



Universitas Médica

ISSN: 0041-9095

revistascientificasjaveriana@gmail.com

Pontificia Universidad Javeriana

Colombia

SANTANDER, SANDRA PAOLA; URUEÑA, CLAUDIA; CASTAÑEDA, DIANA; CIFUENTES, CLAUDIA; ARISTIZÁBAL, FABIO; CORDERO, CLAUDIA; FIORENTINO, SUSANA
Influencia del tratamiento de Petiveria alliacea en la expresión diferencial de genes en células tumorales

Universitas Médica, vol. 50, núm. 3, julio-septiembre, 2009, pp. 284-296

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231018677003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Influencia del tratamiento de *Petiveria alliacea* en la expresión diferencial de genes en células tumorales

SANDRA PAOLA SANTANDER¹

CLAUDIA URUEÑA¹

DIANA CASTAÑEDA¹

CLAUDIA CIFUENTES^{1,2}

FABIO ARISTIZÁBAL³

CLAUDIA CORDERO³

SUSANA FIORENTINO⁴

Resumen

El estudio del perfil de expresión génica en las células eucariotas se constituye como una herramienta importante en el entendimiento de las huellas moleculares generadas en respuesta a un estímulo farmacológico. A partir de *Petiveria alliacea*, una de las plantas colombianas con actividad antitumoral, se ha obtenido la fracción FAST 8 7:3, en la cual se han encontrado diferentes compuestos, como el trisulfuro de dibencilo, uno de los componentes antitumorales más potentes reportados para la planta. Esta fracción también posee actividad citotóxica sobre la línea de células tumorales K562 e induce cambios en el perfil de expresión de genes, que podrían estar relacionados de alguna forma con la actividad antitumoral tradicional reportada para esta planta. Esta actividad puede ser ejercida, en parte, por la presencia del trisulfuro de dibencilo y por la actividad de los otros componentes de la fracción. En este contexto, proponemos el uso del ADNc-AFLP como herramienta útil en la tamización del perfil de genes transcritos en las células tumorales y, también, como herramienta útil para el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales.

Palabras clave: AFLP, *Petiveria alliacea*, expresión diferencial de genes, fármacos antitumorales, productos naturales.

1 Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas, Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Profesora asistente, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

3 Departamento de Farmacia, Grupo de Farmacogenética del Cáncer, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

4 Directora, Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 26-01-2009

Revisado: 17-04-2009

Aceptado: 18-06-2009

Title

Differential gene expression in tumor cells induced by *Petiveria alliacea* treatment

Abstract

Gene expression profile in eukaryotic cells is a very useful tool to understand the molecular footprint responsible for the pharmacological response to a stimulus. In the present study a fraction named FAST 8 (7:3), obtained from *Petiveria alliacea*, was used as stimulus to track out the gene expression profile on K562 cell line. *P. alliacea* is a plant that grows in Colombia, and in traditional medicine is used for its anti-tumoral activity. Of the different compounds present in the fraction, dibenzyl trisulfide (DTS), is a compound described by previous reports to have anti-tumoral properties. The fraction exhibits cytotoxic activity over tumor cell line K562 inducing changes in gene expression profile. DTS might be in part responsible for the fraction activity, but the other compounds may also contribute to the biological response. Herein, we propose the use of cDNA-AFLP as a useful tool for gene expression profile screening of tumoral cells and in the discovery of new anti-tumoral drugs.

Key words: AFLP, *Petiveria alliacea*, gene differential expression, antitumor drugs, natural products.

Introducción

Las plantas han sido utilizadas por siglos como fuente de medicina popular para el tratamiento de diferentes enfermedades, pero sólo hasta ahora ese conocimiento tradicional comienza a ser utilizado y estudiado en la medicina moderna, redescubriendo medicamentos para el tratamiento del cáncer. Un ejemplo de ello es el taxol, aislado de la planta *Taxus brevifolia* y caracte-

rizado de manera experimental como fármaco antitumoral, ya que tiene la capacidad de unirse y desestabilizar los microtúbulos de diferentes líneas celulares tumorales[2]. Debido a esta actividad, actualmente es usado en el tratamiento de cáncer de mama y de ovario[3].

En Colombia, existen diferentes plantas que también tienen un inmenso potencial farmacológico y que comienzan a ser estudiadas con el fin de encontrar nuevos productos que puedan utilizarse en la terapia antitumoral; una de ellas es *Petiveria alliacea*, conocida comúnmente como anamú. Esta planta es cultivada en diferentes áreas tropicales con propósitos medicinales[4], como diurético, antiespasmódico, analgésico y antiinflamatorio[5, 6]. Hasta el momento, se han venido realizando diferentes estudios farmacológicos con el fin de descifrar sus propiedades medicinales, las cuales han confirmado su actividad inmunomoduladora[7, 8], antimicótica[9], analgésica, antiinflamatoria[10, 11] y antitumoral[12].

La actividad antitumoral fue inicialmente reportada en las fracciones etanólicas, las cuales inducen citotoxicidad en diferentes líneas de células tumorales[13]. Diversos componentes han sido implicados como responsables de la actividad antitumoral, como el trisulfuro de dibencilo, que ejerce diferentes efectos (antiproliferativos y

citotóxicos) en células del neuroblastoma[12].

Recientemente, nuestro grupo encontró que una fracción no polar de *P. alliacea* induce apoptosis por la vía mitocondrial y disminución de la HSP70, la cual puede ser protectora contra la muerte celular (artículo en preparación). Además, el análisis del proteoma de las células tumorales tratadas con fracciones obtenidas a partir de la purificación con acetato de etilo, ha demostrado un cambio metabólico importante que podría explicar la muerte celular, unido a una actividad sobre el citoesqueleto que induce una detención de las células en la fase G2 del ciclo celular[13].

En la actualidad, el estudio del perfil de la expresión genética en células eucariotas se constituye como una herramienta importante en el entendimiento de las huellas moleculares de una variedad de enfermedades humanas[14] y, también, se utiliza en la identificación de genes expresados por tejidos y células tratadas con diversos agentes farmacológicos[15]. Aunque los mecanismos por los cuales *P. alliacea* ejerce una función antitumoral empiezan a ser estudiados, no sabemos si la expresión diferencial de proteínas[13] corresponde también a una expresión diferencial de genes o si, por el contrario, es el reflejo de un manejo diferencial de las proteínas codificadas naturalmente por la célula.

El estudio de estos mecanismos permitiría diferenciar los blancos moleculares de la planta entre los factores reguladores del procesamiento posterior a la traducción de la degradación intracelular o los reguladores de la expresión génica.

En este contexto, proponemos el uso del ADNc-AFLP basado en el polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism*, AFLP) como método de estudio rápido para observar el perfil de transcritos entre poblaciones de ARNm de células tumorales. Este método involucra la transcripción inversa de ARNm a ADNc de doble cadena, seguida por la digestión con una enzima de restricción de amplio rango de corte (EcoRI) y un segundo corte con una enzima dirigida contra secuencias menos frecuentes (MseI). Después de la digestión enzimática, se realiza la ligación de adaptadores específicos sobre el ADNc y el fraccionamiento de esta mezcla se utiliza para la amplificación selectiva por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); estos fragmentos se separan después en geles de alta resolución y se tiñen con nitrato de plata[16, 17].

En el presente estudio encontramos que una fracción de *P. alliacea*, a la que denominamos FAST 8 7:3, presenta un compuesto muy citotóxico, previamente identificado en la plan-

ta[18], que induce muerte en la línea tumoral K562, además de generar un cambio en el perfil de expresión de genes determinado por AFLP. Estos hallazgos podrían sugerir que el cambio en el proteoma de las células[13] correspondería a un cambio en la expresión de genes, lo que podría ser el origen de su actividad antitumoral.

Materiales y métodos

Obtención de las fracciones de *Petiveria alliacea*

El material vegetal fue recolectado en Viotá, Cundinamarca, e identificado por el biólogo Antonio Luis Mejía como *P. alliacea*. La planta se comparó con la muestra del Herbario Nacional Colombiano, con número de registro 333406 del 12 de agosto de 1991.

Las hojas secas y los tallos (300 g) fueron extraídos por reflujo (60°C) con 1,5 litros de etanol al 96% por 3 horas. El extracto etanólico fue filtrado y evaporado hasta la mitad de su volumen, a presión reducida de 175 mbares. Se añadió un volumen igual de agua destilada y se calentó a 65°C por 20 minutos con agitación constante para permitir la floculación. El precipitado fue eliminado por filtración (papel Wattman) y la fracción soluble se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) exhaustivamente (7 veces), utilizando un embudo de separación.

Análisis de la fracción FAST 8 por HPLC-MS/MS

Para la separación de la fracción, se utilizó una bomba HPLC Alliance 2795 (Waters®, UK) con detector ultravioleta de diodos PDA 996 (Waters®, UK), a las siguientes condiciones: Columna Symmetry (Waters) C18 – 2,1x150 mm – 5 µm + precolumna a 40°C; solventes: solvente A (H₂O + 0,1% HCOOH) y solvente B (CH₃OH + 0,1% HCOOH); gradiente: 0 a 45 minutos de corrido solvente A al 60% y solvente B al 40%; de los 45 a 50 minutos de corrido solvente A al 0% y solvente B al 100%, y de 52 a 65 minutos de corrido solvente A al 60% y solvente B al 40%. Para el análisis de la relación masa/carga (m/z) de los compuestos, se utilizó un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo (LCT de MICromass®, UK) y *electrospray*. Los análisis se realizaron en el Instituto de Productos Naturales de Gif sur Yvette, Francia.

Mantenimiento y tratamiento de las células tumorales

Para el estudio se utilizó la línea celular K562 (eritroleucemia humana), obtenida de la American Type Cell Culture (ATCC) Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 con suplemento de suero fetal bovino (SFB) al 10%, 0,01 M de Hepes, 100 µg de penicilina, 100 UI de estreptomina y 2 mM de glutamina (Eurobio,

Francia), en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. La viabilidad de las células se analizó con azul de tripano.

Determinación del efecto citotóxico de la fracción FAST 8 sobre células K562 (IC50)

Para los análisis de citotoxicidad, se cultivaron 5×10^3 células K562 y se trataron con diferentes concentraciones de la fracción FAST 8 (125 a 0,9 µg/ml). Como control negativo, se utilizó etanol al 0,2% y como control positivo se agregaron diferentes concentraciones de vincristina (0,1 a 0,0008 µg/ml), por 48 horas a 37°C. Después del tratamiento, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI 1640 con suplemento sin rojo de fenol y se trataron por 4 horas a 37°C con MTT, a una concentración final de 0,25 µg/ml [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Después de la incubación, los cristales de formazán se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) y la absorbancia se determinó a 540 nm en un Multiskan MCC/340 (LabSystems). Finalmente, la concentración inhibitoria 50 se calculó usando un análisis Probit (MINITAB® Release 14.1. Minitab Inc. 2003 Statistical Software).

Obtención del ARNm y síntesis del ADNc

Para los ensayos de AFLP, se trataron 20×10^6 células K562 con 25 µg/ml

de la fracción FAST 8. Después del tratamiento, las células se observaron al microscopio para identificar posibles cambios morfológicos. El ARN total de las células K562 se obtuvo con trizol, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GIBCO). Las muestras de ARN se cuantificaron por espectrofotometría y se observaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El ARNm se aisló a partir del ARN total, utilizando el kit de aislamiento de ARNm PolyAtract (Promega).

Para la construcción del ADNc, 1 µg del ARNm se puso en contacto con 50 ng/ml de cebadores aleatorios, 0,5 mM de dNTP, 0,005 M de DDT y 200 U de la enzima SuperScript III, en un volumen final de 20 µl (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo utilizando las siguientes temperaturas: 10 minutos a 25°C, seguida de 50 minutos a 50°C y una reacción terminal de 70°C por 5 minutos. Para la síntesis de la segunda cadena, se utilizaron 5 U de *E. coli* ligasa, 20 U de *E. coli* polimerasa I (New England Biolabs), 200 µM de dNTPs y 1 U de RNasa H (Invitrogen), en un volumen final de 28 µl. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 16°C. La purificación del ADNc de doble cadena se llevó a cabo utilizando fenol:cloroformo:isoamílico en una relación de 25:24:1 (Clontech).

Análisis de ADNc-AFLP

Para los análisis de AFLP, el ADNc de doble cadena se incubó con 0,5 U

de EcoRI y MseI, según las condiciones del fabricante (Invitrogen). Se incubaron 10 µl de los productos de digestión con 5 pmol de los adaptadores para EcoRI y MseI, con el fin de generar secuencias para la amplificación del ADNc. Para las preamplificaciones, se utilizaron cebadores con una base de selección en el extremo 3'. La mezcla utilizada contenía 50 ng de ADNc, 20 µl de la mezcla de iniciadores de preamplificación, PCR solución tampón AFLP 1X y taq polimerasa a 0,04 U/µl, en un volumen final de 25 µl. Con esta mezcla se realizó la PCR, con el siguiente perfil de amplificación: 94°C por 30 segundos (s), 56°C por 60 s y 72°C por 60 s, por 20 ciclos. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Para las amplificaciones selectivas, se utilizaron cebadores, que poseen la misma secuencia de los utilizados en la preamplificación, más tres bases de selección en los extremos 3' (Invitrogen-AFLP analysis system II) (tabla 3).

Análisis del gel

Para observar los cambios en el perfil de expresión de genes, la muestra obtenida de la PCR selectiva se diluyó con 20 µl de una solución de formamida al 98%, EDTA 10 mM, azul de bromofenol y cianol de xileno, la cual fue calentada por 5 minutos a

95°C y colocada en hielo inmediatamente. La muestra se corrió en geles de secuenciación de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 20:1, urea 6 M y solución tampón TBE 1X) y teñidos con nitrato de plata (Invitrogen-AFLPs analysis system II).

Resultados

Obtención y análisis de la composición química del FAST 8

Durante el proceso de purificación del extracto de *P. alliacea*, se obtuvieron tres fracciones denominadas (1:1), (7:3) y (9:1), a las que se les determinó su actividad citotóxica sobre la línea de células tumorales K562. Los resultados obtenidos muestran que la fracción 7:3, llamada FAST 8, induce mayor cambio morfológico y posee mayor actividad citotóxica sobre las células tumorales que las otras fracciones obtenidas para la *P. alliacea* (no se presentan los datos). Por lo tanto, esta fracción fue la seleccionada para continuar con los ensayos biológicos.

Mediante el análisis de la actividad citotóxica, se estableció la concentración a la cual el 50% de las células tumorales se encontraban vivas y el otro 50%, muertas (IC₅₀); se calculó para la fracción y se encontró una concentración correspondiente a 81,58 µg/ml (tabla 1).

Teniendo en cuenta este resultado, se establecieron concentraciones por debajo de la IC50 que nos permitieron observar el efecto de la fracción. Para el trisulfuro de dibencilo, uno de los compuestos reportados y presentes en la fracción, en el 2007, Williams referencia los valores de IC50 en diferentes líneas tumorales como: neuroblastoma SH-SY5Y (0,12 µg/ml), carcinoma mamario MCF7 (0,62 µg/ml) y (1,8 µg/ml), melanoma IPC (0,81 µg/ml), carcinoma primario de mama (5,27 µg/ml), leucemia de células Jurkat (0,09 µg/ml), fibrosarcoma HT1080 (0,53 µg/ml), cáncer de pulmón de células grandes H460 (1,4 µg/ml), mama M231 (0,672 µg/ml) y adenocarcinoma HeLa (0,7 µg/ml).

Al comparar estos valores con los obtenidos para nuestra fracción en la línea K562, encontramos menor actividad citotóxica en la fracción y, aunque el trisulfuro de dibencilo es uno de los compuestos mayoritarios en la misma, ésta posee componentes adi-

cionales que podrían disminuir su toxicidad, pero que también actuarían sobre otros blancos en la célula tumoral.

En el análisis del espectro de masas obtenido para la fracción, se observó la presencia de 14 relaciones masa/carga (m/z). En ellas se encontraron tres compuestos con relaciones de masas 278, 298, y 314, que correspondían a compuestos previamente identificados y reportados para *P. alliacea*, como el trisulfuro de dibencilo[18], 7-demetil leridal y leridal o petiveral, respectivamente[19, 20] (tabla 2).

Tabla 1
IC50 de la fracción de *P. alliacea* FAST 8 7:3 en la línea celular K562. Las células K562 fueron tratadas con diferentes concentraciones de FAST8 7:3 y el IC50 del extracto fue calculado usando un análisis Probit (MINITAB® Release 14.1. Minitab Inc. 2003 Statistical Software)

	IC50 (µg/ml)	
	Vincristina	FAST8 7:3
K562	1,07	81,58

Tabla 2
Caracterización de la fracción FAST 8 por HPLC-MS/MS. La fracción FAST8 fue sometida a un análisis por HPLC-MS/MS para identificar los posibles compuestos presentes en ésta. Para el análisis de la relación masa/carga (m/z) de los compuestos, se utilizó un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo (LCT de Micromass®, UK) y electrospray

Tiempo de retención (minutos)	m/z	Compuestos identificados por derreplicación
30,65	314	Leridal/petiveral
33,41	298	Leridal 7 demeti
48,36	278	Trisulfuro de dibencilo

Tabla 3
Cebadores seleccionados para la amplificación selectiva del ADNc de la línea tumoral K562

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC
E-AAC	√	√	√	√	√	√

Las relaciones masa/carga (m/z) correspondientes a 238, 281, 294, 308, 316, 330, 344, 514, 530, 676 y 692, no se pudieron correlacionar con ningún compuesto reportado previamente para la planta. El trisulfuro de dibencilo encontrado en el FAST 8 es uno de los compuestos con mayor actividad biológica reportada inmunomoduladora como la actividad citotóxica y la antiproliferativa en líneas de células tumorales –por disminución de la fosforilación de cinasas– y la actividad inmunomoduladora [12, 21, 22]. Para compuestos como el 7-demetil leridal, leridal y petiveral, no se ha reportado ninguna actividad biológica específica.

La fracción FAST 8 induce cambios en el perfil de expresión génica de las células K562

El cultivo de células tumorales en las condiciones empleadas nos permitió conseguir una concentración suficiente de ARN total con la calidad óptima para obtener hasta 1 µg de ARNm. Las condiciones utilizadas para la síntesis de la primera y segunda cadenas de ADNc han sido optimizadas para realizar las respecti-

vas digestiones y ligaciones con los adaptadores blancos de la preamplificación y, por consiguiente, poder realizar las amplificaciones selectivas necesarias para implementar la técnica de ADNc-AFLP.

El análisis de estas amplificaciones con las diferentes combinaciones de cebadores nos ha llevado a encontrar mezclas que permiten obtener un perfil de expresión de diferentes genes en las células K562, que puede ser analizado utilizando la técnica de ADNc-AFLP (tabla 4).

La visualización de estas amplificaciones en los geles de poliacrilamida nos permitió encontrar las combinaciones con las que se puede obtener un perfil de expresión diferencial de genes (figura 1). Por ejemplo, la combinación del iniciador E-AAC y el M-CAC fue la óptima para comparar la expresión de los diferentes genes en las células K562. Como se muestra en la figura 1 (carril 16), se encontraron 21 genes expresados diferencialmente en las células tratadas con la fracción FAST 8, al comparar las células tratadas con el control negativo.

Tabla 4
Combinación de cebadores que amplifican el ADNc y permiten la observación de un perfil de expresión diferencial de genes en las células K562 tratadas con el extracto FAST 8

	M-CAA	M-CACM-CAGM-CAT			M-CTA	M-CTC	
	E-AAC	√	√	√	x	√	√
Bandas observadas	Nuevas	10	21	5	9	14	21
	Aumentadas		3	0	5	1	5
	Disminuidas	4	4	0	0	2	1
	No expresadas	7	3	0	7	15	6

x: no recomendado

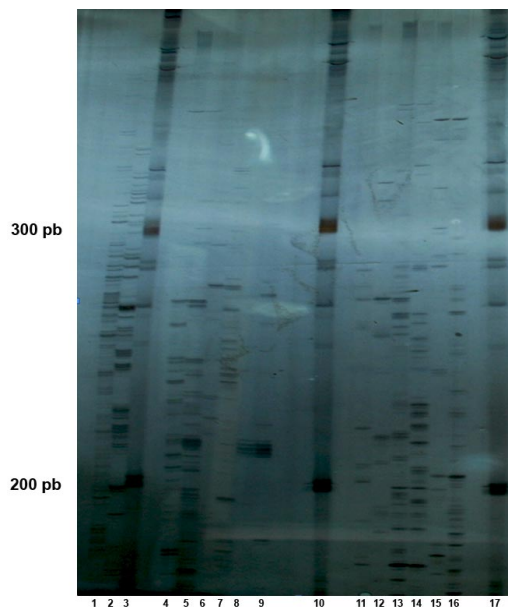


Figura 1. Análisis de la expresión diferencial de genes por ADNc-AFLP en las células tumorales K562 tratadas con el extracto FAST 8 de *Petiveria alliacea*. Las células tumorales K562 fueron tratadas por 24 horas con 25 µg/ml del extracto FAST 8 obtenido de *Petiveria alliacea*. Las amplificaciones selectivas se realizaron utilizando la siguiente combinación de cebadores: M-CAA, K562 tratadas con el solvente (KS) (línea 4) y K562 tratadas con FAST 8 (KFAST8) (línea 5); M-CAC, KS (línea 6) y KFAST8 (línea 7); M-CAG, KS (línea 8) y KFAST8 (línea 9); M-CAT, KS (línea 11) y KFAST8 (línea 12); M-CTA, KS (línea 13) y KFAST8 (línea 14); M-CTC (línea 15) y KFAST8 (línea 16). Control positivo: ADN tomate digerido con EcoR I con el cebador M-CAA (línea 1), M-CAC (línea 2); marcador de peso molecular (línea 3, 10 y 17).

La identificación de los genes expresados diferencialmente está siendo evaluada por nosotros actualmente; sin embargo, ésta es la primera demostración de que un extracto de *P. alliacea*, utilizada tradicionalmente para el tratamiento de algunas enfermedades como el cáncer, actúa sobre la célula tumoral induciendo cambios genéticos que pueden atribuirse a la presencia de uno de los compuestos encontrados en esta fracción, como lo es el trisulfuro de dibencilo, considerado principal componente activo lipofílico de la *P. alliacea*[18].

Conclusiones

Petiveria alliacea, comúnmente utilizada en la medicina tradicional en América, el Caribe, Estados Unidos y África, es una de las plantas con mayor potencial farmacológico en nuestro país y a nivel mundial, ya que ha sido seleccionada entre 14.000 extractos de plantas como una de las 34 candidatas con potencial antitumoral por la Universidad de Illinois[23].

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el extracto completo de la *P. alliacea* obtenido en nuestro laboratorio, presenta actividad citotóxica en la células K562 y contiene tres compuestos, con masas de 278, 298, y 314, que corresponden a compuestos previamente identificados y reportados para *P. alliacea*, como trisulfuro de dibencilo[18], 7-demetil

leridal y el leridal o petiveral, respectivamente[19, 20].

El trisulfuro de dibencilo se considera el principal compuesto activo contra el cáncer, presente en la planta, ya que su mecanismo de acción ha sido estudiado en diferentes células tumorales, entre ellas las de neuroblastoma, en las que se ha observado disminución en la defosforilación de las MAPcinases y, también, desestabilización de la forma normal en la que se encuentran los microtúbulos del citoesqueleto, sin afectar la dinámica de la áctina, pero inhibiendo la proliferación de las células[12]. El trisulfuro de dibencilo también posee actividad citotóxica sobre líneas tumorales como las del sarcoma TE671, el carcinoma mamario MCF-7, el melanoma IPC, el carcinoma primario de vejiga 5637 y el cáncer de pulmón[22].

En cuanto la expresión de genes, también se ha encontrado que el trisulfuro de dibencilo puede regular positivamente la expresión de E-caderina en células de neuroblastoma SH-SY5Y_{TRK-A} tratadas previamente con factor de crecimiento nervioso (NgF)[25]. La molécula de adhesión celular E-caderina es un componente primordial en la interacción célula-célula y se encuentra notablemente ausente o disfuncional en muchos de los carcinomas epiteliales o de mama más agresivos, indiferenciados y avanzados; la pérdida de esta molécula se ha

visto relacionada de manera importante en la transición de tumores epiteliales benignos a estados invasivos[26]. Por lo tanto, como se reporta, el trisulfuro de dibencilo tiene diferentes blancos citotóxicos en las células tumorales, no sólo por su acción directa a nivel de microtúbulos, sino también, a nivel molecular al inducir la expresión de genes importantes relacionados con el estado invasivo de la célula tumoral.

La demostración de la existencia de una expresión diferencial de genes por las células tumorales tratadas con la fracción FAST 8, sugiere la actividad específica del extracto de la planta sobre la línea celular K562. La identificación de los genes que se encuentran regulados positiva o negativamente, nos permitirá dilucidar los blancos moleculares específicos por los que *P. alliacea* induce su actividad antitumoral.

La validación de la actividad biológica de la planta sentará las bases científicas del conocimiento tradicional y, asimismo, conducirá al desarrollo de nuevos medicamentos derivados de productos naturales que podrán ser utilizados en la terapia antitumoral o como adyuvantes de la terapia convencional.

Agradecimientos

Agradecemos la valiosa colaboración de la doctora Pilar Márquez y Gina Paola Solano de la unidad de

Biotecnología Vegetal. Pontificia Universidad Javeriana.

Fuente de financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana y la Fundación Terry Fox. Sandra Paola Santander y Claudia Urueña son becarias del programa de doctorado de Colciencias.

Bibliografía

1. Schiff PB, Horwitz SB. *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77:1561-5.
2. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*. 1979;22;277:665-7.
3. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2:1-17.
4. Girón LM, Freire V, Alonzo A, Cáceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J Ethnopharmacol*. 1991;34:173-87.
5. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz M Jr., Tien OS, Kakinami SH, *et al*. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. 2002;73:69-91.
6. Caraballo A, Caraballo B, Rodríguez-Acosta A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Ama-

- zon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37:186-8.
7. Marini S, Jovicevic L, Milanese C, Giardina B, Tentori L, Leone M, *et al.* Effects of *Petiveria alliacea* L. on cytokine production and natural killer cell activity. Italian Society of Pharmacology. Congress N° 6, Rome, Italy. 1993;27:107-8.
 8. Queiroz M, Quadros M, Santos L. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2000;22: 501-18.
 9. Malpezzi EL, Davino SC, Costa LV, Freitas JC, Giesbrecht AM, Roque NF. Antimitotic action of extracts of *Petiveria alliacea* on sea urchin egg development. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27:749-54.
 10. Germano D, Sertie J, Bacchi M. Pharmacological assay of *Petiveria alliacea*. II: Oral anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a hydroalcoholic root extract. *Fitoterapia.* 1995;66:195-202.
 11. Lopes-Martins RA, Pegoraro DH, Woisky R, Penna SC, Sertie JA. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine.* 2002;9:245-8.
 12. Rösner H, Williams LA, Jung A, Kraus W. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. *Biochim Biophys Acta.* 2001;22:166-77.
 13. Uruena CP, Cifuentes C, Castañeda DM, Arango AD, Kaur P, Asea AA, *et al.* *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complement Altern Med.* 2008; 8:60.
 14. Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, *et al.* Using gene expression profiling to differentiate benign *versus* malignant thyroid tumors. *Cancer Res.* 2004; 64:5028.
 15. Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E, Smith A, Satagopan J, Zhang L, *et al.* Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol.* 2004; 164:217-27.
 16. Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, *et al.* Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99: 14825-30.
 17. Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, *et al.* Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Genet Genomics.* 2003; 269:173-9.
 18. Kubec R, Musah R. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry.* 2001;58:981-5.
 19. Delle Monache C. 6-formyl and 6-C-hydroxymethyl flavones from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry.* 1992;31: 2481-2.
 20. Delle Monache C. *Petiveria alliacea* II: Further flavonoids and triterpenes. *Gazzeta Chimica Italiana.* 1996; 126:275-7.

21. Williams L, Gardner T, Fletcher C, Naravane A, Gibbs N, Fleishhacker R. Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea* L. *Phytother Res.* 1997;11:1251-3.
22. Williams L, Rosner H, Levy G, Barton N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). *West Indian Med J.* 2007;56:17-21.
23. Mata-Greenwood E, Ito A, Westenburg H, Cui B, Mehta RG, Kinghorn AD, *et al.* Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. *Anticancer Res.* 2001;21:1763.
24. Williams L, Rosner H, Moller W, Conrad J, Nkurunziza J, Kraus W. *In vitro* anti-proliferation/cytotoxic activity of sixty natural products on the human SH-SY5Y neuroblastoma cells with specific reference to dibenzyl trisulphide. *West Indian Med J.* 2004;53:208-19.
25. Williams LAD, Rosner H, Conrad J, Moller W, Beifuss U, Chiba K. Selected secondary metabolites from phytolaccaceae and their biological/pharmaceutical significance. *Recent Res Devel in Phytochem.* 2002; 6:13-68.
26. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson S. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cell induces cell migration, invasion and metastasis. *J Cell Biol.* 2000; 148:779-90.
27. Williams L, Rosner H, Levy H, Barton N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). *West Indian Med J.* 2007;56:17.