



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Juan Guillermo Cárcamo M.

INSTITUTO: Bioquímica

FACULTAD: Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Álvaro León R.

INSTITUTO: Medicina

FACULTAD: Medicina

EFECTO APOPTÓTICO Y QUIMIOSENSIBILIZADOR DE LEPTOCARPINA EN DISTINTOS MODELOS CELULARES DE LEUCEMIAS

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al Título
de Químico Farmacéutico.

CRISTIÁN ALEXIS MENA SEREY

VALDIVIA-CHILE

2008

Agradecimientos

En primer lugar a mi familia por el apoyo incondicional brindado en este largo proceso, a mi profesor patrocinante Dr. Juan Guillermo Cárcamo M. por ser parte importante de mi formación profesional, a mi profesor co-patrocinante Dr. Álvaro León R. por la buena voluntad y disposición siempre mostrada, a mi profesora informante Dra. Claudia Quezada M. pilar fundamental en la realización práctica de esta tesis. A la unidad de Hematología del instituto de Medicina, especialmente a la T.M. doña María Elena Bustos. Al servicio de Banco de Sangre del Hospital Clínico Regional Valdivia. A los proyectos que permitieron la realización de este trabajo: DID-U.A.CH: S-2005-29 y Proyecto Bicentenario: PBCT N° 5. Al instituto de Bioquímica de la U.A.CH, especialmente a los integrantes de mi laboratorio, y en particular a Mauricio González Oyarzún por su amistad y apoyo tanto personal como profesional, a los integrantes del laboratorio de “Enzimología Molecular”, por la buena disposición siempre mostrada y manifestada, y a todas aquellas personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo y amistad, que si los nombrara uno por uno, la lista no tendría fin, y de manera muy especial a Mónica, mi leal compañera.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1 INTRODUCCION	3
2 HIPOTESIS	28
3 OBJETIVO GENERAL.	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	28
4 MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.2.1 Cultivo celular	31
4.2.2 Obtención de muestras clínicas	31
4.2.3 Viabilidad celular por el ensayo MTT para células en suspensión	32
4.2.4 Viabilidad celular por exclusión de azul de tripán	33
4.2.5 Determinación de apoptosis por caspasa 3	33
4.2.6 Extracción de RNA total	33
4.2.7 Cuantificación del RNA total	34
4.2.8 Síntesis de cDNA total	34
4.2.9 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	35
4.2.10 Electroforesis en gel de agarosa	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Curvas de calibración de número de células en función de intensidad de producto en ensayos de MTT	37
5.2 Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular	39

5.3 Efecto de leptocarpina sobre la cinética de viabilidad celular	45
5.4 Inducción de apoptosis por leptocarpina	48
5.4a Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3	49
5.4b Efecto de leptocarpina sobre la expresión de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis	54
5.5 Expresión de proteínas de resistencia a multidrogas por RT-PCR	62
5.6 Determinación del número óptimo de ciclos de amplificación de los distintos partidores por RT-PCR	64
5.7 Efecto de leptocarpina sobre la expresión de transportadores de resistencia a multidrogas	71
6 DISCUSIÓN	78
7 BIBLIOGRAFIA	88

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Fig. 1. Curva de calibración para el método de MTT	38
Fig. 2. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en HL60, U937 y leucocitos por el método de azul de tripan	41
Fig. 3. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en células de LLA, LMA y LMC por azul de tripan	42
Fig. 4. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular HL60, U937 y leucocitos por el método de MTT	43
Fig. 5. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en células de LLA, LMA y LMC por el método de MTT	44
Fig. 6. Efecto de leptocarpina sobre la cinética de viabilidad en células HL60, U937 y leucocitos por azul de tripan	46
Fig. 7. Efecto de leptocarpina sobre la cinética de viabilidad en células HL60, U937 y leucocitos por el método de MTT	47
Fig. 8. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en células HL60	50
Fig. 9. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en células U937	51

Fig. 10. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en leucocitos	52
Fig. 11. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en células provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC)	53
Fig. 12. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bcl-2 en células HL60	55
Fig. 13. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bcl-2 en células U9	56
Fig. 14. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de p21 en células HL	57
Fig. 15. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de p21 en células U 7	58
Fig. 16. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bax en células HL	59
Fig. 17. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bax en células U9	60
Fig. 18. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis	61
Fig. 19. Expresión de proteínas de resistencia a multidrogas	63
Fig. 20. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MRP1 en células HL60	65
Fig. 21. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MRP1 en células U937	66
Fig. 22. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MVP en células U937	67

Fig. 23. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de Mrp1 en leucocitos	68
Fig. 24. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MVP en leucocitos	69
Fig. 25. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de Pgp1 en leucocitos	70
Fig. 26. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en células HL60	72
Fig. 27. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en células U937	73
Fig. 28. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de MVP en células U937	74
Fig. 29. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en leucocitos	75
Fig. 30. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de MVP en leucocitos	76
Fig. 31. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Pgp1 en leucocito	77

INDICE DE ABREVIATURAS (por orden de aparición en el texto)

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

MRP'S: Proteínas de resistencia a multidroga

MDR: Multidrug resistance

LMC: Leucemia mieloide crónica

RB-1: gen de retinoblastoma

LLC: Leucemia linfocítica crónica

FAB: Franco-Americano-Británico

SNC: Sistema nervioso central

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

MTX: Metotrexato

DFHR: Dihidro folato reductasa

DNA: Acido desoxi ribonucleico

GAR: Glicinamida ribonucleótido transformilasa

AICAR: Aminoimidazol carboxiamida transformilasa

RFC: Transportador de folatos reducidos

FPGS: Folilpolil glutamato sintasa

γ -GH: γ Glutamil hidrolasa

ABC: ATP Binding cassette

MVP: Major vault protein

GSH: Glutación

GST: Glutación S transferasa

GS-X: Conjugados a GSH

SAPK: Stress activated protein kinase

TTL: Tubulin tyrosine ligase

PKC: Protein kinase C

BCRP: Breast cancer resistance protein

P-gp: P glicoproteína

CYP3A4: Isoforma 3A4 del sistema metabolizador enzimático Citocromo P450

LTC₄: Leucotrieno C₄

MXR: Mitoxantrone resistance protein

ATP: adenosin trifosfato

RNA: Acido ribonucleico

cAMP: adenosin monofosfato cíclico

cGMP: Guanosin monofosfato cíclico

LRP: Lung resistance protein

NF- κ B: Nuclear factor κ B

TNF α : Tumoral necrosis factor α

IKC: Complejo IK β quinasa

SL: Sesquiterpene lactones

MTT: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio

EDTA: Acido etilen diamino tetraacético

PBS: Buffer fosfato salino

DMSO: Dimetil sulfóxido

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

UV: ultra violeta

RT-PCR: transcripción reversa acoplada a reacción de polimerasa en cadena

IDO: intensidad de densidad óptica

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

mRNA: Acido ribonucleico mensajero

Cdks: proteínas quinasas dependientes de ciclina

RESUMEN

Entre los diez tipos de cáncer más comunes se encuentra la leucemia, que es responsable de la mayoría de los casos de cáncer infantil, siendo la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y la leucemia mieloide aguda (AML) responsables de aproximadamente 75% y 17% de los casos respectivamente. Dado el rendimiento insatisfactorio de los actuales agentes antileucémicos, es imprescindible la búsqueda de nuevos agentes que sean efectivos en los casos de resistencia a las drogas. En este estudio se evaluó el potencial antitumoral de leptocarpina, una lactona sesquiterpenica, respecto a su actividad antiproliferativa y citotóxica, el posible mecanismo de acción y el efecto sobre la expresión de distintos transportadores de resistencia a multidroga, en dos líneas celulares, HL60 (leucemia promielocítica humana) y U937 (leucemia monocítica humana), además de leucocitos normales y células leucémicas de distinto tipo provenientes de cultivos ex-vivo. El efecto citotóxico y antiproliferativo de leptocarpina fue ensayado por Azul de Tripano y reducción de MTT, a concentraciones que van de 0 a 100 uM, y a tiempos de 24 hrs. Leptocarpina promovió una disminución de la viabilidad celular en aproximadamente un 70% con respecto al control en las células leucémicas y, además, leptocarpina induce apoptosis por un mecanismo dependiente de p-21^{WAF-1}, caspasas y asociado a la vía intrínseca (Bcl-2). Asimismo, leptocarpina indujo una variación negativa en la expresión de transportadores de resistencia a multidrogas MRP1 y MDR1 principalmente. Si bien, en base a los resultados obtenidos, es aventurado darle un uso terapéutico a leptocarpina como citotóxico, ella podría ser usada como quimio-sensibilizador, asociado a otro u otros fármacos. Este potencial inhibitorio de expresión de proteínas de resistencia a multidrogas es tanto o más valioso que un gran efecto citotóxico.

SUMMARY.

Leukemia is among the ten most common types of cancer and accounts for the greatest number of child cancers being Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and Acute myeloid leukemia (AML) responsible for 75 and 17 % of the those cases respectively. Therefore new drugs, especially those with the ability to circumvent the Multidrug resistance phenomena are urgently needed. This study evaluated the antitumor, antiproliferative, and cytotoxic potential of Leptocarpine, a sesquiterpene lactone, its probable mechanism of action and its influence on the ability and expression of Multidrug resistance proteins, in two different cell lines, HL60 (leucemia promielocítica humana) and U937 (leucemia monocítica humana), together with normal leukocytes and ex vivo obtained primary cultured leukemic cells. Leptocarpine cytotoxic and antiproliferative effect was assessed by trypan blue exclusion and MTT reduction, for 24 hours at concentrations ranging from 0 to 100 uM. Leptocarpine successfully promoted a fall in cell viability of about 70 % compared to controls in leukemic cells, inducing apoptosis in a p-21^{WAF-1} and caspases dependent manner associated to intrinsic pathways (Bcl-2). Leptocarpine also induced negative variations in the expression of some MDR transporters like MRP1 and MDR1. Despite the promising data is risky to attribute leptocarpine a therapeutic use in future cancer chemotherapy regimes, although its use as a chemosensitizer associated to other drugs could be favored. Is also necessary to highlight that multidrug resistance protein inhibitory potential is as valuable as cytotoxic properties in current and future cancer chemotherapy and other clinical applications.

1 INTRODUCCIÓN.

Aunque desde hace siglos se han descrito tumores en seres humanos, los primeros estudios del cáncer se atribuyen, por lo general, a los médicos del siglo XVIII. Hill comentó que existía un extraño enlace entre el consumo de tabaco y el cáncer. Poco después, Pott estableció una relación entre el cáncer testicular y la exposición ocupacional de los deshollinadores al alquitrán de hulla y al hollín, pero no fue hasta 1917 cuando se presentó la primera documentación experimental que demostraba que el alquitrán actuaba como carcinógeno en animales, al formar tumores en las orejas de conejos después de ser aplicado en este sitio. En 1895, Rehn dio a conocer que los trabajadores de la industria de anilinas presentaban una elevada incidencia de cáncer vesical. En 1938, Hueper señaló que la 2-naftilamina, una amina aromática a la que estaban expuestos los trabajadores de anilinas, era carcinógena, después de inducir tumores vesicales en perros (Weiss, 1997).

El cáncer es una enfermedad en la que ocurre un desorden en el proceso normal de división celular (Reddy et al, 2003), además es un proceso multietapas que es definido por distintas fases histológicas y fisiopatológicas (Smith et al, 2006), en las cuales alteraciones genéticas y epigenéticas determinan la transición de una etapa a otra, y estas incluyen mutaciones en oncogenes, genes supresores tumorales y desajuste en la reparación de genes (Smith et al, 2006). A nivel celular las anormalidades incluyen incremento de la proliferación, evasión de la apoptosis, aumento del proceso de angiogénesis y de la capacidad para invadir regiones distantes del sitio primario (metástasis) (Modzelewska et al, 2005).

Entre las causas del cáncer se encuentran tres fenómenos bien documentados y difíciles de separar que son: una dieta incorrecta, predisposición genética y estímulos perniciosos del

ambiente. Se estima que por lo menos el 35% del total de cánceres del mundo son causados por una dieta inadecuada, que en relación a este tema (cáncer) esta ligada principalmente al bajo consumo de agentes antioxidantes que se encuentran en frutas, verduras, extractos de plantas y hierbas; en el caso del cáncer de colon, una dieta incorrecta seria responsable del 80% de los casos en el mundo (Reddy et al, 2003). Mujeres japonesas y en general las orientales tienen una incidencia mucho menor de cáncer de mama que las mujeres occidentales, lo cual se deberia al alto consumo de soya, que contiene isoflavonas, que son fitoestrógenos o estrógenos vegetales. Los fitoestrógenos se unen a los receptores de estrógenos y bloquean el efecto promotor de este sobre el cáncer, por lo que son recomendados para reducir el cáncer de mama y próstata (Demark-Wahnefried et al, 2001). Otro ejemplo de la influencia de la dieta lo constituye el tomate, que contiene el antioxidante licopeno que protege contra el cáncer de próstata y si además es usado en combinación con alfa tocoferol su efecto se ve enormemente potenciado (Klein et al, 2001). La predisposición genética al cáncer se presenta en aproximadamente 20% de los casos y la gran mayoría esta ligado a carcinógenos ambientales (Reddy et al, 2003). Los mayores carcinógenos ambientales incluyen la polución del agua y del aire, la radiación y los medicamentos (Doll et al, 1981). La idea que el cáncer tiene una base genética se sustenta en observaciones clínicas de ciertos tumores que presentan patrones definidos de herencia familiar, así como en observaciones de anomalías cromosómicas especificas que se relacionan con tumores en particular, por ejemplo, el cromosoma de Filadelfia en casos de leucemia mieloide crónica (L.M.C) (Kano et al, 2001) el cual constituye un marcador genético de esta leucemia, y se origina por la translocación reciproca entre los cromosomas 9 y 22, donde se fusiona el gen de la tirosina kinasa c-ABL (homólogo celular del producto de oncogen viral de leucemia murina de Abelson) del cromosoma 9 y el gen *breakpoint cluster region* (BCR) del cromosoma 22. La

fusión genética *BCR-ABL* codifica una proteína kinasa BCR-ABL activa que juega un rol causal en L.M.C (Hunter, 2007). Los datos que confirman esto derivaron de estudios sobre retrovirus animales que generan cánceres específicos. En 1911, Rous comunicó la inducción de sarcomas en pollos usando filtrados libres de células extraídos de la mama de ratón. (Weiss, 1997).

Los mecanismos por los cuales los genes celulares normales adquieren actividad oncogénica son: mutación, translocación cromosómica, amplificación, inserción y delección (Weiss, 1997). Ejemplo de lo anterior es el aumento en la expresión de los protooncogenes leucémicos MYC, TAL1, LYL1, y HOX11; la translocación que genera fusión entre los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX1, y MLL; y alteraciones de la ploidia que incluyen aumento o disminución (Downing et al, 2002). Sin embargo, estudios en una variedad de sistemas experimentales han demostrado que la mayoría de estas lesiones son insuficientes para generar un fenotipo leucémico total por si solos. La necesidad de mutaciones múltiples para desregular la proliferación sin conducir a la apoptosis queda en evidencia en el hecho de la proliferación celular y apoptosis que ocurre en ratones deficientes del gen de retinoblastoma (*RB1*^{-/-}). Este gen es un supresor tumoral ubicado en el cromosoma 13 y codifica para la proteína nuclear pRB que participa en la regulación de la transcripción y el control de la división celular en células oculares comparado con células deficientes de los genes *RB-1* y *p53* (ambos genes supresores tumorales) que perpetúan su proliferación y no responden a la apoptosis (Morgenbesser et al, 1994; Miao et al, 2003; Nelson, et al, 2001).

1.1 Leucemias.

Los tumores malignos que surgen en las células hematopoyéticas son tan variados como las líneas individuales que comprende este tejido, e incluye los síndromes mieloproliferativos y

linfoproliferativos agudos y crónicos (L.M.A, L.L.A, L.M.C, L.L.C) (Downing et al, 2002). La clasificación de leucemias agudas que goza de mayor difusión y aceptación en el ámbito hematológico internacional es la elaborada en 1976 por el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB). Esta clasificación se basa únicamente en el aspecto morfológico y en el comportamiento citoquímico de las células blásticas (tabla 1 y 2).

La leucemia (que significa *sangre blanca*), fue descrita originalmente en 1845 por Virchow (Virchow, 1847), y son proliferaciones neoplásicas clonales de células inmaduras del sistema hematopoyético, las cuales se caracterizan porque la diferenciación es aberrante o se detiene en fases iniciales de maduración y diferenciación. Las leucemias agudas que se agrupan, según su estirpe, en linfoblásticas y mieloides, propiamente tales, pueden identificarse fenotípica y genéticamente, y se caracterizan por un curso clínico rápido que habitualmente requiere tratamiento inmediato. Sus células (blastos) derivan de las progenitoras hematopoyéticas primitivas, a las que se asemejan biológicamente (De Vita et al, 2000), en algunos casos los blastos pueden ser indiferenciados o tener características tanto linfoide como mieloides, y aunque los dos tipos celulares cursan con síntomas clínicos similares, su demografía y tratamiento son diferentes (Weiss, 1997). Por el contrario, las leucemias crónicas tienen el fenotipo y los rasgos biológicos de células más maduras (De Vita et al, 2000). Aunque el número total de neoplasias hematopoyéticas en adultos supera enormemente las observadas en niños y adolescentes, estos tumores solo representan el 5%-8% del total, mientras que en los menores comprende el 50% de todos los cánceres en EE.UU (<http://www.seer.cancer.gov>), en Chile corresponde al 40% del total de los cánceres infantiles con una incidencia de 4-5 casos por 100.000 niños, lo que corresponde a 146-182 casos nuevos/año (población 2002: menores de 15 años: 3.658.631 habitantes) (minsal,

2004). Por lo tanto hay una necesidad de nuevos agentes antileucémicos, especialmente aquellos que sean efectivos en los casos de resistencia a las drogas actuales. (Batova et al, 2002)

Rasgos citológicos	Tipo morfológico		
	L1	L2	L3
Tamaño celular	Predominio de células pequeñas	Células grandes y heterogéneas	Células grandes y homogéneas
Cromatina	Homogénea	Variable, heterogénea	Homogénea y en punteado fino
Formas del núcleo	Regular Ocasionalmente hendido o con indentaciones	Irregular Generalmente hendido o indentado	Regular Oval o redondo
Nucléolos	No visibles o pequeños y atenuados	Uno o más, a menudo prominentes	Uno o más, prominentes
Cantidad de citoplasma	Escasa	Variable, moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplásmica	Ligera	Variable	Muy intensa
Vacuolización	Variable (habitualmente ausente)	Variable (habitualmente ausente)	Prominente

Tabla 1: clasificación FAB de las leucemias agudas linfoides. Extraído de Sans-Sabrafen et al. Hematología Clínica (4ª ed.) pag. 359.

Subtipo FAB	Denominación	Diferenciación predominante	Tanto por ciento de células medulares		
			Blastos (%)	Componente granulocítico* (%)	Componente monocítico** (%)
MO	Mieloblástica aguda con mínima diferenciación mieloide	-	> 30; < 3 MPO o NS+, MPO+ por ultraestructura, CD13 y/o CD33+, marcadores de línea B y T negativos, morfología de blastos tipo L2 o muy indiferenciados		
M1	Mieloblástica aguda sin maduración	Granulocítica	> 90	< 10	< 10
M2	Mieloblástica aguda con maduración	Granulocítica	30-89	> 10	< 20
M3	Promielocítica	Granulocítica	> 30 promielocitos anómalos de núcleo reniforme o lobulado, múltiples bastones de Auer y/o astillas		
M3v	Promielocítica (forma microgranular)	Granulocítica	> 30 promielocitos anómalos de núcleo monocitoide y granulación o polvillo granular no visible. Astillas ocasionales		
M4	Mielomonocítica aguda	Granulocítica y monocítica	> 30	> 20	> 20
M4eos	Mielomonocítica aguda (variante con eosinofilia)	Granulocítica y monocítica	> 30, eosinófilos atípicos con granulación inmadura (basófila) y alteraciones de la segmentación nuclear		
M5a	Monoblástica aguda	Monocítica	> 30	< 20	> 80 (monoblastos)
M5b	Monocítica	Monocítica	> 30	< 20	< 80 (monoblastos)
M6	Eritroleucemia	Eritrocítica y granulocítica	> 30; mieloblastos \geq 50% de eritroblastos		
M7	Megacarioblástica	Megacariocítica	> 30; demostración de estirpe megacarioblástica por citoquímica ultraestructural (PPO) o técnicas inmunológicas		

* Promielocitos a polimorfonucleares.
** Monoblastos a monocitos; MPO: mieloperoxidasa; NS: negro sudán; PPO: peroxidasa plaquetaria.

Tabla 2: clasificación FAB de las leucemias agudas mieloides. Extraído de Sans-Sabrafen et al. Hematología Clínica (4ª ed.) pag. 348.

1.2 FENÓMENO DE LA RESISTENCIA A MULTIDROGAS

La efectividad de las terapias adoptadas para tratar muchas patologías de nuestro tiempo, como el cáncer, infecciones, artritis reumatoide y enfermedades que comprometen al SNC tales como, depresión, enfermedad de Alzheimer, demencia inducida por VIH, epilepsia y esquizofrenia está limitada en gran medida por la baja respuesta o franca resistencia al tratamiento administrado (Baldini et al, 1997; Gottesman et al, 2002). La mayoría de las respuestas farmacológicas están condicionadas por un sinnúmero de factores que afectan los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos; estos incluyen enzimas metabolizantes, transportadores de drogas, acceso del fármaco a compartimentos anatómicos determinados y la alteración de las dianas celulares o expresión de productos génicos que pueden desencadenar una baja en la respuesta farmacológica (Leonard et al, 2003; Borst et al, 2002). La unión de uno o más de estos factores podría desencadenar la aparición de un fenómeno complejo y de importancia capital en la terapéutica moderna conocido como Resistencia Múltiple a Fármacos (*Multidrug resistance*, MDR por sus siglas en inglés). Este fenómeno consiste en que las células, principalmente tumorales, desarrollan resistencia cruzada a una amplia variedad de drogas que no tienen necesariamente similitud estructural entre si después de haber sido expuestos de forma crónica o aguda a un único agente terapéutico (Ling et al, 1997).

El ejemplo que mejor ilustra esto debido a la multifactorialidad de las respuestas y mecanismos involucrados es el del citostático Metotrexato (MTX). Metotrexato es el agente inhibidor de reductasas folicas más usado no solo en el tratamiento de leucemias, linfomas, coriocarcinoma, neoplasias de cuello y cabeza, y carcinoma osteogénico. MTX es una de las piedras angulares en el régimen curativo de niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA), pero desgraciadamente es efectivo sólo en un 10 % de los pacientes que sufren de leucemia mieloide crónica (LMC)

(Gorlick et al, 1996). MTX es un inhibidor de la enzima dihidro folato reductasa (DHFR) y como consecuencia de esta inhibición, N^5-N^{10} metilen tetrahydrofolato y N^{10} formiltetrahydrofolato, los cofactores esenciales para la síntesis de timidilato y purinas no se producen, el resultado es una inhibición de la síntesis de DNA y la muerte celular (Chu et al, 1996). De forma similar a lo observado con la enzima DHFR las enzimas glucinamida ribonucleótido transformilasa (GAR) y aminoimidazol carboxamida transformilasa (AICAR), esenciales en la síntesis de *ново* de nucleótidos de purina también son inhibidas por MTX. MTX también tiene la capacidad de competir con los folatos reducidos en su transporte y conjugación a glutamato. La efectividad de MTX depende de su concentración y de la capacidad de las células para internalizarlo y retenerlo por lo tanto esta situación es determinante en el desarrollo de resistencia (Westerhof et al, 1995). La razón de influjo de MTX a las células es controlada por la proteína transportadora de folatos reducidos (RFC, por sus siglas en inglés). Un segundo transportador de baja capacidad es el receptor de folatos unido a membrana, sin embargo la información disponible no permite hasta el momento asegurar que este sistema de transporte esté involucrado al menos de forma directa en la resistencia a MTX (Trippet et al, 1992). Al igual que los folatos, el MTX es metabolizado para formar derivados de poliglutamatos, todo esto catalizado por la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS) que une grupos glutamil a MTX. La formación de estos productos es de gran importancia pues los poliglutamatos de MTX permanecen dentro de la célula por periodos más largos que otros conjugados de menor longitud y que el MTX sin conjugar (Barrueco et al, 1992). La actividad de MTX depende también de la exopeptidasa γ -Glutamil Hidrolasa (γ -GH) que cataliza la hidrólisis de poliglutamatos intracelulares (Barrueco et al, 1992 (2)). Tomando en cuenta lo mencionado en el párrafo anterior se ha descrito que los principales mecanismos que definen la resistencia celular a MTX incluyen (1) transporte de MTX defectuoso, debido a una

baja en la expresión de RFC, (2) aumento de la amplificación de los genes de la enzima DHFR lo que resulta en una alza de sus niveles de expresión, (3) la alteración de la afinidad de MTX por DHFR debido a mutaciones de la diana (lo que también se observa con antifolatos usados para el tratamiento de la malaria), (4) una disminución de la acumulación de los derivados poliglutamato debido a un aumento de la degradación o disminución de la síntesis, mecanismo que por fuerza implica una disminución de las enzimas encargadas de la conjugación, y (5) la expresión de bombas de eflujo de alguna de las familias del tipo ABC y aquellas que aunque no pertenecen a esta superfamilia pero que sin embargo poseen importancia clínica y pronóstica, a saber, *major vault protein* (MVP por sus siglas en inglés) y RLIP76 (Matherly et al, 1995; Gorlick et al, 1997).

Entre otros mecanismos de gran importancia que contribuyen al desarrollo de un fenotipo resistente se encuentran fallas en los mecanismos apoptóticos, principalmente dados por la inhibición de enzimas encargadas de transformar componentes del citoesqueleto que actuarían como último punto de control apoptótico (LCP por sus siglas en inglés) (Idriss, 2000), sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y sus auxiliares que compiten con la proteína Bax regulando la descarga de proteínas y citocromo-c desde la mitocondria para desencadenar la iniciación de la cascada de caspasas (Fojo et al, 2003), y el silenciamiento mediante metilación de genes que codifican para proteínas consideradas vitales para la supresión tumoral como p21 y p53 (Sobell et al, 1996), además de alteración en los mecanismos de metabolización.

1.3 MECANISMOS MOLECULARES DE IMPORTANCIA ALTERADOS EN EL FENOMENO MDR.

1.3.1 Alteración del metabolismo

Una vez en el interior de la célula las drogas pueden ser inactivadas por múltiples mecanismos, entre los cuales se cuenta la oxidación y/o conjugación con glutatión (GSH). Familias de isoenzimas como las glutatión S-transferasas (GSTs) conjugan el glutatión con varios xenobióticos o fármacos, jugando un importante papel en la detoxificación. La sobreexpresión de GSTs y el aumento del contenido celular de GSH se han asociado con la resistencia a un agente muy usado en el tratamiento del cáncer de pulmón, el cisplatino (Ishikawa et al, 1993), y también con antraciclinas y alquilantes como melfalán, ciclofosfamida, thiotepa o la carmustina (Lehnert, 1996). La conjugación no es suficiente para que la célula expulse los fármacos, ya que el conjugado (GS-X) es más hidrófilo y no puede salir por difusión pasiva. Para ello el GS-X necesita de las llamadas bombas de GS-X (“GS-X pumps”). Algunas proteínas transportadoras como Mrp pueden actuar como bombas de GS-X (Borst et al, 2000). Otra de estas proteínas, Pgp, parece tener elementos reguladores comunes con la Glutathion S-transferasa- π (Volm et al, 1991), estando descrito un aumento de la expresión de ambas en tumores resistentes y en tumores con baja actividad proliferativa (Kreisholt et al, 1998).

1.3.2 Alteraciones de la diana molecular.

Las topoisomerasas son enzimas muy importantes en el metabolismo del ADN. Entre otras funciones, rompen de forma controlada y posteriormente vuelven a unir las cadenas de ADN (Plasencia et al, 2000). Existen dos tipos de topoisomerasas, I y II. La I rompe una sola cadena,

mientras la II rompe ambas cadenas a la vez. Las roturas del ADN permiten el paso de una cadena a través de la otra, lo cual es imprescindible para la formación de la doble hélice. Las alteraciones cuantitativas o cualitativas de la enzima pueden alterar la sensibilidad de esta a sus inhibidores. Existen dos isoformas de la topoisomerasa II llamadas α y β (Stewart, 2001). Estas isoformas presentan una regulación diferente, y sus propiedades y probablemente sus funciones también lo son. Los fármacos inhibidores de las topoisomerasas se unen de forma fija a ellas y al ADN, estabilizando las roturas de este. Al impedirse el restablecimiento de la integridad del ADN se inicia el proceso de la muerte celular (Morrow et al, 1993). Son inhibidores de la topoisomerasa I fármacos como el topotecán y el irinotecán o CPT11. Son inhibidores de la topoisomerasa II las epipodofilotoxinas como el VP16 o etopósido y el VM26 o tenipósido, las antraciclinas y otras drogas como la mitoxantrona, muchos de estos fármacos se emplean en el tratamiento de diversos cánceres como pulmón y cáncer de tejido linfático, testículo y ovario (Carney et al, 2000; Shepherd, 2000). Otro grupo importante de fármacos que actúa como inhibidor de la topoisomerasa II son las quinolonas y sus congéneres fluorados. Las alteraciones de la topoisomerasa II α pueden jugar un papel en la resistencia a la quimioterapia del cáncer de pulmón (Scaglioti et al, 1999), pero los estudios clínicos, en general, no encuentran relación con la respuesta a la quimioterapia ni con otras variables clínicas (Kreisholt et al, 1998; Scaglioti et al, 1999; Giacone et al 1995; Dingemans et al, 2001). Sin embargo, algunos estudios han detectado una menor sobrevida en los pacientes que presentan altos niveles de topoisomerasa II α (Giacone et al, 1995; Dingemans et al, 2001).

1.3.3 Aumento en la capacidad de reparación del ADN.

Muchos citotóxicos tiene en común la alteración de la estructura del ADN (alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos) (Morrow et al 1993). El aumento en la capacidad de reparación de este, es otro mecanismo causante de resistencia múltiple a drogas. Anormalidades en enzimas como la O6-alquilguanina-alquiltransferasa (ATasa) o alteraciones en los genes que codifican para elementos involucrados en la reparación del ADN, parecen estar entre sus causas (Lehnert, 1996).

1.3.4 Fallo de la muerte celular programada o apoptosis.

Es uno de los factores a los que se le da actualmente más importancia como causa de resistencia a múltiples drogas. Los tejidos normales, a diferencia de los neoplásicos, no crean resistencia a la quimioterapia (Chu et al, 1997). Esto es evidente a la simple observación clínica. Los tejidos normales más renovables, como la mucosa gastrointestinal y la medula ósea, aun siendo los que más sufren los efectos de las drogas antineoplásicas, nunca se vuelven resistentes, y a pesar del uso reiterado del fármaco continúan sufriendo sus efectos tóxicos (Chu et al, 1997). Hoy se piensa que esto se debe a que los tejidos normales tienen intacta y en buen funcionamiento toda la maquinaria genética que controla los llamados “puntos de chequeo” del ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis. Estos controles, no permiten que células con ADN dañado entren en división, de tal manera que detienen el ciclo celular hasta que se repare el ADN o bien encaminan a la célula hacia la muerte programada o apoptosis. La alteración de estos sistemas de control del crecimiento celular puede ser una de las causas principales de la resistencia a la quimioterapia (Chu et al, 1997). De hecho, se han iniciado estudios con sustancias que inducen apoptosis (Yang et al, 2003). El mal funcionamiento de los mecanismos de control del ciclo

celular y de la apoptosis, hace que una célula con daño no reparado en su ADN se reproduzca continuamente, en lugar de morir o detener su duplicación (Tamm et al, 2001).

Los nuevos conocimientos sobre el control del ciclo celular modifican la visión clásica de que la sensibilidad a las drogas antineoplásicas dependía, de forma casi exclusiva, de la interacción entre el fármaco y su diana celular. En muchas ocasiones dicha interacción es solo el estímulo que inicia una cascada de acontecimientos que eventualmente pueden terminar con la vida de la célula (Chu et al, 1997). Un elemento importante en todo lo descrito anteriormente es la proteína p53. p53 es una proteína activadora de la transcripción, con efecto tumoral supresor, que actúa deteniendo el ciclo celular en la fase G1 o G2, cuando la célula es expuesta a fármacos que dañan el ADN (Chu et al, 1997; Leonard et al, 1995). Comportándose así como una potente inductora de la apoptosis (Leonard et al, 1995). Las mutaciones en el gen que codifica para p53 son frecuentes en los tumores humanos (Chu et al, 1997). Las alteraciones en la regulación de la apoptosis y en los puntos de chequeo del ciclo celular, por mutaciones de p53, pueden ser causa de resistencia a la quimioterapia (Chu et al, 1997; Marie, 2001). Una p53 alterada se ha relacionado con resistencia a una gran variedad de quimioterápicos, pero, por el contrario, también con una mayor sensibilidad a otros (Chu et al, 1997). Las alteraciones de p53 se han relacionado con la respuesta a la quimioterapia (Chin et al, 1992; Harada et al, 2003; Kawasaki et al, 1998), en especial con la resistencia al cisplatino. En su estado normal, p53 parece ejercer un efecto supresor sobre los genes que codifican dos proteínas relacionadas con la resistencia a la quimioterapia, MRP y P-gp (Chin et al, 1992; Wang et al, 1998). P-gp, con independencia de su papel de bomba de membrana, se ha relacionado con la inhibición de la apoptosis por vías diferentes a la relacionada con p53 (Chin et al, 1992). Además de p53, existen otros elementos que actuando también sobre la apoptosis, pueden tener un papel en la resistencia a la

quimioterapia (Chu et al, 1997). Entre ellos tenemos: la activación de genes supresores de la apoptosis como el Bcl-2, cuya inhibición disminuye la resistencia a drogas antineoplásicas en cultivos celulares de leucemia y linfomas; la inhibición de las proteínas quinasas activadas por el *stress* (SAPK o “Stress-Activated Protein Kinase”), las cuales facilitan la apoptosis inducida por quimioterapia; o la inhibición de las caspasas, que activadas por muchos quimioterápicos inician la apoptosis (Solary et al, 2000).

Entre los mecanismos descritos en el párrafo anterior el que ha concitado gran atención y dedicación por parte de varios grupos de investigación es la inactivación mediada por quinasas de una proteína conocida como TTL (Tubulin Tyrosine Ligase). Esta proteína es la responsable de la adición de un residuo de nitrotirosina al Glutamato carboxi terminal de la α tubulina lo que en condiciones normales produciría una alteración de la red microtubular resultando en apoptosis por un mecanismo dependiente o independiente de caspasas. La falla de este mecanismo permitiría a la célula escapar del control proliferativo y eventualmente generar cáncer. Además se ha descrito que la fosforilación de TTL esta relacionada con un mal pronóstico de la enfermedad. La fosforilación de esta enzima presumiblemente por una isoforma de la proteína quinasa C (PKC) en un residuo de serina cercano a su sitio de unión al ATP impediría la unión del nucleótido a su sitio de hidrólisis lo que resultaría en la inactivación (Idriss et al, 2000).

1.4 BOMBAS DE EFLUJO.

Estos transportadores han demostrado tener un importante y muy bien definido rol en la extrusión de drogas con relevancia clínica. Dentro de este apartado, encontramos a las siguientes proteínas transportadoras: P-glicoproteína, las proteínas asociadas a la resistencia múltiple a drogas (MRPs), de las cuales se conocen 12 isoformas y la proteína de resistencia a drogas del cáncer de mamas ABCG2. En realidad la familia de los transportadores ABC en mamíferos parece ser más extensa y funcionalmente diversa y es muy probable que en un futuro no muy lejano más proteínas transportadoras de este tipo sean identificadas y caracterizadas. Todas las proteínas transportadoras del tipo ABC que serán discutidas aquí y que están involucradas en el fenómeno MDR se localizan principalmente en la membrana plasmática desde donde ellas pueden extruir una gran variedad de fármacos estructuralmente muy diferentes, además de metabolitos, fármacos conjugados y otros compuestos. La exportación de estos compuestos fuera de los límites celulares ocurre de una manera activa donde la energía requerida proviene de la hidrólisis del ATP, y ella puede llevarse a cabo incluso en contra de gradientes de concentración. Basándonos en su estructura las proteínas transportadoras de drogas pueden dividirse en cuatro clases. La primera en ser descubierta y caracterizada fue P-glicoproteína, la que posee dos dominios muy similares, cada uno de los cuales tiene seis segmentos transmembrana y un sitio de unión para ATP, ubicados ambos en el lado intracelular. El primer segmento extracelular de P-gp está fuertemente N-glicosilado. La misma arquitectura general se encuentra en MRP-4 y MRP-5 dos miembros de la familia MRP, pero las glicosilaciones se encuentran principalmente en el cuarto segmento extracelular. MRP-1 MRP-2 y MRP-3 tienen la misma estructura básica que MRP-4 y MRP-5, pero además ellos poseen una extensión N-terminal que consiste de cinco

segmentos transmembrana. Como consecuencia el N-terminal de estas proteínas se encuentra ubicado extracelularmente y glicosilado en MRP-1.

La proteína transportadora de drogas más reciente es BCRP. A diferencia de los transportadores antes discutidos, este es sólo un “medio transportador” que posee sólo un sitio de unión a ATP intracelular seguido de seis segmentos transmembrana. La última vuelta extracelular es glicosilada, la información disponible sugiere que el transportador BCRP funciona como un homodímero.

Todos estos transportadores poseen de una u otra forma árboles de glicosilación. Según algunos estudios in vitro es muy probable que estas glicosilaciones no sean necesarias para la función transportadora básica de estas proteínas. Sin embargo la N-glicosilación probablemente cumple un importante papel ayudando a estabilizar la inserción de los transportadores a la membrana.

1.5 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL FENÓMENO MDR

1.5.1a P-gp

La P-glicoproteína (P-gp) es quizás la proteína transportadora de drogas mejor estudiada de todas. Su característica más destacable es sin lugar a dudas la diversidad estructural de los sustratos que puede transportar, que incluyen un vasto número de drogas con importantes usos terapéuticos. En este trabajo los compuestos que son efectivamente transportados por estas ATPasas serán denominados sustratos mientras que los compuestos que sólo han demostrado ser inhibidores serán llamados inhibidores o simplemente bloqueadores. P-gp fue identificado porque se descubrió que se sobreexpresaba en líneas celulares que eran resistentes a drogas citotóxicas. Debido a la gran variedad de sustratos transportados y a la diversidad estructural de estos, este

curioso fenómeno fue denominado “multirresistencia a drogas” (Senior et al, 1997; Ambudkar et al, 1999; Schinkel et al, 1997).

Sólo hay unos pocos denominadores comunes en la estructura de los sustratos de P-gp. Ellos usualmente son moléculas orgánicas cuyo peso molecular va desde algo menos de 200 Da hasta casi 1900 Da. Muchos contienen grupos aromáticos, pero moléculas lineales o circulares también son transportadas. La mayoría de las moléculas que son transportadas eficientemente no poseen carga o son de naturaleza básica, pero algunos compuestos ácidos como metotrexato y fenitoína también pueden ser extruídos aunque a una tasa menor. El principal denominador común de los sustratos de P-gp es la naturaleza anfipática de estas moléculas. Esto puede estar estrechamente relacionado con el mecanismo de translocación propuesto para P-gp. Se ha postulado que los sustratos intracelulares de P-gp primero deben insertarse en el pliegue interior de la membrana plasmática antes de ser “volteados” hacia el pliegue más externo de esta o quizás ser extruídos directamente hacia el medio extracelular por P-gp (Higgins et al, 1992; Smit et al, 1993; Smith et al, 1994; Van Heelvort et al, 1996). Sólo moléculas de naturaleza anfipática poseen las características deseadas de inserción a la membrana. Como la mayoría de los sustratos de P-gp son hidrofóbicos en principio ellos pueden difundir pasivamente a través de las membranas biológicas a una tasa razonable. En estudios farmacológicos esto haría suponer que en la ausencia de transporte activo los sustratos de P-gp cruzarán membranas y llegarán a los tejidos u otros compartimentos (Smit et al, 1993; Van Heelvort et al, 1996). Entre los sustratos de P-gp encontramos: Inhibidores de la proteasa del VIH tales como imrinavir, saquinavir, ritonavir, antidiaréticos como la loperamida, antagonistas H₂ como la cimetidina y antineoplásicos como los alcaloides de la vinca, antraciclinas, taxanos, antracenos, topotecano, y MTX.

1.5.1b Funciones fisiológicas de P-gp

MDR-1 P-gp se encuentra principalmente (aunque no de manera exclusiva) en las células epiteliales del cuerpo donde se localiza en la membrana apical (Thiebaut et al, 1987). Esto puede tener dramáticas consecuencias para la conducta farmacológica de las drogas sustrato. Muchas de estas características farmacológicas fueron demostradas por primera vez en ratones *Knockout* que no poseían uno o dos de los homólogos Murinos de MDR-1 P-gp humana, Mdr1a y Mdr1b (Schinkel et al, 1991; Huisman et al, 2001). Entre las funciones más estudiadas se encuentran las que cumple en la barrera hematoencefálica (Cordon-Cardo et al, 1989; Schinkel et al, 1994, 1995, 1996), hematotesticular (Saito et al, 2001; Schinkel et al 1995), hematofetal (Lankas et al, 1998), la función hepatobiliar y la excreción intestinal directa (Thiebaut et al, 1987).

1.5.2a MRP1 (ABCC1)

Esta proteína fue identificada por primera vez en una línea celular que se hizo muy resistente a doxorubicina y no poseía P-gp, los análisis que siguieron a esta observación concluyeron que esta proteína además confería resistencia a un gran número de otros antineoplásicos. Entre los sustratos que esta proteína puede transportar se incluyen los alcaloides de la vinca, antraciclinas, mitoxantrona y metoxetrato (Cole et al., 1992, 1994).

MRP1 funciona principalmente como un cotransportador de aniones orgánicos anfipáticos y otros compuestos de diferente naturaleza. Puede transportar drogas hidrofóbicas como el mediador inflamatorio leucotrieno C4 (LTC4) y otros compuestos que están conjugados o acomplejados con el tripéptido aniónico glutatión (GSH), además de aquellos que están conjugados con ácido glucurónico o sulfato. En realidad el transporte eficiente de varias drogas

anti cancerígenas no aniónicas por medio de MRP1 es muy dependiente del contenido celular de GSH, por otro lado es muy probable que MRP1 exporte drogas tales como vincristina y etopósido mediante cotransporte con GSH reducido. Iones no orgánicos de metales pesados como arsénico y antimonio trivalente también son transportados unidos a GSH (Leier et al, 1994; Muller et al, 1994). A diferencia de P-gp, MRP1 se localiza en la membrana basolateral de las células epiteliales y sus sustratos por lo tanto son transportados hacia el lado basolateral del epitelio (Evers et al, 1996). Ratones knockout para Mrp1 son viables y fértiles pero muestran deficiencias en las reacciones inflamatorias mediadas por LTC₄, lo que sugiere que la excreción de LTC₄ es tal vez la principal función fisiológica de MRP1 (Wijnholds et al, 1997).

1.5.2b Funciones farmacológicas de MRP1

Aunque MRP1 se localiza predominantemente en la membrana basolateral de las células epiteliales posee importantes funciones farmacológicas y toxicológicas. Algunos grupos han demostrado que ratones knockout para Mrp1 son más sensibles a los efectos tóxicos de etopósido administrado por vía intravenosa en la membrana muco-orofaríngea y en los túbulos testiculares (Wijnholds et al, 1997). Esto puede ser explicado por el hecho de que estas células están protegidas por el epitelio de las toxinas traídas por la sangre, ya que este epitelio tiene su lado basolateral hacia el flujo sanguíneo (Wijnholds et al, 2000).

A nivel celular la expresión endógena de MRP1 (y P-gp) puede contribuir de manera substancial a la resistencia basal de líneas celulares a una amplia gama de drogas anticancerígenas. Lo anterior fue demostrado usando dos modelos experimentales, células madre y otra de fibroblastos que eran deficientes para Mrp1, y/o Mdr1a y Mdr1b. En estos modelos se observó una marcada

sensibilidad a alcaloides de la vinca, antraciclinas y topotecanos (Lorico et al, 1996). Tales contribuciones pueden explicar de forma muy satisfactoria el marcado aumento de la sensibilidad a las drogas de la médula ósea y de las células del epitelio intestinal que son deficientes de Mrp1 y especialmente cuando la proteína transportadora de drogas P-gp también es deficiente en estos tejidos. Para los efectos de extrapolar resultados de estudios farmacológicos se debe tener en cuenta que el Mrp1 de roedor es mucho menos eficiente que el MRP humano a la hora de transportar antraciclinas (Allen et al, 2000; Zhang et al, 2001). Algunos sustratos conocidos de MRP1 son: etopósido, tenipósido, alcaloides de la vinca, antraciclinas, irinotecan, topotecan, mitoxantrona y oxianiones de metales pesados tales como arsenito y amonio trivalente (Zhang et al, 2001). Entre los inhibidores de MRP1 descritos, se encuentran LCT4 y su análogo MK571, además de S-decilglutación, sulfinpirazona, benzobromarona y probenecid (Loe et al., 1996; Keppler et al, 1998; Hollo et al, 1996).

1.5.3 Proteínas no pertenecientes a la familia ABC involucradas en el fenómeno MDR

1.5.3a Bóvedas (vaults) o LRP (MVP)

Este tipo especial de proteína fue llamada bóveda (vault) cuando fue descrita por primera vez en el inicio de la década de los ochenta debido a que su estructura tridimensional se asemejaba a las cúpulas abovedadas de las catedrales. Este complejo parece tener un tamaño aproximado de 42x75 nm y una masa molecular de 13MDa que lo convierten en la ribonucleoproteína de mayor tamaño conocida (Kedersha et al, 1986). Las vaults están compuestas mayoritariamente por múltiples copias de tres proteínas de masas moleculares de 100.000, 130.000, 240.000 Da respectivamente, además de pequeñas moléculas de RNA sin traducir de entre 88-141 bases de largo (Scheffer et al, 1995). La estructura en forma de barril de estos complejos proteicos y su localización subcelular sugiere que están involucradas en funciones de trasiego intracelular y por lo tanto se postuló que podían estar involucradas en el fenómeno de resistencia a multidroga mediante el secuestro de agentes terapéuticos o su reclutamiento lejos de sus respectivas dianas moleculares (Kong et al, 1999). La localización intracelular de vaults es múltiple y se han encontrado en el citoplasma asociadas a componentes del citoesqueleto (Hamill et al, 1997), además se ha señalado su asociación con el núcleo, en particular con el nucléolo, la membrana nuclear y/o poros nucleares (Chugani et al, 1993). En general se ha descrito que en mamíferos no más del 5% de la fracción total de esta ribonucleoproteína se encuentra asociada al núcleo (Abbondanza et al, 1998). Su relación con el fenómeno de resistencia a multidroga no fue establecida fehacientemente hasta la identificación, a mediados de la década de los noventa, de una proteína de masa molecular de 110,000 Da en una línea cancerígena de pulmón que se mostró particularmente resistente al tratamiento con doxorubicina y que no expresaba P-gp (Scheper et al, 1993). Esta proteína fue llamada LRP (Lung Resistance Protein), en un comienzo

y su posterior análisis determinó que era idéntica a MVP y se postuló que transportaba drogas lejos de sus dianas moleculares, mediando la extrusión de drogas fuera del núcleo y el secuestro de drogas en vesículas (Scheffer et al, 1995).

1.6 COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL CON PROBADA Y POSIBLE ACTIVIDAD MODULADORA SOBRE EL FENÓMENO MDR.

A pesar de que muchos de los compuestos probados como posibles moduladores del transporte de fármacos mediado por los transportadores del tipo ABC, son sustancias de origen artificial o derivados de compuestos naturales obtenidos por hemisíntesis, existe una gran variedad de moléculas de origen natural y de ocurrencia sorprendentemente común que han probado modular la actividad de estos transportadores de formas igualmente diversas y variadas.

Entre los tipos de compuestos más estudiados se encuentran los flavonoides y las lactonas sesquiterpénicas. Los flavonoides han demostrado estar directamente involucrados en la regulación de procesos vitales entre los que se encuentran protección contra el stress oxidativo, interacción con las diversas isoformas del complejo citocromo P450 e interacción con diversos transportadores de membrana como los encargados del transporte de glucosa, mientras que las lactonas sesquiterpénicas tiene una probada participación en la respuesta antiinflamatoria, antifúngica y antitumoral.

1.6.1 Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas (SL por sus siglas en ingles) son una gran familia de más de 5,000 compuestos aislados principalmente a partir de plantas de la familia Compositae que poseen una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas (Marles et al, 1995). Debido a su toxicidad algunos de estos compuestos han sido probados para establecer su actividad antifúngica (Calera et al, 1990). Se conoce que parte de la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas se debe a su capacidad de alquilar nucleófilos biológicos tales como cisteína, glutatión o sistemas

que contengan grupos sulfidrilo como las enzimas fosfofructoquinasa y glicógeno sintasa. No es aventurado por lo tanto postular que afectando los niveles intracelulares de GSH las lactonas sesquiterpénicas pueden modular de forma negativa variadas funciones celulares. Otro de los mecanismos descritos es la interacción de las lactonas sesquiterpénicas con el factor de transcripción NF- κ B que es responsable de la expresión de más de 150 genes entre las que se cuentan la expresión de citoquinas inflamatorias como las interleuquinas 1, 2, 4,6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), además de genes que codifican para inmunorreceptores, moléculas de adhesión, proteínas de fase aguda y enzimas como ciclooxigenasa II (Baeuerle and Henkel, 1999; Pahl, 1999). El factor de transcripción NF- κ B esta compuesto por dos subunidades llamadas p50 y p65 que son retenidas en el citoplasma en forma inactiva unidas a la subunidad inhibitoria I κ B. Inductores de NF- κ B tales como lipopolisacáridos bacterianos o citoquinas inflamatorias que activan el complejo I κ B quinasa (IKK), el cual fosforila I κ B en las serinas 32 y 36 causando la degradación del IKK por proteosomas (Barnes and Martin, 1997).

Muchas SL han mostrado inhibir la activación de NF- κ B pero sorprendentemente ellas no actúan inhibiendo la translocación nuclear del factor de transcripción o la degradación de I κ B sino a través de la alquilación de la cisteína 38 en la subunidad p65 del factor de transcripción, lo que impediría su unión al DNA, interrumpiendo de esta forma la transcripción de los genes modulados por NF- κ B (Alfonso et al., 2001).

Una de las primeras aproximaciones experimentales realizadas con el objeto de elucidar el mecanismo de acción de estos compuestos, estableció fehacientemente que actuaban, de forma general, inhibiendo la síntesis de proteínas (Martinez et al., 1994) sin embargo experiencias posteriores mostraron que algunas SL también actúan además inhibiendo la síntesis del DNA (Woynarowsky et al, 1981; Ross et al, 1999). En este estudio las propiedades mutagénicas de la

SL himenovina sugieren una directa interferencia en la función del DNA. Se cree que los grupos multifuncionales responsables de la alquilación en SL pueden formar enlaces cruzados entre secciones de DNA y/o DNA y proteínas. Este hipótesis se probó en células de carcinoma uterino HeLa en donde se obtuvieron pruebas concluyentes de que las SL inhibían la síntesis de DNA in vivo (Woynarowsky et al., 1981).

En lo tocante a la interacción de las SL con las proteínas del tipo ABC se ha postulado que estos compuestos no afectarían de forma directa la actividad ATPasa sino que modularían el transporte a través de su unión a los dominios transmembrana de la proteína lo que causaría efectos alostéricos negativos que redundarían en una disminución de la capacidad por parte del dominio de unión de nucleótido de unir ATP, revirtiendo de esta forma el fenómeno MDR, lo que las transforma en una de las clases de compuestos que concitará el mayor interés científico en los años por venir (Muñoz-Martínez et al, 2004).

En esta línea de acción destaca, leptocarpina, una lactona sesquiterpénica aislada a partir de la planta nativa *leptocarpha rivularis* (palo negro) perteneciente a la familia *compositae* y que ha sido usada desde tiempos inmemoriales en la medicina nativa de Chile como agente estimulante, carminativo y para el tratamiento de desórdenes gástricos. Estudios biológicos de carácter preliminar han determinado que leptocarpina posee actividad biológica, la que se traduce en la inhibición de la síntesis de proteínas en células HeLa sin afectar la síntesis de ácidos nucleicos (Martinez et al., 1995). La información disponible acerca de otros de sus congéneres permite afirmar también que leptocarpina posee algún grado de actividad citotóxica aunque su espectro de acción y mecanismos de acción en células tumorales es aún desconocido.

En base a los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente hipótesis y objetivos.

2 HIPOTESIS.

Leptocarpina, una lactona sesquiterpénica aislada a partir de partes aéreas de la planta nativa Palo Negro (*Leptocarpa rivularis*) presenta actividad citotóxica, apoptótica y quimiosensibilizadora sobre células leucémicas de distintas estirpes.

3 OBJETIVO GENERAL.

Determinar las propiedades citotóxicas, apoptótica y quimiosensibilizadora de leptocarpina, utilizando líneas celulares y cultivos primarios de células hematológicas provenientes de pacientes leucémicos y contrastar los resultados con muestras de individuos normales.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Montar un método para determinación de viabilidad celular por MTT en células que crecen en suspensión.
2. Medir el efecto de leptocarpina sobre viabilidad y proliferación en:
 - Cultivos primarios de células hematológicas de pacientes leucémicos.
 - Cultivos primarios de leucocitos.
 - Cultivo celular de líneas tumorales humanas (HL60 y U937).
3. Determinar el mecanismo citotóxico inducido por leptocarpina en:
 - Cultivos primarios de células hematológicas de pacientes leucémicos.
 - Cultivos primarios de leucocitos.

Cultivo celular de líneas tumorales humanas (HL60 y U937).

4. Determinar el efecto de leptocarpina sobre la expresión de las proteínas involucradas en el fenómeno de resistencia a multidrogas en:

Cultivos primarios de leucocitos.

Cultivo celular de líneas tumorales humanas (HL60 y U937).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Reactivos

Leptocarpina (extracción propia).

Gibco: Medio RPMI 1640, Mezcla antibiótica-antifúngica (penicilina-estreptomicina-anfotericina B) para cultivo, L-glutamina.

Invitrogen: agarosa ultra pura, bromuro de etidio, Taq DNA polimerasa.

J.T.Baker: ácido clorhídrico, cloruro de sodio.

Kibutz Beit Haemek: Suero fetal bovino

Merck, Darmstadt, Alemania: hidróxido de sodio, isopropanol, etanol, dimetil sulfoxido (DMSO), fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de sodio.

Perkin Elmer: desoxirribonucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP).

Promega: DNA polimerasa.

Sigma Chemical Co: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT); tris[hidroximetil]aminometano (Trizma-base), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), bicarbonato de sodio

Winkler: PBS 10X, Tris HCl pH 9,0 Buffer Fosfato pH 7,5; agua libre de nucleasas

4.1.2 Equipos

Balanza analítica Shimadzu (Libror AEX-120 G), espectrofotómetro Hewlett Packard (8453), pHmetro Radiometer Copenhagen (PHM 83 autocal pH meter), balanza Shimadzu (Libror EB-3200 S), termociclador MJ Research (Mini Cyclor), micropipetas Gilson, horno microondas 18 Somela (E 70 TF-7), microcentrífuga mikro 22R, cámara de bioseguridad Nuair (class II type A), estufa de cultivo con inyección de CO₂ Nuair (Ir Autoflow), baño termorregulado Kottermann, vortex Fisher (Genie 2), cámara digital para geles de agarosa Spectroline (model CA-1000/F) con monitor, Fluorímetro Perkin Elmer modelo, LS-50; centrífuga Eppendorf 5417-R, cámara de Neubauer, bomba de vacío GAST modelo DOA-P104-AA, microscopio invertido NOVA modelo IN833, Freezer a -70°C Forma Scientific Bio-freezer 8425.

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Cultivo celular: Las líneas humanas de leucemia, HL-60 y U-937, crecieron en medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina/estreptomicina 1% y L-glutamina 2 mM, a 37° C en atmósfera humedecida y con 5% de CO₂. El cambio de medio se realizó cuando alcanzaban una densidad celular de 1 millón/mL, centrifugando las células a 2000 rpm, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet celular en PBS 1x para ser lavadas por pipeteo repetido, se repitió la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió las células en medio RPMI 1640 completo.

4.2.2 Obtención de muestras clínicas: Las muestras de células leucémicas provenían de pacientes de la Unidad de Hematología del Hospital Clínico Regional de Valdivia, en el momento en que se les diagnosticaba la enfermedad y previo consentimiento informado. Se les recolectó sangre periférica en tubos heparinizados y se separaron las células mononucleares. Muestras sanguíneas normales frescas fueron obtenidas de donantes del Banco de Sangre del Hospital Clínico Regional de Valdivia, a las cuales se les separaron los glóbulos rojos, plasma y plaquetas. Posteriormente las células mononucleares tanto cancerígenas como normales se separaron por centrifugación a 1800 rpm por 30 min en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque, las células obtenidas en cada interfase se lavaron entre dos a tres veces con una solución hipotónica de NaCl 0,2% para producir lisis de glóbulos rojos remanentes por no más de 15 segundos y después se le agregó igual volumen de una solución hipertónica de NaCl 1,6% en igual volumen para equiparar la osmolaridad, a continuación las células se lavaron dos veces con medio RPMI 1640, y se resuspendieron en medio de cultivo con suero bovino fetal 10%, penicilina/estreptomicina 1% y 2 mM L-glutamina.

4.2.3 Viabilidad celular por el ensayo MTT para células en suspensión: Este método se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) de color amarillo y soluble en agua, en cristales de formazan azul oscuro insolubles en agua. Esta reacción solo ocurre en células viables y es catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa.

El formazan insoluble en agua debe ser solubilizado y la densidad óptica del material resultante se mide espectrofotométricamente y la absorbancia es proporcional a la concentración de la tinción lo que se correlaciona con el número de células metabólicamente viables en el cultivo.

El ensayo se basó en lo descrito por Tim Mosmann el año 1983 pero con modificaciones.

Lo primero fue determinar el número óptimo de células, para lo cual se hizo una curva de calibración para cada tipo celular, lo que determinó un número óptimo de células de 5×10^4 cel/pocillo para HL60, 7×10^4 cel/pocillo para U937, 3×10^5 cel/pocillo para leucocitos y 5×10^5 cel/pocillo para células leucémicas. La densidad celular fue de 1 millón cel/mL en tubos Eppendorf 1,5 mL en los cuales se realizó casi la totalidad del ensayo. Una vez sembradas las células en los tubos, se agregó una solución del reactivo MTT (1 mg/mL) disuelto en medio completo en un volumen igual al de la suspensión celular para lograr una concentración de 0,5 mg/mL por tubo. Los tubos se incubaron por 1 hora a 37° C y 5% CO₂, posteriormente se recuperaron las células por centrifugación a 2000 rpm y se lavaron una vez con medio sin suplementar, el precipitado de color violáceo en el interior de las células a menudo visible a simple vista fue resuspendido con 100 µL de Dimetil sulfoxido (DMSO) por tubo, luego se traspasa la solución a una placa multipocillos y se lee la absorbancia a 550 nm en un multilector de placas.

4.2.4 Viabilidad celular por exclusión de azul de tripán: Las células cancerígenas, normales y líneas celulares después de ser incubadas con leptocarpina se recolectaron por centrifugación a 2000 rpm x 3 minutos, se lavaron una vez con PBS 1X y se resuspendieron en medio completo, del cual se toma una alícuota de 50 μ L la que se diluye 4 veces con 100 μ L de PBS 1X y un volumen de azul de tripán al 0,4% de 50 μ l. Se colocó una alícuota de 10 μ L de la solución resultante en una cámara de Neubauer y las células se contaron en un microscopio de lente invertido.

Aquellas que incorporan la tinción se consideran no viables para los efectos del ensayo.

4.2.5 Determinación de apoptosis por caspasa 3: Se usó el kit EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 para determinar la actividad de caspasa 3 por fluorescencia. Las células sembradas a una densidad de 1 millón/mL fueron incubadas por 18 horas a distintas concentraciones de leptocarpina, después se contaron por exclusión de azul de tripan y se recolectó 1 millón de células de cada pocillo, se lavaron dos veces con PBS 1X centrifugándose a 2000 rpm x 3 minutos para recolectar el pellet celular, el cual se resuspendió en 50 μ L de buffer de lisis celular 1X y se incubó 30 minutos en hielo. A continuación se centrifugaron las muestras a 5000 rpm x 5 minutos y se transfirieron 50 μ L del sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1,5 mL. Como control no enzimático se usó 50 μ L de buffer de lisis celular 1X, además de un control con un inhibidor enzimático. Se agregó 50 μ L de solución de trabajo de sustrato 2X y se incubó por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia a 342 nm de excitación y 441 nm de emisión. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de caspasa 3.

4.2.6 Extracción de RNA total: Se utilizó el método de Chomczynski. Las células sembradas a una densidad de 1 millón/mL fueron incubadas por 24 horas a distintas concentraciones de

leptocarpina; se contaron y se recolectaron 10 millones de células, las que se lavaron 2 veces con PBS 1X; las células se lisaron con 1 mL de solución de Chomczynski por pipeteo repetido a temperatura ambiente; luego se agregó 0,2 mL de cloroformo por cada mL de solución de Chomczynski, se mezcló en vortex vigorosamente por 15 segundos y se dejó reposar por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 g x 15 minutos a 4°C, se separó la fase acuosa superior y se precipitó el RNA con 0,5 mL de alcohol isopropílico, se mezcló y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugaron las muestras a 12000 g x 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el RNA con alcohol etílico 75°. La suspensión se centrifugó a 7500 g x 5 minutos a 4°C. Luego se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente; a continuación el RNA se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas y se guardó a -70°C.

4.2.7 Cuantificación del RNA total: La cuantificación del RNA total se realizó mediante un procedimiento espectrofotométrico, para lo cual se midió la absorbancia a 260 nm de las muestras de RNA, diluidas 250 veces en agua estéril. La concentración aproximada de la muestra se calculó utilizando la relación que dice que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA. La concentración final de la solución de RNA se obtuvo al multiplicar el valor de absorbancia obtenido por el factor de dilución de cada muestra y por 40 µg/mL.

4.2.8 Síntesis de cDNA total: De acuerdo a Roth y col. (1985), en un tubo de microcentrífuga estéril, libre de nucleasas, se agregaron 2,5 µg de RNA, 1 µL del partidor oligo dT 100 mM, 1 µL de mix de dNTP's (10 mM cada uno), y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 20 µL finales. La mezcla fue calentada a 65°C por 5 min para eliminar las estructuras secundarias en el templado, y se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente, a la mezcla anterior se le agregaron 4 µl de tampón de reacción 5X para la transcriptasa reversa M-MLV, 2 µL de DTT 10

mM, 25 U de inhibidor de RNAsas, 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV. Se mezcló suavemente y se incubó a 42 °C por 1 h. Finalmente, se incubó a 72 °C por 10 min para desactivar la enzima.

4.2.9 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR): La amplificación por PCR se hizo usando 1 μ l of cDNA, buffer PCR 1X, 1.5mM Mg^{+2} , 0.4mM dNTP's, 1.25U Taq DNA polimerasa y 0.5 μ M de oligonucleótido gen-específico. Los partidores oligonucleótidos específicos fueron: β -actin-S: 5'- TCACCCACACTGTGCCCATC-3', β -actin-A: 5'- CAGCGGAACCGCTCATTGCC-3', MRP1-S: 5'-CGTGTACTCCAACGCTGAC-3', MRP1-A: 5'-CTGGACCGCTGACGCCCGTGAC-3, MDR1-S: 5'- CCCATCATTGCAATAGCAGG-3', MDR1-A: 5'- GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3', MDR3-S: 5'- GCTGTGTCAGGAATTGTTGA-3', MDR3-A: 5'-TCGAAAAACAACCGGCATAGG-3', MVP-S: 5'-TTCTGGATTTGGTGGACGC-3', MVP-A: 5'-ACTTCTCTCCCTTGACCAC-3', ABCG2-S: 5'-CTGAGATCCTGAGCCTTTG-3', ABCG2-A: 5'- TGCCCATCACAACATCATCT-3'

La amplificación se hizo entre 30 y 34 ciclos para los distintos partidores, cada ciclo consistió en denaturación a 94°C por 2 min, annealing a 55°C (MDR1, MDR3, MRP1, MVP, ABCG2, P21, Bcl-2, β -actina) o 60°C (BAX) por 1 min y extensión a 72°C por 45 segundos.

4.2.10 Electroforesis en gel de agarosa: Para la identificación y separación de los fragmentos de DNA, se utilizó un método de electroforesis estándar descrito por Sambrook y col. (1989), en geles de agarosa al 1.5 % en tampón TAE 1X, con 1 μ L de bromuro de etidio (0.5 mg/ml). Como estándar de tamaño molecular se utilizaron 0.5 μ g del marcador Winkler de 3 Kb. La corrida electroforética se llevó a cabo aplicando una corriente de 75 mA durante 1 hora. Para visualizar

los fragmentos de DNA se utilizó un transiluminador UV, los que fueron cuantificados con el programa GelPro31 y los resultados fueron graficados en el programa SigmaPlot 9.0.

5 RESULTADOS.

5.1 Curvas de calibración de número de células en función de intensidad de producto en ensayos de MTT.

Con la finalidad de determinar el intervalo lineal entre el número de células y la intensidad de la reacción de MTT, se prepararon curvas de calibración a una absorbancia de 550 nm, que corresponde a la medición del producto de la reacción MTT, en función del número de células, para todos los modelos celulares utilizados (HL60, U937, leucocitos normales y células leucémicas). En la figura N°1 se muestran los resultados para (A) HL60, (B) U937, (C) leucocitos normales, (D) células leucémicas. A partir de los resultados mostrados se determinó utilizar en las líneas HL60 y U937 un número de 50 mil y 70 mil células por experimento respectivamente, en los leucocitos 300 mil células y en las células leucémicas 500 mil células en los experimentos de citotoxicidad. Las curvas corresponden al promedio de tres experimentos individuales.

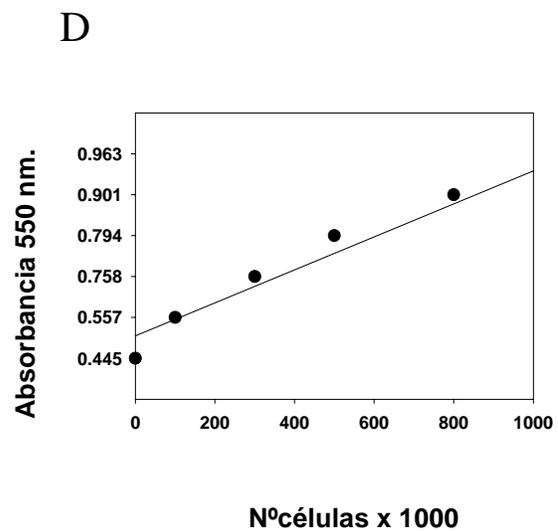
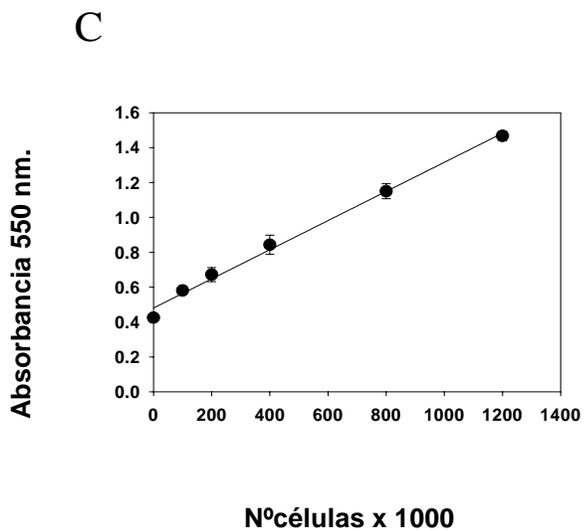
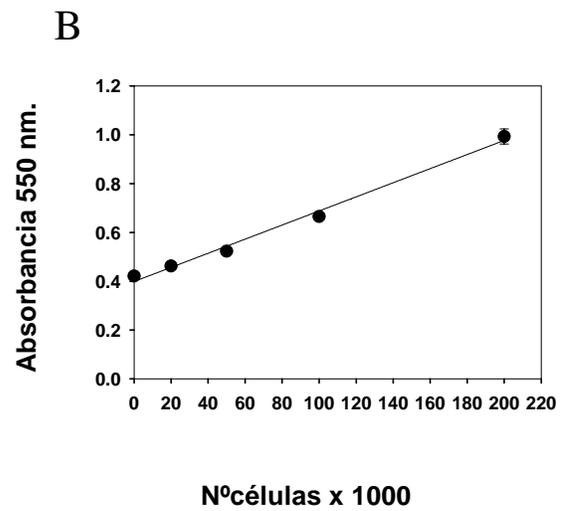
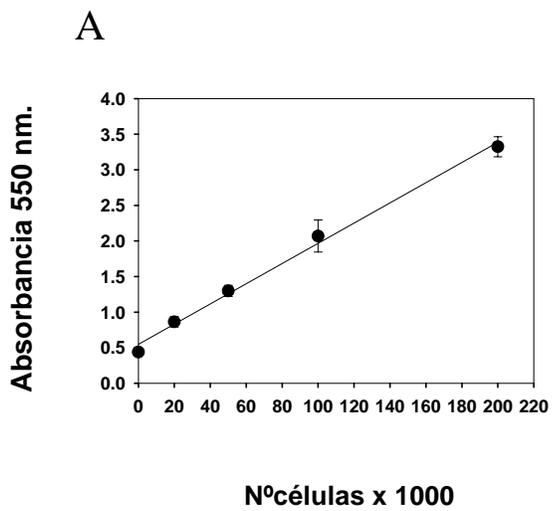


Fig. 1. Curva de calibración para el método de MTT. A) células HL60; B) células U937; C) leucocitos; D) células leucémicas.

5.2 Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular.

Para determinar el efecto de la droga leptocarpina sobre la viabilidad celular en los diferentes tipos celulares, HL60, U937, leucocitos y células leucémicas se realizaron curvas de dosis-respuesta a concentraciones de 0, 10, 20, 30, 50, 75 y 100 μM de la droga a 24 horas de tratamiento mediante el cálculo del IC_{50} (concentración de droga que disminuye la viabilidad al 50%). Por medio del método de exclusión de azul de tripán se obtuvo, para las células HL60 y U937, valores de IC_{50} de 31.7 μM y de 22.8 μM de leptocarpina respectivamente. En el caso de los leucocitos se obtuvo un IC_{50} de 50.4 μM de leptocarpina (fig. 2). En las muestras leucémicas los valores de IC_{50} obtenidos son los siguientes: *células de LLA* provenientes de paciente N°1: 33.5 μM , paciente N°2: 64.7 μM , paciente N°3: 23.2 μM , paciente N°4: 7.3 μM , paciente N°5: 56.2 μM . *Células de LMA* los valores de IC_{50} son para paciente N°6: 50.9 μM , paciente N°7: 18 μM , paciente N°8: 14.9 μM . *Células de LMC*: paciente N°10: 52.5 μM , paciente N°11: 24.3 μM , paciente N°12: 45.5 μM , paciente N°13: 26.7 μM . (fig. 3). La viabilidad celular también se midió utilizando el método de MTT como se describe en el apartado 4.2.3 de materiales y métodos, obteniéndose valores de IC_{50} para las células HL60 y U937 de 22.7 μM y 19.8 μM respectivamente, para los leucocitos normales se obtuvo un IC_{50} de 34.6 μM (fig. 4). En las diferentes muestras de leucemia los valores de IC_{50} por el método de MTT son los siguientes: *células de LLA* provenientes de paciente N°1: 20.5 μM , paciente N°2: 33.4 μM , paciente N°3: 23.6 μM . *Células de LMA* los valores de IC_{50} son: paciente N°6: 11.1 μM , paciente N°7: 42 μM , paciente N°8: 32.1 μM , paciente N°9: 15.1 μM . *Células de pacientes con LMC*, los IC_{50} son: paciente N°10: 6.2 μM , paciente N°11: 18.3 μM , paciente N°12: 3.2 μM , paciente N°13: 26.2 μM (fig. 5). Los gráficos mostrados tanto por el método de MTT como azul de tripán corresponden al promedio de tres experimentos independientes hechos cada uno por triplicado.

En el caso de las células leucémicas, estas se presentan como experimentos independientes de distintos pacientes agrupados por tipo de leucemia. Todos los resultados fueron graficadas como porcentaje del control (células no expuestas a droga).

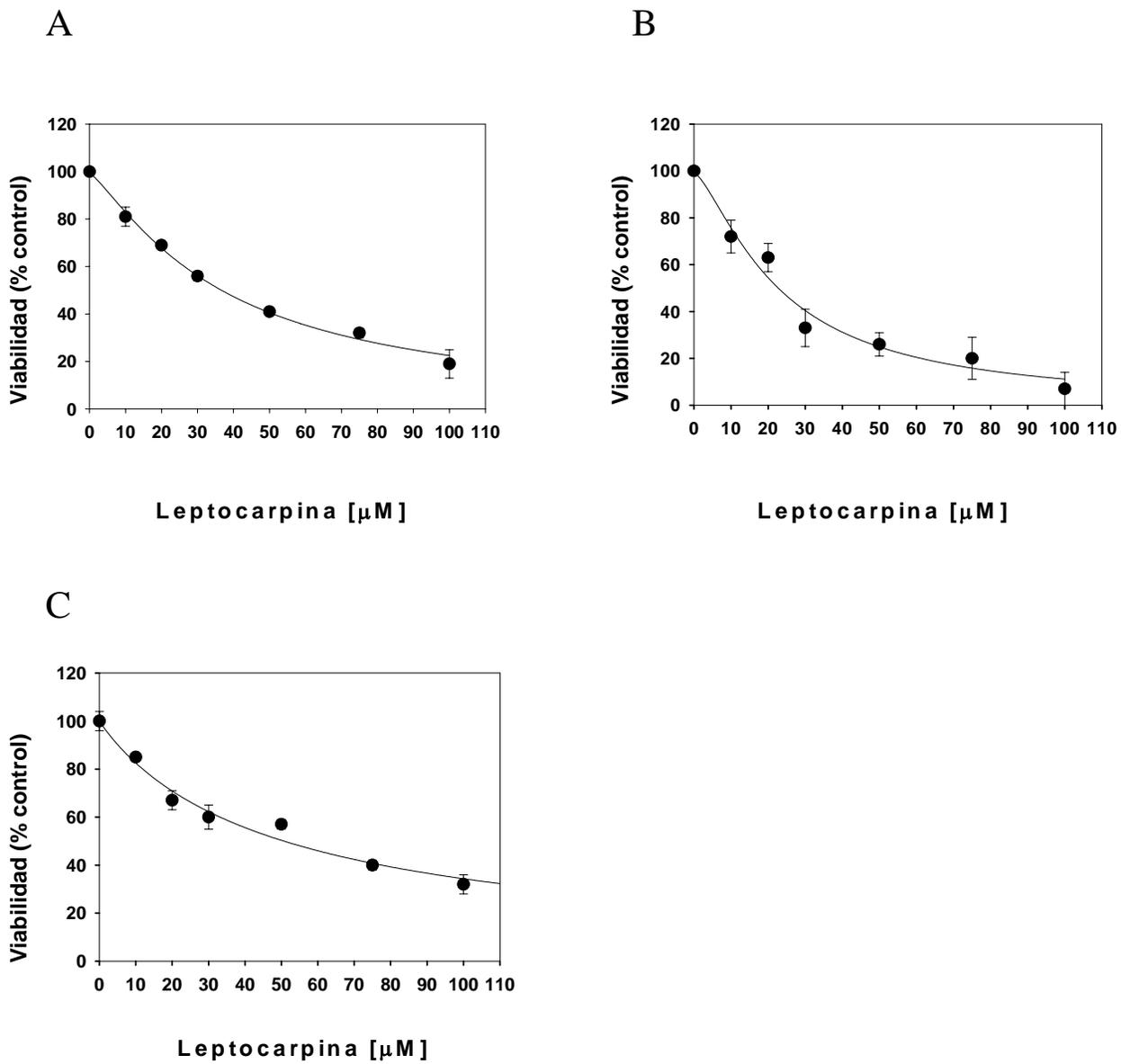


Fig. 2. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en líneas celulares HL60 (A), U937 (B) y leucocitos (C). La viabilidad se determinó por el método de exclusión de azul de tripán a las 24 horas de tratamiento. Los gráficos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

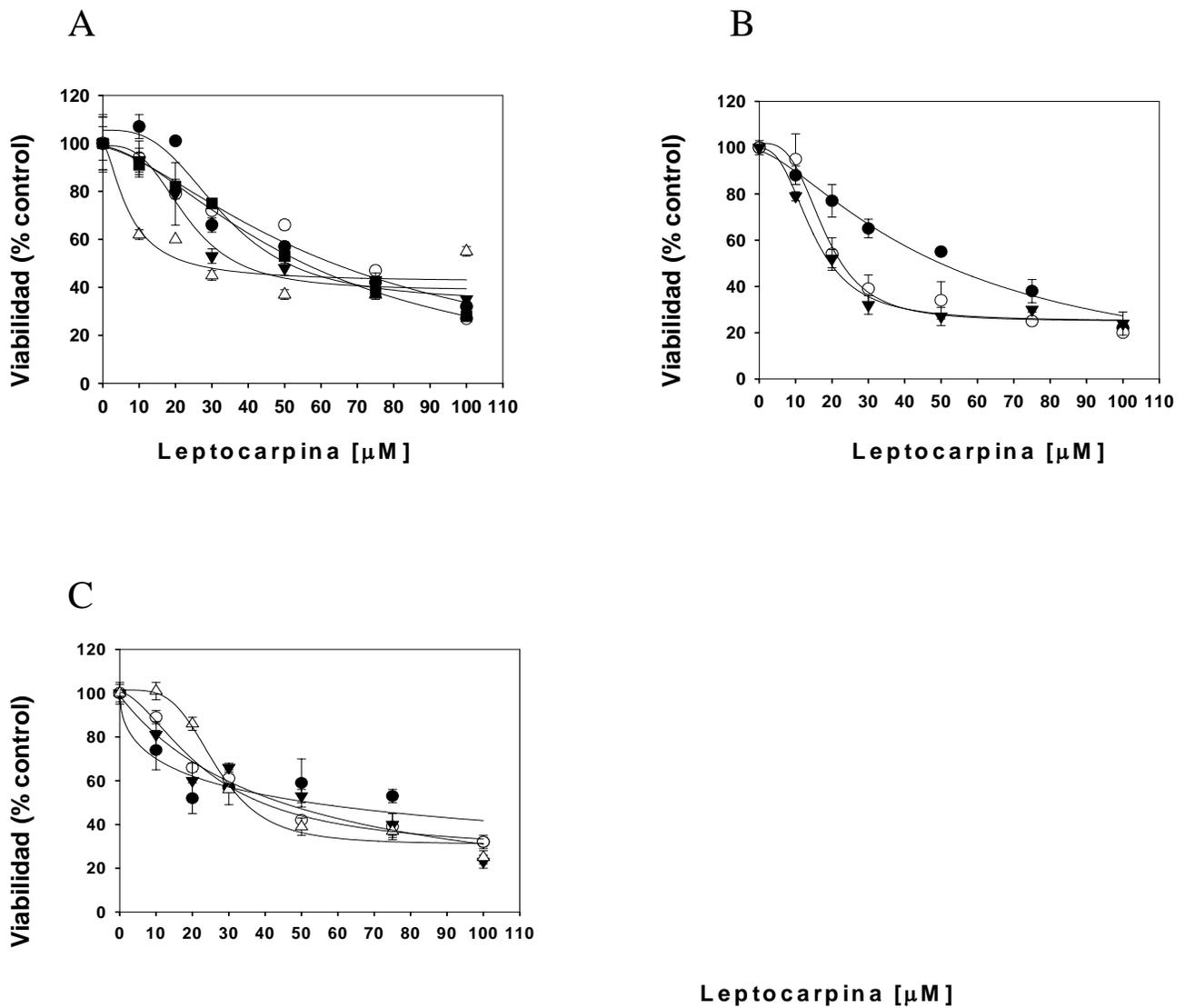


Fig. 3. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en células de LLA, LMA y LMC. La viabilidad se determinó por el método de exclusión de azul de tripan a las 24 horas de tratamiento. A) células de LLA: ● paciente N°1, ○ paciente N°2, ▼ paciente N°3, Δ paciente N°4, ■ paciente N°5. B) células de LMA: ● paciente N°6, ○ paciente N°7, ▼ paciente N°8. C) Células de LMC: ● paciente N°10, ○ paciente N°11, ▼ paciente N°12, Δ paciente N°13.

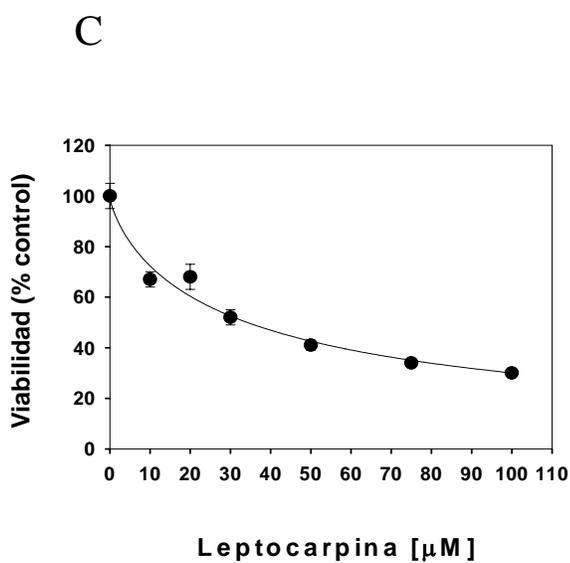
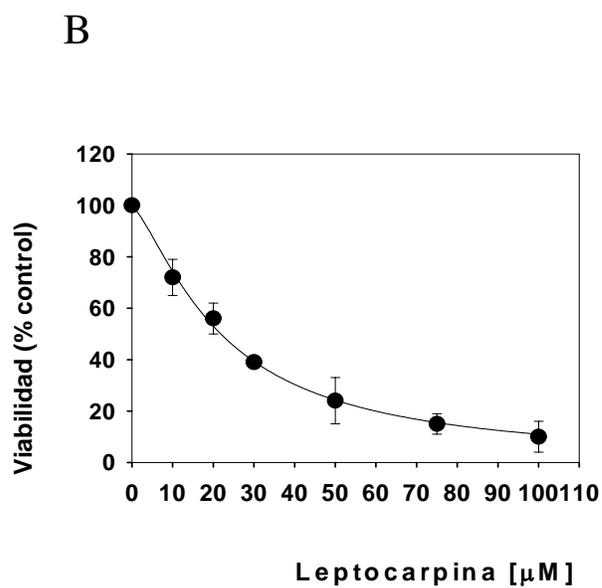
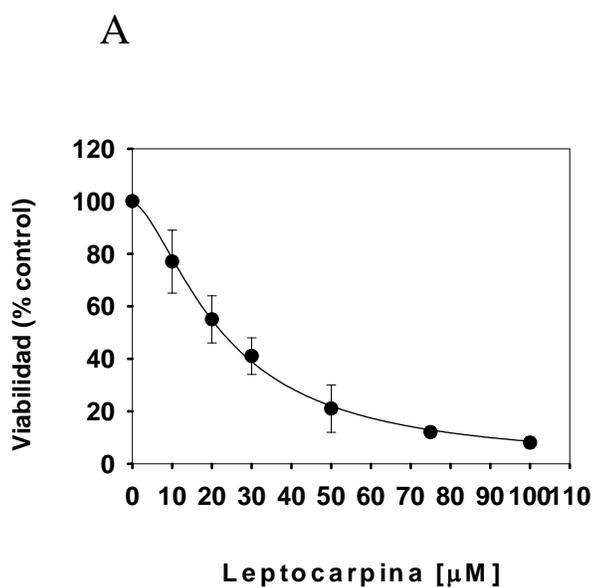


Fig. 4. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en líneas celulares HL60 (A), U937 (B) y leucocitos (C). La viabilidad se determinó por el método de MTT a las 24 horas de tratamiento.

Los gráficos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

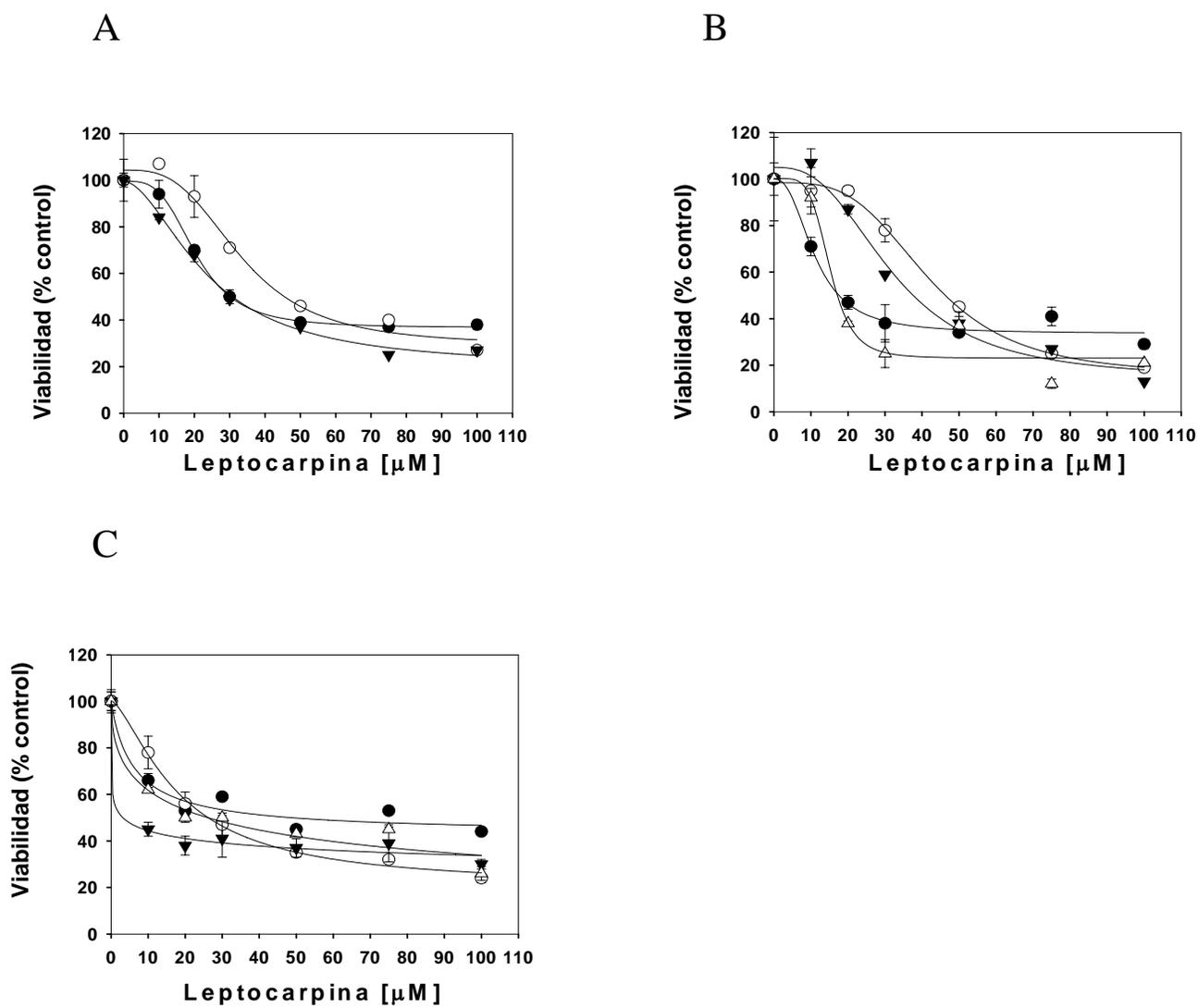


Fig. 5. Efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular en células de LLA, LMA y LMC. La viabilidad se determino por el método de MTT a las 24 horas de tratamiento. A) células de LLA: ● paciente N°1, ○ paciente N°2, ▼ paciente N°3. B) células de LMA: ● paciente N°6, ○ paciente N°7, ▼ paciente N°8, Δ paciente 9. C) Células de LMC: ● paciente N°10, ○ paciente N°11, ▼ paciente 12, Δ paciente 13.

5.3 Efecto de leptocarpina sobre la cinética de viabilidad celular.

Se determinó el efecto de leptocarpina sobre la cinética de la viabilidad celular en los diferentes tipos celulares, HL60, U937 y leucocitos, mediante una curva de tiempo-respuesta luego de ser expuestos a concentraciones de leptocarpina de 0, 30 y 100 μM por 24 horas, tomando muestras a diferentes tiempos y determinando viabilidad celular por los métodos que se describen en el apartado 4.2.3 y 4.2.4 de materiales y métodos. El objetivo de estos experimentos es determinar la $t_{1/2}$ (vida media), que corresponde al tiempo que tarda una determinada concentración de la droga en disminuir al 50% la viabilidad celular. Los datos graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes hechos cada uno por triplicado, tanto en los experimentos realizados con el método de azul de tripán como con MTT y graficándose como porcentaje del control. En las células HL60 además se incorporó un control positivo de staurosporina 3 μM . Utilizando el método de exclusión de azul de tripán se obtuvieron para las células HL60 los siguientes valores de $t_{1/2}$: 11.9 horas para leptocarpina 30 μM , 5.9 horas para leptocarpina 100 μM , 4.7 horas para staurosporina 3 μM . Los valores de $t_{1/2}$ para las células U937 son: 9.1 horas para leptocarpina 30 μM , 4.3 horas para leptocarpina 100 μM . En leucocitos los valores de $t_{1/2}$ son los siguientes: 25.9 horas para leptocarpina 30 μM , 11.6 horas para leptocarpina 100 μM (fig. 6). Por la técnica de MTT se obtuvo para las células HL60 los siguientes valores de $t_{1/2}$: 15.2 horas para leptocarpina 30 μM , 4.6 horas para leptocarpina 100 μM , 2.8 horas para staurosporina 3 μM . Los valores de $t_{1/2}$ para las células U937 son: 16.6 horas para leptocarpina 30 μM , 8.8 horas para leptocarpina 100 μM . En leucocitos los valores de $t_{1/2}$ son los siguientes: 12.5 horas para leptocarpina 30 μM , 10.4 horas para leptocarpina 100 μM (fig. 7).

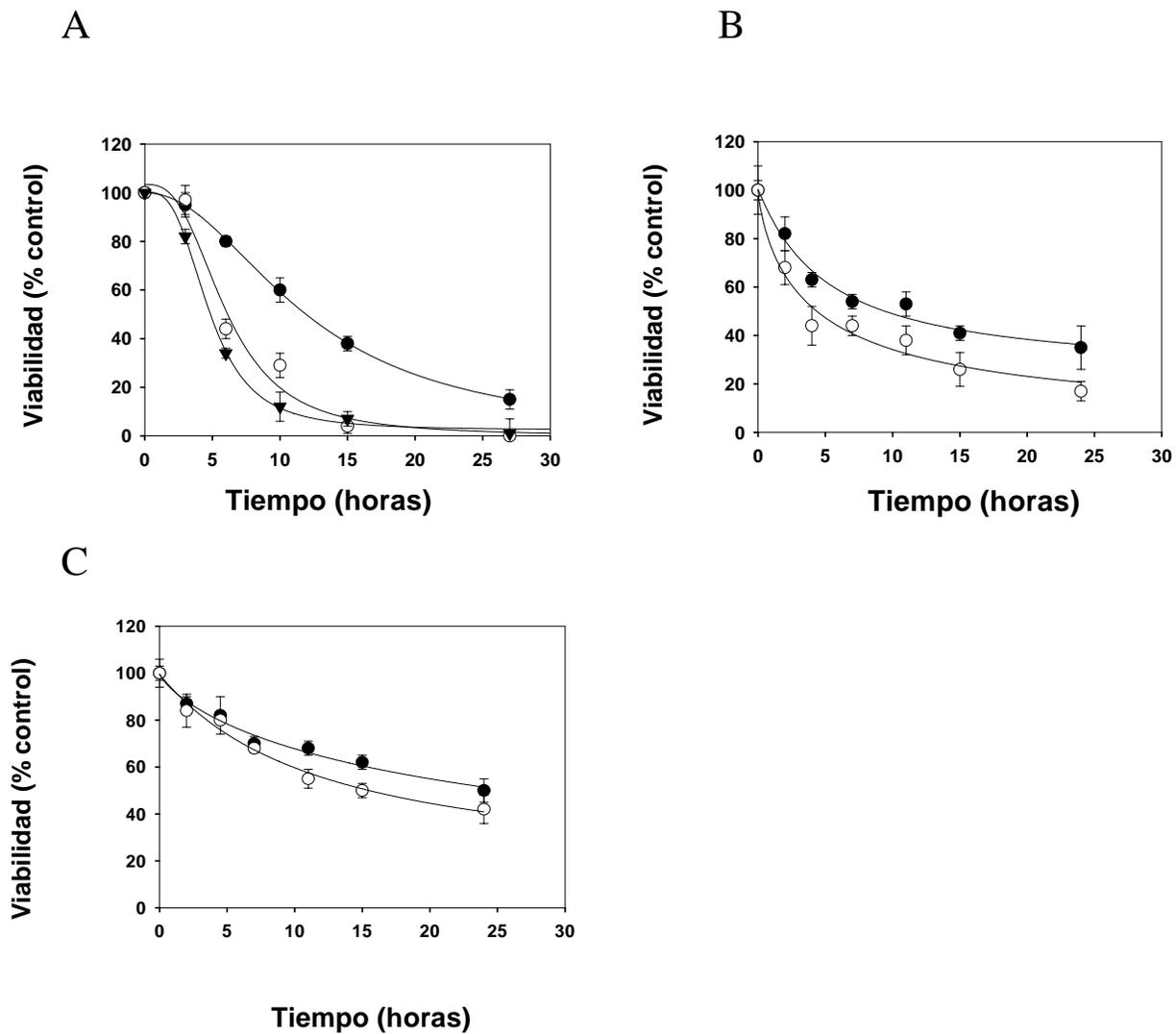


Fig. 6. Efecto de leptocarpina sobre la cinética de viabilidad en células HL60, U937 y leucocitos. La viabilidad se determinó por el método azul de tripán. Leptocarpina 30 μM (●), leptocarpina 100 μM (○), staurosporina 3 μM (▼). Gráfico (A) células HL60, el seguimiento se realizó hasta las 27 horas de incubación, gráfico (B) células U937, el seguimiento se realizó hasta las 24 horas de incubación, gráfico (C) leucocitos, el seguimiento se realizó hasta las 24 horas de incubación.

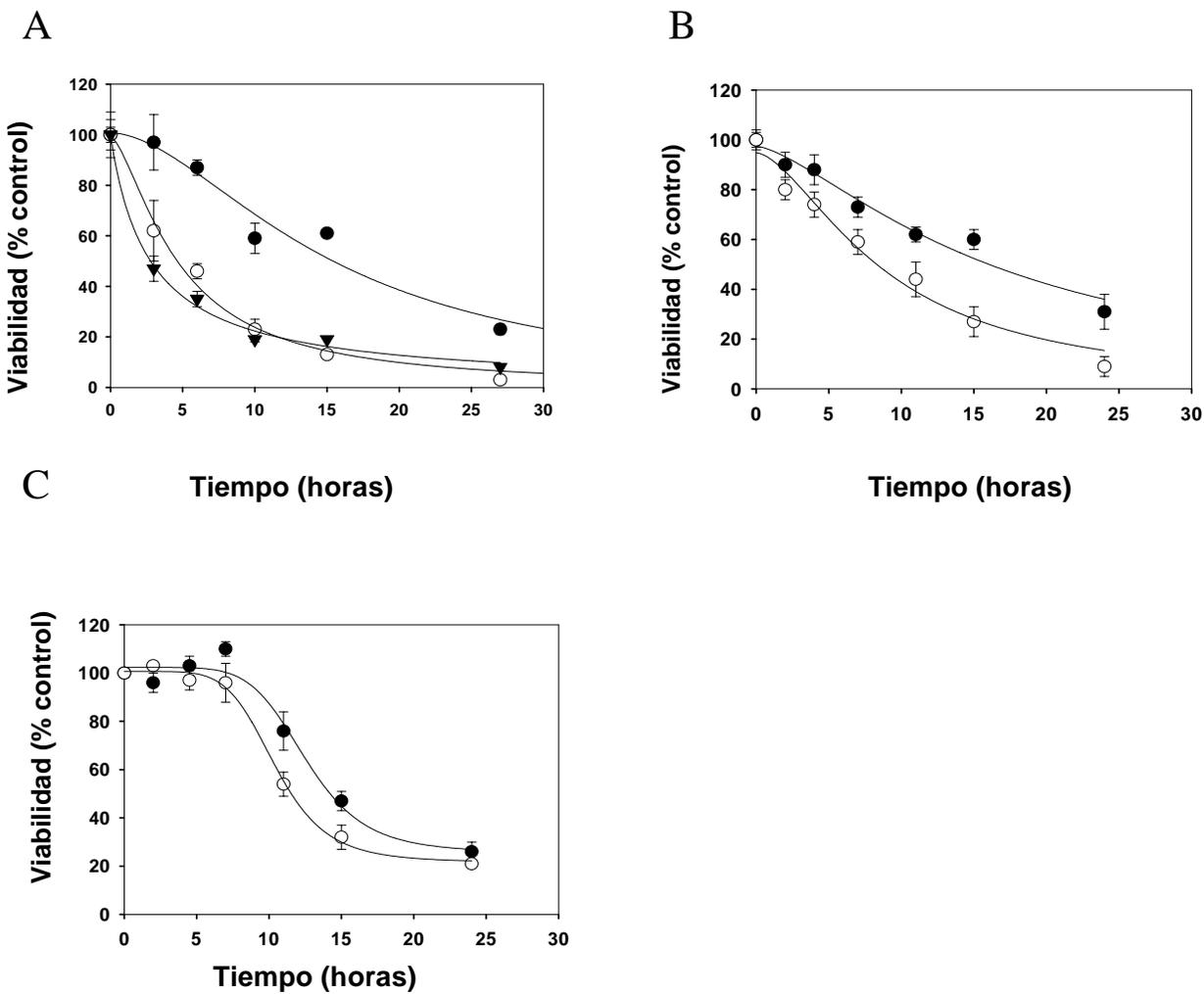


Fig. 7: Efecto de leptocarpina sobre la cinética de viabilidad en células HL60, U937 y leucocitos. La viabilidad se determinó por el método de MTT. Leptocarpina 30 μ M (●), leptocarpina 100 μ M (○), staurosporina 3 μ M (▼). Gráfico (A) células HL60, el seguimiento se realizó hasta las 27 horas de incubación, gráfico (B) células U937, el seguimiento se realizó hasta las 24 horas de incubación, gráfico (C) leucocitos, el seguimiento se realizó hasta las 24 horas de incubación.

5.4 Inducción de apoptosis por leptocarpina.

Con la finalidad de determinar de que manera leptocarpina disminuye la viabilidad celular, se realizaron ensayos tendientes a verificar el posible efecto apoptótico que pudiera inducir en los modelos celulares utilizados (HL60, U937, leucocitos normales y células de leucemia mieloide crónica), para ello se realizaron experimentos que determinan variaciones en la actividad enzimática de caspasa-3, que es proporcional a la cantidad de enzima presente, usando el kit *EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1*, además de RT-PCR para determinar si leptocarpina afecta la expresión de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis.

5.4a Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3.

En las figuras 8 a la 11 se muestra el resultado del efecto de la droga leptocarpina sobre la activación de la enzima caspasa-3 (proteína cisteinil-aspartato proteasa) Las concentraciones ensayadas de leptocarpina fueron 0, 30 y 100 μM , además de una muestra que contiene leptocarpina 100 μM y un inhibidor específico de caspasa-3 como control negativo. Los resultados obtenidos en células HL60 muestran un incremento en la actividad de caspasa-3 de 2481% y 712% para muestras con leptocarpina 30 y 100 μM con respecto al control, respectivamente (fig. 8). En células U937 el aumento de caspasa-3 fue de 480% y 537% para muestras con leptocarpina 30 y 100 μM con respecto al control, respectivamente (fig. 9). Los resultados obtenidos en leucocitos provenientes de individuos sanos muestran un incremento en la actividad de caspasa-3 de 276% y disminución en un 14% para muestras con leptocarpina 30 y 100 μM con respecto al control, respectivamente (fig. 10). Los resultados obtenidos en células provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica muestran un incremento en la actividad de caspasa-3 de 755% y 321% para muestras con leptocarpina 30 y 100 μM con respecto al control, respectivamente (fig. 11). En todos los tipos celulares se observó que la muestra que contenía leptocarpina 100 μM más el inhibidor específico de caspasa-3 presentó lecturas de fluorescencia menores al control, lo que nos asegura que las lecturas de las distintas muestras corresponden únicamente a la activación de caspasa-3.

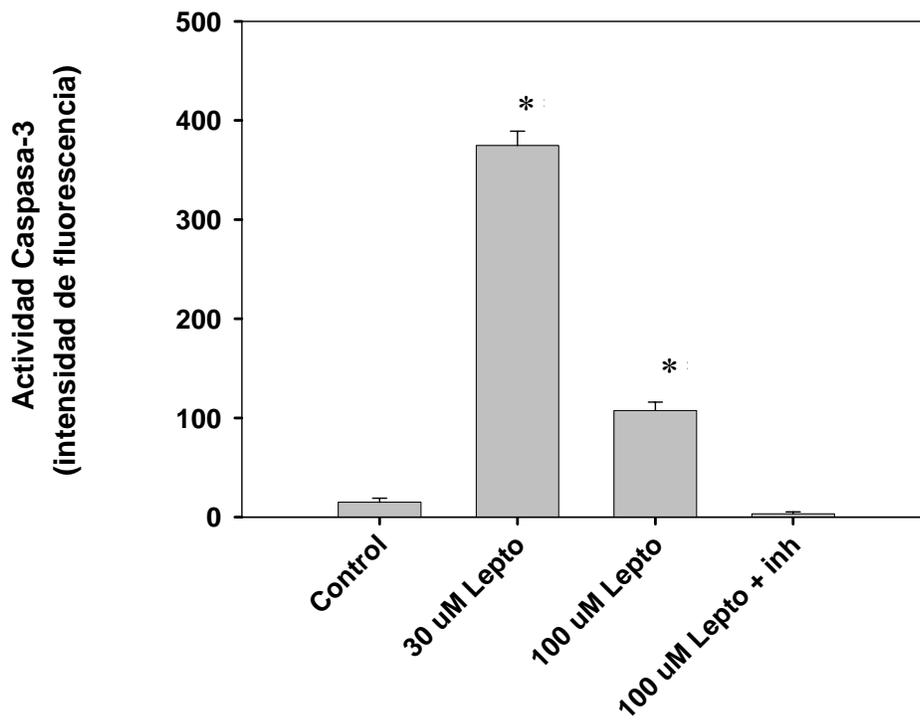


Fig. 8. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en células HL60 tras 18 horas de tratamiento. Las figuras corresponden a tres experimentos independientes hechos por triplicado. * $P < 0.01$ respecto al control.

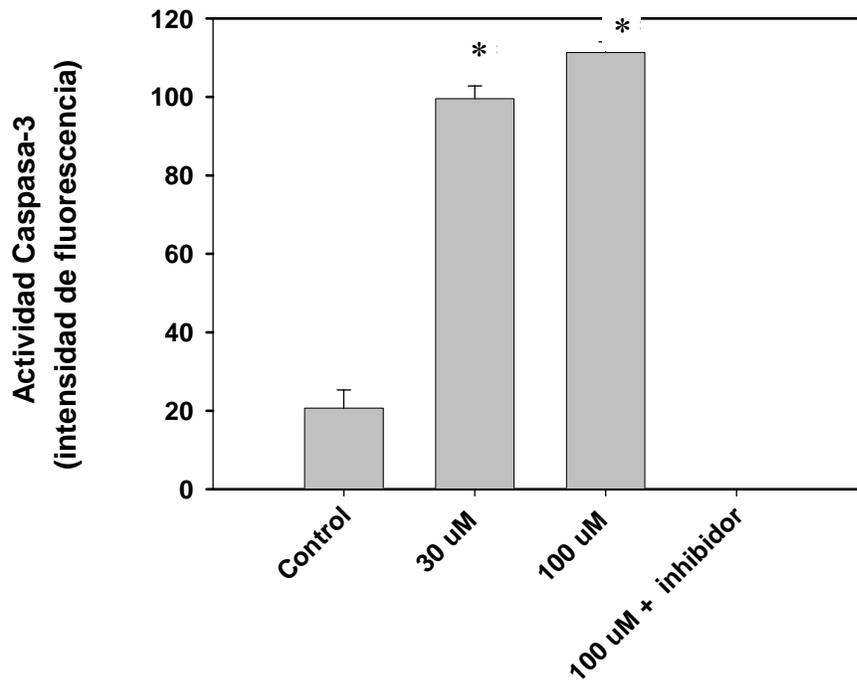


Fig. 9. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en células U937 tras 18 horas de tratamiento. Las figuras corresponden a tres experimentos independientes hechos por triplicado. * $P < 0.01$ respecto al control.

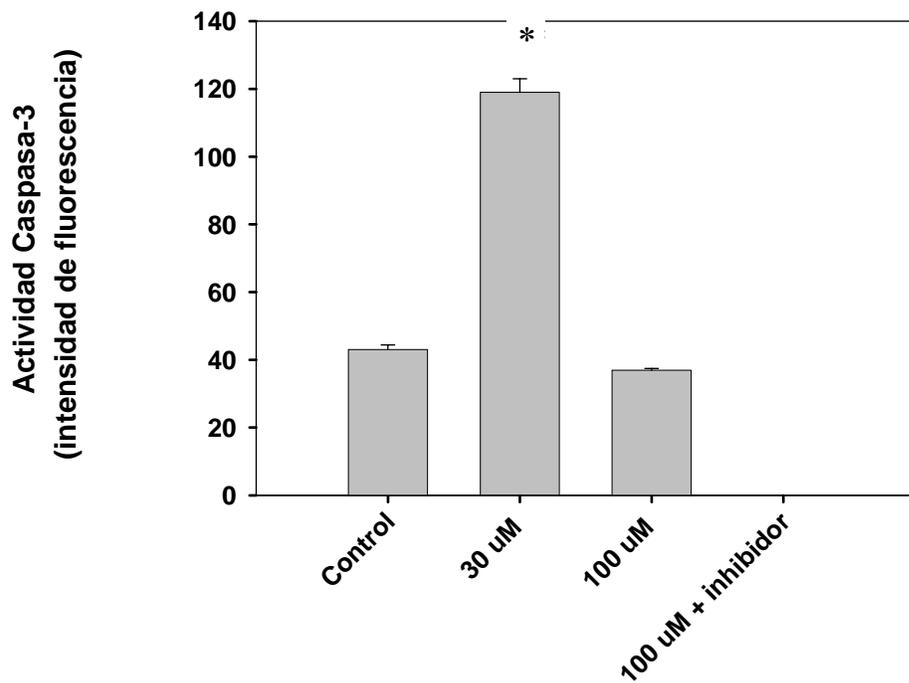


Fig. 10. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en leucocitos tras 18 horas de tratamiento. Las figuras corresponden a tres experimentos independientes hechos por triplicado. * $P < 0.01$ respecto al control.

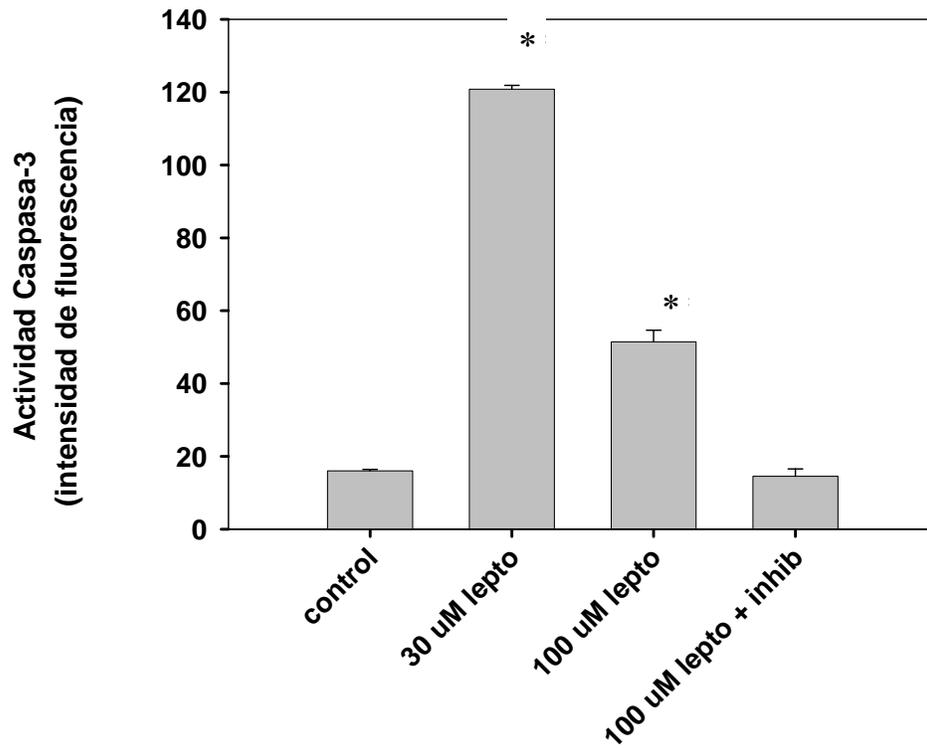


Fig. 11. Efecto de leptocarpina sobre la activación de caspasa-3 en células provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) tras 18 horas de tratamiento. Las figuras corresponden a tres experimentos independientes hechos por triplicado. * $P < 0.01$ respecto al control.

5.4b Efecto de leptocarpina sobre la expresión de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis.

Con la finalidad de determinar si leptocarpina afecta la expresión de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis, se expuso a las líneas celulares HL60 y U937 a diferentes concentraciones de la droga. En los experimentos correspondientes a las figuras 12 a la 17, se determinó el efecto de leptocarpina 30 y 100 μM sobre la expresión de dos de estas proteínas Bcl-2 y Bax, además se incluyó en este apartado los experimentos de expresión de p-21, mediante el análisis de sus transcritos por RT-PCR, como se describió en las secciones 4.2.6 a 4.2.10 de materiales y métodos. Los resultados que se exponen a continuación sobre el efecto de leptocarpina sobre las proteínas antes descritas están expresados como porcentaje del control más su respectiva desviación estándar. La expresión de Bcl-2 en células HL60 disminuyó a un $41\% \pm 2\%$ para 30 μM de leptocarpina y $53\% \pm 5\%$ para 100 μM de leptocarpina (fig. 12). Por su parte, Bcl-2 en células U937 disminuyó a un $75\% \pm 5\%$ para 30 μM de leptocarpina y $44\% \pm 5\%$ para 100 μM de leptocarpina (fig. 13). Para p-21 en células HL60 se obtuvo aumento en los niveles de expresión a valores de $231\% \pm 19\%$ para 30 μM de leptocarpina y luego una disminución de un $9\% \pm 28\%$ para 100 μM de leptocarpina (fig. 14). En células U937, se obtuvo un aumento en la expresión de p-21 a $141\% \pm 12\%$ para 30 μM de leptocarpina y $125\% \pm 4\%$ para 100 μM de leptocarpina (fig. 15). En el caso de la expresión de Bax en células HL60 se obtuvo una disminución de la expresión a valores de $82\% \pm 14\%$ para 30 μM de leptocarpina y $91\% \pm 15\%$ para 100 μM de leptocarpina (fig. 16). Resultados similares se observaron en las células U937, $85\% \pm 18\%$ para 30 μM de leptocarpina y $95\% \pm 14\%$ para 100 μM de leptocarpina (fig. 17).

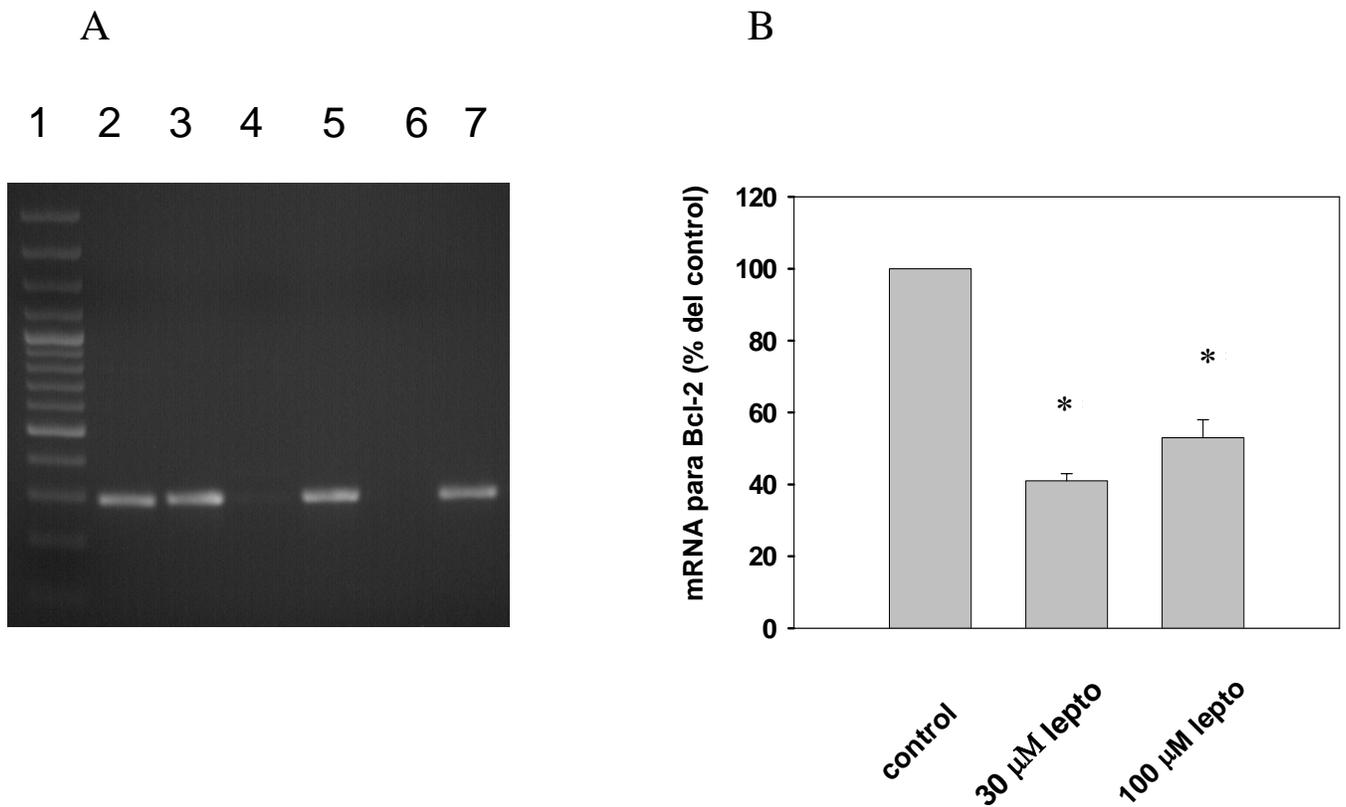


Fig. 12. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bcl-2 en células HL60. A) La expresión se determinó a través de ensayos de RT-PCR tras 24 horas de incubación. Carril 1: estándar 3000 Kb, carril 2: Bcl-2 control, carril 3: β -actina control, carril 4: Bcl-2 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: Bcl-2 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B) Cuantificación de los resultados mostrados en la fig. A, expresados como porcentaje del control. * $P < 0.01$ respecto al control.

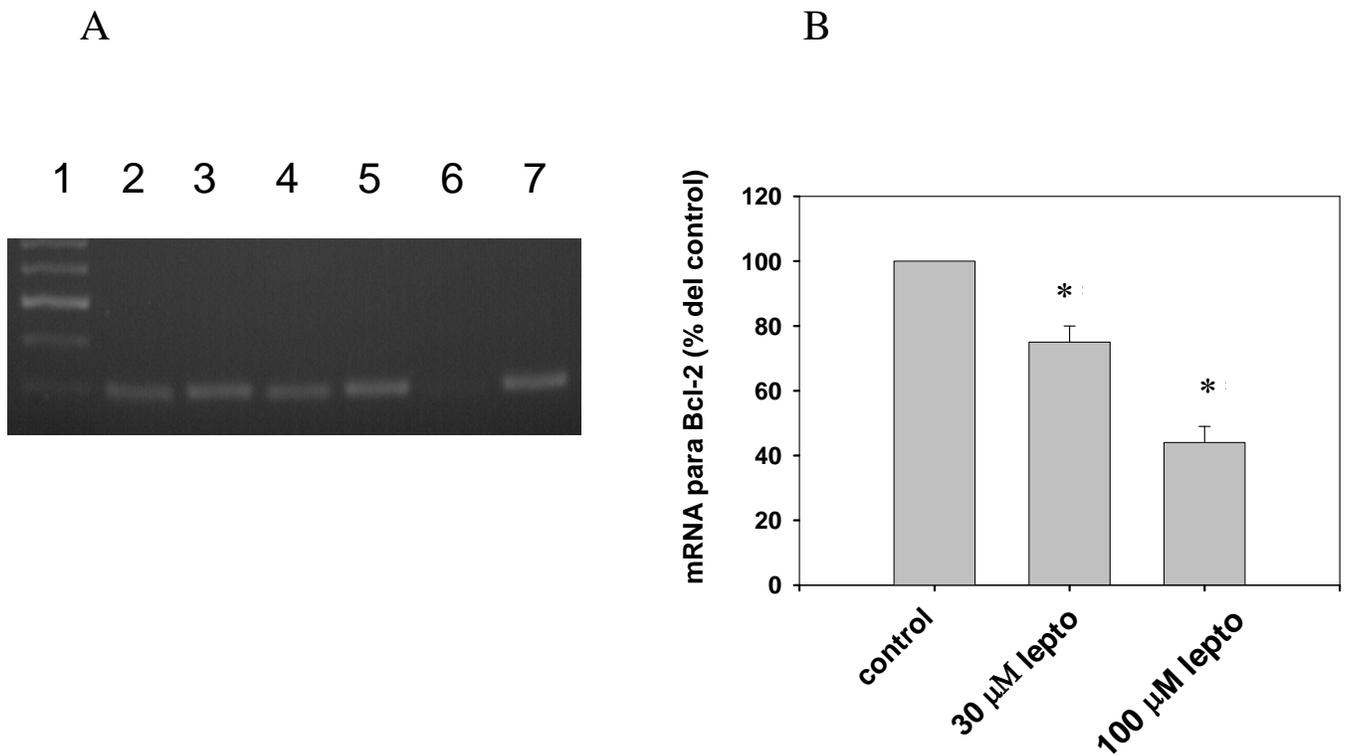


Fig. 13. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bcl-2 en células U937. A) La expresión se determinó a través de ensayos de RT-PCR tras 24 horas de incubación: carril 1: estándar 3000 Kb, carril 2: Bcl-2 control, carril 3: β -actina control, carril 4: Bcl-2 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: Bcl-2 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B) Cuantificación de los resultados mostrados en la fig. A, expresados como porcentaje del control. * $P < 0.01$ respecto al control.

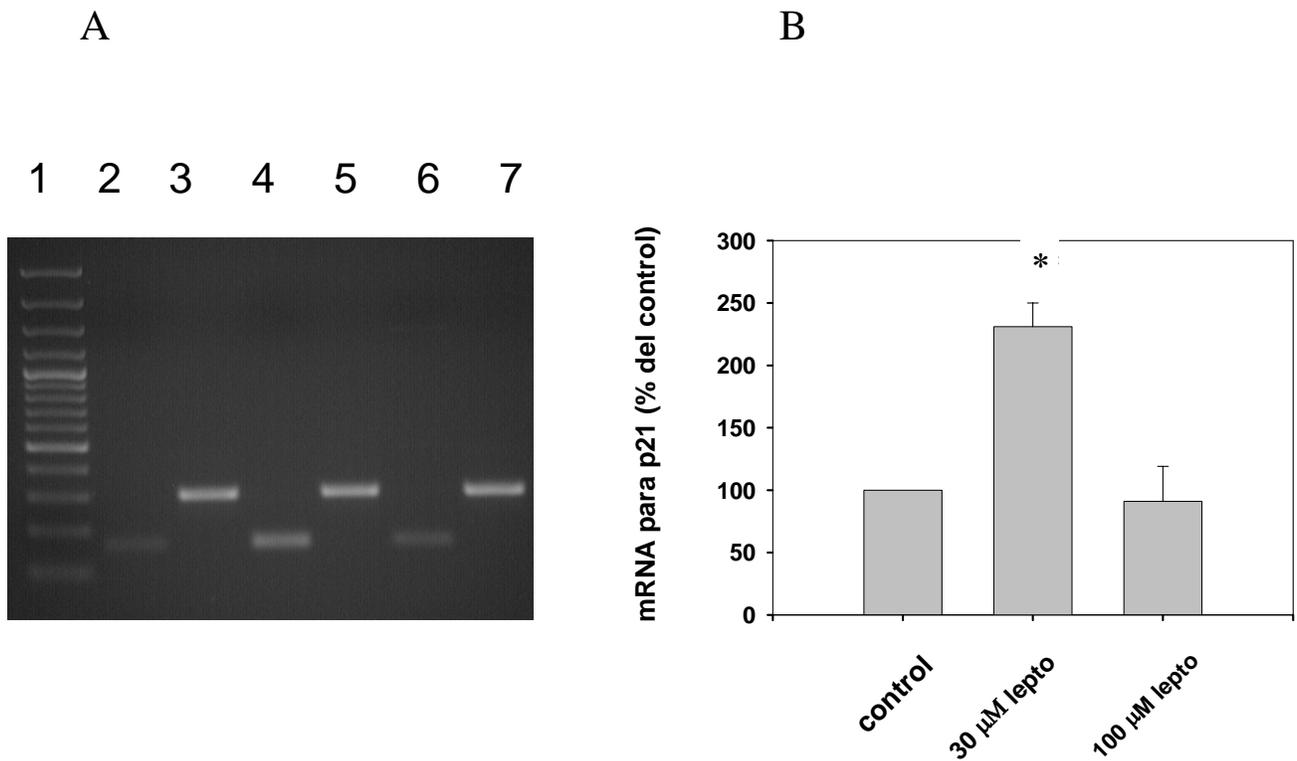


Fig. 14. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de p21 en células HL60. A) La expresión se determinó a través de ensayos de RT-PCR tras 24 horas de incubación. Carril 1: estándar 3000 Kb, carril 2: p21 control, carril 3: β -actina control, carril 4: p21 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: p21 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B) Cuantificación de los resultados mostrados en la fig. A, expresados como porcentaje del control. * $P < 0.01$ respecto al control.

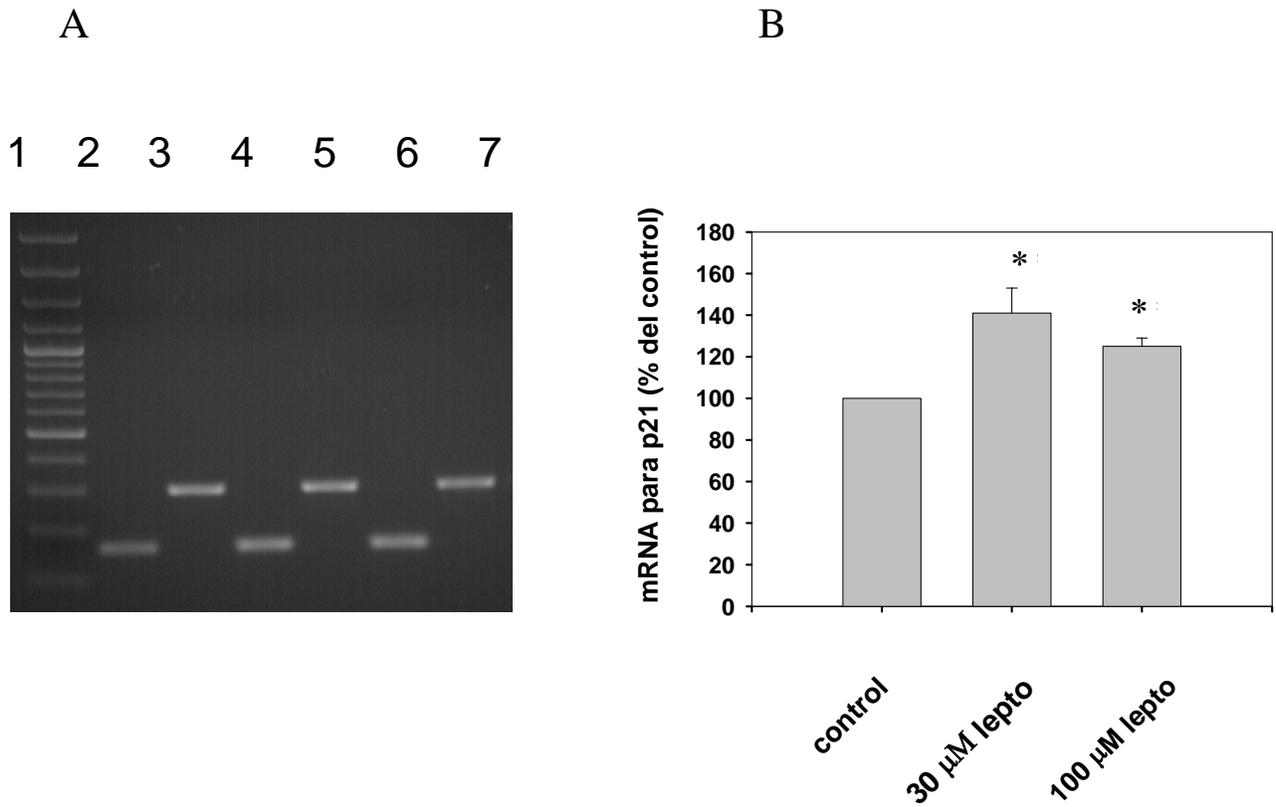


Fig. 15. Efecto de leptocarpina sobre la expresion de p21 en células U937. A) La expresión se determino a través de ensayos de RT-PCR tras 24 horas de incubación. Carril 1: estandar 3000 Kb, carril 2: p21 control, carril 3: β -actina control, carril 4: p21 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: p21 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B) Cuantificación de los resultados mostrados en la fig. A, expresados como porcentaje del control. * $P < 0.01$ respecto al control.

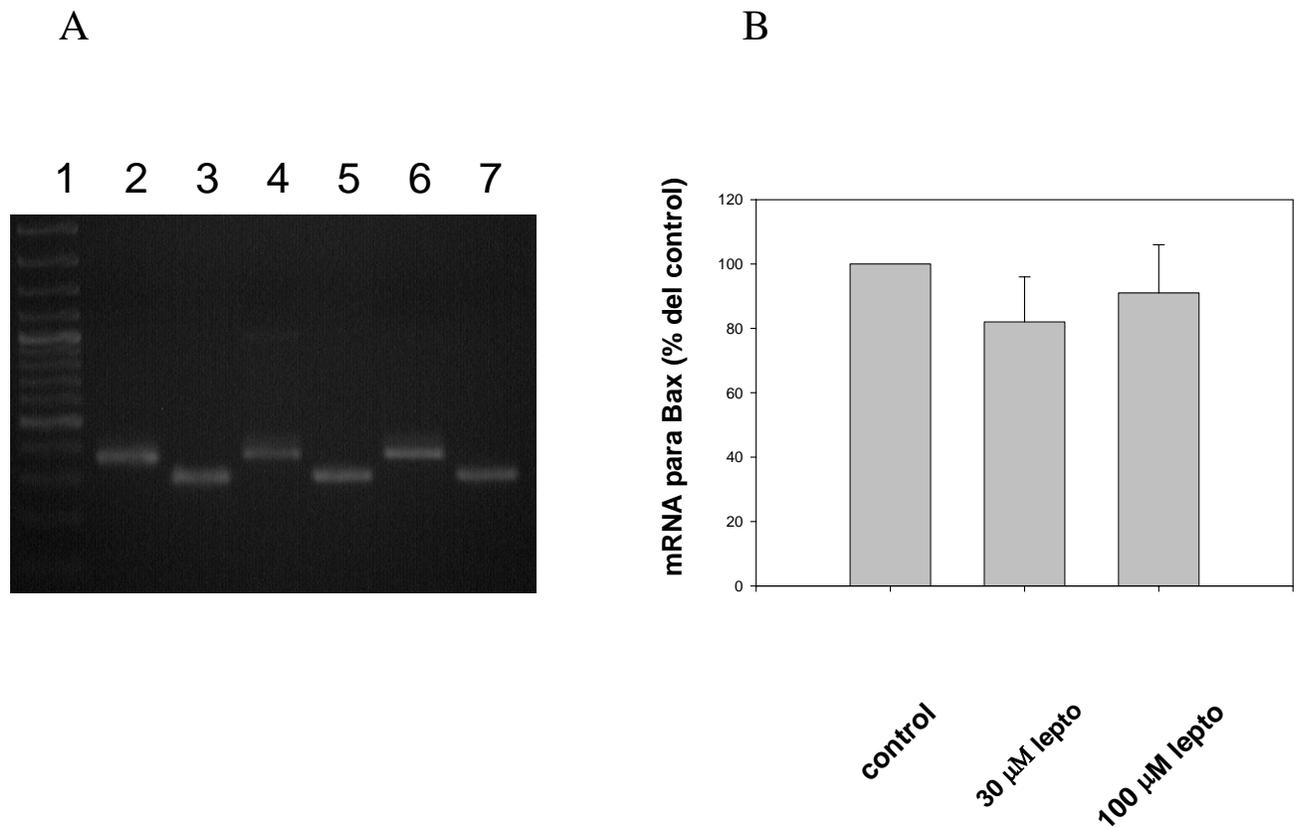


Fig. 16. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bax en células HL60. A) La expresión se determinó a través de ensayos de RT-PCR tras 24 horas de incubación. Carril 1: estándar 3000 Kb, carril 2: Bax control, carril 3: β -actina control, carril 4: Bax 30 μ M, carril 5: β -actina 30 μ M, carril 6: Bax 100 μ M, carril 7: β -actina 100 μ M. B) Cuantificación de los resultados mostrados en la fig. A, expresados como porcentaje del control.

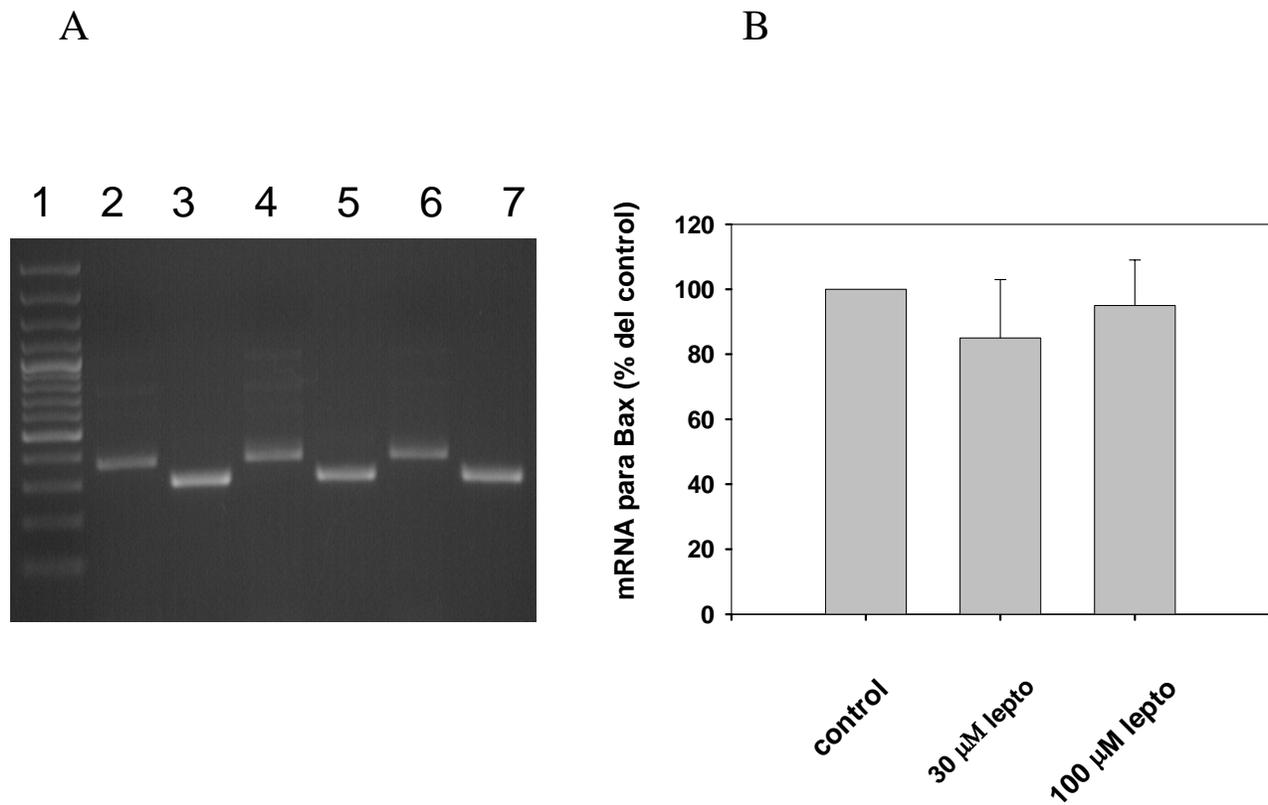


Fig. 17. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Bax en células U937. A) La expresión se determino a través de ensayos de RT-PCR tras 24 horas de incubación. Carril 1: estandar 3000 Kb, carril 2: Bax control, carril 3: β -actina control, carril 4: Bax 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: Bax 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B) Cuantificación de los resultados mostrados en la fig. A, expresados como porcentaje del control.

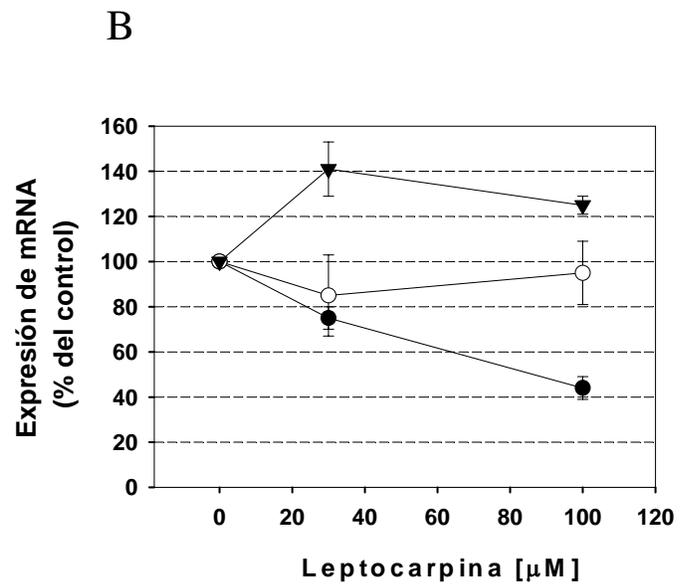
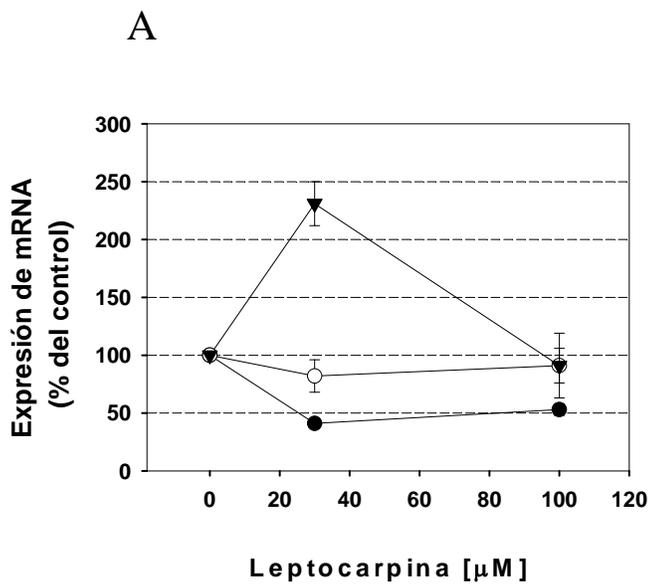


Fig. 18. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis. (A) expresión de mRNA de Bcl-2 (●), Bax (○), p-21 (▼) en células HL60 por RT-PCR. (B) expresión de mRNA de Bcl-2 (●), Bax (○), p-21 (▼) en células U937 por RT-PCR.

5.5 Expresión de proteínas de resistencia a multidrogas por RT-PCR.

Con el objetivo de determinar qué proteínas asociadas al fenómeno de resistencia a multidrogas se expresan en forma natural en los modelos celulares utilizados (HL60, U937, leucocitos normales).

En la figura 19 se presentan los resultados de las proteínas asociadas al fenómeno de resistencia a multidrogas que se expresan en las líneas celulares HL60, U937 y en leucocitos provenientes de individuos normales, realizados por medio de RT-PCR. Las proteínas ensayadas en los diferentes tipos celulares fueron Mrp1, MVP, ABCG2, Pgp1 y Pgp2, como se describe en materiales y métodos sección 4.2.6 a 4.2.10. Como se muestra en la figura 19, en células HL60 solo se detectó la expresión de MRP1. Por su parte, en células U937 se detectó la expresión de MRP1 y MVP. No obstante, en leucocitos normales se observó la expresión de los mRNA para los transportadores MRP1, MVP y Pgp1.

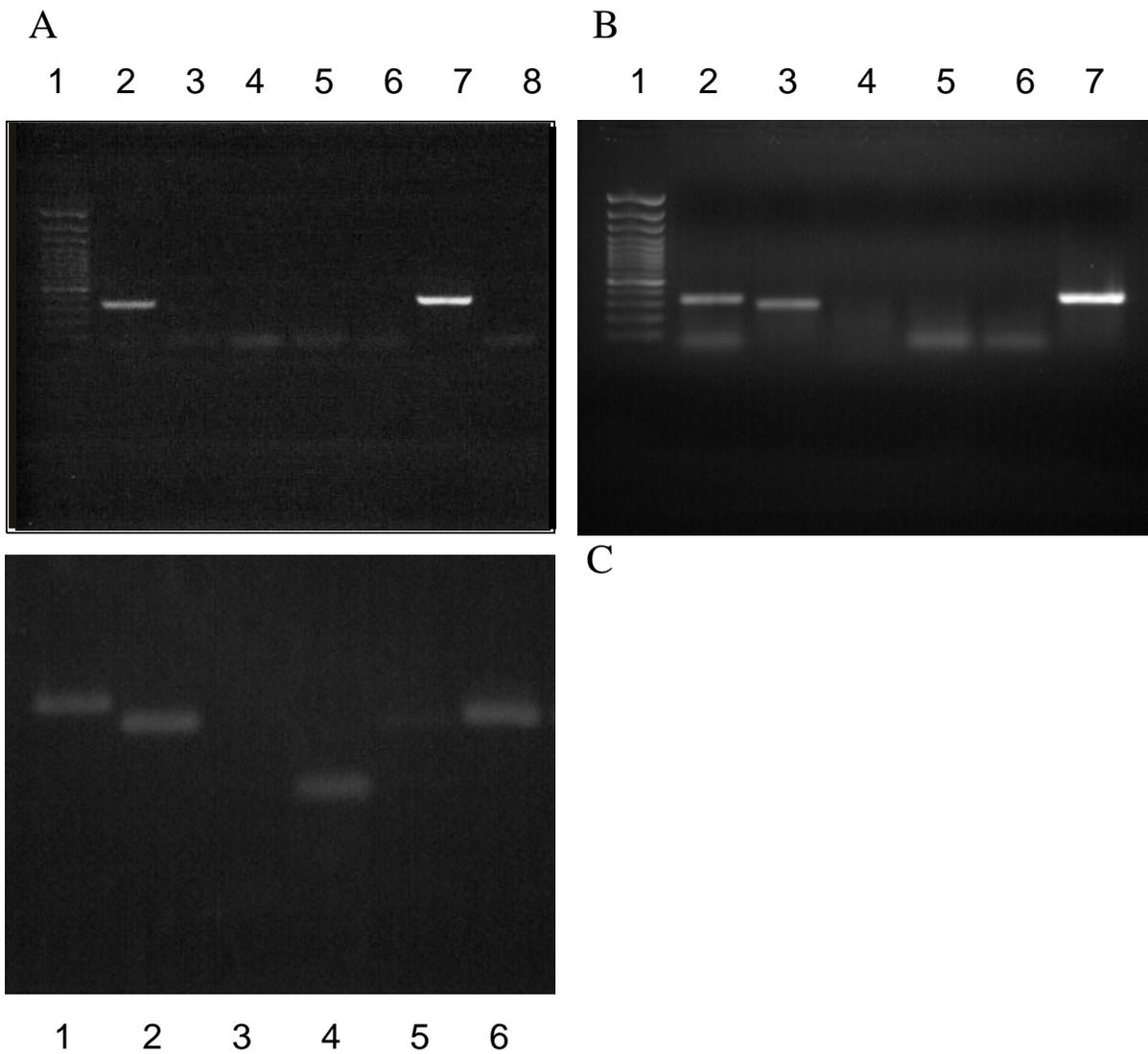


Fig. 19. Expresión de proteínas de resistencia a multidrogas por RT-PCR en células crecidas por 24 horas. A: células HL60 carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: Mrp1, carril 3: MVP, carril 4: ABCG2, carril 5: Pgp1, carril 6: Pgp2, carril 7: β -actina, carril 8: control negativo. B: células U937 carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: Mrp1, carril 3: MVP, carril 4: ABCG2, carril 5: Pgp1, carril 6: Pgp2, carril 7: β -actina. C: leucocitos carril 1: Mrp1, carril 2: MVP, carril 3: ABCG2, carril 4: Pgp1, carril 5: Pgp2, carril 6: β -actina.

5.6 Determinación del número óptimo de ciclos de amplificación de los distintos partidores por RT-PCR.

Una vez realizados los experimentos mostrados en la fig. 19, realizados a 35 ciclos para asegurar que se está en la fase de plateau de la curva de amplificación del cDNA, lo que nos permite saber cuales de las proteínas de resistencia a multidroga se expresan en los distintos tipos celulares, para ello hay que determinar el número óptimo de ciclos de amplificación con los partidores que dieron una expresión positiva por RT-PCR. Cada uno de los distintos pares de partidores en los diferentes tipos celulares: Mrp1 en HL60; Mrp1, MVP para U937; Mrp1, MVP, Pgp1 en leucocitos, se sometieron a los siguientes números de ciclos, 28-30-32-34-36, para diferenciar la zona de amplificación lineal del plateau. Según los gráficos obtenidos luego de la cuantificación de los gels de agarosa con el programa GelPro 31 (intensidad de densidad óptica (IDO) v/s N° de ciclos), y graficados en SigmaPlot 9.0 se determinó usar un número de 32 ciclos de amplificación en los experimentos de efecto de leptocarpina sobre la expresión de transportadores de resistencia a multidroga (fig. 26-31), para todos los partidores ensayados (fig. 20-25). Los valores de densidad óptica fueron los siguientes: Mrp1 en células HL60: 28 ciclos: 6953, 30 ciclos: 11265, 32 ciclos: 28199, 34 ciclos: 25070 este valor se excluyó, 36 ciclos: 48413 (fig.20). Mrp1 en células U937: 28 ciclos: 12344, 30 ciclos: 29367, 32 ciclos: 43372, 34 ciclos: 46817, 36 ciclos: 57635 (fig.21). MVP en células U937: 28 ciclos: 0, 30 ciclos: 8164, 32 ciclos: 16330, 34 ciclos: 19322, 36 ciclos: 38634 (fig.22). Mrp1 en leucocitos: 28 ciclos: 0, 30 ciclos: 0, 32 ciclos: 11601, 34 ciclos: 18808, 36 ciclos: 37885 (fig.23). MVP en leucocitos: 28 ciclos: 6513, 30 ciclos: 14114, 32 ciclos: 23416, 34 ciclos: 29532 (fig.24). Pgp1 en leucocitos: 28 ciclos: 0, 30 ciclos: 3775, 32 ciclos: 5717, 34 ciclos: 10895, 36 ciclos: 19494 (fig.25).

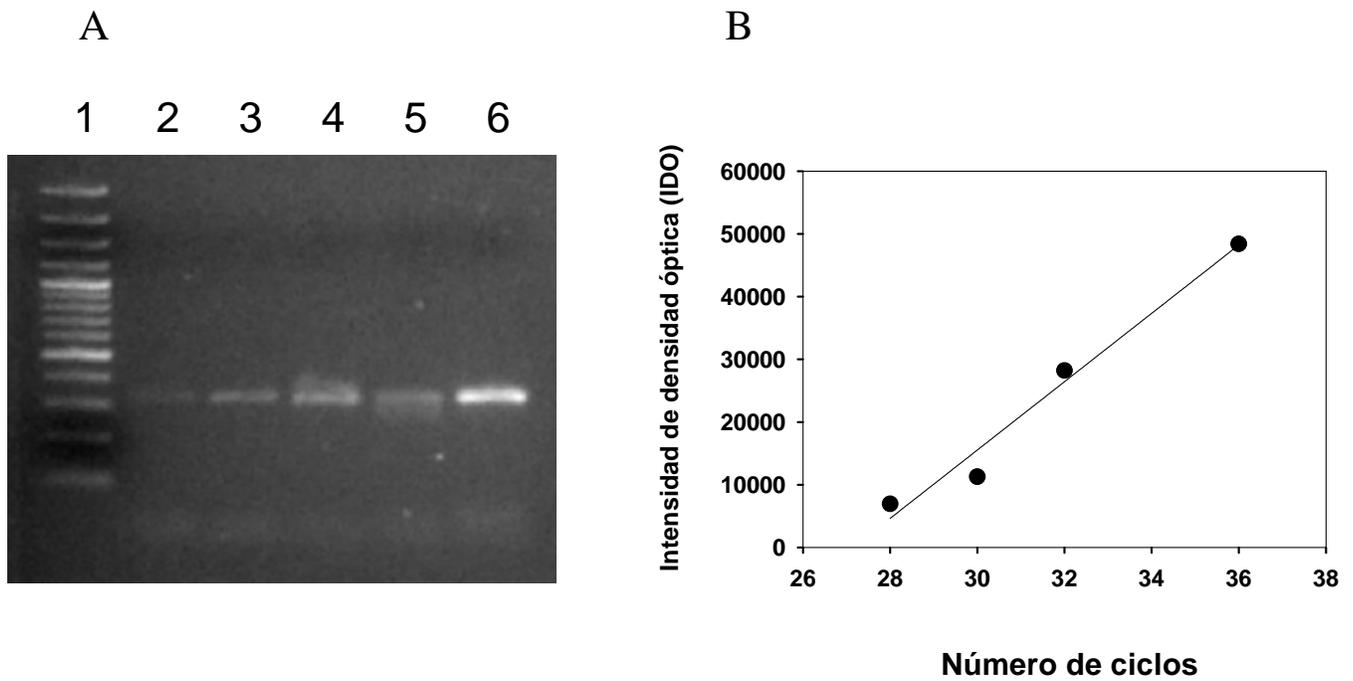


Fig. 20. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MRP1 en células HL60. A: La banda fue visualizada con tinción de bromuro de etidio en geles de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: 28 ciclos, carril 3: 30 ciclos, carril 4: 32 ciclos, carril 5: 34 ciclos, carril 6: 36 ciclos. B: Gráfico de los resultados obtenidos en A, número de ciclos versus la intensidad de densidad óptica.

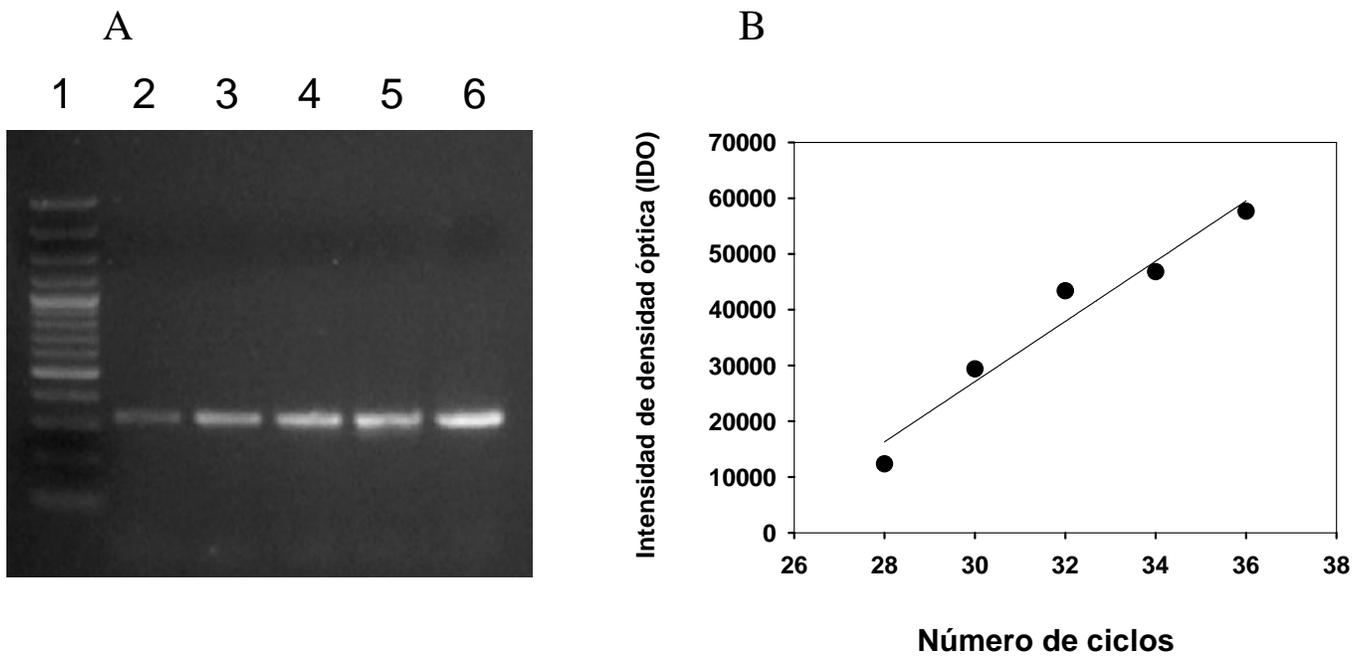


Fig. 21. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MRP1 en células U937. A: La banda fue visualizada con tinción de bromuro de etidio en geles de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: 28 ciclos, carril 3: 30 ciclos, carril 4: 32 ciclos, carril 5: 34 ciclos, carril 6: 36 ciclos. B: Gráfico de los resultados obtenidos en A, número de ciclos versus la intensidad de densidad óptica.

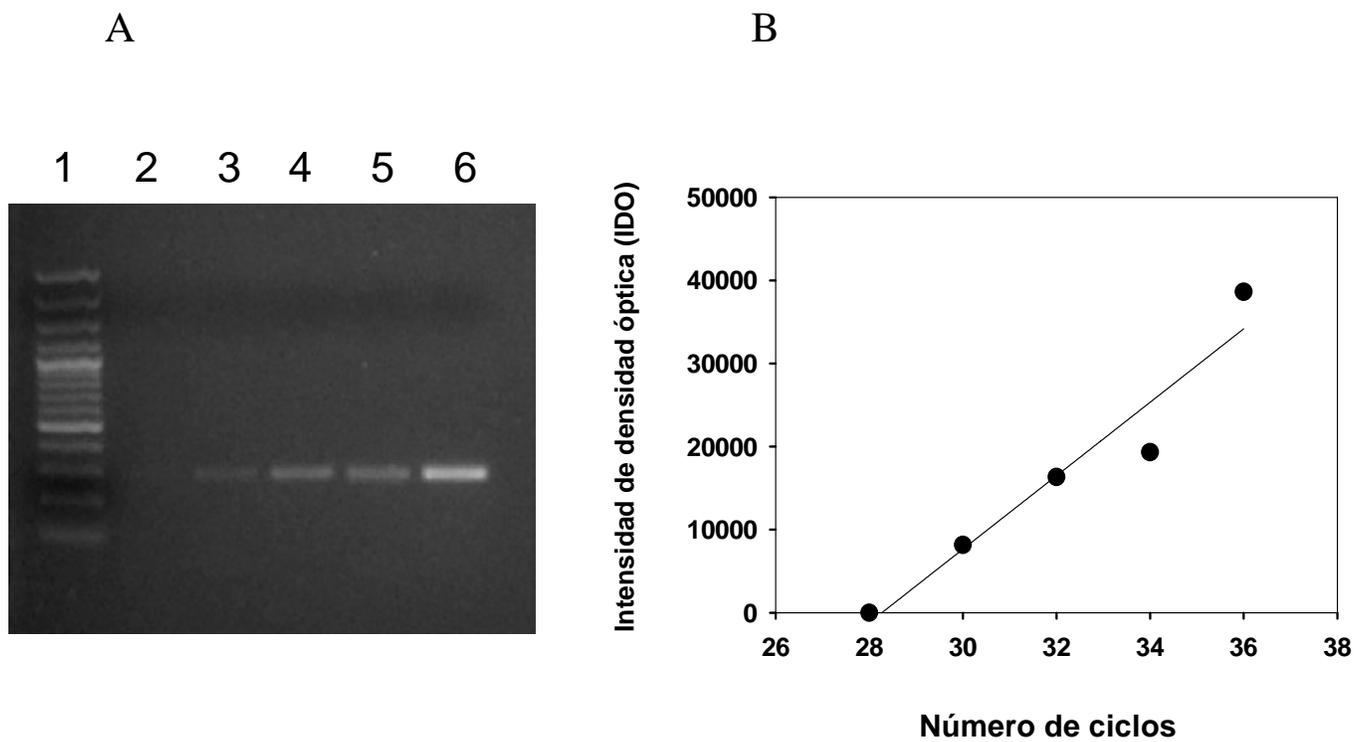


Fig. 22. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MVP en células U937 por RT-PCR. A: La banda fue visualizada con tinción de bromuro de etidio en geles de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: 28 ciclos, carril 3: 30 ciclos, carril 4: 32 ciclos, carril 5: 34 ciclos, carril 6: 36 ciclos. B: Gráfico de los resultados obtenidos en A, número de ciclos versus la intensidad de densidad óptica.

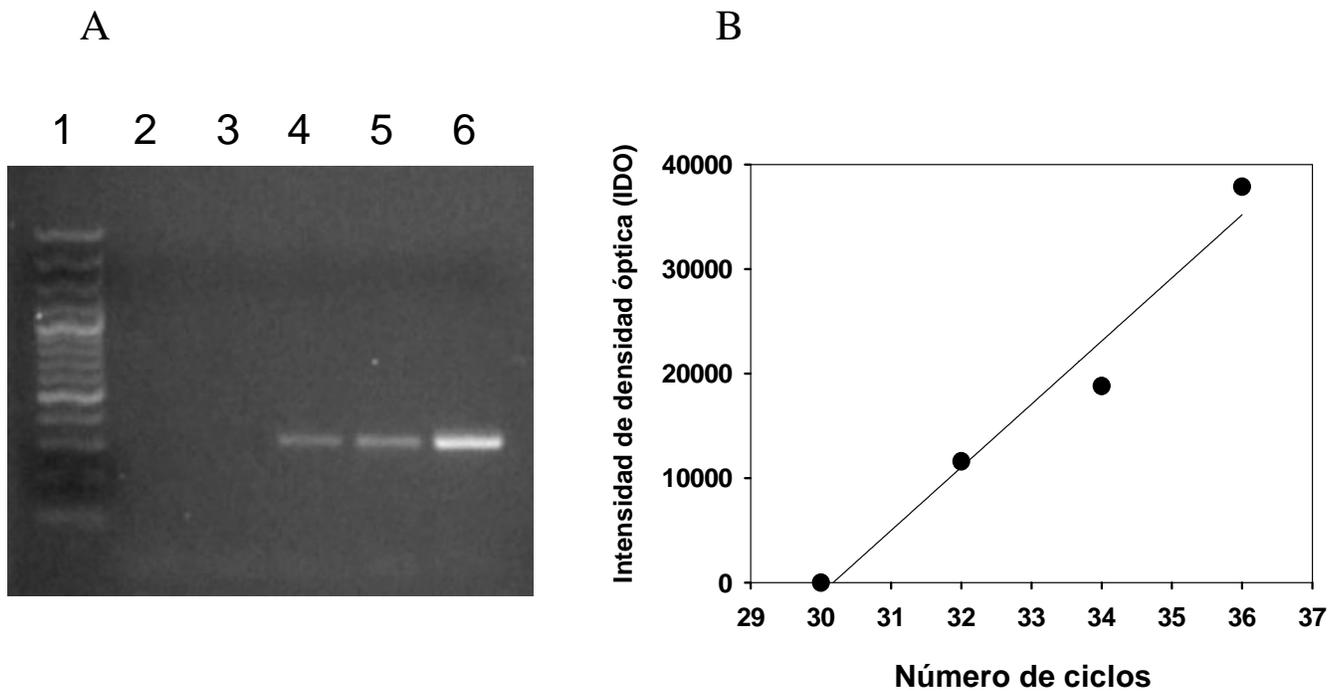


Fig. 23. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de Mrp1 en leucocitos por RT-PCR. A: La banda fue visualizada con tinción de bromuro de etidio en geles de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: 28 ciclos, carril 3: 30 ciclos, carril 4: 32 ciclos, carril 5: 34 ciclos, carril 6: 36 ciclos. B: Gráfico de los resultados obtenidos en A, número de ciclos versus la intensidad de densidad óptica.

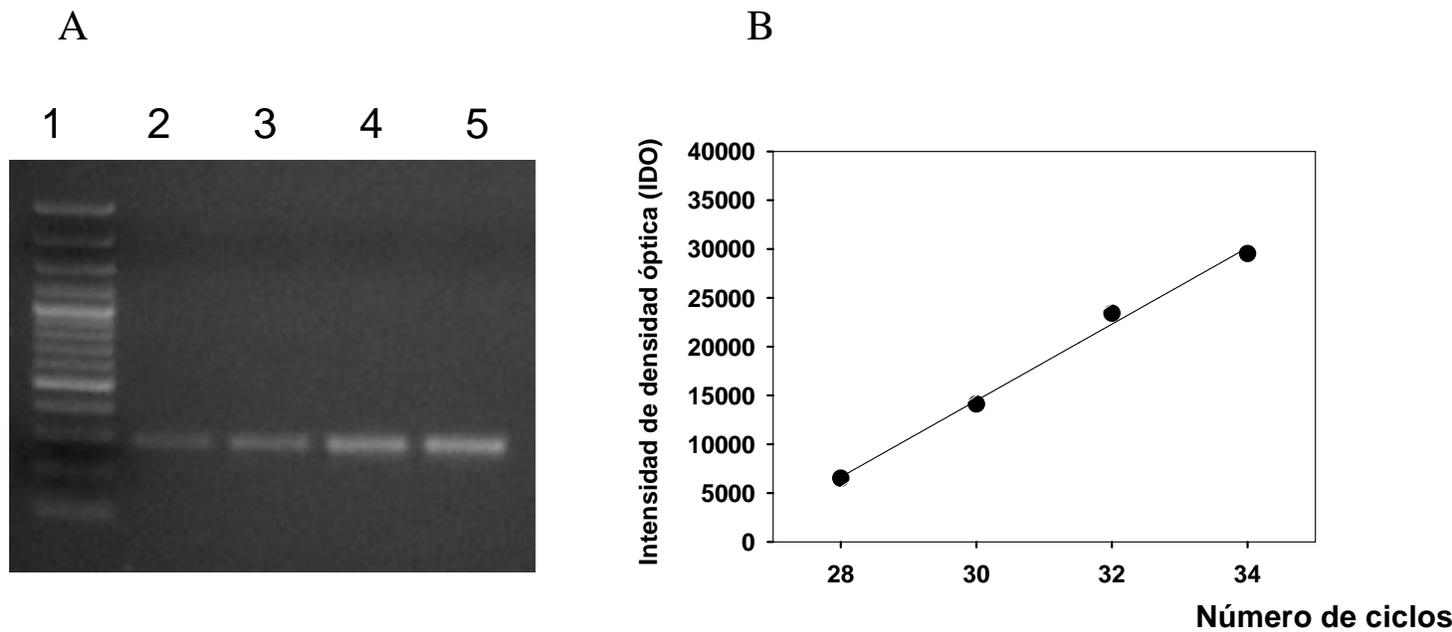


Fig. 24. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de MVP en leucocitos por RT-PCR. A: La banda fue visualizada con tinción de bromuro de etidio en geles de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: 28 ciclos, carril 3: 30 ciclos, carril 4: 32 ciclos, carril 5: 34 ciclos. B: Gráfico de los resultados obtenidos en A, número de ciclos versus la intensidad de densidad óptica.

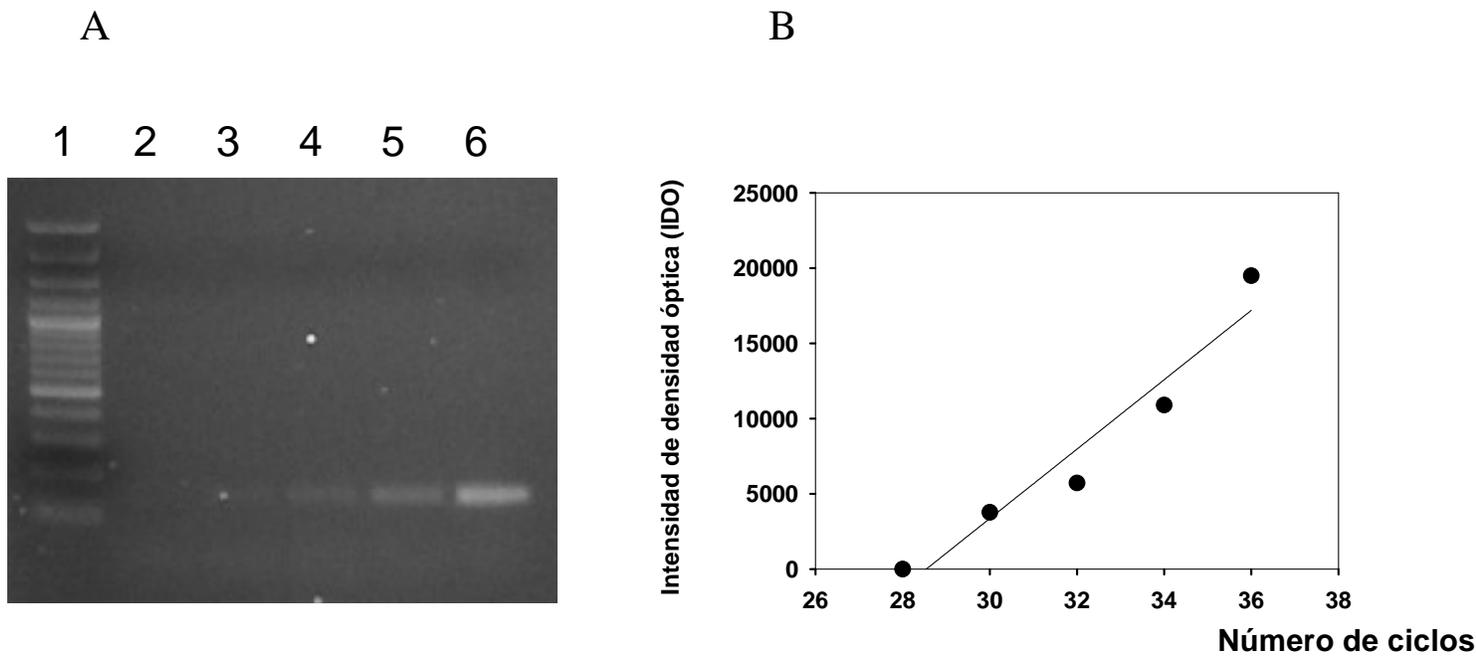


Fig. 25. Efecto del número de ciclos de PCR sobre intensidad de la banda de amplificación del cDNA de Pgp1 en leucocitos por RT-PCR. A: La banda fue visualizada con tinción de bromuro de etidio en geles de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: 28 ciclos, carril 3: 30 ciclos, carril 4: 32 ciclos, carril 5: 34 ciclos. B: Gráfico de los resultados obtenidos en A, número de ciclos versus la intensidad de densidad óptica.

5.7 Efecto de leptocarpina sobre la expresión de transportadores de resistencia a multidrogas.

Con la finalidad de determinar si leptocarpina afecta la expresión de las proteínas de resistencia a multidrogas que se expresaron en el experimento de la figura N°19, las respectivas células se sometieron a concentraciones de 30 y 100 μM de leptocarpina. En las figuras 26 a 31 se muestra el efecto de la droga leptocarpina a 24 horas de incubación sobre los transcritos de las proteínas de resistencia a multidrogas: Mrp1 en HL60; Mrp1, MVP en U937; Mrp1, MVP, Pgp1 en leucocito, por RT-PCR a 32 ciclos de amplificación y como se describe en la sección 4.2.6 a 4.2.10. La cuantificación en el programa GelPro 31 de las bandas obtenidas en las electroforesis en agarosa de los productos de PCR se presenta en un grafico de barras como la razón entre la intensidad de densidad óptica del transportador transcrito y su respectivo control de β -actina. Los resultados son producto de tres experimentos individuales realizados por triplicado y representados como porcentaje del control. Para Mrp1 en células HL60 los valores son de: 85 ± 12 y 63 ± 6 para 30 μM y 100 μM de leptocarpina, respectivamente. Para Mrp1 en células U937: 91 ± 3 y 45 ± 7 para 30 μM y 100 μM , respectivamente. MVP en células U937: 96 ± 13 y 85 ± 11 para 30 μM y 100 μM respectivamente. Mrp1 en leucocitos: 48 ± 12 para 30 μM y 51 ± 12 para 100 μM . MVP en leucocitos: 52 ± 2 para 30 μM y 41 ± 9 para 100 μM . Pgp1 en leucocitos: 84 ± 8 para 30 μM y 56 ± 14 para 100 μM .

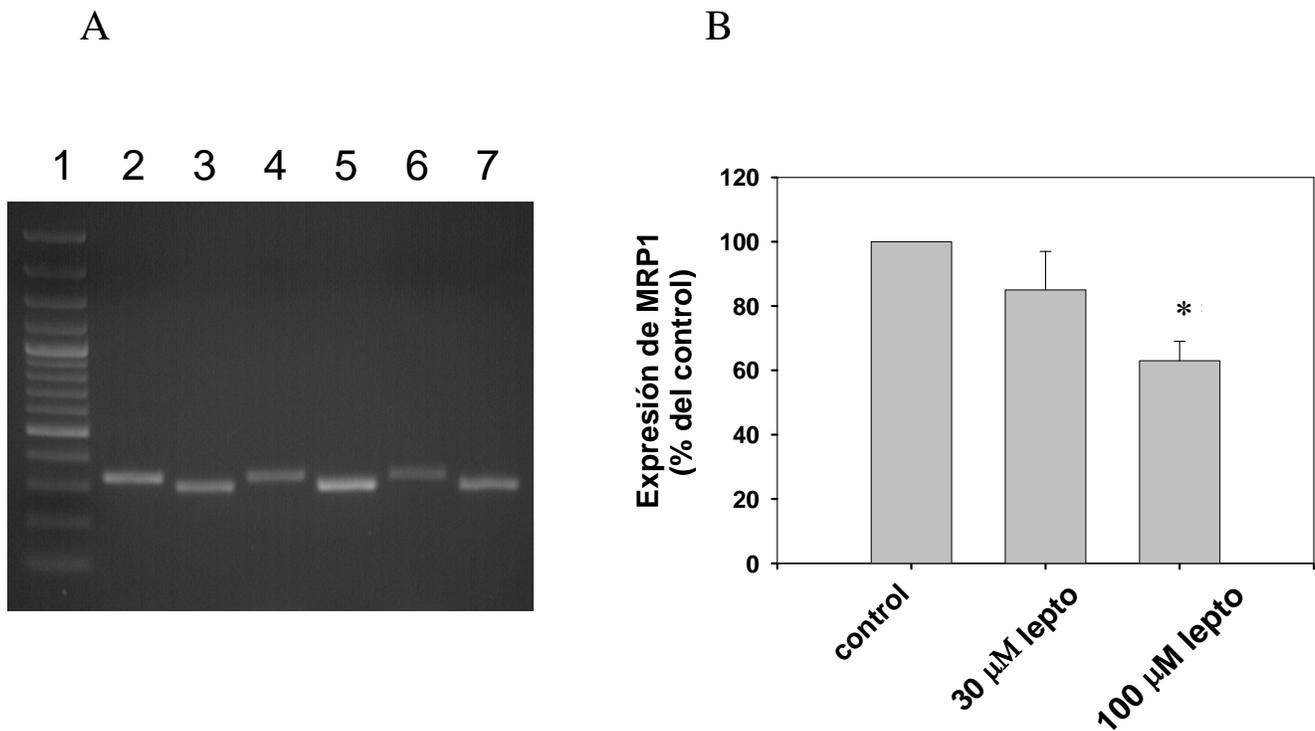


Fig. 26. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en células HL60 determinado por RT-PCR a 24 horas de incubación. A: gel de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: Mrp1 control, carril 3: β -actina control, carril 4: Mrp1 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: Mrp1 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B: cuantificación del efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en células HL60 por RT-PCR a 24 horas de incubación (figura A). * $P < 0.01$ respecto al control.

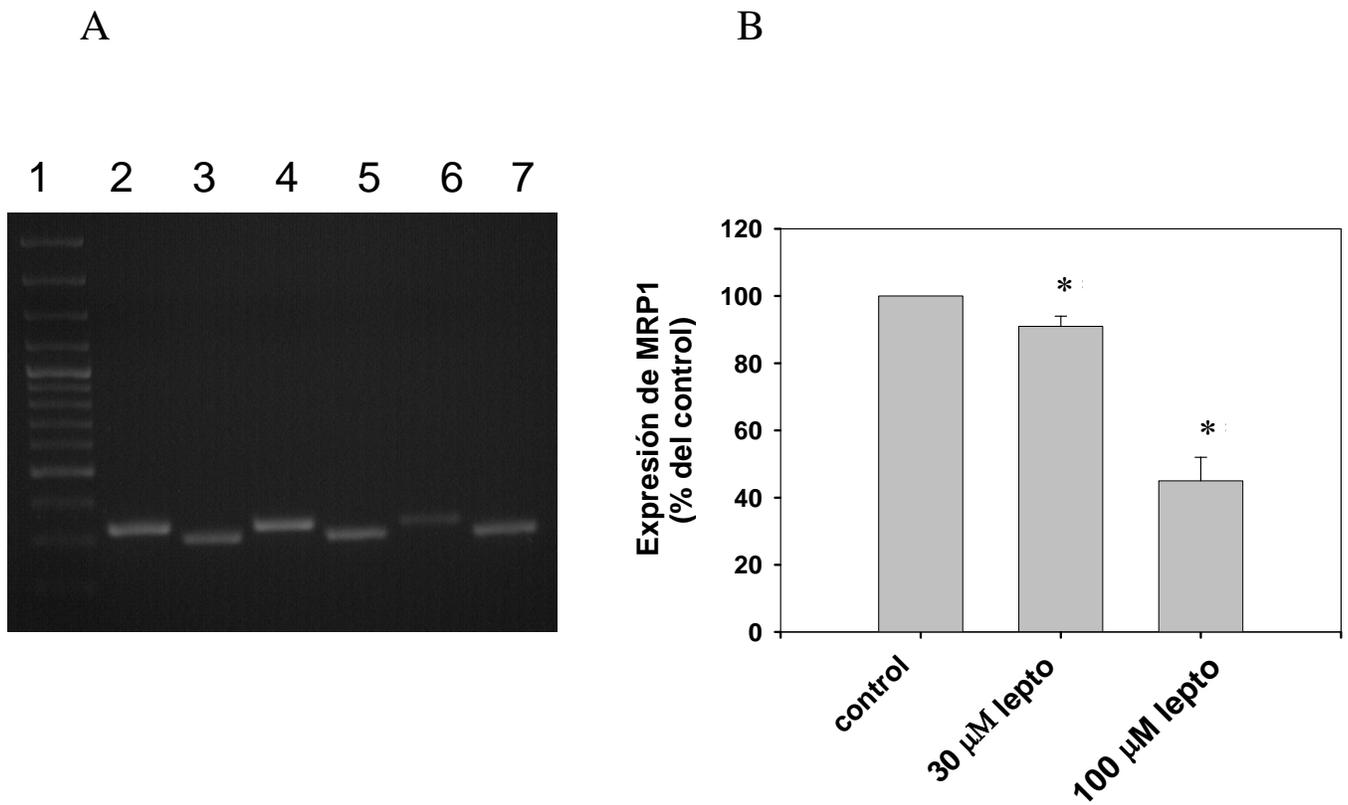


Fig. 27. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en células U937 determinado por RT-PCR a 24 horas de incubación. A: gel de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: Mrp1 control, carril 3: β -actina control, carril 4: Mrp1 30 μ M, carril 5: β -actina 30 μ M, carril 6: Mrp1 100 μ M, carril 7: β -actina 100 μ M. B: cuantificación del efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en células U937 por RT-PCR a 24 horas de incubación (figura A). * $P < 0.01$ respecto al control.

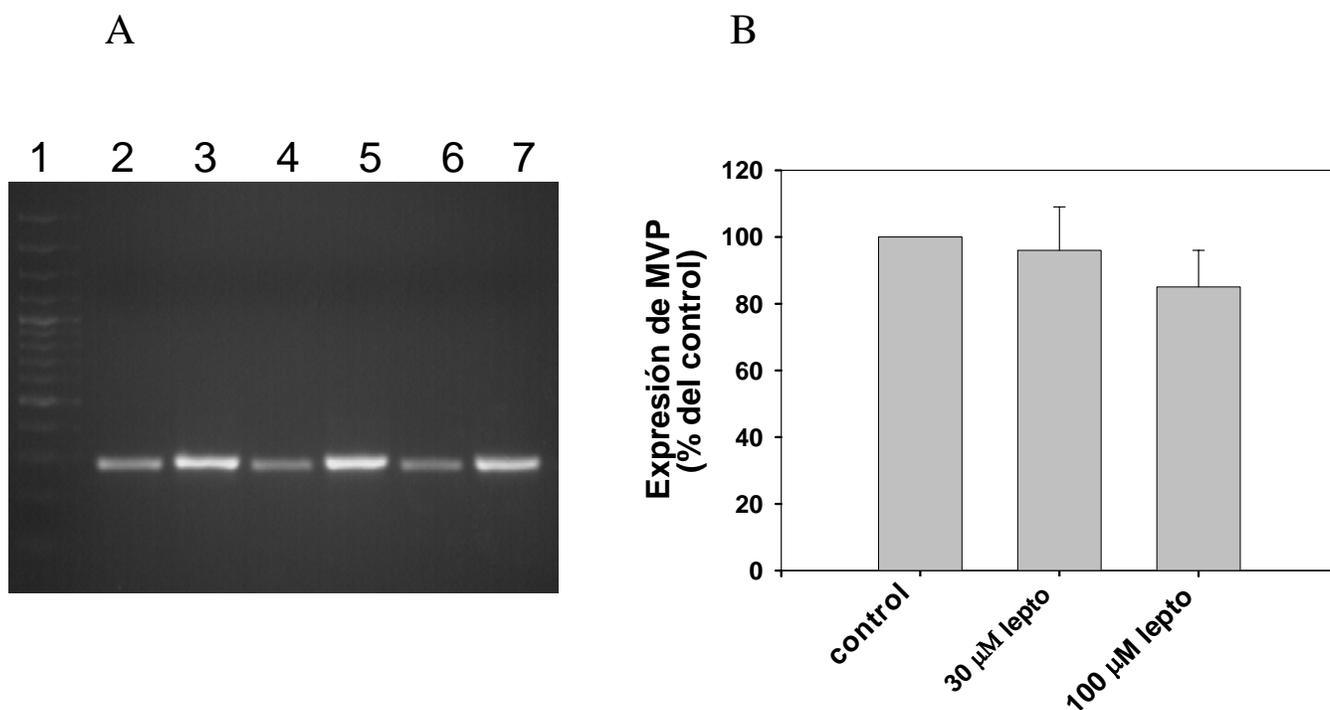
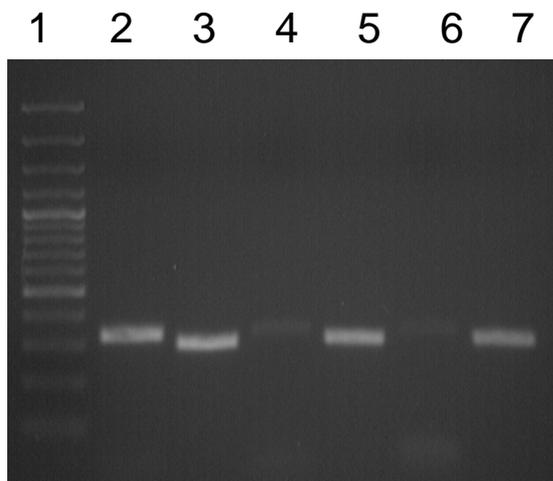


Fig. 28. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de MVP en células U937 determinado por RT-PCR a 24 horas de incubación. A: gel de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: MVP control, carril 3: β -actina control, carril 4: MVP 30 μM , carril 5: β -actina 30 μM , carril 6: MVP 100 μM , carril 7: β -actina 100 μM . B: cuantificación del efecto de leptocarpina sobre la expresión de MVP en células U937 por RT-PCR a 24 horas de incubación (figura A).

A



B

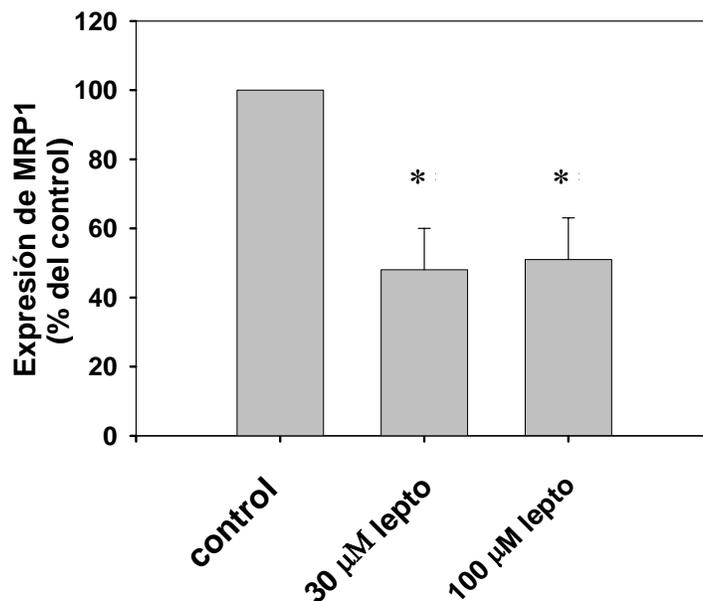
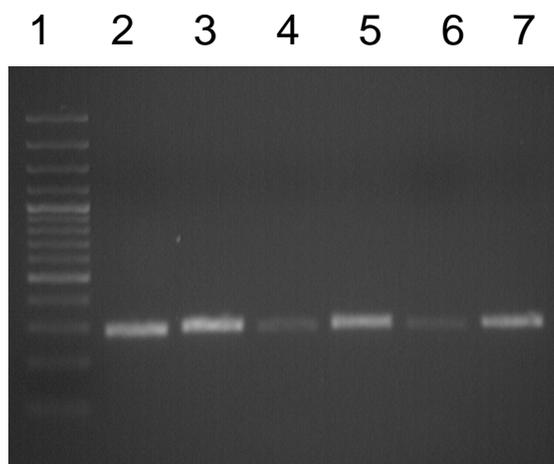


Fig. 29. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en leucocitos determinado por RT-PCR a 24 horas de incubación. A: gel de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: Mrp1 control, carril 3: β -actina control, carril 4: Mrp1 30 μ M, carril 5: β -actina 30 μ M, carril 6: Mrp1 100 μ M, carril 7: β -actina 100 μ M. B: cuantificación del efecto de leptocarpina sobre la expresión de Mrp1 en leucocitos por RT-PCR a 24 horas de incubación (figura A). * $P < 0.01$ respecto al control.

A



B

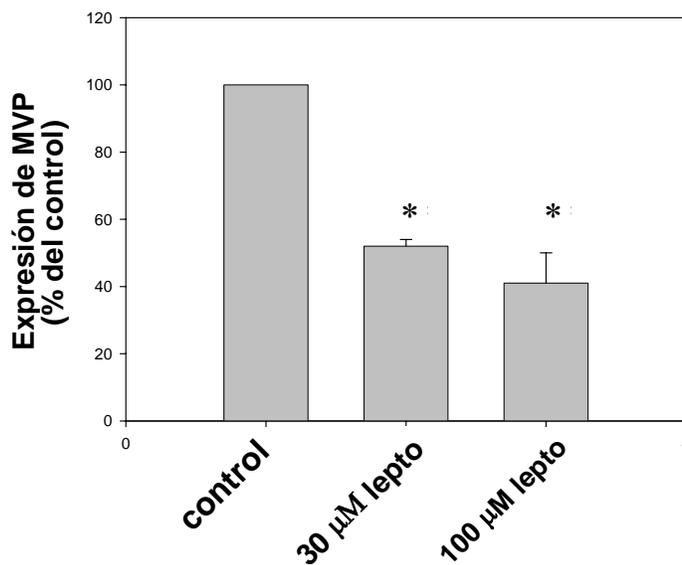
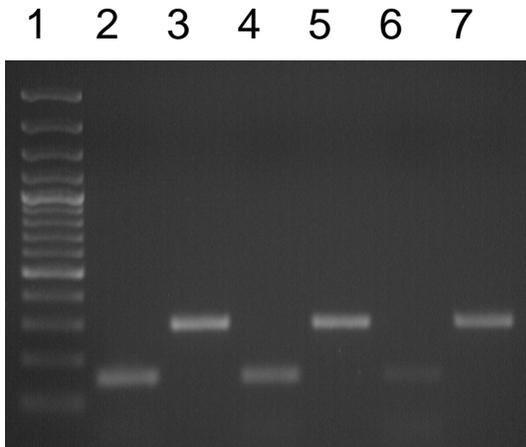


Fig. 30. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de MVP en leucocitos determinado por RT-PCR a 24 horas de incubación. A: gel de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: MVP control, carril 3: β -actina control, carril 4: MVP 30 μ M, carril 5: β -actina 30 μ M, carril 6: MVP 100 μ M, carril 7: β -actina 100 μ M. B: cuantificación del efecto de leptocarpina sobre la expresión de MVP en leucocitos por RT-PCR a 24 horas de incubación (figura A). * $P < 0.01$ respecto al control.

A



B

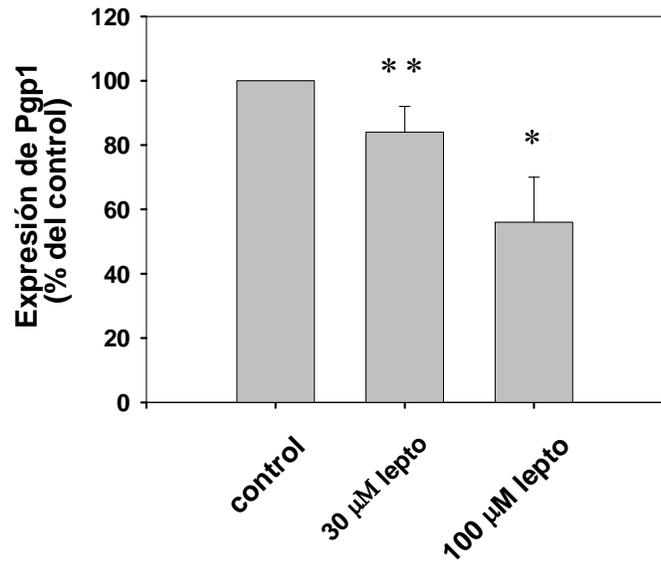


Fig. 31. Efecto de leptocarpina sobre la expresión de Pgp1 en leucocitos determinado por RT-PCR a 24 horas de incubación. A: gel de agarosa. Carril 1: estándar 3000 kb, carril 2: Pgp1 control, carril 3: β -actina control, carril 4: Pgp1 30 μ M, carril 5: β -actina 30 μ M, carril 6: Pgp1 100 μ M, carril 7: β -actina 100 μ M. B: cuantificación del efecto de leptocarpina sobre la expresión de Pgp1 en leucocitos por RT-PCR a 24 horas de incubación (figura A). * $P < 0.01$ respecto al control. ** $P < 0.05$ respecto al control.

6 DISCUSIÓN.

El uso de los compuestos de origen natural en la terapéutica en general y en el cáncer, en particular, es indiscutible. Alrededor de tres cuartas partes de la población mundial ha usado plantas y productos provenientes de plantas para el cuidado de la salud. Estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que sobre el 30% de las especies de plantas del mundo han sido usadas con fines médicos. De las 250.000 especies de plantas mayores sobre la Tierra, más de 80.000 especies son medicinales (Vandebroek et al, 2004). En el cáncer puntualmente los productos naturales han sido una importante fuente de agentes quimioterapéuticos potenciales. Sobre 50% de las drogas anticáncer aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) desde 1960, son originarias de fuentes naturales, especialmente plantas terrestres. Datos de bioensayos de citotoxicidad indican que más de 400 compuestos fueron aislados de plantas, organismos marinos, y microorganismos entre 1996 y 2003 (Mayer et al, 2004). Entre los compuestos naturales más estudiados se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, consideradas como una de las clases de productos naturales con mayor espectro de actividad biológica (Robles et al, 1995) entre los que encontramos: efecto inhibitorio sobre linfocitos T citotóxicos (Aniguchi et al, 1995), producción de óxido nítrico (NO) (Lee et al, 1999), expresión de antígenos de superficie en virus de la hepatitis B (Chen et al, 1995), supresión del crecimiento de células cancerígenas (Hall et al, 1977), acción antiinflamatoria por inhibición de 5-lipooxigenasa y ciclooxigenasa (Hall et al, 1980; Summer et al, 1992; Rungeler et al, 1998; Hwang et al, 1996), acción antiinflamatoria por supresión de la producción de citoquinas tales como TNF- α y citoquinas que inducen quimioatracción de neutrófilos (interleukina 8) (Cho et al, 1998; Jung et al, 1998), efectos citotóxicos en cultivos de células tumorales (Hladon et al, 1977; Hall et al, 1988; Woerdenbag et

al, 1994; Tellez-Martinez et al, 1980; Hladon et al, 1975; Pal et al, 1978; Beekman et al, 1998; Itokawa et al, 1993; Tozyo et al, 1994), depresor de la síntesis de DNA y síntesis proteica a nivel de la síntesis de purinas, pirimidinas, timidina quinasa y procesos de fosforilación oxidativa (Hall et al, 1982; Liou et al, 1983), acción antilipemiente y antioxidante (Baldazzi et al, 1999), promoción de citoprotección gástrica (Giordano et al, 1990; Maria et al, 1988). Dentro de esta realidad, y sobre la base de los antecedentes ya existentes acerca del gran espectro de acción de las lactonas sesquiterpénicas se enmarcó el desarrollo de esta tesis, en la que se estudió el efecto de una de ellas, denominada leptocarpina, que es aislada de las partes aéreas de la planta "Palo negro" (*Leptocarpha rivularis*), un arbusto nativo del sur de Chile, originalmente llamado Cüdu-mamëll (en mapudungun) por el pueblo mapuche (Marticorena et al, 1985). Se han documentado estudios preliminares que muestran que leptocarpina, tiene actividad biológica. Específicamente, esta droga es capaz de afectar la biosíntesis de proteínas en células HeLa, provenientes de cáncer cérvico uterino, lo que se dedujo de la inhibición en un 50% de la incorporación de [³⁵S]-metionina. Por otro lado, leptocarpina no afectó la síntesis de DNA o RNA, medido como incorporación de metil-[³H]-timidina y 5,6-[³H]-uridina, respectivamente (Martinez et al, 1995). Estudios posteriores reforzaron lo anterior en líneas celulares de diferente origen, P-815 (mastocitoma de ratón), NSO-2 (mieloma murino), J774.2 (macrófagos humano), 4FIO-67, CHO (células de ovario de hámster chino), donde igualmente se apreció inhibición de la incorporación de [³H]-leucina, que va desde un 50% a un 70%. Mientras la incorporación de [³H]-timidina y [³H]-uridina se mantuvo sin modificaciones (Martinez et al, 2006). La capacidad de inhibir la síntesis de DNA parece ser un rasgo común entre las lactonas sesquiterpénicas citotóxicas y antitumorales aunque leptocarpina no parece tener efecto a este nivel (Martinez et al, 1995).

Leptocarpina mostró un efecto citotóxico y antiproliferativo tanto en las líneas celulares hematológicas HL60 (leucemia promielocítica) y U937 (leucemia monocítica), con valores de IC_{50} de 31.7 μ M y 22.8 μ M respectivamente, utilizando el método de exclusión de azul de tripán y valores de IC_{50} de 22.7 μ M y 19.8 μ M utilizando el método de MTT. La viabilidad celular remanente llega a 19% y 9% para células HL60 y U937 respectivamente, lo que estaría mostrando un mejor efecto citotóxico sobre estas células en comparación a lo obtenido con células HeLa, donde se obtiene una sobrevida celular del 34% al ser expuestas a leptocarpina 30 μ M por 24 horas, en igualdad de condiciones (Martinez et al, 2006). La sobrevida que se determinó por el método de MTT es un poco más notoria, ya que los valores de viabilidad llegan al 8% y 13% para HL60 Y U937, respectivamente. Esto se puede explicar por la mayor sensibilidad del método empleado, que reconoce las células inactivas metabólicamente y no cuando estas sufren lisis o daño a nivel de la membrana plasmática (Mosmann, 1983). Estos valores de inhibición celular (IC_{50}) están un poco alejados de los valores que se han descrito para las mismas líneas celulares y utilizando otras lactonas sesquiterpénicas, que poseen un gran potencial de acción antitumoral, como por ejemplo, cinaropicrina que presentó valores de IC_{50} de 3,11 μ M a 48 horas de incubación (Cho et al, 2004). Asimismo, tamirin e ineupatorolide A con valores de 12.1 μ M y 2,6 μ M respectivamente, tras 24 horas de incubación en células U937 (Rivero et al, 2003). Por su parte, en células HL60 se han descrito valores de IC_{50} de $3,1 \pm 0,3$ μ M para arucanolide, de $4,2 \pm 0,5$ μ M para calealactone B, de $3,8 \pm 1,9$ μ M para parthenolide (Nakagawa et al, 2005), y valores de 2,8 μ M para ineupatorolide A tras 24 horas de incubación (Rivero et al, 2003). Los valores de IC_{50} encontrados para leptocarpina en células leucémicas por el método de azul de tripan no son tan bajos como los encontrados en las líneas celulares HL60 y U937, ya que fluctúan entre 7,3 y 64,7 μ M (fig. 3). Algo similar ocurrió al usar el método de

MTT, donde se encontraron valores de IC_{50} que fluctúan entre 11,1 y 42 μM . La excepción esta dada en el análisis de las células de pacientes con leucemia mieloide crónica, posiblemente por la heterogeneidad en cuanto a estados de maduración que posee, donde se midieron valores de IC_{50} bastante mas bajos que los obtenidos con el resto de las células leucémicas, HL60 y U937; determinándose valores que van desde 3,2 μM hasta 26,2 μM (fig. 5), con un promedio de $\pm 13,4$ μM . Si estos resultados obtenidos con las células tumorales se comparan con los obtenidos en leucocitos, es decir valores de IC_{50} de 50,4 μM de leptocarpina por el método de azul de tripan (fig. 2) y de 34,6 μM por el método de MTT (fig. 4), se aprecia una clara diferencia de sensibilidad entre estos valores y los encontrados en las líneas celulares HL60 y U937, siendo estas ultimas significativamente más sensibles. Este resultado se ve reflejado a partir de la concentración de 20 μM al usar el método de MTT para ambos tipos celulares.

La disminución de la viabilidad celular observada al tratar con leptocarpina fue dosis y tiempo dependiente para los distintos tipos celulares, de manera similar a lo observado en células HL60 cuando son expuestas a staurosporina 3 μM (STS), un producto bacteriano que inhibe múltiples proteínas quinasas (Tamaoki et al, 1990) e induce apoptosis de forma muy rápida en todos los tipos celulares nucleados en mamíferos (Jacobson et al, 1997). En un primer apronte en la determinación del mecanismo involucrado en la disminución en la viabilidad celular por leptocarpina, se ensayó la variación de la actividad de caspasa-3 con y sin su inhibidor específico. La activación de las caspasas juega un rol primordial en la ejecución del proceso de apoptosis celular, principalmente caspasa-3, una caspasa efectora que es la mayor caspasa activada en respuesta a distintos estímulos apoptóticos (Jow et al, 2004). Caspasa-3 mostró un aumento sustancial en su actividad en respuesta a leptocarpina, en todos los ensayos realizados en líneas celulares HL60 y U937, como en las células provenientes de pacientes con leucemia mieloide

crónica, obteniéndose en estos tres tipos celulares diferencias estadísticamente significativas a concentraciones de 30 y 100 μM , con valores de $P < 0,01$ respecto al control sin tratamiento. Por su parte en células provenientes de individuos sanos usados como control negativo, también se observó un aumento de 276% en la actividad de caspasa-3, pero de intensidad inferior al presentado en los modelos tumorales. En estas células, solo hubo diferencias significativas con respecto al control a 30 μM de leptocarpina, ya que a 100 μM de leptocarpina, la activación de caspasa-3 fue un 14% inferior al control. El tratamiento con leptocarpina 30 μM fue el que llevó a la mayor activación de caspasa-3, obteniéndose en células HL60 un incremento de 2.481% con respecto al control (100%), lo cual es una fuerte evidencia de la inducción del proceso de apoptosis por leptocarpina, al igual como se ha demostrado en las lactonas sesquiterpénicas representativas, como lo es costunolide, que estimula apoptosis en células HL60 y U937 a 12 horas de tratamiento, mediante generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteración de la permeabilidad mitocondrial y depleción de tioles (principalmente glutatión) (Choi et al, 2002; Lee et al, 2001). Cinaropicrina, indujo apoptosis en células de leucemia humana U937 a concentraciones de entre 10 y 20 μM , tras una incubación superior a las 12 horas, mediante detención del ciclo celular en G_1/S y degradación de PKC δ (Cho et al, 2004). Otra lactona sesquiterpénica, helenalin, indujo apoptosis a concentraciones entre 10-50 μM a las 24 horas de incubación en células Jurkat (leucemia de células T humana) (Dirsch et al, 2001).

La vía intrínseca o mitocondrial es una de las dos vías que conduce a la apoptosis, ella está regulada por una familia de proteínas llamada Bcl-2 formada por alrededor de 25 miembros, los que están agrupados en tres subfamilias, entre las que se cuentan proteínas pro y anti apoptóticas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial. Las tres subfamilias son la Bcl-2 (anti-apoptótica): *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *MCL-1*; Bax (pro-apoptótica): *Bax*, *Bak*, *Bok*; BH3 (pro-

apoptótica): *Bad, Bid, Bik, Blk, BimL*. Bcl-2 esta involucrada en el bloqueo de la muerte celular, más específicamente de los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear, desorganización de la membrana plasmática y ruptura endonucleolítica del ADN. Por su parte, Bax es un monómero anclado a la cara citosólica de diversos organelos, que ante una señal de muerte celular se inserta en la membrana externa mitocondrial en forma de homo oligómero permeabilizándola con la consecuente liberación de factores del espacio intermembrana como el citocromo C. Además se incluyó el análisis de expresión de la proteína p21^{WAF-1}, que es un gen supresor tumoral que codifica una proteína del mismo nombre que restringe la división celular frente a un daño en el ADN detectado por proteínas quinasas ATM y ATR, las que a su vez activan p53 que actúa como factor de transcripción en la síntesis de p21^{WAF-1}. p21^{WAF-1} inhibe la actividad proteína quinasa de la ciclina E-CDK2 encargada de fosforilar la proteína del retinoblastoma (pRb), de esta manera la pRb permanece unida al factor de transcripción E2F bloqueándolo y por ende deteniendo el ciclo celular en G1. La vía apoptótica desencadenada esta relacionada a un aumento o disminución en la regulación de distintos genes como p-53 y Bcl-2 (Chakrabarty et al, 2002), al parecer leptocarpina estaría induciendo apoptosis por una vía dependiente de p-53, dado la variación positiva de p21^{WAF-1}, que es un potente ligando inhibidor de Cdk's, que puede inhibir la fosforilación de pRb por ciclinas A-Cdk2, E-Cdk2, D1-Cdk4 y D2-Cdk4 (Xiong et al, 1993), la expresión de p21^{WAF-1} juega un rol fundamental en el progreso del ciclo celular, y se demostró que leptocarpina incrementa la expresión de p-21 a nivel de mRNA en ambos tipos celulares HL60 y U937 (fig. 18), llegando a valores de 231% respecto al control (100%). El efecto sobre p21^{WAF-1}, sumado al efecto sobre Bcl-2 que se ve disminuido en su expresión llegando a un 41% y 44% en células HL60 y U937 respectivamente, se asemeja a lo observado en células de leucemia mieloide aguda con la lactona sesquiterpenica parthenolide, que

induce apoptosis por regulación positiva de la proteína p-53 asociada a p21^{WAF-1} y disminuyendo la expresión de Bcl-2 asociada a Bax (Guzman et al, 2005). La razón entre moléculas anti y pro apoptoticas tales como Bcl-2/Bax, marcan la susceptibilidad a la apoptosis por la vía intrínseca (Nika et al, 2004), lo que queda de manifiesto en los experimentos realizados, por la disminución en la expresión de Bcl-2 de manera significativa con respecto al control, $P < 0.01$, y la mantención constante de la expresión de Bax en células HL60 y U937. Según los datos mostrados leptocarpina induce apoptosis por un mecanismo dependiente de p-53, caspasas y asociado a la vía intrínseca, lo que no queda claro es si está involucrada la vía extrínseca, ya que esta vía se puede relacionar a la vía mitocondrial por intermedio de la proteína Bid, que puede ser activada por caspasa-8 y a su vez activar la proteína Bax para la liberación de citocromo c (Hengartner, 2000; Nika et al, 2004). Lo anterior toma fuerza al considerar que la bioactividad, incluyendo la acción antitumoral de lactonas sesquiterpénicas es atribuida al grupo α -metilen- γ -lactona, y que uno de los mecanismos de acción es el que involucra la reacción de este grupo con nucleófilos, como grupos sulfhidrilos de cisteinas y glutatión intracelular libre, que conducen a la disminución de la actividad enzimática o causan alteración del metabolismo de glutatión y el consecuente desbalance del potencial redox intracelular, produciéndose inducción de estrés oxidativo (Wen et al, 2002; Zhang et al, 2004; Choi et al, 2002). El exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), causa la iniciación de la apoptosis por la vía dependiente de la mitocondria. La apoptosis inducida por lactonas sesquiterpénicas relacionada con esta vía, ha sido observada en varias lactonas sesquiterpénicas representativas, tales como helenalina (Dirsch et al, 2001), costunolide (Lee et al, 2001) y partenolide (Zhang et al, 2004).

Se sabe que parte de la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas se debe a su capacidad de alquilar nucleófilos biológicos tales como glutatión y tioles proteicos, lo que lleva a

depleción de ellos, de lo anterior hay bastante evidencia a favor de estas moléculas como se muestra con vernolepina, helenalina, elephantopina, eriofertopina, costunolide, repón y parthenolide (Wen et al, 2002; Zhang et al, 2004; Rüngeler et al, 1999; Choi et al, 2002; Arrick et al, 1983; Robles et al, 1997). Una de las consecuencias más importantes de la depleción de tioles es la disrupción del balance redox celular e inducción de estrés oxidativo. El estado reducción/oxidación intracelular es un balance preciso entre niveles de generación de ROS y tioles endógenos existentes en las células (Wen et al, 2002). Se ha asociado el aumento o disminución en la expresión de transportadores a multidroga a un incremento o disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno intracelular. Condiciones que generan especies reactivas de oxígeno han mostrado incremento de Pgp en células derivadas de tejidos de hígado (Ziemann et al, 1999; Hirsch-Ernst et al, 2000; Deng et al, 2001) y riñón (Thevenod et al, 2000). Por el contrario otros estudios han mostrado disminución de Pgp mediante el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno en tumores de próstata (Wartenberg et al, 2000; Wartenberg et al, 2001), esto último estaría de acuerdo con la disminución de expresión observada en todas las proteínas de resistencia a multidroga en los modelos celulares ensayados (MRP1, MVP, Pgp1),

Está demostrado que leptocarpina depleta el glutatión intracelular, lo que lleva a un aumento de las especies reactivas de oxígeno. Hay una hipótesis que sugiere que el aumento de las especies reactivas de oxígeno intracelular disminuye la expresión de Pgp, sobrerregulando la vía de señalización de MAPK, específicamente a ERK1,2 y JNK (Wartenberg et al, 2001), vía que también es estimulada por las lactonas sesquiterpénicas como thapsigargin, que es un potente inhibidor de ATPasa Ca^{2+} dependiente del retículo endoplásmico, y que induce fosforilación de p38 y ERK en células leucémicas mieloides M1. Además de ser este un proceso envuelto en la

apoptosis inducida por esta lactona sesquiterpénica (Lotem et al, 1999). Otros experimentos que avalan la hipótesis de disminución en la expresión de los transportadores por aumento de ROS, son los que se hicieron coadministrando un oxidante y una molécula captadora de radicales libres, donde no se alteraron los niveles de Pgp, lo que estaría indicando que la disminución de la expresión de Pgp es mediada vía ROS (Wartenberg et al, 2000). De manera similar hay evidencia que liga la expresión de MRP1 al balance redox celular, donde altos niveles de ROS resulta en un severo estrés oxidativo celular que incrementa la expresión de MRP1 (Yamane et al, 1998). Otros estudios en células endoteliales cerebrales de rata han mostrado un aumento en la expresión de Pgp pero mantienen constante los niveles de MRP1 (Felix et al, 2002). Para efectos prácticos y explicativos de la variación de proteínas de resistencia a multidrogas, se centró la atención en Pgp, por ser de quien se tiene mayor información, no así de MRP1 y mucho menos de MVP. Los resultados obtenidos en las líneas celulares HL60 y U937, y en los leucocitos normales respecto a la variación en la expresión de proteínas de resistencia a multidrogas frente a leptocarpina 30 y 100 μ M (fig 26 a la 31), son bastante prometedores en una futura terapia antitumoral, ya que se obtuvo una disminución de un $37\% \pm 6\%$ en la expresión del mRNA del transportador MRP1 con respecto al control en células HL60 expuestas a 100 μ M de leptocarpina (fig. 26) y un $9\% \pm 3\%$ y $55\% \pm 7\%$ para 30 μ M y 100 μ M de leptocarpina, respectivamente, en células U937 (fig. 27). Los valores anteriores representan diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0,01$. En lo que respecta a MVP que fue otra proteína ensayada, la información disponible es poca y bastante incierta, ya que si bien ha demostrado tener un rol en la resistencia a multidrogas de células leucémicas, este rol está aún bajo discusión, ya que puede variar dependiendo del tipo celular en proliferación (linfoblastos/mieloblastos). Publicaciones sobre LLA y LMA proveen resultados diferentes (List et al, 1996; Goasguen et al, 1996; Filipits

et al, 1998). Los niveles de expresión de MVP obtenidos en células U937 muestran que no existe variación (fig. 28), no así en células provenientes de individuos normales, donde si hubo variaciones de expresión (fig. 30).

En base a todos los antecedentes expuestos se puede deducir que leptocarpina a bajas dosis no tiene un efecto citotóxico preferencial por células tumorales ya sean líneas celulares o células de cultivos primarios, en comparación a células provenientes de individuos sanos. Al aumentar la dosis (sobre 20 μM) se establece la diferencia entre las líneas celulares HL60 y U937 respecto a las células normales, lo cual no ocurre con las células leucémicas de cultivos primarios, ya que el rango de IC_{50} presentados por estas células es muy disperso, con márgenes que abarcan todos los valores de IC_{50} encontrados para las demás células analizadas. Si bien los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad son menos alentadores pensando en un posible uso terapéutico de la droga, los resultados logrados en lo que respecta a la expresión de proteínas de resistencia a multidroga abren la esperanza de un posible uso terapéutico de leptocarpina como coadyuvante de la quimioterapia, por su efecto sensibilizador, asociado o no a otro fármaco, puesto que el potencial inhibitorio de expresión de proteínas de resistencia a multidroga es tanto o más valioso que el solo efecto citotóxico.

7 BIBLIOGRAFIA.

Abbondanza, C., Rossi, V., Roscigno, A., Gallo, L., Belsito, A., Piluso, G., Medici, N., Nigro, V., Molinari, A. M., Moncharmont, B. & Puca, G. A. (1998) Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell. *J Cell Biol*, 141, 1301-10.

Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Van Deemter, L., Wijnholds, J. & Schinkel, A. H. (2000) Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res*, 60, 5761-6.

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M. M. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 361-98.

Aniguchi, M., Kataoka, T., Suzuki, H., Uramoto, M., Ando, M., Arao, K., Magae, J., Nishimura, T., Otake, N., Nagai, K., (1995). Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2064-2067.

Arrick BA, Nathan CF, Cohn ZA, (1983). Inhibition of glutathione synthesis augments lysis of murine tumor cells by sulfhydryl-reactive antineoplastics. *J Clin Invest.* Feb;71(2):258-67.

Baldazzi C, Calderoni F, Marotta E, Piani S Righi P et al, (1999). Medium sized lactones with hypolipidaemic and antioxidant activity: synthesis and biological evaluation of promising dual action anti-atherosclerosis drugs. *Bioorg Med Chem.* 7:411-8.

Baldini, N. (1997). Multidrug resistance-a multiplex phenomenon. *Nat Med*, 3, 378-80.

Barrueco, J. R., O'leary, D. F. & Sirotnak, F. M. (1992). Facilitated transport of methotrexate polyglutamates into lysosomes derived from S180 cells. Further characterization and evidence for a simple mobile carrier system with broad specificity for homo- or heteropeptides bearing a C-terminal glutamyl moiety. *J Biol Chem*, 267, 19986-91.

Barrueco, J. R., O'leary, D. F. & Sirotnak, F. M. (1992). Metabolic turnover of methotrexate polyglutamates in lysosomes derived from S180 cells. Definition of a two-step process limited by mediated lysosomal permeation of polyglutamates and activating reduced sulfhydryl compounds. *J Biol Chem*, 267, 15356-61.

Batova A, Shao LE, Diccianni MB, Yu AL, Tanaka T, Rephaeli A, Nudelman A, Yu J, (2002). The histone deacetylase inhibitor AN-9 has selective toxicity to acute leukemia and drug-resistant primary leukemia and cancer cell lines. *Blood.* 100(9):3319-24.

Beekman AC, Wierenga PK, Woerdenbag HJ, Van Unden W, Pras N et al, (1998). Artemisinin derived sesquiterpene lactones as potencial antitumours compounds: cytotoxic action against bone marrow and tumour cells. *Pharma Med.* 64:615-19.

Borst, P. & Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 71, 537-92.

Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1295-302.

Carney, D. N. & Hansen, H. H. (2000) Non-small-cell lung cancer--stalemate or progress? *Engl. J Med*, 343, 1261-2.

Chakrabarty S, Roy M, Hazra B, Bhattacharya RK, (2002). Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Lett*. Dec 15;188(1-2):85-93.

Chen HC; Chou CK; Lee SD; Wang JC; Yeh SF, (1995). Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral research*; Vol. 27 (1-2), pp. 99-109.

Chin, K. V., Ueda, K., Pastan, I. & Gottesman, M. M. (1992). Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*, 255, 459-62.

Cho, J.Y., Park, J., Yoo, E.S., Baik, K.U., Lee, J., Park, M.H., (1998). Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophage-like cells. *Planta Med*. 64, 594-597.

Cho JY, Kim AR, Jung JH, Chun T, Rhee MH, Yoo ES, (2004). Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *Eur J Pharmacol.* 492(2-3):85-94.

Choi JH, Ha J, Park JH, Lee JY, Lee YS, Park HJ, Choi JW, Masuda Y, Nakaya K, Lee KT, (2002). Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols. *Jpn J Cancer Res.* 93(12):1327-33.

Chu, E. & Brandt, D. S. (1997). Future challenges in the clinical development of thymidylate synthase inhibitor compounds. *Oncol Res*, 9, 403-10.

Chugani, D. C., Rome, L. H. & Kedersha, N. L. (1993) Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci*, 106 (Pt 1), 23-9.

Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. & Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258, 1650-4.

Cole, S. P., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M. & Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*, 54, 5902-10.

Cordon-Cardo, C., O'brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. & Bertino, J. R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 695-8.

Demark-Wahnefried W, Price DT, Polascik TJ, Robertson CN, Anderson EE, Paulson DF, Walther PJ, Gannon M, Vollmer RT, (2001). Pilot study of dietary fat restriction and flaxseed supplementation in men with prostate cancer before surgery: exploring the effects on hormonal levels, prostate-specific antigen, and histopathologic features. *Urology*. 58(1):47-52.

Deng L., Lin-Lee Y. C., Claret F. X. and Kuo M. T. (2001). 2-Acetylaminofluorene up-regulates rat *mdr1b* expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 413-420.

De Vita, V; Hellman, S; Rosenberg, S, (2000). Cancer: principios y práctica de oncología. V.2. editorial panamericana (5^a ed).

Dingemans, A. C., Van Ark-Otte, J., Span, S., Scagliotti, G. V., Van Der Valk, P., Postmus, P. E. & Giaccone, G. (2001). Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 32, 117-28.

Dirsch VM, Stuppner H, Vollmar AM, (2001). Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-x(L) or Bcl-2. *Cancer Res.* 61(15):5817-23.

Doll R, Peto R, (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 66(6):1191-308.

Downing JR, Shannon KM, (2002). Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell.* 2(6):437-45.

Evers, R., Zaman, G. J., Van Deemter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L. C., Oude Elferink, R. P., Borst, P. & Schinkel, A. H. (1996). Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest*, 97, 1211-8.

Felix RA, Barrand MA, (2002). P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J Neurochem.* 80(1):64-72.

Filipits M, Pohl G, Stranzl T, Suchomel RW, Scheper RJ, Jager U, et al, (1998). Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 91:1508-13.

Fojo, T. & Bates, S. (2003). Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene*, 22, 7512-23.

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V, (1986). Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature.* 324(6096):485-9.

Giaccone, G., Van Ark-Otte, J., Scagliotti, G., Capranico, G., Van Der Valk, P., Rubio, G., Dalesio, O., Lopez, R., Zunino, F., Walboomers, J. & Et Al. (1995). Differential expression of DNA topoisomerases in non-small cell lung cancer and normal lung. *Biochim Biophys Acta*, 1264, 337-46.

Giordano OS, Guerreiro E, Pestchanker MJ, Guzman J, Pastor D et al, (1990). The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J Nat Prod*. 53:803-9.

Goasguen JE, Lamy T, Bergeron C, Ly Sunnaram B, Mordelet E, Gorre G, et al, (1996). Multifactorial drug-resistance phenomenon in acute leukemias: impact of P170-MDR1, LRP56 protein, glutathionetransferases and methallothionein systems on clinical outcome. *Leukemia and Lymphoma*. 23:567–76.

Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2, 48-58.

Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, Jordan CT, (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. 105(11):4163-9.

Hall, IH; Lee, K.H; Mar, E.C; Starnes, C.O; Wadell, T.G, (1977). Antitumor agents. 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by tenulin and helenalin and related cyclopentenones, *J. Med. Chem*. 20, 333– 337.

Hall IH, Liou YF, Lee KH, (1982). Antitumor agent LII: The effects of molephantinin on nucleic acid and protein synthesis of Ehrlich ascites cells. *J Pharm Sci*, 71:687-90.

Hall IH, Starnes CO Jr, Lee KH, Waddell TG, (1980). Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *J Pharma Sci*, 69: 537-43.

Hall IH, Williams WL Jr, Grippo AA, Lee KH, Holbrook DJ et al, (1988). Inhibition of nucleic acid synthesis in P-388 lymphocytic leukemia cells in culture by sesquiterpene lactones. *Anticancer Res*, 8:33-42.

Hamill, D. R. & Suprenant, K. A, (1997). Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol*, 190, 117-28.

Harada, T., Ogura, S., Yamazaki, K., Kinoshita, I., Itoh, T., Isobe, H., Yamashiro, K., Dosaka-Akita, H. & Nishimura, M, (2003). Predictive value of expression of P53, Bcl-2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*, 94, 394-9.

Hausott B, Greger H, Marian B, (2003). Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 129(10):569-76.

Higgins, C. F. & Gottesman, M. M. (1992). Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci*, 17, 18-21.

Hirsch-Ernst K. I., Kietzmann T., Ziemann C., Jungermann K. and Kahl G. F. (2000). Physiological oxygen tensions modulate expression of the *mdr1b* multidrug-resistance gene in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem. J.* 350, 443±451.

Hladon B, Bobkiewicz T, Drozd B, (1977). Sesquiterpene lactones. XIX Preliminary studies on the mode of action. Inhibition of synthesis of tumor cell protein and RNA. *Arch Immunol Ther Exp.* 25:243-51.

Hladon B, Drozd B, Grabarczyk H, Bobkiewicz T, Olszewski J, (1975). Sesquiterpene lactones. Part XIII. Cytotoxic activity of eupatolide and eupatoriopicrin on human and animal malignant cells in tissue culture in vitro. *Pol J Pharmacol Pharm.* 27:429-38.

Hollo, Z., Homolya, L., Hegedus, T. & Sarkadi, B. (1996). Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett*, 383, 99-104.

Huisman, M. T., Smit, J. W., Wiltshire, H. R., Hoetelmans, R. M., Beijnen, J. H. & Schinkel, A. H. (2001). P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir. *Mol Pharmacol*, 59, 806-13.

Hunter T, (2007). Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *J Clin Invest.* 117(8):2036-43.

Hwang, D; N.H. Fischer; B.C. Jang; H. Tak; J.K. Kim; W. Lee, (1996). Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 810– 818.

Idriss, H. T. (2000). Phosphorylation of tubulin tyrosine ligase: a potential mechanism for regulation of alpha-tubulin tyrosination. *Cell Motil Cytoskeleton*, 46, 1-5.

Ishikawa, T. & Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem*, 268, 20116-25.

Itokawa H, Masuyama K, Morita H, Tayeka K, (1993). Cytotoxic sesquiterpenes from *Nardostachys chinensis*. *Chem Pharm Bull*, 41:1183-4.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC, (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88(3):347-54.

Jow GM, Chou CJ, Chen BF, Tsai JH, (2004). Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. *Cancer Lett.* 216(2):165-73.

Jung, J.H., Ha, J.Y., Min, K.R., Shibata, F., Nakagawa, H., Kang, S.S., Chang, I.M., Kim, Y., (1998). Reynosin from *Saussurea lappa* as inhibitor on CINC-1 induction in LPS-stimulated NRK-52E cells. *Planta Med.* 64, 454-455.

Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y, Furukawa Y, (2001). In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood.* 97(7):1999-2007.

Kawasaki, M., Nakanishi, Y., Kuwano, K., Takayama, K., Kiyohara, C. & Hara, N. (1998). Immunohistochemically detected p53 and P-glycoprotein predict the response to chemotherapy in lung cancer. *Eur J Cancer*, 34, 1352-7.

Kedersha, N. L. & Rome, L. H. (1986). Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol*, 103, 699-709.

Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G. & Konig, J. (1998). ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact*, 111-112, 153-61.

Klein EA, Thompson IM, Lippman SM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR, Coltman C, (2001). SELECT: the next prostate cancer prevention trial. Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *J Urol.* 166(4):1311-5.

Kreisholt, J., Sorensen, M., Jensen, P. B., Nielsen, B. S., Andersen, C. B. & Sehested, M. (1998). Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase IIalpha, P-glycoprotein and multidrug resistance protein (MRP) in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 77, 1469-73.

Lankas, G. R., Wise, L. D., Cartwright, M. E., Pippert, T. & Umbenhauer, D. R. (1998). Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol*, 12, 457-63.

Lee HJ; Kim NY; Jang MK; Son HJ; Kim KM; Sohn DH; Lee SH; Ryu JH, (1999). A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha in LPS-activated macrophages. *Planta Med.* Vol. 65 (2), pp. 104-8.

Lee MG, Lee KT, Chi SG, Park JH, (2001). Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. *Biol Pharm Bull.* 24(3):303-6.

Lehnert, M. (1996). Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer*, 32A, 912-20.

Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S. P., Deeley, R. G. & Keppler, D. (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem*, 269, 27807-10.

Leonard, C. J., Canman, C. E. & Kastan, M. B. (1995). The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Important Adv Oncol*, 33-42.

Leonard, G. D., Fojo, T. & Bates, S. E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 8, 411-24.

Liou YF, Hall IH, Lee KH, Williams WL Jr, Chaney SG, (1983). Investigation of sesquiterpene lactones as protein synthesis inhibitors of P-338 lymphocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*, 739: 190-6.

List AF, Spier CS, Grogan TM, Johnson C, Roe DJ, Greer JP, et al, (1996). Over expression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*, 87:2464-9.

Loe, D. W., Almquist, K. C., Deeley, R. G. & Cole, S. P. (1996). Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem*, 271, 9675-82.

Lorico, A., Rappa, G., Flavell, R. A. & Sartorelli, A. C. (1996). Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. *Cancer Res*, 56, 5351-5.

Lotem J, Kama R, Sachs L, (1999). Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(21):12016-20.

Maria AO, Wendel GH, Guzman JA, Giordano OSD, Guerreiro E, (1988). Gastric cytoprotective activity of dehydroleucodine in rats. Role of nitric oxide. *Pharmacol Res*, 37:281-4.

Marie, J. P. (2001). Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol*, 13, 463-9.

Marticorena, C; Quezada, (1985). Catalogo de la flora vascular de Chile. *Gayana Botánica. Univ. De Concepción*. (42). N^o 1-2. 157 p.

Martínez, Rolando; Kesternich, Victor; Carrasco, Héctor; Álvarez-Contreras, Carolina; Montenegro, Carolina; Ugarte, Ricardo; Gutiérrez, Elena; Moreno, José; García, Carlos; Werner, Enrique; Cárcamos, Juan, (2006). Synthesis And Conformational Analysis Of Leptocarpin Derivatives: Influence Of Modification Of The Oxirane Ringon Leptocarpin's Cytotoxic Activity. *J. Chil. Chem. Soc.* v.51 n.4.

Martinez R, Kesternich V, Gutierrez E, Dolz H, Mansilla H, (1995). Conformational analysis and biological activity of leptocarpin and leptocarpin acetate. *Planta Med*, 61:188-9.

Matherly, L. H., Taub, J. W., Ravindranath, Y., Proefke, S. A., Wong, S. C., Gimotty, P., Buck, S., Wright, J. E. & Rosowsky, A. (1995). Elevated dihydrofolate reductase and impaired

methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 85, 500-9.

Mayer AM, Gustafson KR, (2004). Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer*. 40(18):2676-704.

Miao ZH, Tang T, Zhang YX, Zhang JS, Ding J, (2003). Cytotoxicity, apoptosis induction and downregulation of MDR-1 expression by the anti-topoisomerase II agent, salvicine, in multidrug-resistant tumor cells. *Int J Cancer*. 106(1):108-15.

Michael O. Hengartner, (2000). The biochemistry of apoptosis. *NATURE*, VOL 407, 12.

Minsal (2004). Protocolo Auge, Cancer Infantil Leucemias.

Modzelewska A, Sur S, Kumar SK, Khan SR, (2005). Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 5(5):477-99.

Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA, (1994). p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature*. 371(6492):72-4

Mosmann, T, (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63

Muller, M., Meijer, C., Zaman, G. J., Borst, P., Scheper, R. J., Mulder, N. H., De Vries, E. G. & Jansen, P. L. (1994). Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 13033-7.

Muñoz-Martinez, F., Lu, P., Cortes-Selva, F., Perez-Victoria, J. M., Jimenez, I. A., Ravelo, A. G., Sharom, F. J., Gamarro, F. & Castanys, S. (2004). Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulators that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse cellular multidrug resistance. *Cancer Res*, 64, 7130-8.

Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N, Yi K, Naoi M, Nakayama T, Nozawa Y, Akao Y, (2005). A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucanolide, in HL60 Cells: a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. *J Pharmacol Sci*, 97(2):242-52.

Nelson, D y Cox, M, (2001). Lehninger Principios De Bioquímica. Ediciones Omega, S.A, 1^a ed. Capitulo 13, pag. 469-475.

Nika N. Danial and Stanley J. Korsmeyer, (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, Vol. 116, 205–219.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-66.

Pal R, Kulshreshtha DK, Rastogi RP, (1978). Antileukemic and other constituents of *Tithonia tagitiflora* Desf. *J Pharma Sci.* 65:918-20.

Preet M. Chaudhary, Eugene B. Mechetner, and Igor B. Roninson, (1992). Expression and Activity of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Blood*, Vol 80, No 11, pp 2735-2739.

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD, (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther.* 99(1):1-13.

Rivero A, Quintana J, Eiroa JL, López M, Triana J, Bermejo J, Estévez F, (2003). Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 482(1-3):77-84.

Robles. M, Aregullin. M, West. J, Rodriguez. E, (1995). Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology, and neurotoxicology of sesquiterpene lactone, *Planta Med.* 61, 199–203.

Robles M, Wang N, Kim R, Choi BH, (1997). Cytotoxic effects of repin, a principal sesquiterpene lactone of Russian knapweed. *J Neurosci Res.* 47(1):90-7.

Ross, J. J., Arnason, J. T. & Birnboim, H. C. (1999). Low concentrations of the feverfew component parthenolide inhibit in vitro growth of tumor lines in a cytostatic fashion. *Planta Med*, 65, 126-9.

Roth, M.J., Tanese, N. y Goff, S.P. (1985). Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260 (16), 9326- 9335.

Rüngeler P, Castro V, Mora G, Gören N, Vichnewski W, Pahl HL, Merfort I, Schmidt TJ, (1999). Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 7(11):2343-52.

Rungeler P, Lyss G, Castro V, Mora G, Pahl HL, Merfor I, (1998). Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets. *Planta Med*, 64:588-93.

Saito, T., Zhang, Z. J., Ohtsubo, T., Noda, I., Shibamori, Y., Yamamoto, T. & Saito, H. (2001). Homozygous disruption of the *mdrla* P-glycoprotein gene affects blood-nerve barrier function in mice administered with neurotoxic drugs. *Acta Otolaryngol*, 121, 735-42.

Sans-Sabrafen, J ; Besses Raebel, C ; Vives Corrons, J.L. *Hematologia Clinica* (4^a ED.) pag. 359.

Sans-Sabrafen, J ; Besses Raebel, C ; Vives Corrons, J.L. *Hematologia Clinica* (4^a ED.) pag. 348.

Scagliotti, G. V., Novello, S. & Selvaggi, G. (1999). Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 10 Suppl 5, S83-6.

Scheffer, G. L., Wijngaard, P. L., Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Slovak, M. L., Pinedo, H. M., Meijer, C. J., Clevers, H. C. & Scheper, R. J. (1995). The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med*, 1, 578-82.

Scheper, R. J., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., Kaaijk, P., Dalton, W. S., Van Heijningen, T. H., Van Kalken, C. K., Slovak, M. L., De Vries, E. G., Van Der Valk, P. & Et Al. (1993). Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*, 53, 1475-9.

Schinkel, A. H. (1997). The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol*, 8, 161-70.

Schinkel, A. H. & Borst, P. (1991). Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol*, 2, 213-26.

Schinkel, A. H., Smit, J. J., Van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C. A., Van Der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., Te Riele, H. P. & Et Al. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77, 491-502.

Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A. & Van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest*, 97, 2517-24.

Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C. A. & Borst, P. (1995). Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest*, 96, 1698-705.

Senior, A. E. & Gadsby, D. C. (1997). ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol*, 8, 143-50.

Shepherd, F. A. (2000). Chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: modest progress, many choices. *J Clin Oncol*, 18, 35S-8S.

Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., Van Der Lugt, N. M., Van Roon, M. A. & Et Al. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75, 451-62.

Smith, A. J., Timmermans-Hereijgers, J. L., Roelofsen, B., Wirtz, K. W., Van Blitterswijk, W. J., Smit, J. J., Schinkel, A. H. & Borst, P. (1994). The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett*, 354, 263-6.

Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM, (2006). Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 12(19):2979-90.

Solary, E., Droin, N., Bettaieb, A., Corcos, L., Dimanche-Boitrel, M. T. & Garrido, C. (2000). Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*, 14, 1833-49.

Stewart, C. F. (2001). Topoisomerase I interactive agents. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, 19, 85-128.

Summer H, Salan U, Kaight DW, Hoult JR, (1992). Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in leukocytes by feverfew. Involvement of sesquiterpene lactones and other components. *Biochem Pharmacol*, 43:2313-20.

Tamaoki, T., and Nakano, H. (1990). Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Bio/Technology* 8, 732–735.

Tamm, I., Dorken, B. & Hartmann, G. (2001). Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?. *Lancet*, 358, 489-97.

Tellez-Martinez, Taboada J, Gonzalez-Diddi M, (1980). Cytotoxicity of some sesquiterpene lactones “in vitro”. *Arch Invest Med (Mex)*. 11:435-43.

Theâvenod F., Friedmann J. M., Katsen A. D. and Hauser I. A. (2000). Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 1887-1896.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. & Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7735-8.

Tozyo T, Yoshimura Y, Sakurai K, Uchida N, Takeda Y et al, (1994). Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 42:1096-100.

Trippett, T., Schlemmer, S., Elisseyeff, Y., Goker, E., Wachter, M., Steinherz, P., Tan, C., Berman, E., Wright, J. E., Rosowsky, A. & Et Al. (1992). Defective transport as a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 80, 1158-62.

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I, (1987). Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(9):3004-8.

Vandebroek I, Calewaert JB, De jonckheere S, Sanca S, Semo L, Van Damme P, Van Puyvelde L, De Kimpe N, (2004). Use of medicinal plants and pharmaceuticals by indigenous communities in the Bolivian Andes and Amazon. *Bull World Health Organ.* 82(4):243-50.

Van Helvoort, A., Smith, A. J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A. H., Borst, P. & Van Meer, G. (1996). MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, 87, 507-17.

Virchow R. (1847). *Archiv pathol. Anat. Physiol. klin. Med.* 1, 12-13.

Volm, M., Mattern, J. & Samsel, B. (1991). Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in resistant non-small cell lung carcinomas of smokers. *Br J Cancer*, 64, 700-4.

Wang, Q. & Beck, W. T. (1998). Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res*, 58, 5762-9.

Wartenberg M., Fischer K., Hescheler J. and Sauer H. (2000). Redox regulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in multicellular prostate tumor spheroids. *Int. J. Cancer* 85, 267-274.

Wartenberg M., Ling F. C., Schallenberg M., Baumer A. T., Petrat K., Hescheler J. and Sauer H. (2001). Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 276, 17420-17428.

Weiss , G, (1997). *Oncologia Clínica*, capitulo 3, imprenta manual moderno 1997.

Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG, (2002). Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J Biol Chem*. 277(41):38954-64.

Westerhof, G. R., Rijnboutt, S., Schornagel, J. H., Pinedo, H. M., Peters, G. J. & Jansen, G. (1995). Functional activity of the reduced folate carrier in KB, MA104, and IGROV-I cells expressing folate-binding protein. *Cancer Res*, 55, 3795-802.

Wijnholds, J., Delange, E. C., Scheffer, G. L., Van Den Berg, D. J., Mol, C. A., Van Der Valk, M., Schinkel, A. H., Scheper, R. J., Breimer, D. D. & Borst, P. (2000). Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest*, 105, 279-85.

Wijnholds, J., Evers, R., Van Leusden, M. R., Mol, C. A., Zaman, G. J., Mayer, U., Beijnen, J. H., Van Der Valk, M., Krimpenfort, P. & Borst, P. (1997). Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med*, 3, 1275-9.

Woerdenbag HJ, Merfort L, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G et al, (1994). Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and COLO 320 cell lines. *Planta Med*, 60:434-7.

Wojnarowski, J. M. & Konopa, J. (1981). Inhibition of DNA biosynthesis in HeLa cells by cytotoxic and antitumor sesquiterpene lactones. *Mol Pharmacol*, 19, 97-102.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D, (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 366(6456):701-4.

Yamane Y, Furuichi M, Song R, Van NT, Mulcahy RT, Ishikawa T, Kuo MT, (1998).

Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J Biol Chem*. 273(47):31075-85.

Yang, H. H., Ma, M. H., Vescio, R. A. & Berenson, J. R. (2003). Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis. *J Clin Oncol*, 21, 4239-47.

Zhang, D. W., Cole, S. P. & Deeley, R. G. (2001). Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. *J Biol Chem*, 276, 34966-74.

Zhang S, Ong CN, Shen HM, (2004). Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*. 208(2):143-53.

Ziemann C., Burkle A., Kahl G. F. and Hirsch-Ernst K. I. (1999). Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*, 20, 407-414.