



En los últimos años, el tratamiento del cáncer ha evolucionado mucho, se ha conseguido aumentar la supervivencia (por ejemplo, leucemias o linfomas), pero no con la efectividad deseada debido fundamentalmente a una insuficiente actividad terapéutica ó a una excesiva toxicidad. El uso de agentes naturales para prevenir el desarrollo o la repetición de cánceres ha sido aceptado ampliamente como una opción realista para controlar la enfermedad. Muchos compuestos derivados de plantas han sido utilizados como medicamentos. A lo largo de la historia se han identificado infinidad de compuestos en plantas. En la familia Compositae, representada en Canarias por unos 32 géneros, los compuestos químicos que predominan son fundamentalmente lactonas sesquiterpénicas, compuestos que contienen el grupo α -metilen- γ -butirolactona y que han atraído mucha atención durante años.



Lactona tipo germacranolida

Lactona tipo

Lactona tipo

quayanolida

QUE INDUCEN APOPTOSIS Y LA LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DE ORIGEN NATURAL eudesmanolida





Departamento de Química Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología

TESIS DOCTORAL

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DE ORIGEN NATURAL QUE INDUCEN APOPTOSIS Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MAPK EN LÍNEAS **CELULARES TUMORALES** HUMANAS

> **Gledy Negrín Morales** Las Palmas de Gran Canaria



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Y DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado:

Obtención, Preparación y Evaluación Biológica de Fármacos de Origen Marino y Terrestre (Programa Interdepartamental)

TÍTULO

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DE ORIGEN NATURAL QUE INDUCEN APOPTOSIS Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MAPK EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria presentada por la Licenciada: Dª. Gledy Negrín Morales

La Doctoranda

El Director

El Director

D^a Gledy Negrín Morales Dr. Francisco Estévez Rosas Dr. José Quintana Aguiar

Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de Abril de 2013

D. FRANCISCO ESTÉVEZ ROSAS, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA,

Que D^a. Gledy Negrín Morales, licenciada en Biología por la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DE ORIGEN NATURAL QUE INDUCEN APOPTOSIS Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MAPK EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS

Una vez revisada la presente memoria, escrita en castellano, en forma y estructura acorde con el reglamento vigente para la elaboración, tribunal, defensa y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, la encuentra apta para su defensa pública ante tribunal para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende la presente certificación en

Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de Abril de 2013.

Fdo. D. Francisco Estévez Rosas

D. JOSÉ QUINTANA AGUIAR, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA,

Que D^a. Gledy Negrín Morales, licenciada en Biología por la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DE ORIGEN NATURAL QUE INDUCEN APOPTOSIS Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MAPK EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS

Una vez revisada la presente memoria, escrita en castellano, en forma y estructura acorde con el reglamento vigente para la elaboración, tribunal, defensa y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, la encuentra apta para su defensa pública ante tribunal para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende la presente certificación en

Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de Abril de 2013.

Fdo. D. José Quintana Aguiar

Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía.

Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia

Anónimo

Este trabajo ha sido financiado por:

- Ministerio de Educación y Ciencia de España y FEDER. Plan Nacional de Biomedicina. SAF 2004-07928 y SAF 2007-62536.
- Subvención para equipamiento e infraestructura científicotecnológica. Dirección General de Universidades e Investigación. Resoluciones de 21 de diciembre de 2006 y 21 de diciembre de 2007.
- Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. PI 2007/045.
- Instituto Canario de Investigación del Cáncer. RED PRODNATCANCER- 2008 y 2009.

Ilustración de portada: Lactonas sesquiterpénicas y plantas de las que fueron aisladas: Nauplius stenophyllus, Asteriscunolida A, Tanapsina Tanacetum oshanahanii,

Ilustración de contraportada: Microfotografías de una célula HL-60 normal (izquierda) y una célula en apoptosis (derecha) obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.



En primer lugar, deseo expresar mi gratitud al Dr. Francisco Estévez Rosas y al Dr. José Quintana Aguiar, directores de esta tesis, por haber compartido conmigo sus conocimientos y su pasión por la investigación, por su ayuda y dedicación en el trabajo diario y por haber confiado en mí.

Me gustaría agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, personas que han seguido este trabajo de cerca y saben perfectamente lo que conlleva la lectura de esta tesis, por su ayuda diaria. A Fernando por su amistad y ayuda a lo largo de estos años. A Mayte por su ayuda en los experimentos. Gracias a Juan, Olga, Sara R., Cristina, Sara E., y Fabio, por haberme acompañado durante estos años, por su ayuda, amistad y por traer el buen humor a este laboratorio.

Quiero agradecer al Dr. Javier Cabrera, y al Dr. Juan Francisco Loro Ferrer su inestimable ayuda, a la Dra. Mª del Pino Santana, a la Dra. Inmaculada Servanda Hernández, al Dr. Ignacio Javier González, por haber sido un gran apoyo en estos años. Al Dr. Germán Gallardo, Dr. Enrique Castro y Dr. Carlos Tabraue por sus consejos y por haberme ayudado a resolver todo tipo de problemas técnicos. También quiero agradecer su ayuda a José Manuel Pérez y Olivia Rodríguez, del Servicio de Microscopía Electrónica.

También quisiera expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros del CEPA Valsequillo, que durante el tiempo dedicado a esta Tesis me han ayudado, me han ofrecido su amistad, sus palabras de ánimo y sus consejos, han compartido conmigo el día a día con sus momentos buenos y menos buenos, y con todo ello han contribuido a la realización de este trabajo.

Y sobre todo gracias a la persona que me animó a empezar esta aventura, gracias Miguel por todo el cariño, comprensión, ayuda y apoyo

incondicional en los momentos difíciles, gracias por todos los momentos compartidos juntos.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, que siempre me ayudó, incluso desde la distancia. A mis padres, Ramiro y Juana, ya que gracias a su esfuerzo he podido llegar hasta aquí. A mis hermanas, Raiza, Mayte y Yurena, por su paciencia y ayuda cuando ha sido necesaria. A mis sobrinos, José Manuel y Raúl, por haber aportado alegría a nuestra familia.

¡Gracias a todos!



ÍN	DICE	1	
AB	REVIATURAS	7	
FIGURAS Y TABLAS		15	
I.	INTRODUCCIÓN	19	
	1. Cáncer	21	
	1.1.Tratamiento	23	
	1.2. Uso de fármacos de origen natural	24	
	2. Lactonas	25	
	3. Apoptosis4. Maquinaria apoptótica4.1. Las caspasas		
	4.2. Vías de activación de la apoptosis	35	
	4.2.1. Vía extrínseca	35	
	4.2.2. Vía intrínseca	37	
	4.3. Sustratos de las caspasas	40	
	4.4. Inhibidores de las caspasas		
	4.5. Proteínas de la familia Bcl-2		
	4.6. Mecanismos de acción de las MAPK's en la apoptosis celular	49	

OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. Agentes farmacológicos	61
2. Productos y material	62
3. Modelo experimental	66
3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60, JURKAT y MOLT-3, y células de linfoma histiocítico humano U937	66
3.2. Cultivo de células de melanoma	67
3.3. Cultivo de células A549 (cáncer de pulmón humano).	67
3.4. Cultivo de células HL-60 transfectadas con el gen humano Bcl-xL (HL-60 que sobre expresan Bcl-xL), HL-60 con su vector control HL-60 bcl-neo y U937 que sobre expresan el gen humano de bcl-2 (denominadas U937/Bcl-2).	68
	 OBJETIVOS MATERIAL Y MÉTODOS 1. Agentes farmacológicos 2. Productos y material 3. Modelo experimental 3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60, JURKAT y MOLT-3, y células de linfoma histiocítico humano U937 3.2. Cultivo de células de melanoma humanas SK-MEL-1 3.3. Cultivo de células A549 (cáncer de pulmón humano). 3.4. Cultivo de células HL-60 que sobre expresan Bcl-xL), HL-60 con su vector control HL-60 bcl-neo y U937 que sobre expresan el gen humano de bcl-2 (denominadas U937/Bcl-2).

3.5.Células mononucleares de sangre69periférica de origen humano

3.6.	Tratamiento con los compuestos	69
4. Métod	los	70
4.1.	Evaluación de la citotoxicidad in vitro y estudios de la proliferación celular: MTT	70
4.2.	Estudio de la apoptosis celular	71
	4.2.1. Tinción con el fluorocromo bisbenzimida	71
	4.2.2. Fragmentación del ADN	72
	 4.2.3. Cuantificación de las células hipodiploides por citometría de flujo. Cuantificación de la fracción SubG1, G1, S y G2/M mediante el análisis del contenido en ADN 	73
	4.2.4. Determinación de las células apoptóticas mediante el análisis de la externalización de fosfatidilserina	74
	4.2.5. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	75
4.3.	Determinación de la actividad caspasa	76
2	4.4. Inmunodetección de proteínas (western blot)	76

	4.5. Determinación de la generación	79
	de especies reactivas de oxígeno	
	intracelulares.	
	4.6. Análisis de la despolarización de	80
	la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m)	
	5. Métodos estadísticos	81
IV.	RESULTADOS	83
V.	DISCUSIÓN	107
VI.	CONCLUSIONES	119
VII.	BIBLIOGRAFÍA	123
VIII.	ANEXOS	139

ABREVIATURAS

$\Delta \Psi_{\text{m}}$	Potencial de membrana mitocondrial
μΜ	Micromolar
14-3-3	Proteínas adaptadoras y de andamiaje
Ac-DEVD-pNA	N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina
Ac-IETD- <i>p</i> NA	Ac-lle-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
Akt	Quinasa involucrada en la supervivencia celular
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas
Ara-C	1-β-D-arabino-furanosil-citosina
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Asteriscunolida A
ATP	Adenosín trifosfato
Bad	Proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2
Bak	Proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2
Bax	Proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
Bcl-x _L	Proteína anti-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2
Bid	Proteína pro-apoptótica
BIR	Dominio de interacción proteína-proteína presente en las IAP _s
САК	Proteína quinasa constitutiva activadora de CDK
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
CAT	Catalasa
СССР	Carbonil Cianuro m-Clorofenil- Hidrazona
Cdc25	Proteína fosfatasa que participa en la activación del complejo Cdk1/Ciclina B
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclina
CDK1	Proteína quinasa dependiente de ciclina 1
CDK2	Proteína quinasa dependiente de ciclina 2
CDK4	Proteína quinasa dependiente de ciclina 4
CDK6	Proteína quinasa dependiente de ciclina 6
CIP	Proteínas inhibidoras de CDKs

СКІ	Inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas
CoA	Coenzima A
CREB	Factor de transcripción
Сус	Ciclina
DAG	Diacilglicerol
DCF	Diacetato 2´,7´-diclorofluoresceína
DD	Dominio (de) muerte
DED	Dominio efector (de) muerte
DEVD-pNA	Sustrato específico de caspasa -3/-7
DGK	Diacilglicerol quinasa
DISC	Complejo inductor de muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	Proteína quinasa dependiente de ADN
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetra-acético
EGFR	Receptores del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-N,N'-tetraacético
Elk-1	Factor de transcripción nuclear
ERK1/2	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2
EROs	Espécies reactivas de oxígeno
ETO	Etopósido
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Fas	Receptor de muerte, también llamado Apo1 o CD95
FasL	Ligando del receptor (de) muerte Fas
FBS	Suero bovino fetal
GPCR	Receptor asociado a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]
Hsp27	Proteína de choque térmico de 27 kDa
Hsp40	Proteína de choque térmico de 40 kDa
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa

IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IC ₅₀	Concentración de producto que inhibe el crecimiento celular a la mitad
ICAD/DFF45	Inhibidor de la DNasa activada por caspasa.
IP	Yoduro de propidio
JC-1	Yoduro de 5,5',6,6'–tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolocarbocianina
JNK	Proteína quinasa N-terminal de jun
JNKK	Proteína quinasa de las JNK
Jun	Factor de transcripción de la familia de AP-1
МАРК	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína quinasa MAPK/ERK
MEKK	Proteína quinasa de las MEKs
MIF	Factor inhibitorio de la migración
МК	Proteínas quinasas activadas por MAPKs
МКР	MAP quinasas fosfatasas
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular
MOM	Membrana mitocondrial externa
MSK	Proteína quinasa activada por mitógenos y estrés
m-TOR	Proteína quinasa de la familia de la PI3K
MTT	Bromuro de 3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolio
Мус	Factor de transcripción nuclear
MYT1	Factor de transcripción de mielina
Na_3VO_4	Ortovanadato sódico
NAC	N-acetil-L-cisteína
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-κB	Factor nuclear - кВ
p21	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas
р38 ^{марк}	p38 proteína quinasa activada por mitógenos
P53	Proteína supresora de tumores

PA	Plasminógeno tisular
PARP-1	Poli (ADPribosa) polimerasa-1
PBMC	Células mononucleares humanas de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PD98059	Inhibidor específico de la quinasa reguladora MEK1
PHA	Fitohemaglutinina
РІЗК	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PIP ₂	PI 4,5-bisfosfato
РК	Proteína quinasa
РКА	Proteína quinasa A
РКВ	Proteína quinasa B
РКС	Proteína quinasa C
PL	Fosfolipasa
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilfenilo
PP1	Proteína fosfatasa 1
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
pRB	Proteína retinoblastoma
РТР	Poro de transición de permeabilidad
PVDF	Fluoruro de Poli-vinilideno
Raf-1	МАРККК
Ras	Proteína G pequeña
RING	Dominio interacción proteína-proteína
RIP	Proteína de interacción con el receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptores tirosina quinasas
SAPK	MAPK activada por estrés
SB203580	Inhibidor específico de p38 ^{MAPK}
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser	Serina

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Smac	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
SP600125	Inhibidor específico de JNK
SL	Lactona Sesquiterpénica
Та	Tanapsina
TBST	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20
TEMED	N,N,N,N,-tetrametil-etilendiamina
Thr	Treonina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor de muerte de TNF- 🛛
TNFR1	Receptor 1 del factor necrótico tumoral
TRADD	Dominio de muerte asociado al TNFR
TRAF2	Factor asociado a al receptor de TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
U0126	Inhibidor selectivo de las quinasas reguladoras MEK1 y MEK2
UV	Ultravioleta
VDAC	Proteína de canal aniónico dependiente de voltaje
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
z-DEVD-FMK	Inhibidor específico de caspasa-3 y -7
z-IETD-FMK	Inhibidor específico de caspasa-8
z-LEHD-FMK	Inhibidor específico de caspasa-9
z-VAD-FMK	Inhibidor general de caspasas
z-VDVAD-FMK	Inhibidor específico de caspasa-2
z-VEID-FMK	Inhibidor específico de caspasa-6
z-YVAD-FMK	Inhibidor específico de caspasa-1

FIGURAS Y TABLAS

I. Introducción

Figura 1	Reacción de Michael o adición de Michael	26
Figura 2	Clasificación de las lactonas sesquiterpénicas	27
Tabla 1	Enfermedades asociadas a la desregulación de la apoptosis	30
Figura 3	Caspasas apoptóticas en los mamíferos. La flecha roja marca la posición de la primera escisión de activación intra- cadena entre las subunidades largas (~p20) y pequeña (~p10).	33
Figura 4	Activación de las caspasas por procesamiento proteolítico.	34
Figura 5	Vías de activación de la apoptosis	36
Figura 6	Conexión entre la vía intrínseca y la extrínseca	40
Figura 7	Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2	46
Figura 8	Interacciones entre los miembros de la familia Bcl-2	48
Figura 9	Esquema simplificado de las principales cascada de las MAPKs	50

IV. Resultados

- Tabla 2Efecto de las lactonas sesquiterpénicas86sobre la proliferación de células tumorales
humanashumanasFigura 10Estructura química de la Asteriscunolida A87
- y la Tanapsina y plantas de la Asteriscunolida A 87 y la Tanapsina y plantas de las que fueron extraídas. Efecto de la As y la Ta sobre la viabilidad celular de HL-60.

Figura 11	Efecto sobre la proliferación de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) y de células HL-60	88
Figura 12	Asteriscunolida A y Tanapsina inducen la apoptosis en células tumorales humanas: fragmentación.	90
Figura 13	Asteriscunolida A y Tanapsina inducen la apoptosis en células tumorales humanas: microscopía de fluorescencia	92
Figura 14	Estudio de la apoptosis inducida por AS y Ta en células tumorales humanas	93
Figura 15	Estudio, mediante microscopía electrónica, de la apoptosis inducida por AS y Ta en células tumorales humanas	94
Figura 16	Implicación de las caspasas en la inducción de apoptosis por AS y Ta en células de leucemia humana HL-60 y en células de melanoma SK-MEL-1	96
Figura 17	AS y Ta reducen el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi_m$).	98
Figura 18	AS y Ta inducen apoptosis en células de leucemia humana y en células de melanoma SK-MEL-1 con implicación de las caspasas	99
Figura 19	AS induce muerte celular a través de mecanismo dependiente de caspasa	100
Figura 20	AS induce la fosforilación de MAPKs	103
Figura 21	AS induce la generación de ROS.	105

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Bajo la denominación cáncer se incluyen un conjunto de enfermedades caracterizadas por una producción anómala de un determinado tipo celular del organismo. Estas células tienen una velocidad de crecimiento y división más allá de los límites normales, por lo que progresivamente van invadiendo el organismo.

El cáncer constituye una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. A escala mundial, es la principal causa de muerte y se prevé que alcance los 13,1 millones en 2030 [1]. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte por enfermedades no transmisibles (48%), del cáncer (21%) y de las enfermedades seguidas respiratorias crónicas (12%) [2]. En Europa causa el 20% de las muertes, con más de 3 millones de casos nuevos y 1,7 millones de muertes cada año. En España el cáncer ha adquirido tal magnitud que se sitúa como la primera causa de muerte (la primera en varones y la segunda en mujeres) y es por tanto un problema de salud prioritario. Uno de cada tres varones y una de cada cuatro mujeres se diagnosticarán de cáncer a lo largo de su vida. Cada año la incidencia del cáncer aumenta en España, pero también disminuye su mortalidad, lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento [3].

Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer. La mayoría toman el nombre del órgano o tejido en donde empiezan pudiendo agruparse en distintas categorías:

- *Carcinoma*: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.

 Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.

 Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.

 Linfoma y mieloma: cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.

- Cánceres del sistema nervioso central: cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

En la mayoría de estos tipos de cáncer, las células, al dividirse de forma incontrolada, forman una masa que recibe el nombre de tumor. Pero hay otros tipos de cáncer, como la leucemia, que no forman tumor.

La leucemia consiste en la proliferación incontrolada de una población anómala de células de la sangre. Estas células anómalas infiltran la médula ósea, impidiendo la producción de las restantes células normales, e invaden la sangre y otros órganos. La leucemia puede afectar uno de los dos tipos principales de glóbulos blancos: las células linfoides o las células mieloides. Cuando son las células linfoides las afectadas, el trastorno se denomina leucemia linfoide o linfoblástica. Si las células afectadas son las mieloides, la enfermedad se denomina leucemia mieloide.

1.1. Tratamiento

años, el tratamiento del cáncer En últimos ha los evolucionado mucho, se ha conseguido aumentar la supervivencia (por ejemplo, leucemias o linfomas), pero no con la efectividad deseada debido fundamentalmente a una insuficiente actividad terapéutica ó a una excesiva toxicidad. Estos problemas sólo podrán solucionarse seleccionando las dianas terapéuticas y mediante meiores el uso de biomarcadores para identificar a los pacientes apropiados para recibir cada tratamiento [4].

El gran avance se ha realizado con el conocimiento de la muerte celular por apoptosis, mecanismo mediante el cual las células son eliminadas con el propósito de controlar la proliferación celular ó en respuesta a un daño en el ADN. Este conocimiento es el que nos proporciona las líneas a seguir en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, induciendo la muerte de las células tumorales de forma específica o sensibilizándolas frente a los tratamientos antitumorales actuales
Las neoplasias hematológicas forman uno de los grupos de cáncer más estudiados. En 1980 se descubrió que los glucocorticoides inducen fragmentación del ADN y apoptosis en los timocitos. V desde entonces el sistema hematopoyético ha desvelado numerosas situaciones en las que los mecanismos de muerte celular resultan clave en el control de la homeostasis. El análisis de este mecanismo ha proporcionado nuevas dianas terapéuticas eficaces en el tratamiento de este y otros tipos de cáncer [5]. Entre las neoplasias hematológicas, la leucemia mieloide crónica es una de las más estudiadas, y constituye uno de los mejores ejemplos de cómo una enfermedad puede ser tratada mediante una terapia dirigida a una diana molecular específica.

El esfuerzo realizado en la identificación de nuevas dianas terapéuticas ha tenido en los últimos años múltiples frutos, ejemplos de ello son: el Bortezomib, tratamiento de elección en mieloma múltiple, el Trastuzumab de aplicación en cáncer de mama, ó el Cetuximab que se utiliza en el tratamiento del cáncer de colon metastásico con sobreexpresión de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [6].

1.2. Uso de fármacos de origen natural

Muchos compuestos derivados de plantas han sido utilizados como medicamentos, ya sea en su forma original o semisintético. Metabolitos secundarios de las plantas también pueden servir como precursores de drogas, prototipos de medicamentos y sondas farmacológicas. En la actualidad encontramos fármacos a partir de plantas, que ya son medicamentos aprobados y compuestos actualmente en ensayos clínicos. Hay también varios extractos de plantas o "fitomedicamentos" en ensayos clínicos para el tratamiento de diversas enfermedades.

A lo largo de la historia se han identificado infinidad de compuestos en plantas. En la familia Compositae (Asteraceae), representada en Canarias por unos 32 géneros, los compuestos químicos que predominan son fundamentalmente lactonas sesquiterpénicas.

Debido a su rango apreciable de actividades biológicas, incluidas las propiedades antitumorales, es por lo que la lactonas sesquiterpénicas se hacen merecedoras de la atención de la investigación farmacológica.

En el futuro, en general los compuestos derivados de plantas seguirán siendo un aspecto esencial para acelerar el descubrimiento de nuevos tratamientos [7].

2. Lactonas

En los últimos años, el uso de agentes naturales para prevenir el desarrollo o la repetición de cánceres ha sido aceptado ampliamente como una opción realista para controlar la enfermedad. Los compuestos que contienen el grupo α -metilen- γ -butirolactona han atraído mucha atención durante años ya que es un potente receptor para nucleófilos que pueden inhibir los enzimas que contienen centros nucleofílicos esenciales, como grupos amino (- NH₂) y tiol (- SH)[8].

Las lactonas sesquiterpénicas, componentes activos de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae, son fitoconstituyentes de bajo peso molecular, de carácter lipofílico, incoloros y amargos. Se obtienen de la parte aérea de las plantas, constituyen un grupo de terpenoides C-15 con un anillo lactónico y contienen el agrupamiento α -metilén- γ -lactona. Los compuestos con este grupo ejercen su efecto actuando como agentes alquilantes a través de una adición tipo Michael [9] (Figura 1.1).



Figura 1: Reacción de Michael o adición de Michael

El responsable de las actividades biológicas incluyendo la citotoxicidad frente a células tumorales, es la interferencia en las funciones de las proteínas por la formación de enlaces entre las lactonas sesquiterpénicas y los grupos sulfhidrilos (-SH) de dichas macromoléculas [10].

Las lactonas sesquiterpénicas presentan estructuras que parecen tener un origen común, habiéndose formado en procesos biogenéticos estrechamente relacionados y que permiten proporcionar caracteres químicos útiles dentro de la tribu. Así podemos clasificarlas en tres grandes grupos: lactonas tipo *germacranolida*, lactonas tipo *eudesmanolida* y lactonas tipo *guayanolida*. (Figura 2).



Figura 2. Clasificación de las lactonas

3. Apoptosis

La muerte celular puede producirse a través de dos mecanismos: necrosis y apoptosis. En general, la necrosis es

un tipo de muerte celular pasiva que se deriva en respuesta a disfunciones celulares agudas (procesos de toxicidad) que conllevan la liberación al entorno del contenido intracelular y a la activación de una respuesta inflamatoria. El término apoptosis fue utilizado por primera vez en un artículo ya clásico de Kerr, Wyllie, y Currie en 1972 para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular. La apoptosis es un proceso de muerte celular activo y muy regulado que tiene lugar durante el desarrollo, y en diferentes contextos fisiológicos como procesos inmunológicos o en respuesta a lesiones celulares. Se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos, posteriormente fagocitados por los macrófagos, que evitan la liberación del contenido celular y la activación de una respuesta inflamatoria [11].

Las células normales tienen capacidad de división de forma limitada con un número finito de divisiones. Al final de su vida útil, mueren por apoptosis o entran en un estado de irreversible del crecimiento parada conocido como senescencia replicativa. La vida útil de una célula es un equilibrio entre las respuestas de la célula hacia la supervivencia o hacia la muerte mediante un proceso complejo y dinámico como consecuencia del balance de diferentes estímulos intrínsecos y ambientales [11]. Así, una desregulación del proceso de apoptosis, ya sea por déficit o por exceso, puede desencadenar un gran número de patologías. En la Tabla 1 encontramos algunas de las patologías asociadas a la desregulación del proceso de apoptosis. Una resistencia de las células a la apoptosis permite la persistencia de células autorreactivas o mutadas, que pueden provocar desórdenes como el cáncer. En cambio, en las situaciones donde hay un exceso de apoptosis, se producen diferentes patologías crónicas como las enfermedades neurodegenerativas o el SIDA.

Durante el proceso de apoptosis en la célula se producen una serie de cambios, tanto morfológicos como bioquímicos.

- Cambios morfológicos.

Durante la fase temprana de la apoptosis se puede observar una contracción celular y la picnosis. La picnosis es el resultado de la condensación de la cromatina y éste es el rasgo más característico de la apoptosis [12]. La condensación se inicia periféricamente a lo largo de la membrana nuclear, formando una media luna o estructura de anillo. Durante las etapas posteriores de la apoptosis se condensa más, y finalmente se rompe dentro de una célula con una membrana celular intacta, una característica descrita como cariorrexis [13].

En la membrana plasmática se van formando evaginaciones, el núcleo se fragmenta y se forman cuerpos apoptóticos, fragmentos de la membrana celular que incluyen citoplasma con orgánulos densamente empaquetados con o sin fragmentos nucleares.

ENFERMEDADES POR	ENFERMEDADES POR
DÉFICIT DE APOPTOSIS	EXCESO DE APOPTOSIS
Cáncer	Inmunodeficiencias
Leucemia Linfática	SIDA
Crónica	
Enfermedades	Enfermedades
autoinmunes	neurodegenerativas
Lupus eritromatoso	crónicas
Glomerulonefritis	Alzheimer, Parkinson,
Diabetes	Esclerosis lateral
	amiotrófica, Retinitis
	pigmentaria.
Infecciones virales	Síndromes
Herpes	mielodisplásicos
Adenovirus	Aplasia medular
	Enfermedades
	degenerativas agudas
	Daño isquémico, Infarto de
	miocardio, Daño de
	reperfusión, Accidente
	cerebrovascular, Hepatitis
	inducida por tóxicos
	(alcohol), Pancreatitis,
	Tiroiditis
	I Contraction of the second

Tabla 1. Enfermedades asociadas a la desregulación de la apoptosis

Estos cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por macrófagos o por células vecinas debido a la exposición de marcadores de fagocitosis en la superficie celular como la fosfatidilserina, evitando la exposición del material intracelular al sistema inmune que podría desencadenar una respuesta inflamatoria [12].

- Cambios bioquímicos.

Se produce hidrólisis de proteínas, jugando un papel esencial las caspasas, y rotura del ADN en fragmentos de 180 a 200 pares de bases. También se produce la externalización de fosfatidilserina, anexina I y calreticulina que actúan como marcadores de fagocitosis. Aumentan los niveles de calcio iónico libre y hay una deshidratación celular. Hay una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y de la asimetría en la composición de la membrana plasmática [14,15]. Este proceso culmina con el reconocimiento y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos. El hecho de que la membrana plasmática se mantenga íntegra durante todo el proceso de apoptosis es de vital importancia para los organismos, ya que de esta manera evita el vertido del material celular en el espacio intercelular, que provocaría una reacción inflamatoria [16]

4. Maquinaria apoptótica

4.1. Las Caspasas

Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas (Cysteine-Aspartate-Proteases) [17], caracterizadas por presentar un residuo de cisteína mediador de la ruptura de otras proteínas y que generalmente se sintetizan como zimógenos o formas precursoras inactivas.

Hasta ahora, 14 caspasas (caspasa-1-14) han sido identificadas, de las cuales 12 se encuentran en las células humanas [15,18] Todas ellas se encuentran en forma de zimógenos o proenzimas con una estructura bien definida (Figura 3):

• un dominio N-terminal muy variable tanto en su secuencia como en su longitud, con funciones de regulación y activación,

• una región catalítica formada por dos dominios, uno grande (20 kDa) y otro pequeño (10 kDa), que darán lugar a las dos subunidades de la enzima una vez activada [19].



Figura 3. Caspasas apoptóticas en los mamíferos. La flecha roja marca la posición de la primera escisión de activación intracadena entre las subunidades largas (~p20) y pequeña (~p10).

La familia de las caspasas se ha clasificado en tres grupos, las caspasas no apoptóticas (caspasa-1, -5 -4,), las caspasas apoptóticas iniciadoras (caspasas-2, -8, -9, -10), y las caspasas apoptóticas efectoras, (caspasas-3, -6, -7), activadas por alguna de las caspasas iniciadoras e hidrolizan numerosas proteínas celulares [20,21]. Las procaspasas -8 y -10 contienen en sus dominios repeticiones de una secuencia de interacción proteína-proteína llamada dominio efector de muerte (DED), mientras que las procaspasas -2, y -9 contienen dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs); estos dominios facilitan la interacción con proteínas que contienen los mismos dominios [22] (Figura 3).

La activación de las caspasas efectoras se inicia por un procesamiento proteolítico entre sus dominios mayor y menor (Figura 4), que puede ser llevado a cabo por ellas mismas, o por otras caspasas. La proteólisis provoca un correcto posicionamiento del sitio activo y, a su vez, una correcta alineación de los residuos que interaccionan con los sustratos, formando un heterodímero y dando lugar a una conformación activa [20,22].



Figura 4. Activación de las caspasas por procesamiento proteolítico. El proenzima es escindido en las secuencias de corte de caspasas y dos subunidades grandes se combinan con dos pequeñas formando así el enzima activo.

Estudios recientes han revelado que la escisión no es ni requerida ni suficiente para la activación de las caspasas iniciadoras. Los zimógenos de las caspasas iniciadoras existen dentro de la célula como monómeros inactivos. Estos monómeros zimógenos requieren la dimerización para asumir una conformación activa, y esta activación es independiente de la escisión.

La dimerización se produce en los complejos activadores multiproteicos, donde los zimógenos son reclutados en virtud de su dominio N-terminal de reclutamiento. El complejo activador implicado depende del origen del estímulo de muerte, que se clasifican como extrínseca o intrínseca.

4.2. Vías de activación de la apoptosis

En mamíferos se han descrito dos vías principales de apoptosis, que requieren diferentes caspasas-iniciadoras, pero que convergen a nivel de las caspasas-efectoras activadas [11]. Una es la activada por los receptores de superficie llamados "Receptores de la muerte" [23,24] y la otra, es la inducida por diferentes situaciones de estrés celular que inducirá la salida de factores apoptóticos mitocondriales, y donde tienen mucha importancia los miembros de la familia de Bcl-2, denominados "Los guardianes de la integridad mitocondrial" [25,26] (Figura 5).

4.2.1. Vía extrínseca: receptores de muerte celular.

La vía extrínseca o de los receptores de muerte se activa cuando un ligando se une a sus correspondientes receptores.



Figura 5: Vías de activación de la apoptosis

Se han identificado dos familias de receptores con estas características: los receptores de muerte de la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), que incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF, TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand)/Apo-2L (TRAILR1/DR4, TRAIL-R2/DR5).

La vía apoptótica desencadenada por la activación de los receptores de la muerte, provoca la formación del complejo de señalización inductor de muerte, llamado DISC (deathinducing signaling complex). Este complejo DISC está formado por la unión de las proteínas adaptadoras FADD (Fas-associated death domain, dominio muerte asociado a Fas) y TRADD (TNFR1-associated death domain protein) mediante su dominio de muerte, DD (death domain) y por interacciones homólogas, recluta en el DISC a la procaspasa-8, que también contiene un DED. Después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa (caspasa iniciadora) es liberada del DISC al citoplasma, formando un heterotetrámero de 2 subunidades pequeñas y 2 grandes [27].

4.2.2. Vía intrínseca: inicio de la señal de apoptosis en la mitocondria.

La vía intrínseca o mitocondrial se ejecuta en respuesta a estímulos externos, agentes tóxicos o daño en el ADN. En este proceso, las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, que darán lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consiguiente liberación de moléculas como citocromo *c* [11,28] que, una vez en el citosol, se asocia con Apaf-1 (apoptotic protease activating factor, factor activador de proteasa apoptótica) posibilitando así el reclutamiento del proenzima de la caspasa-9, vía el dominio homólogo de reclutamiento CARD (caspase recruitment domain, dominio de reclutamiento de caspasas), formando el llamado apoptosoma, complejo que permitirá la activación de la

caspasa-9 y su actuación sobre las caspasas efectoras, como la caspasa-3 y -7 [29,30], que inician la proteólisis de los diferentes sustratos celulares. Otra de las moléculas liberadas son, por un lado, Smac/DIABLO que se une a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) impidiendo su unión a las caspasas [31], y por otro, la endonucleasa G, responsable de la degradación del ADN que se transloca al núcleo tras su liberación de la mitocondria y está involucrada en la fragmentación del ADN y junto con exonucleasas y ADNasa I, producen el típico patrón en escalera [32].

Como consecuencia se rompe la cadena de transporte de liberan iones superóxido [33,34] y se electrones, se hiperpolariza la membrana mitocondrial interna (que puede terminar con la dilatación de la matriz y la ruptura de la membrana). Además, se abren los poros mitocondriales permitiendo la entrada de agua y solutos a la matriz, produciéndose un choque osmótico y la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), que se transloca al núcleo y provoca la condensación y rotura del ADN en fragmentos de alto peso molecular (50 Kb). A nivel de la membrana celular, AIF activa a la flipasa e inhibe a la translocasa haciendo que la fosfatidilserina que en células normales se encuentran en la cara interna de la membrana se exponga ahora al exterior [35]. La actividad de AIF es inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2, pero no por los inhibidores de caspasas, es decir su efecto es indedependiente de las caspasas [36]. También se induce la activación de Bax que puede formar un canal en la membrana mitocondrial.

La apoptosis desencadenada por la activación de los receptores de la muerte, y la vía mitocondrial controlada por los miembros de la familia de Bcl-2, pueden estar conectadas a través del miembro proapoptótico Bid [37], que pertenece al subgrupo de proteínas con un solo dominio BH3, dentro de la gran familia de Bcl-2. La inducción de la vía extrínseca de muerte induce la activación de la caspasa-8, que es capaz de proteolizar a Bid, generando una forma truncada (tBid), que puede translocarse a la mitocondria e inducir la salida del citocromo *c*, amplificando la cascada apoptótica. (Figura 6).

Las células se pueden clasificar según las vías apoptóticas activadas en la estimulación de los receptores de la muerte. En las células de tipo I, el procesamiento de la caspasa-8 es suficiente para activar la cascada de caspasas У desencadenar el proceso de muerte, independientemente de la vía mitocondrial y de los miembros de la familia de Bcl-2. En las células tipo II, la activación de las caspasas efectoras depende de la translocación de Bid a la mitocondria y de la activación de la vía intrínseca.



Figura 6: Conexión entre la vía intrínseca y la extrínseca

4.3. Sustratos de las Caspasas

Un elevado número de proteínas son proteolizadas por las caspasas durante el proceso de apoptosis. En los últimos años se han identificado muchos sustratos de caspasa importantes. El primer sustrato de caspasas descrito fue la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) [38]. La endonucleasa corta el ADN genómico entre los nucleosomas, para generar fragmentos de ADN con longitudes correspondientes a números enteros de aproximadamente múltiples 180 pares de bases. La presencia de esta escalera de ADN se ha utilizado como marcador de la muerte celular apoptótica[39].

En células no apoptóticas, la PARP se une al DNA que presenta daños en sus cadenas, dando lugar a la formación de polímeros de ADP-ribosa que se unirán a diferentes proteínas como las topoisomerasas I y II, histonas, DNA polimerasa y DNA ligasa2, como a la propia PARP. Esta unión inhibe a algunas de estas proteínas inhibiendo la replicación y transcripción del DNA y permitiendo la unión de enzimas de reparación del DNA mediante la separación de las histonas del DNA. Por ello, la PARP ha sido implicada en los mecanismos de reparación del DNA [40,41].

En las fases finales del proceso apoptótico, la caspasa-3 proteoliza la PARP generando un fragmento de 85 kDa, que contiene el dominio catalítico (C-terminal), y un fragmento de 16 kDa, que contiene el dominio de unión al DNA (N-terminal) [38] El resultado final de esta proteólisis es impedir la reparación del DNA dañado y permitir que la célula entre en apoptosis.

Se conocen más de 200 sustratos hidrolizados por las caspasas y pueden clasificarse en:

Proteínas citoplasmáticas: actina, gelsolina, componentes de unión a β-cateninas.

• **Proteínas nucleares:** lamina-A, B, receptor de lamina B, proteínas nucleares del aparato mitótico,

proteínas asociadas a ribonucleoproteínas, proteínas de unión a la estructura del cromosoma.

• **Proteínas relacionadas con el metabolismo y reparación del ADN:** PARP, DNA-PKcs, proteínas de replicación del ADN, ADN-topoisomerasas.

• **Proteínquinasas:** PKC y sus isoformas, MAPK, ERK, Akt, Wee1.

• *Proteínas implicadas en las vías de señalización:* citoquinas, pro-interleuquinas y fosfolipasas.

• **Proteínas del ciclo celular y proliferación celular:** p21, p27, pRb, ubiquitinas [19]

4.4. Inhibidores de caspasas.

Debido a que el proceso de proteólisis es irreversible, la activación de las caspasas en las células está finamente regulada transcripcionalmente y por modificaciones post-transduccionales [13]. Para evitar que se produzcan respuestas fisiológicas no deseadas, las células emplean tres estrategias de copia de seguridad: la inhibición de caspasas, la degradación de las caspasas, y los inhibidores de los receptores señuelo (decoy receptors).

La solución natural para la inhibición de proteasas es a menudo tomar ventaja del punto de unión al sustrato, ocupándolo con un segmento que imita un buen sustrato. Tales ejemplos se encuentran en algunos virus, donde los inhibidores de caspasas actúan bloqueando las defensas del huésped para controlar la infección [14].

Una vez activadas, también existen mecanismos de regulación de su degradación a nivel del proteosoma [42].

La acción de las caspasas está regulada a varios niveles, e incluyen el bloqueo de la activación de las caspasas en DISC, así como la inhibición de la actividad enzimática. Existen al menos dos tipos distintos de reguladores de caspasas: IAP y FLIP [19].

IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins, proteínas inhibidoras de apoptosis): constituyen una familia de factores proteicos que son liberados por la mitocondria y ejercen su acción inhibiendo directamente a las caspasas. Son las únicas proteínas endógenas que regulan tanto la actividad de caspasas iniciadoras (de la caspasa-9 pero no la -8), como efectoras (caspasas-3 y -7). En humanos se han identificado varios miembros de la familia de la IAP: c-IAP1, c-IAP2, [43], XIAP [44], NAIP [45], survivina [46], apollon [47], ML-IAP [48] [49] y ILP-2 [50].

Todas ellas pueden presentar:

 al menos un dominio **BIR**, mediante el que se unen a las caspasas inhibiendo su acción, dominios **RING**, que actúan como una ubiquitín-ligasa induciendo su autodegradación y la degradación de la caspasa unida a él por el proteosoma,

 dominios CARD, que pueden permitir la regulación de la degradación de las caspasas por interacción entre dominios de este tipo.

Dentro de esta familia de proteínas, la mejor estudiada es XIAP. Su estructura está formada por tres dominios BIR y un dominio RING, el dominio BIR2 inhibe las caspasas -3 y -7, mientras que el dominio BIR3 inhibe la caspasa-9. Los antagonistas de XIAP pueden unirse a BIR2, bloquear su efecto inhibidor [51] y activar directamente a la caspasa-3, que a su vez activa a las caspasas -8 y -9 como consecuencia del bucle de amplificación de la señal apoptótica. Además, el efecto apoptótico inducido por el antagonista de XIAP sólo se observa en células tumorales, debido a que sus niveles de expresión son mayores que en las células normales.

La proteína survivina sólo posee un dominio BIR, y aunque fue considerada como una IAP, no inhibe a las caspasas directamente, sino que es una proteína nuclear importante en la mitosis celular [19].

FLIP (**FL**ICE/caspase 8 **I**nhibitory **P**rotein) posee dos regiones homólogas a los dominios efectores de muerte (DED) en su extremo amino, asemejándose a la estructura de las caspasas -8 y -10. Esto le permite impedir la

formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), y también mediante la unión a la caspasa-8 por sus dominios DED formar un heterodímero caspasa-8/c-FLIPL, que promueve la proteólisis parcial de ambos. Esta proteólisis incompleta mantiene a las dos proteínas unidas al receptor, impidiendo la liberación de la forma activa de la caspasa-8 [52].

Las caspasas pueden, además ser modificadas covalentemente por fosforilación. Por ejemplo, Akt, proteína quinasa involucrada en la supervivencia celular y mediador de PI3K, fosforila el centro activo de la caspasa-9 inhibiendo su función [53].

4.5. Proteínas de la familia Bcl-2

Una de las vías más importantes en la regulación de la apoptosis se lleva a cabo por la familia de proteínas Bcl-2. Estas proteínas juegan un papel central en la regulación de la muerte celular participando en la apoptosis [54]. (Figura7)

El primer miembro y que da nombre a la familia, Bcl-2, fue clonado a partir del punto de corte en la translocación cromosomal t(14:18), presente en el 85% de los linfomas foliculares de células B humanas, y se caracteriza por inhibir la muerte celular por apoptosis [55]. Posteriormente, fue identificada toda una familia de proteínas relacionadas por su homología de secuencia y su participación en el control de la apoptosis.



Figura 7: Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2

En humanos se han descrito al menos 20 miembros de esta superfamilia. Todos ellos se caracterizan por la presencia de, al menos, uno de los cuatro dominios presentes en la proteína Bcl-2, conocidos como BH1-4 (Bcl-2 homology 1-4). Los distintos miembros de esta superfamilia se dividen en miembros antiapoptóticos, proapoptóticos y proteínas "solo BH3" (Figura 8).

<u>Antiapoptóticos</u>: Bcl-2, proteína integral de membrana,
[56,57] y sus homólogos más cercanos, Bcl-X_L y Bcl-w, que

solo se insertan en las membranas después de una señal citotóxica [58] y **Mcl-1**, localizado en la mitocondria y que también parece estar implicado en la regulación del ciclo celular [59]. Todos estos factores comparten con Bcl-2 una actividad anti-apoptótica y una homología estructural en cuatro regiones α -hélice homólogas a Bcl-2, BH1 - BH4.

<u>Proapoptóticos</u>: **Bax** y **Bak**, presentes en multitud de tejidos y **Bok**, cuya expresión parece estar limitada a tejidos reproductivos. Estos factores comparten con Bcl-2 solo los dominios BH1, BH2 y BH3. La activación simultánea de Bax y Bak, pero no su inactivación individual, bloquea la apoptosis en muchos tejidos [60,61].

- <u>Proteínas "solo BH3"</u>: **Bad**, se activa mediante desfosforilación facilitando su translocación a la mitocondria y su interacción con **BcI-X**_L, **Bid**, proteína que interrelaciona las dos vías apoptóticas, la activación de caspasa-8 induce la hidrólisis de Bid formando un fragmento truncado tBid que se transloca a la membrana mitocondrial e induce la liberación de citocromo *c*. **Bik**, y Bid pueden actuar sobre la mitocondria, induciendo la liberación de citocromo *c* [62]. **Bim**, y Bid, inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial en un modelo dependiente de Bax y/o Bak, induciendo su oligomerización [55].



Figura 8. Interacciones entre los miembros de la familia Bcl-2

Estos factores sólo poseen el dominio BH3 necesario y suficiente para promover la apoptosis [25].

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de forma dinámica para regular la apoptosis, mediante homo/heterodimerización 0 mediante fosforilación V desfosforilación. Los miembros que sólo poseen el dominio BH3, necesitan heterodimerizar para ejercer su acción, uniéndose a las proteínas anti-apoptóticas. Además, los miembros pro-apoptóticos como Bax pueden heterodimerizar con los anti-apoptóticos como Bcl-2 ó Bcl-xL y bloquear su actividad anti-apoptótica. Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas de la muerte celular, y cuando Bax está en exceso la célula está abocada a entrar en apoptosis. Por tanto la relación de los niveles de expresión entre los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 determina el destino celular [55].

La pérdida de la regulación sobre los miembros de la familia Bcl-2 está estrechamente vinculada a la tumorogénesis, los miembros anti-apoptóticos parecen funcionar como oncoproteínas y los pro-apoptóticos como supresores de tumores.

4.6. Mecanismos de acción de las MAPKs en la apoptosis celular

La red de señalización celular confiere a la célula los mecanismos necesarios para recibir y responder de manera adecuada a estímulos externos. Las vías de señalización dirigidas por las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) juegan un papel fundamental en la transducción de señales en la célula a través de cascadas de fosforilación en serie [63], modulando eventos cruciales como pueden ser, la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular, la regulación del desarrollo embrionario, la migración celular, la apoptosis o la diferenciación celular [64,65]. Son proteínas caracterizadas como quinasas de residuos de serina / treonina dirigidas a prolina (Pror-Leu-Ser/Thr-Pro) [66,67].

En los mamíferos, hay más de una docena de genes de MAPKs pero al menos tres MAPKs diferentes están implicadas en la modulación de vías de transducción de señales en células de mamíferos:

 ERK1/2, proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares

- JNK/SAPK, proteínas quinasas activadas por estrés/quinasas N-terminal de c-Jun

 p38 MAPK. proteínas quinasas activadas por mitógenos p38.



Figura 9: Esquema simplificado de las principales cascadas de las MAPKs

Cada vía de señalización MAPKs consiste en un módulo de tres proteínas quinasas: una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), la cual fosforila y activa una MAPK quinasa (MAPKK) que a continuación fosforila y activa a una MAPK. Entre las MAP quinasas, las ERK1/2 son principalmente activadas por mitógenos y por factores de crecimiento, mientras que p38-MAPK y JNK son activadas principalmente por estímulos de estrés ambientales (UVA, radiaciones ionizantes, calor, ROS, etc.) provocando la apoptosis celular. (Figura 9).

La vía de activación de ERK1/2 (p42/44 MAPK) está bien caracterizada, produciéndose principalmente a través de p21Ras/Raf/MEK en respuesta a factores de crecimiento y/o a la unión de integrinas a moléculas específicas de la matriz extracelular [68], regulando la maguinaria gue controla el ciclo celular. Actualmente está demostrado el hecho de que la activación de estos receptores está asociada con una inducción de ciclina D1 y con una disminución en los niveles inhibidores endógenos de proteínas de quinasas dependientes de ciclina (CDKs), como p21 (conocido también como WAF1 o CIP1) y p27 (denominado a veces KIP1) [69,70]. Su función sobre estas proteínas parece estar mediada por distintos factores de transcripción, en el caso de CDK1 a través de AP-1 [71], aunque también pueden activar a ELK1, ETS, STAT1,3 y PPARy en su función de regular la progresión del ciclo celular, la movilidad celular o la expresión génica.

Su papel en la actividad mitocondrial ha sido investigado en diversos estudios usando inhibidores farmacológicos que han cómo puede modular indicado ERK1/2 funciones mitocondriales, particularmente las asociadas con la muerte celular. La activación de ERK promueve la función ATPsintasa mitocondrial en astrocitos deprivados de glucosa manteniendo el potencial de membrana mitocondrial y previniendo la liberación de citocromo c [72], lo que sugiere que además de jugar un papel inductor en la división celular, participa en la labor de mantener activos los mecanismos implicados en la supervivencia celular.

JNK (p46/p54 MAPK) y p38-MAPK son intermediarios claves en las señales de estrés provocadas por una gran variedad de estímulos como radiación UV, radiación γ , choque térmico, estrés osmótico o citoquinas inflamatorias [73]. Las JNKs son activadas por las quinasas de especificidad dual MKK4/SEK1 y MKK7 [74,75], mientras que p38-MAPK son activadas por MKK3/6 [76]. Una vez activada, la JNK media la fosforilación y activación de factores de transcripción como c-jun, ATF-2 y Elk1 [77,78], mientras p38-MAPK igualmente está implicada en la regulación transcripcional de ATF-2, Elk1, MAX, CHOP/GADD153 y CREB [78-80] y en la activación de MAPKAP2/3 quinasas que a su vez fosforilan proteínas de choque térmico pequeñas.

Xia et al. fueron los primeros en describir efectos opuestos sobre la apoptosis de los miembros de las MAPKs, ERK1/2

frente a SAPK/JNK y p38/HOG. Encontraron que mientras JNK y p38 se activaban en el proceso apoptótico inducido por deprivación de suero y del factor de crecimiento nervioso (NGF) en células de feocromocitoma de rata (PC12), las ERK1/2 se inhibían [81]. Esta respuesta diferencial de las MAPKs ha sido ampliamente descrita en la inducción, por múltiples estímulos, de la apoptosis celular, incluyendo el tratamiento de distintos tipos celulares con ceramida, óxido nítrico, FAS, TNF α , H₂O₂, UV o Rayos X [82-85]. Kim et al, en un trabajo reciente demuestran que la activación de JNK y p38-MAPK, en células de hepatoma humano HepG2 por H₂O₂, UV o etopósido, induce la fosforilación en Ser87-Pro y/o Thr167-Pro de la proteína pro-apoptótica BAX, provocando su translocación mitocondrial y posterior muerte celular por apoptosis [86]. Si bien, la regulación y el mecanismo de acción de p38-MAPK en su papel como proteína proapoptótica inducida por activación del receptor de muerte (receptor de FAS) parece ser distinta. En estudios realizados con células T CD8+, el tratamiento con el ligando FAS induce la activación de p38-MAPK [87]. Los autores de este trabajo, además de proponer que la activación de p38-MAPK es fundamental para la apoptosis inducida por FAS, demuestran que una vez p38-MAPK es activada, ésta es capaz de fosforilar Bcl-x_L y Bcl-2, previniendo la acumulación proteínas antiapoptóticas la de estas en membrana mitocondrial.

Los efectos de JNK sobre la mitocondria a menudo implican una estimulación de la apoptosis celular. Ya que produce una inhibición de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, de provocando la pérdida potencial de membrana mitocondrial y la consecuente liberación de citocromo c al citoplasma [88]. JNK, además, media la liberación de SMAC/DIABLO promoviendo la actividad de la caspasa 9 [85]. Sin embargo, la señalización mediada por JNK puede antagónicas, respuestas promoviendo la causar supervivencia celular bajo ciertas condiciones y en ciertos tipos celulares. En experimentos en los que se han transfectado células con mutantes, dominantes negativo, de MEKK1, SEK1 o JNK y tratado posteriormente con TNF se ha visto que la ausencia de actividad JNK no previene la apoptosis.



Estos últimos años, el uso de agentes naturales para prevenir el desarrollo o la repetición de cánceres ha sido aceptado extensamente como opción realista para controlar la enfermedad.

Los compuestos que contienen el grupo α -metilen- γ butirolactona han sido el centro de atención durante años. Este grupo es una estructura funcional importante en una amplia gama de productos naturales, particularmente en lactonas sesquiterpénicas citotóxicas.

El objetivo de este estudio es:

 Examinar los efectos de lactonas sesquiterpénicas, extraídas de plantas endémicas de las Islas Canarias, sobre la viabilidad celular en varias líneas tumorales humanas.

2. Caracterizar las vías de señalización implicadas en la apoptosis desencadenada por estos compuestos.

MATERIAL Y MÉTODOS
1. Agentes farmacológicos

Los estudios correspondientes al aislamiento, elucidación estructural y derivatizaciones de los productos naturales fueron llevados a cabo en el Grupo de Investigación Química Orgánica I, del departamento de Química de la ULPGC, bajo la dirección del Dr. Jorge Triana Méndez, y el Dr. José Luis Eiroa Martínez.

Las especies estudiadas fueron recolectadas en los lugares que se indican en cada caso, habiendo sido clasificadas por la Dra. Rosa Febles Hernández del Jardín Canario "Viera y Clavijo" de Las Palmas de Gran Canaria, encontrándose en el herbario de dicho Centro muestras de las mismas.

Todos las lactonas naturales utilizadas en este estudio fueron aisladas de las partes aéreas de especies endémicas canarias pertenecientes a la familia *Compositae*.

De las partes aéreas de *Nauplius stenophyllus,* se aisló la **asteriscunolida A** (AS), purificada por cromatografía en una columna de sílica gel y se eluyó con una mezcla de n-hexano y acetato de etilo en una proporción de (8:2). La pureza de este compuesto fue 99,0% según se juzga por cromatografía de líquidos de alta presión. La identificación estructural de este compuesto se determinó espectroscópicamente (PMR y 13C NMR, I.R. y UV / Espectroscopia visible y espectrometría de masas).

Las partes aéreas de algunos ejemplares de la especie *Tanacetum oshanahanii* fueron recolectadas en el Jardín Canario "Viera y Clavijo" de Las Palmas de Gran Canaria. Presenta una única población situada en los riscos de Guayedra, al oeste de la isla de Gran Canaria, entre los 550 y 600 metros sobre el nivel del mar. La extracción con etanol de partes aéreas de esta planta dio un líquido de aspecto siruposo que fue sometido a sucesivos procesos de separación mediante cromatografía en columna sílica gel utilizando como eluyente una mezcla de n-hexano y acetato de etilo en proporción creciente de este último a medida que avanzaba el proceso. Se recogieron varias fracciones que se agruparon y fueron sometidos a una cromatografía en columna de sílica gel utilizándose como eluyente mezcla de n-hexano y acetato de etilo en proporción 50:50. De las fracciones obtenidas logró separarse la **tanapsina** (Ta).

2. Productos y materiales.

- Cultivos celulares.

El medio de cultivo RPMI 1640, Dulbecco's MEM (DMEM), el suero bovino fetal (FBS), la tripsina, el HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]), la L-glutamina, el azul de tripán, el bicarbonato sódico y los antibióticos (estreptomicina, gentamicina y penicilina G) fueron de Sigma Chemical Co. (San Luis, EEUU). Las botellas de cultivo de 75 cm² y las placas de 48 y 96 pocillos estériles, así como el resto del material estéril utilizado fueron de Becton-Dickinson.

- Fragmentación del ADN.

La RNasa A, la proteinasa K y el fenol fueron suministradas por Sigma Chemical Co. El cloroformo y alcohol isoamílico se obtuvieron de BDH (Poole, Inglaterra). La agarosa se obtuvo de Bio-Rad (Madrid, España) y el bromuro de etidio de Sigma/Aldrich (España).

- Microscopía de fluorescencia (tinción con bisbenzimida).

El paraformaldehído y la bisbenzimida (Hoechst nº 33258) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Se utilizó un microscopio de fluorescencia LSM 5 PASCAL de ZEISS.

- Citometría de flujo.

El yoduro de propidio y la RNasa A se obtuvieron de Sigma/Aldrich. La anexina V se obtuvo de BD PharmigenTH (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit). Los fluorocromos H₂-DCF-DA (diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína) y JC-1 (yoduro de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolo-carbocianina) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA). Los inhibidores de caspasas z-VAD-fmk (benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp(OME)-fluoro metil cetona), z-DEVD-fmk (Benzilocicarbonil-Asp-Glu-Val-Asp(OME) fluorometil cetona), z-LEHD-fmk (Benciloxicarbonil-Leu-Glu-Hisfluorometil Asp(OME) cetona), z-IETD-fmk (Benciloxicarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp(OME) fluorometil cetona), z-VDVAD-fmk (Benciloxicarbonil-Val-Asp-Val-Ala-Asp(OME)

fluorometil cetona) fueron obtenidos de Sigma, mientras que los inhibidores z-YVAD-fmk (Benciloxicarbonil-Tyr-Val-Ala-Asp(OME) fluorometil cetona) y z-VEID-fmk (Benciloxicarbonil-Val-Glu-Ile-Asp(OME) fluorometil cetona fueron obtenidos de Calbiochem.

SP600125, PD98059, SB203580, Trolox, N-acetil-L-cisteína (NAC), Tocoferol (vitamina E), ditiotreitol (DTT), alopurinol, ácido ascórbico (vitamina C), hidroxibutilanisol (BHA), pirrolidín ditiocarbamato (PDTC), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), U0126 y el resto de inhibidores fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

- Determinación de la actividad caspasa.

El sustrato específico utilizado para determinar la actividad caspasa -3/-7 fue N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina (DEVD-pNA) obtenido de Sigma, y la paranitroanilina (pNA) fue obtenida de Calbiochem.

- Inmunodetección de proteínas ("Western blot").

La acrilamida (bis N,N'-metilen-bis-acrilamida), persulfato amónico, TEMED (N,N,N,N,-tetrametil-etilendiamina), SDS (dodecil sulfato sódico) y los marcadores de pesos moleculares obtuvieron de Bio-Rad. El azul se de bromofenol, el BSA (albúmina de suero bovino) y el βmercaptoetanol fueron de Sigma. Las membranas (PVDF) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvieron de Millipore (Billerica, MA, USA). Las placas para autorradiografía se adquirieron de Kodak.

Los productos utilizados en la obtención del lisado celular, fueron: aprotinina (inhibidor de serínproteasas que inhibe tripsina, quimiotripsina y plasmina), leupeptina (inhibidor de cisteín y serínproteasas. Inhibe plasmina, tripsina, papaína y catepsina B), pepstatina A (inhibidor potente de proteasas PMSF cisteín, ácidas), (inhibe serínproteasas V acetilcolinesterasa), ditiotreitol (DTT: agente reductor estereoselectivo para puentes disulfuro en complejos moleculares), ortovanadato sódico (inhibidor de fosfatasas alcalinas) y el detergente tritón X-100 fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Los anticuerpos para PARP, caspasa -3, caspasa -6, caspasa -7, caspasa -8, caspasa -9, citocromo *c*, BCL-2 se obtuvieron de Stressgen (Victoria, British Columbia, Canadá). El anticuerpo para BAX, α -tubulina y anti- β -actina se obtuvieron de Sigma/Aldrich.

Los anticuerpos para fosfo-p38^{MAPK} (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), p38^{MAPK}, fosfo-JNK/SAPK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), JNK/SAPK, fosfo-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) y ERK1/2 fueron obtenidos de New England Biolabs (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EEUU). Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de Amersham Biosciences.

- Reactivos generales de laboratorio.

El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Mili-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica, Madrid, Spain). El dimetilsulfóxido (DMSO), EDTA, EGTA, NaCl, glicerol, trizma base, trizma-HCl, azida sódica, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la sacarosa, tween 20, hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl) y otros compuestos utilizados en la preparación de reactivos y tampones se adquirieron a Sigma Chemical Co. o a BDH (Carlo Erba, E Merck y Fluka). El dodecil sulfato sódico (SDS) se obtuvo de Bio-Rad.

3. Modelo Experimental.

Las células se contaron en un hematocitómetro y la viabilidad siempre fue superior al 95% utilizando el método de exclusión de azul de tripán.

3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60, JURKAT y MOLT-3, y células de linfoma histiocítico humano U937.

Las células HL-60, JURKAT, MOLT-3 y U937 se obtuvieron de la colección americana y alemana de cultivos celulares (ATCC y DSMZ) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y antibiótico (100 unidades /ml de penicilina y 100 μ g/ml estreptomicina) en una atmósfera humidificada (37 °C y 5% CO₂) y a una densidad no superior a 0,5 x 10⁶ células/ml [90,91]. A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana y se dividieron aproximadamente cada 24 horas. 3.2. Cultivo de células de melanoma humanas SK-MEL-1.

Las células de melanoma humano SK-MEL-1 establecidas a partir de células metastásicas del conducto torácico de un hombre de 29 años, se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares (DMSZ), se cultivaron en medio RPMI 1640 en las mismas condiciones que las anteriores. Aunque las células crecen lentamente producen sin embargo una rápida acidificación del medio por lo que el medio de cultivo se cambió tres veces por semana [90,91].

3.3. Cultivo de células A549 (cáncer de pulmón humano).

Las células de cáncer de pulmón humano A549 fueron establecidas a partir un tumor pulmonar de un hombre de 58 años en 1972, se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares (DMSZ), se crecieron en medio DMEM conteniendo 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 unidades /ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Para su cultivo utilizamos placas Falcon de 100mm, ya que estás células son adherentes y crecen rápidamente, se cambió el medio de cultivo dos o tres veces en semana utilizando 0,25 % tripsina-EDTA durante 5 minutos y las células obtenidas por centrifugación (500 g durante 5 minutos) se resuspendieron a una densidad de 1×10^4 células /ml. Se mantuvieron en una atmósfera humidificada (37 °C y 5% CO₂) [90,91]. *xL), HL-60 con su vector control HL-60 bcl-neo y U937 que sobreexpresan el gen humano de bcl-2 (denominadas U937/Bcl-2).*

Las células HL-60 fueron transfectadas con el plásmido pSFFV-neo (HL-60/neo) o con el plásmido pSFFV-bcl- x_L (HL-60/Bcl- x_L) que fueron establecidos por el Dr. Kapil N Bhalla (Medical College of Georgia Cancer Center, EEUU) y fueron obtenidas por donación de Dr. Angelika Vollmar (Department of Pharmacy, Universidad de Munich, Alemania). Las células HL-60/Bcl- x_L y HL-60/neo fueron cultivadas igual que en el caso de las células HL-60, añadiendo 0,1mM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio (Invitrogen) al medio de cultivo. Además añadimos gentamicina (1mg/ml) al medio de cultivo cada quinto pase, y las células con gentamicina no fueron empleadas para los experimentos.

Las células U937/Bcl-2 fueron proporcionadas por la Dra. Jacqueline Bréard (INSERM U749, Faculté de Pharmacie Paris-Sud, Châtenay-Malabry, Francia). Las células se cultivaron en RPMI 1640 con glutamax y 25 mM de HEPES, 1% MEM piruvato de sodio, complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 unidades /ml de penicilina y 100 μ g/ml estreptomicina, en una atmósfera humidificada a 37 °C y 5% CO₂.

A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana y se duplicaron cada 24 horas. [90,91].

3.5. Células mononucleares de sangre periférica de origen humano (PBMC).

Las células mononucleares de sangre periférica de origen humano (PBMC) fueron aisladas de sangre obtenida de voluntarios sanos, recogidas en tubos heparinizados para evitar la coagulación y se aislaron mediante centrifugación con Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). Una parte de las PBMCs obtenidas se estimularon con fitohemaglutinina (PHA, 2 μ g/ ml) durante 48 h antes del tratamiento experimental.

3.6. Tratamiento con los compuestos.

Los productos se prepararon a una concentración de 10-100 mM en dimetilsulfóxido y las alícuotas se mantuvieron a – 20° C. Las diluciones necesarias se hicieron en medio de cultivo justo antes del experimento. En todos los experimentos la concentración de DMSO no excedió del 0,3%, una concentración que no es tóxica para las células. La misma concentración de DMSO fue añadida a las células control.

4. Métodos

4.1. Evaluación de la citotoxicidad in vitro y estudios de la proliferación celular: MTT.

Se realizó, mediante el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la actividad deshidrogenasa mitocondrial [92].

Las células se cultivaron en placas de 96 pocitos, por triplicado, a una densidad de 1x10⁴ células/pocito en 0,2 ml de medio de cultivo v en presencia de diferentes concentraciones de las lactonas sesquiterpénicas durante 72 h. Las placas se centrifugaron (500 g, 10 min) a temperatura ambiente y el medio se eliminó por aspiración. A cada pocito se le añadió 100 μ l de MTT (0,5 mg/ml en medio de cultivo con antibiótico pero sin suero) y las placas se incubaron durante 4 h a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100 μ l de SDS (20%) con HCl 0,02 N e hasta la mañana incubando la mezcla siguiente. La cuantificación de la conversión del MTT (amarillo) en su forma reducida (púrpura) por la deshidrogenasa mitocondrial se determinó a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 680 Bio-Rad) utilizando como blancos pocitos sin células a los que se les añadió medio. Los datos se analizaron con el programa informático Prism 2.0 (GraphPad) y se determinó la concentración de producto que inhibe el crecimiento celular a la mitad (IC_{50}) [93,94].

4.2. Estudio de la apoptosis celular:

La apoptosis celular se determinó mediante diversos criterios:

4.2.1. Tinción con el fluorocromo bisbenzimida.

Método cuantitativo, basado en la capacidad del fluorocromo para unirse al ADN, permitiendo visualizar la existencia de cambios morfológicos del núcleo como son la condensación de la cromatina y su compactación a lo largo de la periferia del núcleo y la segmentación del núcleo. Una vez finalizados los tratamientos, las células (~5x10⁵) se lavaron con PBS (10 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, pH 7,4) y se fijaron con 70 µl de paraformaldehído (3% en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se (12.000 g, 1 centrifugaron minuto), se eliminó el paraformaldehído y las células se tiñeron con 20 µl de una disolución que contenía 20 µg/mL de bisbenzimida (Hoechst 33258) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Una alícuota (10 µl) se fijó en un porta y se analizó la morfología nuclear de 500 células con un microscopio de fluorescencia (Zeiss-Axiovert). Se consideraron células apoptóticas aquellas cuyos núcleos presentaron condensación de la cromatina, su compactación a lo largo de la periferia y/o la fragmentación nuclear en tres o más cuerpos apoptóticos [93].

4.2.2. Fragmentación del ADN.

Método cualitativo, basado en la detección de la fragmentación internucleosómica del ADN y visualización como una escalera discontinua de bandas multiméricas de 185-200 pares de bases, características del proceso apoptótico.

Las células (5 x 10^5 células/ml) después de ser tratadas con las distintas lactonas sesquiterpénicas se recolectaron por centrifugación (12.000 g, 1 minuto) y se lavaron dos veces con PBS frío. Las células se resuspendieron con 30 ul de tampón de lisis [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,5% SDS] y se incubaron sucesivamente con 1 μ g/ μ l de RNasa A (1 hora a 37 °C) y con 1 μ g/ μ l de Proteinasa K (1h a 50 °C). Se añadió a cada muestra 2 µl de azul bromofenol (0,25%) y el ADN se extrajo con 100 µl de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Las muestras se centrifugaron (12.000 g, 1 min.) a temperatura ambiente y la fase acuosa (azul) se lavó nuevamente con 100 μ l de cloroformo. A las muestras se les añadió 5 ul de tampón de carga (10 mM EDTA, pH 8,0, conteniendo 1% (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión y 40% de sacarosa) y se incubaron a 70 °C durante 5-10 minutos. Finalmente 30 µl de cada muestra se sometieron a electroforesis (5 V/cm) durante 3-4 h en geles de agarosa al 1,8 %. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml durante 20 min), los fragmentos de ADN se visualizaron a 260 nm en un

transiluminador y la imagen se captó con una cámara digital (DC290, Kodak) y se analizó con el software Quantity One (Bio-Rad).

> 4.2.3. Cuantificación de células hipodiploides por citometría de flujo. Cuantificación de la fracción SubG1, G1, S y G2/M mediante el análisis del contenido en ADN.

Método cuantitativo basado en la fluorescencia emitida por diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN (Ej. yoduro de propidio). Se puede detectar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en función de su contenido en ADN. Las células en fase G_1 forman el primer pico, en la fase S las células están sintetizando ADN y en fase G_2/M las células presentan el doble de contenido en ADN que una célula normal y aparecerán como un segundo pico. Las células que contienen ADN hipodiploide (menor contenido de ADN que el contenido diploide de las células normales) son consideradas apoptóticas, y se localizan a la izquierda del pico G_1 constituyendo la fracción Sub G_1 [93].

Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron durante al menos una hora en etanol al 70 %, a -20 °C. A continuación se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron con 1 ml de PBS (1h a 37 °C en oscuridad) conteniendo 100 μ g/ml de RNasa A y 50 μ g/ml de yoduro de propidio. La sonda fue excitada a 488 nm y la fluorescencia emitida por

el complejo propidio-ADN (617nm) se determinó en un citómetro Coulter Epics XL-MCL, (Beckman Coulter) usando el detector FL3 (620±15nm). Se analizaron 10.000 células en cada muestra y los resultados se analizaron con el software EXPO 32 ADC Sofwaretm (Beckman Coulter) [94].

4.2.4. Determinación de las células apoptóticas mediante el análisis de la externalización de fosfatidilserina.

La fosfatidilserina es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y se transloca a la cara externa de dicha membrana en los estadíos tempranos del proceso de apoptosis. La proteína anexina V se une a fosfatidilserina en presencia de Ca²⁺ y permite detectar las células apoptóticas por citometría de flujo, previa incubación de las células con anexina V unida a un fluorocromo (FITC). De esta manera distinguimos: a) células viables, no unen anexina V y excluyen yoduro de propidio, b) células en apoptosis temprana, unen anexina V y excluyen yoduro de propidio, c) células en apoptosis tardía, unen anexina V e incorporan yoduro de propidio y d) células necróticas, unen anexina V e incorporan yoduro de propidio, o sólo incorporan yoduro de propidio.

Las células ($1x10^{6}$ por muestra) una vez tratadas se lavaron con PBS frío, y se resuspendieron en el tampón 1X (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂). Se transfirieron 100 µl de la suspensión (1 x 10⁵ células) a un tubo de cultivo de 5 ml, y se le añadió 5 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de yoduro de propidio. Mezclamos suavemente las células e incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en la oscuridad. Se añadió 400 µl del anterior tampón 1X a cada tubo, y se analizó cada muestra por citometría de flujo.

Cuando las células en cultivo sufren apoptosis, al no poder ser fagocitadas, sufren necrosis secundaria al proceso apoptótico, por lo que puede aumentar el número de células que dan positivo a yoduro de propidio.

4.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Para el procesado de muestras en microscopía electrónica de transmisión, las células tratadas se centrifugaron, se resuspendieron y se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,2) durante 24 horas. La post-fijación se realizó en OsO_4 al 1% en tampón fosfato. Las células se deshidrataron con una serie de concentraciones crecientes de etanol. El sedimento se incluyó en una resina EMBed 812 que polimerizó a 70 °C. Los cortes fueron realizados con un ultramicrotomo *Reichert Ultracuts (Leica)*. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina, mientras que los ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y plomo. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión *Zeiss EM 910 (Carl*

ZEISS, Alemania) equipado con cámara digital Proscan Slowscan CCD-Camera for TEM (Fa. Proscan Elektronische Systeme GmbH, Alemania) y software Soft Imaging System (Alemania) del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

4.3. Determinación de la actividad caspasa.

Las células tratadas se centrifugaron a 1.000 g durante 5 min a 4 °C, se lavaron con PBS y se incubaron en hielo. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,1% Chaps) v se dejaron 5 min en hielo. Se centrifugaron durante 10 min at 16.000 g a 4 °C, se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes mediante el método de Bradford y se almacenaron a -20 °C hasta que se usaron para el estudio de la actividad enzimática de las caspasas. Se utilizó una cantidad equivalente de proteínas de los diferentes tratamientos ($\sim 20 \ \mu g$). El incremento de la absorbancia a 405 nm después de la incubación a 37 °C durante 1 hora fue indicativo de la actividad enzimática de las caspasas. El sustrato colorimétrico específico utilizado en el ensayo para la actividad caspasa -3/7 fue N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina (DEVD-pNA).

4.4. Inmunodetección de proteínas (Western blot).

Las células $(1-10 \times 10^6)$ se incubaron en medio de cultivo con las lactonas sesquiterpénicas de interés durante

distintos tiempos a 37 °C. A continuación se recolectaron por centrifugación (500 g, 10 minutos, 4 °C) y se lavaron dos veces con PBS. En este punto, las células se procesaron de distinta forma: en función de si se necesitaba el lisado celular o las diferentes fracciones subcelulares (fracción nuclear, citosólica y mitocondrial).

Obtención del lisado celular:

El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis [Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 137 mM cloruro sódico, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 2 mM de pirofosfato de sodio, 20 mM glicerofosfato de sodio, 10 mM fluoruro sódico, 2 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, leupeptina (5 µg/ml), aprotinina (5 µg/ml) y pepstatina A (5 µg/ml)] e incubó durante 15 min a 4 °C. Los lisados se sonicaron (cuatro ciclos de cinco segundos) y se centrifugaron a 11,000 x g durante 10 min a 4 °C. El precipitado resultante (membranas y demás restos celulares) se descartó, mientras el sobrenadante se analizó [90,92].

- Fraccionamiento subcelular:

El precipitado celular (~ 10^7 células) se resuspendió en 100 µl de tampón de homogeneización [20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] con inhibidores de proteasas (0,1 mM PMSF, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml aprotinina y 10 µg/ml pepstatina A), y se incubó durante 15 min a 4

°C. Las células se lisaron usando una aguja de 21G y el extracto resultante se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C. El precipitado (fracción nuclear) se resuspendió en 100 µl de tampón de homogeneización y se sonicó 3 veces durante 10 segundos a 4 °C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 22.000 x g durante 20 minutos a 4 ºC. El precipitado (fracción mitocondrial) se resuspendió en 50 ul de de tampón homogeneización mientras aue el sobrenadante fue utilizado como fracción citosólica. Las diferentes fracciones se congelaron a -20 °C hasta su utilización [90].

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, y todas las muestras se ajustaron a la misma concentración utilizando el tampón anterior. Los lisados celulares se hirvieron en tampón de electroforesis [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM β -mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol] a 100 °C durante 5 min [90].

Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (del 7,5% al 15%, dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar) conteniendo 0,1% SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con 10% de leche desnatada en tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20] durante 1 h a temperatura ambiente (o toda la noche a 4 °C), seguido de una incubación con el anticuerpo específico.

Los anticuerpos utilizados en este estudio se diluyeron en TBST conteniendo 3% de leche desnatada y las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo de interés, durante 24 h con agitación suave y a 4 ºC. Las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 15 min cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se lavaron nuevamente con TBST en las mismas condiciones anteriores y la detección de las proteínas específicas se determinó por emisión de quimioluminiscencia, utilizando un kit comercial y posterior exposición de las membranas sobre películas autorradiografía. Las imágenes de fueron capturadas con un escáner y analizadas con el programa Adobe Photoshop 7.0.

Como control de que se ha cargado y transferido la misma cantidad de proteínas, las distintas muestras se analizaron con un anticuerpo específico anti-β-actina.

4.5. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelulares.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares se midió fluorimétricamente usando la sonda diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H₂-DCF-DA). Las células fueron expuestas a los tratamientos correspondientes y se incubaron con 8 µM de H₂-DCF-DA durante los últimos 30 minutos antes de finalizar el ensayo, a 37 °C. Inmediatamente después, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con el equipo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter), excitando la sonda con un láser de argón a 488 nm y recogiendo la emisión fluorescente de la diclorofluoresceína (529 nm), con el detector FL1 (525±20 nm). La distinta intensidad de la emisión fluorescente indica la mayor o menor presencia de ROS en el interior de la célula. Los resultados se analizaron con el EXPO 32 ADC Sofwaretm (Beckman Coulter) [95,96].

4.6. Análisis de la despolarización de la membrana mitocondrial ($\Delta \Psi m$).

Las células HL-60 (1 x 10⁶ células) se incubaron a 37 °C en la oscuridad, con la sonda JC-1 (10 µg/ml) durante los últimos 30 minutos antes de finalizar el ensayo y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el canal FL1 (527 nm) para detectar la fluorescencia verde de los monómeros de la sonda y el canal FL2 (590 nm) para la fluorescencia roja de los agregados. La cuantificación de la despolarización mitocondrial ($\Delta \Psi m$) se obtuvo a partir de la representación gráfica de los datos recogidos por el detector FL1 frente a los recogidos por el detector FL2. La división de las gráficas en cuadrantes permite estimar el porcentaje de células con potencial de membrana intacto (cuadrantes superiores) aquellas sufren despolarización de que mitocondrial (cuadrantes inferiores).

El ionóforo de protones carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) se utilizó como control positivo de la

80

disipación del potencial de membrana. La despolarización de la membrana mitocondrial inducida por CCCP (10 μ M) se ve reflejada por un incremento del número de células que emiten mayor fluorescencia verde y menos roja respecto a las células control y que se sitúan en el cuadrante inferior derecho. Para el análisis se usó citómetro Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

5. Métodos estadísticos.

En todos los casos las determinaciones para cada grupo experimental se realizaron por triplicado o cuadruplicado, y los valores representados se corresponden a datos de tres experimentos como mínimo (Media \pm S.E.M). La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la t de Student o análisis de la varianza, considerando significativos los valores de P < 0,05.

RESULTADOS

 La asteriscunolida A y la tanapsina inhiben el crecimiento y la viabilidad de las líneas celulares estudiadas.

Estudios anteriores han demostrado que las lactonas sesquiterpénicas muestran propiedades citotóxicas en células tumorales. Sin embargo, no se ha evaluado la de actividad antiproliferativa las lactonas sesquiterpénicas (SL) de origen natural asteriscunolida A (As) y tanapsina (Ta) (Tabla 2) en células leucémicas y de melanoma humanas. En el presente estudio, se examinaron los efectos de estas lactonas sesquiterpénicas en la proliferación de varias líneas celulares tumorales humanas.

Observamos que tanto las líneas celulares de leucemia humana, incluidas las mieloides (HL-60 y U937) y las linfoides (Molt-3) como la línea celular de melanoma humano (SK-MEL-1) resultaron ser altamente sensibles al efecto antiproliferativo de As y Ta (Tabla 2). Los tratamientos con estos compuestos indujeron una inhibición de la proliferación celular que resultó ser dosis-dependiente (Figura 10-B), sin cambios significativos entre las cuatro líneas celulares. El valor de IC₅₀ fue similar en células HL-60, U937, y SK-MEL-1 (Tabla 2). Curiosamente, ambas lactonas sesquiterpénicas presentaron especificidad frente al tipo de células ya que la línea celular A549 fue altamente resistente a estos compuestos (valor de $IC_{50} > 30 \mu$ M).

 IC_{50} de las α -metilen- γ -butirolactonas

	As (μM)	Ta (μM)
HL-60	5,2±1,3	14,3±1,6
$HL-60/Bcl-X_L$	7,3±0,8	16,9±3,0
U937	5,4±0,7	11,5±2,1
U937/Bcl ₂	14,8±1,6	15,4±4,7
Molt-3	4,9±1,7	8,2±1,7
SK-MEL-1	6,8±2,8	11,8±3,4
A549	>30	>100

Tabla 2. Efecto de las lactonas sobre la proliferación de células tumorales humanas. Las células se cultivaron durante 72 horas y el valor de la IC_{50} se determinó mediante un ensayo colorimétrico con MTT. Los datos representan la media \pm S.E.M. de 3-5 experimentos independientes con tres determinaciones en cada uno.



Figura 10. A) Estructura química de la As y la Ta y plantas de las que fueron extraídas. **B)** Efecto de la As y la Ta sobre la viabilidad celular de HL-60. Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de As y Ta durante 72 h, y posteriormente la viabilidad celular se determinó por el ensayo MTT. Se muestran los resultados de un experimento representativo. Cada punto representa la media de determinaciones por triplicado.

Dado que un agente anticancerígeno ideal no debería tener efecto sobre las células normales, no tumorales, se investigó si estas SL también eran citotóxicas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), extraídas de voluntarios sanos. En el estudio no se observó citotoxicidad (hasta 10 µM) para las PBMC, independientemente de si eran quiescentes 0 proliferantes. A concentraciones de 30 µM presentaron significativo sólo efecto citotóxico PBMC en las

proliferantes, pero no en PBMC quiescentes. Sin embargo, se observó una reducción importante en la proliferación de células HL-60 que se incluyeron en el experimento como control positivo (Figura 11), incluso a 10 μ M.



Figura 11. Efecto sobre la proliferación de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) y de células HL-60. Efecto diferencial de As sobre la proliferación normal de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) versus las células HL-60. Las células HL-60, y las células quiescentes PBMC y células PBMC activadas con fitohemaglutinina de origen humano se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas de AS durante 24 h. Los valores representan medias ± SE de dos experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. * P <0,05, significativamente diferente de su correspondiente control. Efectos similares fueron observados con la Ta.

 La As y la Ta inducen parada del ciclo celular en la fase G2-M y la apoptosis en la leucemia mieloide humana y en células de melanoma humano

Un objetivo importante en la quimioterapia es encontrar nuevos agentes citotóxicos que sean capaces de incrementar o restaurar la capacidad de las células tumorales а sufrir apoptosis. Para dilucidar Ы mecanismo responsable de la inhibición de la proliferación celular, se examinó si estas SL inducen apoptosis.

Este tipo de muerte celular se caracteriza por la degradación del ADN multímeros de en aproximadamente 200 pares de bases. Mediante electroforesis en un gel de agarosa pudimos observar cuando las células se incubaron que con concentraciones crecientes tanto de As como de Ta, el ADN mostró patrones de fragmentación resultantes de la hidrólisis internucleosomal de la cromatina en las células humanas HL-60, U937, y células SK-MEL-1. Fue visualizada como una escalera discontinua de bandas multiméricas, característica de la apoptosis y que se diferencia de la fragmentación aleatoria típica de la necrosis. Lo que confirma los efectos inductores de apoptosis (Figura 12).

Se usaron concentraciones entre dos y seis veces más altas que los valores antiproliferativos de IC_{50} con el fin de determinar claramente el mecanismo de acción temprana de estas SL en las células tumorales.



Figura 12. As y Ta inducen la apoptosis en células tumorales humanas: fragmentación. Efectos de As y Ta en la fragmentación del ADN en células tumorales humanas. Las células se trataron con las concentraciones indicadas de los compuestos y se extrajo ADN genómico, se separó en un gel de agarosa y se visualizaron bajo luz UV mediante tinción con bromuro de etidio.

Además, se utilizó microscopía de fluorescencia para analizar los cambios morfológicos de las células tumorales en respuesta a AS y Ta, observándose la cromatina condensada y fragmentada, característica de la muerte celular apoptótica (Figura 13).



Figura 13. As y Ta inducen la apoptosis en células tumorales humanas: microscopía de fluorescencia. Las microfotografías de campos representativos de las células teñidas con trihidrocloruro bisbenzimida para evaluar la condensación de la cromatina nuclear (es decir, apoptosis) después del tratamiento con 30 µM de As y Ta.

Para evaluar si la inhibición del crecimiento celular inducida por As y Ta es mediada por alteraciones en la progresión del ciclo celular, se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la distribución de las fases del ciclo celular mediante estudios de citometría de flujo. Como Figura 14A, As se muestra en la induce una acumulación de células en la fase G₂-M a expensas de la población celular de la fase G1 a las 24 h de tratamiento. El porcentaje de células en G₂-M aumentó de 30,0±0,8% (células de control) a 41,5±2,7% en presencia de AS. Consistente con los resultados anteriores, el porcentaje de células sub-G₁ aumentó de 4,1± 0,2% (control) a 16,2± 1,6% (~ 4 veces) en células HL-60 tratadas. Una tendencia similar a la parada en G₂-M (19,0±0,8% vs. 32,4± 2,4%) y en células hipodiploides (3,2± 1,2% vs. 11,3± 1,3%) se observó en las células U937 cultivadas en presencia de As. En cuanto a Ta, también induce parada en G₂-M, tanto en HL-60 (30,0±0,8% vs 40,2±0,7%) como en U937 (19,0±0,8% vs 24,9±2,7%). En consonancia con estos resultados el porcentaje de células sub-G₁ aumentó de 4,1± 0,2% (control) a 12,3± 1,6% (~ 3 veces) en células HL-60 tratadas y de 3,2± 1,2% (control) a 10,5± 2,3% (~ 3 veces) en células U937.

La externalización de fosfatidilserina es una indicación temprana de la apoptosis. La aparición de este fosfolípido en la superficie celular prepara a la célula que va a morir para ser fagocitada y eliminada por los macrófagos. La evaluación por citometría de flujo del número de células positivas anexina V-FITC mostró que el porcentaje de células apoptóticas aumentó alrededor de tres veces en células HL-60 tratadas tanto con AS como con Ta durante 24 h (Figura 14B).



Figura 14. Estudio de la apoptosis inducida por As y Ta en células tumorales humanas. **A)** Las células HL-60 y U937 se incubaron con As y Ta 30 μM durante 24 h. Se sometieron a citometría de flujo y analizadas usando yoduro de propidio. Las células hipodiploides (células apoptóticas) se muestran en la región marcada con una flecha. **B)** Análisis de la externalización de fosfatidilserina por citometría de flujo con Anexina V-FITC y tinción con yoduro de propidio en células HL-60 células después de 24 h de tratamiento con As y Ta 30 μM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

El aspecto morfológico ultraestructural también se evaluó por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las células apoptóticas observadas en respuesta a los tratamientos se caracterizan por la fragmentación nuclear y la fuerte condensación de la cromatina, incluso en células que sobreexpresan las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl- X_L (Figura 15).



Figura 15. Estudio mediante microscopía electrónica de la apoptosis inducida por As y Ta en células tumorales humanas. Análisis de la morfología nuclear mediante microscopía electrónica de transmisión después de 24 h de incubación con las concentraciones indicadas de As y Ta. La barra mostrada es equivalente a 2 µm. Todas las imágenes se muestran con la misma ampliación.

En conjunto, estos resultados indican que As y Ta inducen la parada del ciclo celular en la fase G₂-M y apoptosis en las células de leucemia mieloide humana HL-60 y U937.

3. El As y la Ta inducen la muerte celular por una vía dependiente de caspasa

La apoptosis puede estar mediada por diferentes vías de señalización que implican diferentes caspasas y también puede ocurrir independientemente de la activación de la caspasa. Para determinar si las caspasas están involucradas en la apoptosis inducida por As Ta. se examinó si estas lactonas V sesquiterpénicas inducen la hidrólisis de la poli (ADPribosa) polimerasa (PARP), un sustrato conocido de la caspasa-3 que juega un papel importante en la reparación del ADN. Los resultados (Figura 16A) demuestran que As induce la hidrólisis de la proteína PARP de 116 kDa al fragmento de 85 kDa, de una manera dependiente de la concentración, en células HL-60, U937 y SK-MEL-1.

Puesto que la liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol puede desempeñar un papel crucial en la señalización de apoptosis, se determinó si esta molécula clave participa en la apoptosis inducida por As. Las células se trataron con concentraciones crecientes de estos compuestos y las preparaciones citosólicas se analizaron por inmunotransferencia. Los resultados muestran un aumento significativo en la cantidad de citocromo c en el citosol a las 24 h de tratamiento (Figura 16B). Curiosamente, la liberación
de citocromo *c* se observó también en las células que expresan niveles elevados de la proteína antiapoptótica Bcl- x_L . Este resultado está de acuerdo con los resultados de microscopía electrónica de transmisión descritos y también con los ensayos de citotoxicidad.



Figura 16. Implicación de las caspasas en la inducción de apoptosis por AS y Ta en células de leucemia humana y en células de melanoma SK-MEL-1. (A) Las células se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de As y Ta y los lisados celulares se analizaron por inmunotransferencia para la escisión de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). (B) Las células se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de As y de Ta y los extractos citosólicos se analizaron por inmunotransferencia para detectar la liberación del citocromo c mitocondrial. Como control de carga se utilizó β-actina.

La expresión de niveles elevados de Bcl-2 o Bcl- x_{L} no suprime la toxicidad inducida por As, aunque el valor de IC₅₀ en U937/Bcl-2 era, ligeramente más alto que el valor de IC₅₀ en células U937 (Tabla 2). Además, la expresión de niveles elevados de Bcl- x_{L} no confirió protección contra la citotoxicidad inducida por As, ya que el valor IC₅₀ en las células HL-60/Bcl- x_{L} fue similar a la obtenida en células HL-60 (Tabla 2).

Por lo tanto, As parece ser capaz de activar la citotoxicidad ya sea por derivación de eventos mitocondriales o por inactivación de la protección mitocondrial por Bcl-2 y Bcl- x_L .

A fin de determinar si la liberación de citocromo c está asociada con una alteración del $\Delta\Psi$ m, las células HL-60 se trataron con As durante diferentes períodos de tiempo (6, 12, y 24 h), se tiñeron con JC-1 y se analizó por citometría de flujo. Los resultados muestran una pérdida significativa de $\Delta\Psi_m$ a las 6-12h de tratamiento (Figura 17), lo que sugiere que la alteración del $\Delta\Psi_m$ podría estar implicado en la muerte celular inducida por As.

El procesamiento proteolítico de procaspasas para generar sus formas activas es un evento importante en la muerte celular por apoptosis dependiente de caspasas. Para determinar el efecto de As sobre estas proteasas, las células se incubaron en presencia de esta lactona sesquiterpénica y las caspasas iniciadoras (caspasas-9 y -8) y efectoras (caspasas-7, -6, y -3) se determinaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos que se unen tanto a la proenzima como a los fragmentos activos. Los resultados indican que As significativamente la escisión promueve de las procaspasas-9, -7, -6, -3 y en todas las líneas celulares evaluadas. Sin embargo no se observó el procesamiento de la procaspasa-8, incluso con la concentración más alta ensayada (30 µM) a 24 h de tratamiento (Figura 18).



Figura 17. As y Ta reducen el potencial de membrana

mitocondrial ($\Delta \Psi_m$ **).** Las células se trataron con As y Ta durante los tiempos indicados y el $\Delta \Psi_m$ se analizó con la sonda JC-1. La intensidad de fluorescencia de JC-1 se analizó por citometría de flujo. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.



Figura 18. AS y Ta inducen apoptosis en céluas de leucemia humana y en células de melanoma SK-MEL-1 con implicación de las caspasas. Las células se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de As y Ta y los lisados celulares se analizaron por inmunotransferencia para la escisión de las procaspasas-9, -8, -7, -6, y -3.

Para demostrar que la apoptosis inducida por As requiere la activación de caspasas, las células HL-60 se trataron previamente con el inhibidor de caspasas de amplio espectro z-VAD-FMK. Como podemos observar en la Figura 19A, los resultados muestran que la apoptosis se bloquea casi por completo, lo que indica que As induce muerte celular a través de mecanismo dependiente de caspasa.

Dado que la caspasa-3 es la principal caspasa efectora implicada en la apoptosis, también comprobamos si As activa esta caspasa. Las células se incubaron en presencia de As a distintos tiempos (6, 12, o 24 h) y los lisados celulares se analizaron para la escisión del tetrapéptido DEVD-*p*NA como sustrato específico de la caspasa-3.



Figura 19. As induce muerte celular a través de mecanismo dependiente de caspasa (A) Las células se pretrataron en ausencia o en presencia de z-VAD-fmk (100 μ M) antes de la adición de As y se analizó la distribución de las fases del ciclo celular por citometría de fluio. Las células hipodiploides (células apoptóticas) se muestran en la región marcada con una flecha. (B) Cinética de la activación de la caspasa-3 en respuesta a As. Las células HL-60 se incubaron con As durante los tiempos indicados y los lisados celulares se ensayaron para la actividad caspasa usando el sustrato colorimétrico DEVD-pNA. Los resultados se expresan como aumento de veces en la actividad caspasa respecto al control. Los valores representan las medias ±SEs de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. * P <0,05, significativamente diferente del control sin tratar

Tal como se muestra (Figura 19B), la inducción de esta caspasa fue significativamente detectable después de 12 h de tratamiento y aumentó con el tiempo de incubación.

Estos resultados indican que As induce la escisión de PARP, liberación del citocromo *c* y el procesamiento de las procaspasas -9, -7, -6, y -3 y que el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, inhibe casi completamente la apoptosis inducida por As.

Experimentos análogos se realizaron con la Ta obteniendo resultados similares.

4. La AS activa las MAPKs

Las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) pueden mediar señales que promueven o inhiben la proliferación de las células hematopoyéticas malignas [97]. Por esta razón, se utilizaron células de leucemia promielocítica HL-60 como modelo para investigar en detalle la implicación potencial de las rutas de MAPK en la muerte de células tumorales.

Puesto que las proteínas quinasas ERK, JNK / SAPK, y $p38^{MAPK}$ desempeñan un papel fundamental en el destino celular, se analizó el efecto de AS (10 μ M) sobre la activación de estas proteínas quinasas en las



células HL-60 (Figura 20A). Los resultados muestran una fosforilación rápida (30 min) de ERK1 / 2 y de p38^{MAPK} pero no de JNK / SAPK.

La fosforilación de ERK1 / 2 permaneció elevada durante al menos 4 h, mientras que la activación de p38^{MAPK} disminuyó a nivel basal después de 2-3 horas bajo las mismas condiciones experimentales.

Esto indica que el tratamiento de las células con AS induce la activación de ERK1 / 2 y de p 38^{MAPK} siguiendo una cinética similar. Para determinar si la fosforilación de las MAPKs desempeña un papel clave en la apoptosis inducida por AS, examinamos el efecto de los inhibidores específicos de la señalización ERK1 / 2 y p 38^{MAPK} en las células HL-60 (Figura 20B).

Sorprendentemente, el tratamiento previo de las células con los inhibidores específicos PD98059 (10 μ M) y U0126 (10 μ M), que bloquean la activación de ERK1 / 2, amplificó la apoptosis inducida por As.

Como se muestra en la Figura 20B, el tratamiento combinado de AS y PD98059 duplicó la muerte celular en comparación con el tratamiento de AS sólo, y aumentó aproximadamente siete veces la muerte celular en comparación con PD98059 sólo. Con U0126, otro inhibidor de MEK1/2, se obtuvieron resultados similares.



Figura 20. AS induce la fosforilación de MAPKs. (A) AS induce la fosforilación dependiente del tiempo de ERK 1/2 y p38^{MAPK}. Las células HL-60 se incubaron con AS a los tiempos indicados y los extractos de proteínas se analizaron mediante inmunoblot utilizando anticuerpos específicos para determinar la fosforilación de las diferentes MAPKs. (B) Las células HL-60 se preincubaron con PD98059 (PD, 10 µM), U0126 (U0, 10 μM), y SB203580 (SB, 2 μM) durante 1 h y después se trataron con AS. La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo como se describe en la sección Materiales y Métodos. Las barras representan la media ± SE de tres experimentos independientes cada uno realizado por triplicado. * P <0,05, significativamente diferente del control sin tratar. # P <0,05, significativamente diferente del tratamiento con AS solo.

Estudios previos han demostrado efectos sinérgicos de los agentes quimioterapéuticos y los fármacos que inhiben la activación de MAPK en la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis de células de leucemia aguda [98,99]. Recientemente nuestro grupo ha descrito cómo inhibidores específicos de MEK 1/2 pueden servir como sensibilizadores hacia la apoptosis inducida por el tetraacetato del 3-metiléter de la quercetina en células de leucemia humana [96].

En cambio, la inhibición farmacológica de la $p38^{MAPK}$ utilizando el inhibidor SB203580 (2 μ M) no disminuyó significativamente la muerte celular inducida por AS.

Estos resultados indican que la inhibición de la vía de ERK aumenta la muerte celular inducida por AS, mientras que la proteína quinasa p38^{MAPK} no está involucrada en la muerte celular inducida por AS.

5. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son necesarias para la muerte celular inducida por AS.

La mayoría de los agentes inductores de la apoptosis liberan especies reactivas de oxígeno, que se consideran mediadores de la señalización de apoptosis.

Puesto que el aumento de producción de ROS en las células leucémicas puede conducir a la activación de las MAPKs y la muerte celular [100,101], decidimos investigar si las ROS están implicadas en la apoptosis inducida por As. Para esto, las células tratadas con As fueron cargadas con el colorante fluorescente 2',7'diacetato diclorodihidrofluoresceína y luego analizadas por citometría de flujo.



Figura 21. As induce la generación de ROS. (A) As aumenta la generación de ROS en células HL-60. Las células se trataron con AS (30 μ M) durante 1 h o con AS 10 μ M durante los tiempos indicados (B) y la fluorescencia obtenida por la oxidación de H2-DCF-DA se determinó mediante citometría de flujo. (C) Las células se preincubaron con Nacetil-L-cisteína (NAC, 10 mM) durante 1 h y después se trataron con As durante 24 horas y los niveles de ROS intracelulares se determinaron como anteriormente. (D) Las células se trataron previamente con 10 mM de NAC y luego se trató con AS y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados representan el porcentaje de las células hipodiploides (sub- G_1) (media \pm SE) de tres experimentos diferentes cada uno realizado por triplicado. * P <0,05, significativamente diferente del control sin tratar. # P < 0.05, significativamente diferente del tratamiento solo.



Como se muestra en la Figura 21A, la formación de ROS se detectó a la hora del tratamiento y curiosamente, los experimentos de curso temporal demuestran que hay dos picos de la generación de ROS (Figura 21B).

Para determinar si las ROS están implicados en la muerte celular inducida por As, las células se trataron previamente con 10 mM de *N*-acetil-L-cisteína (NAC), un precursor de glutatión reducido y eliminador de radicales libres.

Como se muestra, NAC inhibió completamente la generación de ROS (Figura 21C) y la apoptosis (Figura 21D), lo que indica que las ROS juegan un papel crucial en el mecanismo de la muerte celular provocada por As.



Aunque existen tratamientos eficaces para la leucemia linfocítica aguda y la leucemia mielógena crónica, se necesitan tratamientos más eficaces para otras formas de leucemia aguda.

Este objetivo ha llevado a un interés creciente en el desarrollo de productos naturales para la prevención o el tratamiento del cáncer. En este sentido, el uso de agentes naturales para prevenir el desarrollo o la recurrencia de distintos tipos de cáncer ha sido ampliamente aceptado como una opción realista para combatir la enfermedad.

Los compuestos que contienen el grupo funcional α metilen- γ -butirolactona han atraído mucha atención, particularmente las lactonas sesquiterpénicas citotóxicas. La opinión generalizada es que estas lactonas ejercen sus efectos biológicos actuando como agentes alquilantes, formando aductos covalentes *in vivo* con las proteínas y otras biomoléculas con grupos funcionales nucleófilos, a través de una adición de tipo Michael de un grupo sulfhidrilo libre o una amina [8].

En este estudio, se han evaluado las potenciales propiedades citotóxicas de las lactonas sesquiterpénicas naturales, la AS y la Ta, utilizando varias líneas de células tumorales. Curiosamente, encontramos que muestran propiedades citotóxicas en las células de leucemia humana (HL-60, U937, y Molt-3) y en la línea celular de melanoma humano SK-MEL-1, pero no en la línea celular de adenocarcinoma humano A549. Esto significa que los efectos de AS y Ta son generalmente específicos de células (dependiendo del tipo celular).

Los valores de IC_{50} fueron de aproximadamente 5 μ M en las líneas celulares de leucemia y de melanoma para AS y de aproximadamente 10 μ M para la Ta. Aunque se necesitan más estudios para determinar los mecanismos implicados en la muerte celular de SK-MEL-1, este resultado es muy interesante teniendo en cuenta que el melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel y con frecuencia es resistente a la quimioterapia.

También demostramos que tanto AS como Ta , son citotóxicos en células de leucemia humana que expresan niveles elevados de Bcl-2 y Bcl- x_L . Estas proteínas antiapoptóticas confieren resistencia a la apoptosis mediante la inhibición de la transición de la permeabilidad mitocondrial , la acumulación citosólica del citocromo c y la activación de las caspasas ejecutoras de la apoptosis [102,103].

El hecho de que las proteínas protectoras de las mitocondrias Bcl-2 y Bcl-xL sean incapaces de impedir

110

la citotoxicidad inducida (Tabla 2) sugiere que estas lactonas sesquiterpénicas provocan una vía alternativa que circunvala a las mitocondrias o que son capaces de inactivar la protección conferida por estas proteínas. En este sentido, estudios previos han demostrado la inactivación de Bcl-2 por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la escisión por las caspasas y la hiperfosforilación [104,105].

Además, dado que las lactonas sesquiterpénicas reaccionan covalentemente tiol con grupos 0 sulfhidrilos, AS v Та podrían inducir un entrecruzamiento de la proteína translocadora de nucleótidos de adenina, una proteína transportadora del poro de transición de permeabilidad situada en la membrana mitocondrial interna, y por tanto podría eludir el efecto antiapoptótico de los miembros de la familia Bcl-2.

El análisis del ciclo celular reveló que las lactonas sesquiterpénicas naturales AS y Ta inducen la parada del ciclo celular en la fase G_2 -M, que va acompañada con un aumento de la fracción sub- G_1 , lo que indica la muerte celular apoptótica. Resultados similares han sido publicados recientemente para la lactona sesquiterpénica 1,6 - O, O-diacetilbritannilactona en células HL-60 [106] Previamente nuestro grupo ha publicado la capacidad de las lactonas sesquiterpénicas que contienen un esqueleto germacranolida para inducir la muerte celular en las líneas celulares de leucemia HL-60 y U937[90]. Además, la helenalina, una lactona sesquiterpénica del tipo pseudoguayanolida, induce la apoptosis en células de leucemia humana Jurkat[107].

Sin embargo, aún no hay estudios que hayan abordado la citotoxicidad de la AS o de la Ta en líneas de leucemia y de melanoma humanas. Nuestros resultados también indican que el efecto antiproliferativo de estas lactonas implica una inducción de apoptosis dependiente de caspasa ya que el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk protegió casi completamente a las células HL-60. Estos compuestos inducen la liberación de citocromo c, incluso en las células HL-60/Bcl-x₁ y la activación de las caspasas-9, -7, -6, y -3, enfatizando que la vía intrínseca juega un papel importante en la muerte de la célula. Sin embargo, el mecanismo de citotoxicidad mostrada por AS y Ta se diferencia claramente del de las lactonas sesquiterpénicas descritas anteriormente. Por ejemplo, la lactona sesquiterpénica arucanolida induce la apoptosis en células HL-60 por un mecanismo independiente de caspasas ya que los inhibidores de caspasas son incapaces de revertir la muerte celular, la caspasa-9 no se activa y no se detecta la liberación de citocromo c mitocondrial [108].

En isocostunolida, contraste, la una lactona sesquiterpénica aislada de Inula helenium. desencadena la apoptosis a través de los efectos cooperativos de las vías extrínseca e intrínseca [109]. Además, la lactona sesquiterpénica partenolida, uno de los componentes más importantes de matricaria (Tanacetum parthenium), induce apoptosis a través de las vías extrínseca e intrínseca y activa la caspasa-8, la caspasa-3, y la caspasa 9. Sin embargo, los niveles de activación de la caspasa-8 y de la caspasa-3 son más pronunciadas que la caspasa-9 [110].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se han implicado como segundos mensajeros en múltiples vías de señalización [111]. El efecto antiproliferativo de las lactonas sesquiterpénicas de origen natural incluidos en este estudio está asociado con un aumento en el nivel intracelular de ROS, que fueron detectables después de 1 h de tratamiento y se mantuvieron elevadas durante al menos 120 min.

Curiosamente, se observó un segundo pico de la generación de ROS a las 6 h de tratamiento, aunque desconocemos por el momento la importancia biológica de este efecto. Además, las ROS parecen jugar un papel crucial ya que la preincubación con el

antioxidante *N*-acetil-L-cisteína bloqueó la generación de ROS y la apoptosis en células HL-60. Este resultado también sugiere que, AS cambia el estado redox de las células a través de la unión a las biomoléculas que contienen grupos tiol que están implicadas en el mantenimiento del equilibrio redox, como el glutatión. Sin embargo, esto requiere confirmación por futuros estudios.

Nuestros resultados son consistentes con los derivados de los estudios de la partenolida que muestra propiedades contra el cáncer e induce la apoptosis tanto *in vitro* [8,112,113] como en modelos animales [113,114].

Estudios previos han demostrado que la apoptosis inducida por la partenolida en células de mieloma múltiple y en células de leucemia mielógena aguda es dependiente de la generación de ROS v es completamente inhibida (la apoptosis) por NAC, lo que indica el papel crucial del estrés oxidativo en el mecanismo [115,116]. Sin embargo, la generación de ROS no es una característica general de los compuestos contienen el funcional α -metilen- γ que grupo butirolactona. En este sentido, la isocostunolida induce la apoptosis en células de melanoma humano por un mecanismo independiente de ROS [109].

Estudios recientes sugieren que las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), tales como las proteínas quinasas N-terminal de c-Jun / proteínas quinasas activadas por estrés (JNK / SAPK 1 /2) y p38^{MAPK} desempeñan un papel clave en la inducción de la apoptosis en respuesta a diversos factores celulares, incluyendo el estrés oxidativo [117]. En el presente estudio, mostramos que la fosforilación p38^{MAPK} tiene lugar antes de la activación de las caspasas en términos de tiempo (30 min). Sin embargo, el inhibidor de p38^{MAPK} SB203580 no atenúa la apoptosis, lo que sugiere que la activación de p38^{MAPK} no se requiere para la muerte celular inducida por AS.

Esta lactona sesquiterpénica también aumenta la activación de la vía de MEK/ERK1/2 y la combinación de AS y los inhibidores específicos PD98059 o U0126 potencian la muerte celular. Estos resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas para el uso de As en combinación con inhibidores MEK1 / 2 como potenciales agentes terapéuticos.

La inducción de la fosforilación de MAPK a menudo se produce muy rápidamente. En cambio, la condensación de la cromatina es un acontecimiento posterior en la cascada apoptótica.

La activación de ERK1 / 2 puede desencadenar tanto efectos antiapoptóticos como proapoptóticos,

dependiendo de los estímulos y del tipo celular, aunque en la mayoría de los casos ejerce efectos citoprotectores. Nuestros datos sugieren que ERK1 / 2 está involucrada en las señales de supervivencia, ya que los inhibidores de MEK1 / 2 potencian los efectos apoptóticos de AS.

El aumento de la apoptosis en células HL-60 cuando la vía ERK está bloqueada puede parecer contradictorio con el aumento de la muerte celular provocada por AS en PBMC activadas.

Una posible explicación podría ser que la AS es capaz de disminuir el nivel de glutatión intracelular, así como la capacidad proliferativa. Se ha demostrado que una reducción de glutatión en los linfocitos causa una disminución de la actividad proliferativa en estas células [118,119], puesto que estas células requieren glutatión para la progresión de la fase G1 a la fase S [120,121]. Este efecto hipotético de la AS (la disminución de glutatión intracelular) está apoyado por estudios previos que muestran que las lactonas sesquiterpénicas influyen en los niveles de glutatión intracelular [122].

Además, los estudios sobre la citotoxicidad de las helenanolidas en líneas celulares de cáncer que difieren en sus niveles intracelulares de glutatión, han puesto de manifiesto que tanto la helenalina como los derivados de la chamissonolida son menos citotóxicos hacia las células con un mayor nivel de glutatión [123]. Teniendo en cuenta que la AS induce la generación de ROS, la respuesta predominante podría ser una disminución de los niveles de glutatión reducido intracelulares. Por otra parte, la generación de ROS activada por la AS podría agotar los niveles de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) y de ese modo indirectamente, interferir con la función de la glutatión reductasa [124].

En conclusión, las lactonas sesquiterpénicas de origen natural evaluadas en el presente estudio son fuertemente citotóxicas contra las líneas de leucemia y de melanoma humanas ensayadas, implicando perturbaciones en el ciclo celular y la apoptosis caspasa – dependiente mediada por un mecanismo dependiente de ROS.

La síntesis química de esta clase de compuestos puede permitir el descubrimiento y obtención de nuevos fármacos y agentes antitumorales, altamente específicos contra las células de leucemia. 118

•



 Hemos evaluado la actividad antitumoral de dos lactonas sesquiterpénicas naturales en cinco líneas tumorales humanas. Las líneas de leucemia humana, incluidas las mieloides (HL-60 y U937) y las linfoides (Molt-3) y también las de melanoma humano (SK-MEL-1) fueron, en general, las que mostraron mayor sensibilidad a estos compuestos.

2. La citotoxicidad inducida por la asteriscunolida A y la tanapsina presenta especificidad frente al tipo de línea celular ya que las células de la línea A549 (cáncer de pulmón) fueron muy resistentes a la acción de estas lactonas.

 No presentan efectos citotóxicos en los linfocitos obtenidos de voluntarios sanos a concentraciones que si lo son en las líneas celulares estudiadas.

4. Tanto la asteriscunolida A como la tanapsina inducen una parada del ciclo celular en la fase G_2 -M.

 Las lactonas sesquiterpénicas objeto de este estudio inducen apoptosis en células de leucemia mieloide humana y de melanoma humano.

6. La asteriscunolida Α la tanapsina inducen V apoptosis а través de un mecanismo que es dependiente de la actividad caspasa. Las caspasas -9 - 7, -6 y -3, desempeñan un papel principal, mientras que la caspasa -8 no está involucrada.

7. La expresión de niveles elevados de Bcl-2 y Bcl-xL no confiere ninguna protección a la célula frente a la inducción citotóxica de la asteriscunolida A y la tanapsina.

8. La inhibición de la vía de las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) aumenta la muerte celular inducida por la asteriscunolida A, mientras que la proteína quinasa p38^{MAPK} no está involucrada en la muerte celular inducida por esta lactona sesquiterpénica.

9. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel crucial en el mecanismo de la muerte celular inducida por la asteriscunolida A.

Los datos del presente estudio proporcionan evidencias acerca del mecanismo por el que la asteriscunolida A y la tanapsina inhiben el crecimiento de las células tumorales mieloides humanas e inducen apoptosis y sugieren que la síntesis química de esta clase de compuestos puede permitir el descubrimiento y obtención de nuevos fármacos y agentes antitumorales, altamente específicos contra las células de leucemia.



1. Siegel, R.;Naishadham, D.;Jemal, A. Cancer statistics, 2013. Cancer Journal for Clinicians 2013;63(1):11-30

2. WHO. World health statistics 2012. Publications of the World Health Organization 2012

3. SEOM.El Cáncer en España 2012. Boletín de la Sociedad Española de Oncología Médica 2013.

4. Benson JD, Chen YNP, Cornell-Kennon SA et al. Validating cancer drug targets. Nature 2006;441(7092):451-456.

5. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. Blood 2005;106(2):408-418.

6. Sawyers CL. Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. Genes & Development 2003;17(24):2998-3010.

7. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences 2005;78(5):431-441.

8. Zhang S, Won Y-K, Ong C-N, Shen H-M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. Current Medicinal Chemistry Anti-cancer agents 2005;5(3):239-249.

9. Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappa B by directly targeting p65. Journal of Biological Chemistry 1998;273(50):33508-33516.

10. Schmidt TJ. Helenanolide-type sesquiterpene lactones .3. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. Bioorganic & Medicinal Chemistry 1997;5(4):645-653.

11. Bree RT, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. Biogerontology 2002;3(4):195-206.

12. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.. Toxicologic Pathology 2007;35(4):495-516

13. Ziegler U, Groscurth P. Morphological Features of Cell Death. News in Physiological Sciences 2004;**19:124-128**.

14. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. Journal of Immunology 1992;148(7): 2207-2216

15. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000;407(6805):770-776.

16. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 2000;407(6805):784-788.

17. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. Science 1998;281(5381):1312-1316.

18. Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. Cell Death and Differentiation 2002;9(4):358-361.

19. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - An update. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 2008;151(1):10-27.

20. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. Journal of Biological Chemistry 2009;284(33):21777-21781.

21. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 1998;1387(1-2):17-31.

22. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2004;**5(11):897-907.**

23. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annual Review of Biochemistry 2000;69:217-245.

24. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. Cytokine & Growth Factor Reviews 2008;19(3-4):325-331.

25. Cory S, Adams JM. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer 2002;2(9):647-656.

26. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998;281(5381):1309-1312.

27. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death and Differentiation 2003;10(1):45-65.

28. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. Cell 2003;112(4):481-490.

29. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends in Biochemical Sciences 2001;26(6):390-397.

30. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Oncogene 2004;23(16):2850-2860.

31. Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. Journal of Cell Biology 2001;153(1):221-228.

32. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 2001;412(6842):95-99.

33. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today 1997;18(1):44-51.

34. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nature Medicine 2000;6(5):513-519.

35. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. Journal of Experimental Medicine 2000;192(4):571-580.

36. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999;397(6718):441-446.

37. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. Cell 2004;116(2):205-219.

38. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis - Lesson from an uncleavable mutant. Journal of Biological Chemistry 1998;273(50):33533-33539.

39. Helleday T, Bryant HE, Schultz N. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. Cell Cycle 2005;4(9):1176-1178.

40. Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA. Poly(ADPribose)polymerase: A guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. Molecular and Cellular Biochemistry 1999;193(1-2):23-30.

41. Oei SL, Keil C, Ziegler M. Poly(ADP-ribosylation) and genomic stability. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 2005;83(3):263-269.

42. Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2002;3(2):112-121.

43. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral-inhibitor of apoptosis proteins. Cell 1995;83(7):1243-1252.

44. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. EMBO Journal 1996;15(11):2685-2694.

45. Liston P, Roy N, Tamai K et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. Nature 1996;379(6563):349-353.

46. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nature Medicine 1997;3(8):917-921.

47. Chen ZH, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human IAP-family gene, Apollon, expressed in human brain cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999;264(3):847-854.

48. Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. Current Biology 2000;10(21):1359-1366.

49. Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. Journal of Biological Chemistry 2001;276(5):3238-3246.

50. Richter BWM, Mir SS, Eiben LJ et al. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. Molecular and Cellular Biology 2001;21(13):4292-4301.

51. Carter BZ, Gronda M, Wang ZL et al. Small-molecule XIAP inhibitors derepress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells. Blood 2005;105(10):4043-4050.

52. Thome M, Schneider P, Hofmann K et al. Viral FLICEinhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature 1997;386(6624):517-521.

53. Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt - A potent survival signaling cascade for endothelial cells. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 2000;20(2):402-409.

54. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. Oncogene 2008;27(50):6398-6406.

55. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. Journal of Clinical Investigation 2005;115(10):2648-2655.

56. Janiak F, Leber B, Andrews DW. Assembly of bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial-membranes. Journal of Biological Chemistry 1994;269(13):9842-9849.

57. Lithgow T, Vandriel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear-envelope, the endoplasmic-reticulum, and the outer mitochondrial-membrane. Cell Growth & Differentiation 1994;5(4):411-417.

58. O'Reilly LA, Print C, Hausmann G et al. Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. Cell Death and Differentiation 2001;8(5):486-494.

59. Fujise K, Zhang D, Liu JL, Yeh ETH. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1 - Differential

role of proliferating cell nuclear antigen. Journal of Biological Chemistry 2000;275(50):39458-39465.

60. Lindsten T, Ross AJ, King A et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. Molecular Cell 2000;6(6):1389-1399.

61. Wei MC, Zong WX, Cheng EHY et al. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science 2001;292(5517):727-730.

62. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003;304(3):437-444.

63. Cobb MH, Goldsmith EJ. How map kinases are regulated. Journal of Biological Chemistry 1995;270(25):14843-14846.

64. Murray AW. MAP kinases in meiosis. Cell 1998;92(2):157-159.

65. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. Molecular and Cellular Biology 1999;19(4):2435-2444.

66. Alvarez E, Northwood IC, Gonzalez FA et al. Pro-leuser/thr-pro is a consensus primary sequence for substrate protein-phosphorylation - characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth-factor receptor threonine-669 protein-kinase. Journal of Biological Chemistry 1991;266(23):15277-15285.

67. Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human erk1 and ERK2 protein-kinases. Journal of Biological Chemistry 1991;266(33):22159-22163.
68. Davis RJ. The mitogen-activated protein-kinase signaltransduction pathway. Journal of Biological Chemistry 1993;268(20):14553-14556.

69. Assoian RK. Anchorage-dependent cell cycle progression. Journal of Cell Biology 1997;136(1):1-4.

70. Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. Bioessays 2000;22(9):818-826.

71. Cook SJ, Aziz N, McMahon M. The repertoire of Fos and Jun proteins expressed during the G(1) phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation. Molecular and Cellular Biology 1999;19(1):330-341.

72. Lee HJ, Bach JH, Chae HS et al. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase attenuates 3-hydroxykynurenine-induced neuronal cell death. Journal of Neurochemistry 2004;88(3):647-656.

73. Hibi M, Lin AN, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein-responsive and uv-responsive protein-kinase that binds and potentiates the c-jun activation domain. Genes & Development 1993;7(11):2135-2148.

74. Yan MH, Dai TN, Deak JC et al. Activation of stressactivated protein-kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. Nature 1994;372(6508):798-800.

75. Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997;94(14):7337-7342.

76. Moriguchi T, Toyoshima F, Gotoh Y et al. Purification and identification of a major activator for p38 from

osmotically shocked cells - Activation of mitogen-activated protein kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factoralpha, and H_2O_2 . Journal of Biological Chemistry 1996;271(43):26981-26988.

77. Marais R, Wynne J, Treisman R. The srf accessory protein elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell 1993;73(2):381-393.

78. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor atf2 regulation by the jnk signal-transduction pathway. Science 1995;267(5196):389-393.

79. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. Science 1996;272(5266):1347-1349.

80. Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM, Brent R. MXI2, a mitogen-activated protein-kinase that recognizes and phosphorylates max protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995;92(23):10531-10534.

81. Xia ZG, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of erk and jnk-p38 map kinases on apoptosis. Science 1995;270(5240):1326-1331.

82. Verheij M, Bose R, Lin XH et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature 1996;380(6569):75-79.

83. Pfeilschifter J, Huwiler A. Nitric oxide stimulates stress-activated protein kinases in glomerular endothelial and mesangial cells. FEBS Letters 1996;396(1):67-70.

84. Chen YR, Wang XP, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation - Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. Journal of Biological Chemistry 1996;271(50):31929-31936. 85. Chauhan D, Kharbanda S, Ogata A et al. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. Blood 1997;89(1):227-234.

86. Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinasemediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. Journal of Biological Chemistry 2006;281(30):21256-21265.

87. Farley N, Pedraza-Alva G, Serrano-Gomez D et al. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8(+) T cells. Molecular and Cellular Biology 2006;26(6):2118-2129.

88. Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R et al. c-Jun Nterminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. Biochemical Journal 2003;372:359-369.

89. Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. Molecular and Cellular Biology 1997;17(1):170-181.

90. Rivero A, Quintana J, Eiroa JL et al. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. European Journal Of Pharmacology 2003;482(1-3):77-84.

91. Cabrera J, Quintana J, Reiter RJ, Loro J, Cabrera F, Estevez F. Melatonin prevents apoptosis and enhances HSP27 mRNA expression induced by heat shock in HL-60 cells: possible involvement of the MT2 receptor. Journal of Pineal Research 2003;35(4):231-238.

92. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976;72:248-254.

94. Rubio S, Quintana J, López M, Eiroa J, Triana J, Estévez F. Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. European Journal of Pharmacology 2006;548(1-3):9-20.

95. Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS et al. Avicins: triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America 2001;98(10):5821-5826.

96. Rubio S, Quintana J, Eiroa J, Triana J, Estévez F. Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. Carcinogenesis 2007;28(10):2105-2113.

97. Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. Blood 2003;101(12):4667-4679.

98. Jarvis WD, Fornari FA, Tombes RM et al. Evidence for involvement of mitogen-activated protein kinase, rather than stress-activated protein kinase, in potentiation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis by interruption of protein kinase C signaling. Molecular Pharmacology 1998;54(5):844-856.

99. Yu CR, Wang SJ, Dent P, Grant S. Sequencedependent potentiation of paclitaxel-mediated apoptosis in human leukemia cells by inhibitors of the mitogen-activated protein kinase kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. Molecular Pharmacology 2001;60(1):143-154.

100. Chen YR, Wang WF, Kong ANT, Tan TH. Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. Journal of Biological Chemistry 1998;273(3):1769-1775.

101. Zhuang SG. Demirs JT. Kochevar IE. p38 mitogenkinase mediates bid activated protein cleavage. mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. Journal Biological of Chemistry 2000;275(34):25939-25948.

102. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. Current Opinion in Immunology 2007;19(5):488-496.

103. Yang J, Liu XS, Bhalla K et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997;275(5303):1129-1132.

104. Fadeel B, Hassan Z, Hellstrom-Lindberg E, Henter JI, Orrenius S, Zhivotovsky B. Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. Leukemia 1999;13(5):719-728.

105. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Molecular and Cellular Biology 1999;19(12):8469-8478.

106. Pan M-H, Chiou Y-S, Cheng A-C et al. Involvement of MAPK, Bcl-2 family, cytochrome c, and caspases in induction of apoptosis by 1,6-O,O-diacetylbritannilactone in human leukemia cells. Molecular Nutrition & Food Research 2007;51(2):229-238.

107. Dirsch VM, Stuppner H, Vollmar AM. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis. Planta Medica 2001;67(6):557-559.

108. Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N et al. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing

factor. Journal of Pharmacological Sciences 2005;97(2):242-252.

109. Chen C-N, Huang H-H, Wu C-L et al. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. Cancer Letters 2007;246(1-2):237-252.

110. Suvannasankha A, Crean CD, Shanmugam R et al. Antimyeloma effects of a sesquiterpene lactone parthenolide. Clinical Cancer Research 2008;14(6):1814-1822.

111. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 2004;55:373-399.

112. Zhang S, Ong CN, Shen HM. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. Cancer Letters 2004;208(2):143-153.

113. Sweeney CJ, Mehrotra S, Sadaria MR et al. The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. Molecular Cancer Therapeutics 2005;4(6):1004-1012.

114. Won YK, Ong CN, Shi XL, Shen HM. Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. Carcinogenesis 2004;25(8):1449-1458.

115. Wang W, Adachi M, Kawamura R et al. Parthenolideinduced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity. Apoptosis 2006;11(12):2225-2235.

116. Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of

human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. Blood 2005;105(11):4163-4169.

117. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. Embo Reports 2001;2(3):222-228.

118. Liang CM, Lee N, Cattell D, Liang SM. Glutathione regulates interleukin-2 activity on cyto-toxic t-cells. Journal of Biological Chemistry 1989;264(23):13519-13523.

119. Kavanagh TJ, Grossmann A, Jaecks EP et al. Proliferative capacity of human peripheral-blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content. Journal of Cellular Physiology 1990;145(3):472-480.

120. Hamilos DL, Mascali JJ, Wedner HJ. The role of glutathione in lymphocyte-activation .2. effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one on early and late activation events. International Journal of Immunopharmacology 1991;13(1):75-90.

121. Messina JP, Lawrence DA. Cell-cycle progression of glutathione-depleted human peripheral-blood mononuclearcells is inhibited at s-phase. Journal of Immunology 1989;143(6):1974-1981.

122. Robles M, Aregullin M, West J, Rodriguez E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. Planta Medica 1995;61(3):199-203.

123. Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM et al. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from arnica species against the glc(4) and the colo-320 cell-lines. Planta Medica 1994;60(5):434-437.

124. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunology Today 1994;15(1):7-10.



Autores: Marrero, MT; Estevez, S; Negrín, G; Quintana, J; López, M; Pérez, FJ; Triana, J; León, F; Estévez, F Título: Ayanin diacetate-induced cell death is amplified by TRAIL in human leukemia cells Revista Biochemical and Biophysical Research : Communications Volumen: 428 Páginas: 116-120 Fecha: 2012 Indicios de calidad A) Base de datos de indexación: Journal Citation Reports B) Año: 2011 C) Índice de impacto: 2.484 C) Posición que ocupa la revista en la categoría: 173 de 290 D) Categoría: Biochemistry & Molecular Biology E) Número de citas recibidas: 0

Autores: **Negrín, G**; Eiroa,JL; Morales, M; Triana, J; Quintana, J; Estevez, F

Título: Naturally Occurring Asteriscunolide A Induces Apoptosis and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Human Tumor Cell Lines

Revista: Molecular Carcinogenesis

Volumen: 49 Páginas : 488-499 Fecha: 2010 Indicios de calidad

A) Base de datos de indexación: Journal Citation Reports

B) Año: 2010

C) Índice de impacto: 3.265

C) Posición que ocupa la revista en la categoría: 63 de 185

- D) Categoría: Oncology
- E) Número de citas recibidas: 7

Cabrera, J; Negrín, G, Estévez, F; Loro, J, Autores: Reiter, RJ; Quintana, J Título: Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells Revista: Journal of Pineal Research Volume:49 Páginas:45-54 Fecha: 2010 Indicios de calidad A) Base de datos de indexación: Journal Citation Reports

- C) Índice de import
- C) Índice de impacto: 5.855
- C) Posición que ocupa la revista en la categoría: 17 de 122
- D) Categoría: Endocrinology & Metabolism
- E) Número de citas recibidas: 17

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Autores: **Gledy Negrín**, J.L. Eiroa, M. Morales, J. Triana, J. Quintana and F. Estévez

Título: Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of asteriscunolide A and tanapsin on human melanoma and leukaemic cell lines Congreso: XI Meeting of the Spanish Association for Cancer Research (ASEICA) on Translational Oncology

Participación: Ponente

Lugar: Las Palmas de Gran Canaria Fecha: 2007

Autores: **Gledy Negrín**, J.L. Eiroa, M. Morales, J. Triana, J. Quintana and F. Estévez

Título: Induction of G2-M phase arrest and apoptosis by naturally occurring α -methylene- γ -butyrolactones in human leukemia cells

Congreso: 5th Meeting of the Young cancer Investigators of the Canaries (5th YCIC) and 3rd Meeting of the Young Biomedicinal Investigators of the Macaronesia (3rd YBIM) Participación: Ponente

Lugar: La Laguna, Tenerife Fecha: 2008

Autores: **Gledy Negrín**, J.L. Eiroa, M. Morales, J. Triana, J. Quintana and F. Estévez

Título: Natural occurring sesquiterpene lactones induce apoptosis and activation of mapk pathway on human tumor cell lines

Congreso: 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference

Participación: Poster Lugar: Atenas, Grecia

Fecha: 2008

Autores: **Gledy Negrín**, J. Quintana and F. Estévez Título: Classification of cell death Congreso: 6th Meeting of the Young Cancer Investigators of the Canary Islands. Participación: Ponente Lugar: Las Palmas de Gran Canaria Fecha: 2009