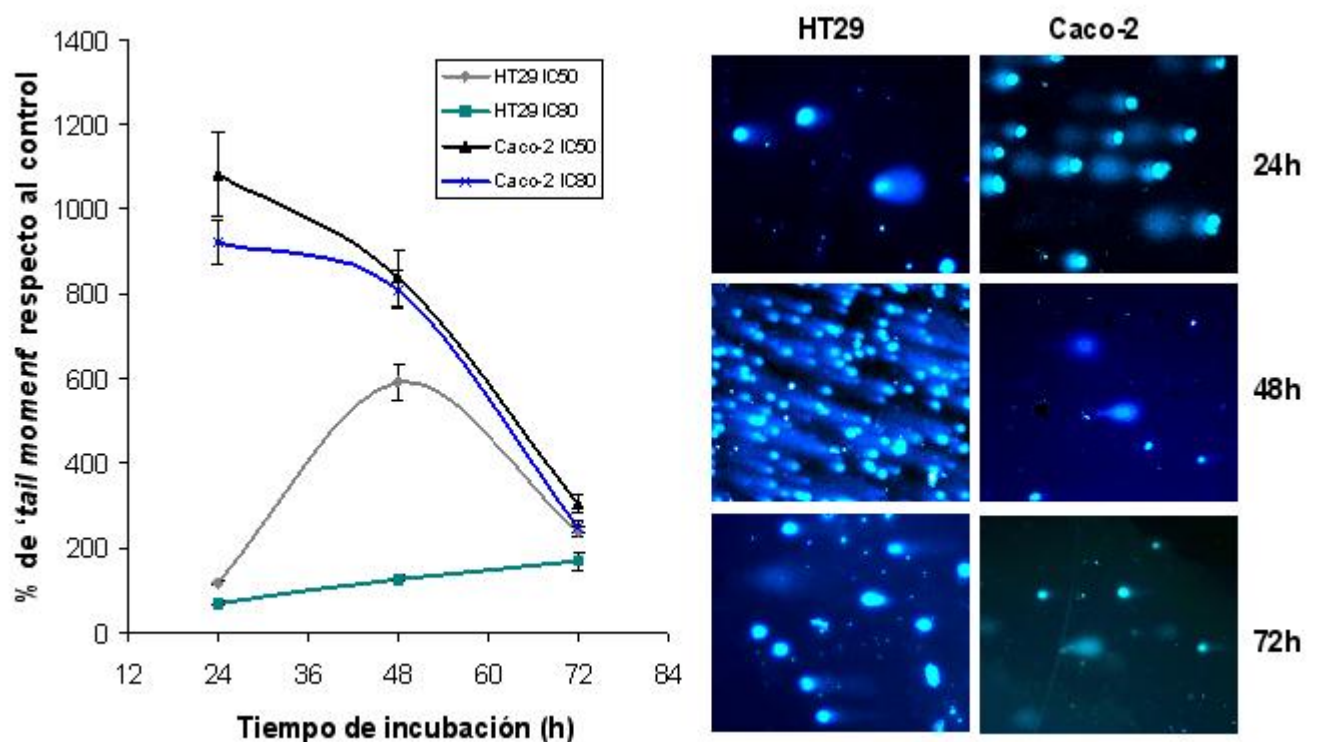
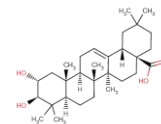


Figura 10.2 (Izquierda) Variación en el tamaño de las colas de los cometas (*tail moment*) observados mediante electroforesis en microgel en células HT29 y Caco-2 durante las 72h de tratamiento con ácido maslínico. (Derecha) Imágenes de electroforesis en microgel de las células HT29 y Caco-2 incubadas con ácido maslínico a sus respectivas concentraciones de IC₅₀.

Por otro lado, los resultados sobre Caco-2 (**figura 10.2**) muestran que estas células son mucho más sensibles a la genotoxicidad producida por maslínico que la línea HT29, siendo visible y alcanzando el valor máximo en el número y tamaño de las colas tras las primeras 24h de tratamiento. A continuación, estos valores disminuyen de forma proporcional al tiempo de incubación, aunque continúan siendo significativamente elevados hasta el final del tratamiento, lo que podría explicarse por cierta recuperación de la genotoxicidad inducida, aunque ésta es menor a la observada en HT29 y se produce de forma significativa tras las 72h de tratamiento. Con respecto a la concentración de ácido maslínico, la mayor genotoxicidad se alcanzó a la concentración de IC₅₀, siendo algo menor a la concentración de IC₈₀. Los resultados



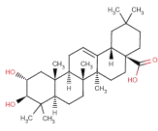
obtenidos nos muestran que la línea HT29 es en principio menos sensible a la genotoxicidad inducida por el ácido maslínico ya que no se pudo observar genotoxicidad hasta las 48h de tratamiento y los valores obtenidos son bastante más bajos que los observados en la línea celular Caco-2.

En las células Caco-2, el valor de '*tail moment*' alcanza su valor máximo tras las 24h de incubación. Por otro lado, las células HT29, que aún continuaban viables tras 72h de tratamiento, se recuperaron de la genotoxicidad en mayor proporción y de una forma más rápida que las células Caco-2, siendo la recuperación en estas últimas más pausada, con valores de *tail moment* que continuaron siendo elevados hasta el final del tratamiento.

Estos resultados podrían estar relacionados con la activación de factores de transcripción en la línea celular HT29, tales como p53 (cuya expresión ha sido examinado por *western*) o NF- κ B, lo que permitiría a estas células recuperarse de la genotoxicidad inducida por el ácido maslínico. Sin embargo, en las células Caco-2 el proceso de inducción de apoptosis sucede de forma mucho más rápida, siguiendo un mecanismo molecular que impide la recuperación de la genotoxicidad inducida. Esto se debe a que en las células Caco-2, el ácido maslínico induce la activación directa del proceso de apoptosis, mientras que en las células HT29 la activación de este proceso es más lenta y compleja, posiblemente desencadenando mecanismos de diferenciación celular de forma previa a la inducción de la apoptosis.

El ácido maslínico induce arresto celular en líneas tumorales

Tras el análisis de citotoxicidad nos planteamos determinar el proceso mediante el cual el ácido maslínico ejercía este efecto antiproliferativo. La disminución de la proliferación celular de células en un cultivo *in vitro*, ocasionada por un producto, puede ocurrir a través de varias vías: En primer lugar, hay que discernir entre el efecto citotóxico o citostático del producto en cuestión. Si el producto ejerce un efecto citostático evitará la división celular y, por tanto, la inhibición de la proliferación no se deberá exclusivamente a la muerte celular, sino que habrá que sumar el efecto antiproliferativo generado por la proporción de células arrestadas (**Sena y col., 1999; Walkman y col., 1997**). Aunque esta citostaticidad también puede mediar por una disminución en la tasa de división sin producir la muerte celular, provocando así, la ralentización de la proliferación del cultivo. En el caso de que la acción del compuesto sea completamente citotóxica, las células que continúan evolucionando a lo largo de su ciclo celular no deben verse afectadas sino es para entrar en el proceso de muerte celular, sin entrar en el arresto de su ciclo.



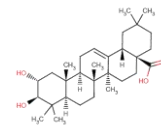
El análisis del ciclo celular se realiza, entre otras técnicas, mediante la tinción del DNA nuclear con yoduro de propidio lo que nos permite conocer exactamente qué proporción de células se encuentra en cada una de las fases del ciclo celular de forma inmediata ya que la unión del yoduro de propidio con el DNA se produce de forma estequiométrica conociendo de esta forma el contenido en DNA.

La cantidad de DNA presente en la célula está en relación directa con la fase del ciclo celular en la que se encuentra. Así, si la célula se encuentra en la fase G_0/G_1 la cantidad de ADN nuclear será la mitad que la cantidad correspondiente a las fases G_2/M (las cuales son indistinguibles mediante esta técnica, ya que la célula posee la misma cantidad de DNA en la fase G_2 que en la fase M). Por último, si la célula se encuentra en la fase de síntesis, fase S , la cantidad de DNA nuclear habrá de encontrarse entre las dos anteriores, ya que la célula en esta fase está sintetizando el DNA necesario para llevar a cabo su división.

Por otra parte, el número de células en cada fase del ciclo celular puede ser cuantificado mediante citometría de flujo utilizando un analizador FACS (*fluorescent activated cell sorter*) o contador activado por fluorescencia que determina el histograma de células en función de su tinción con yoduro de propidio, tinción que estará en relación directa con la cantidad de DNA nuclear que dependerá a su vez de la fase del ciclo en la que la célula se encuentra. Por ello, y para determinar la proporción de células en cada fase, los datos obtenidos por citometría de flujo fueron analizados utilizando el software Multicycle (Phoenix Flow System, San Diego, CA, USA). Este programa permite, a partir de los datos experimentales, interpolar la proporción de células presentes en cada fase del ciclo.

Esta proporción de células en cada fase del ciclo va a variar mucho dependiendo de qué tipo celular se investigue, así por ejemplo, para el caso de células completamente normales, la proporción de células en la fase G_0/G_1 se deberá encontrar próxima a un 90%, estando el resto de la población celular repartido entre las demás fases del ciclo. Sin embargo en las células cancerígenas esta proporción será algo menor, dependiendo de la línea que se considere. Debiéndose encontrar en torno a un 70% de células en la fase G_0/G_1 (según nuestros resultados) ya que en estos tipos celulares malignos el ritmo de división celular es bastante más acelerado que en células normales.

Además de distinguir las distintas fases del ciclo celular, este análisis de conteo de partículas en función de su tinción con yoduro de propidio, nos permite cuantificar la cantidad de restos celulares. La proporción correspondiente a estos restos celulares se encontrará por debajo del



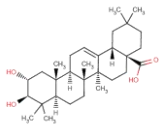
pico G_0/G_1 , pudiéndose identificar incluso la existencia de cuerpos apoptóticos. No obstante, con este tipo de análisis, en la mayoría de los casos, es muy difícil distinguir entre el DNA proveniente de restos celulares y el DNA que deriva de una muerte celular causada por apoptosis.

Si se tiene 'la suerte' de realizar este análisis justo en el momento de la generación de estos cuerpos apoptóticos, antes de que se degraden, podremos visualizarlos en el histograma correspondiente, ya que la dotación genómica de estos cuerpos es más o menos constante y aparecerá como un pico por debajo del pico G_0/G_1 (sub G_0/G_1). En el caso de que no sea así, se podrá ver el DNA como el correspondiente al de los restos celulares sin ningún tipo de tendencia, lo que se mostrará como un ruido de fondo o una elevación en el nivel de la línea base. Si la muerte celular ha sucedido por necrosis, podremos visualizar el DNA de los restos celulares sin que los datos sigan algún tipo de tendencia, siendo imposible distinguir qué DNA proviene de apoptosis y cual proviene de necrosis.

Una de las pruebas iniciales de diferenciación celular es el arresto en la fase del ciclo G_0/G_1 , ya que en esta fase, la célula posee su dotación cromosómica normal propia de la especie. Las células cuando se encuentran en el tejido al que pertenecen se diferencian mostrando el fenotipo propio de dicho tejido. Durante este proceso de diferenciación la célula pierde, o al menos disminuye, su capacidad de división.

Cuando la célula se encuentra diferenciada sale del ciclo celular arrojándose en la fase G_0 , que mediante el análisis de citometría es indistinguible de la fase G_1 . Por tanto, un arresto observado por citometría de flujo en las fases G_0/G_1 , sería indicativo de la posible diferenciación celular del cultivo. Lógicamente si la célula pierde o disminuye su capacidad de división, el resto de las fases del ciclo también se verán afectadas, por tanto el aumento en la fase G_0/G_1 vendrá acompañado de una disminución en el resto de las fases del ciclo.

Tras tener en cuenta todas estas consideraciones, se determinó la proporción de células en cada fase del ciclo celular a las 72h de incubación en todas las líneas celulares a las concentraciones de IC_{50} e IC_{80} calculadas en los ensayos de citotoxicidad sobre las líneas tumorales. Para las líneas normales o no transformadas IEC-6 e IEC-18, las concentraciones utilizadas fueron las respectivas IC_{50} e IC_{80} halladas en las células HT29. Por último, las células HT29 fueron además incubadas durante 96h a su concentración de IC_{50} e IC_{80} , con el objetivo de visualizar los posibles picos de aneuploidía, concretamente hipoploidía, correspondientes a la aparición de cuerpos apoptóticos.



A la hora de interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que la proporción 'normal' de células en cada fase del cultivo cancerígeno es distinta a la encontrada en las células procedentes de un tejido normal. Se determinaron estas proporciones a partir de los controles de células no tratadas, siendo, para las células HT29 de un 60% en la fase G_0/G_1 , un 30% en la fase S y un 10% en la fase G_2/M ; para las células Caco-2, un 75% en la fase G_0/G_1 , un 20% en la fase S y un 5% en la fase G_2/M . En las células IEC-6 estas proporciones fueron de un 70% en la fase G_0/G_1 , un 20% en la fase S y un 10% en la fase G_2/M y por último, para las células IEC-18, estas proporciones fueron de un 80% en la fase G_0/G_1 , un 10% en la fase S y un 10% en la fase G_2/M .

Como puede observarse, estos resultados ponen de manifiesto que el comportamiento más parecido al de las células normales tiene lugar en la línea celular IEC-18, teniendo la línea IEC-6 y Caco-2 un comportamiento claramente semejante en su crecimiento, y por tanto en sus tasas de división, lo que podría estar relacionado con los resultados en la citotoxicidad observados. Por último, resulta interesante observar que en la línea celular HT29, el número de células en las fases propias de la división celular, fases S y G_2/M , es bastante superior al encontrado en el resto de las líneas celulares estudiadas, Caco-2, IEC-6 e IEC-18, lo que lógicamente viene acompañado de una menor proporción en el número de células presentes en la fase G_0/G_1 .

Tras la incubación con ácido maslínico, los valores obtenidos en el número de células en cada una de las fases del ciclo celular en la línea HT29, muestran un importante y significativo incremento en la población de células correspondientes a la fase G_0/G_1 , siendo a la concentración de IC_{80} de más de un 21% respecto al control (**figura 10.3**). Este arresto celular ocurre de forma dependiente a la concentración de ácido maslínico utilizada, lo que claramente indica una inducción de la diferenciación celular provocada por parte del ácido maslínico y confirmada más tarde mediante los ensayos realizados de actividad fosfatasa alcalina (comúnmente utilizada enzima como marcadora de la diferenciación celular en células de colon).

Este incremento en el número de células de la fase G_0/G_1 ocurre de forma inversamente proporcional a la disminución en la proporción de células de las fases S y G_2/M , siendo esta disminución de un 17% y de un 4%, respectivamente, a la concentración de IC_{80} . El incremento de la población celular también quedó claramente reflejado en las gráficas de los parámetros SS y FS en los que se puede apreciar la clara aparición de la población celular correspondiente a la fase G_0/G_1 .

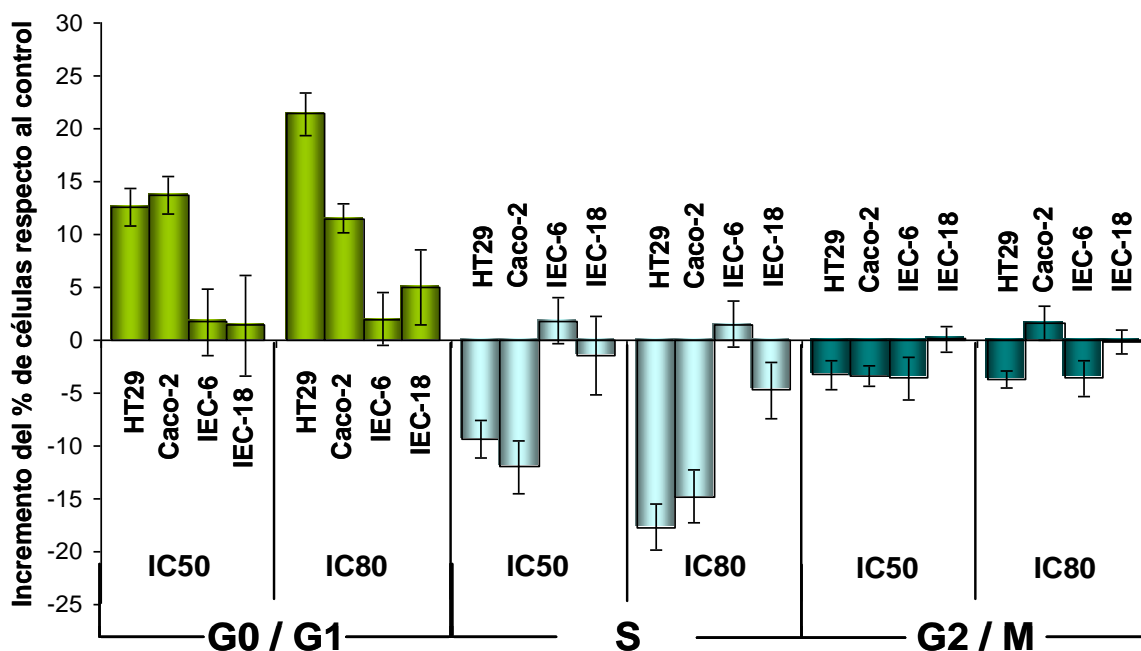
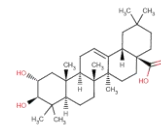
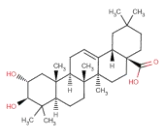


Figura 10.3 Incremento en las poblaciones celulares de HT29, Caco-2, IEC-6 e IEC-18, presentes en cada fase del ciclo celular con respecto a los controles de células sin tratar. En estas gráficas puede observarse claramente como el incremento en las fase G₀/G₁ en células tumorales está acompañado de un significativo decremento de la fase S.

En la línea tumoral Caco-2 se apreció también un incremento en el número de células en la fase G₀/G₁, aunque este incremento fue menor al observado sobre la línea tumoral HT29. En este caso, tal incremento no fue claramente concentración dependiente, ya que el mayor incremento se observó a la concentración de IC₅₀, siendo de un 14%. Mientras que a la concentración de IC₈₀ el incremento no llegó al 12% (**figura 10.3**). Estos incrementos en la fase G₀/G₁ ocurrieron de forma conjunta a la disminución del número de células en las poblaciones S y G₂/M. En cuanto a la disminución del número de células en la fase S, ésta si pareció ocurrir de forma concentración dependiente, siendo de un 12% respecto a la concentración de IC₅₀ y de un 15% a la concentración de IC₈₀, sin embargo, la disminución en la fase G₂/M tampoco ocurrió de forma concentración dependiente, siendo de un 3,4% a la concentración de IC₅₀ y pareciendo incluso aumentar en sólo un 2% a la concentración de IC₈₀, aunque estos valores no son significativos por el error asociado que presentan. El mayor arresto y, por tanto, la mayor diferenciación se observa en la línea tumoral HT29, como ha sido, también, confirmado en el análisis de la actividad fosfatasa alcalina.

Respecto a las líneas normales IEC-6 e IEC-18, independientemente de la concentración de ácido maslínico utilizada, no se observó cambio significativo en las poblaciones de células correspondientes a cada fase del ciclo celular (**figura 10.3**), permaneciendo los valores encontrados muy cercanos a los valores de los controles sin tratar, no siendo sus diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se apreció, en estos tipos celulares, la aparición de

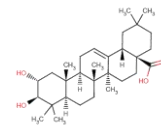


restos celulares, claramente visibles en este tipo de ensayo. Podemos concluir, por tanto, que los efectos del ácido maslínico sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis fueron selectivos para las células malignas, ya que no alteró el ciclo celular, ni indujo apoptosis apreciable en el examen del ciclo celular sobre las líneas de células intestinales normales IEC-6 e IC-18. Este resultado sobre el efecto del ácido maslínico en las rutas pro-apoptóticas específicas de células malignas hace de este compuesto y, por analogía, del resto de los triterpenos pentacíclicos unos buenos aspirantes como fármacos anticancerígenos de última generación. Ya que además, como se ha comentado, poseen cierta citotoxicidad selectiva.

Se ha documentado ampliamente la inducción de arresto en el ciclo celular por otros compuestos triterpénicos pentacíclicos, así, algunos autores (**Rhew, 1993, Li y col., 2002**) describen la inhibición del crecimiento y el arresto en las fases del ciclo celular G_1 por los ácidos oleanólico y ursólico, así como la inducción de apoptosis en ciertos sistemas cancerígenos, impidiendo la proliferación e induciendo diferenciación en células malignas. Además, **Li, Guo y Yang en 2002**, describieron un importante arresto en el ciclo celular sobre las células de carcinoma de colon HCT15 por parte de los ácidos oleanólico y ursólico. Se ha descrito la inhibición en el crecimiento y el arresto en el ciclo celular por derivados del oleanólico, CDDO-Im en células de linfoma (**Han y col., 2006**) y AOA-GMe (metil éster 3β -3-acetoxi-28-oxoolean-12-en-28-il glicina) en células de melanoma (**Lu y col., 2007**).

Cuando las células fueron incubadas durante 36h y 72h con estos triterpenos se incrementó el porcentaje de células en la fase G_0/G_1 de forma tiempo dependiente, con un decremento en la población de células en la fase S. Estos autores, sin embargo, no pudieron identificar de forma clara la aparición de apoptosis mediante este tipo de análisis del ciclo celular. Los resultados descritos por estos autores, son muy similares a los encontrados en nuestro trabajo, por lo que se podría suponer que el arresto celular, así como la diferenciación observada podrían inducirse por los distintos triterpenos siguiendo procesos y mecanismos similares.

Por último, se determinó si la apoptosis observada en las células HT29 por otros ensayos era también observable mediante los análisis del ciclo celular. Para ello se incubó con ácido maslínico la línea tumoral HT-29 durante 96h (24h más que en el resto de los ensayos), en este caso la aparición de un pico aneuploide sub- G_0/G_1 fue evidente. La aparición de este pico a las 96h de tratamiento no es de extrañar, ya que otros ensayos indicaban que a las 72 h de tratamiento, la apoptosis inducida por el ácido maslínico en la línea tumoral HT29 se encuentra aún en un estadio temprano. Muestra de ello son los resultados obtenidos en los ensayos de tinción con yoduro de propidio y anexina V-FICT. Estos resultados mostraron un marcaje muy

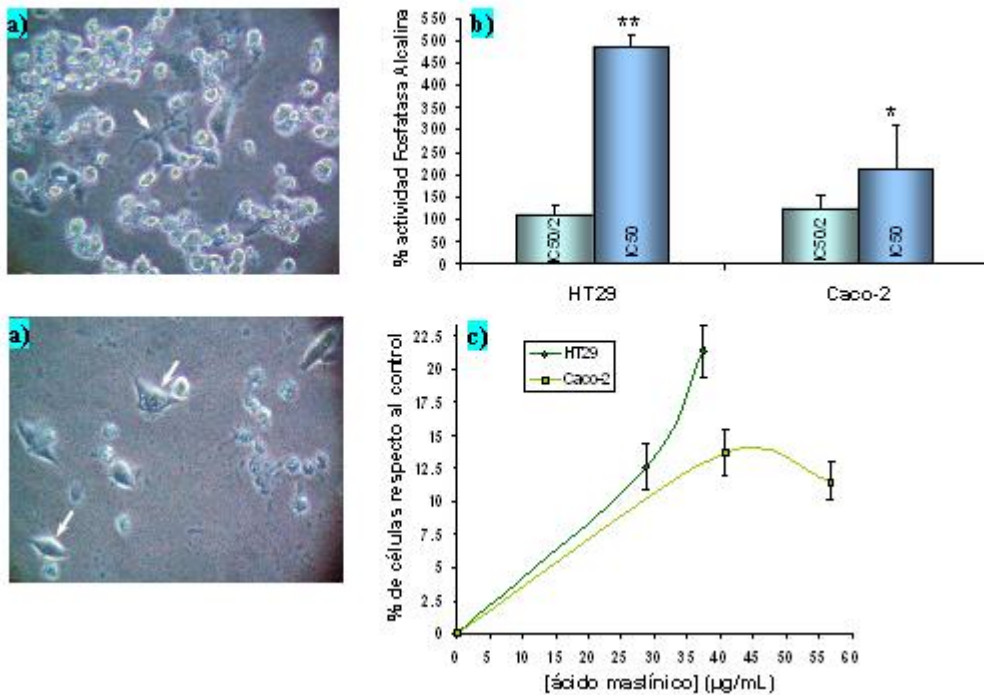
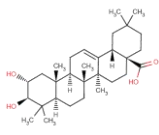


elevado con anexina, mientras que el marcaje con yoduro de propidio era bastante menor, indicando que aunque a 72h de incubación, la apoptosis en HT29 está bastante extendida, la célula aún conserva su integridad de membrana encontrándose en apoptosis temprana. Este hecho se ve reforzado, como se verá más adelante, con el mecanismo molecular encontrado para la inducción de apoptosis en esta línea celular. Sin embargo, a las 96 h de incubación con el ácido maslínico, la apoptosis se encuentra ya bastante avanzada, llegando a sus estadios finales, por lo que la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos se hace evidente, mostrándose claramente en el análisis del ciclo celular. Si se observa la gráfica de SS (*side scatter*) frente a FS (*forward scatter*) puede verse la clara aparición de una subpoblación de partículas correspondiente a estos cuerpos apoptóticos. También en los histogramas del análisis del ciclo puede observarse un incremento en el número de restos celulares, el cual se ve reflejado como un aumento en el nivel de la línea base por debajo del pico G_0/G_1 tanto a las concentraciones de IC_{50} , como a las concentraciones de IC_{80} . Este aumento en la proporción de restos celulares puede deberse a la degradación de los cuerpos apoptóticos, quedando expuesto el DNA que contienen al yoduro de propidio.

El ácido maslínico induce diferenciación celular en líneas tumorales

En el proceso de diferenciación, los enterocitos adquieren características estructurales de células maduras, expresando productos tales como la fosfatasa alcalina y desarrollando funciones propias del tejido al que pertenecen. La inhibición en el crecimiento del cultivo junto con el arresto del ciclo celular y el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina son características marcadoras de diferenciación enterocítica. (Choi y col., 1990; Ding y col., 2000; Baltes y col., 2004). La actividad fosfatasa alcalina ha sido ampliamente utilizada como enzima marcadora de diferenciación sobre las líneas celulares HT29 y Caco-2 (Liu y col., 2006; Dihal y col., 2007; Lea y col. 2007). Se ha relacionado la diferenciación de células de colon con la expresión de las proteínas p21 y p53 (Izawa y col., 2005).

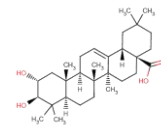
Tras 72h de incubación con ácido maslínico a las concentraciones de IC_{50} e $IC_{50/2}$, se examinó la actividad fosfatasa alcalina sobre las líneas celulares HT29 y Caco-2 (figura 10.4b). A la concentración de $IC_{50/2}$ la actividad fue bastante baja siendo próxima a la encontrada en las células control sin tratar. Sin embargo, a IC_{50} hubo un significativo incremento en la actividad de esta enzima. Este incremento fue de unas 5 veces respecto al control en células HT29 y de 2 veces respecto al control en células Caco-2, siendo en este último caso menos significativo.



carcinoma de colon: a) Imágenes de microscopía óptica de las células HT29 (arriba) y Caco-2 (abajo). b) Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina en las líneas HT29 y Caco-2. c) Incremento de las poblaciones celulares de la fase GO/G1 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico tras 72h de incubación.

Estos resultados junto con el arresto del ciclo celular producido tras el tratamiento con ácido maslínico, confirman su capacidad como agente inductor de diferenciación celular en las dos líneas de cáncer de colon ensayadas. Por otro lado, las células que aún continúan siendo viables tras el tratamiento con el ácido maslínico parecen cambiar su morfología como muestran las imágenes de microscopía óptica (**figura 10.4a**). Estas células parecen tener un mayor volumen celular y presentar ciertas proyecciones de la membrana plasmática. Los resultados muestran una mayor inducción de la actividad fosfatasa alcalina en la línea celular HT29, lo que unido al mayor arresto en el ciclo celular observado en esta línea (**figura 10.4c**), indican que la diferenciación inducida por el ácido maslínico es mayor en esta línea celular que sobre las células Caco-2.

Otros resultados que apoyan este indicio son, la menor genotoxicidad producida por el ácido maslínico en la línea tumoral HT29; la rápida recuperación de la misma, y, finalmente, la sobre-expresión del factor de transcripción p53 capaz de inducir diferenciación celular. Estos resultados llevan a la conclusión de que la diferenciación celular en respuesta al tratamiento con ácido maslínico ocurre en mayor extensión sobre la línea tumoral HT29 que sobre la línea Caco-2.



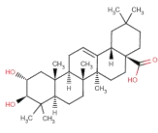
La inducción de diferenciación celular ha sido descrita en respuesta al tratamiento con distintos compuestos triterpénicos en varias líneas celulares, así **Galgon y col., 2005**, describieron la diferenciación inducida por concentraciones subcitotóxicas de ácido betulínico diferenciándose de keratinocitos a corneocitos. También se ha observado esta actividad diferenciadora en los ácidos ursólico y oleanólico, incluyendo efectos inhibitorios sobre la angiogénesis aunque el mecanismo por el que tiene lugar esta actividad aún no está claro. (**Ovesna, 2004; Novontny, Vacchalkova y Biggs, 2001**).

Relacionados con esta actividad, se han propuesto mecanismos que involucran la supresión de la expresión de ciertos oncogenes como c-jun y c-fos (**Rhew, y col., 1993**). Los ácidos ursólico y oleanólico, inducen diferenciación en células F9 de teratocarcinoma humano induciendo la expresión de genes como laminina B1 y colágeno IV propios de las células diferenciadas (**Lee y col., 1994**), estos ácidos inducen también la diferenciación de células M1 a células de tipo macrófago (**Umehara y col., 1992**).

Se ha descrito que el compuesto CDDO derivado del ácido oleanólico induce diferenciación monocítica en células de leucemia mieloide CLLB (**Perdersen y col., 2002**); diferenciación adipogénica de fibroblastos de ratón 3T3-L1, diferenciación neuronal en células de rata PC12 (**Suh y col., 1999**) y diferenciación sobre células de osteosarcoma humano (**Ito y col., 2001**). CDDO-Im induce diferenciación monocítica sobre células de leucemia HL60 (**Ji y col., 2006**). CDDO-Me induce diferenciación en células de leucemia (**Shishodia y col., 2006**). Por último, se ha descrito la inducción de diferenciación por el ácido boswéllico sobre las células de melanoma de ratón B16F10 (**Zhao y col., 2003**).

El ácido maslínico ejerce un efecto proapoptótico en líneas tumorales

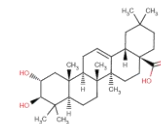
Del estudio del ciclo celular, por citometría de flujo, es posible obtener una gran cantidad de información, pero, debido a las limitaciones inherentes a este método, es difícil distinguir entre distintos procesos de muerte celular, ya que sólo informa de la cuantificación de partículas en función de su tinción con yoduro de propidio. Para cuantificar la extensión del efecto apoptótico inducido por ácido maslínico, se procedió a realizar un ensayo más preciso, la determinación por citometría de flujo del marcaje con anexina V-FICT unida a la tinción con yoduro de propidio. Este ensayo nos permite cuantificar las distintas poblaciones celulares en función de su grado de apoptosis. La anexina V-FICT tiene una elevada afinidad por el aminofosfolípido fosfatidil-serina. En células normales, debido a la asimetría de membrana este aminofosfolípido se encuentra fundamentalmente en la cara interna de la membrana citoplasmática.



Cuando la célula sufre un proceso de muerte programada, la asimetría de membrana cambia exponiendo al exterior entre otras moléculas a la fosfatidilserina. Esta es una señal inequívoca para que los macrófagos fagociten a la célula apoptótica. Todo esto ocurre, lógicamente, antes de la fragmentación celular y/o la formación de cuerpos apoptóticos. El marcaje con yoduro de propidio se realiza, a diferencia con el análisis del ciclo celular, sin permeabilizar previamente la membrana con etanol, de forma que solamente se marcará aquel DNA que esté libremente expuesto, marcando a la célula cuando la integridad de la membrana está comprometida. Esto puede ocurrir en el caso de muerte por necrosis así como en la degradación de los cuerpos apoptóticos o incluso durante el proceso de apoptosis, permitiendo la entrada del yoduro de propidio.

Un bajo marcaje en IP y un alto marcaje con anexina V-FICT indican que la célula se encuentra totalmente inmersa en el proceso de apoptosis, pero la integridad de la membrana continúa intacta, denominamos a esta fase como apoptosis temprana. Por otra parte, un alto marcaje con IP y un bajo marcaje con anexina V-FICT indican que la célula ha sufrido la ruptura de la membrana citoplasmática sin que se haya translocado la fosfatidilserina, indicándonos que nos encontraríamos ante un proceso de necrosis. Por último, si existe un elevado marcaje en anexina V-FICT y en yoduro de propidio, nos encontraríamos ante una célula que ha translocado la fosfatidilserina, pero que ha sufrido en algún momento la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática, probablemente durante la formación de los cuerpos apoptóticos, a este estadio del proceso de apoptosis lo denominamos apoptosis tardía. La cuantificación de estas poblaciones celulares se realizó, al igual que en el análisis del ciclo celular, mediante citometría de flujo utilizando un contador activado por fluorescencia o analizador FACS (*fluorescent activated cell sorter*).

La cuantificación del proceso de apoptosis sobre las líneas celulares cancerígenas y sobre las líneas de epitelio intestinal mostró que el ácido maslínico, a las diferentes concentraciones ensayadas, induce apoptosis de forma diferencial sobre las líneas cancerígenas y no sobre las líneas normales o no transformadas (**figura 10.5**). En la línea tumoral HT29, el porcentaje de células apoptóticas tras 72h de tratamiento a la concentración de IC_{50} , fue de un 25% (14% de apoptosis temprana más un 11% de apoptosis tardía); a la concentración de IC_{80} este porcentaje fue de un 38% (27% de apoptosis temprana más un 11% de apoptosis tardía); los porcentajes de necrosis no fueron significativos en ninguno de los casos. A 72h de incubación, la apoptosis detectada por este método no se ve reflejada en el estudio del ciclo celular, por lo que es probable que aún no se hayan formado cuerpos apoptóticos detectables por tinción



con yoduro de propidio. Estos resultados, están en consonancia con los encontrados en el análisis del ciclo celular a las 96h, ya que la mayor parte de la población, un 38%, a la concentración de IC₈₀ se encuentra en el estadio de apoptosis temprana a 72h, población que finalmente pasará a formar los cuerpos apoptóticos detectables en el análisis del ciclo celular a las 96h.

En el caso de las células Caco-2, la población de células apoptóticas a la concentración de IC₅₀ fue de un 14% (7% de apoptosis temprana y un 7% de apoptosis tardía). Sin embargo, a la concentración de IC₈₀ el porcentaje de células apoptóticas se incrementó de forma extraordinaria, pasando a ser del 60% (15% de apoptosis temprana y un 45% de apoptosis tardía), porcentaje que supone casi el doble al encontrado en células HT29, encontrándose aproximadamente la mitad de la población celular en el estadio de apoptosis tardía. Como reflejan estos resultados, el comportamiento del ácido maslínico sobre estas dos líneas tumorales ocurre también de forma diferencial. Mientras que en HT29 la mayor parte de la población apoptótica se encuentra en el estadio de apoptosis temprana, en Caco-2 casi un 50% de las células se encuentran en apoptosis tardía.

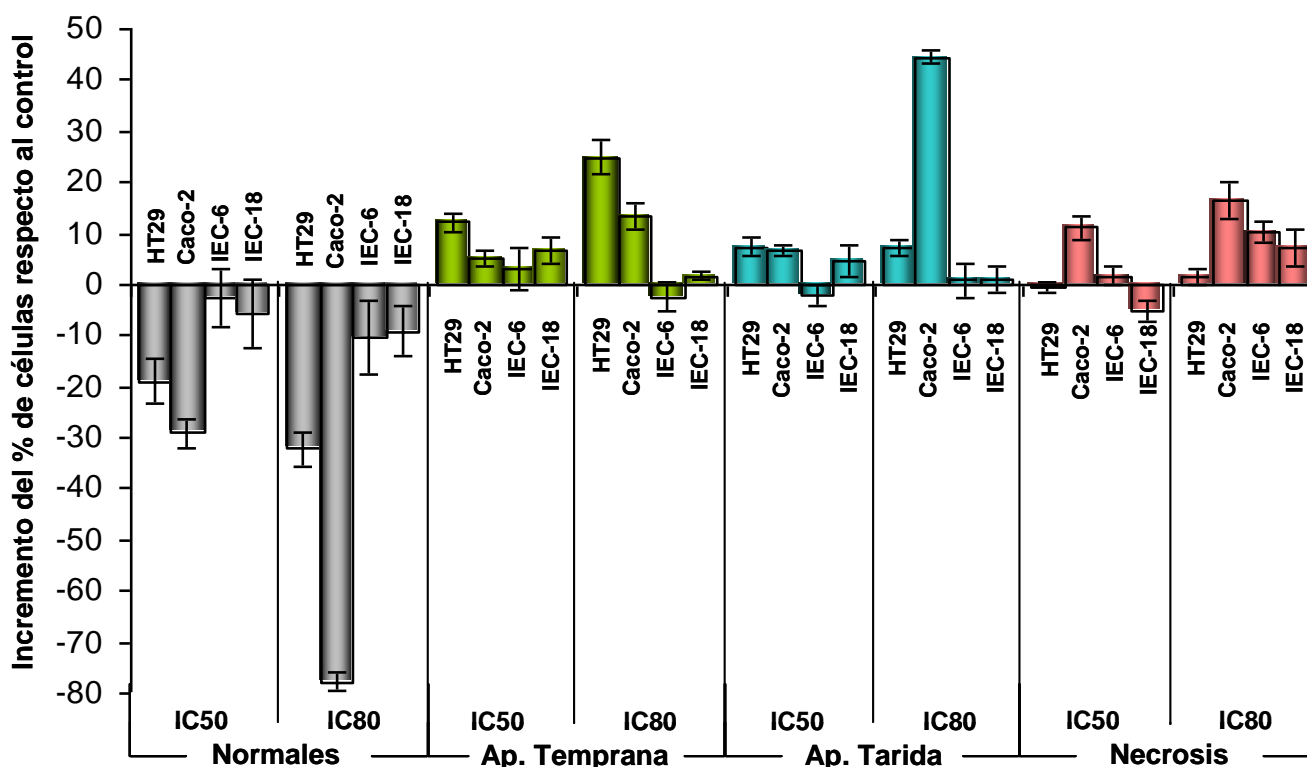
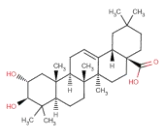


Figura 10.5 Incremento de las distintas poblaciones celulares de HT29, Caco-2, IEC-6 e IEC-18, con respecto a los controles de células sin tratar, en función de la tinción con yoduro de propidio y anexina V-FICT. En estas gráficas puede observarse claramente como el incremento de las poblaciones celulares apoptóticas está acompañado por un significativo decremento en la población de células normales.

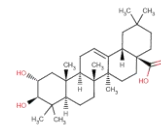


De estos resultados podría interpretarse que en las células HT29 la activación de la ruta apoptótica ocurre más lentamente que en las células Caco-2. Estos resultados han sido corroborados por otros ensayos como son la tinción por Hoechst, el ensayo de electroforesis en microgel donde se puede observar como el ácido maslínico ejerce una mayor genotoxicidad sobre las células Caco-2 a las 72 h de incubación que sobre las células HT29 y en la determinación de la fragmentación apoptótica del DNA por electroforesis.

La activación más pausada de la ruta apoptótica en células HT29 está en consonancia con el mecanismo molecular propuesto, en el que las células Caco-2 comienzan el proceso de apoptosis inmediatamente después de comenzar la incubación con el ácido maslínico, mientras que las células HT29 desencadenan procesos controlados por los factores de transcripción tales como p53 (que en respuesta al daño genotóxico y a otros factores, desencadena procesos de diferenciación celular), pudiendo ser incluso activado el factor de transcripción NF- κ B (capaz de inducir la expresión de genes supervivencia).

Con este ensayo, también, puede evaluarse la proporción de células necróticas, siendo ésta población mayor en las células Caco-2 que en el resto de tipos celulares. En células HT29 esta población, prácticamente, no es significativa. El porcentaje de células Caco-2 necróticas podrían provenir de la evolución final de las células que se encuentran en apoptosis tardía, ya que tras el proceso de apoptosis los cuerpos apoptóticos se degradan liberando su DNA al exterior, lo que estaría directamente relacionado con el alto porcentaje de células en apoptosis tardía hallado en este tipo celular. Por otro lado, el arresto encontrado en células HT29 unido a otros resultados como son la inducción de p53 y el incremento en la actividad fosfatasa alcalina, podría indicar que este tipo celular sufre un proceso de diferenciación previo a la inducción de apoptosis. Lo que explicaría que a las 72h de incubación, el porcentaje de apoptosis temprana sea mayor en HT29 que en el resto de tipos celulares, así como el bajo porcentaje de necrosis.

Los análisis del ciclo celular mostraron que el ácido maslínico prácticamente no presenta efecto sobre el ciclo celular de las líneas no transformadas IECI-6 e IEC-18 y para completar estos resultados se analizó la inducción de apoptosis sobre estas líneas celulares. Los resultados obtenidos mostraron que el ácido maslínico no ejerce un efecto apoptótico significativo sobre estas líneas siendo los porcentajes de células apoptóticas muy parecidos a los encontrados en los controles de células sin tratar. En ambas líneas celulares, se observó cierta población basal de células necróticas en los controles, esto provocó el aparente incremento de este grupo de células en el resto de las concentraciones ensayadas. Pero, si referimos los valores de células



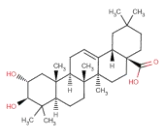
necróticas hallados a las distintas concentraciones, respecto a los encontrados en los controles de células sin tratar, puede observarse que dicho incremento no ocurre. La presencia de esta población basal de células necróticas puede explicarse por una mala calibración de los límites entre las distintas poblaciones celulares, a partir de las células control.

Aunque el ácido maslínico parece afectar de alguna forma a IEC-6 e IEC-18 el grado y la proporción en la que lo hace es bastante menor al encontrado en las líneas tumorales HT29 y Caco-2. Por lo que podemos concluir, que el ácido maslínico no ejerce efectos significativos apreciables sobre estas líneas celulares. Este hecho, como se verá más adelante, ha sido reforzado mediante el estudio de la expresión de caspasa-3, proteína clave del proceso apoptosis, la cual no es inducida en células IEC-6 o IEC-18 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico. El efecto de inducción de apoptosis no es exclusivo del ácido maslínico como triterpeno pentacíclico natural, ya que el efecto apoptótico de estos compuestos es conocido desde hace tiempo (Trumbull y col., 1976), existiendo numerosos artículos a este respecto (ver capítulo 2 de la introducción). Así, el ácido betulínico presenta un efecto apoptótico específico sobre células de melanoma (Patočka, 2003), así como sobre líneas tumorales neuroectodérmicas y neuronales (Zuco y col., 2002) y glioblastoma (Fulda y col., 1999), etc..

El ácido ursólico es capaz de inducir apoptosis sobre líneas de cáncer de mama, melanoma, carcinoma de próstata y leucemia mieloide aguda (Es-Saady y col., 1996a ; Es-Saady y col., 1996b; Choy y col., 2000; Hollosy y col., 2000; Hollosy y col., 2001; Choi y col., 2000; Konopleva y col., 2002; Fernandes y col., 2003), hepatoblastoma (Kim y col., 2000), cáncer de colon (Anderson y col., 2003), etc.. El ácido oleanólico ha mostrado su actividad antiapoptótica contra las líneas celulares A549, SK-OV-3, SK-MEL-3, HCT15, HONE-1, HSC, HSG (Kim, Yoon y Ryu, 2000; Taniguchi y col., 2001; Chiang y col., 2005), células Hela (Niikaw y col., 1993), células de eritroleucemia (Fernandes y col., 2003). Derivados del oleanólico, CDDO-Im y CDDO-Me inducen apoptosis sobre células de leucemia (Ji y col., 2006; Shishodia y col., 2006).

El ácido maslínico induce los cambios característicos de los procesos apoptóticos

Como se ha comentado anteriormente, nuestros datos muestran evidencias de que el ácido maslínico ejerce un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico en las líneas cancerígenas de carcinoma de colon, HT29 y Caco-2. Para corroborar estos resultados, se determinó si el ácido maslínico es capaz de inducir los procesos y cambios morfológicos característicos de la



apoptosis. Entre ellos cabe destacar, la condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, reducción del volumen celular y activación de caspasas. Parte de estos cambios pueden observarse con la visión directa del cultivo celular a través de microscopía de contraste de fase, en la que los fragmentos celulares y/o cuerpos apoptóticos son claramente visibles (**figura 10.6a**).

Esta aparición de fragmentos y/o cuerpos apoptóticos es directamente dependiente de la concentración de ácido maslínico utilizada y del tiempo de incubación, de forma que la mayor proporción de cuerpos refringentes se da a la concentración de IC₈₀ y tras 72h de incubación; también, puede observarse la pérdida de volumen celular, así como el plegamiento de la membrana plasmática. La inducción de la apoptosis por el ácido maslínico es más claramente visible en los ensayos de tinción con Hoechst (**figura 10.6b**), en los que se puede observar el colapso del núcleo en una esfera densa (picnosis) y la aparición de cuerpos apoptóticos.

La proporción de cuerpos apoptóticos visibles es mayor en las células Caco-2, que en células HT29 tras 72h de incubación, tanto a la concentración de IC₅₀ como de IC₈₀. También son visibles por este ensayo la disminución del volumen celular, así como la desorganización del núcleo. Estos fenómenos van en aumento en función del tiempo de incubación y de la concentración de ácido maslínico utilizada, estando ampliamente extendidos tras las 72h de incubación.

La apoptosis reflejada en el ensayo de citometría por tinción con anexinaV-FICT e yoduro de propidio (**figura 10.6c**), fue también evaluada mediante la visualización directa de este marcaje en células HT29. Los datos obtenidos ratifican los resultados obtenidos en el ensayo por citometría de flujo. Mediante esta técnica se puede observar fácilmente la presencia de células apoptóticas, siendo claramente visibles las células teñidas únicamente con anexina V-FICT, lo que indicaría una apoptosis temprana, y aquellas teñidas con anexina-V-FICT e yoduro de propidio, indicarían un estadio posterior del proceso de apoptosis o apoptosis tardía. En este caso, los resultados de apoptosis tienen una buena correlación con los observados por citometría de flujo, sin embargo, los porcentajes de necrosis son algo superiores, lo cual podría deberse a que en la tinción con eoxina pudiese mostrar como no viables células en los últimos estadios de la apoptosis.

Otro ensayo realizado para la confirmación de apoptosis fue la evaluación de la actividad caspasa-3 (**figura 10.6d**). En ambas líneas celulares esta actividad fue más elevada a las 72h de incubación, incrementándose de forma concentración dependiente, siendo algo más marcada en HT29 que en Caco-2, aunque esta diferencia no es demasiado significativa.

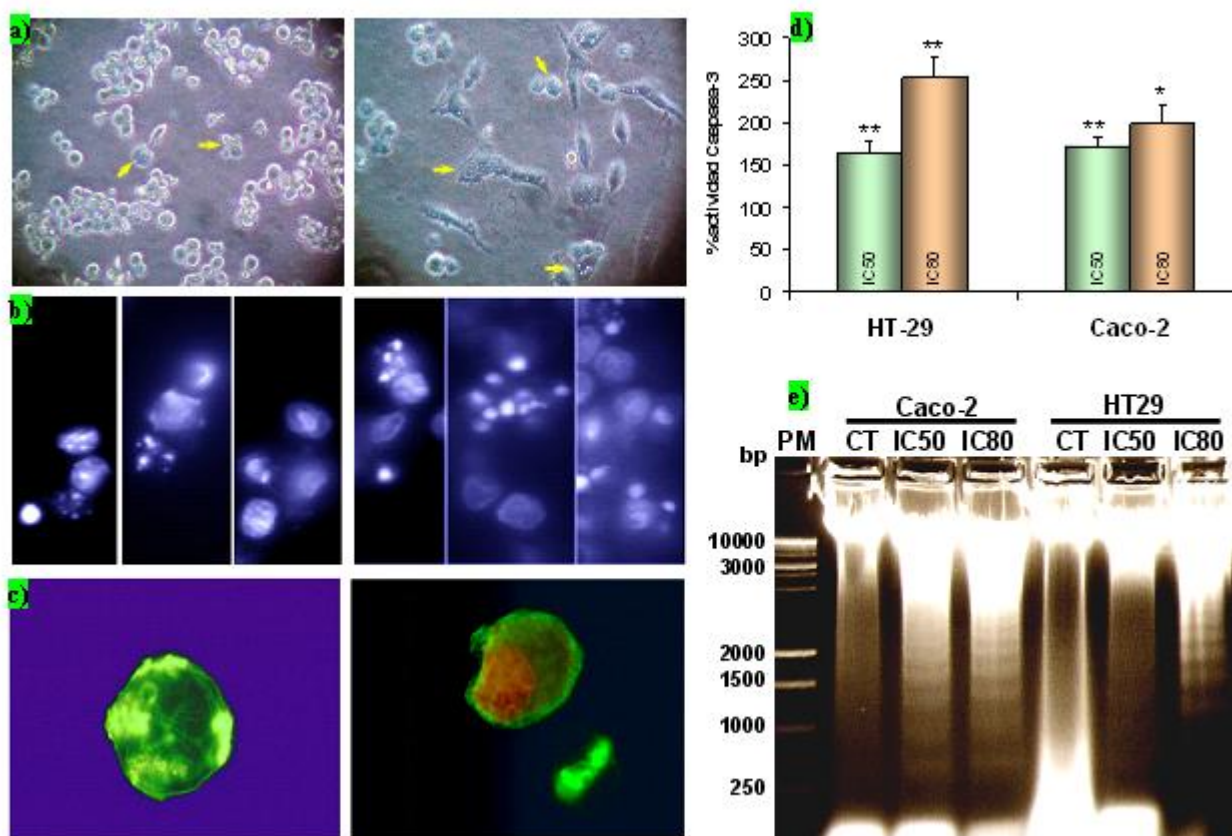
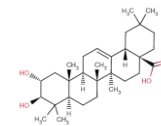
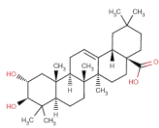


Figura 10.6 Efectos encontrados tras el tratamiento con ácido maslínico de las líneas tumorales HT29 y Caco-2: a) Imágenes de microscopía óptica de células HT29 (izquierda) y Caco-2 (derecha) en las que se aprecia la formación de fragmentos celulares y cuerpos apoptóticos. b) Imágenes de microscopía de fluorescencia en la que se aprecia la condensación del núcleo y la formación de cuerpos apoptóticos sobre células HT29 (izquierda) y Caco-2 (derecha). c) Imágenes de células HT29 apoptóticas, en un estadio de apoptosis temprana (izquierda) y apoptosis tardía (derecha). d) Incremento en el porcentaje de activación de la caspasa-3 en las líneas HT29 y Caco-2 tras 72h de tratamiento con ácido maslínico. e) Patrón de DNA apoptótico hallado en células HT29 y Caco-2 tras 72h de tratamiento con ácido maslínico.

Los incrementos en la actividad caspasa-3 encontrados en la línea HT29 fueron de un 164 ± 13 % a la concentración de IC₅₀, y de un 253 ± 24 % a la concentración de IC₈₀, ambos porcentajes determinados respecto a los valores controles de células sin tratamiento. En la línea tumoral Caco-2 estos incrementos fueron de un $172\% \pm 12\%$ a la concentración de IC₅₀ y de un $198 \pm 23\%$ a la concentración de IC₈₀, evaluados también respecto a los controles de células sin tratar.

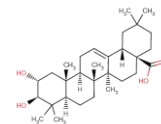
Estas diferencias en la actividad caspasa-3 encontradas entre estos dos tipos celulares podrían explicarse por una inducción de apoptosis más temprana en Caco-2 que en HT29, por lo que tras las 72h de tratamiento las células HT29 aún se encontrarían en plena actividad apoptótica, mientras que las células Caco-2 estarían ya en los estadios finales del proceso. Estos resultados han sido ratificados por los ensayos de expresión caspasa-3 realizados por *western*, los cuales revelan que el comienzo de la inducción caspasa-3 en Caco-2 sucede casi inmediatamente



tras su exposición al ácido maslínico y va disminuyendo con el transcurso del tratamiento. Mientras que la expresión de caspasa-3 en la línea tumoral HT29 alcanza su máximo tras estas 72h de tratamiento.

Por último, se confirma la apoptosis inducida por el ácido maslínico mediante el ensayo de fragmentación del DNA (**figura 10.6e**). Como ya se ha comentado, durante el proceso de apoptosis el DNA es fragmentado en fragmentos internucleosomales de 200 pb o múltiplos de los mismos, lo que genera, tras someter este DNA a electroforesis, el típico patrón en escalera. Los resultados muestran una clara ruptura de DNA a nivel internucleosomal, tanto en las células HT29, como en células Caco-2. Sin embargo, en el caso de HT29 esta ruptura se observa con más frecuencia a la concentración de IC_{80} que a la concentración de IC_{50} . Mientras que en Caco-2 se observa la formación de este patrón en escalera tanto a la concentración de IC_{80} como a la de IC_{50} . Estos resultados confirman que tras 72h de tratamiento a la concentración de IC_{50} la apoptosis en las células Caco-2 se encuentra más avanzada que en las células HT29 demostrando la inducción de apoptosis por el ácido maslínico sobre las líneas tumorales HT29 y Caco-2, aunque encontrándose en las células Caco-2, tras las 72h de incubación, en un estadio más avanzado que en HT29. Estos resultados pueden ser explicados adecuadamente a partir del mecanismo molecular de activación de apoptosis propuesto en cada una de estas dos líneas celulares.

Las pruebas utilizadas para la determinación de la apoptosis inducida por el ácido maslínico, forman parte de los ensayos usados frecuentemente a este respecto, habiendo sido utilizadas en numerosos de los artículos de determinación del potencial antiproliferativo y proapoptótico de los compuestos triterpénicos descritos en el capítulo 2 de la introducción. Así, por ejemplo, ha sido descrita la activación de la caspasa-3 por el ácido betulínico en células de origen neuroectodérmico (**Fulda y col., 1998**), en células de glioma (**Wick y col., 1999**), en tipos celulares de neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma y sarcoma de Ewing (**Pisha y col., 1995; Zuco y col., 2002**), células de melanoma humano M4Beu (**Harmand y col., 2005**). La inducción de fragmentación del DNA también ha sido descrita en respuesta a la acción del ácido betulínico (**Pisha y col., 1995; Gopal y col. en 2005**). La activación de la caspasa-3 ha sido descrita en el mecanismo de la citotoxicidad inducida por el ácido ursólico (**Choy y col., 2000; Hollosy y col., 2001; Konopleva y col., 2002**), siendo observada, también, en células HepG2 junto con la fragmentación del DNA (**Kim y col., 2000**), en células HL-60 (**Fernández y col., 2005**) y en células HT29 (**Anderson y col., 2003**).



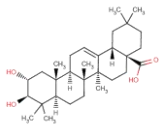
Los compuestos derivados del ácido oleanólico, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oico) y su metil éster CDDO-Me, se han mostrado capaces de inducir la activación de la caspasa-3. En el caso del CDDO la activación de la caspasa-3 ha sido descrita por varios autores (Ito y col., 2000, Ito y col., 2001; Konopleva y col., 2004; Lapillonne y col., 2003), y más concretamente sobre células de leucemia ML-1 (Stadheim y col., 2002), células de leucemia U-937 (Ikeda y col., 2003), etc.; en el caso del CDDO-Me se ha descrito la activación de la caspasa-3 sobre células de leucemia mieloide y de cáncer de pulmón (Kim y col., 2002; Zou y col., 2004).

Además, derivados triterpénicos como las avicinas inducen también la activación de esta caspasa (Haridas y col., 2001a; Haridas y col., 2001b). Los ginsenósidos son capaces de inducir apoptosis activando igualmente a la caspasa-3 (Lee y col. 2000). En general, prácticamente todos los compuestos triterpénicos descritos en el capítulo-2 inducen mecanismos de apoptosis que finalizan con la activación de la caspasa-3 y la fragmentación apoptótica del DNA, independientemente de las líneas celulares utilizadas. Estos eventos son comunes en la mayoría de los mecanismos de inducción de apoptosis conocidos. No obstante, en algunos casos, se ha descrito un mecanismo de inducción de apoptosis celular junto a la fragmentación del DNA independiente de la participación de la caspasa-3 (Li, Luo y Wang, 2001; Suzuki y col., 2001; Hegde y col., 2002).

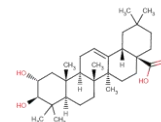
Mecanismo de apoptosis mediado por JNK y p53 en la línea tumoral HT29

Con el objetivo de determinar a través de qué ruta de señalización se produce el efecto apoptótico inducido por el ácido maslínico, se estudiaron varias proteínas claves de las rutas de inducción de apoptosis a distintos tiempos: 4h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h y con las dos concentraciones de ácido maslínico utilizadas para el resto de los ensayos, IC₅₀ e IC₈₀. De forma que el mecanismo secuencial, de acuerdo con los tiempos de inducción encontrados, quedó de la siguiente manera:

1. Entre las primeras 6h-12h de tratamiento se inducen altos niveles de JNK, estos alcanzan un máximo a las 12h, a continuación estos niveles disminuyen, aunque manteniéndose elevados, y terminan aumentando de nuevo hasta el final del tratamiento. Esta inducción también se da a la concentración de IC₅₀ pero en menor grado, no advirtiéndose el pico de inducción observado a la concentración de IC₈₀.



2. Los niveles de Bcl-2 descienden drásticamente desde el inicio del tratamiento manteniéndose en valores muy bajos hasta las 48h de tratamiento, a partir de las cuales se recuperan aunque encontrándose en todo momento por debajo del 80%. Este descenso ocurre tanto a la concentración de IC₅₀, como a la concentración IC₈₀ siendo más marcado a esta última concentración.
3. La activación de la caspasa-3, a la concentración de IC₈₀, ocurre desde las 6h a las 12h de tratamiento, manteniéndose en valores medios-bajos, amentando de forma exponencial a partir de las 48h de tratamiento hasta alcanzar el máximo de inducción tras las 72h. A la concentración de IC₅₀, hay también un aumento inicial menos acentuado, el cual parece descender a continuación, recuperándose a partir de las 24h de incubación hasta el final del tratamiento.
4. El citocromo-c citoplasmático presenta un máximo de inducción muy elevado a las 24h de tratamiento, éste disminuye drásticamente hasta niveles bastante más bajos aunque por encima del control a las 48 h de tratamiento. A la concentración de IC₅₀, también existe cierta liberación de citocromo-c citoplasmático, pero dada la intensidad de la banda correspondiente a la concentración de IC₈₀, no se ve reflejada de forma adecuada en la gráfica. Este incremento en los niveles de citocromo-c también se observa a la concentración de IC₅₀, incremento que disminuye en función del tiempo, pero de forma mucho más gradual, siendo, en este caso, mucho menores los niveles alcanzados a los que se obtuvieron a la concentración de IC₈₀.
5. La activación de la caspasa-9 ocurre a las 12h-24h de tratamiento, previamente a la activación de la caspasa-8 y a la elevación significativa en los niveles de caspasa-3. Esta activación está en consonancia con los tiempos de liberación de citocromo-c encontrados, manteniéndose incluso incrementos hasta el final del tratamiento.
6. Durante las 12h a 24h de tratamiento a IC₈₀, los niveles de Bid descienden, llegando a un mínimo que parece estabilizarse a las 48h y que se mantiene hasta las 72h. A la concentración de IC₅₀ se observa también un descenso paralelo, pero menos acentuado.
7. A las 12h-24h de tratamiento se induce la expresión de p53. Los niveles de esta proteína a la concentración IC₈₀ se mantienen constantes durante las 24-48h de tratamiento, sufriendo un incremento exponencial a partir de las 48h y hasta el final del mismo. A la concentración IC₅₀, estos niveles también se incrementan manteniéndose constantes desde las 24h y hasta el final del tratamiento, estando incluso por encima de los valores encontrados para IC₈₀ durante las 24h-48h de tratamiento.



8. Los niveles de Bax también se ven incrementados a partir de las 12h-24h de tratamiento y siguen incrementándose de forma tiempo dependiente alcanzando niveles muy elevados al final del tratamiento. Este comportamiento ocurre tanto a IC₈₀ como a IC₅₀, siendo estos niveles algo menores a esta última concentración.
9. Respecto a la activación de la caspasa-8, ésta tiene lugar a partir de las 48h-72h de tratamiento, incrementándose hasta el final del mismo de forma exponencial. Este incremento se observa tanto a la concentración IC₈₀, como a la concentración IC₅₀, aunque con valores inferiores.
10. Por último, en los niveles de caspasa-7 sólo se observa un drástico incremento exponencial a las 72h de tratamiento, tanto a la concentración IC₈₀ como a la IC₅₀. Siendo por tanto, junto con la activación de la caspasa-8, uno de los procesos finales dentro del mecanismo propuesto.

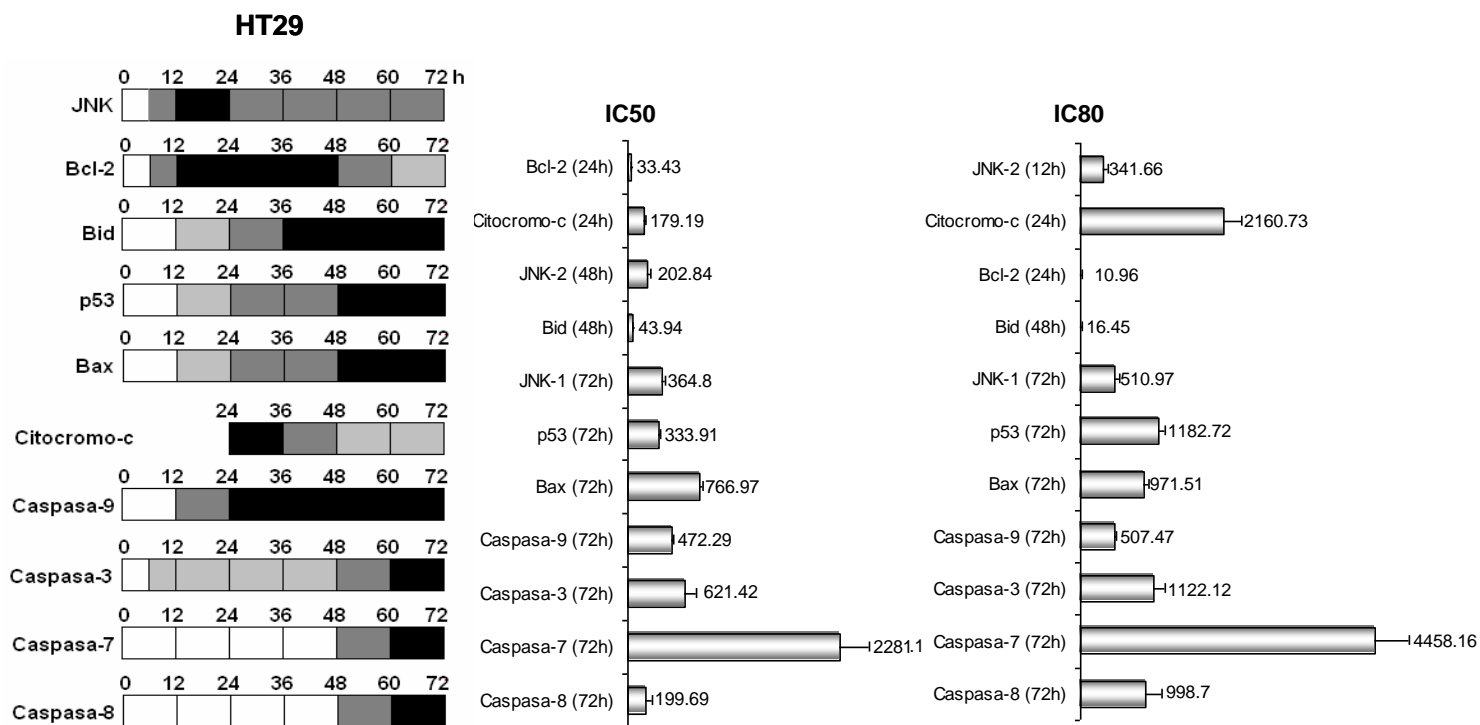
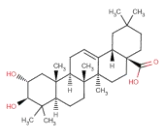


Figura 10.7 (Izquierda) Variación en los porcentajes de activación o inhibición (Bcl-2, Bid) en células HT29, encontrados para cada una de las proteínas apoptóticas ensayadas en función del tiempo de incubación con el ácido maslínico. (Derecha) Porcentajes máximos de activación o de inhibición encontrados para cada una de las proteínas apoptóticas ensayadas a las concentraciones de ácido maslínico IC₅₀ e IC₈₀, en la línea tumoral HT29.

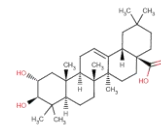


Todo este proceso se puede resumir en la **figura 10.7**, en el que los niveles en gris están en relación con el porcentaje de activación o de inhibición (en el caso de Bcl-2 y Bid) encontrados para cada proteína. A la vista de todos los resultados, podríamos caracterizar el mecanismo molecular de inducción de apoptosis por parte del ácido maslínico en la línea tumoral HT29, según la siguiente ruta o vía de señalización molecular (**figura 10.8**).

En primer lugar, el ácido maslínico activa de forma casi inmediata la proteína JNK, entre las 6h y 12h de tratamiento, la activación de esta proteína suele suceder, como ya ha sido descrito, a través de un receptor de membrana tipo Fas, TNFR1 o NTR. JNK fosforila y regula la actividad de varios factores de transcripción entre los que se encuentra p53 (**Karin, 1995; Davis, 2000; Chang y Karin, 2001; Lin, 2003**). Por tanto, tras su activación JNK puede inducir directamente la activación de p53, que como muestran nuestros resultados se activa a partir de las 12h-24h de tratamiento. La activación de la proteína p53 por JNK se produce mediante la fosforilación en el residuo Ser 6 (**Oleinik, 2007**). **Fuchs y col.** en **1998**, mostraron que JNK puede también regular a p53 de forma no activa, la asociación de JNK y p53 le confiere a p53 unido una mayor vida media. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de JNK puede inhibir el arresto del ciclo celular inducido por p53, promocionando la apoptosis inducida por esta proteína. (**Shaulian y col., 2000; Lin y col., 2002**).

p53 actúa de forma sinérgica con el proceso iniciado por JNK inhibiendo la expresión de Bcl-2 y aumentando la expresión de Bax. Además, la activación de p53 podría estar relacionada con los fenómenos de arresto del ciclo celular y diferenciación observados en la línea HT29. Se ha sugerido que p53 puede jugar un importante papel en la reparación del DNA, llegando a poseer incluso una función como punto de control del ciclo celular (**Lee y Bernstein 1993**), de forma que impide la división celular si existe daño en el DNA. p53 impide la progresión del ciclo celular gracias a la activación del gen WAF1/CIP1 (p21) la cual produce finalmente la inhibición de las quinasas dependientes de ciclinas (**El-Deiry y col., 1993; Harper y col., 1993**). **Bunz y col.** en **1998**, demostraron que este arresto está mediado por p21 (inhibidor de quinasas dependiente de ciclina) cuya transcripción es dependiente de p53.

La marcada inducción de los niveles de p53 provocada por el tratamiento con el ácido maslínico, en la línea tumoral HT29, podría explicar el importante arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ observado en esta línea. Arresto que podría relacionarse con la estimulación de la diferenciación celular. En las líneas tumorales con p53 inactivo, como ocurre en las células Caco-2, estas rutas podrían ser defectuosas, impidiendo el transcurso de tales fenómenos, arresto celular y diferenciación. Aunque como ya se ha comentado, las células Caco-2 son



capaces de diferenciarse espontáneamente cuando llegan a la confluencia, esta diferenciación debe ocurrir a través de otros mecanismos y no por el arresto celular inducido por p53 ya que esta línea celular carece de su funcionalidad, lo que se ve reflejado en un menor arresto del ciclo celular en esta línea. Además los distintos estudios sobre el arresto en ciclo celular inducidos por el ácido maslínico sobre estas líneas fueron realizados con unos porcentajes de confluencia próximos al 50% en el caso de la IC₅₀ y al 20% en el caso de IC₈₀. De forma que cuando el ácido maslínico ejerce su efecto citotóxico, las células Caco-2 entran directamente en apoptosis sin ser ralentizadas por el proceso de diferenciación observado en la línea celular HT29.

JNK regula además la activación de otros factores de transcripción como Elk-1 y c-Myc (Karin, 1995; Davis, 2000; Chang y Karin, 2001; Lin, 2003) cuya fosforilación ocurre dentro de su dominio de activación NH₂-terminal, incrementando su actividad transcripcional. JNK puede además regular la actividad de otros factores de no transcripción como son las proteínas miembro de la familia de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bim y Bad) (Maundrell y col., 1997; Yamamoto y col., 1999; Yu y col., 2004), esta regulación se produce en respuesta a gran variedad de estímulos extracelulares.

Nuestros resultados muestran que la inducción de la actividad JNK, en respuesta a la exposición del ácido maslínico podría actuar, además, sobre los niveles de las proteínas apoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, ya que estos niveles se ven claramente afectados por la incubación con nuestro compuesto. Los niveles de Bcl-2 descienden drásticamente entre las 6h-12h de tratamiento manteniéndose en valores muy bajos hasta las 48h, a partir de las cuales comienzan a elevarse. Esta modulación de la actividad Bcl-2 mediante fosforilación por JNK ha sido ampliamente descrita (Lei y col., 2000). Por otro lado, la fosforilación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bcl-2 y Bcl-xL da lugar a su inactivación.

En respuesta a agentes genotóxicos, las proteína quinasas activadas por estrés, SAPK o JNK, se translocan a la mitocondria y fosforilan a Bcl-2 y a Bcl-xL, provocando su inactivación y la inducción de apoptosis (Maundrell y col., 1997; Yamamoto y col., 1999; Fan y col., 2000, Kharbanda y col., 2000; Deng y col., 2001). Todo esto es consistente con nuestros resultados según los cuales la expresión de JNK inducida por el ácido maslínico causa un incremento en la fosforilación de Bcl-2, siendo posible que la inhibición de Bcl-2 por JNK medie en la apoptosis inducida por nuestro compuesto. Además, la disminución de los niveles de Bcl-2 por la actividad del ácido maslínico, también puede estar relacionada con la activación de p53. Esta proteína ha mostrado tener actividad represora sobre la transcripción de Bcl-2.

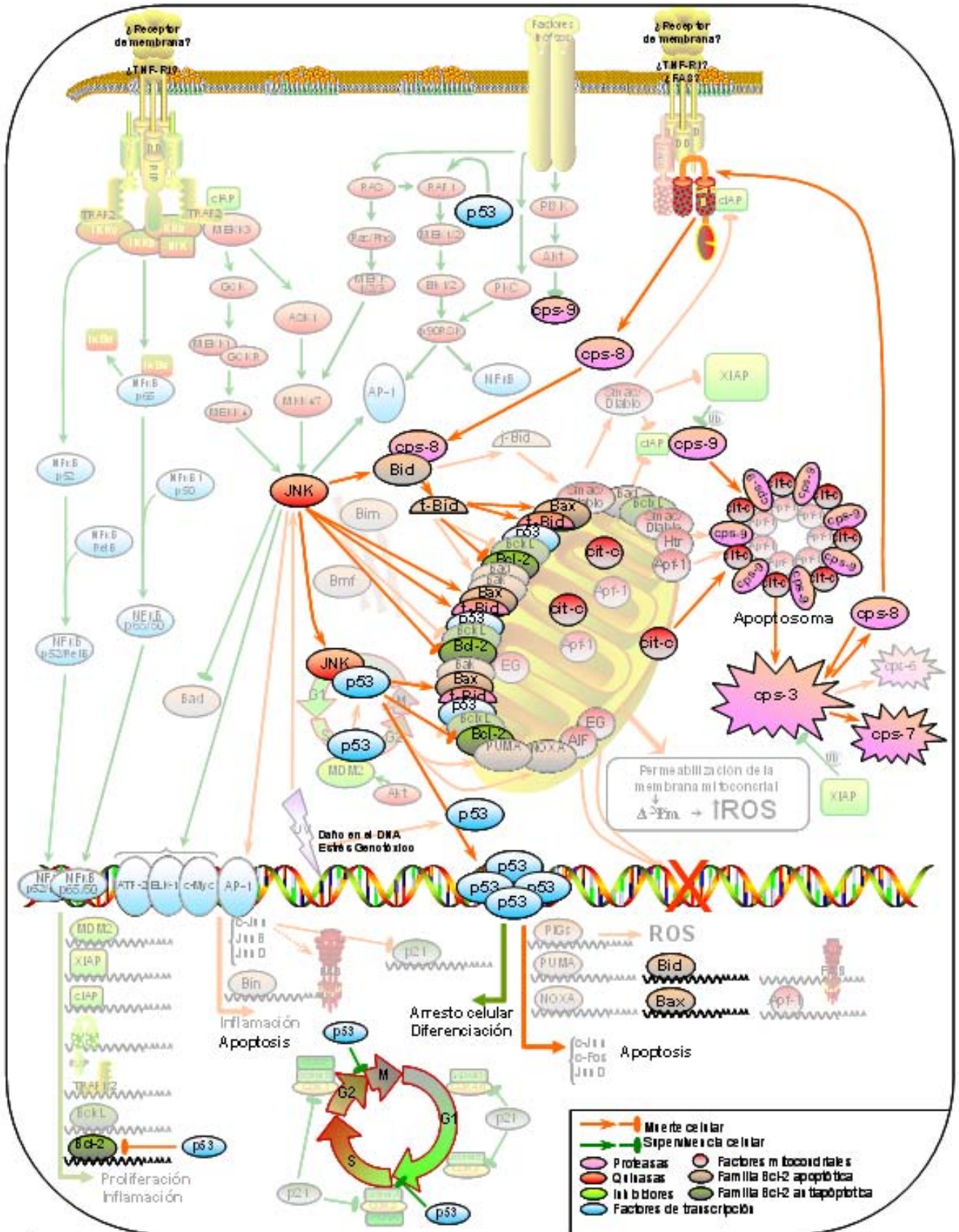
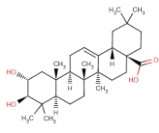
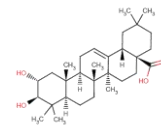


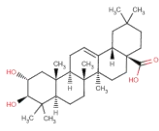
Figura 10.8 Ruta de inducción de apoptosis propuesta en el mecanismo de acción del ácido maslínico sobre la línea tumoral HT29. En el esquema aparecen resaltadas cada una de las proteínas apoptóticas ensayadas, así como las vías de señalización en las que intervienen.



Por otra parte, **Mihara y col.** en **2003** demostraron la inhibición directa de la proteína Bcl-2 por la formación de complejos con p53. **Chips y col.**, (**2004**), encontraron que la translocación citosólica de p53 era suficiente para inducir apoptosis, de forma que p53 inhibe directamente Bcl-2 y activa Bax en ausencia de otras proteínas, permeabilizando la mitocondria. Otra proteína que induce directamente la inhibición de Bcl-2 y la activación de Bax, es Bid activa o t-Bid. En las rutas clásicas de inducción de apoptosis t-Bid se transloca del citoplasma a la mitocondria donde ejerce su efecto proapoptótico inhibiendo Bcl-2 y estimulando la oligomerización de Bax. Es probable que en el control de la inhibición de Bcl-2 intervengan en cierta medida cada uno de estos factores. La proteína proapoptótica Bax, de la familia Bcl-2, también ve sus niveles claramente afectados por el tratamiento con el ácido maslínico. Los niveles de Bax se incrementan a partir de las 12h-24h de tratamiento y continúan elevándose hasta final del tratamiento. Se ha descrito que los niveles de Bax también pueden ser controlados por la actividad JNK. De forma que JNK activo fue incapaz del causar la muerte en células deficientes en proteínas de la subfamilia proapoptótica de Bcl-2 o subfamilia Bax. Además la translocación de Bax no se observa en células JNK-deficientes expuestas a estrés (**Lei y col.**, **2002**). Más aún los fibroblastos Bax^{-/-} y Bak^{-/-} son resistentes a la apoptosis inducida por JNK (**Lindstein y col.**, **2003**). p53 también podría intervenir en regulación de la actividad de Bax, actuando a varios niveles, por un lado siendo capaz de desencadenar activación transcripcional de Bax (**Sykes y col.**, **2006**), y por otro, interaccionando directamente con Bax provocando su oligomerización. (**Chipuk y col.**, **2004**).

Se ha descrito que la estimulación del proceso de apoptosis celular dependiente de JNK media, presumiblemente, a través de la activación proteolítica del dominio BH3 de la proteína Bid (**Deng y col.**, **2003**), generando un fragmento de Bid activo, γ Bid, distinto al generado por la acción de la caspasa-8, t-Bid. Según los autores que describen este mecanismo, cuando γ Bid llega a la mitocondria, promueve exclusivamente la liberación de Smac/Diablo y no de citocromo-c, a continuación, Smac/Diablo actúa inhibiendo la interacción entre cIAP y la caspasa-8, activando esta última. Por otra parte, se ha publicado que fibroblastos deficientes en JNK exhiben defectos en el procesamiento y activación independiente de caspasas y de Bid (**Tournier y col.**, **2000**). Sin embargo, fibroblastos Bid^{-/-} no corroboran el papel de la activación directa de Bid en la apoptosis inducida por JNK.

Nuestros resultados en las células HT29 mostraron un claro descenso de los niveles de Bid a las 12h-24h de tratamiento, llegando hasta un mínimo que se mantuvo hasta las 72h, sin embargo, no muestran la liberación del fragmento activo γ Bid o tBid, lo que puede deberse al bajo peso

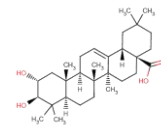


molecular de estos fragmentos al poder ser rápidamente degradados por lo que no son fácilmente detectables. Además, en nuestros ensayos encontramos un incremento muy importante en los niveles citoplasmáticos de citocromo-c, lo que es, sin duda, contradictorio con el mecanismo formulado en la apoptosis mediada por β Bid. Por último, la activación de la caspasa-8 no fue detectada hasta el final del tratamiento, sugiriendo que esta activación ocurre como respuesta a la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7.

Por otro lado, **Sax y col.**, en **2002**, presentaron las evidencias de que Bid es una de las proteínas que regulan las dianas de p53, mediando su inducción y procesamiento en la apoptosis inducida por p53. Además, una consideración a tener en cuenta en la expresión de JNK en respuesta a la exposición al ácido maslínico en células HT29, fue que en un primer momento, durante las primeras 4h-6h de tratamiento, los niveles de JNK se vieron claramente inhibidos. Este hecho, aunque en principio pueda ser contradictorio, ha sido ampliamente reflejado en la bibliografía de la apoptosis inducida a través de la ruta JNK. Cuando la activación de la ruta apoptótica mediada por JNK es transitoria, se induce también la activación del factor de transcripción NF- κ B (que como se sabe es capaz de mediar en las rutas de supervivencia celular) bloqueando la inducción de la apoptosis e inhibiendo incluso los niveles de JNK.

Por otra parte, si la activación de esta ruta es prolongada, la señal de NF- κ B queda relegada, promoviéndose la finalización de la apoptosis mediada por JNK, a través de la inactivación de los supresores de la ruta mitocondrial apoptótica (**Karin y Lin, 2002; Tang, 2002; Lin, 2003**). Tras la permeabilización de la membrana mitocondrial inducida a través de la inducción o inhibición, según el caso, de las proteínas de la familia Bcl-2, se produce una importante liberación de citocromo-c al citosol, esto ocurre de una forma drástica tras las 24h de tratamiento. El citocromo-c liberado al citosol constituye una importante señal apoptótica.

El citocromo-c tras ser liberado forma un complejo con las proteínas adaptadoras Apaf-1, las cuales en presencia de ATP/dATP movilizan y activan a la procaspasa-9, formando el denominado apoptosoma. Nuestros resultados muestran una fuerte activación de la caspasa-9 a las 12-24h de tratamiento con ácido maslínico, de forma previa a la activación de la caspasa-8 y a la elevación significativa de los niveles de caspasa-3. A continuación, la caspasa-9 activa a la caspasa-3, que como ya se ha comentado es la principal caspasa efectora, los niveles de caspasa-3 se mantienen e incluso aumentan llegando a sus valores más altos a las 72h de tratamiento. En este momento, inducida por la actividad caspasa-3 se produce la activación de las caspasas efectoras 7 y 8. La caspasa-8 aunque es una caspasa iniciadora también



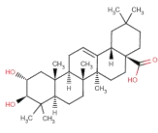
posee cierta actividad efectora como ya se ha comentado. Probablemente, esta activación de la caspasa-8, al final del proceso, responda a un mecanismo de retroalimentación para reforzar la señal apoptótica. Se ha descrito que en hepatocitos, la caspasa-8 no es activada al inicio de la apoptosis, reservando la actividad caspasa-8 para el final ya que es necesaria para la amplificación de la señal apoptótica inducida a través de la ruta mitocondrial (**Wen-Xing y Xiao-Ming, 2004**).

Finalmente, todo el proceso culmina con un importante y significativo incremento en los niveles de caspasa-7 tras las 72h de tratamiento. Quedando por tanto activas las caspasas efectoras 3, 7 y 8, proteínas responsables de la mayoría de los fenómenos apoptóticos observados. A partir de todos estos datos podemos concluir que el ácido maslínico induce la activación de apoptosis a través de una ruta mitocondrial, estando la permeabilización de la mitocondria inducida de forma sinérgica por todos los factores estudiados durante las primeras 24h de tratamiento.

Rutas similares han sido descritas en la inducción de apoptosis en células de tipo II donde la activación de las caspasas claves es débil y la señal apoptótica debe ser amplificada por el entrecruzamiento con la ruta mitocondrial intrínseca. (**Peter y Kramer, 2003**). Hay fuertes evidencias que indican que la activación de JNK podría aumentar la apoptosis inducida en células de tipo II, por la activación prolongada de la ruta de la apoptosis inducida por TNF α (**Liu y col., 2002; Schwave y col., 2004**).

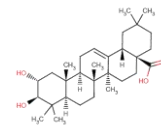
Mecanismo de apoptosis mediado por caspasa-8 y JNK en la línea tumoral Caco-2

El efecto anticancerígeno del ácido maslínico en las células Caco-2 fue bastante más marcado que sobre las células HT29, de forma que tras las 72h de tratamiento la mayor parte de la población celular se encontraba en un estadio de apoptosis tardía. Resultado claramente visible a partir de los ensayos de citometría de flujo por marcaje con anexina V-FICT e yoduro de propidio. Otros resultados que indicaban esta tendencia fueron la clara visualización de la escalera de DNA a la concentración de IC₅₀ en células Caco-2 respecto a las células HT29 y la mayor genotoxicidad mostrada por el ácido maslínico en esta línea. Al igual que en las células HT29 y con el objetivo de determinar a través de que ruta de señalización el ácido maslínico induce su efecto apoptótico en células Caco-2, se ensayaron varias proteínas claves en las rutas de activación de apoptosis a distintos tiempos (4h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h) de



incubación. Las concentraciones de ácido maslínico utilizadas fueron las IC_{50} e IC_{80} halladas en esta línea celular para 72h de incubación. De forma que el mecanismo secuencial, de acuerdo con los tiempos de inducción encontrados, queda como sigue:

1. En este caso, los resultados obtenidos muestran que en primer lugar se produce la activación de la caspasa-8. Esta activación ocurre de forma inmediata tras iniciar el tratamiento. A la concentración de IC_{80} , tras la inducción inicial, los niveles de caspasa-8 disminuyen a las 48h hasta el 200% respecto al control, quedando así hasta el final de tratamiento. Para la concentración de IC_{50} , estos niveles fueron también elevados al comienzo del tratamiento, aunque por debajo de los alcanzados a la concentración de IC_{80} , manteniéndose constantes a partir de las 24h con valores próximos al control hasta el final del tratamiento.
2. Al igual que ocurre con la caspasa-8, la activación de la caspasa-3 tiene lugar de forma inmediata justo tras comenzar el tratamiento. Siendo los niveles iniciales a la concentración IC_{80} muy elevados, disminuyendo de forma tiempo dependiente hasta las 72h. En cuanto a la concentración IC_{50} , los niveles de caspasa-3 también aumentaron respecto al control pero de forma más pausada, alcanzando el máximo de inducción tras las 24h de tratamiento y disminuyendo a las 48h hasta niveles próximos al control.
3. Los niveles de JNK a IC_{80} , como ocurrió en las células HT29, sufrieron cierta disminución tras el inicio del tratamiento alcanzando niveles próximos al 50% respecto al control a las 4h de tratamiento, aumentando bruscamente a continuación llegando hasta un máximo próximo al 235% a las 6h de tratamiento, disminuyendo de nuevo hasta las 24h de tratamiento y aumentando de forma exponencial a partir de este momento. Los niveles encontrados a IC_{50} se incrementaron de forma más gradual produciéndose un pico de inducción a las 24h de tratamiento, manteniéndose elevados hasta el final del mismo.
4. En este caso, a diferencia con HT29, los niveles de t-Bid (Bid truncado) fueron identificables encontrándose elevados desde el inicio del tratamiento, siendo superiores en todo momento a la concentración de IC_{80} respecto a la concentración de IC_{50} . El máximo de inducción no se alcanzó hasta las 24h de tratamiento a la concentración de IC_{80} y hasta las 12h de tratamiento en el caso de la concentración de IC_{50} . Tras alcanzar este máximo los niveles disminuyeron, estando próximos a los encontrados en el control a partir de las 48h de tratamiento.



5. Respecto a los niveles de la proteína Bcl-2, existe una clara inhibición que comienza desde el principio del tratamiento con el ácido maslínico. Esta inhibición llega a su nivel mínimo a las 12h-24h de tratamiento, tanto a la concentración IC₈₀ como a la concentración correspondiente al 50% de inhibición, aumentando de nuevo a partir de las 24h de tratamiento y estabilizándose a partir de este momento, quedando en todo momento por debajo de los valores controles, en torno a un 70%, a la concentración IC₈₀ y aproximándose a los niveles encontrados en el control de células sin tratar a la concentración IC₅₀.
6. Los niveles de caspasa-9 se incrementan de forma drástica entre las 4h y 6h de tratamiento llegando a su máximo de activación a las 12h-24h para la concentración de IC₈₀, y en torno a las 12h para la concentración de IC₅₀. A continuación, estos niveles disminuyen llegando a ser próximos a los encontrados en el control tras las 72h de tratamiento. A la concentración de IC₅₀ estos niveles se mantienen por debajo en todo momento respecto a la concentración de IC₈₀.
7. Por último, se observó un repentino incremento de los niveles de Bax a las 24h de tratamiento. Los niveles de esta proteína permanecieron sin gran variación respecto del control durante las primeras 12h. A continuación de las 12 a 24h se observa una activación considerable que disminuye de nuevo a las 48h de tratamiento, quedando algo por encima de los niveles control tras las 72h. A diferencia de los casos anteriores esta activación pareció ser mayor a la concentración de IC₅₀ respecto a la encontrada a la concentración de IC₈₀, aunque las diferencias observables en la respuesta entre estas dos concentraciones no fueron significativas.

El proceso de inducción de todas estas proteínas puede ser resumido en el siguiente gráfico en el que los niveles de gris están en relación con los porcentajes de activación o inhibición (para el caso de Bcl-2) encontrados en cada proteína (**figura 10.9**). A la vista de estos resultados podemos exponer el mecanismo molecular que desencadena la inducción de la apoptosis producida por el ácido maslínico en la línea tumoral de colon Caco-2 (**figura 10.10**).

Una de las diferencias substanciales encontradas en este mecanismo de inducción de apoptosis sobre células Caco-2, con respecto al mecanismo caracterizado en las células HT-29, es la rapidez con la que tiene lugar todo el proceso, llegando a disminuir los niveles de las proteínas inducidas en muchos casos entre las 24h-48h de tratamiento. Mientras que en las células HT29 estos niveles continuaron aumentados hasta el final del tratamiento.

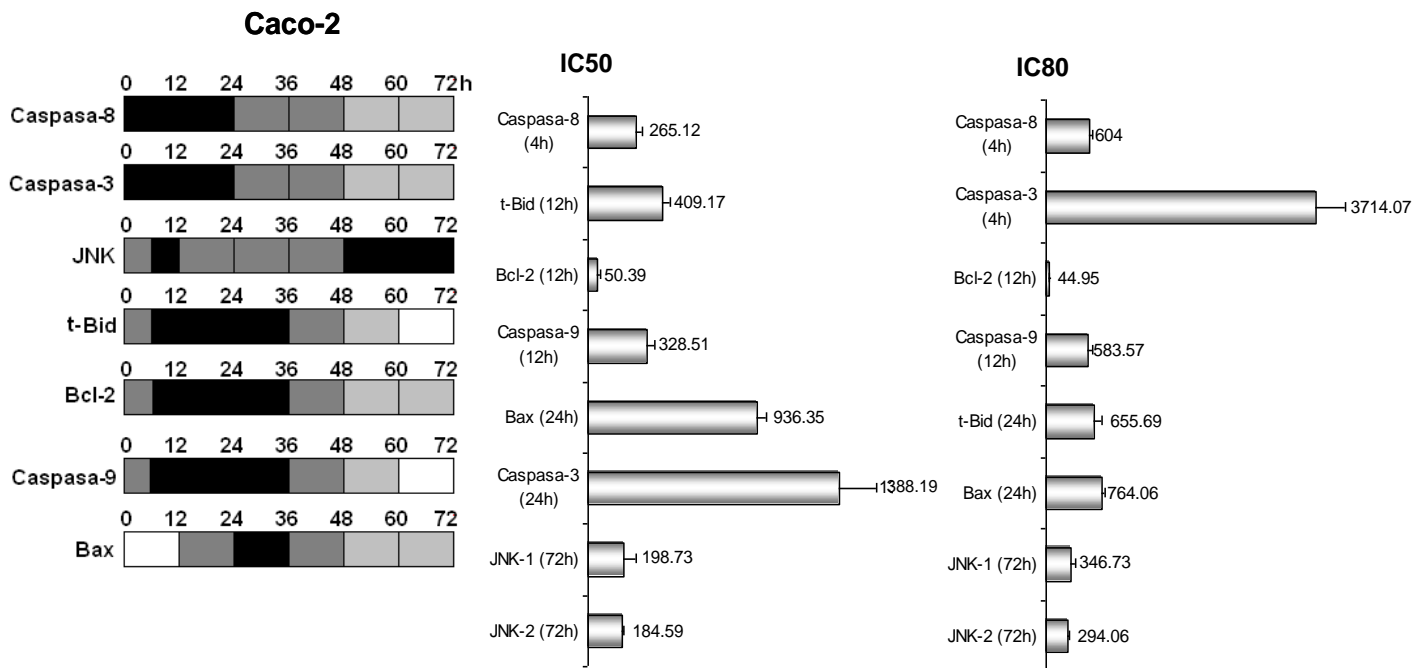
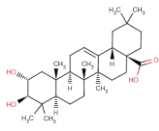
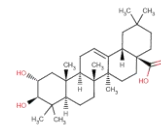


Figura 10.9 (Izquierda) Variación en los porcentajes de activación o inhibición (por %) en células Caco-2, encontrados para cada una de las proteínas apoptóticas ensayadas en función del tiempo de incubación con el ácido maslínico. (Derecha) Porcentajes máximos de activación o de inhibición encontrados para cada una de las proteínas apoptóticas ensayadas a las concentraciones de ácido maslínico IC₅₀ e IC₈₀ en la línea tumoral Caco-2.

El primer paso de este mecanismo de inducción apoptótica es la activación inmediata de la caspasa-8 tras la exposición de la línea tumoral a las distintas concentraciones de ácido maslínico, de forma súbita se alcanzan los niveles más altos de caspasa-8 y caspasa-3 en las primeras horas de tratamiento. Esta inducción directa de la caspasa-8, ha de producirse a través de un receptor de membrana tipo Fas o TNFR1, en este caso, descartamos la inducción indirecta de la caspasa-8 por la caspasa-3 debido a la pronta inducción de esta proteína en estas condiciones.

En este mecanismo, la activación de la caspasa-8 ocurre de forma inmediata. Simultáneamente ocurre la activación de JNK, por lo que podemos descartar el mecanismo propuesto por **Deng y col., (2003)**. Estos autores asumen que el fragmento activo γ Bid, producido por la acción de JNK sobre Bid, libera a la proteína Smac que posteriormente inhibe la unión cIAP-caspasa-8, activando a esta última. A continuación, y de forma casi simultánea a la activación de la caspasa-8, tiene lugar un considerable aumento en la expresión de la caspasa-3 que alcanza muy rápidamente sus niveles más altos. Esta activación inmediata de la caspasa-3 es típica de un mecanismo a través de receptor de membrana. Nos encontramos, por tanto, ante un mecanismo análogo a la ruta extrínseca clásica de inducción de apoptosis.



De manera algo más pausada, pero también durante las primeras horas de tratamiento se incrementan los niveles de p-JNK, t-Bid, Bcl-2 y caspasa-9. La inducción de estas proteínas ocurre por varios mecanismos que se superponen amplificando en gran medida la señal apoptótica. Aunque en este tipo de mecanismo, en el que la activación de caspasa-8 es la responsable del inicio del proceso apoptótico, el rápido incremento en los niveles de caspasa-8 es suficiente para la activación de la caspasa-3.

Por otro lado, el mismo receptor de membrana, fundamentalmente del tipo TNFR-1 o incluso de tipo Fas, además, de incrementar significativamente los niveles de caspasa-8, es capaz de inducir un aumento en los niveles de JNK, lo que ha sido claramente observado sobre la línea celular Caco-2. Estos resultados unidos a aquellos obtenidos sobre la línea HT29, nos hace pensar que nos encontramos ante un mecanismo mediado por receptor de membrana del tipo ya mencionado.

Los altos niveles de caspasa-8 inducen la activación proteolítica de Bid pasando a t-Bid. También ha sido descrita la activación de Bid por JNK aunque en menor grado que la producida por caspasa-8. De forma simultánea JNK y la acción directa de t-Bid son capaces de inhibir Bcl-2. Por último, se observa una clara activación de Bax a las 24h de tratamiento, que contribuye a la permeabilización de la membrana mitocondrial.

Esta activación está probablemente inducida por t-Bid, proteína que induce la oligomerización de la proteína Bax de acuerdo con **Roucou y col, (2002)**. Esta oligomerización también puede ser promovida por la acción de JNK a través de los mecanismos comentados en el capítulo 3 de la introducción. No pudiendo, por tanto, ser promovida por p53 ya que la línea Caco-2 es proteína p53 deficiente. A continuación, tanto t-Bid, como la inhibición de Bcl-2 y activación de Bax, inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial, lo que finalmente provoca la liberación del citocromo-c mitocondrial al citoplasma. También, no obstante, ha sido descrita por otros autores la liberación directa de citocromo-c al citoplasma en respuesta a la acción de t-Bid (**Li y col., 1998**).

Este aumento de los niveles citoplasmáticos de citocromo-c inducen rápidamente la activación de la caspasa-9 mediada por la formación del complejo del apoptosoma (formado por el citocromo-c citoplasmático, la proteína Apaf-1 y la caspasa-9). Esta activación auxiliar del mecanismo de inducción de apoptosis mitocondrial contribuye a la señal apoptótica inicial potenciándola. Estos resultados explican que los procesos apoptóticos descritos en el resto de los ensayos tengan lugar en un tiempo inferior al observado en la línea celular HT29.

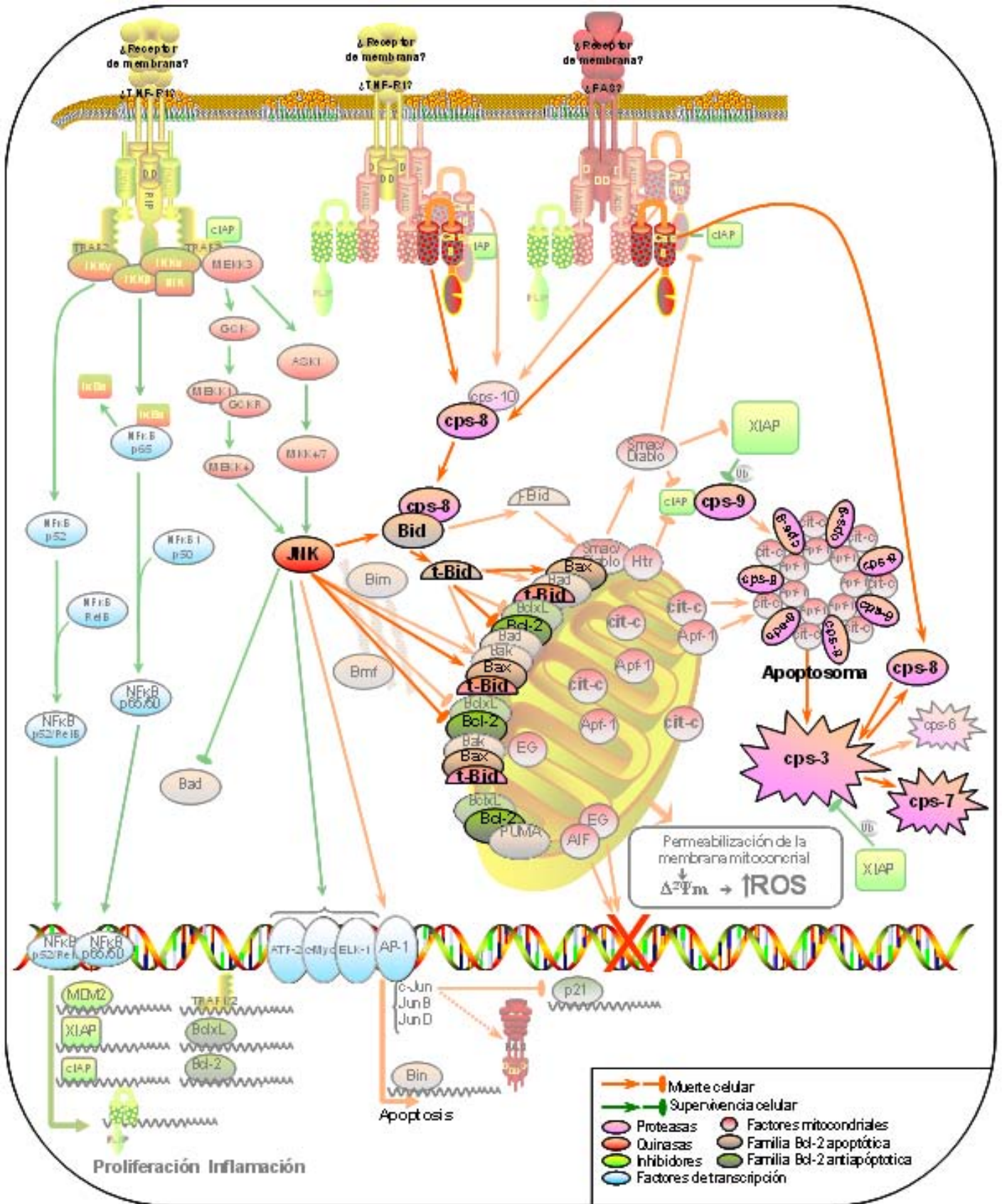
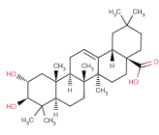
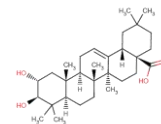


Figura 10.10 Ruta de inducción de apoptosis propuesta en el mecanismo de acción del ácido maslínico sobre la línea tumoral Caco-2. En el esquema aparecen resaltadas cada una de las proteínas apoptóticas ensayadas, así como las vías de señalización en las que intervienen.



A la rapidez de este mecanismo también contribuye la no expresión de p53 por parte de las células Caco-2. Como se ha comentado para el caso de HT29, p53 no sólo incrementa los niveles de proteínas apoptóticas sino que induce la reparación del DNA nuclear arrojando a la célula en la fase G0/G1 e induciendo su diferenciación. La recuperación de las células Caco-2 de la genotoxicidad inducida por el ácido maslínico, aunque significativa fue bastante más pausada y el daño genotóxico producido por el ácido maslínico a las 24h de tratamiento fue muy superior al observado en HT29.

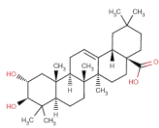
Mecanismo de apoptosis propuesto en líneas tumorales de cáncer de colon HT29 y Caco-2

Podemos decir que la activación de JNK y/o caspasa-8 en algunos casos, así como la inducción de la permeabilidad mitocondrial en otros, son eventos que han sido observados de una forma u otra en la inducción de apoptosis por la mayoría de los compuestos triterpénicos. Según nuestros resultados la inducción de apoptosis a través de un mecanismo u otro va a depender en gran medida del compuesto ensayado, así como de la línea tumoral empleada.

De forma, que no podemos afirmar que la activación de JNK sea indispensable para la inducción de apoptosis por el ácido maslínico en las células Caco-2, ya que dado los elevados niveles iniciales de caspasa-8, probablemente no sea así, aunque JNK aparece en esta línea claramente activo durante el proceso apoptótico inducido por este producto.

Sin embargo, en las células HT29 la inducción de JNK es una pieza clave en el mecanismo de apoptosis propuesto, siendo necesaria para la activación de los factores mitocondriales que, finalmente, desencadenan la permeabilización de la membrana mitocondrial y la activación de las principales caspasas efectoras. El papel que juega la mitocondria en el mecanismo de acción de otros triterpenos también ha sido clave para la inducción de sus efectos apoptóticos, como parece ocurrir con el ácido maslínico.

Nosotros proponemos un mecanismo de inducción de apoptosis mixto entre el encontrado en células HT29 y el hallado en células Caco-2, basado en las observación experimental objetiva. En este mecanismo la apoptosis desencadenada por el ácido maslínico mediaría a través de receptor de membrana tipo TNFR, Fas o TRAIL, capaz de inducir apoptosis por medio de cualquiera de estas dos vías, activando la apoptosis bien directamente a través de la caspasa-8 o a través de un mecanismo más complejo mediado por la activación de JNK.

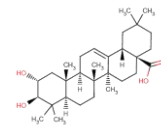


Tras la activación de este receptor tendría lugar la inducción de la actividad JNK o de la caspasa-8 según el caso. La activación de JNK induciría la activación de factores de transcripción tales como p53, o NF- κ B. Lo que en el caso de las células HT29 retrasaría el mecanismo de inducción de apoptosis por un intento de supervivencia celular, diferenciación y de recuperación de la genotoxicidad. La probable activación del factor de transcripción NF- κ B durante los primeros momentos del tratamiento podría explicar los resultados encontrados por otros autores en los que describen al ácido maslínico como inductor en la liberación de citoquinas (**Márquez-Martín y col., 2006a; Márquez-Martín y col., 2006b**).

Ya que, tanto NF- κ B como JNK, a través de la inducción del complejo de transcripción AP-1, están directamente implicados en la inducción de las rutas de inflamación clásicas, la inducción de estas rutas podría entenderse en principio contradictoria con el papel proapoptótico del ácido maslínico, ya que NF- κ B también es inductor de proliferación celular. Cuando esto ocurre, las proteínas expresadas en respuesta a este factor de transcripción son capaces de inhibir la apoptosis inducida a través de JNK, llegando a disminuir incluso los niveles de esta proteína. Esta posible activación de las rutas proliferativas podría explicar, al menos en parte, la hipertrofia y/o hiperplasia celular, observada por la acción *in vivo* del ácido maslínico sobre animales (**Fernández-Navarro y col., 2006**).

Nuestros resultados muestran que la inhibición de JNK realmente ocurre, pero sólo durante las primeras horas de tratamiento. Se ha descrito que la activación de este mecanismo mediado por JNK desencadena este efecto proliferativo y, por tanto, antiapoptótico siempre que el estímulo desencadenante no sea continuado. De forma que en un primer momento se activarían tanto las rutas anti-proliferativas, como las pro-proliferativas y/o pro-inflamatorias. Si el estímulo no es continuado, estas últimas rutas se impondrían sobre las primeras evitando la entrada en apoptosis de la célula. Por el contrario, si este estímulo es continuado el mecanismo proapoptótico se impondría, induciendo la muerte celular.

En el caso que se produjera una activación directa de la caspasa-8 con la suficiente firmeza como para imponerse sobre la activación de JNK y/o NF- κ B, (lo cual dependería del tipo de línea celular, concentración y tiempo de incubación), el efecto de esta caspasa se superpondría sobre los procesos desencadenados por JNK, sumándose y haciendo que la señal apoptótica quedase reforzada. Además, la caspasa-8 puede activar directamente a la caspasa-3, induciendo de forma directa la entrada en apoptosis celular. Ya sea por la inducción de JNK o de la caspasa-8, finalmente se implicarían las actividades de las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 (Bid, Bcl-2 y Bax), lo cual originaría la permeabilización de la membrana

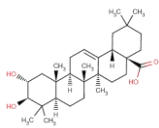


mitocondrial, formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9. Esta proteína activaría a su vez a la caspasa efectora 3, la cual podría activar a otras caspasas efectoras como la caspasa-7 y en su caso, incluso, podría activar a la caspasa-8, reforzando la señal apoptótica inicial.

El hecho diferencial más importante en el mecanismo propuesto respecto a las líneas tumorales HT29 y Caco-2 es la activación directa o no de la caspasa-8, lo que conllevaría a la activación directa de la caspasa-3 como ocurre en la línea celular Caco-2 y aceleraría la inducción del proceso de apoptosis. Sin embargo, si esta activación queda en cierta forma postergada como en el caso de HT29, la activación de JNK desencadenaría por una parte los mecanismos de supervivencia celular controlados por NF- κ B y por otra los mecanismos de diferenciación controlados por la proteína p53. Estos mecanismos de supervivencia y diferenciación, intentarían rescatar a la célula de la genotoxicidad inducida por el ácido maslínico, retrasando finalmente la inducción de apoptosis como ocurre en el caso de las células HT29.

Se han descrito mecanismos análogos al menos en parte, para sustancias similares al ácido maslínico, así Ikeda y col., en 2003 describieron como el CDDO (2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico), inducía apoptosis mediada por la activación de JNK en células de leucemia U-937, incrementando los niveles de ROS (lo que indica un incremento en la permeabilidad mitocondrial). Resultados similares se han encontrado con el tratamiento de derivados del CDDO como el C-28 metil éster (CDDO-Me), mostrando el siguiente mecanismo secuencial de inducción de apoptosis: a) activación de JNK; b) activación de caspasa-8; c) pérdida del potencial de membrana mitocondrial; d) liberación de citocromo-c; y, por último, e) activación de caspasa-3 (Kim y col., 2002). Zou y col., en 2004 describieron como el CDDO-Me indujo apoptosis vía JNK mediada por receptores de muerte celular (DR, *death receptor*) en células de cáncer de mama.

Por otro lado, CDDO combinado con TNF causó un dramático incremento de la apoptosis en células de leucemia ML-1 (Stadheim y col., 2002) asociada con la secuencia activación de caspasa-8, activación de Bid, translocación de Bax, liberación de citocromo c, finalmente, activación de caspasa-3. Experimentos con inhibidores demostraron que la caspasa-8 es el punto de iniciación de esta ruta. Mientras que TNF activa JNK de forma transitoria, el tratamiento con CDDO la activa de forma sostenida. Estos autores, afirmaron que la activación sostenida de JNK es pro-apoptótica, sin embargo, la inhibición de JNK no fue capaz de evitar la translocación de Bax o la liberación de citocromo c, en respuesta al tratamiento con CDDO, demostrando que su falta de implicación no inhibe la inducción de apoptosis sobre las líneas



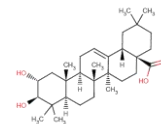
celulares utilizadas. Las diferentes evidencias disponibles indican que CDDO induce apoptosis, al menos en gran parte, por la activación de la ruta extrínseca mediada por caspasa-8 (Ito y col., 2000; Ito y col., 2001; Stadheim y col. 2002; Perderson y col., 2002). El mecanismo en el que se basa esta respuesta inducida por CDDO, sin embargo aún permanece desconocida. (Ikeda y col., 2003).

También se ha descrito, que el CDDO induce apoptosis en células deficientes tanto de caspasa-9 como de caspasa-8, sugiriendo, por tanto, un mecanismo de apoptosis independiente de caspasas. Células con sobreexpresión de Bcl-2 fueron marcadamente resistentes a la apoptosis inducida por CDDO. Más aún, CDDO provocó la liberación de citocromo-c en mitocondrias aisladas, sugiriendo que este producto es capaz de activar directamente la ruta intrínseca mitocondrial de apoptosis. (Konopleva y col. 2004).

Los siguientes eventos han sido propuestos con cierta frecuencia en los mecanismos de inducción de apoptosis por parte de los compuestos triterpénicos pentacíclicos: a) implicación de proteínas de la familia Bcl-2; b) inducción de apoptosis mediada por el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial; c) liberación de citocromo-c y AIF mitocondriales; d) con el resultado final de la activación de las caspasas 3 y 8. (Wick y col, 1999; Raghuvar y col. 2004; Gopal y col., 2005; Harmand y col., 2005).

Zuco y col., en 2002, recogieron una vía directa de alteración mitocondrial, formación de ROS, y la modulación de las proteínas Bcl-2 y Bax en la apoptosis inducida por el ácido betulínico, afirmando que esta muerte programada es independiente del estado de la proteína p53 y de sistemas ligando/receptores tales como CD95. Según estos autores, el tratamiento con betulínico sobre líneas de neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma y sarcoma de Ewing daba lugar a la aparición de factores apoptóticos tales como citocromo-c o AIF mitocondrial, por otro lado, la sobre-expresión de proteínas tales como Bcl-2 o Bcl-xL conferían resistencia a la apoptosis inducida por este producto (Zuco y col., 2002).

Ensayos llevados a cabo sobre líneas celulares de origen neuroectodérmico mostraron que el ácido betulínico induce un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, el cual ocurre gracias a la inhibición de la expresión de proteínas tales como Bcl-2 o Bcl-xL, este aumento de la permeabilidad activa, finalmente, a las caspasas y a otros marcadores de apoptosis (Fulda y col., 1998). Estos mismos autores afirman, posteriormente, que el ácido betulínico produce apoptosis a través de una vía directa de desorganización de la mitocondria (Fulda y Debatin, 2000). Por otra parte, los efectos antiproliferativos producidos por el ácido



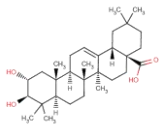
betulínico han sido asociados, también, con la inhibición de la topoisomerasa I y a la activación de las MAPK quinasas (**Chowdhury y col. 2002; Tan y col. 2003**). **Zou y col.** también describieron, en **2004**, la participación de la ruta de las MAPK quinasas (JNK) en el mecanismo de inducción de apoptosis en células de cáncer de pulmón y en células de leucemia por el ácido betulínico.

Kim y col. en **2000**, describieron la liberación de citocromo-c y la inducción de caspasa-3 por el ácido ursólico. **Anderson y col.** en **2003** estudiaron el efecto anticancerígeno del ácido ursólico sobre la línea celular HT29, describiendo la activación de las caspasas 9, 3 y 8. También se ha descrito la supresión por este triterpeno pentacíclico de la activación de NF- κ B en respuesta a TNF α , lo que prueba que este compuesto interfiere de alguna forma sobre esta vía. (**Shishodia y col., 2003**)

Por último, también se ha descrito la inducción de apoptosis por triterpenos pentacíclicos en células p53 deficientes (**Liebermann, Hoffman and Steiman, 1995**). Como es el caso de la inducción de apoptosis por el ácido betulínico en células de ovario A2780, p53 deficientes (**Zuco y col., 2002**) o la inducción de apoptosis por los derivados del 3 β -acetoxilupano con modificaciones oxidativas sobre el anillo E, siendo efectivos sobre líneas celulares con p53 mutado y/o pRb negativas (**Sarek y col., 2003**).

Todos estos resultados descritos en la bibliografía podrían explicarse a partir del mecanismo molecular propuesto independientemente del producto utilizado o de la línea celular empleada. Aunque para determinar la dirección de este mecanismo, así como la importancia relativa de cada una de las proteínas ensayadas en el mecanismo propuesto, sería necesaria la realización de nuevos ensayos con inhibidores específicos de cada una de estas proteínas y ampliar el estudio realizado sobre otras proteínas claves, como es el caso de NF- κ B.

De lo que no cabe duda es que todas las proteínas ensayadas ven afectados sus niveles intracelulares en presencia del ácido maslínico concluyendo con la inducción de apoptosis tanto sobre la línea tumoral HT29, como sobre la línea tumoral Caco-2. El mecanismo propuesto es uno de los pocos mecanismos de inducción de apoptosis que engloba los resultados referentes a todas las proteínas ensayadas, así como sus tiempos de activación y explica los resultados encontrados en el resto de los ensayos realizados.

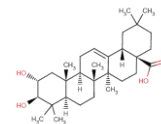


Capítulo 11

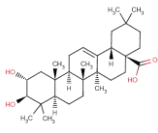
Conclusiones

A partir de nuestros estudios, hemos demostrado que el ácido maslínico posee un potente y selectivo efecto anticancerígeno sobre las células de carcinoma de colon, utilizando dos líneas celulares de cáncer de colon, HT29 y Caco-2, que difieren en la expresión de ciertos oncogenes, y dos líneas celulares normales de intestino, IEC-6 e IEC-18. Este efecto anticancerígeno se produce, fundamentalmente, a través de los siguientes eventos moleculares que se describen a continuación:

- Presenta un efecto citotóxico, cuantificado mediante el ensayo de viabilidad celular por MTT sobre ambas líneas cancerígenas. Esta citotoxicidad ocurre a través de la inducción de los procesos de apoptosis celular, determinada por: **a)** la tinción celular con anexina V-FICT e ioduro de propidio, tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia; **b)** la aparición de picos sub- G_0/G_1 en el análisis del ciclo celular; **c)** la condensación de la cromatina y la aparición de cuerpos apoptóticos observados por microscopía de fluorescencia; **d)** el patrón en escalera asociado con la formación del DNA apoptótico; y por último, **e)** un marcado incremento de la actividad caspasa-3.



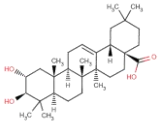
- Además, parte del efecto anticancerígeno descrito en esta memoria se apoya en un claro efecto diferenciador presente en las líneas cancerígenas ensayadas, especialmente sobre la línea tumoral HT29. Este efecto ha sido confirmado por: **a)** un marcado arresto del ciclo celular en la fase G_0/G_1 cuantificado por citometría de flujo; **b)** un incremento de la actividad fosfatasa alcalina, enzima marcador del proceso apoptótico en carcinomas de colon; y **c)** una disminución de la genotoxicidad del producto, tiempo dependiente. Además, el efecto diferenciador se apoya también en la marcada sobre-expresión de la proteína p53 en respuesta al tratamiento con ácido maslínico. Esta proteína es capaz de inducir tanto el arresto del ciclo celular como la diferenciación. Y si tales procesos no han tenido éxito, p53 es capaz de contribuir, por sí mismo, a la activación del proceso apoptótico.
- En las células HT29, el ácido maslínico induce apoptosis celular de una forma más tardía que en células Caco-2. Según el mecanismo propuesto, este compuesto activaría, en primer lugar, la ruta de inducción de apoptosis mediada por JNK, a continuación, esta proteína quinasa activaría o inhibiría a distintas proteínas de la familia Bcl-2. En concreto, se produce una sobre-expresión de los niveles de Bax y una disminución en los niveles de Bid-completo y Bcl-2. A continuación y en respuesta a estos fenómenos, tiene lugar la permeabilización mitocondrial y la consiguiente liberación citoplasmática de citocromo-c. Todo ello daría lugar a la formación del complejo apoptosoma y a la activación de la caspasa-9, que a su vez activaría a la caspasa-3 y a la caspasa-7. Además, en estas células tiene lugar una sobre-expresión de los niveles de p53, tiempo y concentración dependiente. Esta sobre-expresión de la proteína p53 ha sido descrita en respuesta a la activación de JNK.
- En las células Caco-2, el tratamiento con ácido maslínico induce, inmediatamente, los niveles de caspasa-8 y caspasa-3, lo cual conduciría directamente a la activación de los procesos de muerte celular programada. Además, en estas células también ocurre una disminución de los niveles de Bid-completo, con el consiguiente aumento de los niveles de t-Bid; con un aumento en los niveles de Bax, y con una disminución de los niveles de Bcl-2. Este mecanismo de activación produce, más adelante, la activación de la caspasa-9 que también contribuye a la activación de la caspasa-3. Por último, y para comprobar la existencia de un nexo de unión entre estos dos mecanismos, también se pudo observar un incremento de los niveles de la proteína JNK en respuesta al tratamiento con ácido maslínico.

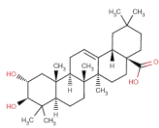


- Para finalizar, proponemos un mecanismo molecular de activación de apoptosis celular en respuesta al tratamiento con ácido maslínico. Se trata de un mecanismo mixto entre los dos mecanismos moleculares encontrados. En éste, el ácido maslínico activaría un receptor de membrana tipo TNFR, lo que a su vez podría explicar la activación tanto de la caspasa-8 como de la proteína JNK, desencadenando los dos mecanismos propuestos. La activación de estas proteínas estaría relacionada con el tipo celular, así como, con el tiempo utilizado en el tratamiento.

A partir de todos estos datos proponemos al ácido maslínico como un compuesto eficaz frente al tratamiento del cáncer de colon por su efecto anticancerígeno, apoptótico y diferenciador sobre líneas de células tumorales, siendo su efecto mucho menor sobre las líneas de células normales.

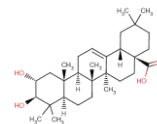
Efecto anticancerígeno del ácido maslínico



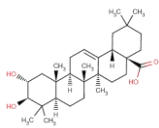


Bibliografía

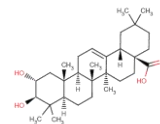
- **Ahn KS, Kim JH, Oh SR, Min BS, Kinjo J, Lee HK.** (2002). Effects of oleanane-type triterpenoids from fabaceous plants on the expression of ICAM-1. *Biol Pharm Bull.* **25**, 1105-7.
- **Altnauer F, Conus S, Cavalli A, Folkers G, Simon HU.** (2004). Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J Biol Chem.* **279**, 5947-57.
- **Andersson D, Liu JJ, Nilsson A, Duan RD.** (2003). Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. *Anticancer Res.* **23**, 3317-22.
- **Andreev OA, Dupuy AD, Segala M, Sandugu S, Serra DA, Chichester CO, Engelman DM, Reshetnyak YK.** (2007). Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **8**, 7893-8.
- **Ashkenazi A, Dixit VM.** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science.* **281**, 1305-1308.
- **Ashkenazi, A.** (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 420-430.
- **Astudillo L, Rodriguez JA, Schmeda-Hirschmann G.** (2002). Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. *J Pharm Pharmacol.* **54**, 538-588.
- **Baek JH, Lee YS, Kang CM, Kim JA, Kwon KS, Son HC, and Kim KW.** (1997) Intracellular Ca₂₊ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Int. J. Cancer.* **73**, 725-728.
- **Baud V, Karin M.** (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* **11**, 373-7.



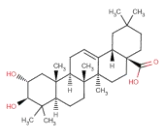
- **Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R.** (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*. **428**, 431-7.
- **Bespalov VG, Alexandrov VA, Limarenko AY, Voytenkov BO, Okulov VB, Kabulov MK, Peresunko AP, Slepyan LI, Davydov VV.** (2001). Chemoprevention of mammary, cervix and nervous system carcinogenesis in animals using cultured Panax ginseng drugs and preliminary clinical trials in patients with precancerous lesions of the esophagus and endometrium. *J Korean Med Sci*. **16**, S42-53.
- **Bianchi G, Vlahov G, Pozzi N.** (1994). The lipids of *Olea europaea*. Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry*. **37**, 205–207.
- **Bianchi G.** (2003). Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 229-242.
- **Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, and Greene WC.** (2004). p53 induces NF-kappaB activation by an IkkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 26115–26125.
- **Boldin M, Goncharov T, Goltsev Y, and Wallach D.** (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell-death. *Cell*. **85**, 803–815.
- **Bonfils JP, Pinguet F, Culine S, Sauvaire Y.** (2001). Cytotoxicity of iridals, triterpenoids from Iris, on human tumor cell lines A2780 and K562. *Planta Med.* **67**, 79-81.
- **Braca A, Morelli I, Mendez J, Battinelli L, Braghiroli L, Mazzanti G.** (2000). Antimicrobial triterpenoids from *Licania heteromorpha*. *Planta Med.* **66**, 768-9.
- **Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, and Dimmeler S.** (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation, molecular characterization of the involved signalling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1886–1896
- **Bunz F.** (2001). Cell death and cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 337–341
- **Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B.** (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. **282**, 1497-1501.
- **Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA.** (2004). Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochem Biophys Res Commun.* **320**, 402-8.
- **Cha HJ, Bae SK, Lee HY, Lee OH, Sato H, Seiki M, Park BC, and Kim KW.** (1996). Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* **56**, 2281–2284
- **Cha HJ, Park MT, Chung HY, Kim ND, Sato H, Seiki M, and Kim KW.** (1998) Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Oncogene*. **16**, 771–778



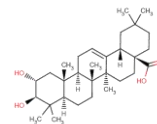
- **Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner B M, Masferrer JL, and Dannenberg AJ.** (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* **59**, 991–994, 1999.
- **Chang L, Karin M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* **410**, 37-40.
- **Chatterjee P, Kouzi SA, Pezzuto JM and Hamann MT.** (2000). Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology.* **66**, 3850-5
- **Chen FK, Lenardo MJ.** (2002). A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* **30**, 652-660
- **Chen L, Haider K, Mondo M, Cariappa A, Rowitch D, Pillai S.** (2001). Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane associated ankyrin repeat-containing protein kinase. *J Biol Chem.* **276**, 21737-31744
- **Chen G, and Goeddel DV.** (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful expression of specific ubiquitin ligase components, pathway. *Science* **296**, 1634–1635
- **Chen Y, Liu J, Yang X, Zhao X. and Xu H.** (2005). Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in-vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **57**, 259–264.
- **Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC.** (2003) Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am J Chin Med.* **31**, 37-46.
- **Chiang YM, Chang JY, Kuo CC, Chang CY, Kuo YH.** (2005). Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry.* **66**, 495-501.
- **Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR.** (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science.* **309**, 1732-1735.
- **Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR.** (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* **303**, 1010-1014.
- **Choi CY, You HJ, Jeong HG.** (2001). Nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by oleanolic acid via nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 49-55.
- **Choi B M, Park R, Pae HO, Yoo JC, Kim YC, Jun CD, Jung BH, Oh GS, So HS, Kim YM, and Chung HT.** (2000) Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacol. Toxicol.* **86**, 53–58
- **Choi YH, Baek JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, and Kim KW.** (2000). Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and downregulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **17**, 565–571,
- **Chou JJ, Matsuo H, Duan H and Wagner G.** (1998). Solution structure of the RAIDD CARD and model of CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell.* **94**, 171-180.



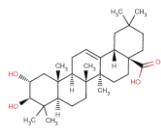
- **Chou KJ, Fang HC, Chung HM, Cheng JS, Lee KC, Tseng LL, Tang KY, and Jan CR.** (2000). Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca^{2+} levels in Madin Darby canine kidney cells. *European Journal of Pharmacology.* **408**, 99-106
- **Chowdhury AR, Mandal S, Mitra B, Sharma S, Mukhopadhyay S, and Majumder HK.** (2002) Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Medicine science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* **8**, 254-65
- **Cichewicz RH, Kouzi SA.** (2004). Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev.* **24**(1), 90-114
- **Cohen GM.** (1997) Caspases, the executioners of apoptosis. *Biochem J.* **326**, 1-16.
- **Connolly JD, Hill RA.** (1991). Triterpenoids, in Terpenoids. *Charlwood B. V. and Banthorpe D.V., Ed. London: Academic Press.* **7**, 331-59.
- **Connolly JD, and Robert AH.** (2005). Triterpenoids. *Natural Product Report.* **22**, 487-503.
- **Cory S, and Adams JM.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the Conclusions cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 647-656
- **Dat NT, Lee IS, Cai XF, Shen G, Kim YH.** (2004). Oleanane triterpenoids with inhibitory activity against NFAT transcription factor from Liquidambar formosana. *Biol Pharm Bull.* **27**, 426-8.
- **Datta R, Manome Y, Taneja N, Boise LH, Weichselbaum RR, Thompson CB, Slapak CA, and Kufe DW.** (1995). Overexpression of Bcl-xL by cytotoxic drug exposure confers resistance to ionizing radiation-induced internucleosomal DNA fragmentation. *Cell Growth Differ.* **6**, 363-370
- **Davis RJ.** (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* **103**, 239-52.
- **De Valck D, Jin DY, Heynink K, Van de Craen M, Contreras R, Fiers W, Jeang KT, Beyaert R.** (1999). The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases. *Oncogene.* **18**, 4182-90.
- **Declercz W, Denecker G, Fiers W, Vandenabeele P.** (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis. involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol.* **161**, 390-399
- **Deng Y, Lin Y, and Wu X.** (2002) TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev.* **16**, 33-45.
- **Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, and Wu X.** (2003). A JNK-Dependent pathway is required for $TNF\alpha$ -Induced Apoptosis. *Cell.* **115**, 61-70.
- **Deng, X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P, and May WS.** (2001). Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 23681-23688.
- **Devereaux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* **388**, 300-304



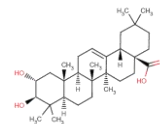
- **Deveraux QL, Reed JC.** (1999). IAP family proteins. suppressor of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.
- **Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, and Davis RJ.** (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science.* **277**, 693–696.
- **Dihal AA, Tilburgs C, van Erk MJ, Rietjens IM, Woutersen RA, Stierum RH.** (2007). Pathway and single gene analyses of inhibited Caco-2 differentiation by ascorbate-stabilized quercetin suggest enhancement of cellular processes associated with development of colon cancer. *Mol Nutr Food Res.* [Epub ahead of print]
- **Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, and Zeiher AM.** (1999). Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation, a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.* **189**, 1815–1822.
- **Dinkova-Kostova AT, Liby KT, Stephenson KK, Holtzclaw WD, Gao X, Suh N, Williams C, Risingsong R, Honda T, Gribble GW, Sporn MB, Talalay P.** (2005). Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proceedings of National Academy of Sciences USA.* **102**, 4584–4589.
- **Dixon RA.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature.* **41**, 843-847.
- **DNP. Dictionary of Natural Product on CD.** (2002) Buckingham J. (Editor).. Ed: Chapman & Hall (Electronic publishing division), England. ISBN: 0412491508.
- **Dominic YA, and Subbaiyan M.** (1993) Studies on mitochondrial lipid peroxidation in tumor-bearing rats treated with ursolic acid and ursolic acetate. *Medical Science Research.* **21**, 213-215.
- **Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* **102**, 33–42.
- **Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J.** (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Report.* **23**, 394-411
- **Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, and DuBois RN.** (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* **107**, 1183–1188.
- **El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* **75**, 817-825.
- **Es-Saady D, Simon A, Jayat-Vignoles C, Chulia AJ, and Delage C.**(1996a) MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer Res.* **16**, 481–486
- **Es-saady D, Simon A, Ollier M, Maurizis JC, Chulia AJ, and Delage C.** (1996b) Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. *Cancer Lett.* **106**, 193–197
- **Evan GI, Brown L, Whyte M, Harring E.** (1995). Apoptosis and the cell cycle. *Curr. Op. in Cell Biol.* **7**, 825-834.



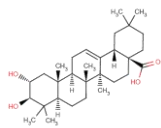
- **Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM.** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* **148**, 2207-16.
- **Fan M, Goodwin M, Vu T, Brantley-Finley C, Gaarde WA, and Chambers TC.** (2000). Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J. Biol. Chem.* **275**, 29980–29985.
- **Faris M, Kokot N, Latinis K, Kasibhatla S, Green DR, Koretzky GA, and Nel A.** (1998a). The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J. Immunol.* **160**, 134–144.
- **Faris, M., Latinis KM, Kempiak SJ, Koretzky GA, and Nel A.** (1998b). Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5414–5424.
- **Fernandes J, Castilho RO, da Costa MR, Wagner-Souza K, Coelho Kaplan MA, Gattass CR.** (2003). Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett.* **190**, 165-9.
- **Fernandes J, Weinlich R, Castilho RO, Kaplan MA, Amarante-Mendes GP, Gattass CR.** (2005). Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. *Cancer Lett.* **219**, 49-55.
- **Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salveson G, et al.** (1995). Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* **55**, 6045-52.
- **Fernández-Navarro M, Peragón J, Esteban FJ, de la Higuera M, Lupiáñez JA.** (2006). Maslinic acid as a feed additive to stimulate growth and hepatic protein-turnover rates in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **144**, 130-40.
- **Fernández-Navarro M, Peragón J, Amores V, De La Higuera M, Lupiáñez JA.** (2008). Maslinic acid added to the diet increases growth and protein-turnover rates in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* En prensa.
- **Fésüs L, Szondy Z.** (2005). Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett.* **579**, 3297-302.
- **Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, et al.** (2000). Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J.* **352**, 145-4.
- **Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z.** (1998). MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 10541-6.
- **Fujioka S, Schmidt C, Sclabas GM, Li Z, Pelicano H, Peng B, Yao A, Niu J, Zhang W, Evans DB, Abbruzzese JL, Huang P, Chiao PJ.** (2004). Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **279**, 27549–27559.
- **Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E and Debatin K. M.** (1998). Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *The Journal of Biological Chemistry.* **273**, 33942-8



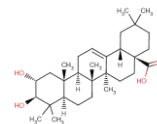
- **Fulda S, Debatin KM.** (2000) Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Med Pediatr Oncol.* **35**, 616-8.
- **Galgon T, Wohlrab W, and Drager B.** (2005). Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes. *Experimental Dermatology.* **14**, 736.
- **García-Granados Lopez De Hierro, Andres.** (1998). Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling byproducts. *PCT Int. Appl.*, 17 pp. CODEN: PIXXD2 WO 9804331 A1 19980205 CAN 128:179706 AN 1998:9835.
- **García-Granados A, Martínez A, Parra A, Rivas F, Osuna A, Mascaro C.** (1999). Use of maslinic acid as inhibitor of serine proteases for treatment of diseases caused by *Cryptosporidium* parasites. 6 pp. CODEN: SPXXAD ES 2131467 A1 19990716 *Patent written in Spanish. Application:* ES 97-9701029 19970512. CAN 132:146626 AN 2000:149822
- **García-Granados A, Dueñas J, Moliz JN, Parra A, Pérez FL, Dobado JA, Molina J.** (2000). Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Part II. Theoretical and experimental C-13 chemical shifts. *J. Chem. Res. Synop.* **2**, 326-339.
- **García-Granados A, Gutiérrez MC, Rivas F.** (2003). Improved microbiological hydroxylation of sesquiterpenoids: semisynthesis, structural determination and biotransformation studies of cyclic sulfite eudesmane derivatives. *Org Biomol Chem.* **1**, 2314-20.
- **García-Granados A, Fernández A, Gutiérrez MC, Martínez A, Quirós R, Rivas F, Arias JM.** (2004). Biotransformation of ent-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi. *Phytochemistry.* **65**, 107-15.
- **García-Granados A, López PE, Melguizo E, Parra A, Simeó Y.** (2007). Remote hydroxylation of methyl groups by regioselective cyclopalladation. Partial synthesis of hiptatic acid-A. *J Org Chem.* **72**, 3500-9.3
- **Geetha T, and Varalaxmi P.** (1998) Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia.* **69**, 13-19
- **Ghosh S, Karin M.** (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell.* **109**, S81-S96
- **Ghribi O, Herman MM, Spaulding NK, and Savory J.** (2002) Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation. *J Neurochem.* **82**. 137-145.
- **Glaser T, Winter S, Groscurth P, Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP, Schabet M, Weller M.** (1999) Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *Br J Cancer.* **80**, 756-65.
- **Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J.** (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731-801.
- **Gopal DVR, Narkar AA, Badrinath Y, Mishra KP and Joshi DS.** (2005) Betulinic acid induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl. *Toxicology Letters.* **155**, 343-51
- **Green DR, Reed JC.** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* **281**, 1309-12.



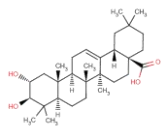
- **Green DR, Evan GI.** (2002). A matter of Life and Death. *Cancer Cell.* **1**, 19-30
- **Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee Y, Durkop H, Englemann H, Scheurich P.** (1999). Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40, and CD30. a role of TNFR1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* **18**, 3034-3043
- **Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, and Hickman JA.** (1999) Cell damage-induced conformational changes of the proapoptotic protein bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol.* **144**, 903-914.
- **Gross A, McDonnell MJ, and Korsmeyer SJ.** (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899–1911.
- **Gupta S, Su H, Bi R, Agrawal S, Gollapudi S.** (2005). Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence. *Immun Ageing.* **23**, 2-12.
- **Gupta S.** (2000). Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* **69**, 2957-2964.
- **Gupta S.** (2001). Molecular steps of TNF receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med.* **1**, 299-306.
- **Gupta S.** (2002). Decision between life and death during TNF-induced signaling. *J Clin Immunol.* **22**, 185-94.
- **Han SS, Peng L, Chung ST, DuBois W, Maeng SH, Shaffer AL, Sporn MB, Janz S.** (2006). CDDO-Imidazolide inhibits growth and survival of c-Myc-induced mouse B cell and plasma cell neoplasms. *Mol Cancer.* **5**, 22-37.
- **Hanausek M, Ganesh P, Walaszek Z, Arntzen CJ, Slaga TJ, Gutterman JU.** (2001). Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 11551-6.
- **Harborne, JB.** (1998). *Pytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis.* Ed: Chapman and Hall. ISBN: 0412572605.
- **Haridas V, Darnay BG, Natrajan K, Helle R, Aggarwal BB.** (1998). Overexpression of the p80 TNFR leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation. *J Immunol.* **160**, 3152-3162
- **Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU.** (2001a). Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 11557-62.
- **Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS, Bailey D, Mujoo K, Blake ME, Arntzen CJ, Gutterman JU.** (2001b). Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 5821-6.
- **Harmand PO, Duval R, Delage C, Simon A.** (2005) Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int. J. Cancer.* **114**, 1-11



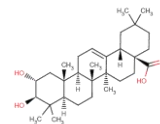
- **Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ.** (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. **75**, 805-816.
- **Hata K, Hori K and Takahashi S.** (2002) Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *J Nat Prod*. **65**, 645–648.
- **Hata K, Mukaiyama T, Tsujimura N, Sato Y, Kosaka Y, Sakamoto K, Hori K.** (2006). Differentiation-inducing activity of lupane triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Cytotechnology*. **52**, 151-158.
- **Hausott B, Greger H, and Marian B.** (2004) Flavaglines: a group of efficient growth inhibitors block cell cycle progression and induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*. **109**, 933–940.
- **Hayashi I, Vuori K, Liddington RC.** (2002). The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol*. **9**, 101-6.
- **He X, Liu RH.** (2007). Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J Agric Food Chem*. **55**, 4366-70.
- **Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lezbnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis proteincaspase interaction. *J Biol Chem*. **277**, 432-438.
- **Herr I, and Debatin KM.** (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. **98**, 2603–2614.
- **Heyninck K, Beyaert R.** (2005). A20 inhibits NF- κ B activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci*. **30**, 1-4.
- **Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M.** (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*. **7**, 2135-48.
- **Hirota M, Mori T, Yoshio M, and Iriye R.** (1990) Suppression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and 4,4-dimethylcholestane derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*. **54**, 1073-1075.
- **Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, Niethammer D, Sailer ER, Simmet T, Dannecker GE, Ammon HP.** (1999). Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **288**, 613-9.
- **Hollosoy F, Meszaros G, Bokonyi G, Idei M, Seprodi A, Szende B, and Keri G.** (2000) Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A431 human tumor cells. *Anticancer Res*. **20**, 4563–4570.
- **Hollosoy F, Idei M, Csorba G, Szabo E, Bokonyi G, Seprodi A, Meszaros G, Szende B, and Keri G.** (2001) Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. *Anticancer Res*. **21**, 3485–3491.



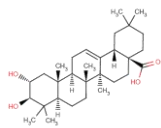
- **Honda T, Honda Y, Favaloro FG, Gribble GW, Suh N, Place AE, Rendi MH, Sporn MB.** (2002) A novel dicyanotrimerpene, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-onitrile, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1027.
- **Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV.** (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* **4**, 387-396.
- **Hsu S. Y., Lin P., and Hsueh A. J.** (1998) BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol.* **12**, 1432-1440.
- **Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Lou YR, Stauber K, Ma W, Georgiadis C, Laskin JD, and Conney AH.** (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* **54**, 701-708
- **Hwang BY, Chai HB, Kardono LB, Riswan S, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD.** (2003). Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. 1: Phytochemistry. **62**, 197-201.
- **Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y.** (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* **275**, 90-4.
- **Ikeda T, Sporn M, Honda T, Gribble GW, and Kufe D** (2003). The Novel Triterpenoid CDDO and its Derivatives Induce Apoptosis by Disruption of Intracellular Redox Balance. *Cancer Research.* **63**, 5551-5558.
- **Irmiler M, Thome M, Hahne M, Schnieder P, Hoffmann K, Steiner V, Bodmer J-L, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J.** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* **388**, 190-195.
- **Ishida M, Okubo T, Koshimizu K, Daito H, Tokuda H, Kin T, Yamamoto T, and Yamazaki N.** (1990) Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. *Chemical Abstract.* **113**, 12173.
- **Ito Y, Yanase S, Tokuda H, Kishishita M, Ohigashi H, Irota M, and Koshimizu K.** (1983) Epstein-Barr virus activation by tung oil, extracts of *Aleurites fordii* and its diterpene ester 12-O-hexadecanoyl-16hydroxyphorbol-13-acetate. *Cancer Letters.* **18**, 87-95.
- **Ito Y, Pandey P, Place A, Sporn M, Gribble G, Honda T, Kharbanda S, and Kufe D.** (2000). The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis of human myeloid leukaemia cells by a caspase-8 dependent mechanism. *Cell Growth Differ.* **11**, 261-267.
- **Ito Y, Pandey P, Sporn M, Datta R, Kharbanda S, and Kufe D.** (2001). The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis and differentiation of human osteosarcoma cells by a caspase-8 dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1094-1099.
- **Izawa H, Yamamoto H, Damdinsuren B, Ikeda K, Tsujie M, Suzuki R, Kitani K, Seki Y, Hayashi T, Takemasa I, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Monden M.** (2005). Effects of p21cip1/waf1 overexpression on growth, apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells. *Int J Oncol.* **27**, 69-76.
- **Jacobson MD, Weil M, Raff MC.** (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell.* **88**, 347-54.



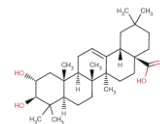
- **Jeong HJ, Chai HB, Park SY and Kim DSHL.** (1999) Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett.* **9**, 1201–1204.
- **Jeremias I, Steiner HH, Benner A, Debatin KM, and Herold-Mende C.** (2004). Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochirurgica.* **146**, 721.
- **Ji Y, Lee HJ, Goodman C, Uskokovic M, Liby K, Sporn M, Suh N.** (2006). The synthetic triterpenoid CDDO-imidazolidine induces monocytic differentiation by activating the Smad and ERK signaling pathways in HL60 leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* **5**, 1452-8.
- **Jing Y, Nakajo S, Xia L, Nakaya K, Fang Q, Waxman S, Han R.** (1999). Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Leuk Res.* **23**, 43-50.
- **Juan ME, Wenzel U, Ruiz-Gutierrez V, Daniel H, Planas JM.** (2006). Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr.* **136**, 2553-7.
- **Karin M.** (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* **270**, 16483-6.
- **Karin M, Lin A.** (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* **3**, 221-7
- **Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA and Brielmann HL.** (1999). Natural products from plants. Ed: CRC Press. ISBN: 0848329760.
- **Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leader P.** (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity.* **8**, 297-303.
- **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** (1972) Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**, 239-57.
- **Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, and Kufe D.** (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x_L in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **275**, 322–327.
- **Kim DSHL, Pezzuto JM and Pisha E.** (1998) Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett.* **8**, 1707–1712.
- **Kim DH, Han KM, Chung IS, Kim DK, Kim SH, Kwon BM, Jeong TS, Park MH, Ahn EM, Baek NI.** (2005). Triterpenoids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. as human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors. *Arch Pharm Res.* **28**, 550-6.
- **Kim JY, Koo HM, Kim DSHL.** (2001) Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett.* **11**, 2405–2408.
- **Kim KB, Lotan R, Yue P, Sporn MB, Suh N, Gribble GW, Honda T, Wu GS, Hong WK, Sun SY.** (2002). Identification of a novel synthetic triterpenoid, methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate, that potently induces caspase-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **3**, 177-84.
- **Kim YK, Yoon SK, Ryu SY.** (2000). Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.* **66**, 485-6.



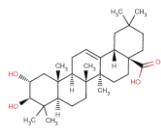
- **Kim DK, Baek JH, Kang CM, Yoo MA, Sung JW, Chung HY, Kim ND, Choi YH, Lee SH, and Kim KW.** (2000) Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int. J. Cancer.* **87**, 629–636
- **Kinoshita K, Yang Y, Koyama K, Takahashi K, Nishino H.** (1999). Inhibitory effect of some triterpenes from cactin 32P-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Phytomedicine.* **6**, 73–77.
- **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, and Newmeyer DD.** (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* **275**, 1132–1136
- **Knies UE, Behrendorf HA, Mitchell CA, Deutsch U, Risau W, Drexler HCA., and Claus M.** (1998). Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 12322–12327.
- **Konopleva M, Tsao T, Ruvolo P, Stiouf I, Estrov Z, Leysath CE, Zhao S, Harris D, Chang S, Jackson CE, Munsell M, Suh N, Gribble G, Honda T, May WS, Sporn MB, and Andreeff M.** (2002) Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood.* **99**, 326–335.
- **Konopleva M, Tsao T, Estrov Z, Lee RM, Wang RY, Jackson CE, McQueen T, Monaco G, Munsell M, Belmont J, Kantarjian H, Sporn MB, Andreeff M.** (2004). The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **64**, 7927-35.
- **Korhonen L, Belluardo N, Mudo G, and Lindholm D.** (2003) Increase in Bcl-2 phosphorylation and reduced levels of BH3-only Bcl-2 family proteins in kainic acid-mediated neuronal death in the rat brain. *Eur J Neurosci.* **18**, 1121-1134.
- **Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, and Reed JC.** (1993) Investigation of the Subcellular-Distribution of the Bcl-2 Oncoprotein - Residence in the Nuclear-Envelope, Endoplasmic-Reticulum, and Outer Mitochondrial-Membranes. *Cancer Research.* **53**, 4701-4714.
- **Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, and Reed JC.** (1995) Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci.* **15**, 6364-6376.
- **Kroemer G, Reed JC.** (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Med.* **6**, 513-519.
- **Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, and Flavell RA.** (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron.* **22**, 667–676.
- **Kubo M, Tong CN, Matsuda H.** (1992). Influence of the 70% methanolic extract from red ginseng on the lysosome of tumor cells and on the cytotoxic effect of mitomycin C. *Planta Med.* **58**, 424-8.
- **Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y.** (1998). Beta-amyrin synthase-cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur J Biochem.* **256**, 238–244.



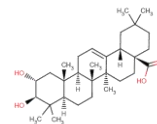
- **Kvasnica M., Sarek J., Klinotova E., Dzubak P. and Hajduch M.** (2005). Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorganic and Mededical Chemistry Letters*. **13**, 3447-54
- **Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, and Yu J.** (2002). Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 417-25
- **Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, Gold D, McQueen T, Sutherland RL, Madden T, Andreeff M.** (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 5926-39.
- **Lauthier F, Taillet L, Trouillas P, Delage C, and Simon A.** (2000) Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anticancer Drugs.* **11**, 737-745
- **Lea MA, Ibeh C, Shah N, Moyer MP.** (2007). Induction of differentiation of colon cancer cells by combined inhibition of kinases and histone deacetylase. *Anticancer Res.* **27**, 741-8.
- **Lee HY, Chung HY, Kim KH, Lee JJ, Kim KW.** (1994). Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120**, 513.
- **Lee JS, Min BS, Bae KH.** (1996) Cytotoxic constituents from the Forsythiae fructus against L1210 and HL60 cells. *Yakhak Hoeji.* **40**, 462-467.
- **Lee SJ, Ko WG, Kim JH, Sung JH, Moon CK, Lee BH.** (2000). Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem Pharmacol.* **60**, 677-85.
- **Lee JM, Bernstein A.** (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **90**, 5742-5746.
- **Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ.** (2002). The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* **22**, 4929-42.
- **Lei K, and Davis RJ.** (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2432-2437.
- **Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, et al.** (1999). Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol.* **19**, 751
- **Li J, Guo WJ and Yang QY.** (2002). Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *J Gastroenterol.* **8**, 493-5.
- **Li LY, Luo X, Wang X.** (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* **412**, 95-9.
- **Li H, Zhu H, Xu C-j, and Yuan J.** (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell.* **94**, 491-501



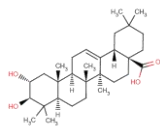
- **Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, and Williams RS.** (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*. **101**, 389–399.
- **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, and Wang X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. **91**, 479–489.
- **Liebermann DA, Hoffman B, and Steinman RA.** (1995) Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene*. **11**, 199-210.
- **Lin A, Minden A, Martinetto H, et al.** (1995) Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science*. **268**, 286-90
- **Lin A.** (2002). Activation of the JNK signaling pathway, breaking the break on apoptosis. *Bioessays*. **25**, 1-8.
- **Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, and Thompson CB.** (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell*. **6**, 1389–1399.
- **Liu H, Lo CR, Czaja MJ.** (2002) NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology*. **35**, 772-778.
- **Liu J.** (1995). Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. **49**, 57-68
- **Liu J.** (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**, 92–94
- **Liu JJ, Huang BH, Zhang J, Carson DD, Hooi SC.** (2006). Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells. *J Cell Physiol*. **207**, 287-92.
- **Liu X, Kim C, Yang J, Jemmerson R, and Wang X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. **86**, 147–157.
- **Locksley RM, Kileen N, Lenardo MJ.** (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies. interacting mammalian biology. *Cell*. **104**, 487-501
- **Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J.** (1995). Molecular Cell Biology. 3rd ed. *Scientific American Books*. Oxford. pp161, 178, 1251.
- **López MV, Cuadrado MP, Ruiz-Poveda OM, Del Fresno AM, Accame ME.** (2007). Neuroprotective effect of individual ginsenosides on astrocytes primary culture. *Biochim Biophys Acta*. **1770**, 1308-16.
- **Lu XM, Yi HW, Xu JL, Sun Y, Li JX, Cao SX, Xu Q.** (2007). A novel synthetic oleanolic acid derivative with amino acid conjugate suppresses tumour growth by inducing cell cycle arrest. *J Pharm Pharmacol*. **59**, 1087-93.
- **Lu H, Levine AJ.** (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Nat. Acad. Sci*. **92**, 5154-5158.



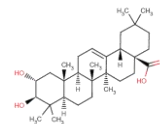
- **Luo JL, Kamata H, Karin M.** (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* **115**, 2625-32.
- **Luo, X., Budiharjo, H., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X.** (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* **94**, 481-490
- **Ma J, Starck SR, Hecht SM.** DNA polymerase beta inhibitors from *Tetracera boiviniana*. *J Nat Prod.* **62**, 1660-3.
- **Maeda, S., Chang, L., Li, Z.W., Luo, J.L., Leffert, H., and Karin, M.** (2003). IKKbeta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNFalpha. *Immunity.* **19**, 725-737.
- **Márquez Martín A, de la Puerta Vázquez R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V.** (2006a). Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res.* **40**, 295-302.
- **Marquez-Martin A, De La Puerta R, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P.** (2006b). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine.* **36**, 211-7.
- **Martín R, Carvalho J, Ibeas E, Hernández M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto ML.** (2007). Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* **67**, 3741-51
- **Martinou J-C, Green DR.** (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **2**, 63-67
- **Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, and Downward J.** (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.* **277**, 439-444.
- **Maudrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou JC, and Arkinstall S.** (1997). Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J. Biol. Chem.* **272**, 25238-25242.
- **McCarthy JV, Ni J, Dixit VM.** (1998). RIP-2 is a novel NF-kB activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem.* **273**, 16969-16975
- **Melzig MF, and Bormann H.** (1998). Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity. *Planta Med.* **64**, 655-7.
- **Merry DE, and Korsmeyer SJ.** (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* **20**, 245-267.
- **Meylan E, Martinon F, Thome M, Gswendt M, Tschopp J.** (2002). RIP4 (DICK/PKK), a novel member of RIP kinase family, activates NF-kB, and is processed during apoptosis. *EMBO Rep.* **3**, 1201-1208.
- **Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopolous K, Tshopp J.** (2001). NF-kB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* **21**, 5299-5305



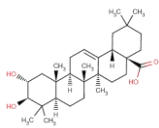
- **Micheau O, Tschopp J.** (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. **114**, 181-190
- **Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM.** (2003). p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell*. **11**, Number 577-590.
- **Min BS, Kim YH, Lee SM, Jung HJ, Lee JS, Na MK, Lee CO, Lee JP, Bae K.** (2000). Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch Pharm Res*. **23**, 155-8.
- **Minden A, Lin A, McMahon M, et al.** (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*. **266**, 1719-23.
- **Montilla MP, Agil A, Navarro MC, Jimenez MI, Garcia-Granados A, Parra A, and Cabo MM.** (2003) Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med*. **69**, 472–474.
- **Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **65**, 55-63.
- **Mujoo K, Haridas V, Hoffmann JJ, Wächter GA, Hutter LK, Lu Y, Blake ME, Jayatilake GS, Bailey D, Mills GB, Gutterman JU.** (2001). Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Res*. **61**, 5486-90.
- **Mukherjee R, Jaggi M, Rajendran P, Srivastava SK, Siddiqui MJA, Vardhan A, and Burman AC.** (2004a). Synthesis of 3-O-acyl/3-benzylidene/3-hydrazone/3-hydrazine/17-carboxyacryloyl ester derivatives of betulinic acid as anti-angiogenic agents. *Bioorganic and Mededical Chemistry Letters*. **14**, 3169-72
- **Mukherjee R, Jaggi M, Rajendran P, Srivastava SK, Siddiqui MJA, Vardhan A, and Burman AC.** (2004b). Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorganic and Mededical Chemistry Lett*. **14**, 2181-4
- **Mukherjee R, Jaggi M, Siddiqui MJ, Srivastava SK, Rajendran P, Vardhan A, and Burman AC.** (2004c). Synthesis and cytotoxic activity of 3-O-acyl/3-hydrazine /2-bromo/20,29-dibromo betulinic acid derivatives. *Bioorganic and Mededical Chemistry Letters*. **14**, 4087-91
- **Murakami S, Takashima H, Sato-Watanabe M, Chonan S, Yamamoto K, Saitoh M, Saito S, Yoshimura H, Sugawara K, Yang J, Gao N, Zhang X.** (2004). Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)-beta1. *FEBS Letters*. **566**, 55–59.
- **Mutai Ch, Abatis D, Vagias C, Moreau D, Roussakis Ch and Roussis V.** (2004). Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry*. **65**, 1159.
- **Muto Y, Ninomiya M, and Fujiki H.** (1990) Present status research on cancer chemoprevention in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. **20**, 219-224.
- **Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, and Dixit VM.** (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. **85**, 817–827
- **Nader BL, Taketa AT, Pereda-Miranda R, Villarreal ML.** (2006). Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of *Galphimia glauca*. *Planta Med*. **72**, 842-4.



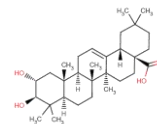
- **Najid A, Simon A, Cook J, Chable-Rabinovitch H, Delage C, Chulia AJ, and Rigaud M.** (1992) Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS Lett.* **299**, 213–217
- **Nateri AS, Riera-Sans L, Da Costa C, and Behrens A.** (2004). The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science*, in press. Published online January 22, 2004. 10.1126/science.1092880
- **Nathan C.** (2006). Role of iNOS in human host defense. *Science.* **312**, 1874-5
- **Natoli G, Costanzo A, Ianni A, Templeton DJ, Woodgett JR, Balsano C, Levero M.** (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF-2-dependent pathway. *Science.* **275**, 200-203
- **Niikawa M, Hayashi H, Sato T, Nagase H, Kito H.** (1993). Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait.) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria. *Mutat. Res.* **319**, 1-9.
- **Nishino H, Tokuda H, Ii T, Takemura M, Kuchide M, Kanazawa M, Mou XY, Bu P, Takayasu J, Onozuka M, Masuda M, Satomi Y, Konoshima T, Kishi N, Baba M, Okada Y, Okuyama T.** (2001) Cancer chemoprevention by ginseng in mouse liver and other organs. *J. Korean Med. Sci.* **16**, S66-9.
- **Nishino H, Nishino A, Takayasu J, Hasegawa T, Iwashima A, Hirabayashi K, Iwata S, and Shibata S.** (1988) Inhibition of the tumor-promoting action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate by some oleanane-type triterpenoid compounds. *Cancer Res.* **48**, 5210–5215
- **Noda Y, Kaiya T, Kohda K, and Kawazoe Y.** (1997). Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* **45**, 1665-70
- **Novotny L, Vachalkova A, Biggs D.** (2001). Ursolic acid: an antitumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasma.* **48**, 241-246
- **Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, and Tanaka N.** (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* **288**, 1053-1058.
- **Ogura M, Cordell GA and Farnsworth R.** (1977). Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia.* **40**, 157.
- **Ohgashi H, Takamura H, Koshimizu K, Tokuda H, and Ito YL.** (1986). Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae*. *Cancer Lett.* **30**, 143–151
- **Ohtsuka M, Fukuda K, Yano H, Kojiro M.** (1995). Effects of nine active ingredients in Chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide mutagenicity. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 1131-5.
- **Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA.** (2007). Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene.* **26**, 7222-30.



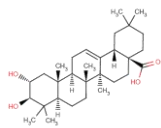
- **Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B.** (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. **358**, 80-83.
- **Opirari AW Jr, Hu HM, Yabkowitz R, Dixit VM.** (1992). The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem*. **267**, 12424-12427
- **Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K, Tothova D.** (2004). Pentacyclic triterpenic acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma*. **51**, 327–333
- **Ovesná Z, Kozics K, Slamenová D.** (2006). Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat. Res*. **600**, 131-137
- **Owen RW, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H.** (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol*. **41**. 703–717.
- **Pahl HL.** (1999). Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*. **18**, 6855-6866
- **Parett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, and Robertson FM.** (1997). Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int. J. Oncol*. **10**, 503–507.
- **Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, and Xue D.** (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C.elegans*. *Nature*. **412**, 90–94.
- **Pathak AK, Bhutani M, Nair AS, Ahn KS, Chakraborty A, Kadara H, Guha S, Sethi G, Aggarwal BB.** (2007). Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res*. **5**, 943-55.
- **Patočka J.** (2003). Biologically active pentacyclic triterpenos and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*. **1**, 7-12.
- **Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E.** (1988). Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods*. **20**, 309-21.
- **Pedersen I, Kitada S, Schimmer A, Kim Y, Zapata J, Charnoneau L, Rassenti L, Andreeff M, Bennett F, Sporn M, Liotta L, Kipps T, and Reed J.** (2002). The triterpenoid CDDO induces apoptosis in refractory CLLB cells. *Blood*. **100**, 2965–2972
- **Pedersen IM, Zapata JM, Samuel T, Scott FL, Salvesen GS, Honda T, Gribble GW, Suh N, Sporn MB, Kipps TJ, Reed JC.** (2004). Retraction: The triterpenoid CDDO-imidazolide induces apoptosis and enhances fludarabine-induced apoptosis of CLL B-cells. *Blood*. **104**, 932.
- **Perez-Camino MC, Cert A.** (1999). Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem*. **47**, 1558–1562.
- **Peter ME, and Krammer PH.** (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. **10**, 26–35.
- **Phillips DR, Rasbery MJ, Bartel B, and Matsuda SP.** (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*. **9**, 305-314.



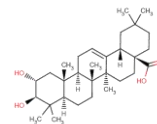
- **Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, and Brown DM.** (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature. Medicine.* **1**, 1046.
- **Potapova O, Anisimov SV, Gorospe M, Dougherty RH, Gaarde WA, Boheler KR, Holbrook NJ.** (2002). Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulation revealed by serial analysis of gene expression. *Cancer Res.* **62**, 3257-63.
- **Pungitore CR, Padron JM, Leon LG, Garcia C, Ciuffo GM, Martin VS, Tonn CE.** (2007). Inhibition of DNA topoisomerase I and growth inhibition of human cancer cell lines by an oleanane from *Junellia aspera* (Verbenaceae). *Cell Mol Biol.* **15**, 13-7.
- **Putchá GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, and Johnson EM.** (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron.* **29**, 615-628.
- **Puthalakath, H., and Strasser, A.** (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-transcriptional control of the proapoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* **9**, 505-512
- **Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L. and Isselbacher, K.J.**(1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell Biol.* **80**, 248-265.
- **Raghuvar DV, Gopal A, Narkar A, Badrinath Y, Mishra KP, and Joshi DS.** (2004) Protection of Ewing's sarcoma family tumor (ESFT) cell line SK-N-MC from betulinic acid induced apoptosis by alpha-DL-tocopherol. *Toxicology Letters.* **153**, 201-12
- **Ramachandran A, Madesh M, and Balasubramanian KA.** (2000) Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 109-120.
- **Ray RM, McCormack SA, and Johnson LR.** (2001). Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **281**, G37-G43.
- **Reed JC.** (1997). Double identity for protein of Bcl-2 family. *Nature.* **387**, 773-778
- **Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, and Brugge JS** (2003) Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature Cell Biology.* **5**, 733-740.
- **Reyes FJ, Centelles JJ, Lupiáñez JA, Cascante M.** (2006). (2 α ,3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* **580**, 6302-10.
- **Rhee YH, Ahn JH, Choe J, Kang KW, Joe C.** (1991). Inhibition of mutagenesis and transformation by root extracts of *Panax ginseng* in vitro. *Planta Med.* **57**, 125-8.
- **Rhew TH, Park SM, Park KY, Chung HY, Hah JC and Lee CK.** (1993) Effects of ursolic acid on oncogene expression detected by in situ hybridization in mice. *Chemical Abstracts.* **119**, 151741



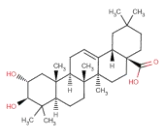
- **Rieber M, and Strasberg Rieber M.** (1998) Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma. *DNA and Cell Biology.* **17**, 399-406
- **Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S.** (2007). MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell.* **25**, 739-50.
- **Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, and Bohlin L.** (1998). Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **61**, 1212–1215
- **Ringgaard S, Harb J, Gautier F, Menanteau J, and Meflah K.** (1996) Altered glycosylation of alpha(s)beta 1 integrins from rat colon carcinoma cells decreases their interaction with fibronectin. *J. Cell Biochem.* **62**, 40–49.
- **Rinkenberger JL, Korsmeyer SJ.** (1997) Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* **7**, 589-96.
- **Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, and Harkonen M.** (1997). Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.* **57**, 1276–1280.
- **Rivas Garcia F, Osuna Carrillo de Albornoz A, Mascaro Lazcano Carmen, Najera Morrondo R.** (2000). Use of maslinic acid as protease inhibitor in the treatment of diseases caused by the HIV virus. *Span.* 8 pp. CODEN: SPXXAD ES 2140329 A1 20000216 CAN 135:483 AN 2001:436683
- **Rodriguez-Rodriguez R, Perona JS, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V.** (2006). Triterpenic compounds from "orujo" olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.* **54**, 2096-102.
- **Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV.** (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* **78**, 681-692.
- **Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV.** (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell.* **83**, 1243-1252.
- **Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC.** (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J.* **368**, 915-21.
- **Rudiyansyah , Garson MJ.** (2006). Secondary metabolites from the wood bark of *Durio zibethinus* and *Durio kutejensis*. *J Nat Prod.* **69**, 1530.
- **Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH.** (2000) Role of NF-kappa-B in p53-mediated programmed cell death. *Nature.* **404**, 892-897.
- **Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, and Wagner EF.** (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech. Dev.* **89**, 115–124.



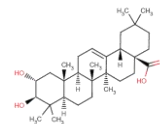
- **Sabapathy K, Kallunki T, David JP, Graef I, Karin M, and Wagner EF.** (2001). c-Jun NH₂-terminal kinase JNK1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J. Exp. Med.* **193**, 317–328.
- **Saimaru H, Orihara Y, Tansakul P, Kang YH, Shibuya M, Ebizuka Y.** (2007). Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **55**, 784-8.
- **Saleem M, Alam A, Arifin S, Shah MS, Ahmed B, and Sultana S.** (2001). Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. *Pharmacol. Res.* **43**, 127-34
- **Salti GI, Kichina JV, Das Gupta TK, Uddin S, Bratescu L, Pezzuto JM, Mehta RG, Constantinou AI.** (2001) Betulinic acid reduces ultraviolet-C-induced DNA breakage in congenital melanocytic naeval cells: evidence for a potential role as a chemopreventive agent. *Melanoma Res.* **11**, 99-104.
- **Salvesen GS, and Duckett CS.** (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 401–410.
- **Sarek J, Klinot J, Dzubak P, Klinotova E, Noskova V, Krecek V, Korinkova G, Thomson JO, Janostakova A, Wang S, Parsons S, Fischer P M, Zhelev N Z and Hajduch M.** (2003). New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *Journal of Medical Chemistry.* **46**, 5402-15.
- **Sarek J, Kvasnica M, Urban M, Klinot J, and Hajduch M.** (2005). Correlation of cytotoxic activity of betulinines and their hydroxy analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4196-200
- **Sax, JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry W.** (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nature Cell Biol.* **4**, 842-849.
- **Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME.** (1998). Two CD95 (Apo-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.
- **Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, and Pezzuto JM.** (1997) Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *European Journal of Cancer.* **33**, 2007.
- **Schwabe RF, Uchinami H, Qian T, Bennett BL, Lemasters JJ, Brenner DA.** (2004). Differential requirement for c-Jun NH₂-terminal kinase in TNF α - and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. *FASEB J.* **18**, 720-722.
- **Sebbagh M., Renvoize C., Hamelin J., Riche N., Bertoglio J., Breard J.** (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* **3**, 346-352.
- **Seigler DS.** (1998). Plant secondary metabolism. Ed: Springer (Kluwer Academic. Boston; London). ISBN: 0412019817.
- **Sena G, Onado C, Cappella P, Montalenti F, Ubezio P.** (1999). Measuring the complexity of cell cycle arrest and killing of drugs: kinetics of phase-specific effects induced by taxol. *Cytometry.* **37**, 113-24.
- **Serra C, Lampis G, Pompei R, Pinza M.** (1994). Antiviral activity of new triterpenic derivatives. *Pharmacol Res.* **29**, 359-66.



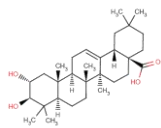
- **Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Aggarwal BB.** (2007). Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kappaB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kappaB activation. *Blood*. **109**, 2727-35.
- **Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M.** (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*. **103**, 897-907.
- **Shaulian E, and Karin M.** (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**, E131–E136.
- **Shibata S.** (1977), in *New natural products and plant drugs with pharmacological and therapeutical activity*, ed. H. Wagner and P. Wolff, Springer-Verlag, 1st edn. 177–196.
- **Shibata, S.** (1994) Antitumor-promoting and anti-inflammatory activities of licorice principles and their modified compounds. *Chemical Abstracts*. **120**, 124297t.
- **Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C.** (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. **91**, 325-334.
- **Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T, Hosoi H, Kinoshita T, Miyajima A, Houghton PJ, Look AT, Ozawa K, and Inaba T.** (2001) Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*. **21**, 854-864.
- **Shiota G, Harada K, Ishida M, Tomie Y, Okubo M, Katayama S, Ito H, Kawasaki H.** (1999). Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis*. **20**, 59-63.
- **Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB.** (2003). Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res*. **63**, 4375-83.
- **Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, Andreeff M, Aggarwal BB.** (2006). A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits IkkappaBalpha kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor kappaB-regulated gene products in human leukemic cells. *Clin Cancer Res*. **12**, 1828-38.
- **Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares AH, Smulson ME.** (1998). Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J Biol Chem*. **273**, 13703-12.
- **Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Smulson ME.** (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*. **59**, 2190-4.
- **Simon A, Najid A, Chulia AJ, Delage C, and Rigaud M.** (1992). Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta*. **1125**, 68–72,
- **Simopoulos A.** (2001). The Mediterranean Diets: What is so important about the diet of Greece? The scientific evidence, *Journal of Nutrition*. **131**, 3065S–3073S.



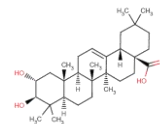
- **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.
- **Singh GB, Singh S, Bani S, Gupta BD, Banerjee SK.** (1992). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol.* **5**, 456-458.
- **Sohn KH, Lee HY, Chung HY, Young HS, Yi SY, and Kim KW.** (1995). Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Lett.* **94**, 213–218
- **Srinivasula S, Ahmad M, Alnemri T, and Alnemri E.** (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell.* **1**, 949–957.
- **Stadheim TA, Suh N, Ganju N, Sporn MB, and Eastman A.** (2002). The novel triterpenoid 2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oic acid (CDDO) potently enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 16448–16455
- **Stennicke H, Jurgenmeier J, Shin H, Deveraux B, Wolf X, Yang X, Zhou Q, Ellerby H, Ellerby L, Bredesen D, Green D, Reed J, Froelich C, and Salvesen G.** (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* **273**, 27084–27090.
- **Sterling Jr, and Cutroneo KR.** (2002) Differentiation dependent induction of CYP1A1 in cultured rat small intestinal Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis.* **23**, 2087–2093.
- **Stiti N, Triki S, Hartmann MA.** (2007). Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids.* **42**, 55-67.
- **Streffler JR, Bitzer M, Schabet M, Dichgans J, Weller M.** (2001). Response of radiochemotherapy-associated cerebral edema to a phytotherapeutic agent, H15. *Neurology.* **56**, 1219-21.
- **Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, and Bashford CL.** (2000). Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today.* **6**, 15-9
- **Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, and Dannenberg AJ.** (2000) Ursolic Acid Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription in Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Research.* **60**, 2399–2404
- **Subbaramaiah K, Yoshimatsu K, Scherl E, Das KM, Glazier KD, Golijanin D, Soslow RA, Tanabe T, Naraba H, Dannenberg AJ.** (2004). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem.* **279**, 12647-58.
- **Suh N, Honda T, Finlay HJ, Barchowsky A, Williams C, Benoit NE, Xie QW, Nathan C, Gribble GW, and Sporn MB.** (1998). Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* **58**, 717–723
- **Suh N, Wang Y, Honda T, Gribble GW, Dmitrovsky E, Hickey WF, Maue RA, Place AE, Porter DM, Spinella MJ, Williams CR, Wu G, Dannenberg AJ, Flanders KC, Letterio JJ, Mangelsdorf DJ, Nathan CF, Nguyen L, Porter WW, Ren RF, Roche NS, Subbaramaiah K, and Sporn MB.** (1999). A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyno-3, 12-dioxoolean-1, 9-dien- 28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative and anti-inflammatory activity. *Cancer Res.* **59** 336–341.



- **Suh N, Roberts AB, Birkey Reffey S, Miyazono K, Itoh S, ten Dijke P, Heiss EH, Place AE, Risingsong R, Williams CR, Honda T, Gribble GW, Sporn MB.** (2003) Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res.* **63**, 1371-6.
- **Sultana N, Lee NH.** (2007). Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytother Res* [Epub ahead of print]
- **Sun HX, Zheng QF, Tu J.** (2006). Induction of apoptosis in HeLa cells by 3beta-hydroxy-12-oleanen-27-oic acid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 1189-98.
- **Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM.** (1999). RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem.* **274**, 16871-16875
- **Surh YJ, Na HK, Lee JY, Keum YS.** (2001). Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Korean Med Sci.* **16**, S38-41.
- **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold A, Siderovski DP, Penninger JM, and Kroemer G.** (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* **397**, 441-446.
- **Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio T, Takahashi R.** (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.* **8**, 613-621
- **Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB.** (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Molec. Cell.* **24**, 841-851.
- **Syrovets T, Büchele B, Gedig E, Slupsky JR, Simmet T.** (2000) Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIalpha. *Mol. Pharmacol.* **58**, 71-81.
- **Taimen P, and Kallajoki M.** (2003). NuMA and nuclear lamins behave differently in Fas-mediated apoptosis. *Journal of Cell Science.* **116**, 571-583.
- **Tan YM, Yu R, and Pezzuto JM.** (2003) Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **9**. 2866-75
- **Tang F, Tang G, Xiang J, et al.** (2002). Absence of NF-kB-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor a induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* **22**, 8571-9.
- **Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, Takamatsu Y, Ito H, Hatano T, Sakagami H, Tokuda H, Nishino H, Sugita D, Shimura S, Yoshida T.** (2002). Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry.* **59**, 315-23.
- **Tartaglia L, Pennica D, Goddel DV.** (1993). Ligand passing. the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signalling by the p55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* **268**, 18542-18548

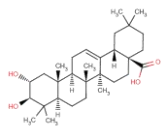


- **Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, and Verma I.** (2002). p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*. **1**, 493–503.
- **Thome M, and Tschopp J.** (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Cancer*. **1**, 50–58.
- **Thompson CB.** (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. **267**, 1456-62.
- **Thornberry NA, Lazebnik Y.** (1998) Caspases, enemies within. *Science*. **281**, 1312-6.
- **Thorpe GH, Kricka LJ.** (1986). Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol*. **133**, 331-53.
- **Tiano H, Chulada P, Spalding J, Lee C, Loftin C, Mahler J, Morham S, and Langenbach R.** (1997). Effects of cyclooxygenase deficiency on inflammation and papilloma development in mouse skin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*. **38**, 1727, 1997.
- **Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B.** (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J*, **15**.6189-6196
- **Tokuda, H., Ohigashi, H., Koshimizu, K., and Ito, Y.** (1986) Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett*. **33**, 279–285
- **Tolstikov TG, Sorokina IV, Tolstikov GA, Tolstikov AG, Flekhter OB.** (2006). Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Bioorg Khim*. **32**, 42-55.
- **Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, and Davis RJ.** (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. **288**, 870–874.
- **Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, and Davis RJ.** (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by pro-inflammatory cytokines. *Genes Dev*. **15**, 1419–1426.
- **Trumbull ER, Bianchi E, Eckert DJ, Wiedhopf RM, and Cole JR.** (1976). Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **65**, 1407-8
- **Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM., Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, and Fahey TJ** (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res*. **59**, 987–990, 1999.
- **Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, Suzuki H, Mukainaka T, Ichiishi E, Yasukawa K, Kasahara Y, Nishino H.** (2002). Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Lett*. **177**, 7-12.
- **Ullah F, Hussain H, Hussain J, Bukhari IA, Khan MT, Choudhary MI, Gilani AH, Ahmad VU.** (2007). Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic

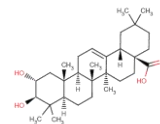


activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytother Res* [Epub ahead of print]

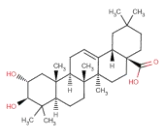
- **Umehara K, Takagi R, Kuroyanagi M, Ueno A, Taki T, and Chen YJ.** (1992) Studies on differentiation-inducing activities of triterpenes. *Chemical and Pharmacological Bulletin*, **40**, 401-405.
- **Urban M, Sarek J, Klinot J, Korinkova G, and Hajduch M.** (2004). Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *Journal of Natural Products*, **67**, 1100-5.
- **Urban M, Sarek J, Tislerova I, Dzubak P, and Hajduch M.** (2005). Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *Bioorganic and Mededical Chemistry Letters*, **13**, 5527-35.
- **van Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M.** (1997). The caspases-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Curr Biol*. **10**, 640-648.
- **Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W.** (1995). Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol*. **154**, 2904-2913.
- **Varfolomeev EE, Ashkenazi A.** (2004). Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?. *Cell*. **116**, 491-7.
- **Verma S, Zhao LJ, and Chinnadurai G.** (2001) Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem*. **276**, 4671-4676.
- **Vissers MN, Zock PL, Katan MB.** (2004) Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. *Eur J Clin Nutr*. **58**, 955-65.
- **Vogelstein B, Kinzler KW.** (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* **70**, 523-526.
- **Wajant H, Pfizenmaier K, and Scheurich P.** (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. **10**, 45-65.
- **Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, Williams J.** (1997). Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat Med*. **3**, 1034-6.
- **Walensky LD.** (2006). BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ*. **13**, 1339-50.
- **Wang D, Xia M, Cui Z.** (2006). New Triterpenoids Isolated from the Root Bark of *Ulmus pumila* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **54**, 775-8.
- **Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, and Korsmeyer SJ.** (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. **10**, 2859-2869.
- **Wang R, Wei Wang , Wang L, Liu R, Yi Ding , Du L.** (2006). Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. **77**, 534-7.
- **Wang X, Wang J, Wong SC, Chow LS, Nicholls JM, Wong YC, Liu Y, Kwong DL, Sham JS, Tsa SW.** (2000). Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells. *Life Sci*. **67**, 2663-71.



- **Wang YF, Lai GF, Efferth T, Cao JX, Luo SD.** (2006). New glycosides from *Tetracentron sinense* and their cytotoxic activity. *Chem Biodivers.* **9**, 1023-30.
- **Wang ZY, Agarwal R, Zhou ZC, Bickers DR, Mukhtar H.** (1991). Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and skin tumor initiating and tumor promoting activities in SENCAR mice by glycyrrhetic acid: comparison of 18 alpha- and 18 beta-stereoisomers. *Carcinogenesis.* **12**, 187-92.
- **Wang ZY, Nixon DW.** (2001). Licorice and cancer. *Nutr Cancer.* **39**, 1-11
- **Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, and Baldwin AS.** (1998). NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* **281**, 1680-1683.
- **Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, and Korsmeyer SJ.** (2001). Proapoptotic BAX and BAK, a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* **292**, 727-730
- **Weiss T, Grell M, Siekienski K, Muhlenbeck F, Durkop H, Pfizenmaier K, Scheurich P, Wajant H.** (1998). TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol.* **161**, 3136-3142
- **Wen-Xing D, and Xiao-Ming Y.** (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury. *J. Cell Mol. Med.* **8**, 445-454.
- **Wen X, Zhang P, Liu J, Zhang L, Wu X, Ni P, Sun H.** (2005). Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg Med Chem Lett.* **15**, 4944-8.
- **Weston, C. R., and R. J. Davis.** (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 14-21.
- **Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, and Ham J.** (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron.* **29**, 629-643.
- **Wick W, Grimmel C, Wagenknecht B, Dichgans J, and Weller M.** (1999). Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **289**, 1306-12.
- **Winesett MP, Ramsey GW, and Barnard JA.** (1996) Type II TGF(β) receptor expression in intestinal cell lines and in the intestinal tract. *Carcinogenesis.* **17**, 989-995.
- **Winking M, Sarikaya S, Rahmanian A, Jödicke A, Böker DK.** (2000). Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option?. *J Neurooncol.* **46**, 97-103.
- **Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW.** DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature.* **394**, 700-4.
- **Wood SR, Zhao Q, Smith LH, and Daniels CK.** (2003) Altered morphology in cultured rat intestinal epithelial IEC-6 cells is associated with alkaline phosphatase expression. *Tissue Cell.* **35**, 47-58.

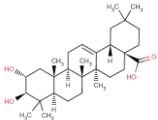


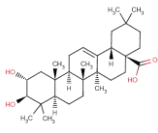
- **Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME.** (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. **270**, 1326-31.
- **Xu HX, Zeng FQ, Wan M, Sim KY.** (1996). Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J Nat Prod*. **59**, 643-5.
- **Xu R, Facio GC, and Matsuda SP.** (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*. **65**, 261-291.
- **Yamada T, Mori Y, Hayashi R, Takada M, Ino Y, Naishiro Y, Kondo T, and Hirohashi S.** (2003). Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient ApcMin/+ mice. *Cancer Res*. **63**, 895-901.
- **Yamagishi T, Zhang DC, Chang JJ, McPhail DR, McPhail AT, Lee KH.** (1988). The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and -B. *Phytochemistry*. **27**, 3213-3216.
- **Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ.** (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. **19**, 8469-78.
- **Yang M, Wang GJ, Wang SJ, Li XT, Xu YP, Wang SP, Xiang JD, Pan SR, Cao GX, Ye WC.** (2005). Quantitative analysis of 23-hydroxybetulinic acid in mouse plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **19**, 1619-23.
- **Yang ZG, Li HR, Wang LY, Li YH, Lu SG, Wen XF, Wang J, Daikonya A, Kitanaka S.** (2007). Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **55**, 15-8.
- **Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, Takeuchi M, and Nakagawa S.** (1991). Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology*. **48**, 72.
- **You HJ, Choi CY, Kim JY, Park SJ, Hahm KS, and Jeong HG.** (2001). Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- β activation in the resting macrophages. *FEBS Lett*. **509**, 156-160.
- **Young HS, Chung HY, Lee CK, Park KY, Yokozawa T, and Oura H.** (1994) Ursolic acid inhibits aflatoxin B₁-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biological Pharmacology Bulletin*. **17**, 990-992
- **Yu C, Minemoto Y, Zhang J, et al.** (2004). JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular Cell*. **13**, 329-40.
- **Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, and Vogelstein B.** (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. **7**, 673-682.
- **Zamzami N, Kroemer G.** (2001).The mitochondrion in apoptosis. How pandora's box opens. *Nature Rev Mol Cell Biol*. **2**, 67-71
- **Zani F, Cuzzoni MT, Daglia M, Benvenuti S, Vampa G, Mazza P.** (1993). Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* by *Glycyrrhiza glabra* extract, glycyrrhizinic acid, 18 α - and 18 β -glycyrrhetic acids. *Planta Med*. **59**, 502-7.



- **Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, and Korsmeyer SJ.** (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCLX(L). *Cell*. **87**, 619-628.
- **Zha J, Zhou Q, Xu L-G, Chen D, Li L, Zhai Z, Shu H-B.** (2004). RIP5 is a RIPhomologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Comm*. **319**, 298-303.
- **Zhang C, Ni X, Konopleva M, Andreeff M, Duvic M.** (2004). The novel synthetic oleanane triterpenoid CDDO (2-cyano-3, 12-dioxoolean-1, 9-dien-28-oic acid) induces apoptosis in Mycosis fungoides/Sézary syndrome cells. *J Invest Dermatol*. **123**, 380-7.
- **Zhao M, Eaton JW, and Brunk UT.** (2001) Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. *FEBS Lett*. **509**, 405-412.
- **Zhao W, Entschladen F, Liu H, Niggemann B, Fang Q, Zaenker KS, Han R.** (2003). Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. *Cancer Detect Prev*. **27**, 67-75.
- **Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, and Thompson CB.** (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*. **15**, 1481-1486.
- **Zou W, Liu X, Yue P, Zhou Z, Sporn MB, Lotan R, Khuri FR, Sun SY.** (2004). c-Jun NH2-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate in human lung cancer cells. *Cancer Res*. **64**, 7570-8.
- **Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, and Formelli F.** (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters*. **175**, 17.

Efecto anticancerígeno del ácido maslínico





Apéndice I

Abreviaturas

AIF, factor inductor de apoptosis (*apoptosis inductor factor*)

ANT, translocador del nucleótido adenina

AP-1, conjunto de factores de transcripción relacionados con apoptosis, (*activator proteins 1*)

Apaf-1, factor 1 activador de la proteasa apoptótica, (*apoptosis protease-activating factor 1*)

Apo2L, (*apoptosis ligand 2*)

ATF2, factor 2 de transcripción asociado a AP-1 (*activating transcription factor 2*)

(B), conformación en forma de bote (*boat*)

Bad, (*Bcl-2 associated death protein*)

Bak, (*Bcl-2 antagonist/killer protein*)

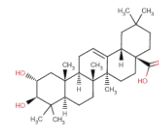
Bax, (*Bcl-2 associated x protein*)

Bcl-2, (*B cell lymphoma- 2 protein*)

Bcl-xL, (*B cell lymphoma protein XL*)

BH3, (*Bcl homology domain-3*)

Bid, (*BH-3 interacting DD protein*)



Bim, (*Bcl-2 interacting protein*)

Bmf, (*Bcl2 modifying factor*)

BMP, (*bone morphogenetic protein*)

BNIP, (*Bcl2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein*)

BPO, benzoilperóxido

BSA, (*bovine suerum albumine*)

(C), Conformación en forma de silla (*chair*)

CAD, complejo DNasa activado por caspasa

CARD, dominio de incorporación de caspasas (*caspase recruitment domain*)

CAS, cicloatrero sintasa (CAS)

Caspasa, cisteinil aspartato proteasa

CC₅₀, concentración citotóxica al 50%

CD95/Fas, antígeno de superficie (*FS7 (foreskin cell strain) associated sAg*),

CDDO, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico

CDDO-Im, CDDO imidazol

CDDO-Me, CDDO-metil éster

c-fos, proteína celular humana homóloga con el oncongen v-fos (*v-fos: Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus, FBJ-MuSV*)

c-jun, proteína celular humana homóloga con el oncongen v-jun (*v-jun: avian sarcoma virus 17, 17: junana en japonés*)

c-myc, proteína celular humana homóloga con el oncongen v-myc (*v-myc: avian myelocytomatosis viral oncogene*)

COX-1, ciclooxigenasa 1

COX-2, ciclooxigenasa 2

DD, dominio citoplasmático de muerte (*DD, death domain*)

DED, dominio efector de muerte (*death effector domain*)

DIABLO, (*direct IAP-associated bindingprotien with low PI*)

DISC, complejo señalizador de inducción de muerte celular (*death inducing signaling complex*)

DMBA, dimetil- benz[a]antraceno

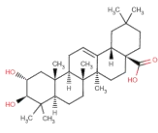
DMSO, dimetil sulfóxido

DNA, ácido desoxiribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

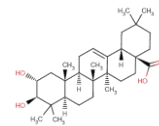
DNA-pk, proteína quinasa DNA dependiente

DPPH, (*1,1-diphenyl-2-picrylthydrazyl*)

DR, receptor de muerte celular (*death receptor*)



- ED₅₀**, valor de concentración que causa el 50 % de la inhibición de la proliferación celular
- EDTA**, ácido etilén diamino tetraacético
- ERK**, (*extracellular signal-regulated quinasa*)
- FACS**, contador activado por fluorescencia (*FACS, fluorescence activated cell sorter*)
- FADD**, proteína Fas asociada a dominio de muerte (*Fas protein associated death domain*)
- FAK**, quinasa de adhesión focal
- FAS**, (*Apoptosis stimulating fragment*)
- FasL**, ligando Fas (*Fas ligand*)
- FCS**, suero bovino fetal (*FCS, fetal calf serum*)
- FITC**, isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FLICE**, (*FADD-like ICE*)
- FLIP**, proteína celular inhibidora FLICE (*celular FLICE inhibition protein*)
- FS**, dispersión frontal (*forward scatter*)
- GI₅₀**, concentración que inhibe el 50% del crecimiento (*growth inhibition 50%*)
- IAPs**, (*cellular inhibitor apoptosis proteins*)
- IC₅₀**, concentración que inhibe la proliferación celular en un 50% (*concentration inhibition 50%*)
- IC₈₀**, concentración que inhibe la proliferación celular en un 80%
- ICAD**, inhibidor del complejo DNasa activado por caspasa
- ID₅₀**, dosis requerida para la mitad de la inhibición máxima (*death inhibition 50%*)
- IFN γ** , interferón γ
- IKK**, quinasa de I κ B
- I κ B**, inhibidor de NF- κ B (*inhibitor of NF- κ B*)
- IL-6**, interleuquina-6
- iNOS** óxido nítrico sintasa inducible
- IP**, yoduro de propidio
- JNK**, c-Jun N-terminal quinasa (*c-Jun N-terminal kinase*)
- LD₅₀** dosis letal al 50%, equivalente a IC₅₀ (*letal dosis 50%*)
- LPO**, peroxidación lipídica
- LPS**, lipopolisacárido
- MAPK**, proteínas quinasas activadas por mitógenos
- Mcl-1**, (*myeloid cell leucemia gene 1*)
- MDM2**, proteína humana homóloga con el oncogen *murine DM* (*mouse double minute 2*)
- MEK**, MAPK quinasa de ERK
- MKK7**, MAPK quinasa de quinasa 7



MMP-9, metaloproteinasas 9

MTT, (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*)

NF- κ B, factor nuclear $\kappa\beta$ (*nuclear factor $\kappa\beta$*)

NGFRs (*nerve growth factor receptors*)

NIK, quinasa inductora de NF- κ B (*NF- κ B inducing kinase*)

NO, óxido nítrico

NOD, (*nucleotide oligomerization domain*)

Noxa, también conocida como PMAIP1 (*PMA-induced protein 1*)

NuMA, (*nuclear mitotic apparatus protein 1*)

Omi, también conocida como HtrA2, (serina proteasa homóloga a HtrA, esencial para la supervivencia de *E. coli* a altas temperaturas)

OSC, óxidoescualeno ciclasa, también conocida como terpeno sintasa h (tpsh)

p21, inhibidor natural de ciclina dependiente de quinasa de 21 kDa

p38, MAPK quinasa de 38 kDa

p53, proteína tumoral p53, factor de transcripción de 53 kDa

PARP, poliADP-ribosa polimerasa

PBS, (*phosphate buffert saline*)

PGE₂, prostaglandina E2

PGs, prostaglandinas

PIGs, (*p53 induces genes*)

PKC, proteína quinasa C

PMA, (12-miristato-13-acetato-forbol)

pRb, (*praline rich protein BstNI subfamily*)

Puma, (*p53 upregulated modulator of apoptosis*)

Raf-1 (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*)

RIP, proteína receptora interactiva

ROS, especies oxígeno reactivas

SC, escualeno ciclasa, también conocida como terpeno sintasa g (tpsg)

Smac, (*second mitochondrial-derived activator of caspase*)

SS, dispersión lateral (*side scatter*)

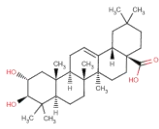
TBARS, sustancias tiobarbutirato reactivas

t-bid, Bid truncado

TBS, (*tris buffert saline*)

TGF, factor transformante del crecimiento (*transforming growth factor*)

TNFR1, receptor del factor de necrosis tumoral tipo I



TNFR2, receptor del factor de necrosis tumoral tipo II

TNFRs, (*tumor necrosis factor receptors*)

TNF α , factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor*)

TPA, 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

TRADD, adaptador del TNFR asociado a DD (*TNF receptor adaptador associated DD*)

TRAFs, factor asociado a TNFR (*TNF receptor associated factor*)

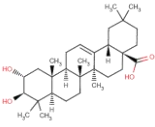
TRAIL, (*tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-Inducing ligand*)

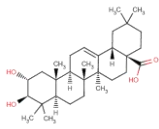
UVA, radiación ultravioleta A

WD40, motivo de unos 40 aminoácidos, terminado en un dipéptido triptófano / aspártico (W/D)

XIAP, inhibidor de apoptosis X-linked (*inhibitor of apoptosis, X-linked*)

Efecto anticancerígeno del ácido maslínico





Apéndice II

Índice de figuras y tablas

Figura 1.1 Estructura de los principales triterpenos tetra y pentacíclicos presentes en <i>Olea europea</i>	3
Figura 1.2 Estructura del ácido maslínico.	8
Figura 1.3 Ruta postulada para la biosíntesis de triterpenoides no esteroídicos en el fruto de <i>Olea europea</i>	9
Figura 1.4 Distribución del potencial electrostático e hidrofóbico del ácido maslínico y del ácido oleanólico	10
Figura 2.1 Estructura de algunos terpenos.....	29
Figura 2.2 Biosíntesis de triterpenoides en plantas.	37
Figura 2.3 Estructura del ácido betulínico, lupeol y sus derivados.	40
Figura 2.4 Estructura del ácido ursólico y sus derivados.	48
Figura 2.5 Estructura del ácido oleanólico y sus derivados.	55
Figura 2.6 Estructura del 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) y sus derivados	57
Figura 2.7 Estructura de los ácidos boswéllicos y sus derivados.	63
Figura 2.8 Estructura del ácido glicirrético y sus derivados	64
Figura 2.9 Estructura de las avicinas	66
Figura 2.10 Estructura los ginsenosídeos.	68
Figura 3.1 Dominios presentes en los distintos tipos de caspasas.....	73
Figura 3.2 Principales proteínas dianas de las caspasas efectoras.	75
Figura 3.3 Estructura de los receptores de muerte celular, TNFR-1 y CD95/Fas.	76
Figura 3.4 Ruta extrínseca de inducción de apoptosis a través de FAS/CD95	78

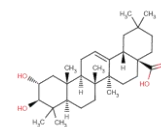


Figura 3.5 Estructura del proteosoma	79
Figura 3.6 Apoptosis inducida a través de los receptores de muerte celular TNF-R1 y TNF-R2.	81
Figura 3.7 Ruta intrínseca de inducción de apoptosis.	87
Figura 3.8 Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2,	90
Figura 3.9 Estructura de las proteínas de la familia Bcl-2	91
Figura 3.10 Participación de JNK en las rutas de inducción de apoptosis, inflamación y supervivencia celular	93
Figura 3.11 Apoptosis inducida por la activación de p53	101
Figura 3.12 Esquema-resumen de los principales procesos de apoptosis.	105
Figura 5.1 Imágenes de microscopía óptica de las células HT29, Caco-2, IEC-6 e IEC-18 (D).	114
Figura 5.2 Transformación del MTT a formazán. Espectro de absorción del formazán.	118
Figura 5.3 Esquema de un citómetro tipo FACS. Histograma del ciclo celular.	120
Figura 5.4 Diagrama en el que se observa los datos de apoptosis obtenidos por citometría de flujo.	123
Figura 5.5 Distintos tipos de cometa en función del tamaño de sus colas o “tail moment”.	125
Figura 5.6 Fragmentación del DNA a nivel de los nucleosomas.	127
Figura 5.7 Substrato peptídico con la secuencia diana (DEVD) típica de unión a caspasas.....	132
Figura 5.8 Reacción de hidrólisis del paranitrofenol fosfato catalizada por la fosfatasa alcalina	133
Figura 5.9 Esquema general de realización de <i>western blotting</i>	135
Figura 6.1 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en células HT29	144
Figura 6.2 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en células Caco-2	146
Figura 6.3 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-6	148
Figura 6.4 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-18.....	149
Figura 6.5 Imágenes de electroforesis en microgel de células HT29,	151
Figura 6.6 Representación del tamaño de las colas o ‘tail moment’ observado en células HT-29.....	152
Figura 6.7 Imágenes de electroforesis en microgel de células Caoc-2.....	154
Figura 6.8 Representación del tamaño de las colas o ‘tail moment’ observado en células Caco-2.	154
Figura 7.1 Histogramas del ciclo celular de células HT29 a 72h.....	159
Figura 7.2 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células HT29 a 72h.....	159
Figura 7.3 Representación de FS (<i>forward scatter</i>) frente a SS (<i>side scatter</i>), en células HT29 a 72h.....	160
Figura 7.4 Histogramas del ciclo celular de células HT29 a 96h.....	161
Figura 7.5 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células HT29 a 96h.....	161
Figura 7.6 Representación de los parámetros FS (<i>forward scatter</i>) frente a SS (<i>side scatter</i>) a 96h	162
Figura 7.7 Histogramas del ciclo celular de células Caco-2 a 72h.	163
Figura 7.8 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células Caco-2 a 72h.	163
Figura 7.9 Histogramas del ciclo celular de células IEC-6 a 72h.....	165
Figura 7.10 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células IEC-6 a 72h.	165
Figura 7.11 Histogramas del ciclo celular de células IEC-6 a 72 h.	167
Figura 7.12 Efecto del ácido maslínico sobre el ciclo celular de las células IEC-18 a 72h.....	167
Figura 7.13 El ácido maslínico induce la actividad fosfatasa alcalina intestinal.	169
Figura 8.1 Diagrama de la apoptosis inducida en células HT29 a 72h de tratamiento	173
Figura 8.2 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida en células HT29 a 72h	174
Figura 8.3 Diagrama de la apoptosis inducida en células Caco-2 a 72h de tratamiento	175
Figura 8.4 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida en células Caco-2 a 72h.....	175

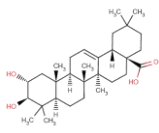


Figura 8.5 Diagrama de la apoptosis inducida en células IEC-6 a 72h de tratamiento..... 177

Figura 8.6 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida en células IEC-6 a 72h 177

Figura 8.7 Diagrama de la apoptosis inducida en células IEC-18 a 72h de tratamiento 179

Figura 8.8 Efecto del ácido maslínico sobre la apoptosis inducida en células IEC-18 a 72h..... 179

Figura 8.9 Imágenes de microscopía óptica de células HT29 a 24, 48 y 72 h de tratamiento 181

Figura 8.10 Imágenes de microscopía óptica de células Caco 2 a 24, 48 y 72 h de tratamiento 181

Figura 8.11 Cambios morfológicos en células HT29 y Caco-2 obtenidas por tinción Hoechst 184

Figura 8.12 Imágenes de células HT29 obtenidas por tinción con anexina V-FICT e Ioduro de propidio 186

Figura 8.13 Fragmentación del DNA de las células HT29 y Caco-2 a 72h de tratamiento..... 188

Figura 8.14 Actividad caspasa-3 en células HT29 y Caco-2 a 72h de tratamiento..... 190

Figura 9.1 Westerns y niveles de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en células HT29 194

Figura 9.2 Variaciones de los porcentajes de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 p(35) en células HT29 196

Figura 9.3 Westerns y niveles de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p50/55) en células HT29 198

Figura 9.4 Variaciones de los porcentajes de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p50/55) en células HT29..... 200

Figura 9.5 Westerns y niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células HT29..... 202

Figura 9.6 Variaciones de los porcentajes de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células HT29 204

Figura 9.7 Westerns y niveles de caspasa-7 (p17) y procaspasa-7 (p35) en células HT29..... 206

Figura 9.8 Variaciones de los porcentajes de caspasa-7 p(17) y procaspasa-7 p(35) células HT29..... 208

Figura 9.9 Westerns y niveles de citocromo-c citoplasmático en células HT29 210

Figura 9.10 Variaciones de los porcentajes de citocromo-c citoplasmático en células HT29 211

Figura 9.11 Westerns y niveles de Bcl-2 en células HT29..... 213

Figura 9.12 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bcl-2 en células HT29 215

Figura 9.13 Westerns y niveles de Bax en células HT29..... 217

Figura 9.14 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bax en células HT29 218

Figura 9.15 Westerns y niveles de Bid en células HT29..... 220

Figura 9.16 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bid en células HT29..... 221

Figura 9.17 Westerns y niveles de p53 en células HT29..... 223

Figura 9.18 Variaciones de los porcentajes de los niveles de p53 en células HT29 225

Figura 9.19 Westerns y niveles de JNK (p-JNK-2: p54; p-JNK-1: p46) en células HT29 227

Figura 9.20 Variaciones de los porcentajes de los niveles de JNK-1 en células HT29 229

Figura 9.21 Westerns y niveles de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en células Caco-2..... 231

Figura 9.22 Variaciones de los porcentajes de los niveles de procaspasa-3 (p35) en células Caco-2, 233

Figura 9.23 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-3 (p17) en células Caco-2 233

Figura 9.24 Westerns y niveles de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p55) en células Caco-2..... 235

Figura 9.25 Variaciones de los porcentajes de los niveles de procaspasa-8 (p55) en células Caco-2..... 237

Figura 9.26 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-8 (p23) en células Caco-2 237

Figura 9.27 Westerns y niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células Caco-2..... 239

Figura 9.28 Variaciones de los porcentajes de los niveles de caspasa-9 (p37) en células Caco-2 241

Figura 9.29 Westerns y niveles de Bid (p24) y t-Bid (p15) en células Caco-2 243

Figura 9.30 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bid (p24) en células Caco-2..... 245

Figura 9.31 Variaciones de los porcentajes de los niveles de t-Bid (p15) en células Caco-2..... 245

Figura 9.32 Westerns y niveles de Bax en células Caco-2 247

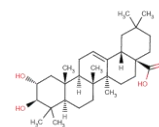


Figura 9.34 Westerns y niveles de Bcl-2 en células Caco-2	250
Figura 9.35 Variaciones de los porcentajes de los niveles de Bcl-2 en células Caco-2.....	251
Figura 9.36 Westerns y niveles de JNK (p-JNK-1, p46) en células Caco-2.....	253
Figura 9.37 Variaciones de los porcentajes de los niveles de p-JNK-1(p46) en células Caco-2.....	255
Figura 10.1 Variaciones de los porcentajes de viabilidad celular en las distintas líneas celulares	260
Figura 10.2 Variaciones en las colas de los cometas (<i>tail moment</i>) e imágenes de células HT29 y Caco-2.....	265
Figura 10.3 Incremento en las poblaciones celulares en cada fase del ciclo celular.....	270
Figura 10.4 Efectos sobre la diferenciación en las líneas tumorales de carcinoma de colon	273
Figura 10.5 Incremento de los niveles de apoptosis en las distintas líneas celulares	276
Figura 10.6 Efectos apoptóticos encontrados en las líneas HT29 y Caco-2	280
Figura 10.7 Variación en los porcentajes de las proteínas apoptóticas ensayadas en células HT29.	284
Figura 10.8 Ruta de inducción de apoptosis propuesta en la línea tumoral HT29.	287
Figura 10.9 Variación en los porcentajes de las proteínas apoptóticas ensayadas en células Caco-2	293
Figura 10.10 Ruta de inducción de apoptosis propuesta en la línea tumoral Caco-2	295
Tabla 1.1 Cambio en la proporción de triterpenoides durante el desarrollo del fruto de la <i>Olea europea</i>	5
Tabla 2.1 Clasificación estructural de los triterpenos cíclicos.....	30
Tabla 2.2 Ácido betulínico y sus derivados. Lupeol y sus derivados.....	40
Tabla 2.3 Ácido ursólico y sus derivados.	48
Tabla 2.4 Ácido oleanólico y sus derivados.	55
Tabla 2.5 CDDO y sus derivados.	57
Tabla 2.6 Ácido boswéllico y sus derivados.	63
Tabla 2.7 Ácido glicirrético y sus derivados.	64
Tabla 6.1, 6.2 y 6.3 Concentraciones de ácido maslínico utilizadas en la determinación de IC ₅₀ en HT29.....	141
Tabla 6.4 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en células HT29 tras 72h	143
Tabla 6.5 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad en células HT29	144
Tabla 6.6 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en células Caco-2 tras 72h	145
Tabla 6.7 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad en células Caco-2.....	146
Tabla 6.8 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-6.....	147
Tabla 6.9 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad en células IEC-6	147
Tabla 6.10 Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento en IEC-18.....	149
Tabla 6.11 Parámetros de ajuste de la curva de viabilidad en células IEC-6.....	149
Tabla 6.12 Resultados del tamaño de las 'colas de los cometas' en células HT29.	151
Tabla 6.13 Resultados obtenidos en el tamaño de las 'colas de los cometas' en células Caco-2	153
Tabla 7.1 Porcentaje de células HT29 en cada una de las distintas fases del ciclo celular tras 72h	159
Tabla 7.2 Porcentaje de células HT29 en cada una de las distintas fases del ciclo celular tras 96h	161
Tabla 7.3 Porcentaje de células Caco-2 en cada una de las distintas fases del ciclo celular	163
Tabla 7.4 Porcentaje de células IEC-6 en cada una de las distintas fases del ciclo celular.....	165
Tabla 7.5 Porcentaje de células IEC-18 en cada una de las distintas fases del ciclo celular	167
Tabla 7.6 Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina en células HT29 y Caco-2.....	168
Tabla 8.1 Porcentaje de apoptosis en células HT29 tras 72h.....	174
Tabla 8.2 Porcentaje de apoptosis en células Caco-2 tras 72h.	175

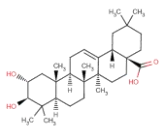
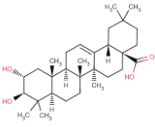
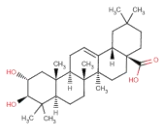


Tabla 8.4 Porcentaje de apoptosis en células IEC-6 tras 72h.	177
Tabla 8.5 Porcentaje de apoptosis en células IEC-18 tras 72h.	179
Tabla 8.6 Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas HT29.....	185
Tabla 8.7 Actividad enzimática caspasa-3 en células HT29 y Caco-2 tras 72h.....	189
Tabla 9.1 Porcentajes de los niveles de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en células HT29	195
Tabla 9.2 Porcentajes de los niveles de caspasa-8 (p23, p36/40) y procaspasa-8 (p50/55) en células HT29	199
Tabla 9.3 Porcentajes de los niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células HT29	203
Tabla 9.4 Porcentajes de los niveles de caspasa-7 (p17) y procaspasa-7 (p35) en células HT29	207
Tabla 9.5 Porcentajes de los niveles de citocromo-c citoplasmático en células HT29.....	210
Tabla 9.6 Porcentajes de los niveles de Bcl-2 en células HT29	214
Tabla 9.7 Porcentajes de los niveles de Bax en células HT29	218
Tabla 9.8 Porcentajes de los niveles de Bid en células HT29	221
Tabla 9.9 Porcentajes de los niveles de p53 en células HT29	224
Tabla 9.10 Porcentajes de los niveles de JNK en células HT29	228
Tabla 9.11 Porcentajes de los niveles de caspasa-3 (p17) y procaspasa-3 (p35) en células Caco-2	232
Tabla 9.12 Porcentajes de los niveles de caspasa-8 (p23) y procaspasa-8 (p55) en células Caco-2	236
Tabla 9.13 Porcentajes de los niveles de caspasa-9 (p37) y procaspasa-9 (p47) en células Caco-2	240
Tabla 9.14 Porcentajes de los niveles de Bid (p24) y t-Bid (p15) en células Caco-2	244
Tabla 9.15 Porcentajes de los niveles de Bax en células Caco-2	248
Tabla 9.16 Porcentajes de los niveles de Bcl-2 en células Caco-2	251
Tabla 9.17 Porcentajes de los niveles de JNK (p-JNK-1, p46; p-JNK-2, p54) en células Caco-2	254

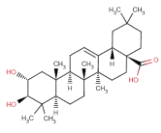
Efecto anticancerígeno del ácido maslínico





Apéndice III

Publicaciones



(2 α ,3 β)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells

Fernando J. Reyes^a, Josep J. Centelles^b, José A. Lupiáñez^a, Marta Cascante^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Granada, Granada, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, C/Marti i Franques, 1, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 14 July 2006; revised 9 October 2006; accepted 17 October 2006

Available online 27 October 2006

Edited by Lukas Huber

Abstract Triterpenoids are known to induce apoptosis and to be anti-tumoural. Maslinic acid, a pentacyclic triterpene, is present in high concentrations in olive pomace. This study examines the response of HT29 and Caco-2 colon-cancer cell lines to maslinic acid treatment. At concentrations inhibiting cell growth by 50–80% (IC₅₀HT29 = 61 ± 1 μM, IC₈₀HT29 = 76 ± 1 μM and IC₅₀Caco-2 = 85 ± 5 μM, IC₈₀Caco-2 = 116 ± 5 μM), maslinic acid induced strong G₀/G₁ cell-cycle arrest and DNA fragmentation, and increased caspase-3 activity. However, maslinic acid did not alter the cell cycle or induce apoptosis in the non-tumoural intestine cell lines IEC-6 and IEC-18. Moreover, maslinic acid induced cell differentiation in colon adenocarcinoma cells. These findings support a role for maslinic acid as a tumour suppressant and as a possible new therapeutic tool for aberrant cell proliferation in the colon. In this report, we demonstrate for the first time that, in tumoural cancer cells, maslinic acid exerts a significant anti-proliferation effect by inducing an apoptotic process characterized by caspase-3 activation by a p53-independent mechanism, which occurs via mitochondrial disturbances and cytochrome *c* release.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Maslinic acid; Triterpenoid compounds; Apoptosis; Cell cycle; Colon carcinoma cells

1. Introduction

Currently, about one-fourth of all medications contain an active ingredient derived from plants. Pentacyclic triterpenes, biosynthesised in plants by squalene cycling, have been used for more than 2000 years in traditional Asiatic medicine as anti-inflammatory and anti-carcinogenic agents. Moreover, their beneficial effects have been analysed by extensive preclinical and epidemiological studies [1–4]. Some natural triterpenoids such as oleanolic, betulinic and ursolic acids have shown notable effects in suppressing tumourigenesis as well as inhibiting tumours [1,5–9]. Also, a range of newly developed

synthetic triterpenoids are more potent than the naturally occurring parent structure [10,11]. In addition, several of these compounds induce apoptosis in a wide variety of cancer cells, including breast carcinoma, melanoma, hepatoma, prostate carcinoma and acute myelogenous leukaemia [7]. To identify potential new anticancer compounds, several pharmaceutical companies are currently evaluating extracts from plants, among these new natural triterpenoids and their derivatives [12–14].

Olives are a rich source of pentacyclic triterpenes such as oleanolic and maslinic acids. Maslinic acid is also the main component of protective wax-like coatings of olives. Researchers have recently sought to characterize oleanolic acid and its derivatives, which present strong anti-tumoural properties [10,11,13,14]. The natural triterpenoid maslinic acid (Fig. 1), which accounts for 80% of the wax in the olive skin, has also been isolated and found to be an antioxidant [15], although its properties as an anti-tumour agent have not yet been described. In this paper, we assess the anticancer properties of maslinic acid isolated from olive pomace. Maslinic acid has potent differentiating and anti-proliferation properties in colon-cancer lines, inducing cell-cycle arrest in the G₀ phase and apoptosis, through caspase activation, in these cells, but not in normal intestinal cell lines. Apoptosis or programmed cell death is defined as an active physiological process of cell self-destruction, with specific morphological and biochemical changes in the nucleus and cytoplasm. Apoptotic death is known to involve a cascade of proteolytic events driven mainly by family of cysteine proteases such as caspase-3, the major executioner of apoptosis. Agents that suppress the proliferation of malignant cells, by inducing apoptosis, may represent a useful mechanistic approach to both chemoprevention and chemotherapy of cancer. Due to these effects, maslinic acid isolated from olive pelt may provide a useful new therapeutic strategy for colon carcinoma.

2. Materials and methods

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO, USA), foetal bovine serum (FCS, Gibco-BRL, Eggenstein, Germany), penicillin/streptomycin (Gibco-BRL, Eggenstein, Germany), phosphate buffer saline (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA), dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA), Hoechst (Sigma, St. Louis, MO, USA), mowiol (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), annexin V-FICT (Bender Med-

*Corresponding author. Fax: +34 93 4021219.

E-mail address: martacascante@ub.edu (M. Cascante).

Abbreviations: FACS, fluorescence-activated cell sorter; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PI, propidium iodide

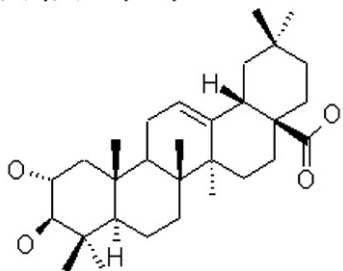
(2 α , 3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid.

Fig. 1. Structure of maslinic acid. ((2 α ,3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid. IUPAC name: 10,11-dihydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid).

Systems, Vienna, Austria), propidium iodide (PI, Sigma, St. Louis, MO, USA), culture flasks and well-plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland).

2.1. Drugs

Maslinic acid, a natural hydroxyl pentacyclic derivative from pressed olive (*Olea europaea*) fruits, is obtained from olive pomace, using the method described in patent number PCT/ES97/000190. Its molecular weight is 472.7. The extract used is a chemically pure white powder comprising 98% maslinic acid and is stable when stored at 4 °C. Maslinic acid was dissolved before use at 10 mg/ml in 50% DMSO and 50% PBS. Stock solution was frozen and stored at –20 °C. For treatments, this solution was diluted in cell culture medium.

2.2. Cell culture

Human colorectal adenocarcinoma cell lines HT29 (ECACC no. 91072201) and Caco-2, (ECACC no. 86010202), as well as normal mammalian intestinal cell lines IEC-6 (ECACC no. 88071401) and IEC-18 (ECACC no. 88011801) (all cell lines used were provided by the cell bank of the University of Granada, Spain) were cultured in DMEM, supplemented with 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated FCS, 10000 units/ml of penicillin, and 10 mg/ml of streptomycin. Subconfluent monolayers of cells were used in all experiments. In the following some relevant characteristics of this cell lines are summarized.

HT29 cells were isolated from a colon cancer of a 44 years old Caucasian female. These cells are a common cell line used in colon cancer studies. Their tumorigenic capacity has been shown in nude mice, they form well differentiated adenocarcinoma consistent with colonic primary (grade I); and they also form tumors in steroid treated hamsters. This cell line is positive for the expression of: myc+, ras+, myb+, fos+, p53+, abl–, ros–, src– (ATCC: HTB-38). Doubling time is around 48 h in normal culture conditions.

Caco-2 cells were isolated from a colon cancer of a 72 years old Caucasian male. Their tumorigenic capacity has been shown in nude mice, they form moderately well differentiated adenocarcinoma consistent with primary colon (grade II). When reaching confluence, cells express enterocyte differentiation characteristics. Doubling time is around 62 h. (ATCC: HTB-37). The line is positive for expression of oncogenes: p53–, ras+, myc+, TGF b–, TGF a+.

The two cells lines not present significant differentiation at the level of DNA mismatch proteins as describes in [16,17]. Respect to oxidative damages both cellular lines present the similarity resistance to H₂O₂ cytotoxicity [17], and similar antioxidants enzyme activity like glutathione peroxidase [18].

The rat intestinal epithelial cell line (IEC-6) was originally described as an homogenous population of epithelial-like cells with large, oval nuclei, growing as tight colonies of polygonal, closely opposed cells [19,20]. Ultrastructural characteristics include: microvilli in a perinuclear region; numerous mitochondria; a junctional complex; microfilaments especially prominent near the cell surface and sites of cell–cell contact. All these features are consistent with those of intestinal crypt cells. Since the establishment and characterization of this cell line, IEC-6 cells have been used in numerous studies to elucidate mechanisms of differentiation [21,22].

IEC-18 cells, a cell line derived from the rat intestinal ileum, have normal cells' characteristics, since they have a contact inhibited cell growth, do not form colonies in soft agar and are not tumorigenic when injected in nude mice. IEC-18 has normal rat diploid karyotype, a similar growth rate and surface antigens to intestinal epithelial cell in vivo [19,23]. IEC-6 and IEC-18 cells express characterised antigens from intestinal epithelia, these cells line have been qualified as normal intestinal cells or non-transformed intestinal cells in numerous papers [22,24–28].

Human colorectal adenocarcinoma cell lines HT29 (ECACC no. 91072201) and Caco-2, (ECACC no. 86010202), as well as normal mammalian intestinal cell lines IEC-6 (ECACC no. 88071401) and IEC-18 (ECACC no. 88011801) (all cell lines used were provided by the cell bank of the University of Granada, Spain) were cultured in DMEM, supplemented with 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated FCS, 10000 units/ml of penicillin, and 10 mg/ml of streptomycin. Subconfluent monolayers of cells were used in all experiments.

2.3. MTT assay

Cell viability was determined by measuring the absorbance of MTT dye staining of living cells, as described elsewhere [29]. For this assay, 6 × 10³ HT29 cells/well and 15 × 10³ Caco-2 cells/well were cultured on 96 well plates.

Concentrations that inhibited cell growth by 50% (IC₅₀) and 80% (IC₈₀) after 72 h of treatment were calculated based on the survival rate compared with untreated cells. Relative cell viability was measured by the absorbance on an ELISA plate reader (Tecan Sunrise MR20-301, TECAN, Austria) at 550 nm.

2.4. Hoechst-stained

The morphological changes were analysed by fluorescent microscopy using Hoechst staining. For this, 175 × 10³ HT29 cells/well and 4 × 10⁵ cells/well were plated in 6 well plates. After 24 h maslinic acid was added and the cells were incubated for 24, 48 and 72 h at their respective IC80 values obtained at 72 h. Then the cells were washed twice with PBS and harvested by trypsinization. The cells were resuspended in 100% MetOH cold for 3 min. Afterwards, cells were washed in PBS and incubated in 500 μL of Hoechst solution 50 ng/mL in PBS for 15 min in darkness. The samples were prepared with mounting medium mowiol and visualized by fluorescent microscopy (DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with a DAPI filter.

2.5. Cell-cycle analysis

The cell cycle was analysed with flow cytometry by using a fluorescence-activated cell sorter (FACS) at 488 nm in an Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA), as described previously [30]. For this assay 175 × 10³ HT29 cells/well, 4 × 10⁵ Caco-2 cells/well, 150 × 10³ IEC-6 cells/well and 50 × 10³ IEC-18 cells/wells were plated in 6 well plates with 2 ml of medium. After 24 h, maslinic acid was added and the cells were incubated for 72 h with maslinic acid. Maslinic acid doses used were the respective IC50 and IC80 values for the tumoral cell lines. IEC-6 and IEC-8 cells were incubated with maslinic acid concentrations corresponding to the IC50 and IC80 determined for HT29 cells at 72 h. In addition, HT29 cells were incubated with their IC50 and IC80 concentrations for 96 h to observe the appearance of subG0 peaks. All experiments were performed five times with two replicates per experiment.

2.6. Annexin V-FITC binding assay

The same numbers of HT29, Caco-2, IEC-6 and IEC-18 cells as in the cell-cycle assay were treated with maslinic acid, as described above. Cells were collected and resuspended in binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Annexin V-FITC conjugate (1 μg/ml) was added and incubated for 30 min at room temperature in darkness. Just before FACS analysis, cells were stained with 20 μL of 1 mg/ml PI solution. In each experiment, approximately 20 × 10³ cells were analysed and the experiment was performed five times.

2.7. Assay for Caspase-3 protease

Caspase-3 activity was measured using a colorimetric assay (caspase-3 colorimetric assay kit, Sigma, St. Louis, MO, USA) based on the hydrolysis of the peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp

p-Nitroaniline (Ac-DEVD-pNA) by caspase-3, resulting in the release of the *p*-nitroaniline. In short, 1.2×10^6 HT29 cells/well and 2.7×10^6 Caco-2 cells/well were cultured in 100-mm plates and were treated for 72 h with maslinic acid at their IC₅₀ and IC₈₀ concentrations. Cells were lysed with lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM Chaps, 5 mM dithiothreitol) for 20 min on ice, and cell lysates were diluted with the assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% Chaps, 5 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA) containing 0.2 mM of caspase-3 substrate. The *p*-nitroaniline concentration was determined by the absorbance measured at 405 nm using an ELISA reader.

2.8. DNA fragmentation analysis

The same numbers of HT29 and Caco-2 cells as for the caspase-3 assay were treated with maslinic acid. Chromosomal DNA was isolated using a real pure extraction kit (Real, Durviz, Valencia, Spain) and ladder-formation assays were made as described previously [18,31]. This assay was performed four times in both cell types.

2.9. Preparation of cytosolic extracts for cytochrome *c* analysis

HT29 cells (1.2×10^6) were cultured in 100-mm plates and were treated for 48 and 72 h with maslinic acid at its IC₅₀ concentrations. After treatment, HT29 cells were washed with ice-cold PBS and resuspended in ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml of pepstatin A, 2 µg/ml of leupeptin and 10 µg/ml of aprotinin). After incubation on ice for 30 min, cells were homogenized with 15 strokes of pre chilled pestle B homogenizer (Sigma, St Louis, MO, USA), and the homogenates were centrifuged at $25000 \times g$ for 30 min at 4 °C. Supernatants were further centrifuged at $25000 \times g$ for 30 min at 4 °C and stored at -80 °C for cytochrome *c* analysis.

2.10. Western blotting

HT29 cells (1.2×10^6) were treated with maslinic acid at their IC₅₀ values of concentration for 48 and 72 h. Caco-2 cells (2.7×10^6) were treated at their IC₅₀ value for 6 and 12 h. Non-cancer cells IEC-6 (1.0×10^6) and IEC-18 (3.0×10^6) were treated at HT29 cells' IC₅₀ for 6, 12, 48 and 72 h. After treatment, the cells were washed twice with PBS and resuspended in lysis buffer (20 M Tris/acetate, pH 7.5, 270 mM sucrose, 1 mM EDTA, pH 8.8, 1 mM EGTA, pH 8.8, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadate, 1 mM sodium glycerophosphate, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM benzamidine, 34.8 µg/ml PMSF, 5 µg/ml leupeptine). The samples, homogenized by ultrasonic and incubated on ice for 20 min, were then centrifuged at $12000 \times g$ for 15 min, and supernatants were assayed for protein concentration using BCA kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

For the Western-blot analysis, 50 µg of proteins were loaded on a 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinyl nitrocellulose transfer membrane (Bio-Rad Laboratories, Richmond, C, USA). The membranes were blocked by incubation in TBS buffer containing

0.1% of Tween and 5% of dry milk for 1 h at room temperature and washed 3 times with TBS buffer of 0.1% Tween. Then membranes were blotted overnight at 4 °C with primary antibodies rabbit polyclonal anti-caspase 3 (1/1000, Cell Signalling Technology, Danvers, USA). For cytochrome *c* determination, membranes were blotted for 1 h at 25 °C with a mouse monoclonal primary antibody anti-cytochrome *c* (1/3000, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). The blots were washed 3 times with TBS-0.1% Tween and developed with peroxidase-linked secondary antibodies (1/3000, Santa Cruz Biotechnology, California, USA). All blots were developed by ECL Western Blotting Detection Kit Reagent (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) and detected using LAS-3000 imaging system (Fuji Photo Film (Europe), TK Tilburg, The Netherlands).

2.11. Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase activity was measured by *p*-nitrophenol formation from *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA). For this assay 1.2×10^6 HT29 cells/well and 2.7×10^6 Caco-2 cells/well were treated with maslinic acid at IC₅₀ and half IC₅₀ concentrations. After incubation, HT29 and Caco-2 cells were collected by scraping. Cells were broken with lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 g/L Triton X-100, 0.2 g/L of sodium deoxycholate and 0.2 mM PMSF) and centrifuged at $100000 \times g$ for 1 h at 4 °C. Alkaline phosphatase activity was measured in the supernatants as described previously [31].

2.12. Statistics

Data are given as the means ± S.E.M. For each assay, the Student's *t* test was used for statistical comparison with the untreated control cells.

3. Results

3.1. Maslinic acid inhibits colon adenocarcinoma cell proliferation

We examined the effect of maslinic acid on the proliferation of HT29 and Caco-2 adenocarcinoma cell lines using the MTT assay. HT29 and Caco-2 cells were treated with increasing doses of maslinic acid; their viability was determined by formazan dye uptake and expressed as percent of untreated control cell proliferation. Maslinic acid induced a dose-dependent decrease in viable formazan accumulating cells after 72 h of treatment, ranging from 0 to 120 µM (Fig. 2). Concentrations of maslinic acid required for 50% growth inhibition (IC₅₀) were 61 ± 1 µM for HT29 and 85 ± 5 µM for Caco-2 cells and for 80% growth inhibition (IC₈₀) were 76 ± 1 µM for HT29 and

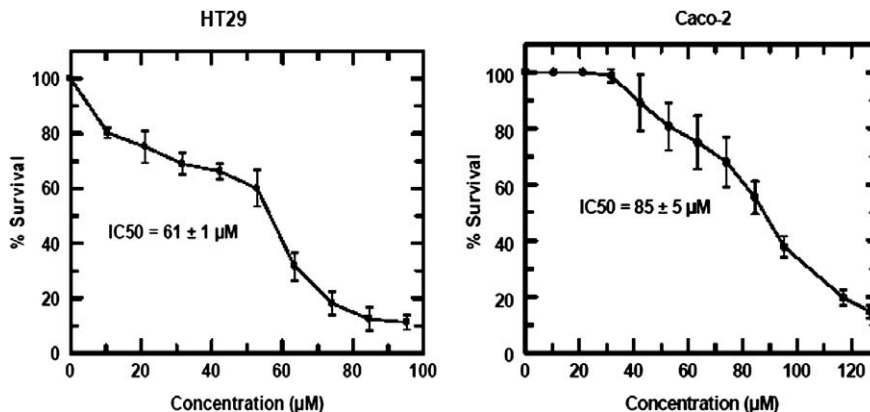


Fig. 2. Growth-inhibitory effects of maslinic acid on HT29 and Caco-2 colon cancer cells. Exponentially growing cells were treated with the concentration of maslinic acid indicated for 72 h. Cell-growth inhibition was analysed by the MTT assay, as described in Section 2. Inset, IC₅₀ values of the individual cell lines. The assay was done using six replicates and repeated eight times. Points, means ± S.E.

$116 \pm 5 \mu\text{M}$ for Caco-2 cells. At the IC₅₀ and IC₈₀, the values of maslinic acid found for HT29 after 72 h of incubation the survival rates of IEC-6 were 78% at IC₅₀ and 63% at IC₈₀, and those of IEC-18 were 68% at IC₅₀ and 62% at IC₈₀.

3.2. Maslinic acid induces morphological changes

The Hoechst procedure stains nuclei that contain nicked DNA, a characteristic exhibited by cells in apoptotic cell death. Morphological analysis of Hoechst-stained cells, in HT29 and Caco-2 cells, indicated that they had undergone remarkable morphological changes (Fig. 3). After 48 h exposure to maslinic acid at IC₈₀ concentration, the cells showed typical apoptotic changes, including cell shrinkage, chromatin condensation, and loss of normal nuclear architecture. At 72 h of incubation the disruption of cell-membrane integrity was more prominent. Fluorescence microscopic observation after Hoechst staining showed that a relevant number of cells treated with maslinic acid acquired apoptotic features, as evident from nuclear fragmentation.

3.3. Maslinic acid induces cell-cycle arrest and apoptosis

HT29 and Caco-2 cells treated with maslinic acid at IC₅₀ and IC₈₀ concentrations showed a significant increase in the population in G₀/G₁ phases (increases of 13% for HT29 and 13% for Caco-2 at IC₅₀, and of 22% for HT29 and 11% for Caco-2 at IC₈₀) with a concomitant decrease in the percentage of cells in the S phase (10% for HT29 and 12% for Caco-2 at

Table 1
Cell-cycle analysis of maslinic acid-treated cells

Cell line	Maslinic (μM)	Phase of cell cycle (% of cells)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HT29	0	62 \pm 5	30 \pm 6	8 \pm 3
	61	75 \pm 5**	20 \pm 4**	4 \pm 4*
	76	84 \pm 6**	12 \pm 6**	4 \pm 1**
Caco-2	0	76 \pm 12	21 \pm 9	5 \pm 4
	85	89 \pm 5**	9 \pm 5**	2 \pm 1*
	116	87 \pm 3*	6 \pm 5**	7 \pm 5
IEC-6	0	68 \pm 6	12 \pm 4	20 \pm 5
	61	69 \pm 6	9 \pm 4	21 \pm 3
	76	70 \pm 2	9 \pm 2	21 \pm 3
IEC-18	0	77 \pm 9	10 \pm 2	13 \pm 7
	61	80 \pm 10	10 \pm 2	11 \pm 8
	76	82 \pm 5	10 \pm 2	8 \pm 3

HT29 and Caco-2 cells were untreated (first value) or treated with maslinic acid at their IC₅₀ (second value) or IC₈₀ (third value) concentrations. IEC-6 and IEC-18 were treated with concentrations of IC₅₀ and IC₈₀ for HT29 cells. All cell lines were treated for 72 h at 37 °C. Cell-cycle analysis was conducted after propidium iodide staining, as described in Section 2. Values represent means \pm S.E. of seven independent experiments. Key (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, with respect to the untreated cells.

IC₅₀, and 18% for HT29 and 15% for Caco-2 at IC₈₀) with respect to untreated cells, suggesting G₀/G₁ arrest (Table 1).

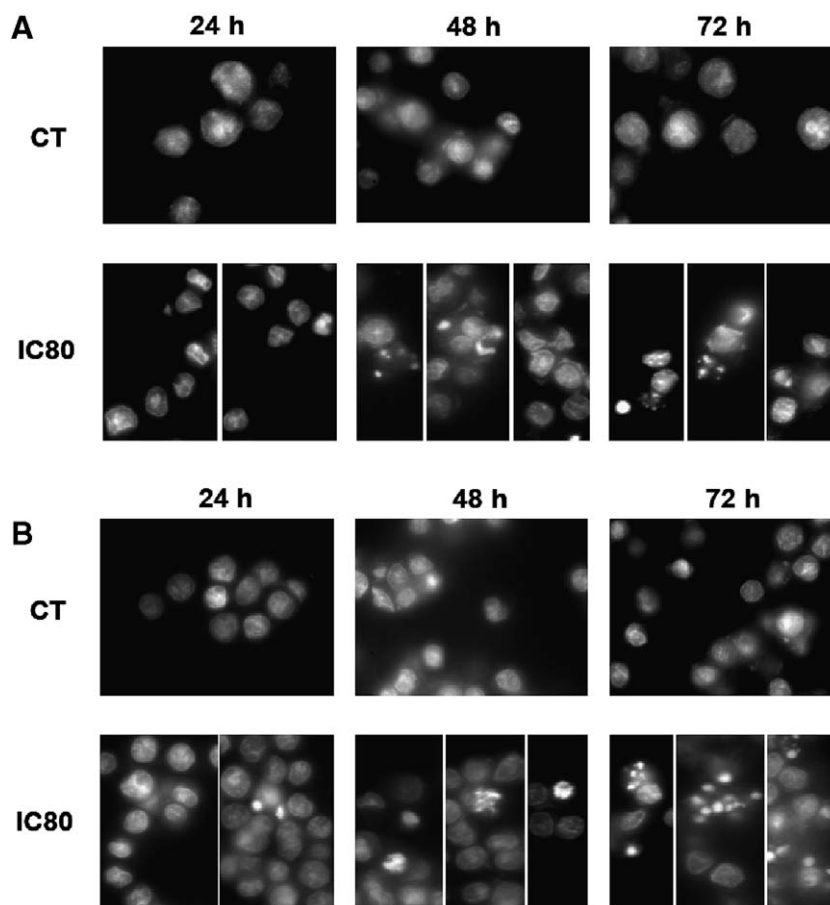


Fig. 3. Morphology changes in colon cancer cells. Morphology of HT29 (A) and Caco-2 (B) cells after exposure to maslinic acid was examined using fluorescence microscopy after Hoechst staining at 24, 48 and 72 h of treatment.

Moreover, a sub-G0 peak was detected at 96 h of incubation in HT29 cells in response to treatment with maslinic acid, indicating that cells underwent apoptosis. These results suggest that maslinic acid induced cell-cycle arrest in HT29 and Caco-2 cells coinciding with apoptotic cell death. At these concentrations of maslinic acid, no effect was observed on the cell cycle of the normal intestinal cell lines IEC-6 and IEC-18 (Table 1).

Assessment of apoptosis in HT29 and Caco-2 cells was performed 72 h after treatment with maslinic acid at the concentrations mentioned above for the analysis of cell cycle. FACS analysis using Annexin V-FITC staining and PI accumulation was used to differentiate early apoptotic cells (Annexin V⁺ and PI⁻) from late apoptotic/necrotic cells (Annexin V⁺ and PI⁺). In comparison with untreated controls, maslinic acid treatment of HT29 cells generated apoptosis in 25% of cells at a concentration of IC50 (14% early apoptosis and 11% late apoptosis/necrosis) and in 38% of cells at IC80 (27% early apoptosis plus 11% late apoptosis). In Caco-2 cells the percentage of apoptosis at IC50 was 14% (7% early apoptosis plus 7% late apoptosis/necrosis) with respect to the untreated controls, lower than in HT29, but at IC80 the rate increased dramatically to 60% (15% early apoptosis plus 45% late apoptosis/necrosis), due to a marked increase in the number of late apoptotic cells (Fig. 4). At these concentrations of maslinic acid, no effect on apoptosis induction was observed in the normal intestinal cell lines IEC-6 and IEC-18. Annexin-V binding assay thus confirmed the observation that maslinic acid induced both cell-cycle arrest and apoptosis.

3.4. Involvement of caspase-3 in maslinic acid induced apoptosis

For a direct examination of the involvement of caspase-3 in maslinic acid-induced apoptosis, caspase-3 activity was determined in cells treated with maslinic acid for 72 h (at IC50 and IC80) using a colorimetric assay based on the hydrolytic rupture of the peptide Ac-DEVD-pNA. As shown in Fig. 5, maslinic acid caused a concentration-dependent activation of caspase-3 in both HT29 and Caco-2 cells.

3.5. Maslinic acid induces DNA fragmentation

Internucleosomal DNA fragmentation in HT29 and Caco-2 cells induced by maslinic acid was detected by DNA ladder on

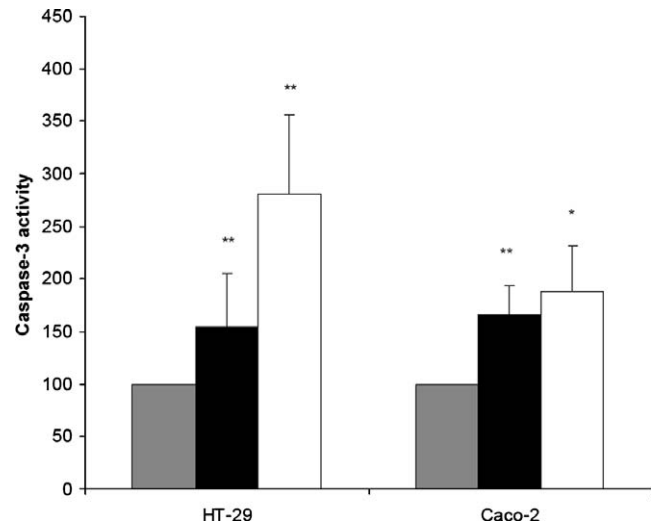


Fig. 5. Maslinic-acid-induced apoptosis through activation of caspase-3. HT29 and Caco-2 cells were untreated (grey bars) or treated for 72 h with their corresponding IC₅₀ (black bars) or IC₈₀ (white bars) concentrations. Cell extracts were prepared and assayed for caspase-3 activity as described in Section 2. Values represent means ± S.E. of seven experiments. Key (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ with respect to the untreated cells.

agarose gels. DNA extracted from HT29 and Caco-2 cells treated with maslinic acid for 72 h displayed a characteristic ladder pattern of discontinuous DNA fragments on agarose-gel electrophoresis at both IC50 and IC80, while untreated controls did not (Fig. 6). The effect of maslinic acid on DNA fragmentation was similar in HT29 and Caco-2 cells.

3.6. Western blotting

To begin to address the mechanism by which maslinic acid causes apoptosis, we first examined whether caspase-3 protease is involved in the cell death response in HT29 and Caco-2, and in non-tumoural intestinal cells IEC-6 and IEC-18, for different incubation times. Caspase-3 activity significantly increased after 72 h of treatment (Fig. 5). Then we investigated whether the apparent promotion of apoptosis by maslinic acid could be

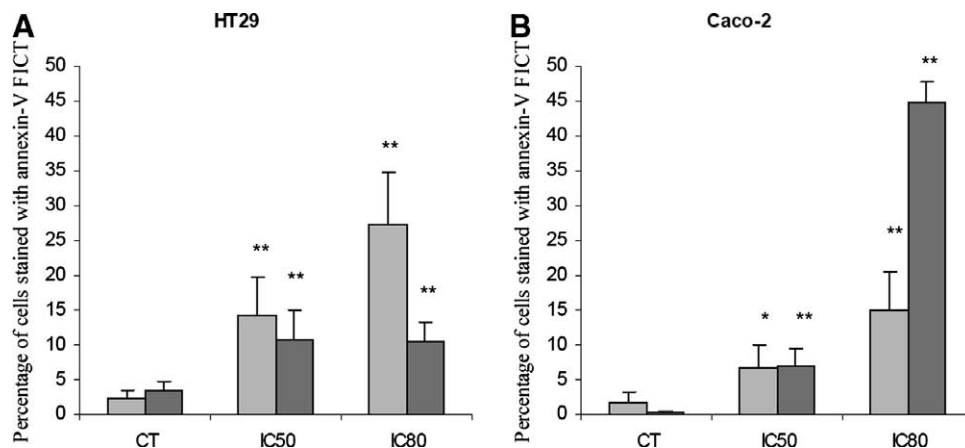


Fig. 4. Flow cytometry analysis of Annexin V-FITC staining and PI accumulation after exposure of HT29 and Caco-2 cells to maslinic acid for 72 h. Cell lines were treated with maslinic acid at a concentration equal to its IC₅₀ or its IC₈₀ values. Early apoptotic cells (light-grey bars) were Annexin V⁺ PI⁻, whereas late apoptotic/necrotic cells (dark-grey bars) were Annexin V⁺ PI⁺. Values are expressed as means ± S.E. of five experiments in duplicate. Key (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, compared with the corresponding value in untreated cells.

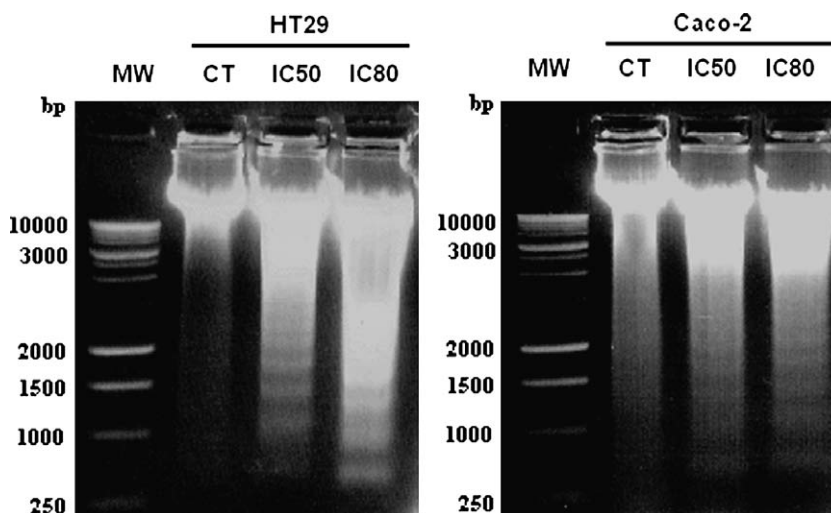


Fig. 6. DNA fragmentation after exposure to maslinic acid. Both HT29 and Caco-2 cells were exposed for 72 h to their IC₅₀ and IC₈₀ concentrations. Genomic DNA was extracted as described in Section 2, electrophoresed in a 1.5% agarose gel, and visualized with ethidium bromide staining.

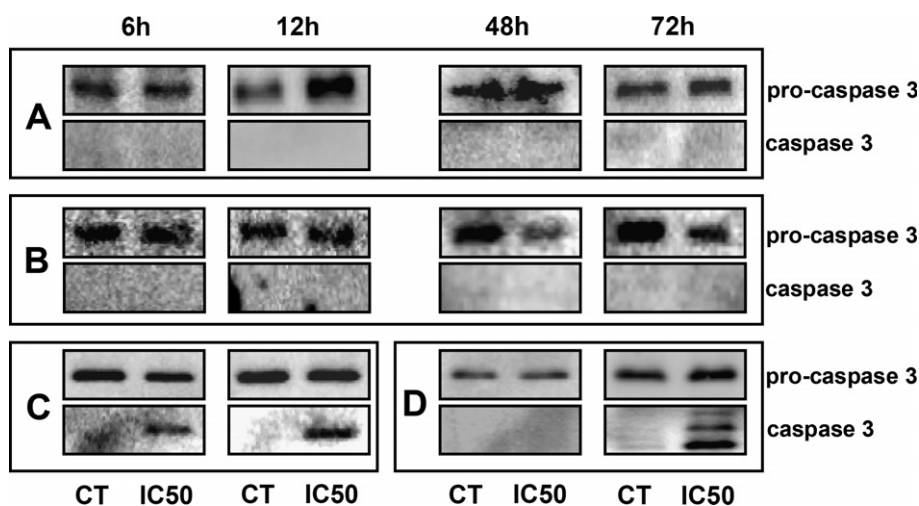


Fig. 7. Caspase-3 induction in tumoural colon-cancer cells and in non-tumoural intestinal cells. Effect of maslinic acid on caspase-3 activation in non-tumoural cells IEC-6 and IEC-18 at 6, 12, 48, 72 h of treatment (A,B). Effect on tumoural cells Caco-2 at 6, 12 h of treatment (C) and in HT29 cells after 48 and 72 h of treatment (D). In non-tumoural cells, no caspase-3 activation was observed, while Caco-2 cells showed early caspase-3 activation (6, 12 h), and in HT29 cells caspase-3 activation was very late (72 h).

linked to a variation in caspase-3 expression at the different incubation times of 6, 12, 48 and 72 h (Fig. 7). At 6 or 12 h of treatment, caspase-3 was activated in Caco-2 cells but not in HT29 cells. In HT29 cells the caspase-3 activation at IC50 was very late (at 72 h of treatment), whereas in Caco-2 cells this activation occurred early (at 6 h of treatment). In non-tumoural cells IEC-6 and IEC-18, no effect was detected on caspase-3 activation at the maslinic-acid concentration used for any of the times assayed.

In most cases the apoptosis involves a disruption of mitochondrial membrane integrity that is decisive for the cell-death process. We next evaluated the effects of maslinic acid on the release of mitochondrial cytochrome *c* into the cytosol in HT29 cells. Western-blot analysis, shown in Fig. 8, revealed that the treatment of HT29 cells with its IC50 concentration induce the release of mitochondrial cytochrome *c* into the cytosol at 48 and 72 h. Taken together, these result lead us to conclude that the mitochondria plays an important role in the

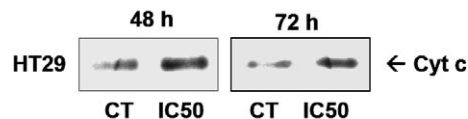


Fig. 8. Cytochrome *c* induction in HT29 colon cancer cells. Effect of maslinic acid on cytosolic cytochrome *c* release in HT29 cells at 48 and 72 h of treatment. Cytosolic lysates were analysed by immunoblotting with anti-cytochrome *c*, as described in Section 2.

activation of caspase-3 and in the induction of apoptosis triggered by maslinic acid in colon carcinoma cells.

3.7. Maslinic acid induce increase in alkaline phosphatase activity

To determine the differentiation effect of the maslinic acid on colon cancer cells we have quantified the alkaline phosphatase activity before and after maslinic acid treatment. The increase

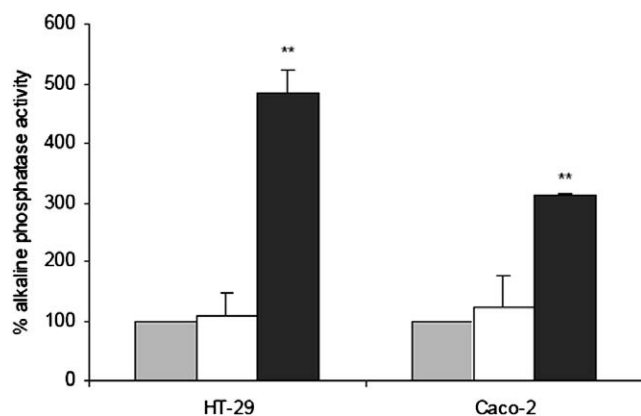


Fig. 9. Maslinic acid induced alkaline phosphatase activity. HT29 and Caco-2 cells were untreated (grey bars) or treated for 72 h with their corresponding IC₅₀ (black bars) or half IC₅₀ (white bars) concentrations. Cell extracts were prepared and assayed for alkaline phosphatase activity as described in Section 2. Values represent means \pm S.E. of four experiments. Key (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ with respect to the untreated cells.

of the activity of this enzyme is used as a differentiation marker in colon cancer cells [32].

The result showed an increase in alkaline phosphatase activity in a dose-dependent way at 72 h, being higher at IC₅₀ than at half IC₅₀ concentrations. In HT29 cells the increment was of fourfold at IC₅₀ concentrations, in Caco-2 cells this increment was twofold respect to the control untreated cells (Fig. 9). This result along with the G0/G1 arrest indicates that the maslinic acid produce cell differentiation effects in colon cancer cells.

4. Discussion

Many modern anti-cancer drugs are secondary metabolites with high bioactivity. Triterpenoids exert various pharmacological effects to control many diseases, including cancer [3,6,33–36]. The present study is the first to evaluate the potential anti-tumoural effects of maslinic acid, a new triterpenoid isolated as a majority compound from olive-pelt pomace. Our data provide evidence that maslinic acid exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in HT29 and Caco-2 colon adenocarcinoma cell lines. Moreover, maslinic acid induces morphological changes that are characteristic of apoptosis, such as chromatin condensation and fragmentation as well as cell shrinkage, as demonstrated by fluorescence microscopy. Analysis of the mechanisms of maslinic-induced cell death indicated activation of caspase-3 and DNA fragmentation, suggesting apoptotic cell death. Quantification of apoptosis using annexin V-FITC and PI staining by FACS analysis showed that the percentage of apoptotic cells at IC₅₀ was lower in Caco-2 cells 14% (7% early apoptosis plus 7% late apoptosis/necrosis) than in HT29 cells 25% (14% early apoptosis and 11% late apoptosis/necrosis); at IC₈₀, however, it increased dramatically and was even higher in Caco-2 cells 60% (15% early apoptosis plus 45% late apoptosis/necrosis) than in HT29 cells 38% (27% early apoptosis plus 11% late apoptosis), indicating that the activation of the apoptotic pathway may occur more slowly in HT29 cells.

In the process of differentiation, enterocytes acquire structural features of mature cells, express specific gene products such as intestinal alkaline phosphatase and develop specialized cellular functions [31]. This growth inhibition near to the cell cycle arrest and the increase in alkaline phosphatase activity are characteristics markers of enterocyte differentiation [32,37].

The fact that maslinic acid induces an stronger arrest in G0/G1 and a higher increase in alkaline phosphatase in HT29 than in Caco-2 cells indicates that maslinic acid is a more potent inducer of differentiation in HT29 cells than in Caco-2 cells.

It is noteworthy that the effect of maslinic acid on cell cycle and apoptosis induction was selective for malignant cells, since it did not alter the cell cycle or induce apoptosis in normal intestine cell lines (IEC-6 and IEC-18). This effect of maslinic acid on pro-apoptotic pathways specific for malignant cells means that this compound is of potential interest for cancer patients. In conclusion, we show that maslinic acid selectively induces the caspase apoptotic pathway in colon adenocarcinoma cell lines, causing G0/G1 cell-cycle arrest.

Because caspases are specific proteases of apoptosis, and among them more particularly caspase-3, we examined whether the possible apoptotic effect of maslinic acid on colon carcinoma cells HT29 and Caco-2 could be linked to induction of caspase-3. From 6 h of treatment, maslinic acid induced caspase-3 activity only in Caco-2 cells. At 72 h of treatment maslinic acid stimulated caspase-3 activity in HT29 cells. As caspase-3 activation is a phenomenon previous to the morphological changes reflected in the FACS analysis, this difference in caspase-3 activation agreed with the results found in FACS analysis, where HT29 cells showed a higher percentage of early apoptosis at 72 h, a circumstance that could be explained by the late activation of caspase-3 (72 h). Moreover, in the FACS analysis, Caco-2 cells presented a very high percentage of late apoptosis at 72 h of treatment, which could be correlated with the early activation of caspase-3 (6 h).

In normal intestinal cells lines IEC-6 and IEC-18, caspase-3 activation was not detected. In addition, caspase-3 activation is apparently time-dependent, this activity occurring prior to the appearance of characteristic apoptotic morphological features. Maslinic acid may thus be effective as a selective apoptogenic agent that exploits endogenous apoptosis-inducing mechanisms as a potential mean of treating or preventing colon adenocarcinoma. However, clinical trials will be required for determining whether maslinic acid can be effectively used in the pharmacology treatment of cancer.

In many cancer cell lines, p53 expression may contribute to therapeutic efficacy of cytotoxic drug. Although it does not seem to be necessary for induction of apoptosis in Caco-2 cells (p53 deficient) by maslinic acid, the cleavage of caspase-3 appears to correlate with maslinic-acid-induced apoptosis in both the HT29 and Caco-2 cell lines. It has been demonstrated that cytochrome *c* participates in the activation of caspase-3. These data suggest a linear and specific activation of caspase-3 in response to cytochrome *c* released from the mitochondria. Cytochrome *c* normally resides in the mitochondrial intermembrane space, where it serves a transducer of electrons in the respiratory chain. Several anti-tumour drugs with diverse intracellular targets have been demonstrated to cause the mitochondrial release and cytosolic accumulation of cytochrome and activation of caspase-3 [38]. Although the mechanism is not yet fully understood, the release of cytochrome *c* is considered to be a very important event for the induction of apoptosis by maslinic acid.

In conclusion, maslinic acid, a novel triterpene, inhibits proliferation and induces apoptosis of human colon carcinoma cells. Exposure to maslinic acid resulted in the activation of caspase-3 through the release of cytochrome *c* from the mitochondria. The more precise signalling pathway by which maslinic acid triggers caspase-3 activation, cytochrome *c* release, and the other apoptotic phenomena described here remain to be identified. Nevertheless, our data should contribute to the development of maslinic acid or related drugs as potential cancer chemotherapeutic or chemopreventive agents.

Although the detailed mechanism by which maslinic acid induces apoptosis remains still to be elucidated, it seems that this compound modulates multiple factors that could increase cellular susceptibility to apoptosis.

For example the over-expression of a mutated p53 in HT29 cells [39] could explain the cell cycle arrest, differentiation and late caspase-3 induction obtained. In this case, maslinic acid could induce the cell differentiation mediated by p53, previous to the apoptosis activation. On an other hand, the fact that in Caco-2 cells p53 gene has deleted and mutated alleles and no detectable accumulation of the corresponding protein [21,40] could explain the lowest differentiation and the early caspase-3 activation obtained.

By the other hand, apoptosis induction could be due to a receptor mechanism, this mechanism have been proposed by different authors in papers related with colon cancer cells [41,42], a different number of receptors in these cell lines could explain the differential apoptosis induction by maslinic acid. For example, it has been reported that many types of cancer can use signals from multiple growth factor receptor for growth and survival [25,43]. The TGF receptors are intimately related with MAP-kinases mediated apoptotic pathway (JNK, p53/Erk), whereas p53 is activated in the endpoints of the pathway [44–46]. The growth-inhibitory apoptotic potential and growth factor-modulator effects of maslinic acid could be related with MAP-kinases mediated apoptotic pathway [22]. Other MAP-kinases pathways as the TNF1 α receptor-JNK-jBID pathway could be related with apoptotic activation by maslinic acid [47]. Further studies will be directed in this direction.

Acknowledgements: This study was supported by Grants AGL2000-1534, PPQ 2003-06602-C04-04 and AGL2004-07579-C04-03/ALI from the Spanish government and has received financial support from the government of Catalonia: ITT program of the Work Community of Pyrenees. We thank Dr. Andres Garcia-Granados and his group (University of Granada, Spain) for providing the maslinic acid.

References

- [1] Liu, J. (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49, 57–68.
- [2] Zuco, V., Supino, R., Righetti, S.C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C. and Formelli, F. (2002) Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 175, 17–25.
- [3] Hata, K., Hori, K. and Takahashi, S. (2002) Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *J. Nat. Prod.* 65, 645–648.
- [4] Yim, H.W., Jong, H.S., Kim, T.Y., Choi, H.H., Kim, S.G., Song, S.H., Kim, J., Ko, S.G., Lee, J.W., Kim, T.Y. and Bang, Y.J. (2005) Cyclooxygenase-2 inhibits novel ginseng metabolite-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 65, 1952–1960.
- [5] Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S. and Aggarwal, B.B. (2003) Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaB-alpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.* 63, 4375–4383.
- [6] You, H.J., Choi, C.Y., Kim, J.Y., Park, S.J., Hahm, K.S. and Jeong, H.G. (2001) Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production via nuclear factor-kappaB activation in the resting macrophages. *FEBS Lett.* 509, 156–160.
- [7] Murakami, S., Takashima, H., Sato-Watanabe, M., Chonan, S., Yamamoto, K., Saitoh, M., Saito, S., Yoshimura, H., Sugawara, K., Yang, J., Gao, N. and Zhang, X. (2004) Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)-beta1. *FEBS Lett.* 566, 55–59.
- [8] Harmand, P.O., Duval, R., Delage, C. and Simon, A. (2005) Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int. J. Cancer* 114, 1–11.
- [9] Karpova, M.B., Sanmun, D., Henter, J.I., Smirnov, A.F. and Fadeel, B. (2006) Betulinic acid, a natural cytotoxic agent, fails to trigger apoptosis in human Burkitt's lymphoma-derived B-cell lines. *Int. J. Cancer* 118, 246–252.
- [10] Ito, Y., Pandey, P., Sporn, M.B., Datta, R., Kharbanda, S. and Kufe, D. (2001) The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis and differentiation of human osteosarcoma cells by a caspase-8 dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 59, 1094–1099.
- [11] Stadheim, T.A., Suh, N., Ganju, N., Sporn, M.B. and Eastman, A. (2002) The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO) potently enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 10, 16448–16455.
- [12] Ji, Z.N., Ye, W.C., Liu, G.G. and Hsiao, W.L. (2002) 23-Hydroxybetulinic acid-mediated apoptosis is accompanied by decreases in bcl-2 expression and telomerase activity in HL-60 Cells. *Life Sci.* 72, 1–9.
- [13] Konopleva, M., Tsao, T., Estrov, Z., Lee, R.M., Wang, R.Y., Jackson, C.E., McQueen, T., Monaco, G., Munsell, M., Belmont, J., Kantarjian, H., Sporn, M.B. and Andreeff, M. (2004) The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 64, 7927–7935.
- [14] Suh, N., Roberts, A.B., Birkey Refley, S., Miyazono, K., Itoh, S., ten Dijke, P., Heiss, E.H., Place, A.E., Risingsong, R., Williams, C.R., Honda, T., Gribble, G.W. and Sporn, M.B. (2003) Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res.* 63, 1371–1376.
- [15] Montilla, M.P., Agil, A., Navarro, M.C., Jimenez, M.I., Garcia-Granados, A., Parra, A. and Cabo, M.M. (2003) Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 69, 472–474.
- [16] Sergeant, C., Franco, N., Chapusot, C., Lizard-Nacol, S., Isambert, N., Correia, M. and Chauffert, B. (2002) Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49, 445–452.
- [17] Chang, D.K., Goel, A., Ricciardiello, L., Lee, D.H., Chang, C.L., Carethers, J.M. and Boland, C.R. (2003) Effect of H(2)O(2) on cell cycle and survival in DNA mismatch repair-deficient and -proficient cell lines. *Cancer Lett.* 195, 243–251.
- [18] Chu, F.F., Esworthy, R.S., Lee, L. and Wilczynski, S. (1999) Retinoic acid induces Gpx2 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Nutr.* 129, 1846–1854.
- [19] Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L. and Isselbacher, K.J. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell Biol.* 80, 248–265.
- [20] Wood, S.R., Zhao, Q., Smith, L.H. and Daniels, C.K. (2003) Altered morphology in cultured rat intestinal epithelial IEC-6 cells is associated with alkaline phosphatase expression. *Tissue Cell* 35, 47–58.
- [21] Ray, R.M., McCormack, S.A. and Johnson, L.R. (2001) Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G37–G43.
- [22] Sterling Jr., K.M. and Cutroneo, K.R. (2002) Differentiation-dependent induction of CYPIA1 in cultured rat small intestinal

- epithelial cells, colonocytes, and human colon carcinoma cells: basement membrane-mediated apoptosis. *J. Cell Biochem.* 86, 440–450.
- [23] Vincentini, O., Ciotta I, C., Bignami, M., Stamatii, A. and Zucco, F. (1996) Normal rat intestinal cells IEC-18: characterization and transfection with immortalizing oncogenes. *Cytotechnology* 21, 11–19.
- [24] Ringgaard, S., Harb, J., Gautier, F., Menanteau, J. and Meflah, K. (1996) Altered glycosylation of alpha(s)beta 1 integrins from rat colon carcinoma cells decreases their interaction with fibronectin. *J. Cell Biochem.* 62, 40–49.
- [25] Winesett, M.P., Ramsey, G.W. and Barnard, J.A. (1996) Type II TGF(beta) receptor expression in intestinal cell lines and in the intestinal tract. *Carcinogenesis* 17, 989–995.
- [26] Ramachandran, A., Madesh, M. and Balasubramanian, K.A. (2000) Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 109–120.
- [27] Yamada, T., Mori, Y., Hayashi, R., Takada, M., Ino, Y., Naishiro, Y., Kondo, T. and Hirohashi, S. (2003) Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 63, 895–901.
- [28] Hausott, B., Greger, H. and Marian, B. (2004) Flavaglines: a group of efficient growth inhibitors block cell cycle progression and induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* 109, 933–940.
- [29] Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L. and Cascante, M. (2003) Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur. J. Nutr.* 42, 43–49.
- [30] Comin-Anduix, B., Boros, L.G., Marin, S., Boren, J., Callol-Massot, C., Centelles, J.J., Torres, J.L., Agell, N., Bassilian, S. and Cascante, M. (2002) Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly (ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J. Biol. Chem.* 277, 46408–46414.
- [31] Ding, Q., Wang, Q. and Evers, B.M. (2000) Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 282–288.
- [32] Choi, P.M., Tchou-Wong, K.M. and Weinstein, I.B. (1990) Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol. Cell Biol.* 10, 4650–4657.
- [33] Hsu, M.J., Cheng, J.S. and Huang, H.C. (2000) Effect of saikosaponin, a triterpene saponin, on apoptosis in lymphocytes: association with c-myc, p53, and bcl-2 mRNA. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1285–1293.
- [34] Liu, J.J., Nilsson, A., Oredsson, S., Badmaev, V., Zhao, W.Z. and Duan, R.D. (2002) Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis* 23, 2087–2093.
- [35] Pacha, J., Lisa, V. and Miksik, I. (2002) Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine. *Steroids* 67, 119–126.
- [36] Mujoo, K., Haridas, V., Hoffmann, J.J., Wachter, G.A., Hutter, L.K., Lu, Y., Blake, M.E., Jayatilake, G.S., Bailey, D., Mills, G.B. and Gutterman, J.U. (2001) Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Cancer Res.* 61, 5486–5490.
- [37] Baltes, S., Nau, H. and Lampen, A. (2004) All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. *Dev. Growth Differ.* 46.
- [38] Lee, S.J., Ko, W.G., Kim, J.H., Sung, J.H., Moon, C.K. and Lee, B.H. (2000) Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem. Pharmacol.* 60, 677–685.
- [39] Van Erk, M.J., Teuling, E., Staal, Y.C., Huybers, S., Van Bladeren, P.J., Aarts, J.M. and Van Ommen, B. (2004) Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *J. Carcinog.* 3, 8.
- [40] Djelloul, S., Forgue-Lafitte, M.E., Hermelin, B., Mareel, M., Bruyneel, E., Baldi, A., Giordano, A., Chastre, E. and Gespach, C. (1997) Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells. Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Lett.* 406, 234–242.
- [41] Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- [42] Rao, J.N., Li, L., Bass, B.L. and Wang, J.Y. (2000) Expression of the TGF-beta receptor gene and sensitivity to growth inhibition following polyamine depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, 1034–1044.
- [43] Massague, J., Blain, S.W. and Lo, R.S. (2000) TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295–309.
- [44] Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- [45] Derynck, R. and Feng, X.H. (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333, 105–150.
- [46] Gali-Muhtasib, H.U., Diab-Assaf, M. and Haddadin, M.J. (2005) Quinoxaline 1,4-dioxides induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55, 369–378.
- [47] Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. and Wu, X. (2003) A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115, 61–70.