



**Universidad
Andrés Bello**

**Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología**

UNIVERSIDAD NACIONAL
ANDRÉS BELLO



35613000188281

660.6062
B713
0041
01

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de
Magíster en Biotecnología

**“Mecanismo de acción por el cual Leptocarpina
induce muerte celular programada en células”.**

CLAUDIA ANDREA BOSIO ROJAS

VIÑA DEL MAR-CHILE

2014



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Mecanismo de acción por el cual Leptocarpina
induce muerte celular programada en células.**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de
Magíster en Biotecnología.

Directores de Tesis:

Dr. Joan Villena

Facultad: Medicina

Universidad de Valparaíso

Dr. Rolando Martínez

Departamento de Química: Facultad Ciencias Exactas

Universidad Andrés Bello

Claudia Bosio Rojas

Viña del Mar, Chile.

Mayo, 2014.



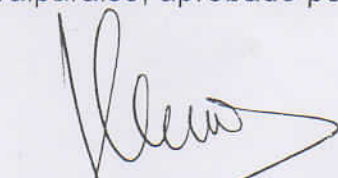
**Universidad
Andrés Bello**

**Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología**

**“Mecanismo de acción por el cual Leptocarpina
induce muerte celular programada en células”.**

CLAUDIA ANDREA BOSIO ROJAS

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Joan Villena, en el laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Universidad de Valparaíso, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.



Dr. Joan Villena
Director de Tesis



Dr. Rolando Martínez
Director de Tesis



Dr. Mauricio Cuellar
Comisión de Tesis



Dr. Jaime Villegas
Comisión de Tesis



Dra. María Isabel Oliver
Directora Escuela Ingeniería en
Biotecnología

VIÑA DEL MAR-CHILE

2014

Dedicatoria

Dedico esta tesis a las dos grandes referencias en mi vida, mi madre que creyó en mí durante este largo camino, que me demostró que en la vida todo se puede lograr a través del esfuerzo, mi abuela que tuvo la paciencia y la dedicación de enseñarme tantas cosas, nunca podría haber llegado a este lugar sin ellas dos.

Otra parte importante en mi vida al que agradezco acompañarme en este proceso es a mi novio Giacomo siempre estuviste conmigo ayudándome cuando lo necesitaba, gracias por tu cariño y paciencia.

Por último, dedico esta tesis a todos mis amigos.

Muchas gracias a todos, este trabajo es para ustedes.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Andrés Bello y en especial al profesor Dr. Rolando Martínez por haberme dado la oportunidad de poder trabajar con el en mi tesis de magíster mediante la financiación estatal por medio de un proyecto FONDECYT. También quiero agradecer por todo el apoyo obtenido por parte de la escuela de Ingeniería en Biotecnología de la universidad a la cual pertenezco, con un especial agradecimiento a la secretaria Laura Chiang quien siempre nos apoyo incondicionalmente.

Además agradezco a la Universidad de Valparaíso que me permitió realizar mis prácticas y mi trabajo de investigación en su Centro de Investigaciones Biomédicas, sin su apoyo no podría haber llevado a cabo este trabajo de investigación y por ende haber terminado mi proceso formativo como alumno de Ingeniería en Biotecnología. Un especial agradecimiento es a mi profesor guía, el Dr. Joan Villena, quien me ha ayudado y guiado a través de este camino orientandome hacia el camino correcto para poder desarrollar correctamente este proceso de formativo y de investigación que ha sido mi tesis.

Índice

1. Resumen	6
Abstract.....	7
2. Introducción.....	8
Cáncer.....	8
NF-kB.....	14
HIF-1.....	16
Lactonas sesquiterpénicas y su influencia en la terapia anti cáncer.....	19
Leptocarpina.....	22
Hipótesis.....	24
3. Materiales y Métodos.....	25
Métodos.....	25
3.1. Cultivo Celular.....	25
3.2. Compuesto Natural.....	25
3.3. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo de Sulforodamina B (SFB).....	26
3.4. Clonogenia.....	27
3.5. Determinación del tipo de muerte celular.....	27
3.5.1. Análisis de la morfología celular y nuclear por medio de tinción de Hoechst 33342.....	27
3.5.2. Determinación del potencial mitocondrial mediante citometría de flujo.....	28
3.5.3. Detección de Células Apoptóticas mediante Citometría.....	28
3.5.4. Determinación de la activación de la Caspasa 3.....	29
3.5.4.1. Actividad de Caspasa 3	29
3.5.4.2. Determinación de la viabilidad celular con SRB e inhibidor de Caspasa 3 (Ac-DEVD-CHO).....	29
3.6 Ciclo celular	30
3.7 Análisis de NF-kB.....	30
3.7.1. Actividad de NF-kB.....	30
3.7.2. Determinación de la Inmunolocalización de NF-kB.....	31

3.8. Determinación de la Inmunolocalización de HIF-1 α (Inmunocitoquímica)....	32
3.9. Análisis Estadístico	32
4. Resultados	33
5. Discusión	74
6. Conclusión	81
7. Bibliografía.....	82

1. Resumen

Varios compuestos derivados de plantas en la actualidad están siendo usados en el tratamiento del cáncer. Dentro de este grupo de compuestos las lactonas sesquiterpénicas han tomado gran importancia en la investigación farmacológica ya que presentan variadas propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias. Estas moléculas se encuentran en gran variedad de plantas, entre ellas una planta autóctona chilena, *Leptocarpha rivularis* o más bien conocida como "palo negro". Esta planta presenta una lactona sesquiterpénica llamada leptocarpina, que en estudios anteriores ha demostrado su actividad biológica. En este estudio se determinó que leptocarpina presenta efecto citotóxico sobre las líneas HT-29, PC-3, DU 145, MCF7, MDA MB-231.

Se determinó que leptocarpina induce condensación y/o fragmentación de la cromatina en las líneas estudiadas, indicando un posible proceso de muerte celular por apoptosis. Este proceso apoptótico se validó con el registro del aumento de permeabilidad mitocondrial medido mediante citometría de flujo y el aumento de la actividad de caspasas que se observó tras el tratamiento con leptocarpina. Leptocarpina también es capaz de generar un arresto del ciclo celular en fase G0/G1, además de disminuir la capacidad de las células de generar progenie idéntica genéticamente (capacidad clonogénica).

Finalmente, se determinó mediante inmunocitoquímica que leptocarpina es capaz de inhibir la localización nuclear de los factores NF- κ B y HIF-1 α .

Estos datos sugieren que leptocarpina podría ser un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer. El mecanismo de acción por el cual leptocarpina presenta un efecto citotóxico aun no ha podido ser dilucidado por completo ya que la acción de este compuesto es dependiente del tipo celular tratado pero implicaría factores de transcripción como NF- κ B y HIF-1 α .

Abstract

Several compounds derived from plants are currently being used in cancer therapy. Within this group of compounds sesquiterpene lactones have taken great importance in drug research and presented various anticancer and anti-inflammatory properties. These molecules are found in a variety of plants, including a native Chilean plant, *Leptocarpha rivularis* or rather known as "black bar". This plant has a sesquiterpene lactone called leptocarpin, which in previous studies has shown biological activity. In this study was determined that leptocarpin presents cytotoxic effect on cellular lines HT-29, PC-3, DU 145, MCF7 and MDA MB-231 by cell viability assays with sulforhodamine B.

By staining with Hoechst 33342 we observed leptocarpin induce condensation and/or fragmentation of chromatin in the analyzed lines, indicating a possible process of cell death by apoptosis. The apoptotic process is validated with the registration of the increase of mitochondrial permeability measured by flow cytometry and the increase in caspase activity was observed following treatments with leptocarpin. Leptocarpin is also capable of generate cell cycle arrest in the G0/G1 phase and also decrease the capacity of cells to produce genetically identical progeny (clonogenic capacity).

Finally, it was determined by immunocytochemistry that leptocarpin is capable of inhibiting the nuclear localization of NF- κ B and HIF-1 α factors.

These data suggest that leptocarpin could be a therapeutic agent for cancer treatment. The mechanism of action by which leptocarpin has a cytotoxic effect has not yet been fully elucidated since the action of this compound is dependent on the cell type treated but involve transcription factors such as NF- κ B and HIF-1 α .

2. Introducción

El término cáncer es genérico y se utiliza para denominar un grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del cuerpo. El cáncer es el resultado del crecimiento y división incontrolado de un conjunto de células que no responden a los mecanismos de regulación de la proliferación ni entran en un proceso de muerte celular cuando debería, para mantener la homeostasis (NCI). Estas células pueden llegar a invadir los tejidos cercanos y a dispersarse al resto del organismo (metástasis) dando origen a estas patologías (cáncer en general). El cáncer se presenta como una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, ya que se le atribuyen 7.6 millones de defunciones en el año 2008 lo que equivale aproximadamente al 13% del total de las causas de muerte a nivel mundial. Los principales tipos de cáncer que afectan a la población son: pulmonar (1,4 millones de defunciones), gástrico (740 mil defunciones), hepáticos (700 mil defunciones), colorectal (610 mil defunciones) y mamario (460 mil defunciones). Se sabe que el 70% de estas defunciones ocurren en países de ingresos medios bajos y se prevé que el número de estas seguirá en aumento (OMS).

El cáncer involucra una serie de transformaciones en el genoma, que llevan a la modificación de la expresión de una serie de factores asociados a diferentes procesos, entre los cuales los más relevantes son la proliferación celular, la reparación del ADN y la regulación de la muerte celular. Cambios en estos procesos son los que facilitan el inicio de la transformación celular que conferirá a las células las características cancerígenas que han sido ampliamente descritas y divididas en diez categorías en la actualidad (**Figura 1**) (Hanahan y Weinberg, 2011).

Tan solo entre 5-10% de los casos de cáncer están asociados a factores genéticos, el resto se asocia a factores externos (90-95%) que pueden ser desde agentes físicos como la radiación ultravioleta e ionizante, agentes químicos como aflatoxinas, arsénico, etc., o bien a agentes biológicos como virus, bacterias o parásitos, todos ellos considerados como agentes carcinogénicos.

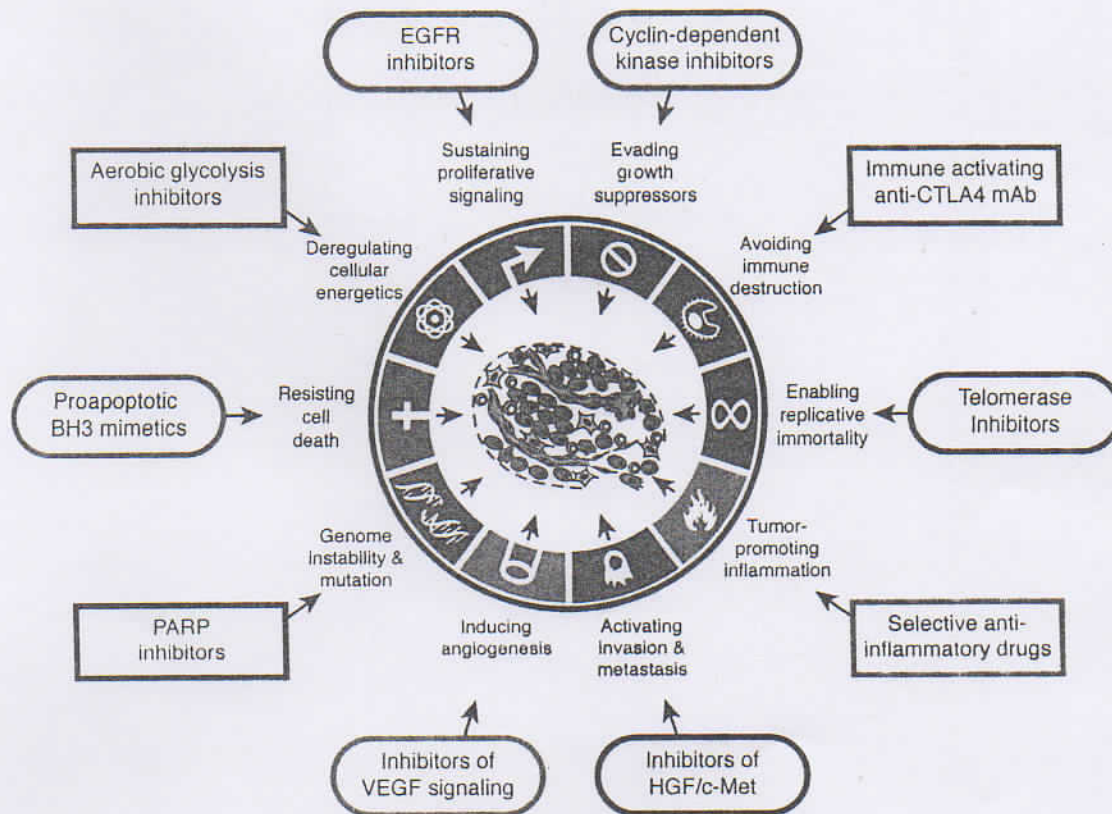


Figura 1. Características propias de las células llamadas cancerígenas (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.- Una de las características más relevantes de una célula cancerígena es la **capacidad de autosostener una señal de proliferación** (Proliferación crónica), a diferencia de las células normales, esta clase de célula genera una desregulación en las señales participantes en los procesos de crecimiento y división, llevando a la célula a una pérdida de su homeostasis, arquitectura y función (Hanahan y Weinberg, 2011).

2.- Además de la capacidad de inducir y de mantener positivamente las señales de estimulación del crecimiento, las células cancerosas también son capaces de **evadir las señales supresoras del crecimiento**, las cuales dependen de la acción de genes supresores de tumores que regulan la proliferación celular. Existen decenas de supresores tumorales que operan de diversas formas, algunos de los más conocidos

son Retinoblastoma (Rb) y p53, que participan en el control de estos procesos (Oren y Rotter, 1999; Hanahan y Weinberg, 2011).

3.- Evasión de la acción del sistema inmune. Las células cancerosas altamente inmunogénicas pueden eludir la destrucción inmune mediante la desactivación de los componentes del sistema inmune que han sido enviados a eliminarlas, esto puede ser llevado a cabo mediante la secreción de factores inmunosupresores (Shields *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010) o por mediante el reclutamiento de células inflamatorias que son activamente inmunosupresoras (Mougiakakos *et al.*, 2010; Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009).

4.- Inmortalidad replicativa, las células cancerosas presentan un potencial de replicación ilimitado, a diferencia de las células normales, que solo son capaces de generar un número limitado de divisiones. Se sabe que los telómeros están involucrados en la capacidad para la proliferación ilimitada y que la telomerasa se expresa a niveles significativos en la gran mayoría (>90%) de las células inmortalizadas, incluyendo las células cancerosas (Blasco, 2005; Shay y Wright, 2000).

5.- Inflamación y promoción del tumor. La respuesta inflamatoria generada por el tumor produciría un aumento de la tumorigénesis y la progresión de este mismo (Colotta *et al.*, 2009; Dvorak, 1986), ya que suministraría moléculas bioactivas (DeNardo *et al.*, 2010; Qian y Pollard, 2010), sustancias químicas y especies reactivas de oxígeno (Grivennikov *et al.*, 2010) para el microambiente tumoral.

6.- Los tumores poseen la capacidad de inducir la neovascularización, proceso denominado **angiogénesis**. Al igual que los tejidos normales, los tejidos tumorales, requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y dióxido de carbono generados, esto se lleva a cabo a través de los vasos sanguíneos. Este proceso permite la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existente (Baeriswyl y Christofori, 2009; Bergers y Benjamin, 2003; Hanahan y Folkman, 1996).

7.- La **Invasión y la Metástasis** implican el desarrollo de alteraciones en la forma celular, así como en la adhesión a otras células y a la matriz extracelular (MEC) (Talmadge y Fidler, 2010; Cavallaro y Christofori, 2004).

8.- La adquisición por parte de las células neoplásicas de las múltiples características enumeradas anteriormente depende en gran parte de una sucesión de **alteraciones en el genoma**. Estos fenotipos mutantes confieren una ventaja selectiva a subclones de células (Hanahan and Weinberg, 2011) a través de la **inestabilidad genética** (Lengauer *et al.*, 1998; Negrini *et al.*, 2010).

9.- La proliferación crónica implica **ajustes en el metabolismo de la energía** con el fin de facilitar el crecimiento y división celular exacerbado. En condiciones normales las células generan el 90% de su ATP mediante la mitocondria en condiciones de niveles de O₂ bajo, como las del microambiente de las células tumorales, estas células generan el 50% de su energía en base a la glicólisis (DeBerardinis *et al.*, 2008 ; Hsu y Sabatini, 2008; Jones y Thompson, 2009).

10.- Las células tumorales presentan la capacidad de evadir la **muerte celular programada**, debido a que esta es una barrera natural para el desarrollo del cáncer. Esta característica está asociada al desarrollo de un alto grado de malignidad y a la resistencia a las terapias (Adams y Cory, 2007; Lowe *et al.*, 2004).

Como ya se indicaba anteriormente, la modificación de factores relacionados a diferentes procesos básicos como la proliferación celular, la reparación del ADN y la regulación de la muerte celular es la base para la génesis tumoral. Se sabe que el balance entre los procesos de división celular (proliferación), migración y muerte celular programada participan en el control del número y tamaño celular, para mantener la homeostasis celular (Hengartner, 2000).

A través del tiempo se han descrito una serie de tipos de muerte celular. La apoptosis es un tipo de muerte celular caracterizada por una serie de alteraciones de la

morfología y la bioquímica de la célula. Las características morfológicas típicas de la apoptosis son la formación de burbujas en la membrana plasmática (blebbing), la condensación de la cromatina con marginación de la cromatina a la membrana nuclear, la fragmentación nuclear (karyorrhexis), la disminución en el volumen celular y la formación de cuerpos apoptóticos (Kerr *et al.*, 1972; Takahashi y Earnshaw, 1996). Los criterios bioquímicos que caracterizan a este proceso incluyen una diferencia en la cinética de la exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática (Denecker *et al.*, 2001; Fadok *et al.*, 1992), cambios en la **permeabilidad de la membrana mitocondrial** (Kroemer y Reed, 2000), liberación de proteínas desde el espacio intermembrana de la mitocondria, y en la mayoría de casos la activación de caspasas y de los procesos dependientes de **caspasas** (Arends y Wyllie, 1991; Harmon *et al.*, 1998; Jacobson *et al.*, 1994). Este proceso de muerte celular es dependiente de ATP y tiene 2 vías de activación una que recibe y procesa las señales extracelulares de muerte (vía extrínseca) y otro que integra las numerosas señales intracelulares que se originan (vía intrínseca) (Fulda y Debatin, 2006) (**Figura 2**). Este proceso es controlado por diversas rutas bioquímicas, convergiendo estas en las vías de activación de las caspasas, predominantes caspasa 3, 6 y/o 7, denominadas caspasas efectoras. (Thornberry *et al.*, 1997). Las caspasas son una familia de cisteínas proteasas y la activación de estas es aceptada bioquímicamente como una característica propia de la apoptosis (Holdenrieder y Stieber, 2004).

Existe una gran diversidad de señales que inducen la apoptosis, generando una barrera para las células cancerosas durante su evolución a un estado maligno. En la vía intrínseca mediada por la mitocondria, participa la familia de proteínas Bcl-2. Esta familia participa en la regulación de la apoptosis. Dependiendo de la cantidad de proteínas que posea cada célula, se determinará si esta es resistente o sensible a la muerte (Adams y Cory, 1998; Antonsson y Martinou, 2000). La influencia que estas proteínas tienen sobre la homeostasis de la mitocondria puede ser tanto directa como indirecta a través de la modulación de proteínas mitocondriales tales como proteínas pertenecientes a la membrana externa mitocondrial, las cuales son las responsables de generar canales o poros. Este cambio conllevará a una alteración fisiológica de la

mitocondria, provocando una ruptura física de la membrana externa y la liberación de las proteínas internas de la mitocondria. Entre estas proteínas encontramos una serie de factores pro-apoptóticos como citocromo C, AIF, Smac/DIABLO y pro-caspasas (2, 3, 9) (Shimizu *et al.*, 1999; Tsujimoto y Shimizu, 2000).

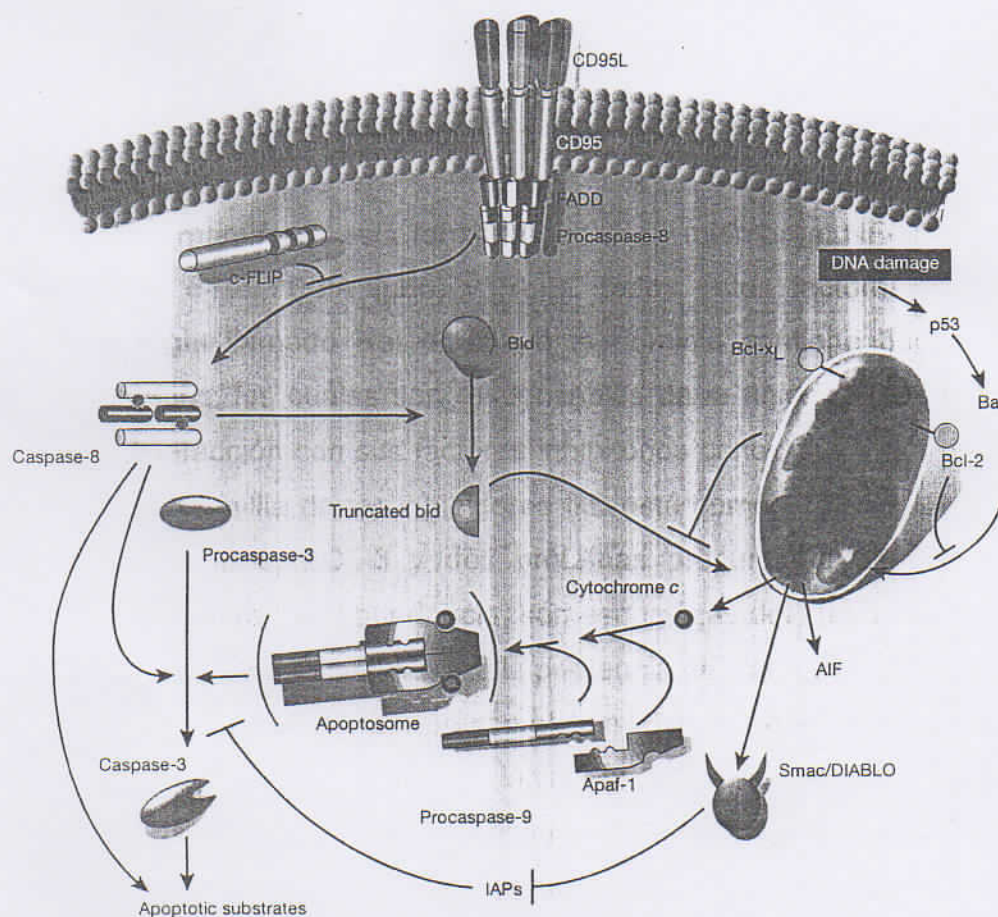


Figura 2. Esquema de las vías de activación de la apoptosis, intrínseca y extrínseca (Hengartner, 2000).

La inducción de la muerte celular es una de las estrategias de tratamiento tumoral en la actualidad.

Factor nuclear kB

El factor nuclear kB (NF-kB) ha sido uno de los factores de transcripción más extensamente investigados por su enorme importancia en la fisiología de vertebrados y por su aparente desregulación en enfermedades humanas entre ellas el cáncer. NF-kB es un importante regulador del **sistema inmune, procesos inflamatorios, adhesión celular, sobrevivencia de la célula, apoptosis, metástasis, invasión celular, quimio y radio resistencia y angiogénesis**, al controlar la expresión de muchos mediadores y efectores dentro de estos procesos (Baichwal y Baeuerle, 1997; Docet *et al.*, 2005).

La familia NF-kB en mamíferos está formada por cinco miembros: NF-kB1 (p50/p105), NF-kB2 (p52/p100), c-Rel, RelA (p65) y RelB. Todos estos factores comparten un dominio de homología llamado Rel (RHD), este dominio contiene 300 aminoácidos altamente conservados, los cuales son responsables de la unión del factor al ADN, la dimerización y la interacción con sus factores inhibitorios conocidos como proteínas IκB (Luo *et al.*, 2005). La familia de los inhibidores IκB está compuesta por siete proteínas IκB-IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, BCL-3 y dos proteínas precursoras p100 y p105. Las proteínas IκB se encuentran en abundancia, son específicas del tipo celular y del tejido. Todas las proteínas IκB se caracterizan por la presencia de cinco a siete repeticiones de anquirina, responsables de la interacción con el sitio RHD de NF-kB, además de un sitio N-terminal regulatorio. IκB es capaz de inhibir la actividad de NF-kB mediante la enmascaramiento de la señal de localización nuclear, impidiendo su acumulación en el núcleo, así como inhibiendo la zona de unión de NF-kB al ADN (Basak *et al.*, 2007; Karin y Delhase, 2000). La vía de activación de NF-kB se induce en respuesta a diversas señales tales como infecciones virales y microbianas, además de la exposición a citoquinas proinflamatorias, las cuales son capaces de activar el complejo quinasa IκB (IKK). El complejo IKK está constituido por 2 subunidades homologas de quinasas, IKKα y IKKβ, y un componente regulatorio no enzimático llamado IKKγ/NEMO. IKK es capaz de fosforilar dos serinas muy bien conservadas ubicadas en el sitio regulador N-terminal de unión de NF-kB y IκB. Esta fosforilación permite que IκB se convierta en objetivo de degradación dependiente de ubiquitina y que el dímero de NF-kB sea

liberado para su translocación al núcleo (Karin y Ben-Neriah, 2000; Li *et al.*, 1999) (Figura 3).

La activación de NF- κ B es fuertemente regulada. En células normales, NF- κ B es activado por diferentes citoquinas proinflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleuquina-1 β (IL-1 β), factor de crecimiento epidermal (EGF), bacterias, lipopolisacaridos (LPS), proteínas virales, doble hebras de ARN y estrés físico y químico (Takada *et al.*, 2006).

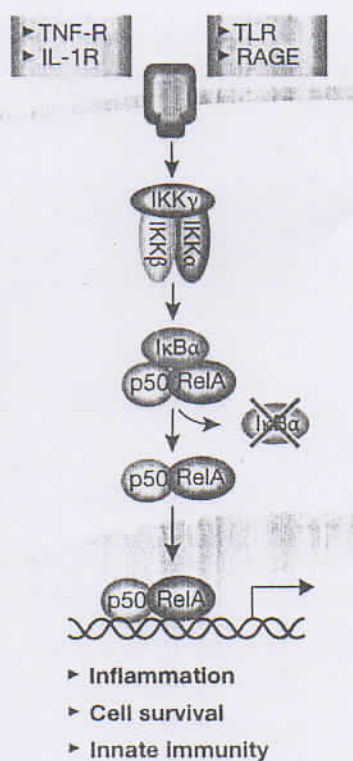


Figura 3. Vía de activación de NF- κ B. En la imagen, se muestra como ejemplo el heterodímero NF- κ B (p50 y RelA). En su estado inactivo, NF- κ B se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B α . A través de receptores de membrana, una variedad de señales extracelular activan la enzima IKK, esta a su vez fosforila la proteína I κ B α que da lugar a la ubiquitinación y disociación del complejo I κ B α -NF- κ B. NF- κ B se activa y entra en el núcleo donde se une a secuencias específicas (Bollrath y Greten, 2009).

Cuando las células se ven expuestas a agentes que dañan el ADN o a $\text{TNF-}\alpha$, se produce la activación de este factor entre otros efectos, lo que permite prevenir la muerte celular mediante la inducción de la expresión de genes anti-apoptóticos (**Figura 4**). También se sabe que NF- κ B es capaz de controlar la activación de ciertos factores pro-apoptóticos tales como CD95L, CD95, TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (Baichwal y Baeuerle, 1997; Debatin, 2004), de ahí su relevancia en el desarrollo tumoral.

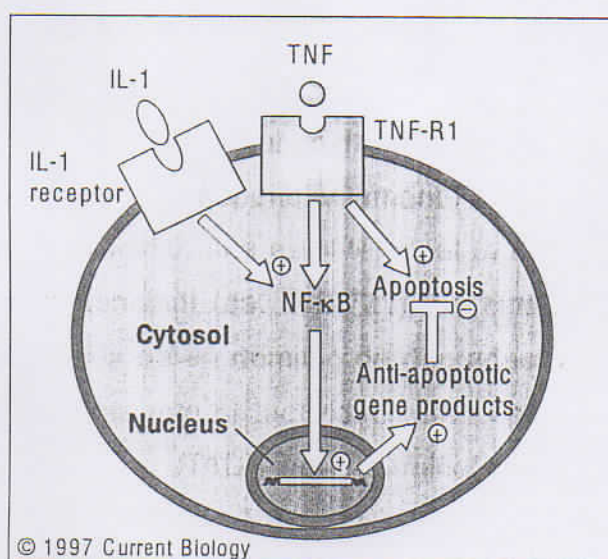


Figura 4. Esquema de participación del factor NF- κ B en el proceso de apoptosis (Baichwal y Baeuerle, 1997).

El microambiente del tumor se asocia a condiciones de **hipoxia** (bajos niveles de O_2), **altos niveles de lactato** (Tennant *et al.*, 2009), **acidificación** y un **aumento de la presión del líquido intersticial** (Milosevic *et al.*, 2004). Se sabe que la hipoxia contribuye a la selección de las células cancerosas resistentes a la apoptosis y media la resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Brown y Giaccia, 1998; Harris, 2002). El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es un regulador maestro de la respuesta transcripcional de las células que se encuentran en situación de privación de oxígeno. HIF-1 está implicado en la regulación de los procesos biológicos fundamentales como: **metabolismo, angiogénesis, apoptosis, metástasis e inflamación** (Denko, 2008;

Giaccia *et al.*, 2003; Semenza, 2003). Existen diferentes subunidades de HIF-1 que desempeñan funciones únicas y específicas, encontrándose sobreexpresadas en diversos tipos de tumores (Harris, 2002).

HIF-1 pertenece a la superfamilia de factores de transcripción eucariotas hélice-bucle-hélice (bHLH) que contienen un sitio de dimerización auxiliar adicional, conocido como dominio PAS. El dominio básico y el extremo carboxi-terminal de PAS se requieren específicamente para la unión de HIF-1 a ADN, mientras que el dominio HLH y el amino-terminal de la PAS son responsables de la dimerización. HIF-1 es un heterodímero compuesto de una de las tres subunidades alfa, es decir, HIF-1 α , HIF-2 α o HIF-3 α , y la subunidad HIF-1 β . La subunidad HIF-1 β se expresa constitutivamente (actividad y número de proteína) independientemente de hipoxia. HIF-1 α contiene dos secuencias de localización nuclear, una es N-terminal (aa. 17-33) en el dominio bHLH, mientras que la otra es C-terminal (aa. 718-721). La estabilidad de esta proteína se regula principalmente a través de un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) (aa. 401-608), mientras que su actividad transcripcional se regula a través de dos dominios de transactivación (TAD), un N-terminal (N-TAD, aa. 531-575) y un C-terminal (C-TAD, aa. 786-826). Estos TAD, son esenciales para la interacción con co-activadores de transcripción tales como AMPc, respuesta a proteína de unión (CREB) y son dianas para la regulación a través de modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, acetilación, y/o modificaciones redox (Semenza *et al.*, 1997; Van Uden *et al.*, 2008).

La regulación del factor se realiza a través de la estabilidad de la subunidad α , en condiciones de normoxia esta proteína es sintetizada y degradada al mismo tiempo, a diferencia de la subunidad 1β que se encuentra constitutivamente presente. La degradación de HIF-1 α se lleva a cabo por una familia de enzimas denominadas sensor de oxígeno. Estas enzimas contienen un dominio prolil hidroxilasa (PHD) y se conocen cuatro isoformas (PHD1 a PHD4). Su actividad es dependiente de la disponibilidad de O₂, 2-oxoglutarato (2-OG) y hierro unido a enzimas (Fe²⁺), estas pueden realizar la hidroxilación de HIF-1 α en dos residuos de prolina distintos (Pro 402 y Pro 564).

Posteriormente, un complejo de ligasa E3-ubiquitina que contiene la proteína de von Hippel Lindau (pVHL), elongina B (ELB), elongina C (ELC), Cul2 y RBX1 forma enlaces de hidrógeno con los residuos de prolina de HIF-1 α hidroxilados, facilitando su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal. La deficiencia de O₂ atenúa la actividad de PHD, previniendo así la unión de pVHL y la posterior ubiquitinación y degradación de HIF-1 α . Al igual que las PHDs, el factor de inhibición de HIF-1 (FIH-1), es dependiente de la presencia de O₂, este inhibidor afecta la unión a ADN y la actividad transcripcional de HIF-1. Una vez que la subunidad α es estable es capaz de generar un heterodímero con la subunidad β , para translocar al núcleo y unirse a sus genes diana (Ke y Costa, 2006; Lee *et al.*, 2004) (Figura 5).

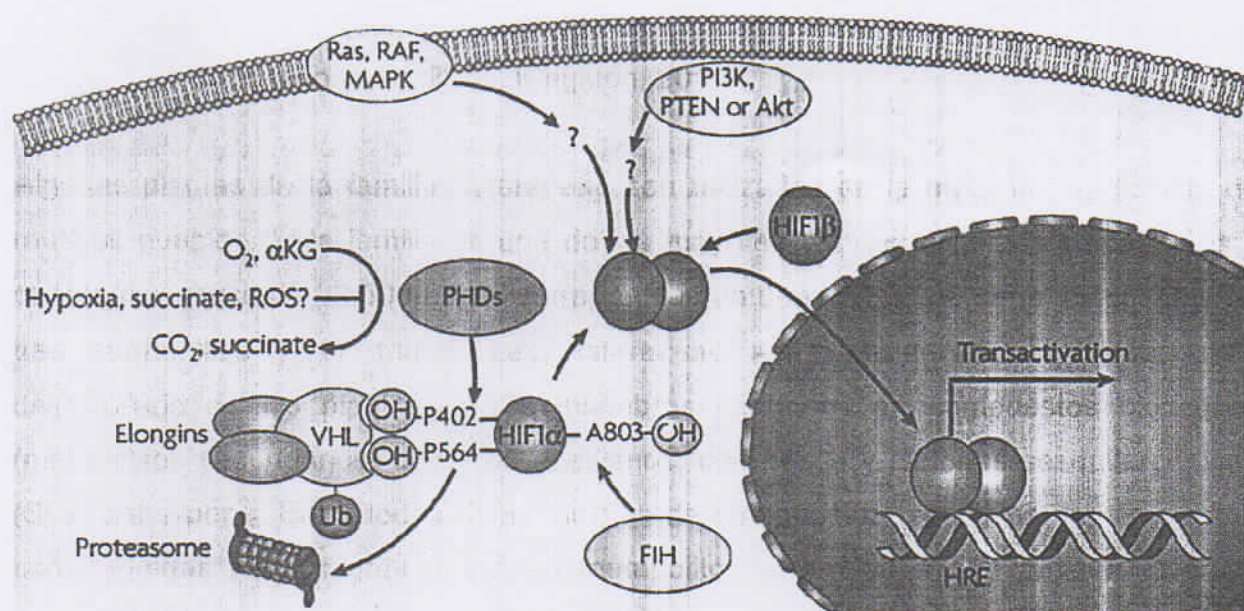


Figura 5. Mecanismo de acción de HIF-1. La degradación del dominio α es a través de la hidroxilación enzimática dependiente de O₂ en P402 y P564. Esta modificación se lleva a cabo por la enzima prolil hidroxilasa (PHD), que media en el reconocimiento y ubiquitinación (Ub) del complejo VHL-elongins de HIF1 α , y posterior degradación proteosomal. Si HIF1 α se ve estabilizado este se une a HIF1 β , para translocar al núcleo y unirse a sus genes dianas (Denko, 2008).

Se sabe que la activación de los procesos apoptóticos dependiente de p53 está asociada a una serie de señales como daño en el ADN, acidosis y/o prolongados periodos de bajos niveles de O₂ (hipoxia). Existe en este último caso una interacción entre HIF-1 y p53 ya sea de forma directa entre los factores o indirecta a través de

MDM2. p53 es capaz de inhibir tanto la actividad a nivel de proteína de HIF-1 como su transcripción, ya que estos dos factores compiten por el co-activador transcripcional p300 (An *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2004).

Lactonas sesquiterpénicas y su influencia en la terapia anti cáncer.

Más del 30% de las plantas superiores conocidas son utilizadas para propósitos de salud y más del 60% de los medicamentos generados contra el cáncer son provenientes de fuentes naturales debido a la gran variedad de compuestos naturales presentes en éstas, teniendo una gran diversidad estructural y siendo biológicamente activos. Esto demuestra que la búsqueda y estudio de nuevos agentes quimiopreventivos y/o quimioterapéuticos en plantas para el tratamiento del cáncer es de gran interés (Cragg *et al.*, 2009; Kingston, 2011).

Algunas plantas de la familia Asteraceae son utilizadas en la medicina tradicional de muchos pueblos. Esta familia es una de las mayores familias de plantas superiores y cuenta con cerca de 23.500 especies repartidas en unos 1.600 géneros, dispuestas en tres subfamilias y 17 tribus. Las Asteraceae son consideradas el grupo más desarrollado de las plantas, y sus miembros son ricos en compuestos bioactivos (metabolitos secundarios) como poliacetilenos, diterpenos y lactonas sesquiterpénicas (SLs) entre otros. Entre todas estas familias de compuestos bioactivos, las SLs están comprendidas por un gran grupo de metabolitos secundarios que poseen diversas actividades biológicas, y más de 5000 variantes estructurales se han caracterizado. La gran diversidad de estructuras que presentan las SLs está probablemente relacionada con la diversidad biológica de estas especies y su éxito ecológico, ya que se encuentran presentes en más de 100 familias de plantas con flores (Orofino Kreugera *et al.*, 2012). **Su actividad farmacológica incluye un amplio abanico de actividades tales como antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral entre otras.** El mecanismo que se ha asociado a la acción de estas moléculas es la unión covalente de las SLs a grupos sulfhídrido presentes en el aminoácido cisteína de las proteínas, lo que alteraría las funciones de estas macromoléculas (**figura 6**). Como resultado las SLs son

capaces de interferir en procesos biológicos claves, tales como **señalización celular, proliferación celular, apoptosis y respiración mitocondrial** (Modzelewska *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006).

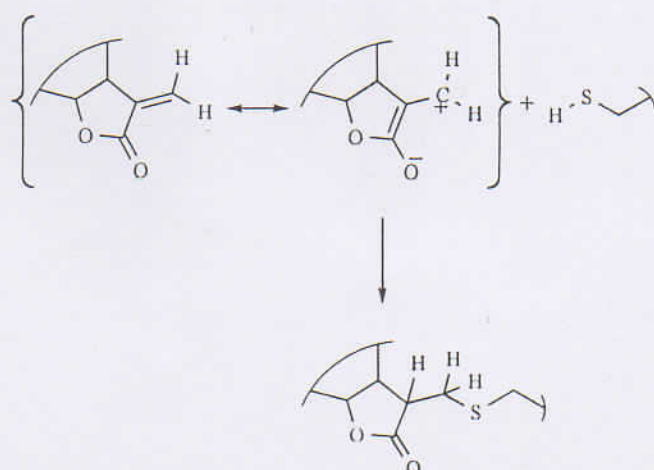


Figura 6. Adición de Michael. Ejemplo del mecanismo de adición de un grupo sulfhidrico que están presente en las cisteínas con el grupo α -metileno- γ -lactona de las lactonas sesquiterpénicas.

Las SLs son esqueletos carbocíclicos de 15 carbonos que se generan a partir de la unión de 3 unidades de isoprenoides, conteniendo un anillo α -metileno- β -lactona bien cis o trans fusionado a la posición C6-C7 o C7-C8 del esqueleto carboxílico con un anillo epóxido (Chaturvedi, 2011; Lee *et al.*, 1971), este último se cree que es generalmente el responsable de la bioactividad de las SL, ya que es capaz de mediar alquilaciones de nucleófilos. Estas interacciones se producen principalmente con grupos sulfhidrilo que contienen grupos tioles y aminos mediante una adición de Michael (Ha *et al.*, 2003; Mathema *et al.*, 2011). Las alquilaciones que se generan sobre las enzimas que contienen estos grupos son irreversibles.

Aunque los mecanismos moleculares implicados en la **apoptosis** inducida por las SLs no han sido bien dilucidados, se cree que la estructura α -metileno- γ -lactona es esencial para la actividad apoptogénica. Una vez que las SLs ingresan a la célula, reaccionan con los tioles existentes, agotándolos. Se sabe que las SLs son capaces de reaccionar con el glutatión reducido que se encuentra libre intracelularmente, esto interfiere con el

balance redox celular, ya que se generan enlaces covalentes entre grupos electrofílicos de las SLs y centros nucleofílicos biológicos, lo que conlleva a la desactivación de estos últimos (Herz, 1977).

Esto conduce a la desregulación del estado redox celular y la inducción de estrés oxidativo. Las especies que se generan tras este estado (ROS-RNS) más el estado redox interrumpido inducen la activación de la vía de la apoptosis dependiente de la mitocondria. Esto provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas, por ejemplo: citocromo C y Smac Diablo, que posteriormente conducen a la activación de caspasas (Choi *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

La **actividad anti-inflamatoria** es una bioactividad asociada a muchos tipos de SLs. Esta actividad se asocia a menudo con la capacidad de las SLs para inhibir la activación de NF- κ B y otros factores de unión a ADN proinflamatorios, tales como AP-1 y Stat3. Esto provoca la inhibición de la transcripción de genes diana como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), interleuquinas (IL) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), así como muchas citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión celular (Borka *et al.*, 1997; Chun *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 1999; Mathema *et al.*, 2011; Mazor *et al.*, 2000).

Algunas SLs inhiben la activación de NF- κ B inducida por diversos estímulos, tales como TPA, TNF, receptor de células T y peróxido de hidrógeno. Esta inhibición se puede producir a diferentes niveles de la vía de señalización de NF- κ B ya que las SLs tienen múltiples dianas moleculares a lo largo de la vía de activación. Algunas de las formas son: el bloqueo de la degradación de la proteína fosforilada I κ B, sin interferir con la actividad de unión a ADN de NF- κ B de forma directa (Hehner *et al.*, 1998). También se sabe que p65 es una diana molecular para las SLs, ya que estas son capaces de generar alquilaciones de dos residuos de cisteína (Cys 38 y Cys 120). La modificación directa de p65 por parte de una SL conduce a la supresión de la unión de NF- κ B al ADN (García-Piñeres *et al.*, 2001; Siedle *et al.*, 2004). Por último la interrupción de la vía de

señalización río arriba de IKK, a nivel de la quinasa PKC α de IKK β (Borka *et al.*, 1997; Chun *et al.*, 2007; Mathema *et al.*, 2011).

También se ha descrito que las SLs provocan una regulación de la actividad del factor de transcripción HIF-1, de forma indirecta ya que se encuentra relacionado con NF- κ B al compartir procesos de regulación y poseer sitios de unión a NF- κ B en sus zonas promotoras, convirtiéndolo en un gen diana (Görlach and Bonello, 2008; Merfort, 2011; Riganti *et al.*, 2009; e Van Uden *et al.*, 2008).

Algunas plantas de la familia Asteraceae, como lo señalamos anteriormente, han sido utilizadas en la medicina tradicional y en la actualidad ampliamente estudiadas como potenciales quimiopreventivos y/o quimioterapéuticos. En estas plantas se encuentran algunas de las SLs más conocidas: partenolide, artemisinina andrografólido costunolide y helenalina (**figura 7**), las que presentan una actividad citotóxica interesante y se sabe que son capaces de promover la **activación de p53** al interactuar con el inhibidor MDM2 y favorecer su ubiquitinación y posterior degradación. Así también se ha descrito que inducen arresto del ciclo celular e inhibición de los factores de transcripción NF- κ B y HIF-1 entre otros (Cheng y Xie, 2011).

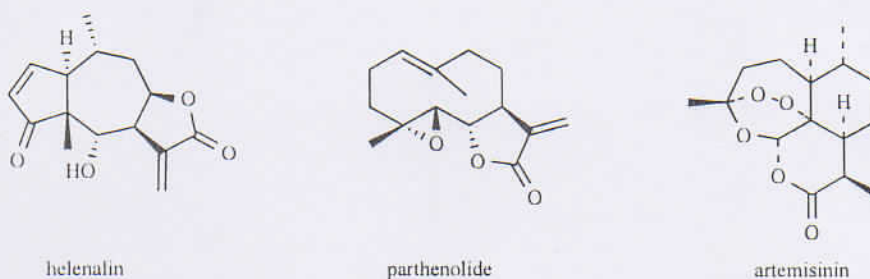


Figura 7. Lactonas Sesquiterpénicas estudiadas en la actualidad (Merfort, 2011).

En nuestro país existe una planta autóctona ampliamente utilizada en la medicina ancestral mapuche denominada "palo negro". El palo negro es un arbusto nativo del sur de Chile, originalmente llamado Cüdu-mamëll (en mapudungun) por los mapuches de Chile. Su nombre científico es *Leptocarpha rivularis* y pertenece a la familia de las

Asteráceas (Figura 8). Las SLs están presentes en un alto porcentaje en la planta, los cuales han sido evaluados presentando un alto potencial inhibitorio del crecimiento celular en numerosos modelos (Chaturvedi, 2011).



Figura 8. Palo negro (*Leptocarpha rivularis*).

Existen estudios anteriores en células cancerígenas que demuestran un efecto citotóxico de ésta SL. Esto se llevó a cabo en las líneas celulares de origen sanguíneo HL60 (leucemia promielocítica) y U937 (leucemia monocítica), además de la línea epitelial HeLa, demostrando que leptocarpina presentó un efecto citotóxico interesante y que es capaz de inducir apoptosis por mecanismos dependientes de p-21^{WAR-1}, un incremento de la expresión de Bax y un aumento de la actividad de caspasa-3 (Martínez *et al.*, 2006). También se demostró que produce una disminución de la expresión de los transportadores de resistencia a multidroga MRP1 y MDR1 (Mena Serey, 2008).

Con los antecedentes mencionados anteriormente, planteamos la siguiente hipótesis:

“Leptocarpina produce muerte celular programada en cultivos celulares tumorales actuando sobre NF- κ B y HIF-1”.

Para lo cual planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo principal:

Determinar el efecto de leptocarpina sobre la muerte celular y la implicación de los factores de transcripción NF- κ B y HIF-1.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar el efecto de leptocarpina sobre viabilidad celular en líneas celulares de cáncer.
- 2.- Determinar la fracción de sobrevivencia (Capacidad clonogenica).
- 3.- Analizar el efecto de leptocarpina sobre la muerte celular.
- 4.- Determinar el efecto de leptocarpina sobre el ciclo celular.
- 5.-Estudiar el efecto de leptocarpina sobre el factor nuclear NF- κ B, tanto en su actividad como en su localización.
- 6.- Determinar el efecto de leptocarpina sobre el factor HIF-1 α .

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivo celular

Se trabajó con cinco líneas celulares de cáncer y dos líneas celulares no tumorales:

- **MDA MB-231 (ATCC código HTB-26®):** Adenocarcinoma de mama proviene de tejido glandular mamario, derivado del sitio metastático.
- **MCF7 (ATCC código HTB-22®):** Adenocarcinoma de mama, proviene de tejido glandular mamario, no presenta actividad de caspasa 3.
- **DU 145 (ATCC código HTB-81®):** Carcinoma metastático de próstata, no expresan antígeno de próstata, presentan múltiples mitocondrias.
- **PC-3 (ATCC código CRL-1435®):** Adenocarcinoma Metastático de Próstata, se aisló a partir de una metástasis ósea de grado IV.
- **HT-29 (ATCC código HTB-38®):** Adenocarcinoma de colon.
- **DHF:** cultivo primario no tumoral de fibroblastos de dermis humana.
- **CCD 841 CoN (ATCC código CRL-1790®):** Células epiteliales de Colon.

Los cultivos celulares fueron mantenidos en DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Ham's F-12 Nutrient Mixture (1:1), Amfotericina (Fungizone 250 µg/ml) a una concentración de 2.5 µg/ml, Penicilina/Streptomicina (10.000 unidades/ml Penicilina y 10.000 µg/ml Estreptomicina) a una concentración de 100 unidades/ml y 100 µg/ml respectivamente y que fue suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% del volumen total, en una incubadora a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂.

3.2 Compuesto Natural

La leptocarpina, se obtuvo de la planta *Leptocarpa rivularis*, fue aislado y purificado en el laboratorio de química de la Universidad Andrés Bello mediante técnicas de laboratorio específicas como se indica a continuación. La extracción se realizó utilizando acetato de etilo o etanol y el extracto obtenido por este método se purificó mediante cromatografía en columnas de sílice con mezcla de solventes de polaridad creciente. El compuesto final obtenido de estos procedimientos es denominado leptocarpina (**Figura**

9) y posee un peso molecular de 362 g/mol, presentando solubilidad en agua y dimetilsulfóxido (DMSO) (Martinez *et al.*, 2006). El método utilizado es de bajo costo y alto rendimiento.

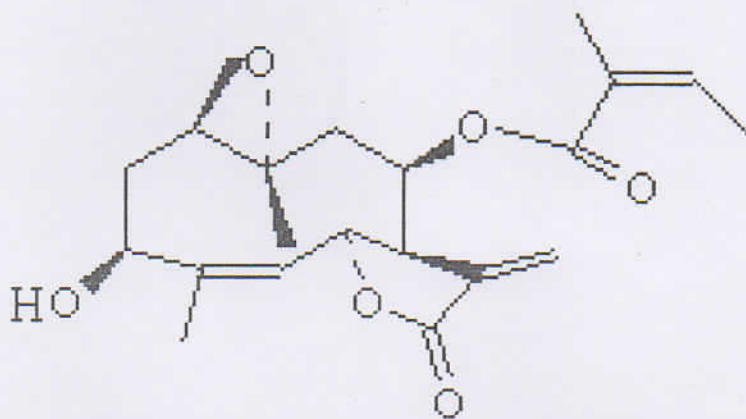


Figura 9. Estructura de la Molécula denominada Leptocarpina.

3.3 Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo de Sulforodamina B (SFB)

Se determinó el efecto del compuesto sobre la viabilidad celular en las diferentes líneas celulares. Para ello se utilizó un ensayo colorimétrico con SFB. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con 3.000 células por pocillo en DMEM High Glucose suplementado con Ham's F-12 Nutrient Mixture (1:1) y Suero Bovino Fetal 10%. Las células se incubaron a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂ y se trataron por 24 horas post siembra con diferentes concentraciones de leptocarpina solubilizada en DMSO al 0,1% (0-25 µM) a 24, 48 y 72 horas. Para descartar que el solvente sea el responsable de los efectos se incluyó en todos los experimentos un control con el solvente con DMSO al 0,1%. Tras el tratamiento las células fueron fijadas con Ácido Tricloro Acético (TCA) al 50% durante una hora a 4°C, posteriormente fueron lavadas por inmersión en agua y teñidas con SFB 0.1% en ácido acético al 1%. Para eliminar el colorante en exceso se realizaron tres lavados consecutivos con ácido acético al 1%. La tinción se reveló con TRIS/HCl 10 mM y se leyó la placa en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 540 nm (Vichai y Kirtikara, 2006) utilizando el programa Gen5 1.07.

Los datos obtenidos fueron analizados y expresados como porcentajes de viabilidad versus las células control de solvente cuya viabilidad fue considerada el 100%.

3.4 Ensayo Clonogenico.

Cada ensayo contó con 2×10^5 células sincronizadas (24 horas con medio que contenía solo 0.1 % de SFB) de las diferentes líneas celulares utilizadas. Estas fueron tratadas con diversas concentraciones (0-25 μM) de leptocarpina y como control positivo se utilizó el compuesto 5 fluorouracilo (5-FU) por 24 hrs (25 μM). Tras este tratamiento las células fueron tripsinizadas, suspendidas en medio y contadas en cámara de Neubauer mediante tinción con Azul de Tripan. Las células viables resultantes fueron sembradas en placas de 6 pocillos (50-200 células por pocillo) y cultivadas por 11 días, hasta que las colonias fueran claramente discernidas a plena vista. Se procedió a la eliminación del medio y posterior lavado con PBS, para finalmente fijar las colonias con metanol al 100% por 30 minutos. Las colonias fijadas fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5% por 10 minutos. La tinción es retirada y el exceso lavado con agua destilada, las colonias resultantes fueron contadas. La fracción de sobrevivencia es calculada según la fórmula entregada por el protocolo utilizado (Franken *et al.*, 2006). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada concentración de leptocarpina y período de tiempo (Costantino *et al.*, 2013; Franken *et al.*, 2006).

PE: (nº de colonias formadas/ nº de células sembradas)*100

SF: nº de colonias formadas tras el tratamiento/ nº de células sembradas *PE

3.5 Determinación del tipo de muerte celular

3.5.1 Análisis de la morfología celular y nuclear por medio de tinción de Hoechst 33342

La tinción de Hoechst es una tinción capaz de incorporarse a células vivas e intercalarse en el ADN. Es por ello que se utiliza para marcar núcleos y poder analizar la morfología nuclear. Tras 48 horas de tratamiento con leptocarpina (0,7 y 25 μM) se analizó la morfología celular y nuclear mediante microscopía en contraste de fases y de fluorescencia. Se adicionó la solución de Hoechst 1 μM diluida en PBS (realizar la

dilución cada vez que se utilice), se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente y se lavó 2 veces con PBS suavemente. Para visualizar el marcaje se utilizó un microscopio de epifluorecencia a una longitud de onda de 465nm (Mocharla *et al.*, 1987). Como control positivo del proceso apoptotico se utilizó 5-FU a 25 μ M.

3.5.2 Determinación del potencial mitocondrial mediante citometría de flujo.

Para la determinación del efecto de leptocarpina sobre el potencial de membrana mitocondrial, se utilizó Rodamina 123 la cual es una sonda catiónica sensible a voltaje que reversiblemente se acumula en la mitocondria cuando el potencial de membrana mitocondrial es funcional (Emaus *et al.*, 1986). Las células fueron incubadas con leptocarpina (0, 7 y 25 μ M) por 24 y 48 hrs, posterior a este tiempo las células se tiñeron con Rodamina 123 a 1 μ M y se incubaron en oscuridad por 1 hora a 37°C. A continuación se retiró el medio y las células fueron lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y recolectadas por medio de centrifugación (10 minutos a 1500 g), el sobrenadante fue descartado. Finalmente se resuspendieron las células en PBS y se cuantificaron mediante citometría de flujo utilizando el filtro FL1 (Villena *et al.*, 2008).

3.5.3 Detección de Células Apoptóticas mediante Citometría

El marcaje con CaspACE™ FITC-VAD-FMK se utilizó para la determinación de la población celular que se encuentra en un proceso apoptotico dependiente de caspasa. Las células fueron incubadas con leptocarpina (0, 2.5, 5, 7 y 25 μ M) y Estaurosporina 0.5 μ M (control positivo de apoptosis) por 12 y 24 horas. Tras este tiempo las células fueron tratadas con CaspACE™ FITC-VAD-FMK (5 μ M) por 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El medio se retiró y las células fueron lavadas dos veces con PBS, tripsinizadas y posteriormente recolectadas mediante centrifugación (10 minutos a 1500 rpm), el sobrenadante fue descartado. Las células fueron resuspendidas en PBS y analizadas mediante citometría de flujo utilizando el filtro FL1 (Belloc *et al.*, 2000).

3.5.4 Determinación de la activación de la Caspasa 3

3.5.4.1 Actividad de Caspasa 3

Se utilizó el kit de ensayo colorimétrico Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit (K106 BioVision®). El ensayo se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA). Una vez que la caspasa 3 tiene contacto con la secuencia DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) marcada con pNA, esta es escindida, liberándose el cromóforo. La emisión de luz de pNA se cuantifica mediante un espectrofotómetro a 400-405 nm. Se procedió al tratamiento de las células con leptocarpina (0, 7 y 25 μ M) a 6, 18 y 24 horas. Terminados los períodos de incubación las células fueron recuperadas por medio de la tripsinación y concentradas por medio de centrifugación. El pellet fue resuspendido en 50 μ l de Buffer de lisis frío e incubado en hielo por 10 minutos. Tras la incubación se centrifugó por 1 minuto a 10.000 g y se transfirió el sobrenadante (fracción citosólica) a un tubo en hielo. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas para lo que se utilizó el método de Bradford. Este ensayo se realizó con 5 μ l de muestra en 250 μ l de azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford, 1976) todo esto en placas de 96 pocillos. Se realizó una curva estándar con albúmina de suero Bovino (BSA) en un rango de 125 a 1000 μ g/ml. Finalmente se cuantificaron las muestras en un lector de placas de "ELISA" a una absorbancia de 595 nm. Estos datos fueron utilizados para la generación de una curva estándar donde los datos obtenidos a partir de las muestras tratadas con leptocarpina fueron intrapolados. Tras la cuantificación de proteínas, la muestra fue diluida en un rango entre 50 y 200 μ g de proteína en buffer de lisis. Tras esto se incorporó 50 μ l de buffer de reacción (2x) (10 mM de DTT), posteriormente se adicionaron 5 μ l del sustrato 4 mM DEVD-pNA y se incubó a 37°C por 1-2 horas. Por ultimo, se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 400-405 nm (Sakaue *et al.*, 2006).

3.5.4.2 Determinación de la viabilidad celular con SRB e inhibidor de Caspasa 3 (Ac-DEVD-CHO)

Para analizar la importancia de caspasa 3 en la muerte celular provocada por el tratamiento con leptocarpina sobre las diversas líneas celulares, se realizó una variante del ensayo "Viabilidad celular con Sulforodamina B" del punto 3.3. La variación

consistió en que se realizó un pre-tratamiento con el inhibidor específico de caspasa 3 y 7, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (Ac-DEVD-CHO), a las concentraciones de 50 y 100 μM por una hora. Posteriormente fue retirado el medio de cultivo con el inhibidor y fue reemplazado por medio de cultivo completo fresco. Luego de esto, se procedió de la misma forma que en el punto 3.3 utilizando las concentraciones de leptocarpina a 0, 7 y 25 μM por 72 horas (Mandlekar *et al.*, 2000).

3.6 Ciclo celular

En placas de 6 pocillos fueron sembradas 2×10^5 células por pocillo, las cuales fueron sincronizadas previo a su tratamiento utilizando un medio mínimo (0.1% de SFB). Posterior al tratamiento con leptocarpina (0, 2.5, 7 y 25 μM) por 24 horas, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas, sedimentadas por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y fijadas y permeabilizadas con metanol al 100% por 5 minutos a 4 °C. Las muestras fijadas se incubaron con 50 mg/ml de ioduro de propidio y 0,1 mg/ml de RNasa por 30 minutos, para su posterior análisis en un citómetro de flujo (FACSCalibur® BD®). Un total de 10.000 eventos fueron analizados utilizando el programa de software FlowJo V.X.0.7. (Cheng y Xie, 2011; Costantino *et al.*, 2013; Henry *et al.*, 2013).

3.7 Análisis de la NF- κB

3.7.1 Detección de la actividad de NF- κB

El ensayo de análisis de NF- κB es un ensayo cromogénico que permite detectar específicamente la actividad del factor al unirse a una secuencia de ADN consenso conocida. Las células previamente a ser tratadas con leptocarpina fueron estimuladas con TNF- α (10 ng/ml por 1 hora, Miyamoto *et al.*, 1994; Dhingra *et al.*, 2009), tras esto se realizó el tratamiento con leptocarpina a 7 μM por 48 horas, terminado este período se recolectaron las células en frío y se centrifugaron a 300 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml en una solución fría de PBS/fosfatasa (Solución de Inhibición de fosfatasa) y se centrifugó a 300 g por 5 minutos a 4°C, repitiéndose este paso una vez más. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se adicionó 500 μl de buffer hipotónico frío, se mezcló por pipeteo

suave para suspender el pellet y se dejó incubando en hielo por 15 minutos. Se adicionaron 50 μ l de Nonidet P-40 al 10% y se homogeneizó la solución con la pipeta. Se centrifugó por 30 segundos a 4 °C, el sobrenadante se descartó en un tubo nuevo que puede ser almacenadas ya que éste contiene la fracción citosólica de las células. El pellet fue resuspendido en 50 μ l en buffer frío de extracción que contiene un inhibidor de proteasas, se homogeneizó la solución y se incubó en hielo por 15 minutos en un agitador. Se centrifugo la solución a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y conservado a -80°C hasta su uso en la placa de análisis. Sobre la placa de 96 pocillos se agregaron las diferentes muestras de células tratadas con: leptocarpina 7 μ M por 48 horas (estimuladas con TNF- α), 0,1% de DMSO por 48 horas y como control negativo un inhibidor de NF-kB, CAPE (Fenetil éster de ácido cafeico) a 25 μ g/ml por 24 horas en las diferentes líneas celulares (Natarajan *et al.*, 1996). Tras esto la placa se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente los pocillos se lavaron 5 veces con 200 μ l de buffer de lavado 1x. Se agregó el anticuerpo anti NF-kB diluido 1:100 en buffer de unión de anticuerpo 1x, se agregó 100 μ l del anticuerpo diluido a cada pocillo exceptuando los controles de marcaje. La placa se cubrió e incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavó 5 veces con buffer de lavado para eliminar todos los residuos de la placa. Luego, se adicionó el anticuerpo secundario (100 μ l/pocillo) diluido en buffer de unión de anticuerpo 1x (1:100) exceptuando el pocillo de control de marcaje y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente los lavados con buffer de lavado. A continuación se agregaron 100 μ l/pocillo de la solución de revelado incubándose durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y protegido de la luz. La lectura se realizó en un lector de placas a 655 nm. Finalmente se añadieron 100 μ l de solución para detener la reacción y realizar la ultima lectura a 450 nm donde se detectó el compuesto generado tras la reacción con la peroxidasa (Morotti *et al.*, 2006).

3.7.2 Determinación de la Inmunolocalización de NF-kB

Con la inmunocitoquímica podemos localizar la forma activa de NF-kB y detectar los cambios que se producen tras los tratamientos. Tras los tratamientos con leptocarpina (0 y 7 μ M) por 24 horas, las células son fijadas con metanol al 100% por 15 minutos.

Tras lo cual fueron lavadas 3 veces con PBS dejando entre cada lavado 5 minutos de reposo. Se bloqueó con BSA al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. La incubación se realizó con el anticuerpo primario en PBS-tween overnight a 4°C (anti NF-kB p65 policlonal de conejo). Posteriormente se lavaron con PBS (3 veces) con periodos de 5 minutos entre cada lavado. Tras esto se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitió los lavados anteriormente descritos con PBS. Finalmente se realizó la incubación con el kit que contenía un sustrato para peroxidasa diluido en agua durante 5 minutos, realizándose un lavado con abundante agua, para la posterior incorporación de hematoxilina para teñir los núcleos (Arqués *et al.*, 2012). Se utilizó como control negativo al igual que en el apartado anterior CAPE a 25 µg/ml por 2 horas (Natarajan *et al.*, 1996) y como control positivo células estimuladas con TNF-α 10 ng/ml por 1 hora (Miyamoto *et al.*, 1994; Dhingra *et al.*, 2009).

3.8 Determinación de la Inmunolocalización de HIF-1α (Inmunocitoquímica)

Al igual que en el apartado anterior se realizaron los tratamientos con leptocarpina (0 y 7 µM) por 24 horas, posteriormente se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito, con la diferencia que el anticuerpo primario utilizado fue anti HIF-1α policlonal de conejo. Se utiliza como control negativo un inhibidor de expresión de HIF-1α genisteína 50 µM por 1 hora (Wang *et al.*, 2005) y como activador EGF (Factor de Crecimiento Epidermal) 20 ng/ml (Peng *et al.*, 2006).

3.9 Análisis estadístico.

Análisis de normalidad en la distribución de los datos: Test de "**Shapiro-Wilk**". Análisis estadístico de datos con distribución no normal: Test no paramétrico con rango designado de "**Wilcoxon**". Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa "Prism 6®" versión 6.0d.

4. Resultados

4.1. Determinar el efecto de Leptocarpina sobre viabilidad celular en líneas celulares de cáncer

Para evaluar el efecto de leptocarpina sobre la viabilidad de células tumorales, abordamos el estudio *in vitro* de este compuesto sobre las líneas celulares MDA MB-231, MCF7, PC-3, HT-29, DU 145, DHF y CCD 841 CoN. Las células viables fueron cuantificadas mediante el método de tinción con SFB. Las diferentes líneas celulares fueron tratadas por 72 horas, mostrando una disminución en la viabilidad celular dependiente de la concentración de leptocarpina (1, 2.5, 4, 5, 6, 7, 10, 12.5 y 25 μ M) (figura 10). Las líneas celulares DU 145, MCF7, MDA MB-231 y PC-3 (figuras 10 A, 10 C, 10 D y 10 E) presentaron una disminución significativa de la viabilidad celular en todas las concentraciones de leptocarpina aplicadas presentando un valor de $p < 0.0001$, estas disminuciones oscilan entre 32% a un 10% en relación al control. La línea HT-29 (figura 10 B) presentó una disminución significativa a partir de la concentración 2.5 μ M de leptocarpina, con un valor de $p < 0.0001$ alcanzando un 9% de sobrevivencia a la concentración mas alta de leptocarpina utilizada. En el caso de línea CCD 841 CoN (figura 10 F), presentó una disminución significativa a partir de 4 μ M de leptocarpina, con un valor de $p \leq 0.0003$, registrando una sobrevivencia del 87% a esta concentración. En cuanto a DHF, el cultivo de fibroblastos de dermis no tumoral (figura 10 G), no presentó una disminución significativa de la viabilidad a bajas concentraciones, generandose este efecto a partir de 6 μ M del compuesto, con un valor de $p \leq 0.0045$ con un porcentaje de sobrevivencia de 90% a esta concentración.

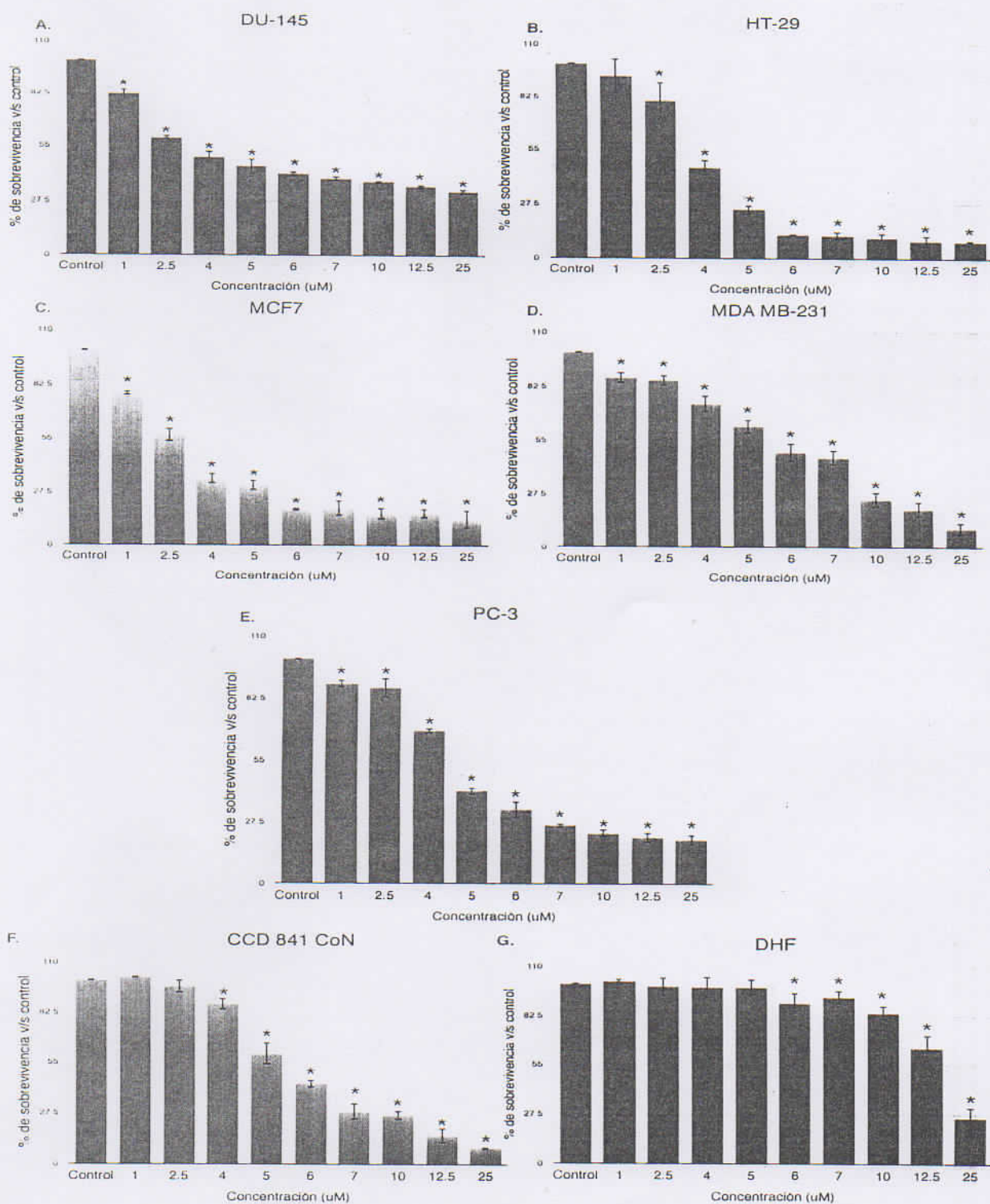


Figura 10. Efecto de Leptocarpina sobre viabilidad celular a 72 horas. Los datos presentados corresponden a porcentajes de células viables respecto al control en función de la concentración de leptocarpina. Los resultados graficados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, (* $p \leq 0.0045$; calculado respecto al control).

Posteriormente se analizó el efecto de leptocarpina sobre la viabilidad celular a diferentes tiempos, para lo cual las células fueron tratadas con leptocarpina por 24, 48 y 72 horas. En las líneas HT-29, MCF7 y PC-3 (**figura 11 B, C y D**) leptocarpina presentó un efecto significativo desde 5 μ M a 24 horas, registrando porcentajes de sobrevivencia de 89% en relación al control, con un valor de $p \leq 0.0305$. En cuanto a 48 y 72 horas todas las concentraciones presentaron una reducción significativa, con valor de $p \leq 0.0266$ obteniendo porcentajes de sobrevivencia que oscilan entre 94% a 9%. En cuanto a las líneas celulares MDA MB-231 y DU 145 (**figura 11 E y A**), leptocarpina a 24 horas de tratamiento presentó un efecto significativo a partir de 4 μ M con un valor de $p \leq 0.0182$ con porcentajes de sobrevivencia de 91% a 54 %. A 48 y 72 horas, teniendo en todas las concentraciones un efecto significativo sobre la viabilidad celular con un valor de $p \leq 0.0155$ con porcentajes de sobrevivencia entre 87% y 19 % en relación al control. En el caso de CCD 841 CoN (**figura 11 F**) a 24 y 48 horas se presenta un efecto significativo a partir de 5 μ M con un valor de $p \leq 0.0007$, registrando porcentajes de sobrevivencia de 80% a 44 % en relación al control, a 72 horas se presenta un efecto significativo a partir de 4 μ M con un valor de $p \leq 0.0003$ con un porcentaje de sobrevivencia a la mas alta concentración de leptocarpina de 26 % en relación al control. Los resultados muestran que en la línea no tumoral DHF (**figura 11 G**) leptocarpina no presentó efecto significativo a 24 horas en todas las concentraciones utilizadas (2.5, 4, 5, 7 y 10 μ M), a 48 horas de tratamiento a partir de 5 μ M de leptocarpina se observó una disminución significativa al igual que con el tratamiento por 72 horas con un valor de $p \leq 0.0245$ con un porcentaje de sobrevivencia de 95% a 84% en relación al control

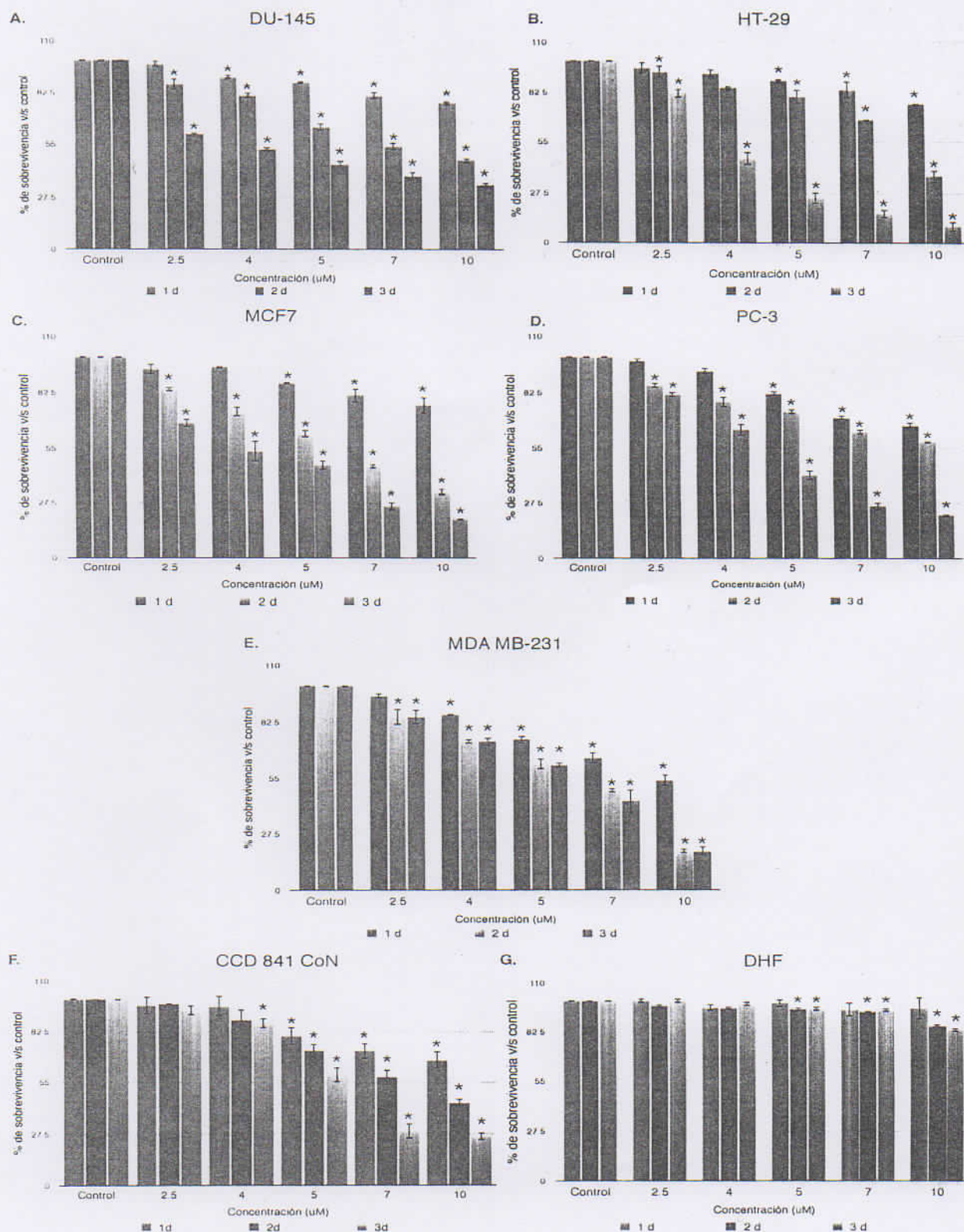


Figura 11. Efecto de Leptocarpina sobre viabilidad celular a 24, 48 y 72 horas. Los datos presentados corresponden a porcentajes de células viables respecto al control en función de la

concentración de leptocarpina. Los resultados graficados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, (* $p \leq 0,0305$; calculado respecto al control).

4.2. Ensayo clonogénico

El ensayo de formación de colonias es un ensayo de supervivencia celular *in vitro* basado en la capacidad de una sola célula de producir progenie hasta alcanzar la formación de una colonia. Este ensayo nos permite determinar el efecto que presenta leptocarpina sobre la supervivencia clonogénica de las diferentes líneas celulares estudiadas. Para realizar el análisis de los datos obtenidos tras el procedimiento de clonogenia es necesario el cálculo de los valores de la eficiencia de sembrado (PE) de cada línea celular y de la fracción de supervivencia (SF) de estas, para esto utilizamos las formulas entregadas por el protocolo de Franken *et al.*, 2006.

Como referencia sabemos que los PE de las líneas utilizadas son las siguientes:

PC-3: 50-60%; DU 145: 50-60% (Franken *et al.*, 2006);

MCF7: 45-60%; HT-29: 35-45% (Liebmann *et al.*, 1993).

Los valores de PE obtenidos fueron: en la línea celular PC-3 fue de un 64%, en la línea celular HT-29 fue de un 79.2%, en la línea MCF7 fue de un 43.32%, en CCD 841 CoN fue de un 81% y en la línea celular DU 145 fue de un 49.33%. Los valores obtenidos de la fracción de supervivencia son detallados en la **tabla 3**.

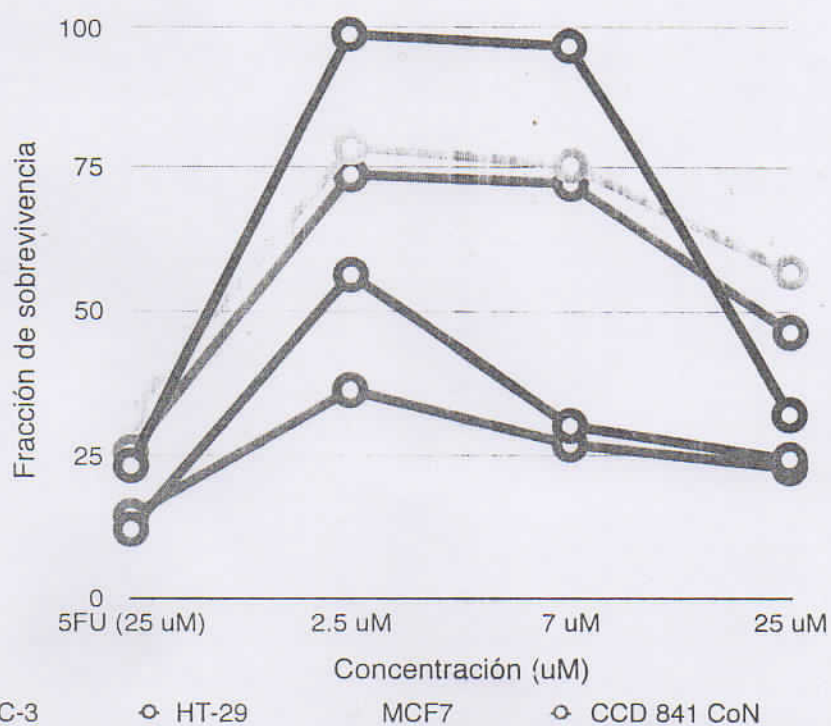


Figura 12. Curva de sobrevivencia celular derivada del ensayo de clonogenia. Se grafican los valores de los porcentajes de la fracción de sobrevivencia obtenidos tras el tratamiento con leptocarpina

SF	PC-3	HT-29	MCF7	CCD 841 CoN	DU 145
Control 5FU 25 uM	23.3	12.2	32.3	25.6	14.5
Leptocarpina 2.5 uM	98.9	56.3	78.5	73.7	36.4
Leptocarpina 7 uM	96.8	30.3	75.4	72.2	27
Leptocarpina 25 uM	32.2	24.4	56.9	46.3	22.9

Tabla 3. Valores de la fracción de sobrevivencia obtenidos tras el ensayo de clonogenia. Los valores de SF (porcentaje) representados en esta tabla son obtenidos tras tres replicas realizadas, los cuales fueron normalizados con el control con DMSO al 0.1%.

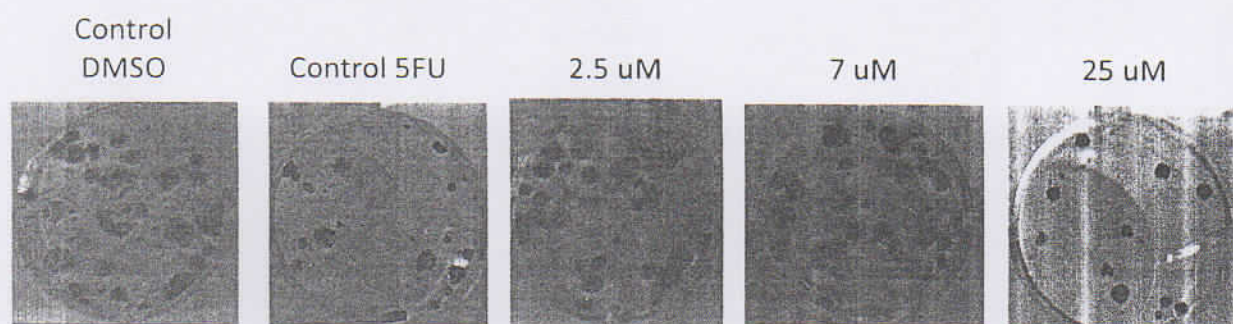


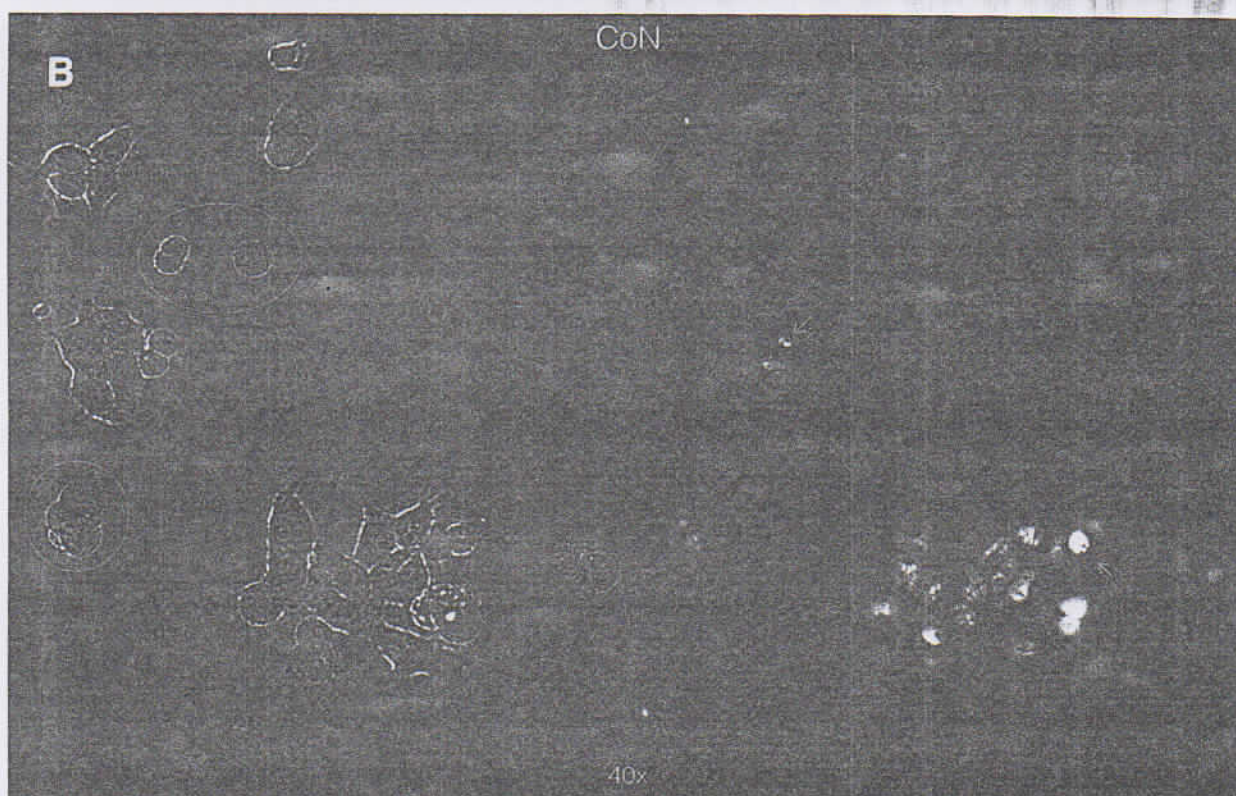
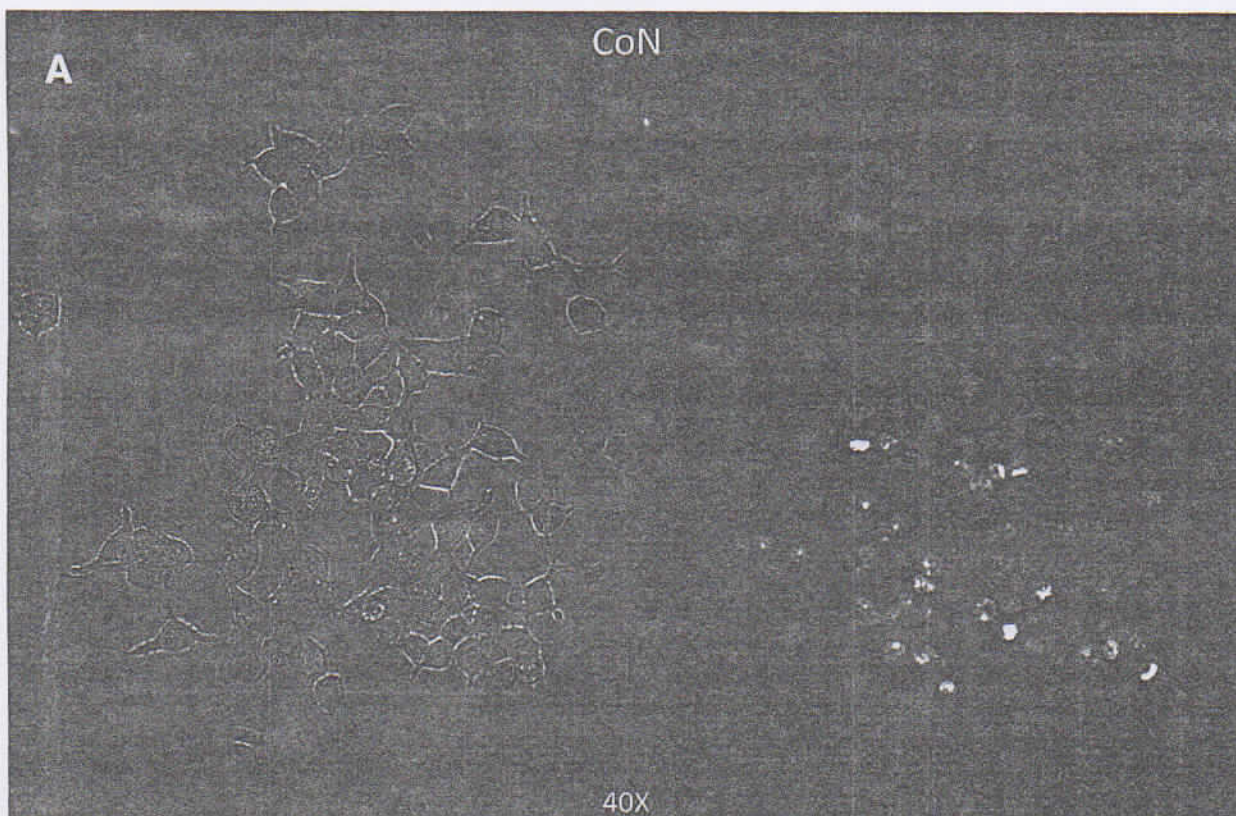
Figura 13. Fotografías representativas del ensayo de clonogenia de la línea celular PC-3.

4.3. Análisis de la morfología celular y nuclear por medio de tinción de Hoechst 33342

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran las fotografías de contraste de fase y epifluorescencia de las líneas CCD 841 CoN (**figura 14**), MCF7 (**figura 15**), HT-29 (**figura 16**) y PC-3 (**figura 17**). Las células fueron tratadas con 7 y 25 μ M de leptocarpina por 48 horas. En las fotografías de contraste de fase de las líneas celulares control (DMSO 0.1 %) se observó la forma característica de cada línea celular, a diferencia de las células tratadas con leptocarpina, donde podemos visualizar una disminución en el tamaño celular, pérdida de la forma, disminución del número de células, formación de los llamados blebbing (burbujas en la membrana celular) y la aparición de cuerpos apoptóticos. Algunos de estos procesos fueron resaltados con un círculo rojo. Se observó que a mayor concentración de leptocarpina mayor es el porcentaje de células que presentan estas características. Como control positivo utilizamos un compuesto inductor de apoptosis (**figuras 14 B, 15 B, 16 B y 17 B**), las células fueron tratadas con 5FU a una concentración 25 μ M, donde se observaron características similares a las que fueron tratadas con leptocarpina .

Posterior al tratamiento se realizó la tinción con Hoechst 33342 para la visualización de la morfología nuclear y la distinción de indicios de procesos apoptóticos (condensación y/o fragmentación de la cromatina), los núcleos que presentaban una mayor intensidad de fluorescencia fueron marcados con flechas rojas (fotografía derecha).

Con esto logramos identificar una morfología propia de un proceso apoptótico, que se estaría generando tras el tratamiento con leptocarpina (Akter *et al.*, 2012). Para la determinar el proceso de muerte celular que se genera tras el tratamiento con leptocarpina se realizaron mediciones de la actividad de caspasas en este proceso.



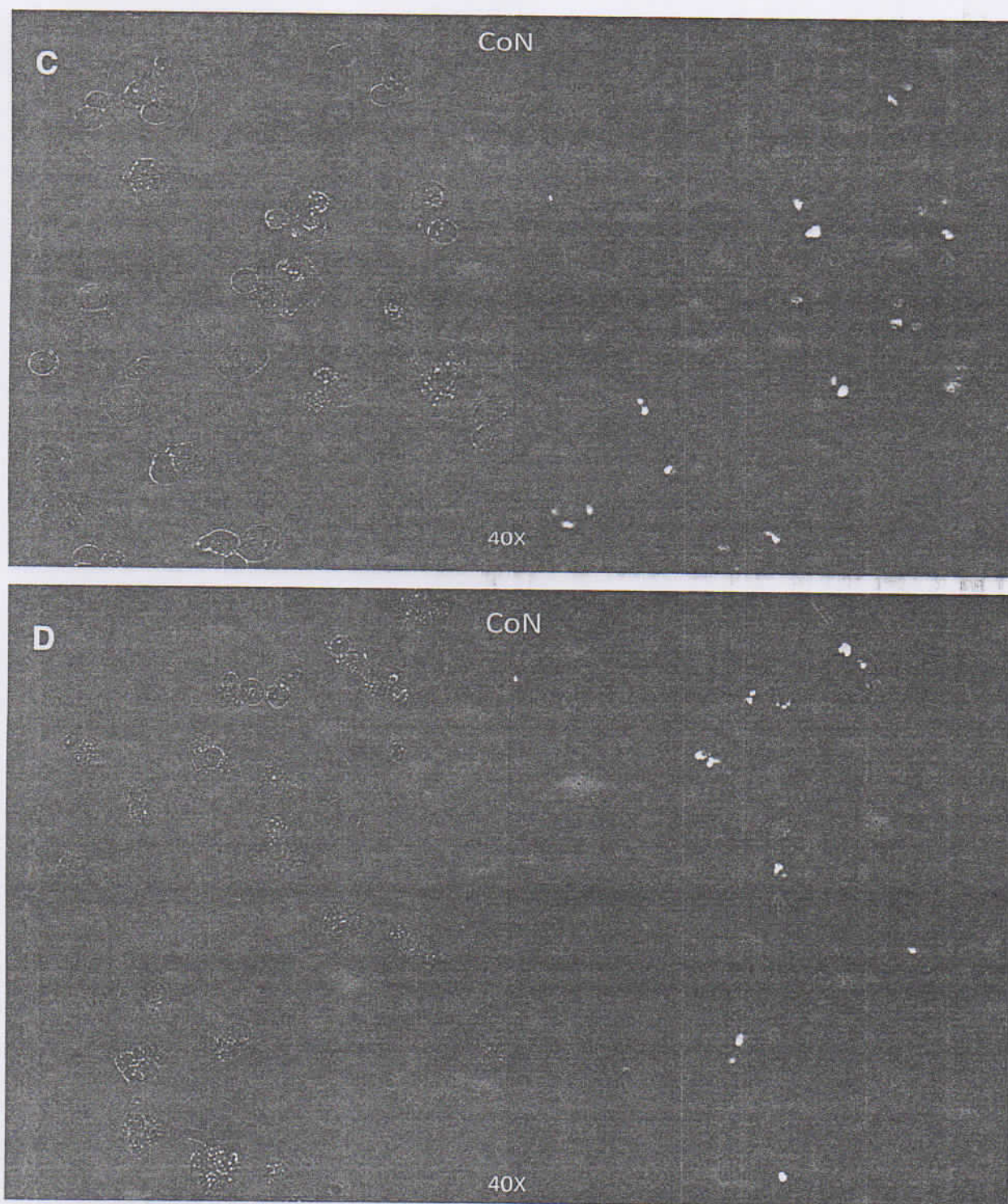
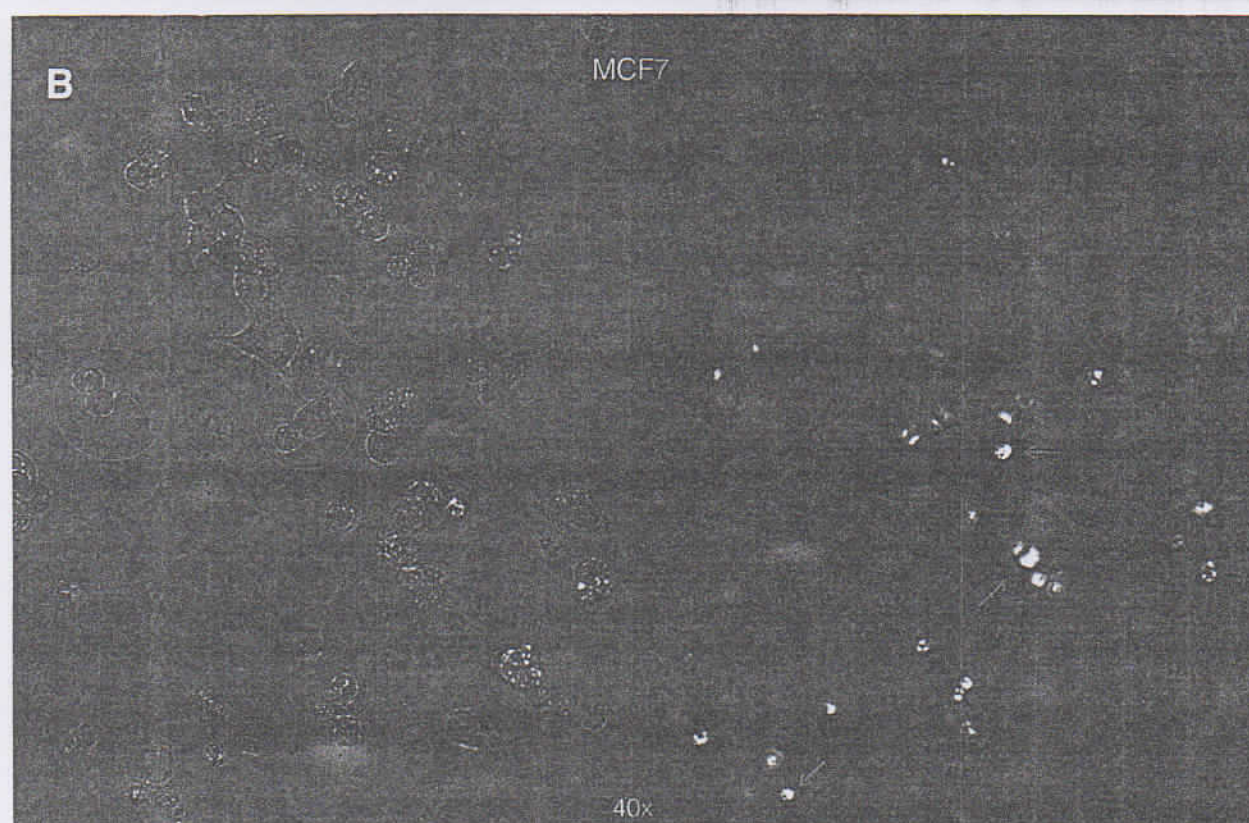
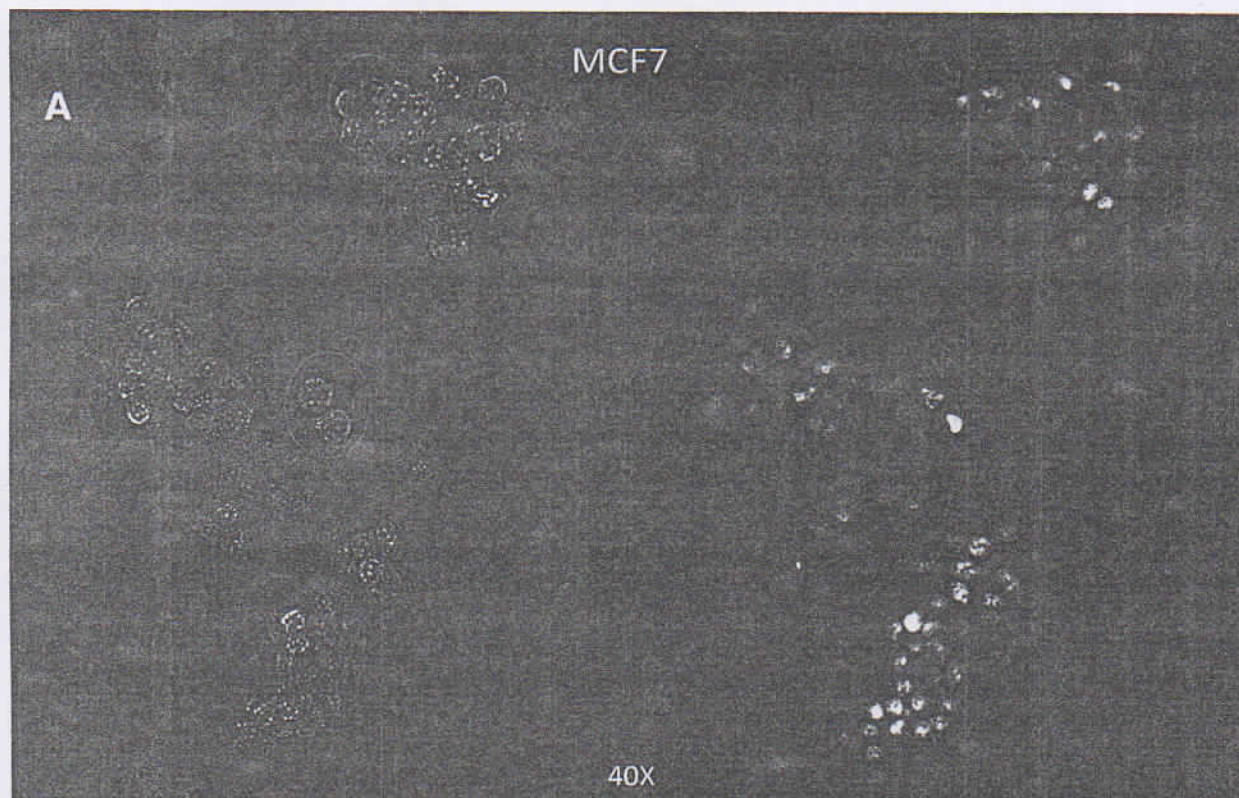


Figura 14. Fotografía de la línea CCD 841 CoN tratada con Leptocarpina 48 Horas. A. Control (0.1% de DMSO) B. Control con 5-FU C. Leptocarpina 7 μ M D. Leptocarpina 25 μ M. Contraste de fase (Izquierda) y epifluorescencia con luz ultravioleta teñidas con Hoechst 33342 (Derecha). Las flechas rojas nos indican núcleos condensados y/o fragmentados y los círculos rojos muestran características morfológicas de células en proceso de muerte.



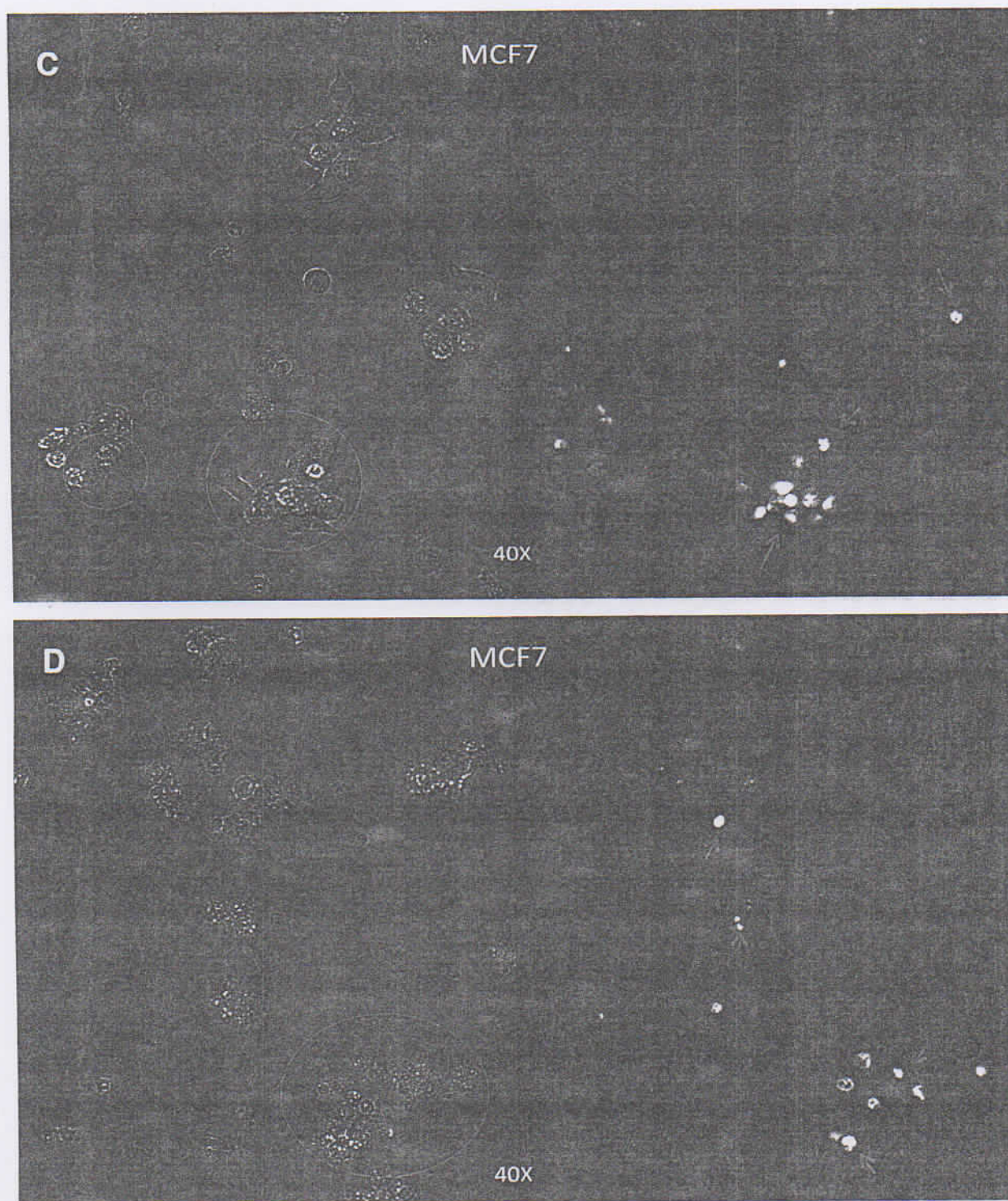
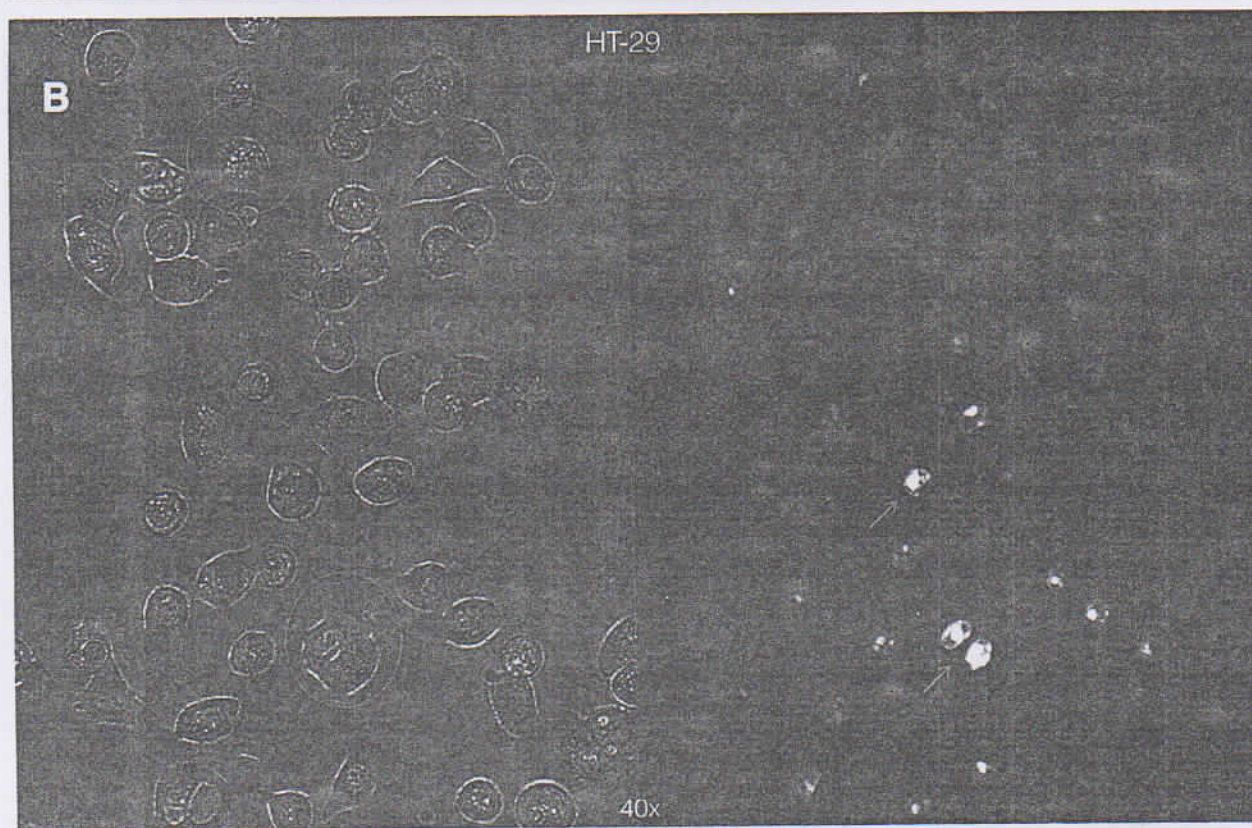
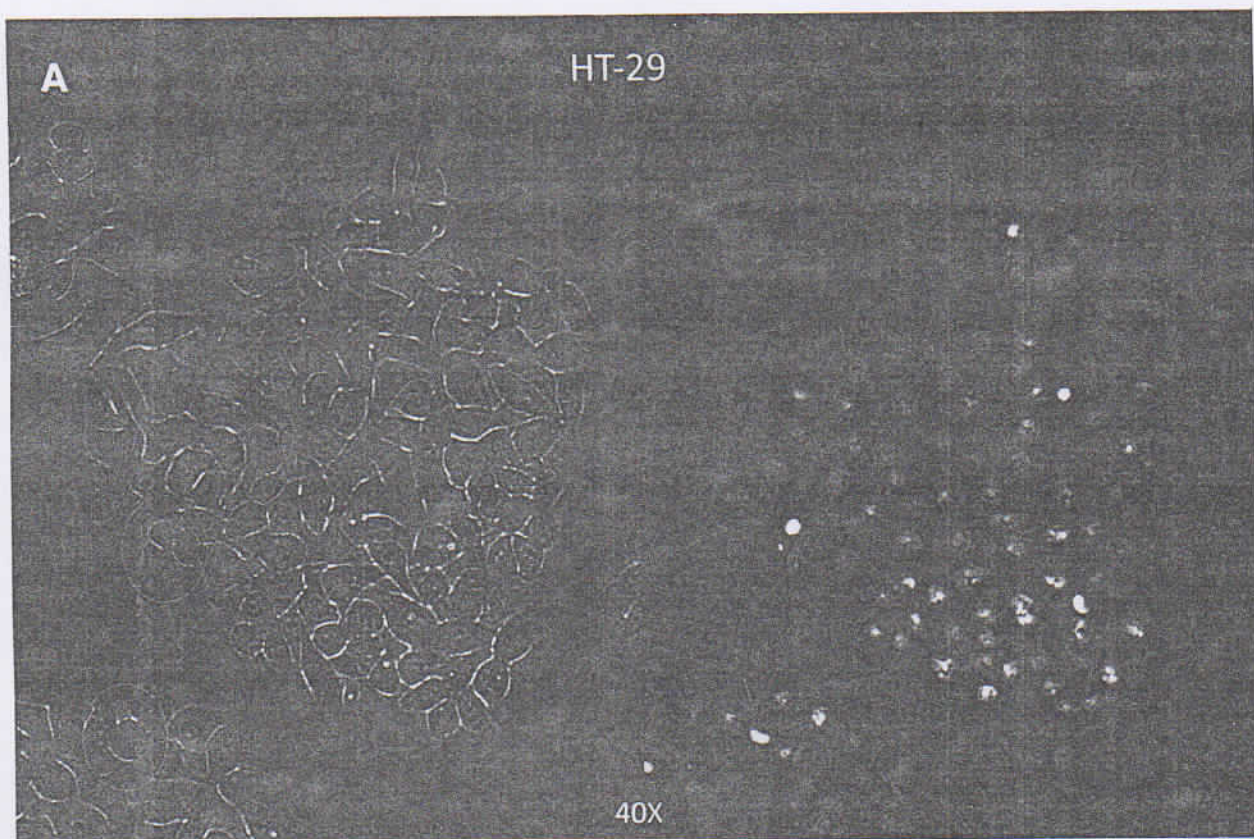


Figura 15. Fotografía de la línea MCF7 tratada con Leptocarpina 48 Horas. A. Control (0.1% de DMSO) B. Control con 5-FU C. Leptocarpina 7 μ M D. Leptocarpina 25 μ M. Contraste de fase (Izquierda) y epifluorescencia con luz ultravioleta teñidas con Hoechst 33342 (Derecha). Las flechas rojas nos indican núcleos condensados y/o fragmentados y los círculos rojos muestran características morfológicas de células en proceso de muerte.



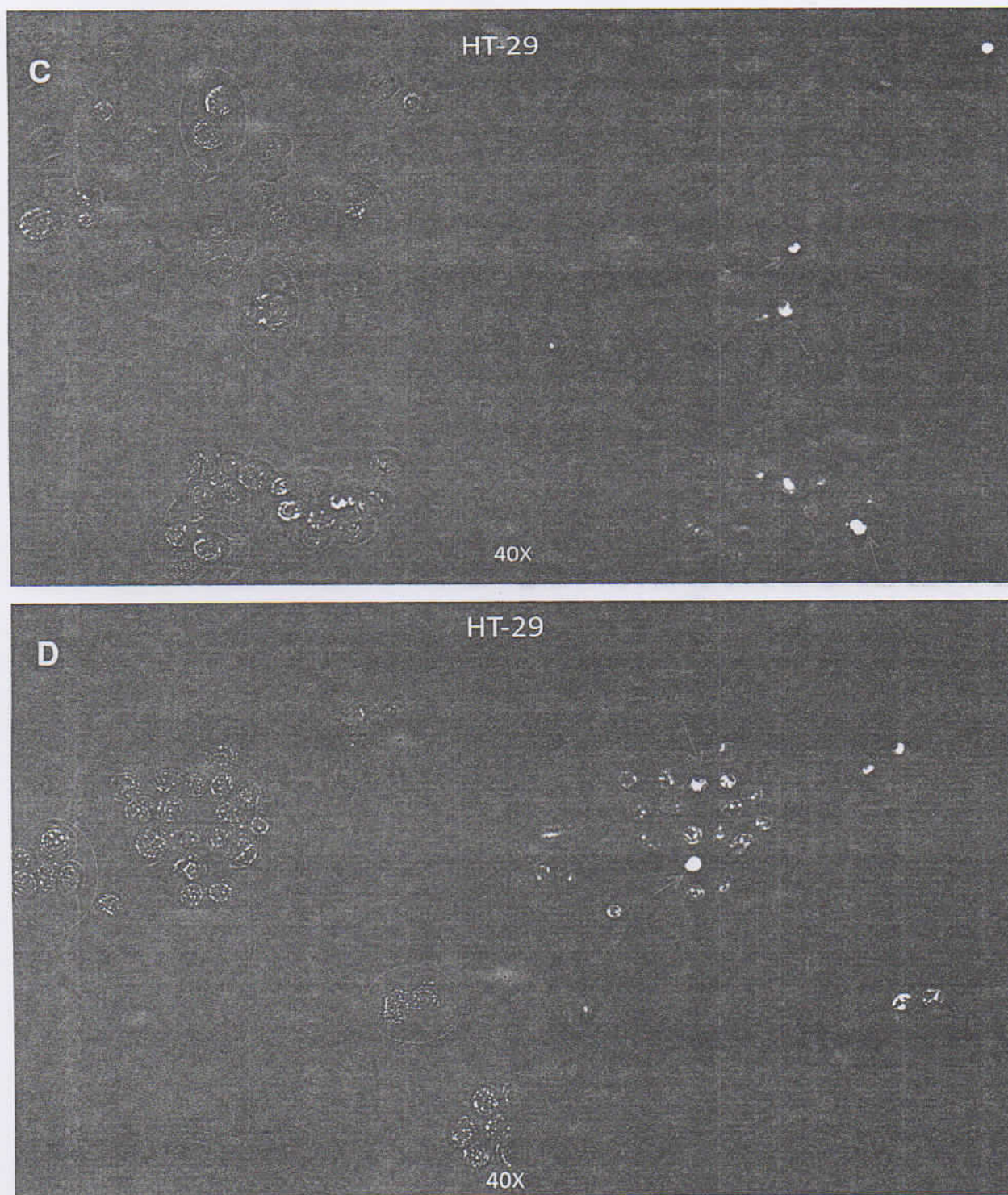
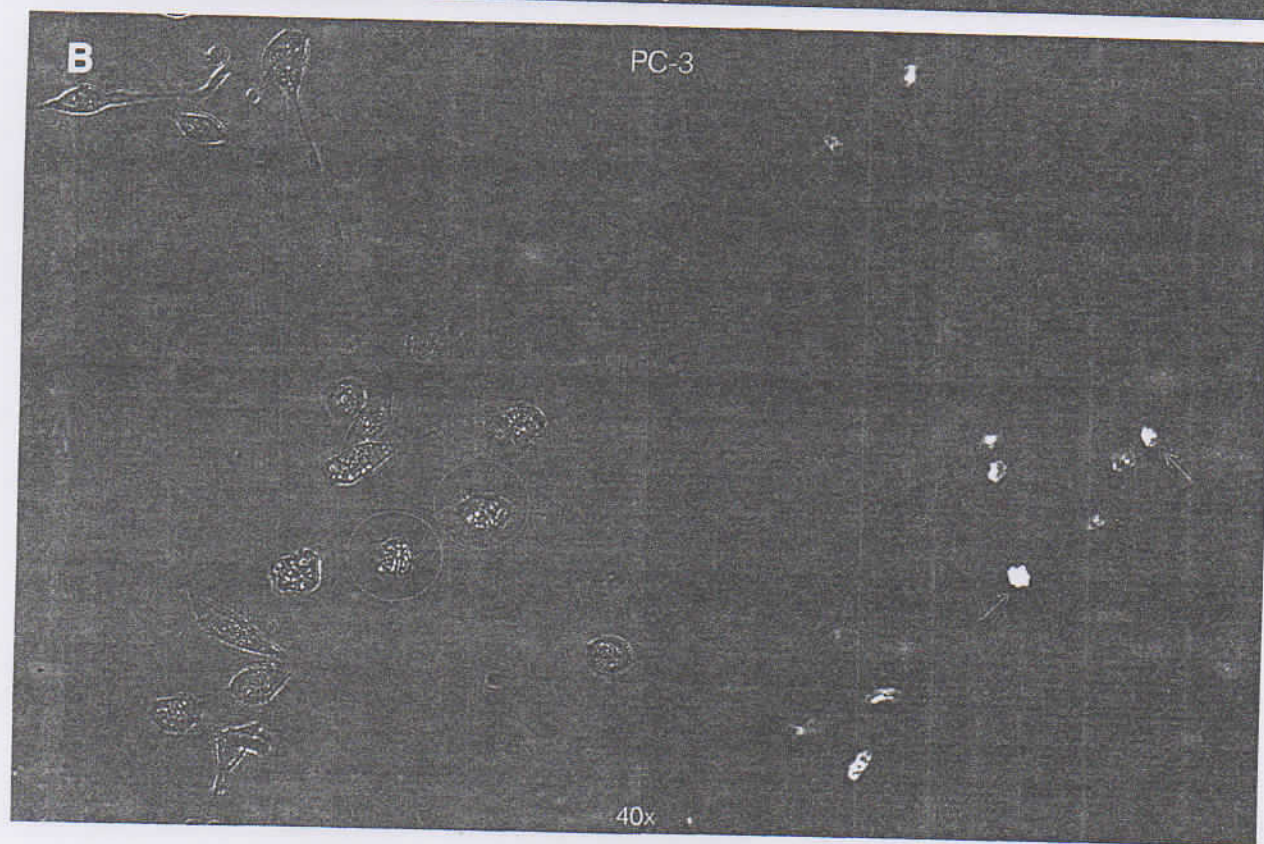
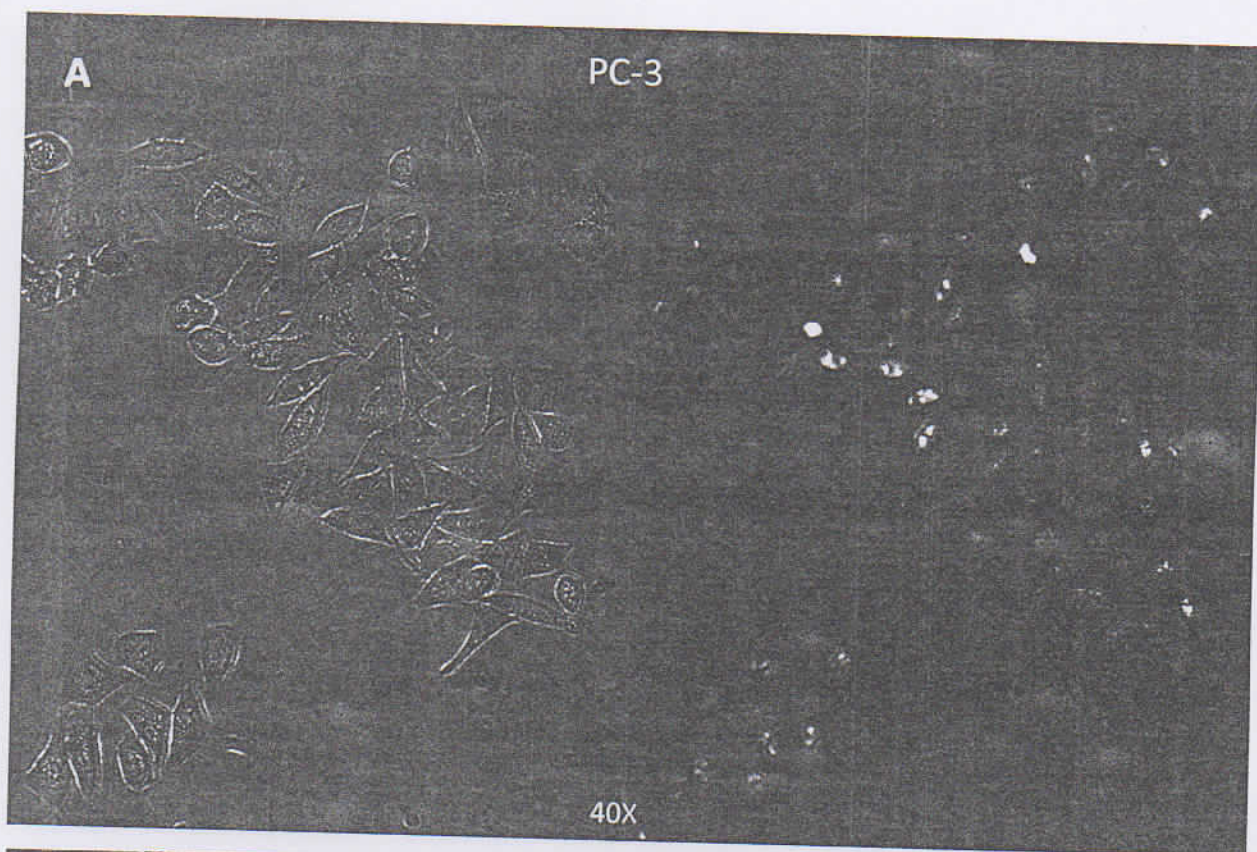


Figura 16. Fotografía de la línea HT-29 tratada con Leptocarpina 48 Horas. A. Control (0.1% de DMSO) B. Control con 5-FU C. Leptocarpina 7 μ M D. Leptocarpina 25 μ M. Contraste de fase (Izquierda) y epifluorescencia con luz ultravioleta teñidas con Hoechst 33342 (Derecha). Las flechas rojas nos indican núcleos condensados y/o fragmentados y los círculos rojos muestran características morfológicas de células en proceso de muerte.



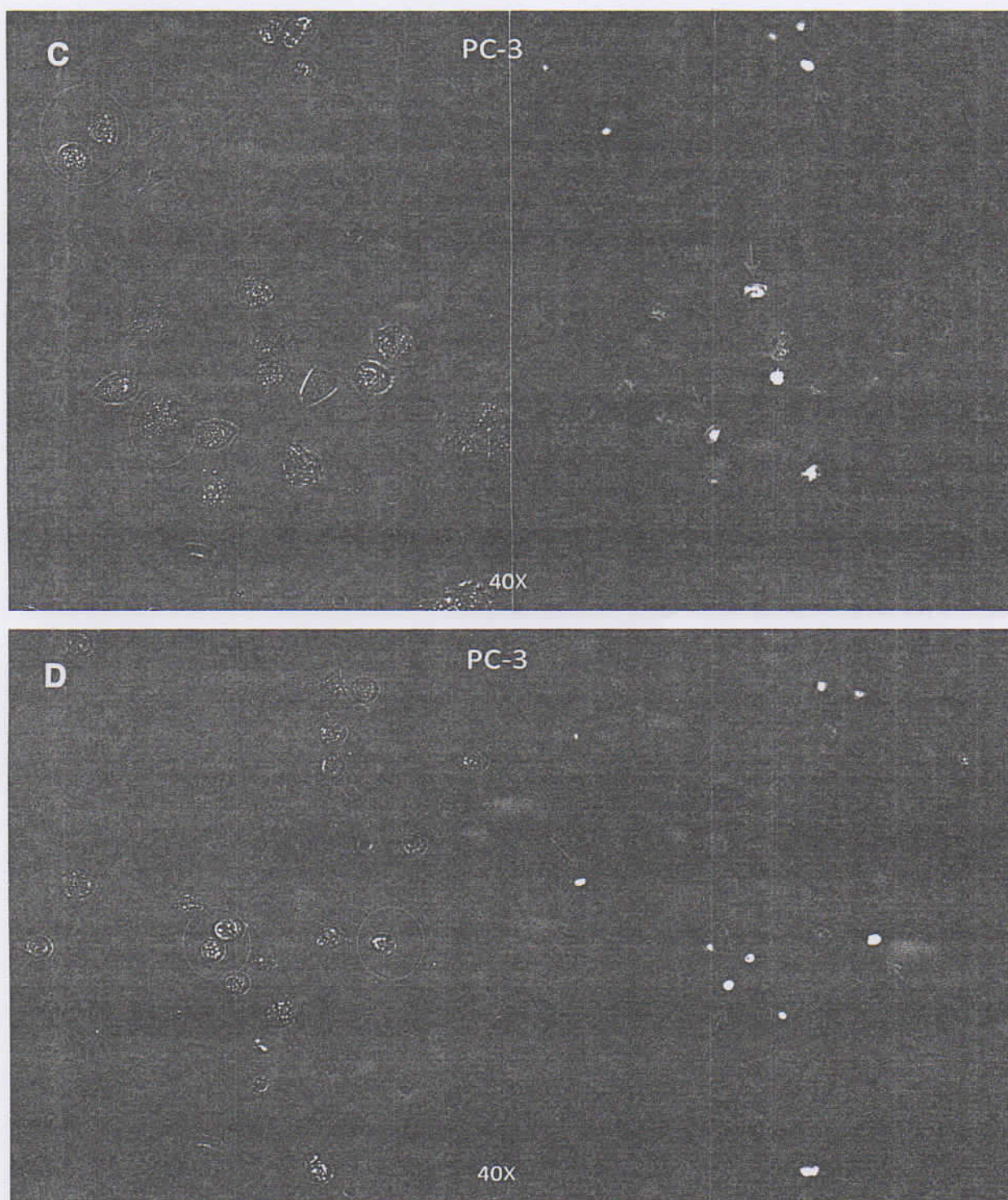


Figura 17. Fotografía de la línea PC-3 tratada con Leptocarpina 48 Horas. A. Control (0.1% de DMSO) B. Control con 5-FU C. Leptocarpina 7 μ M D. Leptocarpina 25 μ M. Contraste de fase (Izquierda) y epifluorescencia con luz ultravioleta teñidas con Hoechst 33342 (Derecha). Las flechas rojas nos indican núcleos condensados y/o fragmentados y los círculos rojos muestran características morfológicas de células en proceso de muerte.

4.4. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo

Uno de los criterios bioquímicos para la determinación de un proceso apoptótico es la permeabilización de la membrana mitocondrial. La permeabilización de esta membrana deriva en la liberación de moléculas que inducen la activación de caspasas, proteasas centrales en el proceso apoptótico. Además previamente se había descrito que otras lactonas sesquiterpénicas tenían un efecto sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial, es por esto que analizamos la funcionalidad de la membrana mitocondrial mediante un ensayo que indica cambios en la permeabilidad de la membrana de esta.

Mediante el marcaje de las células con Rodamina 123 evaluamos el efecto de leptocarpina a 7 y 25 μM por 24 y 48 horas sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial. En la figura 18 se observa que en las líneas HT-29 (**figura 18 B**), DU 145 (**figura 18 C**), MCF7 (**figura 18 D**) y PC-3 (**figura 18 F**) leptocarpina presentó un efecto significativo en todas las concentraciones y tiempos analizados sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial. En el caso de la línea MDA MB-231 (**figura 18 E**) leptocarpina solo presentó un efecto significativo a 48 horas en ambas concentraciones de tratamiento. DHF (**figura 18 A**) solo presentó efecto significativo a 25 μM en ambos tiempos, al igual que CCD 841 CoN (**figura 18 G**) que presentó un efecto significativo a 25 μM por 24 horas. Estos resultados indican que existe un efecto diferencial a nivel de la permeabilidad mitocondrial entre las células tumorales y no tumorales.

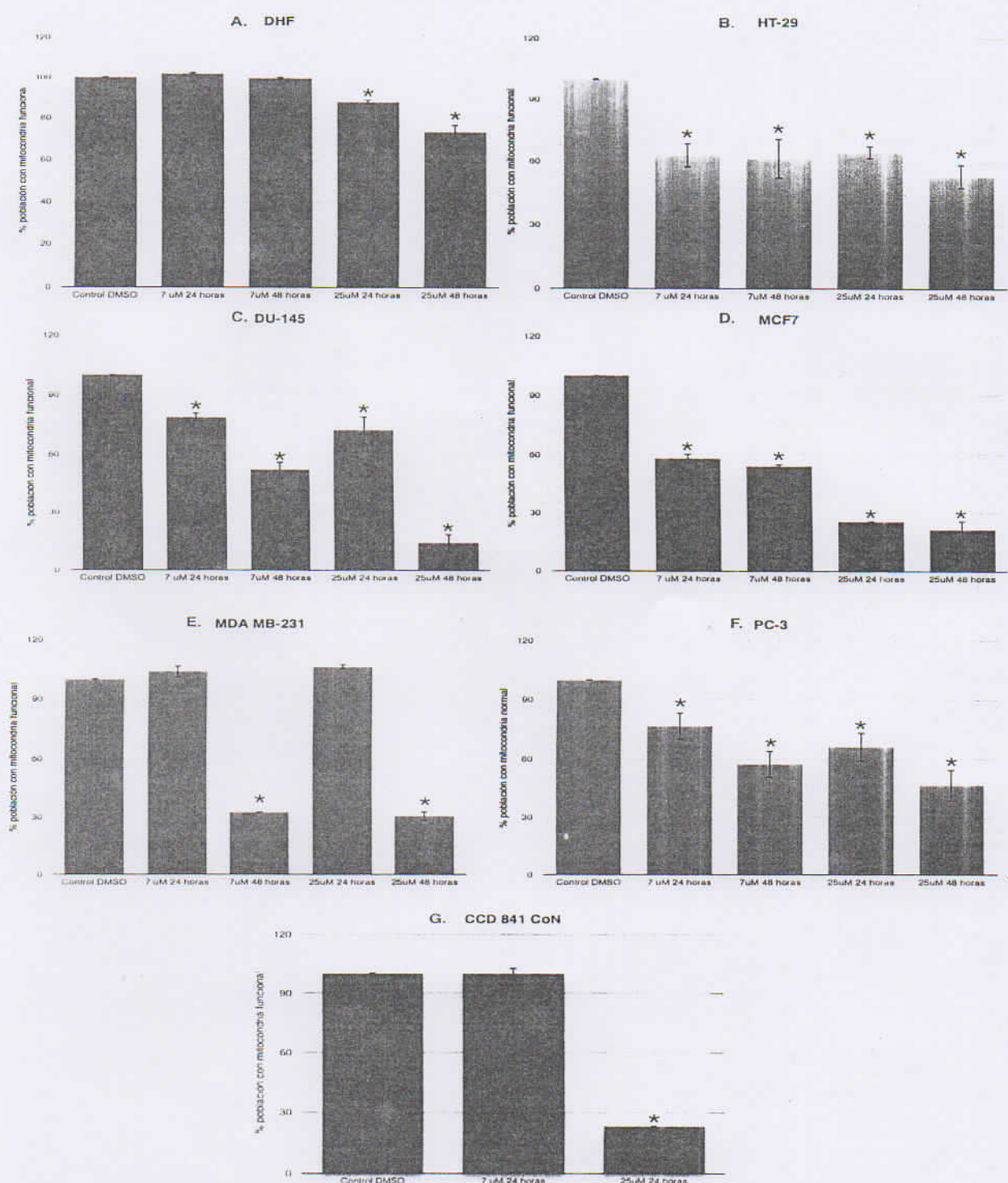


Figura 18. Efecto de leptocarpina sobre la permeabilización de membrana mitocondrial. Los resultados fueron expresados como porcentajes de células que presentan permeabilidad de membrana mitocondrial intacta tras el tratamiento con leptocarpina a 0, 7 y 25 μ M por 24 y 48 horas. Las diferencias estadísticamente significativas en relación al control se marcan con un asterisco (* $p < 0.0010$).

	Sample Name
■	DU-145 25 μ M 48Hr.009
□	DU-145 25 μ M 24Hr.011
▨	DU-145 7 μ M 48Hr.010
▩	DU-145 7 μ M 24Hr.012
▧	DU-145 CTRL DMSO.008

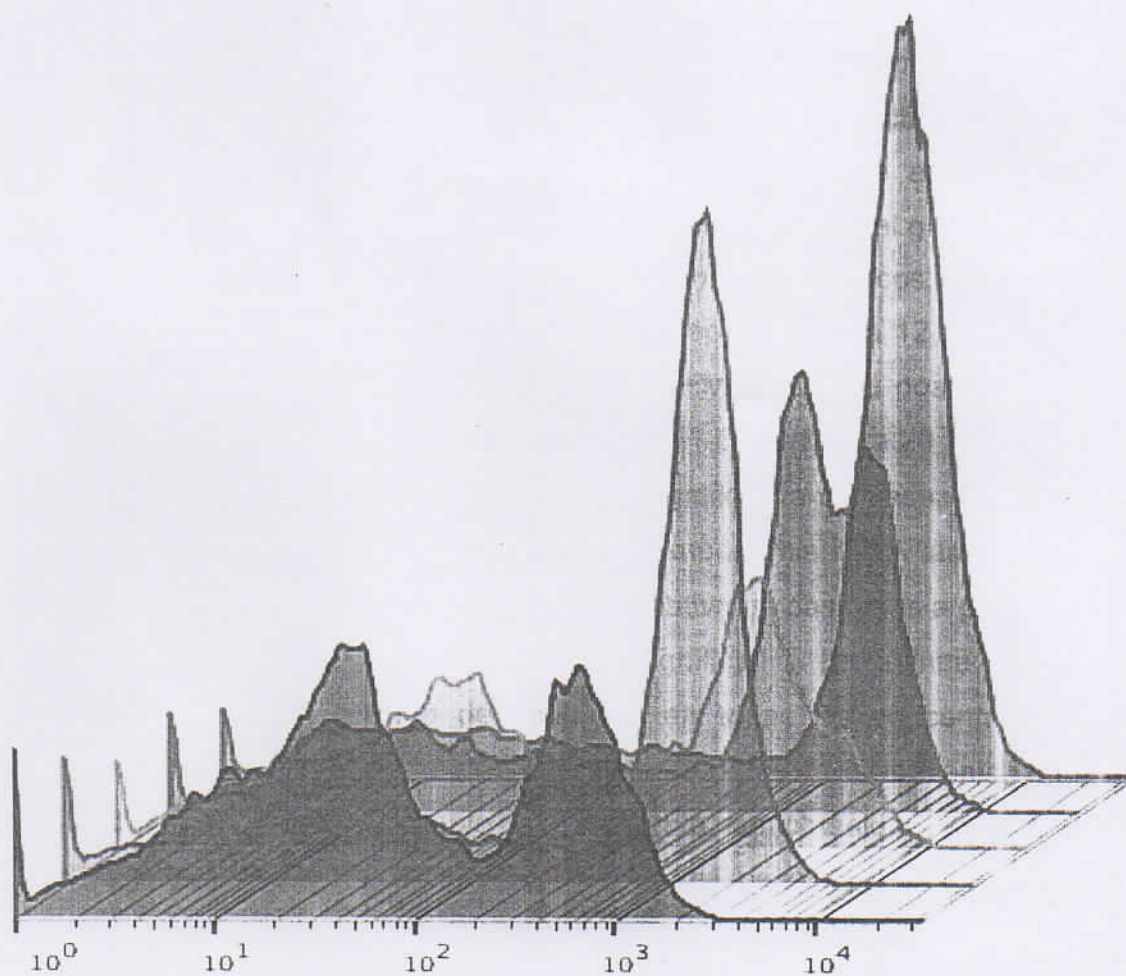


Figura 19. Imagen de histograma obtenido tras el análisis de la permeabilidad de la membrana mitocondria en las línea celular DU 145. Histograma representativo de los ensayos realizados con Rodamina 123 (1 μ M), donde podemos observar como la intensidad de fluorescencia disminuye (movimiento de la curva hacia la izquierda) a medida de aumenta la concentración de leptocarpina y el tiempo de exposición.

4.5. Análisis de la actividad de caspasas mediante marcaje con CaspACE™ FITC-VAD-FMK y medición con citometría de flujo

La activación de caspasas es uno de los sellos más distintivos del proceso apoptótico y es por esto que se analizó la actividad de estas proteasas tras el tratamiento con leptocarpina a diversos tiempos y concentraciones. Para ello se realizó el marcaje con CaspACE™ FITC-VAD-FMK que permite detectar la activación de caspasas, ya que este análogo fluorescente del inhibidor pan caspasa Z-VAD-FMK (carbобензохи-валл-аспартил-(о метил)-fluormetilcetona). Al ser cortado por la caspasa activa, VAD-FMK es capaz de generar una unión irreversible con las caspasas (Slee *et al.*, 1996). Se aprovecha esta unión y el grupo carbобензохи (Z) es sustituido por el grupo isotiocinato (FITC), el cual es detectable y cuantificable por métodos fluorimétricos, en éste caso a través de un citómetro de flujo. Tras la exposición a leptocarpina a 12 y 24 horas, las células fueron marcadas con CaspACE™ FITC-VAD-FMK, para su posterior medición con citometría de flujo. En la línea no tumoral CCD 841 CoN (**figura 20 A**) tratadas por 12 horas con leptocarpina no mostraron actividad significativa de caspasas a ninguna concentración, estaurosporina muestra el mismo comportamiento. A las 24 horas de tratamiento (**figura 20 B**) se registró actividad significativa de caspasas a partir de 5 μM de leptocarpina, estaurosporina no mostró actividad significativa. En la línea celular PC-3 (**figura 20 C**) se observó actividad de caspasas en todas las concentraciones de leptocarpina siendo el punto más alto a 25 μM , a las 24 horas de tratamiento (**figura 20 D**) la actividad de caspasas disminuye en relación a las obtenidas a 12 horas de tratamiento, registrándose actividad significativa de caspasas a partir de 5 μM de leptocarpina. La línea celular MCF7 (**figura 21 A**) a las 12 horas de tratamiento con leptocarpina presentó actividad significativa de caspasas a 2.5 y 7 μM del compuesto, estaurosporina no presentó actividad significativa a este tiempo. A las 24 horas de tratamiento (**figura 21 B**) con leptocarpina se registraron los mayores niveles de actividad de caspasas en esta línea celular. En el caso de la línea celular HT-29 (**figura 21 C**) a las 12 horas de tratamiento con leptocarpina no se registró actividad de caspasa significativo. A las 24 horas de tratamiento (**figura 21 D**) se registró actividad significativa de caspasas en todas las concentraciones de leptocarpina.

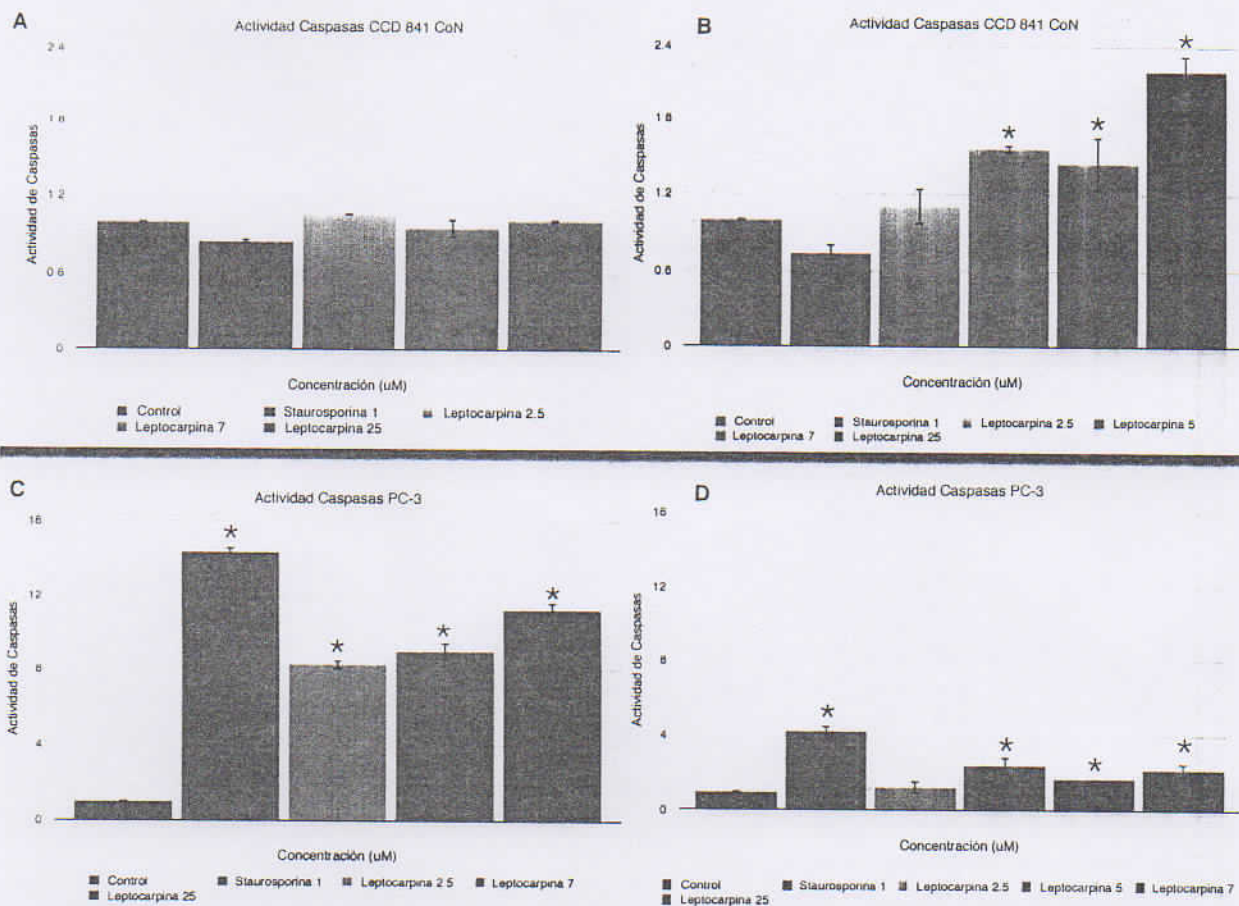


Figura 20. Cuantificación de los resultados obtenidos tras el marcaje con CaspACE™ FITC-VAD-FMK. Los resultados fueron expresados como número de veces en relación al control con DMSO 0.1%. Las líneas celulares CCD 841 CoN tratadas por 12 horas (A), por 24 horas (B), PC-3 tratadas por 12 horas (C) y por 24 horas (D) con leptocarpina a 2.5, 5, 7 y 25 μM (* $p \leq 0,0476$; calculado respecto al control).

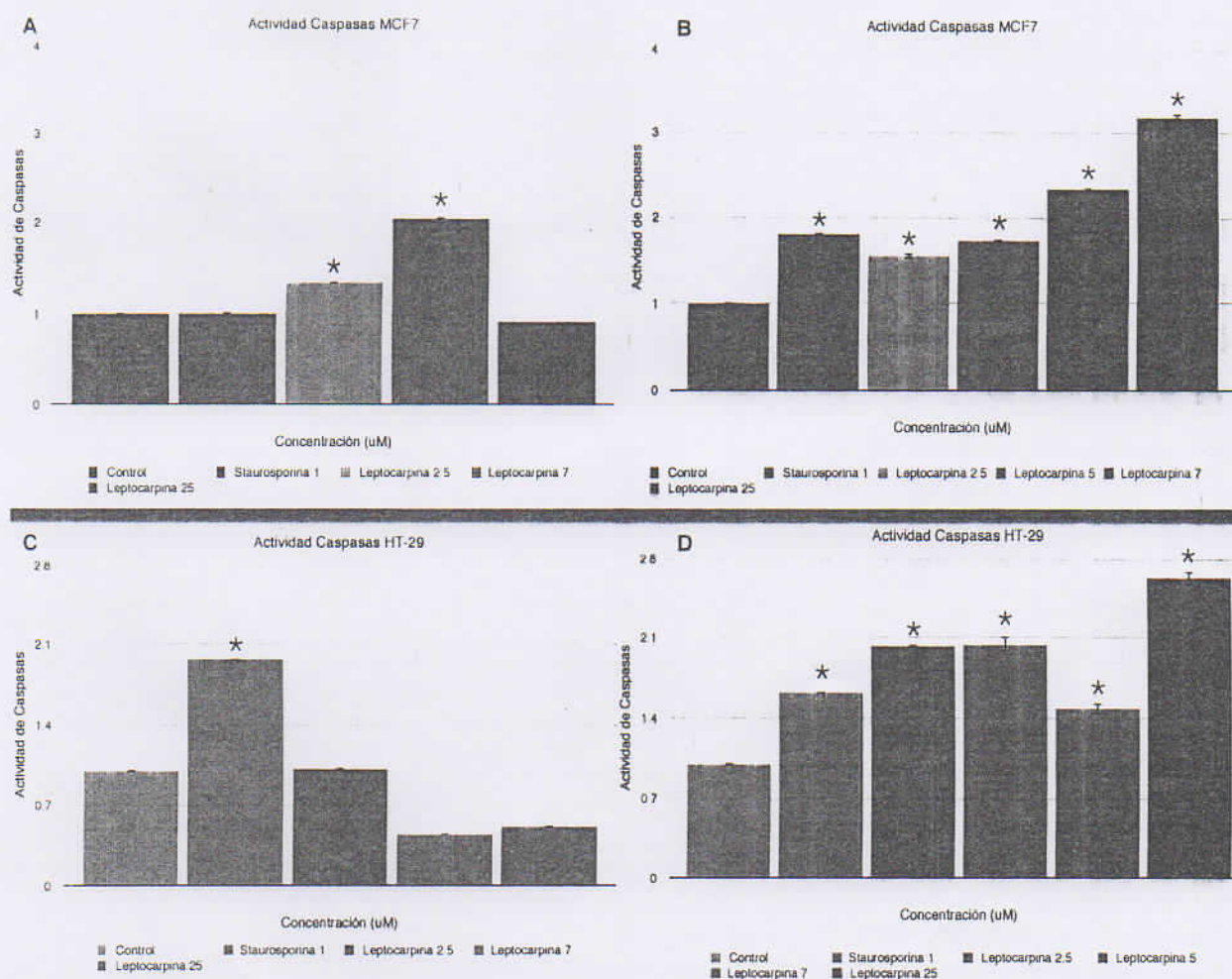


Figura 21. Cuantificación de los resultados obtenidos tras el marcaje con CaspACE™ FITC-VAD-FMK. Los resultados fueron expresados como número de veces en relación al control con DMSO 0.1%. Las líneas celulares MCF7 tratadas por 12 horas (A), 24 horas (B), HT-29 tratadas por 12 horas (C) y por 24 horas (D) con leptocarpina a 2.5, 5, 7 y 25 μM (* $p \leq 0,0097$; calculado respecto al control).

4.6. Determinación de la activación de la Caspasa 3/7

4.6.1. Actividad de Caspasa 3/7

Uno de los factores más característicos de un proceso apoptótico es la activación de caspasa 3/7. Para ello se utilizó un ensayo colorimétrico con el sustrato DEVD-pNA, el cual es cortado por caspasa 3/7 si ésta se encuentra activa. El ensayo se realizó tras el tratamiento con leptocarpina (7 y 25 μM) en las líneas MDA MB-231, HT-29, DU 145, DHF, MCF7 y PC-3 a diferentes tiempos (6, 18 y 24 horas). En la línea MDA MB-231 (**figura 22 A**) se registró actividad de caspasa 3/7 a ambas concentraciones por 6 y 18 horas de tratamiento registrándose un aumento de 1.9 veces en referencia al control, a 24 horas no se registró actividad de caspasa significativa a ninguna concentración de leptocarpina probada. En la línea DU 145 (**figura 22 B**) no se observó un aumento de actividad de caspasa 3 significativa a ningún tiempo y concentración utilizada. En el caso de HT-29 (**figura 22 C**) se registró actividad de caspasa 3/7 a partir de las 18 horas de tratamiento en todas las concentraciones utilizadas, registrándose un aumento de 1.6 veces en referencia al control. En la línea celular DHF (**figura 22 F**) no se registró actividad de caspasa significativa. En la línea celular MCF7 (**figura 22 E**) no se obtuvo actividad a 7 μM por 24 horas, en el resto de las concentraciones y tiempos probados si registraron actividad de caspasa 3/7 alcanzando un aumento de 1.19 veces en referencia al control. En cuanto a la línea celular PC-3 (**figura 22 D**) se obtuvo actividad de caspasa 3/7 en todas las concentraciones y tiempos probados exceptuando 7 μM por 24 horas, destacando que en esta línea es donde se observaron los niveles de actividad más altos entre todas las líneas analizadas alcanzando un aumento de la actividad de caspasa 3/7 de 2.52 veces en referencia al control.

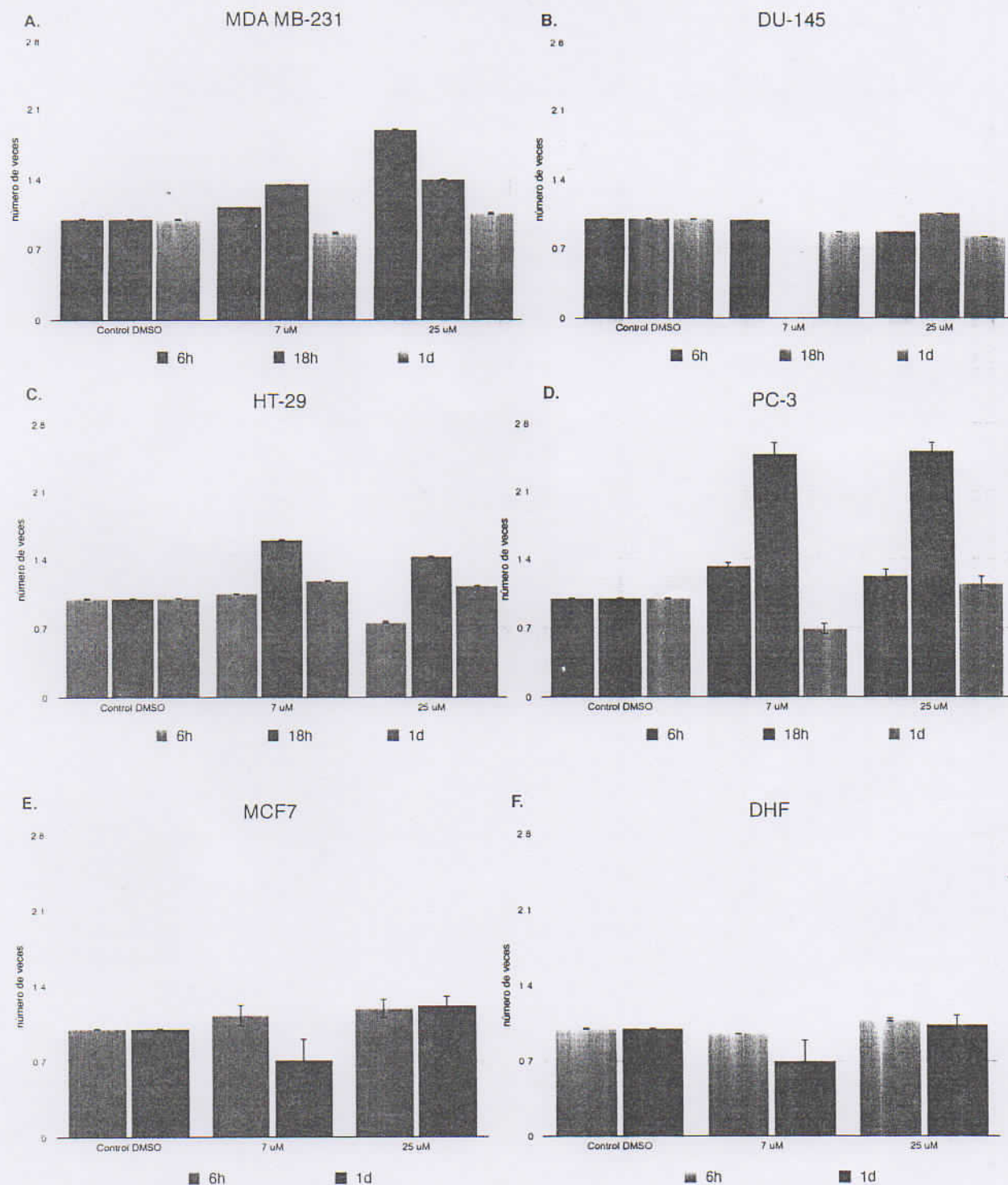


Figura 22. Efecto de Leptocarpina sobre la actividad de Caspasa 3/7. Las líneas MDA MB-231, HT-29, DU 145, DHF, MCF7 y PC-3 fueron tratadas con 7 y 25 μ M de leptocarpina por 6, 18 y 24 horas, están fueron analizadas mediante espectrofotometría y representadas como número de veces en relación al control.

4.6.2. Viabilidad celular en presencia de inhibidor de Caspasa 3/7 (Ac-DEVD-CHO)

Otra forma de demostrar la activación de caspasa 3/7 en el proceso de muerte generado con leptocarpina fue analizar el efecto sobre la viabilidad celular del compuesto tras un pretratamiento con el inhibidor de caspasa 3 y 7 (Ac-DEVD-CHO) en las diversas líneas.

Los resultados mostrados en la figura 24 indican que en la línea celular MDA MB-231 (**figura 23 A**), el pretratamiento con el inhibidor (50 y 100 μM) indujo una recuperación significativa de la viabilidad celular afectada por leptocarpina a las dos concentraciones utilizadas (7 y 25 μM) con valores de $p \leq 0.0039$. En la línea celular PC-3 (**figura 23 B**) la presencia del inhibidor solo presentó una recuperación significativa de la viabilidad celular en las células tratadas con leptocarpina 7 μM con un valor de $p \leq 0.0039$. En las líneas celulares de DHF, DU 145 y CCD 841 CoN (**figura 23 G, E y F**) no presentaron diferencia significativa en ninguna de las concentraciones probadas. HT-29 (**figura 23 C**) presentó una diferencia significativa a 25 μM en ambas concentraciones del Inhibidor, con un valor de $p \leq 0.0079$. La línea celular MCF7 (**figura 23 D**) presentó una diferencia significativa a 25 μM con una concentración de 50 μM del inhibidor, con un valor de $p \leq 0.0313$.

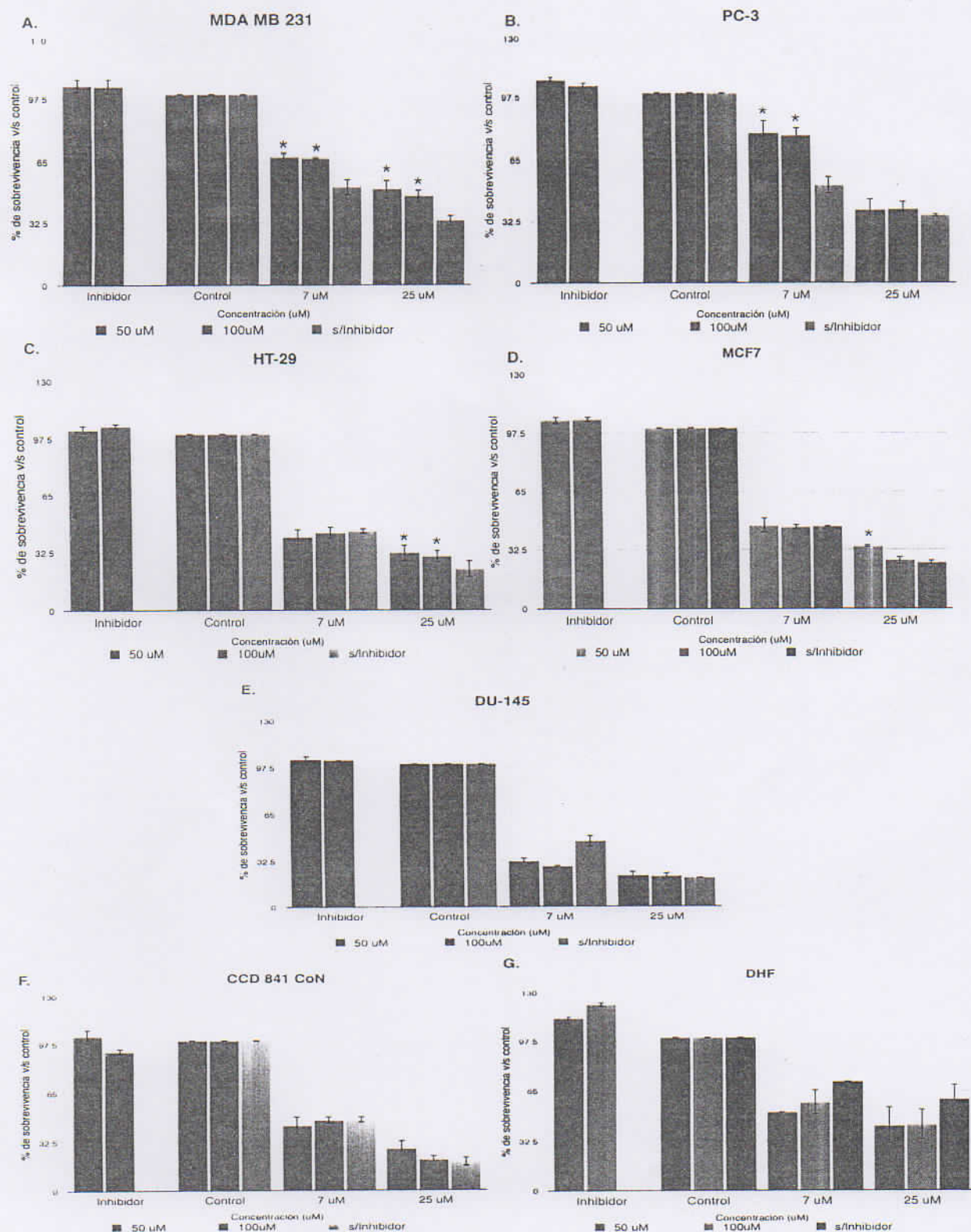


Figura 23. Efecto de Leptocarpina sobre la viabilidad celular tras pretratamiento con inhibidor de caspasa 3/7. Las líneas MDA MB-231, PC-3, CCD 841 CoN, MCF7, HT-29, DHF y DU 145 pre tratadas

con el inhibidor de caspasa 3/7 (Ac-DEVD-CHO 50 μ M y 100 μ M) fueron posteriormente tratadas con leptocarpina (7 y 25 μ M por 72 horas). Se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo de SFB, los datos presentados corresponden a porcentajes de células viables respecto al control en función de la concentración de leptocarpina. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, (* $p \leq 0,0313$; calculado respecto células pre tratada v/s no pre tratadas).

4.7. Efecto de leptocarpina sobre el Ciclo celular

Los procesos de apoptosis y ciclo celular se encuentran ampliamente ligados, ya que en primer lugar los procesos apoptóticos son exclusivos de tejidos proliferativos. Segundo, la intervención del ciclo celular puede prevenir o potenciar la apoptosis dependiendo del punto de detención, ya que existen proteínas que participan en ambos procesos (Meikrantz y Schlegel, 1995). Es por esto que un arresto en el ciclo celular conlleva a una potencial inducción de un proceso de muerte celular (Alenzi, 2004).

La cuantificación del ADN se basa en la capacidad del ioduro de propidio de unirse estequiométricamente a la doble cadena de ADN, unido al uso del citómetro de flujo se puede cuantificar la cantidad de ADN en las células. Tras este análisis en la línea CCD 841 CoN se registró un aumento de las células que se encuentran en la fase subG1, esta fase indica la presencia de una cantidad de ADN menor al de una células en reposo y se asocia a la presencia de cuerpos apoptóticos. Este aumento es dependiente de la concentración de leptocarpina. De la misma forma se observó un aumento en el porcentaje de células que se encuentran en fase G1 y una disminución de las células que se encuentran en G2/M, estos comportamientos al igual que el anteriormente mencionado son dependientes de la concentración de leptocarpina,. MCF7 presentó el mismo comportamiento. Las células PC-3 mostraron un aumento en el porcentaje de células en fase subG1 correlacionado con el aumento de la concentración de leptocarpina, en el caso de las células que se encuentran en la fase G1 se registró un aumento en relación al control. En el caso de HT-29 existe un aumento en el porcentaje celular en fase G1 a medida que aumenta la concentración de leptocarpina. El análisis estadístico para cada línea celular y cada fase del ciclo celular está detallado en la **tabla 9**.

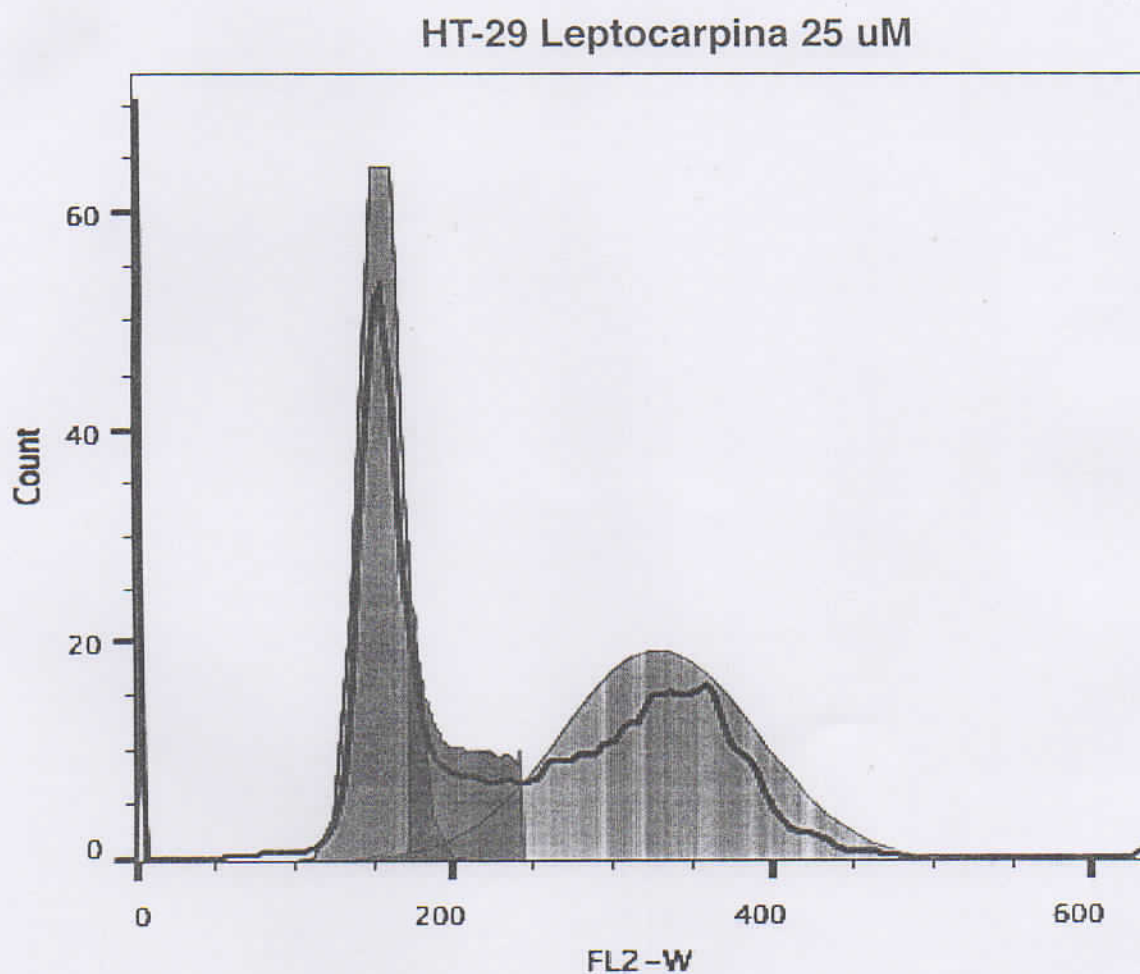


Figura 24. Fases del ciclo celular obtenidas tras tratamiento con leptocarpina por 24 horas. Las células fueron marcadas con Ioduro de Propidio para la cuantificación del ADN y la clasificación en las correspondiente fase del ciclo celular. Los datos fueron analizados con el programa FloJo. La zona de color azul representa las células que se encuentran en fase G0/G1, la zona verde corresponde a las células que se encuentran en fase S, la zona roja las células que se encuentran en fase G2/M.

CCD 841 CoN

Leptocarpina (uM)	Sub G1	G1	S	G2/M
Control	3.19	56.7	0	40.11
2.5	8.52	59.4	24.1	7.98
7	12.86	66.1	13.1	7.94
25	14.85	77.3	4.46	3.39

MCF7

Leptocarpina (uM)	Sub G1	G1	S	G2/M
Control	12.57	53.3	9.03	23
2.5	14.65	58.3	6.95	20.1
7	22.31	62.7	8.91	6.08
25	23.97	64.4	6.61	5.02

PC-3

Leptocarpina (uM)	Sub G1	G1	S	G2/M
Control	0.7	56.3	5.69	11.5
2.5	3.55	58.5	7.25	30.7
7	7.8	56.6	17.9	17.7
25	10.1	59.9	14.5	15.5

HT-29

Leptocarpina (uM)	Sub G1	G1	S	G2/M
Control	9.3	24	17	49.7
2.5	7.72	30.7	5.88	55.7
7	10.7	34.9	20.6	33.6
25	5.2	35.2	14.9	44.7

Tabla 9. Valores obtenidos tras cuantificación de ADN marcado con Ioduro de Propidio (Representados como porcentaje).

4.8. Análisis del factor de transcripción NF-kB

NF-kB es un factor de transcripción dimérico que es responsable de la activación de la expresión de muchos genes involucrados en procesos de inflamación y apoptosis entre otros. En células no estimuladas NF-kB es retenido en el citoplasma mediante la interacción con su inhibidor IκB. En respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios este es liberado de su inhibidor para translocar al núcleo. La capacidad de este factor de transcripción de activar diversos procesos anti apoptóticos lo convierte en un blanco de inhibición de la terapia contra el cáncer (Docet *et al.*, 2005).

4.8.1. Análisis de la actividad de NF-kB

Una vez que NF-kB se activa y transloca al núcleo es capaz de unirse a sus genes dianas, algunos de estos genes son ampliamente conocidos existiendo una secuencia de consenso de unión del factor de transcripción al ADN (Baichwal y Baeuerle, 1997). Este hecho nos permite medir las proteínas activas de NF-kB, mediante la unión de este con las secuencias consenso.

Las líneas celulares tratadas con leptocarpina mostraron una ausencia de actividad de la proteína NF-kB, comportamiento similar al que se presentó cuando las células fueron tratadas con el inhibidor de NF-kB (CAPE).

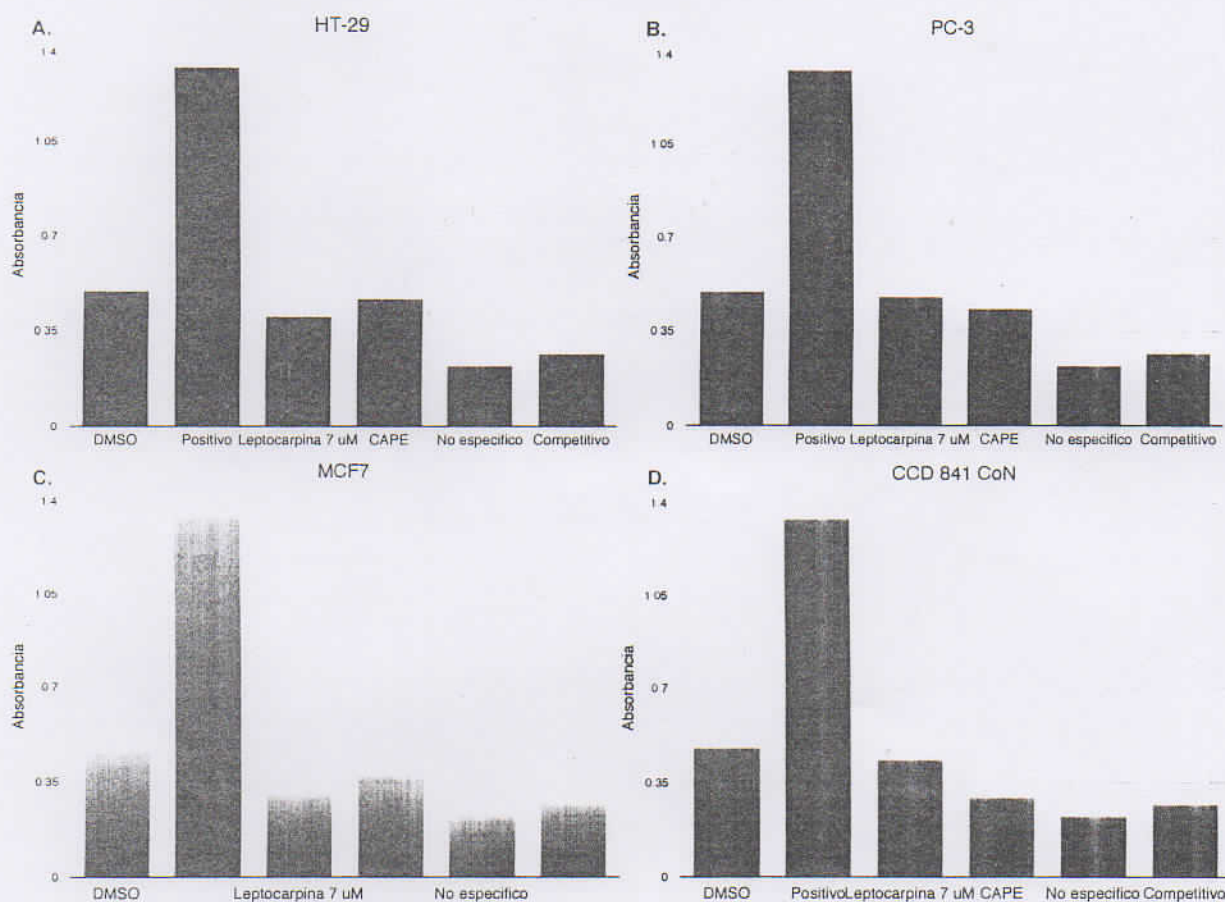


Figura 25. Efecto de leptocarpina sobre la actividad de NF-kB. Las líneas celulares HT-29, PC-3, MCF7 y CCD 841 CoN que fueron tratadas con leptocarpina 7 μ M por 24 horas, fueron además pre tratadas con TNF- α por 1 hora, luego fueron procesadas según las instrucciones del kit para medir NF-kB y el resultante cromóforo cuantificado por espectrofotometría. Las absorbancias obtenidas a 450 nm fueron graficadas.

4.8.2. Análisis de la inmunolocalización de NF-kB

La actividad de NF-kB depende de su localización celular, si está en el citoplasma se encuentra formando un complejo con IκB, el que oculta sus secuencias de destino nuclear, y por tanto, se mantiene transcripcionalmente inactivo. Es por esto que cuando IκB es fosforilado y posteriormente degradado, NF-kB es liberado para translocar al núcleo donde se une a las secuencias consenso de genes blanco (Docet *et al.*, 2005).

Para visualizar la localización del factor NF-kB, se utilizó el anticuerpo contra la forma activa del factor, que se une a la serina 276 que es fundamental en la unión con IκB (Bergqvist *et al.*, 2008). Lo que logramos observar en las inmucitoquímicas realizadas a las diversas líneas celulares, es que leptocarpina es capaz de bloquear la localización nuclear del factor, ya que en presencia de leptocarpina no observamos marca del anticuerpo en el núcleo, incluso cuando las células son estimuladas con TNF-α, un conocido inductor de la actividad de NF-kB. El mismo efecto que se observó con leptocarpina se puede observar con CAPE, un inhibidor de NF-kB. En las **figuras 26 y 27** se muestran imágenes de las inmucitoquímicas realizadas.

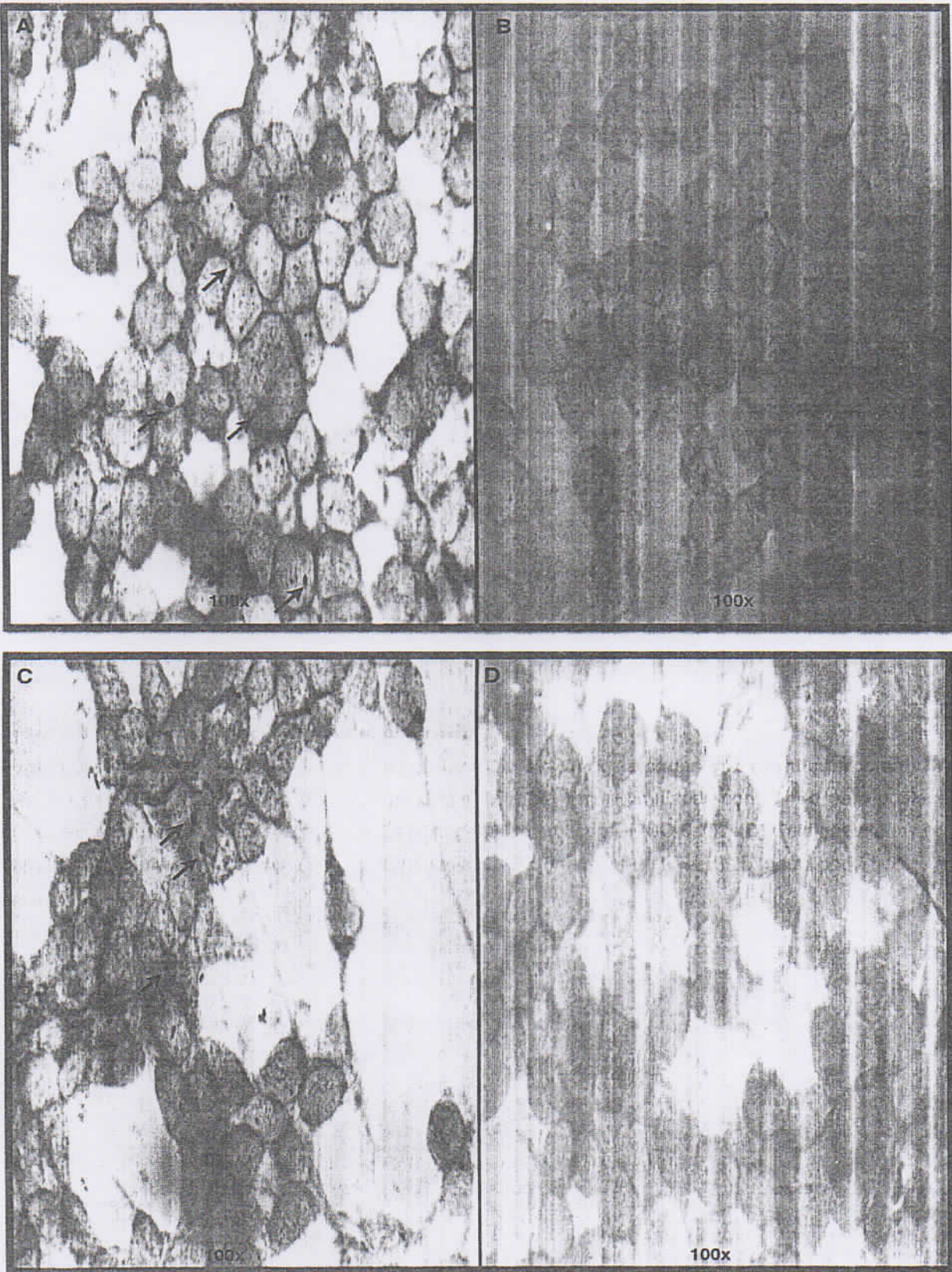




Figura 26. Inmunocitoquímica de la línea celular CCD 841 CoN marcadas con el anticuerpo anti NF-kB. (A) Control Positivo TNF- α (estimulador de NF-kB); (B) Pre estimuladas con TNF- α para posterior tratamiento con 7 μ M de leptocarpina por 24 horas; (C) Control con DMSO 0.1%, (D) Células tratadas con leptocarpina 7 μ M por 24 horas. (E) Control negativo CAPE (inhibidor de NF-kB) 25 mg/ml por 2 horas.

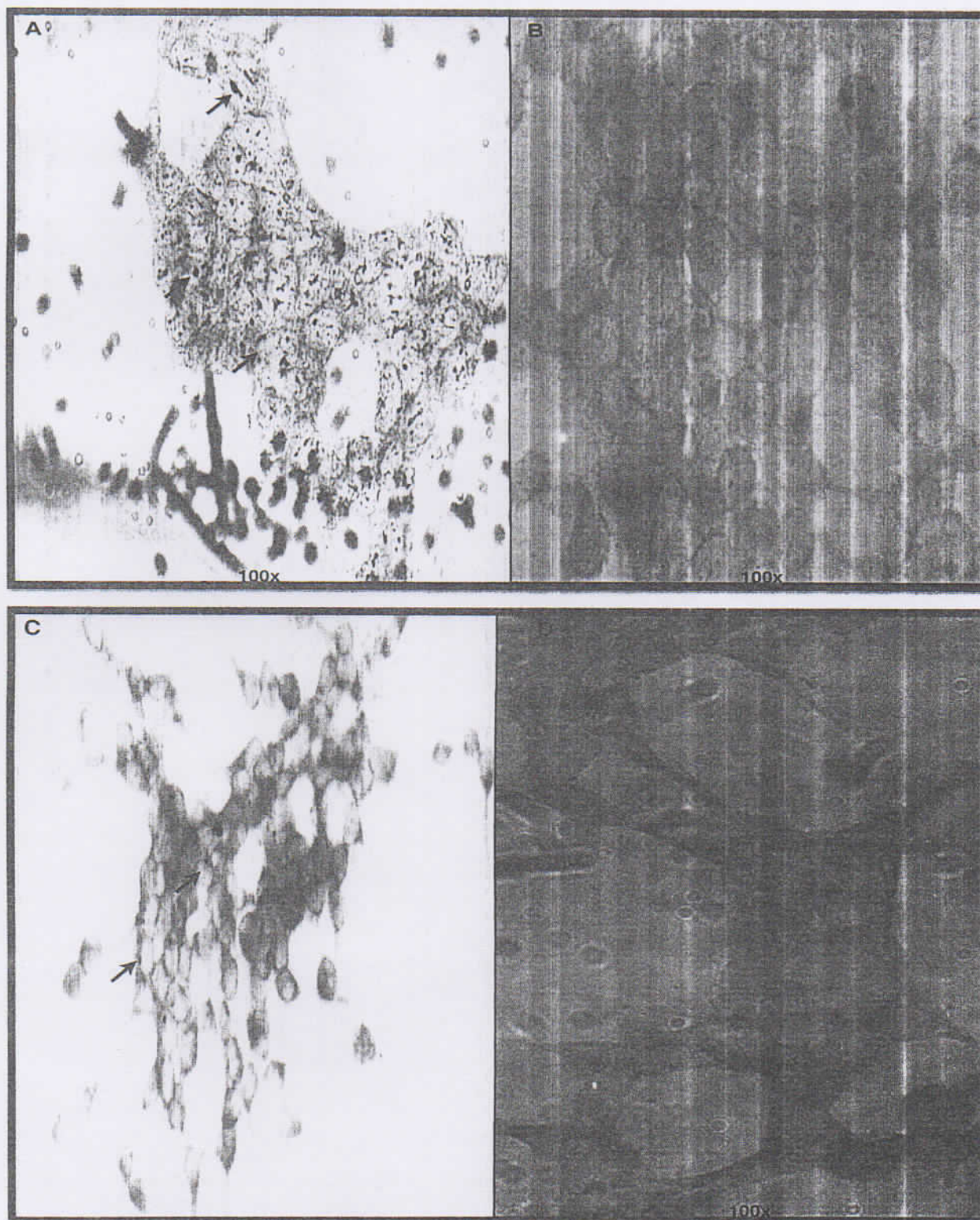


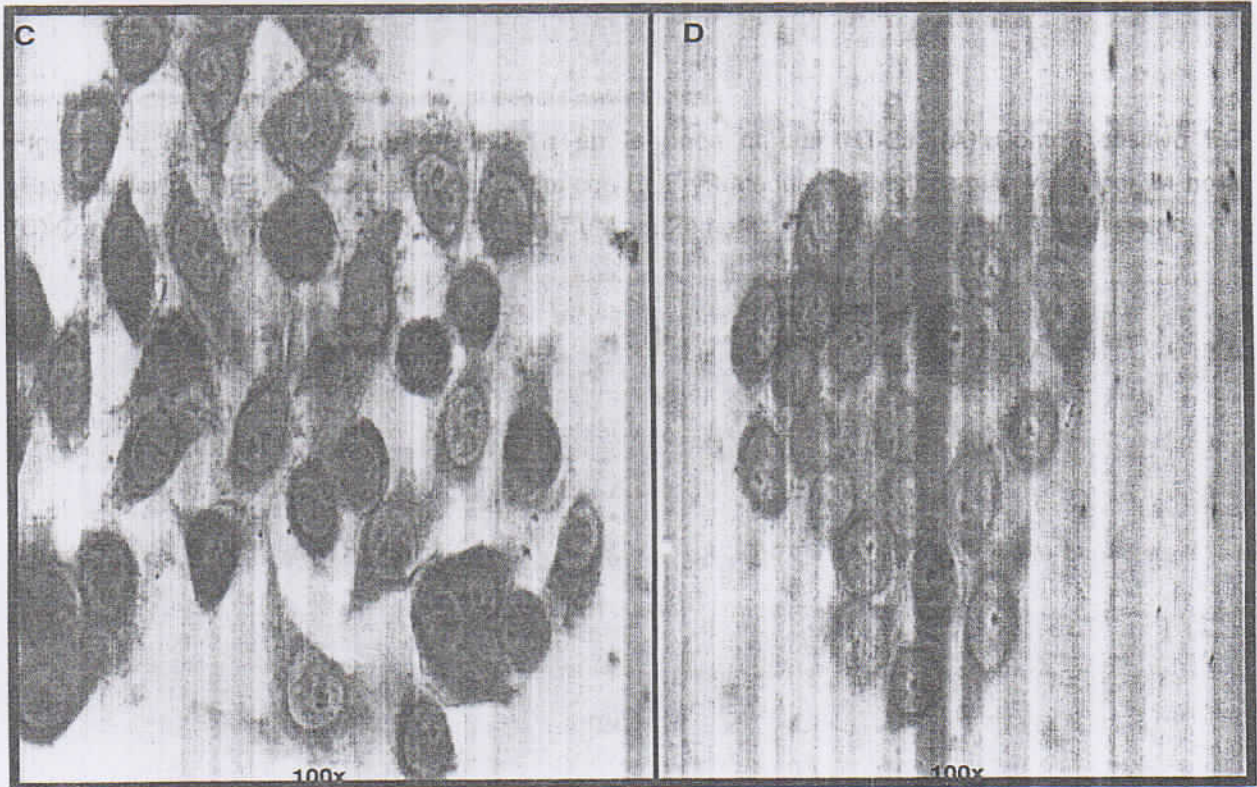
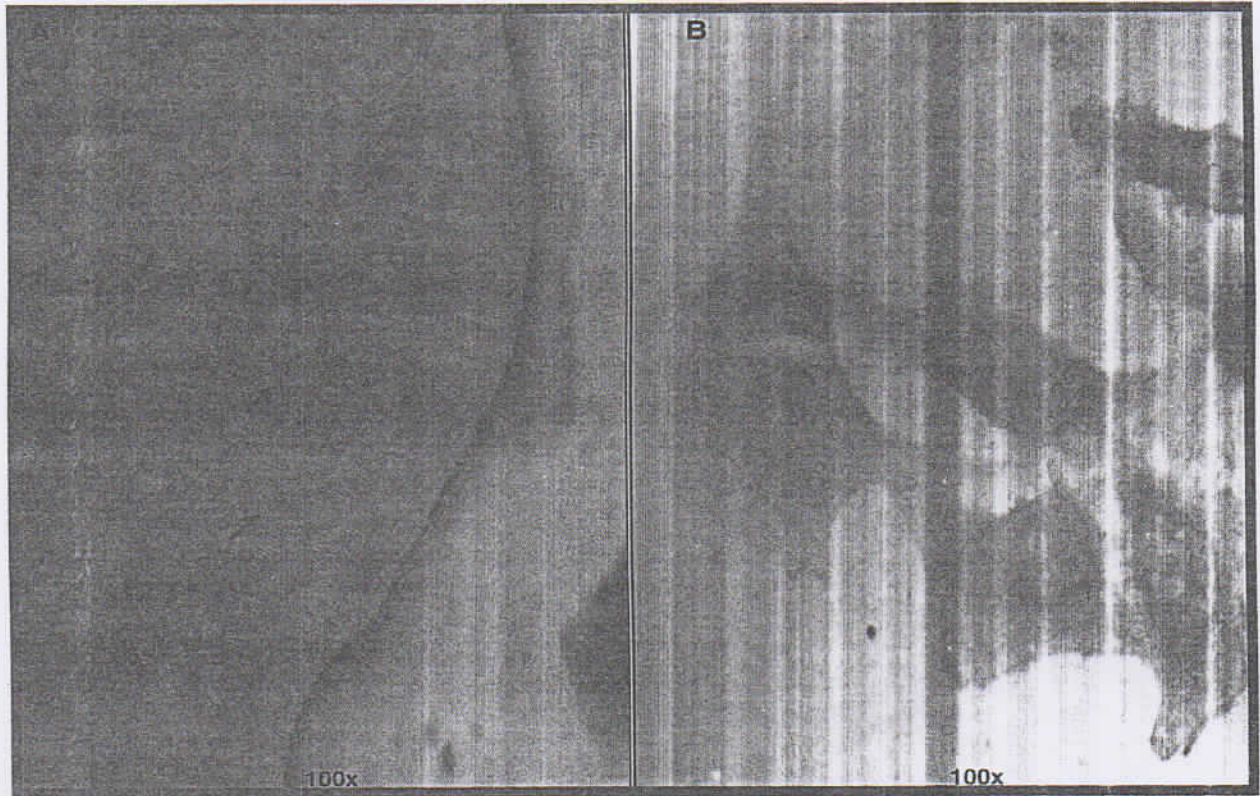
Figura 27. Inmunocitoquímica de la línea celular MCF7 marcadas con el anticuerpo anti NF- κ B. (A) Control Positivo TNF- α (estimulador de NF- κ B); (B) Células pre estimuladas con TNF- α para posterior

tratamiento con 7 μ M de leptocarpina por 24 horas; (C) Control con DMSO 0.1%; (D) Leptocarpina 7 μ M por 24 horas.

4.9 Análisis de la inmunolocalización de HIF-1 α

HIF-1 α se encuentra implicado en procesos realizados bajo hipoxia tanto en células tumorales como tejidos normales asociados a la expresión de genes relacionados con glicolisis y angiogenesis. Es por esto que es un potencial blanco de estudio para el tratamiento de procesos tumorales e inflamatorios (Semenza, 2003).

Es por esto que se utilizó un anticuerpo capaz de detectar la forma activa de HIF-1 α , ya que es capaz de reconocer una secuencia interna de este factor. Como logramos observar en las imágenes de la **figura 28**, HIF-1 α no presenta una expresión basal percibible (**figura 28 C**), solo al ser estimulado con EGF (**figura 28 A**) se presenta marca nuclear. Al tratar con leptocarpina las células estimuladas con EGF (**figura 28 B**) la marca nuclear se pierde. En células tratadas con genisteína, un inhibidor de HIF-1, no se observó marca del anticuerpo (**Figura 28 E**).



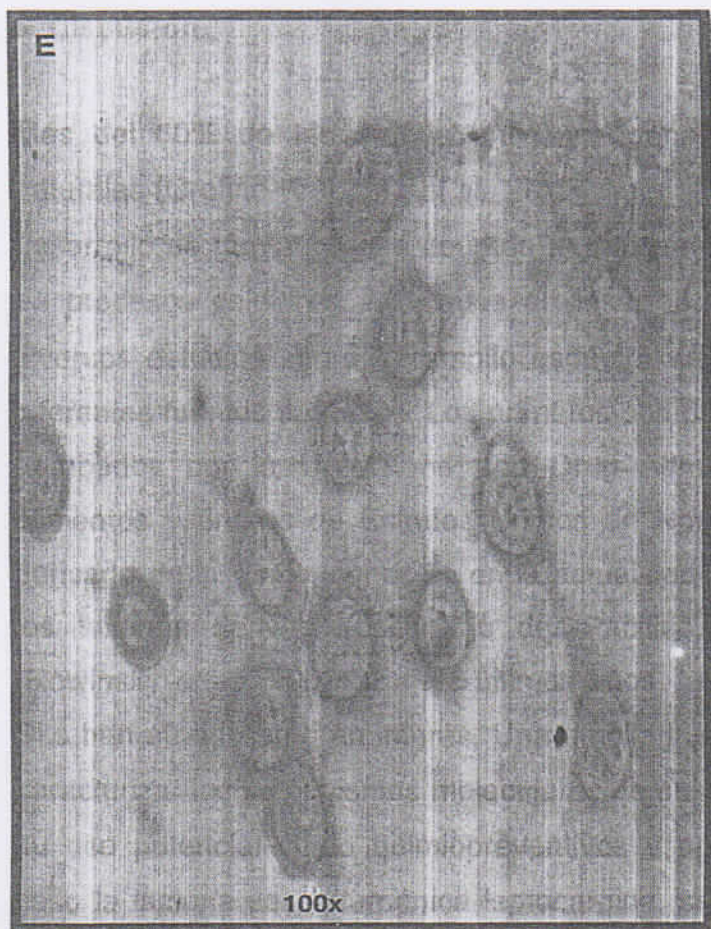


Figura 31. Inmunolocalización de HIF-1 α en la línea celular HT-29. (A) Control positivo EGF (Estimulador de HIF); (B) Células estimuladas con EGF y tratadas con leptocarpina 7 μ M por 24 horas; (C) Control con DMSO 0.1%; (D) leptocarpina 7 μ M por 24 horas; (E) Inhibidor de HIF-1, Genisteína.

5. Discusión

Más del 60% de las drogas anticancerígenas son originadas a partir de fuentes naturales (Orofino-Kreugera *et al.*, 2012) y por ello la investigación actual está dirigida al desarrollo de fármacos que apunten a la lucha contra moléculas claves que participan en procesos celulares, asociados al desarrollo tumoral. Para esto se han realizado diversos estudios sobre un amplio espectro de metabolitos secundarios extraídos de diferentes fuentes naturales. Los primeros compuestos derivados de plantas que fueron aprobados por la U.S. Food and Drug Administration o FDA (Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos de Norteamérica) son el alcaloide vincristina derivado de la Vinca, conocido en la actualidad como Oncovin® (Cragg *et al.*, 2009) y los taxanos derivados del Tejo del Pacífico, conocido como paclitaxel o taxol® (Rowinsky *et al.*, 1992). En los últimos años, las propiedades anticancerígenas de las SLs han atraído un gran interés. Una amplia investigación ha sido llevada a cabo para caracterizar los mecanismos moleculares de sus actividades contra el cáncer, así como su uso potencial como quimiopreventivos y agentes quimioterapéuticos. En nuestro caso la lactona sesquiterpénica leptocarpina, se ha documentado en estudios previos que presenta una actividad biológica, demostrándose que afecta la biosíntesis de proteínas en células HeLa (Martínez *et al.*, 1995). Por otro lado, estudios posteriores confirmaron este comportamiento en líneas celulares de diferente origen como la P-815 (mastocitoma de ratón), NSO-2 (mieloma murino), J774.2 (macrófagos humanos), CHO (células de ovario de hámster chino) (Martínez *et al.*, 2006). También existen estudios del efecto citotóxico en las líneas celulares hematológicas HL60 (leucemia promielocítica) con un IC₅₀ de 22.7 µM, U937 (leucemia monocítica) con IC₅₀ 19.8 µM tratadas por 24 horas (Mena, 2008) y HeLa con una sobrevida de 34% con un tratamiento de 30 µM por 24 horas (Martínez *et al.*, 2006).

Nuestros datos indican que leptocarpina presenta actividad citotóxica en las líneas celulares estudiadas registrando los siguientes IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50%) tras el tratamiento por 72 horas para la línea DU 145 un IC₅₀ 2.04 ± 0.82 µM, en la línea HT-29 se registró un IC₅₀ 3.77 µM ± 0.23, en la línea MCF7 se registro un IC₅₀ 3.08 ±

0.29 μM , en la línea MDA MB-231 IC_{50} 6.35 $\mu\text{M} \pm 0.45$, en la línea PC-3 se registró un IC_{50} 4.47 $\mu\text{M} \pm 0.33$ y finalmente en las líneas no tumorales DHF un IC_{50} de 18.74 $\mu\text{M} \pm 3.52$ y en CCD 841 CoN un IC_{50} de 5.22 $\mu\text{M} \pm 0.31$. Otras lactonas sesquiterpénicas como parthenolide registran valores de Inhibición celular (IC_{50}) en las líneas celulares MCF7 de 11 μM (Wu *et al.*, 2006), DU 145 de 8.9 μM , MDA MB-231 de 7.4 μM (Wyrębska *et al.*, 2013), HT-29 de 7 μM (Parada-Turska *et al.*, 2007) y PC-3 de 14.5 μM (Liu *et al.*, 2010). Sin embargo, comparando con otro compuesto de origen natural, el paclitaxel que es utilizado en la actualidad como quimioterapéuticos, tenemos un IC_{50} de 2 nM en DU 145 (Ranganathan *et al.*, 1998) y de 30 nM en MDA MB-231 (Patel *et al.*, 2000). Los menores valores de IC_{50} registrados para leptocarpina son en la línea DU 145, señalándola como la más sensible ante el compuesto. Por lo contrario, la línea DHF es la que presentó el mayor valor de inhibición celular por lo que resulta ser en éste estudio la menos sensible a leptocarpina. Esto nos indicaría que existe un cierto grado de especificidad por parte de leptocarpina, corroborando esto al calcular y habiendo un alto índice de selectividad (>3 , alta selectividad; Mahavorasirikul *et al.*, 2010). Leptocarpina presenta valores de índice de selectividad que van desde 2.95 a 9.23 en las diferentes líneas celulares estudiadas. Parthenolide por su parte presenta un índice de selectividad de 3.6 (Wu *et al.*, 2010) a 6.4 (Izumi *et al.*, 2008) y en el caso de 5FU, éste presenta un índice de selectividad entre 2.0 a 10.8 (Mahavorasirikul *et al.*, 2010).

La disminución de la viabilidad celular observada al tratar las diversas líneas celulares con leptocarpina fue dependiente e inversamente proporcional tanto de la dosis aplicada como del tiempo de tratamiento con leptocarpina, presentando una alta selectividad. Estos dos factores presentan a leptocarpina como un compuesto atractivo para la utilización no solo como terapéutico sino que como un tratamiento preventivo del cáncer. En comparación a otros compuesto ya sean de origen natural o artificial que se encuentran en estudio, leptocarpina muestra una alta capacidad citotóxica con una alta selectividad.

Una de las características más comunes de una célula cancerosa es la capacidad de proliferar indefinidamente, por lo tanto, una célula que es incapaz de dividirse y producir

un gran número de progenie se considera muerta, esto se conoce muy comúnmente como pérdida de la integridad reproductiva o la muerte reproductiva. La capacidad de una sola célula para convertirse en una gran colonia que puede visualizarse a simple vista es la prueba de que ha conservado su capacidad de proliferación (Munshi *et al.*, 2005). La capacidad de las líneas celulares estudiadas de ser clonogénicas es dependiente de la concentración de leptocarpina y del tipo celular estudiado ya que a bajas concentraciones en la línea celular PC-3 leptocarpina no presenta efecto. En el caso de otras lactonas como parthenolide la fracción de sobrevivencia se encuentra entre un 20% a 80% dependiendo del tipo celular y de la concentración utilizada del compuesto (Nakshatri *et al.*, 2004), este comportamiento es similar al presentado por leptocarpina.

El tratamiento con el compuesto genera cambios de la morfología celular e induce características morfológicas propias de un proceso de muerte celular por apoptosis como la condensación y/o fragmentación de la cromatina, la formación de blebbing, la disminución del volumen celular y la pérdida de la forma celular (Akter *et al.*, 2012). Características de este tipo se han observado en tratamiento de células cancerosas con otras lactonas sesquiterpénicas como parthenolide (Cheng y Xie, 2011).

La mitocondria juega un rol crítico en la inducción y regulación de la apoptosis, esta vía está asociada con cambios de permeabilidad de la membrana mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, este proceso es activado principalmente por las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 y por un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (Henry-Mowatt *et al.*, 2004). La disminución del potencial de membrana mitocondrial y por consiguiente aumento de la permeabilidad de membrana mitocondrial registrados tras el tratamiento con leptocarpina nos indican el inicio de un proceso de muerte celular. Este comportamiento también ha sido descrito para la acción de otras lactonas sesquiterpénicas como parthenolide (Guzman *et al.*, 2005). En estudios anteriores de células tratadas con leptocarpina se registraron aumentos de los niveles de expresión la proteína pro-apoptótica p21^{WAF-1}, disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y un aumento de los niveles de ROS

circulantes (Mena, 2008), estos cambios podrían estar implicados en el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial que se registró en este trabajo.

La permeabilización de la membrana mitocondrial conlleva a la liberación de diversos factores pro-apoptóticos que desencadenan en la activación de caspasas, proteínas efectoras del proceso de muerte celular programada. Mediante el marcaje con CaspACE™ FITC-VAD-FMK que nos permitió detectar la actividad de caspasas que podrían estar involucradas en un proceso apoptótico. Como control positivo utilizamos estaurosporina 1 μ M, compuesto natural (Alcaloide) extraído de *Streptomyces staurosporeus* y que es utilizado para uso clínico y de investigación como un inductor de apoptosis (Belmokhtar *et al.*, 2001). En el caso de estaurosporina esta presenta un efecto en todas las líneas celulares estudiadas con la excepción de la línea no tumoral CCD 841 CoN, este comportamiento ha sido observado en otras líneas no tumorales (Baltuch *et al.*, 1993). El tratamiento con estaurosporina por 12 horas en la línea celular MCF7 no muestra activación de caspasas, esto se puede deber a que el tiempo de exposición fue menor al requerido para la activación de las caspasas, esto se reafirma con los resultados positivos obtenidos tras 24 horas de exposición con estaurosporina. Estudios previos indican que estaurosporina es capaz de generar apoptosis en MCF7 a pesar de la ausencia de caspasa 3 (Ofir *et al.*, 2002) en esta línea celular, ya que es capaz de activar caspasa 6 (Mooney *et al.*, 2002). Es posible que la actividad de caspasas registrada con el tratamiento de leptocarpina en MCF7, se deba a la activación de caspasa 6. Las actividades registradas tras el tratamiento con leptocarpina en las líneas celulares estudiadas demuestran que nuestro compuesto genera la activación de estas proteasas participantes en el proceso de muerte celular.

Una de las caspasas efectoras predominantes es caspasa 3, esta caspasa suele encontrarse con mayor abundancia y actividad en las células (Thornberry *et al.*, 1997), es por esto que se utiliza como un marcador distintivo de un proceso apoptótico. Tras el tratamiento con leptocarpina se registró un aumento en la actividad de caspasa 3 exceptuando las líneas DU 145 y DHF. Esto podría estar indicándonos que leptocarpina es capaz de generar procesos de muerte celular tanto dependientes como independientes de caspasa 3. La activación de procesos de muerte celular programada

dependientes e independientes de caspasa 3/7 se han observado en otros compuestos utilizados en la actualidad como paclitaxel (Ofir *et al.*, 2002) o estaurosporina (Belmokhtar *et al.*, 2001), es decir que el tipo de muerte celular que se estaría generando por el tratamiento con leptocarpina es dependiente del tipo celular y del estado de la célula.

Este último comportamiento pudo ser ratificado mediante el ensayo de viabilidad celular en el que al pre tratar las líneas celulares con un inhibidor de caspasa 3/7, se vio recuperación significativa de la viabilidad celular asociada a la presencia del inhibidor en todas las líneas celulares salvo en DU 145, DHF y CCD 841 CoN, confirmándose los datos registrados en el experimento anterior.

Sabemos que la proteína $p21^{WAF-1}$ es capaz de restringir la división celular frente a un daño en el ADN detectado por las proteínas quinasas ATM y ATR, las que a su vez activan p53 que actúa como factor de transcripción en la síntesis de $p21^{WAF-1}$ y la síntesis de proteínas pro apoptóticas pertenecientes a la familia de las Bcl-2, lo que podría regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Leptocarpina no solo induce un aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial sino que además produce un arresto del ciclo celular en fase G1, esto podría deberse a la participación de $p21^{WAF-1}$ (Alenzi, 2004). En conjunto con el arresto del ciclo celular se observa un aumento en la fracción correspondiente a subG1, la cual está compuesta por fragmentos celulares con fragmentos de ADN producidos en la apoptosis (Henry *et al.*, 2013). El arresto del ciclo celular es una acción ocurrente frente al tratamiento no solo de lactonas sesquiterpénicas (Cheng y Xie, 2011; Hayashi *et al.*, 2010) sino también de otros tipos de compuestos como paclitaxel (Das *et al.*, 2001) y bioflavonoides (Choi *et al.*, 2001).

NF- κ B es un mediador fundamental en el sistema inmune, y además regula genes implicados en la supervivencia celular, la apoptosis, la metástasis y la angiogénesis. Las SLs como parthenolide y helenalina han demostrado un efecto inhibitorio sobre este factor de transcripción. Se ha descrito que el efecto inhibitorio de estas SL puede

producirse a diferentes niveles, ya sea a nivel de la translocación del factor de transcripción al núcleo como a nivel de la unión del factor al ADN (Merfort, 2011; D'Anneo *et al.*, 2013). Leptocarpina por su parte mostró que es capaz de inhibir la localización nuclear del factor de transcripción NF- κ B en las diferentes líneas celulares estudiadas, inhibiendo así la actividad de este factor. Según estudios anteriores se piensa que la inhibición del factor de transcripción NF- κ B está relacionada con la inhibición de la actividad del factor HIF-1 α (Walmsley *et al.*, 2005), esto nos podría estar dando un indicio de la acción inhibitoria que presentó leptocarpina sobre la localización nuclear de HIF-1 α , pero no se conoce con certeza el mecanismo de inhibición que leptocarpina estaría utilizando, este mismo comportamiento se ha descrito para otras lactonas sesquiterpénicas como parthenolide donde se han registrado disminución en la actividad del factor pero no se conoce de forma detallada el por qué (Mathema *et al.*, 2011).

6. Conclusiones

- Leptocarpina disminuye de forma significativa la viabilidad celular de las líneas celulares estudiadas de forma dependiente de la dosis y el tiempo.
- Leptocarpina presenta un alto índice de selectividad (2.95- 9.23).
- Leptocarpina induce condensación y/o fragmentación de la cromatina en las líneas celulares estudiadas.
- Leptocarpina aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial.
- Leptocarpina induce la activación específica de caspasa 3 en las líneas celulares estudiadas exceptuando las líneas DU 145 , MCF 7 y DHF.
- Leptocarpina induce arresto del ciclo celular en la fase (G0/G1) en las líneas celulares estudiadas.
- Leptocarpina inhibe la localización nuclear y la unión a ADN del factor de transcripción NF-kB.
- Leptocarpina inhibe aparentemente la localización nuclear del factor de transcripción HIF-1 α .

Bibliografia

- Adams J. M. and Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281: 1322-1326.
- Adams J.M. and Cory S. (2007). Bcl-2- regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potencial. *Curr Opin Immunol.*, 19: 488-496.
- Akter R., Hossain Md. Z., Kleve M.G. and Gealt M.A.(2012). Wortmannin induces MCF-7 breast cancer cell death via the apoptotic pathway, involving chromatin condensation, generation of reactive oxygen species, and membrane blebbing. *Breast Cancer*, 4: 103-113.
- Alenzi F.Q.B. (2004). Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *Brit J Biomed Sci.*, 61: 1-4.
- An W.G., Kanekal M., Simon M.C., Maltepe E. and Blagosklonny M. V. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Nature*, 392: 405-408.
- Antonsson B. and Martinou J. C. (2000).The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.*, 256: 50-57.
- Arends M.J. and Wyllie A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Revi Exp Pathol.*, 32: 223-254.
- Arqués O., Chicote I., Tenbaum S., Puig I. and Palmer H.G.(2012). Standardized Relative Quantification of Immunofluorescence Tissue Staining. *Protocol Exchange*
- Baeriswyl V. and Christofori G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.*, 19: 329-337.
- Baichwal V.R. and Baeuerle P.A. (1997). Activate NF-kB or die? *Curr Biol.*, 7:94-96.
- Baltuch G.H., Dooley N.P., Couldwell W.T. and Yong V.W.(1993). Staurosporine differentially inhibits glioma versus non-glioma cell lines. *J Neuro-Oncol.*, 16: 141-147.
- Basak S., Kim H., Kearns J.D., Tergaonkar V., O'Dea E., Werner S.L., Benedict C.A., Ware C.F., Ghosh G., Verma I.M. and Alexander Hoffmann (2007). A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell*, 128: 369-381.

- Belloc F., Belaud-Rotureau M.A., Lavignolle V., Bascans E., Braz-Pereira E., Durrieu F. and Lacombe F.(2000). Flow Cytometry Detection of Caspase 3 Activation in Preapoptotic Leukemic Cells. *Cytometry*, 40:151-160.
- Belloc F., Garnier O., Boyer C. and Lacombe F. (2000). CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker as a Probe for Flow Cytometry Detection of Apoptotic Cells. [Internet] Available from: <http://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/caspase-fitcvadfmk-in-situ-marker-a-probe-for-flow-cytometry-detection-of-apoptotic-cells/>.
- Belmokhtar C.A., Hillion J. and Ségal-Bendirdjian E.(2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 20: 3354-3362.
- Bergers G. and Benjamin L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3:401-410.
- Bergqvist S., Ghosh G. and Komives E.A.(2008). The IKB α /NF- κ B complex has two hot spots, one at either end of the interface. *Protein Sci.*, 17: 2051-2058.
- Blasco M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6: 611-622.9
- Bollrath J. and Greten F.R. (2009) IKK/NF- κ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports*, 10: 1314-1319.
- Borka P.M., Schmitz M.L., Kuhnt M., Escherb C., Heinricha M. (1997). Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-KB. *FEBS Letters*, 402: 85-90.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254.
- Brown J.M. and Giaccia A.J.(1998).The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*, 58:1408-1416.
- Cavallaro U., and Christofori G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4:118-132.

- Chaturvedi D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 2011: 313-334.
- Cheng G. and Xie L. (2011). Parthenolide Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Human 5637 Bladder Cancer Cells In Vitro. *Molecules*, 16: 6758-6768.
- Choi, J., Kim, J., Lee, J., Kang, C., Kwon, H., Yoo, Y., Kim, T., Lee, Y., & Lee, S. (2001). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol.*, 19, 837-844.
- Choi J.H., Ha J., Park J.H., Lee J.Y., Lee Y.S., Park H.J., Choi J.W., Masuda Y., Nakaya K., Lee K.T.(2002). Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols. *Jpn J Cancer Res*, 93 :1327-33.
- Chun J.K., Seo D.W., Hoon Ahn S., Park J.H., You J. S., Lee C.H., Lee J.C., Kim Y.K. and Han J.W. (2007). Suppression of the NF- κ B signalling pathway by ergolide, sesquiterpene lactone, in HeLa cells. *J pharm pharmacol.* , 59: 561- 566.
- Colotta F., Allavena P., Sica, A., Garlanda C., and Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30: 1073-1081.
- Costantino V.V., Mansilla S.F., Speroni J., Amaya C., Cuello-Carrión D., Ciocca D.R., Priestap H.A., Barbieri M.A., Gottifredi V., Lopez L.A. (2013). The Sesquiterpene Lactone Dehydroleucodine Triggers Senescence and Apoptosis in Association with Accumulation of DNA Damage Markers. *Plos one*, 8: 1-15.
- Cragg G.M., Grothaus P.G. and Newman D.J.(2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev.*, 109: 3012-3043.
- D' Anneo A., Carlisi D., Lauricella M., Puleio R., Martinez R., Di Bella S., Di Marco P., Emanuele S., Di Fiore R., Guercio A., Vento R. and Tesoriere G.(2013). Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell Death Dis.*, 4:1-14.
- Das G.C, Holiday D., Gallardo R. and Haas C.(2001). Taxol-induces cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett.*, 165: 147-153.

- Debatin K.M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53: 153-159.
- DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G. and Thompson C.B. (2008). The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Met*, 7:11-20.
- DeNardo D.G., Andreu P. and Coussens L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastas Rev*, 29: 309-316.
- Denecker G., Vercammen D., Steemans M., Vanden Berghe T., Brouckaert G., Van Loo G., Zhivotovsky B., Fiers W., Grooten J., Declercq W. and Vandenabeele P. (2001). Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ*, 8: 829-840 .
- Denko N.C.(2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, 8: 705-713.
- Dhingra S., Sharma A.K., Arora R.C., Slezak J. and Singal P.K. (2009). IL-10 attenuates TNF- α -induced NF- κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc Res*, 82: 59-66.
- Docet X., Llobet D., Pallares J. and Guix X.M.(2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446:475-482.
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. *New Engl J Med.*, 315: 1650-1659.
- Emaus R.K. , Grunwald R. , Lemasters J.J. (1986).Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica Biophysica Acta*, 850:436-48.
- Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L. and Henson P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148:2207-16.
- Franken N.A.P, Rodermond H.M, Stap J., Haveman J., Van Bree C.(2006). Clonogenic assay of cell in vitro. *Nat Protocols*, 1: 2315-2319.
- Fulda S. and Debatin K.M. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25: 4798-4811.

- García-Piñeres A.J., Castro V., Mora G., Schmidt T.J., Strunck E., Pahl H.L., Merfort I. (2001). Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J Biol Chem.*, 276:39713-20.
- Giaccia A., Siim B.G. and Johnson R.S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Dis*, 2:803-11.
- Görlach A. and Bonello S. (2008). The cross-talk between NF-kB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J.*, 412: 17-19.
- Grivennikov S.I., Greten F.R. and Karin M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140: 883-899.
- Guzman M.L., Rossi R.M., Karnischky L., Li X., Peterson D.R., Howard D.S., Jordan C.T.(2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, 105:4163-4169.
- Ha T.J., Jang D.S., Lee J. R., Lee K.D., Lee J., Hwang S.W., Jung H. J., Nam S.H., Park K.H. and Yang M.S. (2003). Cytotoxic Effects of Sesquiterpene Lactones from the Flowers of *Hemisteptia lyrata* B. *Arch Pharmacol Res.*, 26: 925-928.
- Hanahan D., and Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364.
- Hanahan D. and Weinberg R.A. (2011). The hallmarks of cancer. *The Next Generation Cell*, 144: 646-674.
- Harmon B.V., Winterford C.M., O'Brien B.A., Allan D.J. (1998). Morphology criteria for identifying apoptosis. In: *Cell Biology: A laboratory Handbook*. AP, 327-340.
- Harris A.L. (2002). Hypoxia a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.*, 2:38-47.
- Hayashi S., Sakurai H., Hayashi A., Tanaka Y., Hatashita M. and Shioura H. (2010). Inhibition of NF-kB by combination therapy with parthenolide and hyperthermia and kinetics of apoptosis induction and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Int J mol med.*, 25: 81-87.
- Hehner S.P., Heinrich M., Bork P.M., Vogt M., Ratter F., Lehmann V., Schulze-Osthoff K., Dröge W., Schmitz M.L.(1998). Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem.*, 273:1288-97.

- Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature Journal*, 407: 770-776.
- Henry C.M., Hollville E. and Martin S.J. (2013). Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Citometry. *Method*, 61:90-97.
- Henry-Mowatt J., Dive C., Martinou J.C. and James D. (2004). Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 23: 2850-2860.
- Herz W. (1977). Sesquiterpene lactones in the Compositae. *London: AP*, 1:337-357.
- Holdenrieder S. and Stieber P. (2004). Apoptosis marker in cancer. *Clin Biochem*, 37: 605-617.
- Hsu P.P. and Sabatini D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134: 703-707.
- Izumi E., Morello L.G., Ueda-Nakamura T., Yamada-Ogatta S.F., Dias B.P., Cortéz D.A., Ferreira I.C., Morgado-Díaz J.A. and Nakamura C.V. (2008). Trypanosoma cruzi: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from Tanacetum parthenium (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp Parasitol.*, 118: 324-330.
- Jacobson M.D., Burne J.F. and Raff M.C. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.*, 13(8): 1899-1910.
- Jones R.G., and Thompson C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23: 537-548.
- Karin M. and Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev of Immunol.*, 18:621-663.
- Karin M., and Delhase M. (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Sem Immunol.*, 12:85-98.
- Ke Q, and Costa M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacology*, 70:1469-1480.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., and Currie A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Brit J Cancer*, 26: 239-257.
- Kingston D.G. (2011). Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod*, 74:496-511.

- Kroemer G. and Reed J.C.(2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6:513 - 519.
- Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H., Kim K.W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, 36: 1-12.
- Lee K. H., Huang E. S., Piantadosi C., Pagano J. S., and Geissman T. A. (1971). Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones. *Cancer Res*, 31:1649-1654.
- Lee H.J., Kim N.Y., Jang M.K., Son H.J., Kim K.M., Sohn D.H., Lee S.H., Ryu J.H. (1999). A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages. *Planta Med*, 65:104-8.
- Lengauer C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1998).Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396: 643-649.
- Li Z.W., Chu W., Hu Y., Delhase M., Deerinck T., Ellisman M., Johnson R., Karin M. (1999).The IKK β subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med.*, 189:1839-1845.
- Liebmann J.E., Cook J.A., Lipschultz C., Teague D., Fisher J. and Mitchell J.B.(1993). Cytotoxicstudiesofpacfitaxel (Taxol®) inhuman tumour cellines. *Brit J Cancer*, 68: 1104-1109.
- Liu J.W., Cai M.X., Xin Y., Wu Q.S., Ma J., Yang P., Xie H.Y. and Huang D.S.(2010). Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29:108.
- Lowe S. W., Cepero E. and Evan G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432: 307-315.
- Luo J.L., Kamata H. and Karin M. (2005). IKK/NF- κ B signaling: balancing life and Death- a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*, 115: 2625-2632.
- Mahavorasirikul W., Viyanant V., Chaijaroenkul W., Itharat A. and Na-Bangchang K. (2010). Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. *BMC Complementary and Alternative Med*, 10: 1-8.

- Mandlekar S., Yu R., Tan T.H. and Kong A.T. (2000). Activation of caspase-3 and c-Jun NH₂-terminal kinase-1 signaling pathways in Tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 60: 5995-6000.
- Martínez R., Kesternich V., Carrasco H., Álvares-Contreras C., Montenegro C., Ugarte R., Gutiérrez E., Moreno J., García C., Werner E. and Cárcamos J. (2006). Synthesis and conformational analysis of leptocarpin derivatives: Influence of modification of the oxirane ring on leptocarpin's cytotoxic activity. *J Chilean Chem Soc*, 51: 1010-1014.
- Martínez R., Kesternich V., Gutierrez E., Dolz H., Mansilla H., (1995). Conformational analysis and biological activity of leptocarpin and leptocarpin acetate. *Planta Med*, 61:188-9.
- Mathema V.B., Koh Y.S., Thakuri B.C. and Sillanpää M. (2011). Parthenolide, a Sesquiterpenic Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities. *J Clin Invest*, 35: 560-565.
- Mazor R.L., Menendez I.Y., Ryan M.A., Fiedler M.A., Wong H.R. (2000). Sesquiterpene lactones are potent inhibitors of interleukin 8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Cytokine*, 12:239-45.
- Meikrantz W and Schlegel R.(1995). Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem.*, 58: 160-174.
- Mena Serey C.A. (2008). Efecto apoptótico y quimiosensibilizador de Leptocarpina en distintos modelos celulares de leucemias (tesis).
- Merfort I. (2011). Perspectives on Sesquiterpene Lactones in Inflammation and Cancer. *Curr Drug Targets*, 12:1560-1573.
- Milosevic M., Fyles A., Hedley D. and Hill R. (2004). The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure. *Semin Radiat Oncol.*, 14: 249-258.
- Miyamoto S., Maki M., Schmitt M.J., Hatanaka M. and Verma I.M.(1994). Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of I κ B α is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kB. *PNAS*, 91: 12740-12744.

- Mocharla, R., Mocharla, H.y Hodes, M. E. (1987). A novel, sensitive fluorometric staining technique for the detection of DNA in RNA preparations. *Nucleic Acids Res.*, 15: 10589.
- Modzelewska A., Sur S., Kumar S. K. and Khan S. R. (2005). Sesquiterpenes: Natural Products That Decrease Cancer Growth. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*, 5:477-499.
- Mooney L.M., Al-Sakkaf K.A., Brown B.L. and Dobson P.R.M.(2002). Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Brit J Cancer*, 87:909-917.
- Morotti A., Cilloni D., Pautasso M., Messa F., Arruga F., Defilippi I., Carturan S., Catalano R., Rosso V., Chiarenza A., Taulli R., Bracco E., Rege-Cambrin G., Gottardi E., and Saglio G. (2006). NF- κ B Inhibition as a Strategy to Enhance Etoposide-Induced Apoptosis in K562 Cell Line. *Am J Hematol.*, 81:938-945.
- Mougiakakos D., Choudhury A., Lladser A., Kiessling R., and Johansson C.C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res.*, 107:57-117.
- Munshi A., Hobbs M. and Meyn R.E.(2005). Clonogenic cell survival assay. *Method Mol Med.*, 110: 21-28.
- Nakshatri H., Rice S.E. and Bhat-Nakshatri P.(2004). Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal Kinase. *Oncogene*, 23:7330-7344.
- Natarajan K., Singh S., Burke T.R., Grunbergert Jr.t, D. and Aggarwal B.B. (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-KB. *Immunology*, 93:9090-9095.
- Negrini S., Gorgoulis V.G., and Halazonetis T.D. (2010). Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11:220–228.
- Ofir, R., Seidman, R., Rabinski, T., Krup, M., Yavelsky, V., Weinstein, Y.y Wolfson, M. (2002). Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ*, 9: 636-642.

- Oren M. and Rotter V. (1999). Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci.*, 55: 9-11.
- Orofino-Kreugera M.R., Grootjansc S., Biavattib M.W., Vandenabeelec P. and D'Herdee K. (2012). Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drug*, 1-14.
- Ostrand-Rosenberg S., and Sinha P. (2009). Myeloid derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.*, 182:4499-4506.
- Parada-Turska J., Paduch R., Majdan M., Kandefer-Szerszeń M. and Rzeski W. (2007). Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 59: 233-237.
- Patel N.M., Nozaki S., Shortle N.H., Bhat-Nakshatri P., Newton T.R., Rice S., Gelfanov V., Boswell S.H., Goulet Jr R.J., Sledge Jr G.W. and Nakshatri H. (2000). Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- κ B is enhanced by I κ B α super-repressor and parthenolide. *Oncogene*, 19: 4159-4169.
- Peng X.H., Karma P., Cao Z., Jiang B.H., Zhou M. and Yang L. (2006). Cross-talk between Epidermal Growth Factor Receptor and Hypoxia-inducible Factor-1 α Signal Pathways Increases Resistance to Apoptosis by Up-regulating Survivin Gene Expression. *J Biol Chem*, 8:25903-25914.
- Qian B.Z., and Pollard J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141: 39-51.
- Ranganathan S., Benetatos C.A., Colarusso P.J., Dexter D. W. and Hudes G.R. (1998). Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Brit J Cancer*, 77: 562-566.
- Riganti C., Doublier S., Viarisio D., Miraglia E., Pescarmona G., Ghigo D. and Bosia A. (2009). Artemisinin induces doxorubicin resistance in human colon cancer cells via calcium-dependent activation of HIF-1 α and P-glycoprotein overexpression. *Brit J Pharmacol.*, 156: 1054-1066.
- Rowinsky E.K., Onetto N., Canetta R.M. and Arbuck S.G. (1992). Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Seminars in Oncology*, 19:646-662.

- Sakaue, M., Motoyama, Y., Yamamoto, K., Shiba, T., Teshima, T. y Chiba, K. (2006). Quantitative measurement of caspase-3 activity in a living starfish egg. *Biochem Biophys Res Commun*, 350: 878-883.
- Semenza G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3: 721-32.
- Semenza G.L., Agani F., Booth G., Forsythe J., Iyer N., Jiang B.H., Leung S., Roe R., Wiener C., Yu A. (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.*, 51: 553-555.
- Schmid T., Zhou J. and Brüne B. (2004). HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 8: 423-431.
- Shay J.W., and Wright W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Rev Mol Cell Biol.*, 1:72-76.
- Sherr C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer*, 6: 663-673.
- Shields J.D., Kourtis I.C., Tomei A.A., Roberts J.M., and Swartz M.A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 328:749-752.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399: 483-487.
- Siedle B., García-Piñeres A.J., Murillo R., Schulte-Mönting J., Castro V., Rüngeler P., Klaas C.A., Da Costa F.B., Kisiel W., Merfort I.(2004). Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. *J Med Chem.*, 47:6042-54.
- Slee E.A., Zhu H., Chow S.C., Macfarlane M., Nicholson D.W. andCohen G.M. (1996). Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J.*, 315: 21-24.
- Takada Y., Ichikawa H., Badmaev V., Aggarwal B.B. (2006). Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by sup- pressing NF-kappa B and NF-kappa B-regulated gene expression. *J Immunol.*, 176:3127-3140.

- Takahashi A. and Earnshaw W.C.(1996). ICE-related proteases in apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.*, 6: 50-55.
- Talmadge J.E. and Fidler I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.*, 70:5649-5669.
- Tennant D.A., Durán R.V., Boulahbel H. and Gottlieb E. (2009). Metabolic Transformation in cancer. *Carcinogenesis*, 30: 1269-1280.
- Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P., Chapman K.T., Nicholson D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.*, 272: 17907-17911.
- Tsujimoto Y. and Shimizu S. (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.*, 7:1174-1181.
- Van Uden P.S., Kenneth N. and Rocha S. (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J.*, 412: 477-484.
- Vichai V. and Kirtikara K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat protocols* 1: 1112-1116.
- Villena J., Henriquez M., Torres V., Moraga F., Diaz-Elizondo J., Arredondo C., Chiong M., Olea-Azar C., Stutzin A., Lavandero S. and Quest A. F. (2008). Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radical Bio Med*, 44: 1146-1160.
- Walmsley S.R., Print C., Farahi N., Peyssonnaud C., Johnson R.S., Cramer T., Sobolewski A., Condliffe A.M., Cowburn A.S., Johnson N. and Chilvers E.R.(2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med*, 201: 105-115.
- Wang B., Li H., Yan H., Xiao J.G. (2005). Genistein inhibited hypoxia-inducible factor-1 α expression induced by hypoxia and cobalt chloride in human retinal pigment epithelium cells. *Method Find Exp Clin.*, 27: 179-84.
- Wen J., You K.R., Lee S.Y., Song C.H., Kim D.G. (2002). Oxidative stress mediated apoptosis. The anticancer effect of sesquiterpene lactone phartenolide. *J Bio Chem*, 277: 38954-64.

- Wu C., Chen F., Rushing J.W., Wang X., Kim H., Huang G., Haley-Zitlin V. and He G. (2006). Antiproliferative Activities of Parthenolide and Golden Feverfew Extract Against Three Human Cancer Cell Lines. *J Med Food*, 9: 55-61.
- Wu R.P., Hayashi T., Cottam H.B., Jin G., Yao S., Wu C.C., Rosenbach M.D., Corr M., Schwab R.B. and Carson D.A. (2010). Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*, 1-6.
- Wyrębska A., Szymański J., Gach K., Piekielna J., Koszuk J., Janecki T. and Janecka A. (2013). Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Mol Bio Rep.*, 40: 1655-1663.
- Yang L., Pang Y., and Moses H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 31:220-227.
- Zhang S., Won Y.K., Ong C.N. and Shen H.M. (2005). Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*, 5: 239-249