



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

IDENTIFICACIÓN DE QUIMIOSENSIBILIZADORES DE
FENOTIPO MDR A TRAVÉS DE QUIMIOTECAS
SINTÉTICAS Y NATURALES.

María José Abad Merín

Tesis Doctoral 2005



D. José Manuel González Ros, Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la tesis doctoral titulada: “Identificación de quimiosensibilizadores de fenotipo MDR a través de quimiotecas sintéticas y naturales”, presentada por María José Abad Merín.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 19 Enero de 2005.

Fdo. José Manuel González Ros



D. Antonio Ferrer Montiel, Doctor en Ciencias Químicas y profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y D. José Antonio Ferragut Rodríguez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche y Director de dicho departamento,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que conduce a la obtención del grado de Doctora titulado: “Identificación de quimiosensibilizadores de fenotipo MDR a través de quimiotecas sintéticas y naturales”, del que es autora Dña. María José Abad Merín, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 19 de Enero de 2005.

Fdo. Antonio Ferrer Montiel

Fdo. José Antonio Ferragut Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche por su acogida y el apoyo recibido durante el largo periodo en el que he desarrollado mi labor investigadora. Hago extensivo mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

Debo un especial reconocimiento a mis directores, los Doctores Pepe Ferragut y Antonio Ferrer, por su incalculable y generoso apoyo personal así como su asesoramiento y dirección en el trabajo de investigación.

También quiero expresar mi gratitud a los Doctores Miguel Saceda y Pilar García por las valiosas aportaciones que me hicieron para mejorar la presente investigación, así como la cálida amistad que me han mostrado siempre.

No puedo olvidar a mis compañeros con los cuales he compartido incontables horas de trabajo y en los que he podido encontrar una gran amistad. Gracias a Ana, Cristina, Laura y Reme por haber encontrado siempre ese minuto cuando lo he necesitado, a Kike por resolver los problemas que a menudo los ordenadores me presentan, a Cloti que siempre está, estuvo y seguirá estando, brindándome cariño y soporte profesional y personal, a Mariló y Elena quienes desde mi primer día amablemente destinaron parte de su tiempo a enseñarme sin prisas. Gracias a todos por los buenos y los malos momentos, por aguantarme y escucharme.

Fuera del laboratorio, un buen número de amigos me ha animado durante todo este tiempo y ha hecho más llevaderos los momentos difíciles. Gracias a Lorena, Fany, Rocío, Natalia, Ana, Nono, Francesca, Federica F., Federica De V., y Marco. Reunirme de vez en cuando con vosotros ha sido una excelente terapia.

Pero todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de mi familia, mis padres, mis hermanos y Gregorio. Gracias por vuestro amor, por haber estado siempre ahí y siempre con una confianza ciega en mí. A ellos va dedicada esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.	1
1. Cáncer. ¿Qué es? _____	1
2. Fenotipo MDR. _____	9
3. Transportadores ABC. _____	10
3.1. Glicoproteína-P (P-gp). _____	12
3.2. Proteína Asociada a la Resistencia a Múltiples Fármacos (MRP). _____	17
4. Moduladores. _____	20
5. Quimiotecas Combinatorias Sintéticas. _____	26
6. Quimiotecas Combinatorias de Extractos Vegetales. _____	28
OBJETIVOS.	34
1. Objetivo General. _____	34
2. Objetivos Específicos. _____	34
RESULTADOS.	36
1. Ensayo de Acumulación Intracelular de Daunomicina: Validación para el cribado funcional de quimiotecas. _____	36
2. Peptoides. _____	39
2.1. Cribado de una Quimioteca. _____	39
2.2. Deconvolución de la Quimioteca. _____	44
2.3. Caracterización. Actividad Funcional de los Compuestos. _____	49
2.3.1. Las Trialquilglicinas Quimiosensibilizan a las células L1210R. _____	49
2.3.2. Los Peptoides disminuyen el Grado de Resistencia Tumoral de las células L1210R. _____	52
2.3.3. Las Trialquilglicinas Quimiosensibilizan a las células HL-60R. _____	54
2.3.4. Los Peptoides disminuyen el Grado de Resistencia Tumoral de las células HL-60R. _____	55
3. Quimioteca de 2,5-Piperacindionas (DKPs). _____	57
3.1. Cribado de las Quimiotecas de DKPs. _____	60
3.2. Grado de Resistencia tras tratar con DKPs. _____	64
4. Extractos Vegetales. _____	66
4.1. Cribado y Deconvolución. _____	66

DISCUSIÓN.	83
CONCLUSIONES.	90
MATERIAL Y MÉTODOS.	92
1. Cultivos Celulares. _____	93
1.1. Líneas Celulares en Suspensión. _____	93
2. Selección de Resistencia de las Líneas Linfoides. _____	93
3. Selección de Capacidad Tumorigénica. _____	94
4. Ensayos de Viabilidad Celular. _____	94
5. Citometría de Flujo (CMF). _____	95
6. Acumulación Intracelular de Daunomicina (DNM). _____	96
7. Quimiotecas Sintéticas. _____	97
7.1. Quimioteca de N-alquilglicinas. _____	97
7.2. Quimioteca de DKPs. _____	101
8. Quimiotecas Naturales (Extractos Vegetales). _____	103
9. Ensayos de Citotoxicidad. _____	105
BIBLIOGRAFÍA.	108
APÉNDICE.	123
1. Abreviaturas. _____	123
2. Índice de Figuras. _____	125
3. Índice de Tablas. _____	128

Introducción.

1. Cáncer. ¿Qué es?

Quizás sea una de las palabras más utilizada y que más asusta cuando se habla de salud y de su reverso, la enfermedad. El cáncer es la segunda causa de muerte en la población española, afectando fundamentalmente a adultos en edad avanzada y representa el 30% de la mortalidad masculina y el 20% de la femenina. Los niveles de supervivencia de la enfermedad están creciendo, pero a su vez también se incrementa la incidencia del cáncer en los países desarrollados. Actualmente, el número de nuevos casos detectados anualmente en España es de 320 hombres y 290 mujeres por cada 100.000 habitantes. En los próximos ocho años, se prevé un aumento de la frecuencia de la aparición de la enfermedad en un 40% en varones y un 30% en mujeres. Sin embargo, se estabilizarán los índices de mortalidad principalmente debido a una mejora en el diagnóstico precoz. “La investigación de la biología molecular del cáncer abre puertas para nuevos enfoques de tratamiento y ha supuesto un impulso para la investigación clínica” (Dr. Dorta, IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)).

Los datos de mortalidad indican que no existen tratamientos eficientes contra el cáncer. Solo un 20% de los pacientes tratados con quimioterapia consiguen una remisión total y esta remisión está concentrada en determinados

tipos de tumores y franjas de edad concretas, por ejemplo el cáncer de testículo tiene un 90% de supervivencia, mientras que en el cáncer de páncreas el porcentaje de supervivencia es prácticamente inexistente (Bailar, J.C., III y Smith, E.M., 1986).

Cáncer es el término que se emplea para un grupo de enfermedades que tienen un denominador común: la transformación de la célula normal en otra que se comporta de forma muy peligrosa para el individuo. Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias, ellas y su progenie se reproducen a pesar de las restricciones normales, e invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. Las células normales crecen a un ritmo limitado y permanecen dentro de su hábitat específico, sin embargo la célula normal puede convertirse en una célula cancerosa debido a un cambio o mutación en el ADN. En ocasiones, estas células, cuya carga genética ha cambiado, mueren o son eliminadas en los ganglios linfáticos, por el contrario, en determinadas circunstancias, dichas células siguen con vida y se reproducen. Las células cancerosas tienen un aspecto distinto al de las células normales, bien porque su forma ha cambiado, o bien porque contengan núcleos de diferente tamaño. Estas células son incapaces de realizar las funciones que corresponden a las células normales pertenecientes a ese tejido. Generalmente, las células cancerosas se multiplican muy rápidamente, debido a la falta de un mecanismo de control del crecimiento. Además, con frecuencia, son inmaduras debido a que se multiplican de una forma muy rápida y no tienen tiempo suficiente para crecer plenamente antes de dividirse. Al formarse un gran número de células cancerosas, se amontonan, presionan o bloquean a otros órganos y les impiden realizar su función fisiológica. Como frecuentemente no se limitan al espacio originario donde se forman, y se extienden a otras zonas, se dicen que son invasivas, dada su tendencia a emigrar a otros lugares a través de la sangre o de la linfa. Las células que se encargan de la defensa del organismo suelen destruirlas cuando están más dispersas pero si sobreviven pueden crecer en

órganos más alejados, produciendo metástasis y haciendo más difícil su eliminación.

El cáncer se define como un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. El cáncer que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen. Existen varios cientos de formas distintas de cáncer, siendo tres los principales subtipos: los sarcomas proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas, y los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas, produciendo inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

El crecimiento canceroso o neoplasia es clonal —todas las células proceden de una única célula madre— (ver [figura 1](#)). Estas células han escapado al control que en condiciones normales rige el crecimiento celular, y al igual que las células embrionarias, son incapaces de madurar o diferenciarse en un estadio adulto y funcional. La proliferación de estas células puede originar una masa denominada tumor que crece sin mantener relación con la función del órgano del que procede.

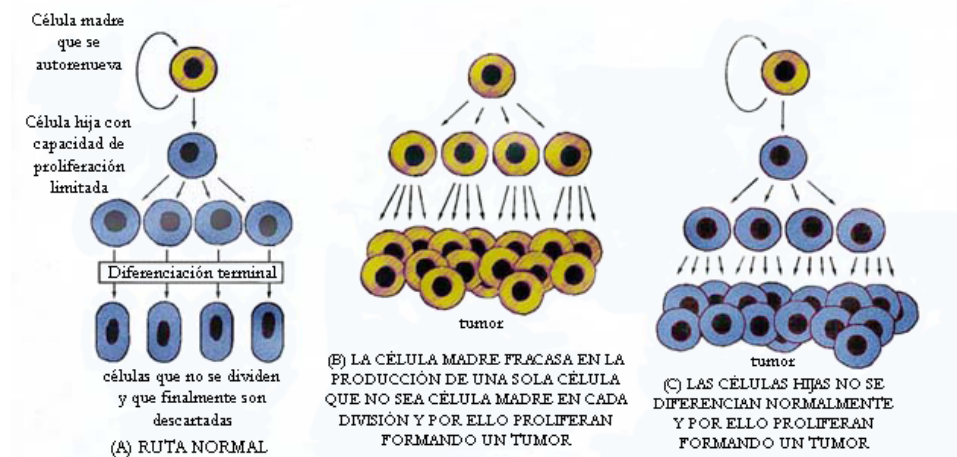


Figura 1: Control normal y alterado de la producción de células a partir de células madre (Alberts, B. et al., 1996).

Casi todos los cánceres forman tumores, pero no todos los tumores son cancerosos o malignos; la mayor parte son benignos (no ponen en peligro la salud). Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula, su crecimiento es lento y tienen una estructura semejante al tejido del que proceden. En ocasiones pueden producir alteraciones por obstrucción, compresión o desplazamiento de las estructuras vecinas, como sucede a veces en el cerebro. Algunos tumores benignos como los pólipos del colon son lesiones precancerosas.

El principal atributo de los tumores malignos es su capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión o infiltración, o a distancia, produciendo crecimientos secundarios conocidos como metástasis (ver [figura 2](#)). La localización y la vía de propagación de las metástasis varía en función de los cánceres primarios:

- Cuando un cáncer invade la superficie del órgano de origen, las células pueden propagarse desde esta superficie a la cavidad vecina y órganos adyacentes, donde pueden implantarse.

- Las células tumorales pueden viajar en el interior de los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos, o también en los vasos sanguíneos. En la corriente circulatoria, estas células se detienen en el punto en el que los vasos son demasiado estrechos para su diámetro. Las células procedentes de tumores del tracto gastrointestinal se detendrán en el hígado y posteriormente pueden propagarse a los pulmones. Las células del resto de los tumores invadirán los pulmones antes de propagarse a otros órganos. Por tanto, los pulmones y el hígado son dos localizaciones frecuentes de metástasis.
- En muchos cánceres las células migran a la corriente circulatoria de manera temprana, y mientras algunas de estas células mueren, otras pueden invadir y penetrar en el árbol vascular y en los tejidos. Si este tejido tiene condiciones favorables para el crecimiento de la célula tumoral, ésta se multiplica produciéndose una metástasis. En ocasiones, sólo se multiplica un pequeño número de veces produciéndose un cúmulo de células que permanecen quiescentes en forma de micrometástasis. Este estadio latente puede perdurar varios años, y por razones desconocidas puede reactivarse y producir un cáncer recurrente.

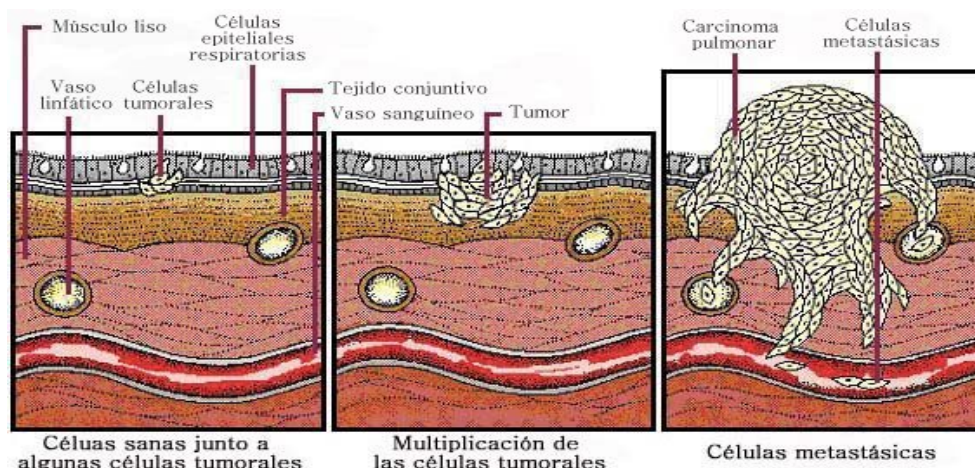


Figura 2: Progresión de un tumor.

Muchas veces las células cancerosas conservan las características físicas y biológicas del tejido del que proceden a pesar de estar ampliamente diseminadas. De este modo, un patólogo puede, a través del examen microscópico de estas células, determinar la procedencia de los tumores metastásicos. Los tumores de las glándulas pueden ser identificados porque en ocasiones producen de forma indiscriminada la misma hormona producida por el tejido del que proceden. A veces, también responden a las hormonas que controlan esos tejidos en condiciones normales.

Cuanto más agresivo y maligno es un cáncer, menos recuerda a la estructura del tejido del que procede, pero la tasa de crecimiento del cáncer depende no sólo del tipo celular y grado de diferenciación, sino también de factores dependientes del huésped. Una característica de malignidad es la heterogeneidad celular del tumor. Debido a las alteraciones en la proliferación celular, las células cancerosas son más susceptibles a las mutaciones. Con la evolución, el tumor es cada vez menos diferenciado y de crecimiento más rápido. También puede desarrollar resistencia a la quimioterapia o a la radiación.

En el tratamiento del cáncer, las medidas terapéuticas tradicionales incluyen la cirugía, la radiación y la quimioterapia. En la actualidad se estudia la utilidad de la inmunoterapia y la modulación de la respuesta biológica.

La cirugía constituye la principal estrategia para el tratamiento curativo del cáncer, produciéndose la escisión de todas las células malignas mediante una intervención quirúrgica. Sin embargo, muchos cánceres están demasiado extendidos en el momento del diagnóstico para que la cirugía curativa sea posible. Si la extensión local del tumor afecta a tejidos vecinos que no pueden ser resecados, o si existen metástasis a distancia, la cirugía no será un tratamiento curativo, sin embargo, puede tener el objetivo de disminuir la masa tumoral para permitir una mejor respuesta al posterior tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico.

El tratamiento con radioterapia consiste en la utilización de radiaciones ionizantes que pueden ser electromagnéticas o por partículas, produciendo una destrucción tisular.

La sensibilidad de los tumores a las radiaciones es muy variable. La radioterapia también se emplea con frecuencia como tratamiento paliativo, sobre todo en las metástasis. Puede ser útil como coadyuvante a la cirugía y en otros casos la radioterapia se emplea en el proceso postoperatorio.

La quimioterapia consiste en la utilización de fármacos para el tratamiento del cáncer. Puesto que los fármacos se distribuyen en el organismo a través del sistema circulatorio, la quimioterapia es útil para aquellos tumores cuya diseminación los hace inaccesibles a la cirugía o a la radioterapia. Existen multitud de fármacos anticancerosos, la mayor parte de los cuales actúan interfiriendo en la síntesis o en la función del ADN, por lo que las células en división son más sensibles a la quimioterapia. El tejido canceroso tiene una mayor proporción de células en división que los tejidos normales (en los que las células de soporte o de relleno están en una fase quiescente y son por tanto resistentes a los efectos del fármaco). Dentro de los tejidos normales, los que tienen una tasa de proliferación más rápida son la médula ósea y las células de recubrimiento del tracto gastrointestinal, siendo por lo tanto los dos tejidos más sensibles al efecto de la quimioterapia, y de la lesión de éstos depende la toxicidad, que limitará la máxima dosis tolerable de los fármacos anticancerosos. Para que el tratamiento quimioterápico sea efectivo, la sensibilidad del tumor debe ser superior a la del tejido normal más sensible. Mientras algunos tumores son varias veces más sensibles, otros sólo lo son ligeramente. Por fortuna, las células de la médula ósea pueden dividirse a mayor velocidad que las células malignas y, por tanto, se recuperan con mayor rapidez. Si se repite un ciclo del fármaco en este momento, el tumor no ha tenido tiempo de crecer demasiado. Los ciclos repetidos reducen de forma paulatina el tumor antes de la aparición de resistencias. La sensibilidad de ciertos tumores a la quimioterapia es tal que es posible la curación en un alto

porcentaje: esto sucede en el cáncer uterino, las leucemias agudas (sobre todo en los niños), la enfermedad de Hodgkin y los linfomas difusos de células grandes, el carcinoma de testículo, el carcinoma de ovario, los carcinomas de células pequeñas del pulmón, y gran parte de los cánceres infantiles. Muchas veces estos procesos cancerosos se han diseminado en el momento del diagnóstico y no existe otra opción terapéutica. Otros cánceres avanzados tienen buena respuesta a la quimioterapia y pueden ser controlados durante periodos prolongados, por lo que se utiliza con frecuencia como tratamiento paliativo.

Los dos principales problemas que limitan la utilización de la quimioterapia son la toxicidad y la resistencia. Los abordajes clínicos y científicos que tratan de evitar o controlar la toxicidad y disminuir el riesgo de resistencias, se han ido perfeccionando. Es importante iniciar el tratamiento en estadio temprano de la enfermedad, la utilización de dosis óptimas del fármaco y la repetición de los ciclos con intervalos lo más cortos posible, siempre que se permita la recuperación del paciente de los efectos tóxicos.

La utilización de múltiples fármacos garantiza en principio una mejor eficacia del tratamiento. Los protocolos de quimioterapia utilizan diferentes fármacos (a menudo entre 3 y 6 al mismo tiempo), cada uno de los cuales es eficaz de forma aislada. Se combinan fármacos con diferentes mecanismos de acción para evitar la aparición de resistencias cruzadas, y con diferentes tipos de toxicidad para poder emplear la dosis óptima de cada fármaco, sin producir toxicidad aditiva que puede resultar fatal.

Se puede utilizar la quimioterapia junto a la cirugía o a las radiaciones en la denominada terapia combinada. Muchas veces se utiliza como tratamiento coadyuvante tras la cirugía, cuando ésta es la principal modalidad terapéutica. Esta terapia es muy eficaz en el cáncer de mama. El objetivo principal de la quimioterapia como coadyuvante es la eliminación de las micrometástasis que pudieran existir con anterioridad a la cirugía. Es más reciente la utilización de

la quimioterapia previa a la cirugía como tratamiento coadyuvante, que puede además, reducir la masa del tumor y facilitar su eliminación quirúrgica.

2. Fenotipo MDR.

Una de las principales causas de fracaso de la quimioterapia antineoplásica en humanos es la aparición de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Wandel, C. et al., 1999). Este fenómeno consiste en una resistencia inespecífica a fármacos citostáticos sin una clara semejanza estructural o química, y con distintos blancos moleculares.

Los mecanismos responsables del fenotipo MDR son pleiotrópicos ya que operan a distintos niveles inhibiendo la acción citotóxica de los fármacos. Su actuación puede ir desde alteraciones en la regulación génica de *p53* o *bcl-2*, hasta producir una disminución de la acumulación de los fármacos en el interior de la célula. Este último mecanismo generalmente va asociado a la actividad de proteínas transportadoras como la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP) (Tan, B. et al., 2000) la proteína asociada a la resistencia pulmonar (LRP) (Kickhoefer, V.A. et al., 1998; Scheffer, G.L. et al., 1995), la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP) y la Glicoproteína-P (P-gp) (Stavrovskaya, A.A., 2000).

P-gp y MRP son bombas de extrusión de macromoléculas, y su sobreexpresión se asocia a la aparición del fenotipo MDR.

P-gp se expresa de modo constitutivo en distintos tejidos y de distinta forma. Por ejemplo, en células de la epidermis o en los pneumocitos, se observan niveles muy bajos de expresión, mientras que en células del córtex de la glándula adrenal o en células de la mucosa del colon se expresa más abundantemente, así mismo, la expresión de P-gp se reduce gradualmente en el proceso de diferenciación de las células mieloides, mientras que la malignización de estas células produce un aumento paralelo de P-gp lo que les

confiere un fenotipo MDR intrínseco. Como hemos apuntado, en tejidos normales existe expresión de P-gp y los mayores contenidos de ésta se hallan en el epitelio secretor, incluyendo el borde en cepillo del epitelio del túbulo contorneado proximal del riñón (Cordon-Cardo, C. et al., 1990), detectándose igualmente en líneas celulares en cultivo procedentes de dicho tejido (García, d.M. et al., 1995). La expresión de P-gp y MRP puede ser inducida por fármacos antineoplásicos en neoplasias que han llegado a ser resistentes al tratamiento quimioterápico. Así tumores que no expresaban P-gp muestran un incremento de ARN mensajero para P-gp en la recidiva que sufren muchos pacientes después de un tratamiento de quimioterapia (Stavrovskaya, A.A., 2000).

3. Transportadores ABC.

El transporte de moléculas específicas a través de las membranas lipídicas es una función esencial de todos los organismos vivos por lo que se han desarrollado una gran cantidad de transportadores específicos con el fin de realizar esta función. La familia más grande de genes transportadores es la superfamilia de transportadores ATP-binding casete (ABC). Estas proteínas desplazan una amplia variedad de substratos como azúcares, aminoácidos, iones metálicos, péptidos, proteínas, y una gran cantidad de compuestos y de metabolitos hidrofóbicos a través de la membrana celular e intracelular. Los genes ABC son esenciales para muchos procesos celulares. Los miembros de esta superfamilia han sido asociados con diversas funciones fisiológicas como proteger a la célula de compuestos tóxicos confiriéndoles resistencia frente a los mismos, la secreción de proteínas, la presentación de antígenos, la patogénesis, y la regulación del desarrollo en microorganismos y mamíferos (Borst, P. y Elferink, R.O., 2002; Gottesman, M.M., 2002; Young, J. y Holland, I.B., 1999). Mutaciones en estos genes causan o contribuyen a varios desórdenes tales como anomalías en la respuesta a fármacos debido a la

extrusión de los mismos fuera de la célula (Borst, P. et al., 2000b; Higgins, C.F., 1992; Higgins, C.F., 1994), enfermedades neurológicas (Mosser, J. et al., 1993), degeneración retiniana (Albet, S. et al., 1997; Berger, J. et al., 1999; Pujol, A. et al., 2000), defectos en el transporte del colesterol (Alonso, E.M. et al., 1994; de Vree, J.M. et al., 1998; Deleuze, J.F. et al., 1996; Dixon, P.H. et al., 2000; Strautnieks, S.S. et al., 1998) y transporte de la bilis (van Helvoort, A. et al., 1996) o anemia (Allikmets, R. et al., 1999).

Las proteínas ABC se unen a ATP y utilizan la energía para transportar las moléculas a través de la membrana plasmática, de las membranas intracelulares del retículo endoplasmático, de los peroxisomas y de la mitocondria (Childs, S. y Ling, V., 1994; Dean, M. y Allikmets, R., 1995; Higgins, C.F., 1992). Los transportadores ABC tienen dos dominios de unión al ATP situados en el citoplasma, también conocidos como dominio de unión a nucleótidos (NBD), y dos dominios transmembrana (TM), que típicamente están formados por seis segmentos en α -hélice que atraviesan la membrana. El transporte de los sustratos (compuestos hidrofóbicos) se da en una sola dirección, siendo este movimiento generalmente de la hoja interna de la bicapa lipídica a la capa externa o a una molécula del aceptor. Los genes que codifican para las proteínas ABC se organizan como transportadores completos que contienen dos TM y dos NBD o como transportadores medios que contienen un solo elemento de cada dominio (Hyde, S.C. et al., 1990). Cuando se organizan como medios han de ensamblarse como homodímeros o heterodímeros para crear un transportador funcional.

P-gp y MRP son proteínas pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC, cuya función es la extrusión de xenobióticos dependiente de ATP (Borst, P. y Elferink, R.O., 2002; Cole, S.P. et al., 1992; Gao, M. et al., 1996). La primera de estas proteínas, descubierta en humanos, fue P-gp, producto del gen *mdr1*. Las células que muestran sobreexpresión de P-gp son resistentes a determinados compuestos químicos entre los que se encuentran algunos de los fármacos antitumorales clínicamente relevantes tales como

daunorrubicina, doxorrubicina, mitoxantrona, taxol, vincristina, vinblastina, aunque permanecen sensibles a los agentes alquilantes y a los antimetabolitos (Biedler, J.L. y Riehm, H., 1970; Borst, P. y Elferink, R.O., 2002; Gros, P. et al., 1986a; Kessel, D. et al., 1968; Ling, V. y Thompson, L.H., 1974).

Aunque los genes *mdr* fueron los primeros en descubrirse implicados en el fenotipo MDR, hoy se conocen otras familias como la familia MRP cuyos productos son proteínas transportadoras capaces de conferir también un fenotipo resistente (Borst, P. et al., 2000a; Gottesman, M.M. et al., 2002).

La estructura general de estos transportadores incluye seis segmentos transmembrana seguidos de un fragmento de unión a ATP. La unidad estructural de P-gp (ver [figura 3](#)) tiene dos dominios transmembrana, cada uno con seis segmentos transmembrana, asociadas a dos regiones intracelulares de unión a ATP. La proteína MRP incluye además una región amino terminal también hidrofóbica compuesta de cinco segmentos transmembrana, unida al resto de la proteína por un fragmento hidrofílico intracelular (ver [figura 6](#)).

3.1. Glicoproteína-P (P-gp).

P-gp ha sido caracterizada bioquímicamente como una glicoproteína de membrana plasmática que se extiende en la bicapa lipídica, y que actúa como una bomba de membrana que activamente exporta fármacos al exterior celular (Ferry, D. et al., 2000). La porción de P-gp expuesta en la superficie celular es reactiva con la técnica de unión de carbohidratos de superficie y es además susceptible a la digestión proteolítica. El mapeo de los epítomos con anticuerpos monoclonales ha permitido localizar el extremo C-terminal de la molécula en la parte citoplasmática de la membrana (Bradley, G. et al., 1988).

El análisis de la secuencia de ADNc procedente de líneas celulares de ratón, hámster y humano, que codifican para el gen de la P-gp ha permitido

conocer la secuencia completa de aminoácidos de la molécula (ver [figura 3](#)). La secuencia de ratón presenta 1.276 aminoácidos mientras que la humana contiene 1.280 (Biedler, J.L., 1992; Harris, A.L. y Hochhauser, D., 1992; Kirschner, L.S. et al., 1992; Lum, B.L. et al., 1993; Roninson, I.B., 1992), calculándose un peso molecular de 140 y 141 kDa, respectivamente. Estos valores coinciden con el tamaño estimado de 140 kDa para la porción polipeptídica de la P-gp (Gros, P. et al., 1986b).

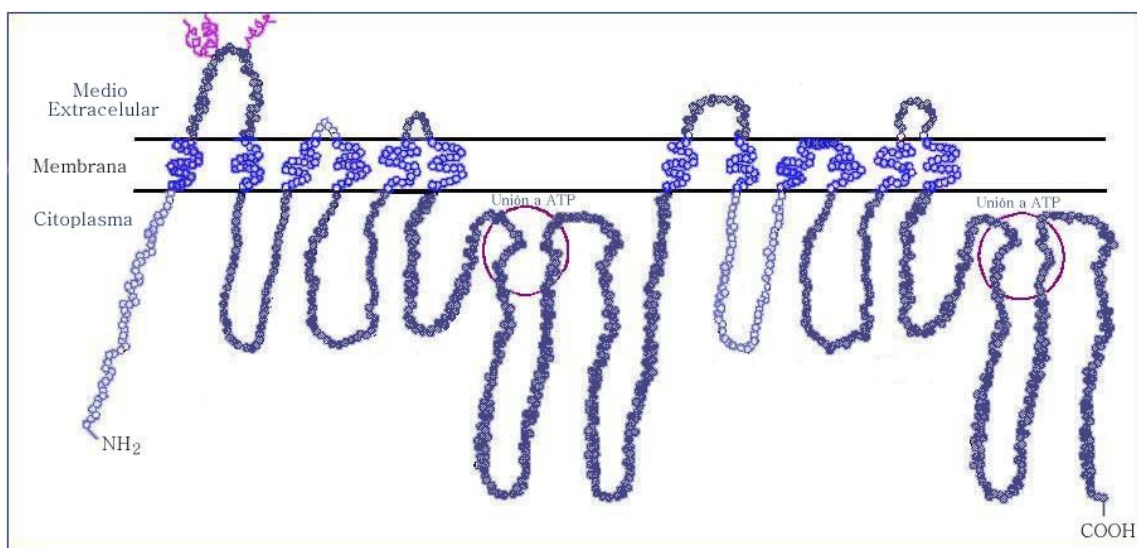


Figura 3: Topología de la P-gp en la membrana plasmática (Gottesman, M.M. y Pastan, I., 1993).

Se ha detectado en líneas celulares de macrófagos de ratón la presencia de dos moléculas precursoras de P-gp diferentes, una de 120 kDa y la otra de 125 kDa. El precursor de 120 kDa se convierte en una proteína madura de 130 kDa, mientras que el precursor de 125 kDa madura en una proteína con un peso molecular de 135-140 kDa, observándose variaciones en el tamaño de una línea celular a otra. Estudios posteriores han identificado la existencia de dos moléculas de P-gp diferentes, que se expresan en distintas líneas celulares con fenotipo MDR. Las diferencias funcionales de estas dos isoproteínas de P-gp estriban en la mayor eficiencia que presenta la proteína

producida a partir de la molécula precursora de 120 kDa, ya que células que expresan este precursor son casi cuatro veces más resistentes. Se ha podido comprobar que las dos isoproteínas de P-gp encontradas en células con fenotipo MDR corresponden a los productos génicos de los genes *mdr1a* y *mdr1b*, los cuales son funcionalmente diferentes (Kirschner, L.S. et al., 1992). En el hombre, la proteína precursora de 140 kDa se convierte gradualmente en 170 kDa en un periodo de entre 2 y 4 horas (Harris, A.L. y Hochhauser, D., 1992). En cada caso, la molécula de P-gp consiste en dos mitades homólogas unidas entre sí (Booth, C.L. et al., 2000; Kaye, S.B., 1988; Lum, B.L. et al., 1993; Nuti, S.L. et al., 2000). Cada mitad de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembrana unidos (Azzaria, M. et al., 1989; Harris, A.L. y Hochhauser, D., 1992; Roninson, I.B., 1992), dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal que contiene la secuencia consenso de unión e hidrólisis del ATP (Biedler, J.L., 1992; Gros, P. et al., 1986b; Harris, A.L. y Hochhauser, D., 1992). La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal (ver [figura 3](#)) (Booth, C.L. et al., 2000). Los segmentos transmembrana en la membrana plasmática están orientados de forma que el extremo C-terminal se sitúe en el lado citoplásmico de la membrana. Los tres pares de segmentos transmembrana están separados por largas cadenas de aminoácidos en la cara citoplasmática de la membrana y cortas cadenas en la superficie celular (Bradley, G. et al., 1988). Además, la molécula presenta una cadena externa de carbohidratos, situada sobre la cadena exterior de aminoácidos que une los dos primeros segmentos transmembrana, cerca del extremo N-terminal de la molécula (ver [figura 3](#) y [4](#)) (Kast, C. et al., 1995). Al menos 20 kDa de los 170-180 kDa de la proteína son debidos a los carbohidratos. Existen fuertes evidencias para asegurar que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte de fármacos o en su reconocimiento.

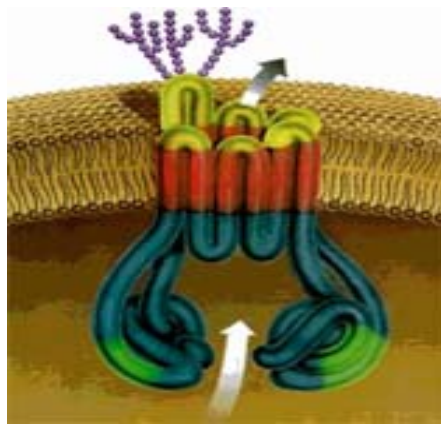


Figura 4: Estructura tridimensional de la Glicoproteína-P.

El estudio de las secuencias de P-gp muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembrana N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplásmicos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de fármacos al exterior celular (ver [figura 4](#) y [5](#)) (Biedler, J.L., 1992; Masters, J.R., 1990). Esta proteína actúa como una bomba extrusora dependiente de energía que expulsa sustancias hidrófobas desde el citoplasma celular al espacio extracelular de acuerdo con el modelo propuesto por (Gottesman, M.M. et al., 1995) (ver [figura 5](#)), quienes la han denominado “aspirador de moléculas hidrofóbicas”. Según dicho modelo, el fármaco no sólo es bombeado fuera de la célula tumoral sino que también se disminuye su entrada en ésta (Germann, U.A. et al., 1996; Gottesman, M.M. y Pastan, I., 1993; Raviv, Y. et al., 1990). Los compuestos entran en la célula por difusión pasiva y son detectados nada más entrar en la membrana y expulsados al exterior de modo que no puedan alcanzar la concentración necesaria para ejercer su efecto citotóxico. El eflujo se realiza a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras que pueden ser un péptido o una proteína (Stavrovskaya, A.A., 2000).

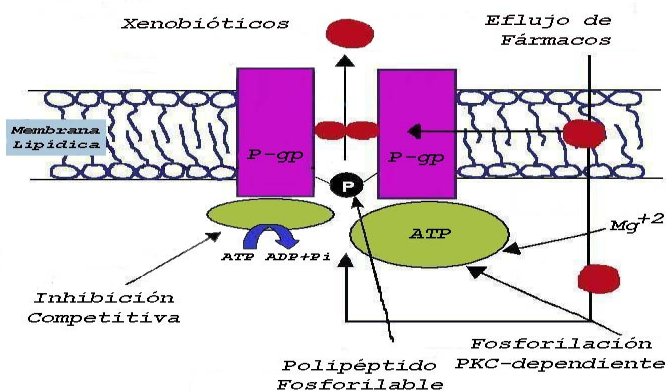


Figura 5: Mecanismo de acción de la Glicoproteína-P.

La adquisición del fenotipo MDR durante o después del tratamiento está perfectamente documentada *"in vitro"* (Bourhis, J. et al., 1989) y hasta ahora ha sido explicada como una respuesta inespecífica a la presión del tratamiento farmacológico con agentes capaces de interactuar con la P-gp. Estos fármacos son compuestos hidrofóbicos, incluyendo una variedad de fármacos antineoplásicos, agentes citotóxicos y fármacos que revierten el fenotipo MDR (ver [tabla 1](#)). Sin embargo, el espectro de sustancias que pueden ser transportadas por P-gp se ha incrementado de forma progresiva, además muchos fármacos como los antagonistas de los canales de calcio, FK506, Rapamicina y Ciclosporina A, interfieren en la expresión y función de P-gp, generalmente a través de un mecanismo de inhibición competitiva (Broeks, A. et al., 1996; Twentyman, P.R., 1992).

Tabla 1: Compuestos que interactúan con Glicoproteína-P.

Quimioterápicos	Otros Citotóxicos	Agentes Revertidores de MDR	Péptidos Cíclicos y Lineales
*Daunorrubicina	*Colchicina	*Verapamilo	*Actinomicina D
*Doxorrubicina	*Emetina	*Nifedipino	*Gramicidina D
*Mitoxantrona	*Bromuro de etidio	*Azidopina	*Valinomicina
*Etopósido	*Puromicina	*Quinidina	*F. Ferhormona de levadura
*Tenipósido	*Mitramicina	*Amiodarona	*N-acetil-leucil-leucil-norleucina
*Vinblastina		*Reserpina	
*Vincristina		*Ciclosporina A	
*Mitomicina C		*FK506	
*Paclitaxel		*Rapamicina	
*Actinomicina D		*Progesterona	
*Topotecan		*Forskolina	

La demostración inmunohistoquímica de su presencia de forma polarizada en la superficie apical de las células ha sugerido que la P-gp está involucrada en la defensa contra xenobióticos y metabolitos tóxicos endógenos (Bennett, W.M. et al., 1996; Cordon-Cardo, C. et al., 1990; Leveille-Webster, C.R. y Arias, I.M., 1995), aunque su función fisiológica exacta no está totalmente definida. Esta hipótesis está apoyada por un reciente trabajo que indica que P-gp contribuye con la detoxificación de pesticidas órgano fosforados en conductos biliares y túbulo contorneados proximales del riñón en ratas (Lanning, C.L. et al., 1996). La gran variabilidad de sustratos que pueden ser transportados por P-gp sugiere que dicha proteína puede tener otras múltiples funciones (ver [tabla 2](#)), muchas de las cuales todavía están en vías de exploración (Ambudkar, S.V. et al., 1999; Leveille-Webster, C.R. y Arias, I.M., 1995).

Tabla 2: Funciones de la Glicoproteína-P.

Funciones de la Glicoproteína P
<ul style="list-style-type: none"> • Protección frente a xenobióticos externos (fármacos, tóxicos medioambientales, etc.). • Transporte de hormonas esteroideas. • Protección frente a tóxicos endógenos. • Transporte de colesterol en epitelios digestivos • Transporte de factores de crecimiento y citocinas en células hematopoyéticas y NK. • Regulación del fenómeno de apoptosis. • Transporte de péptidos vinculados al reconocimiento antigénico.

3.2. Proteína Asociada a la Resistencia a Múltiples Fármacos (MRP).

La familia de MRP, proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos, tiene actualmente siete miembros. Las MRPs son transportadores orgánicos de aniones, es decir, transportan fármacos aniónicos como el metotrexato y fármacos neutros conjugados a los ligandos ácidos, tales como

glutación (GSH), glucuronato o sulfato (Höpfner, D.R. et al., 1999; Jedlitschky, G. et al., 1996; König, J. et al., 1999). Estas proteínas transportadoras constituyen una parte importante de la defensa de las células frente a fármacos carcinostáticos, efecto observado por el médico danés Dano (Dano, K., 1973), que demostró en 1973 que las células resistentes (con fenotipo MDR) de ascitis de Ehrlich podían disminuir su concentración intracelular de daunorrubicina debido a la extrusión activa de fármaco. En 1976, Juliano y Ling (Juliano, R.L. y Ling, V., 1976) descubrieron la P-gp, y en 1992 Cole et al. (Cole, S.P. et al., 1992) descubrieron un segundo tipo de bomba extrusora de fármacos en células de cáncer de fenotipo MDR, la proteína MRP. Mientras que el genoma humano codifica únicamente dos proteínas P-gp (Lincke, C.R. et al., 1991), se ha demostrado la existencia de muchos más genes relacionados con MRP (Allikmets, R. et al., 1996; Kool, M. et al., 1997). Hasta hoy se conocen siete miembros de MRP, siendo MRP7 uno de los miembros más recientes que aún no se ha caracterizado por completo. Las seis MRPs estudiadas hasta el momento se pueden englobar en dos grupos, MRP1, MRP2, MRP3, y MRP6 tiene un dominio adicional en la región N-terminal (indicado como TMD₀ en la [figura 6](#)), mientras que MRP4 y MRP5 carecen de dicho dominio. Se ha demostrado (Bakos, E. et al., 1998) que el dominio TMD₀ de MRP1 no requiere para la actividad del transporte. La región esencial para el transporte es la indicada como L₀ de MRP1 (véase [figura 6](#)) que está conservada en la región N-terminal de MRP4 y MRP5 (Bakos, E. et al., 1998; Gao, M. et al., 1996).

El gen MRP1 está implicado en la multirresistencia a fármacos, siendo la especificidad del sustrato de MRP1 inicialmente similar a la de P-gp. Sin embargo, se ha demostrado que los sustratos más específicos para MRP1 son los aniones orgánicos (Jedlitschky, G. et al., 1994; Leier, I. et al., 1994; Müller, M. et al., 1994). MRP1 consta de 1.531 aminoácidos, con un peso molecular de 190 kDa. Estructuralmente contiene dos dominios de unión de ATP y tres regiones con múltiples hélices que atraviesan la membrana (ver [figura 6](#)). El

gen MRP1 es miembro de la familia de proteínas transportadoras ABC, pero a diferencia de otros miembros de la superfamilia ABC, MRP y varias proteínas relacionadas poseen tres dominios transmembrana. El dominio adicional de NH₂-proximal en MRP contiene cinco hélices que atraviesan la membrana con un NH₂-terminal extracitosólico y esencial para el transporte (Deeley, R.G. y Cole, S.P., 1997; Ling, V., 1997).

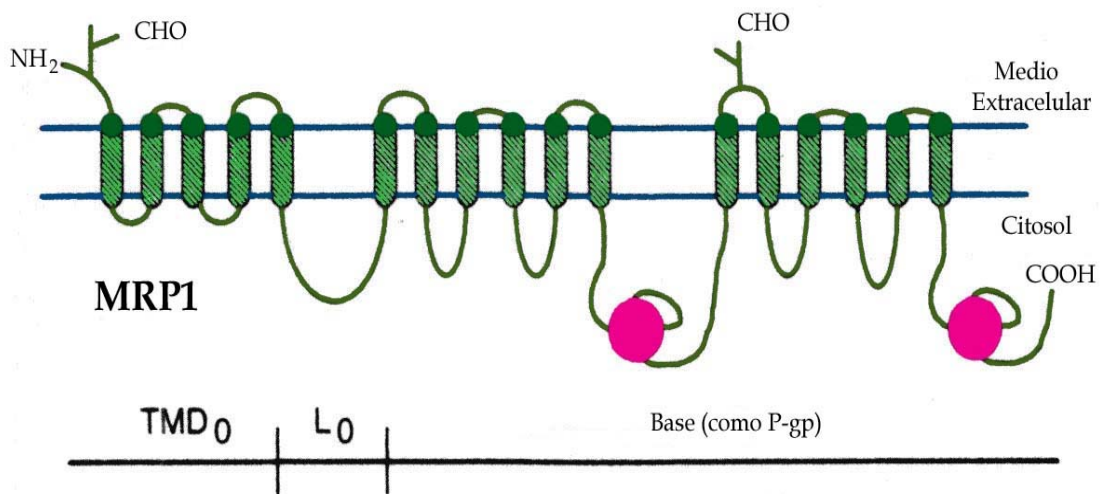


Figura 6: Topología de la MRP1 en la membrana plasmática (Borst, P. et al., 2000a).

Esta proteína transmembrana se expresa constitutivamente en una variedad amplia de tejidos, incluyendo las células epiteliales y todos los tipos celulares hematopoyéticos, lo que sugiere una función fisiológica en la célula, probablemente como un transportador activo de aniones anfifílicos (Deeley, R.G. y Cole, S.P., 1997). También podemos encontrar una expresión creciente de la proteína en varios tipos de tumores. En células normales, presenta una localización predominante en el citoplasma, mientras que en células tumorales la encontramos predominantemente en membrana plasmática, encontrándose también en el retículo endoplasmático, indicando una probable función diversa. La MRP1 es una bomba de eflujo de la membrana plasmática, e induce un fenotipo MDR, confiriendo su sobreexpresión resistencia a una amplia variedad de fármacos hidrofóbicos como la doxorrubicina daunorrubicina, vinblastina,

vincristina, colchicina, VP16, Rodamina 123 (Kavallaris, M., 1997; Zaman, G.J. et al., 1994). Para la expulsión eficaz de los agentes quimioterapéuticos se requiere el glutatión (Barrand, M.A. et al., 1997). El modo de acción de MRP1 es muy similar al de la glicoproteína-P, la principal proteína responsable del fenotipo MDR. Sin embargo, la MRP1 no confiere resistencia a Taxol o al m-AMSA, sino que puede transportar oxianiones metálicos, glutatión y otras conjugaciones del glutatión. Los inhibidores del transporte orgánico del anión, tales como probenecid, pueden bloquear la actividad del MRP.

La MRP1 esta implicada en la resistencia inducida a los agentes quimioterapéuticos, en una amplia variedad de tumores sólidos y hematológicos. La sobreexpresión de MRP1 puede conferir resistencia terapéutica en leucemia y tumores sólidos, no obstante su importancia es relativa, en comparación con otras proteínas capaces de inducir el fenotipo MDR (Willman, C.L., 1997). No está todavía claro, si la sobreexpresión de esta proteína está ligada a la activación transcripcional del gen y/o de la estabilidad creciente del ARN-m, ó a la amplificación del gen (Burger, H. et al., 1994; Cole, S.P. et al., 1992).

4. Moduladores.

Una de las principales características de la MDR es que, en algunos casos, las células seleccionadas en función de su resistencia a un agente citostático son también resistentes a otros agentes que no poseen ningún tipo de analogía funcional o estructural, pues unos actúan como inhibidores de la síntesis de DNA o RNA, otros intervienen en la formación de tubulina y otros en el potencial de membrana. Lo único que tienen en común estos compuestos es que son anfipáticos y que poseen anillos planos hidrofóbicos. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son los alcaloides de la vinca, las antraciclinas o las podofilotoxinas (Gottesman, M.M., 1993). Existen varias estrategias para abordar el problema de la MDR, por ejemplo disminuyendo la

expresión del gen *mdr1* (Hanania, E.G. et al., 1995), utilizando inhibidores de la glicoproteína-P. Si la acción de esta proteína pudiera ser modulada, se podría llegar a una concentración intracelular de fármaco suficiente para ejercer su efecto. Existen unos compuestos capaces de revertir la multirresistencia a fármacos en células MDR, que se denominan quimiosensibilizadores. No son tóxicos por sí mismos y, en general, compiten con los fármacos antitumorales por la unión a P-gp bloqueando así su actividad transportadora y aumentando la concentración intracelular de fármaco que ahora sí alcanza niveles tóxicos. A veces, es necesario utilizar mezclas de quimiosensibilizadores para evitar la aparición de efectos secundarios. De este modo se han utilizado conjuntamente verapamilo y quinina, o verapamilo y ciclosporina A, con resultados positivos.

Se han descrito un gran número de moduladores o quimiosensibilizadores que alteran la capacidad de los transportadores ABC (Glicoproteína-P o MRP) y permiten mantener concentraciones subtóxicas del fármaco en la célula, entre ellos destacan los bloqueadores de los canales de calcio como el verapamilo (VRP), detergentes como el Tritón X-100 y agentes inmunosupresores como la Ciclosporina A. Estos compuestos actúan compitiendo por los sitios de unión del fármaco a estos transportadores. Sin embargo, presentan la desventaja de poseer una alta toxicidad a las concentraciones requeridas para ejercer su acción, por lo que se precisa de nuevas sustancias revertidoras/quimiosensibilizadoras del fenotipo MDR con bajo efecto citotóxico. Dado que para la funcionalidad de estos transportadores es imprescindible la actividad ATPasa, la inhibición específica de la unión e hidrólisis de ATP en el dominio de unión a nucleótidos (NBD), constituye una buena herramienta para tratar de revertir el fenotipo MDR en organismos eucariotas.

Los flavonoides representan un grupo de compuestos polifenólicos con una amplia distribución en frutas y vegetales. Se estima que aproximadamente en la dieta mediterránea consumimos diariamente 1 gramo de estos compuestos, lo que nos da una idea de su baja toxicidad. Se ha descrito que

estos compuestos poseen diferentes actividades como antibacterianos, antivirales, antialérgicos, antitumorales y más recientemente antiparasitarios. Se desconoce su actividad y potencialidad como moduladores del fenotipo MDR en parásitos y células tumorales. Algunos flavonoides (DMA-deshidrosilibin kaempferide, apigenina o chalconas) se unen con gran afinidad al NBD2 y revierten “*in vivo*” la acumulación de fármacos, llevando a una reversión del fenotipo MDR (di Pietro, A. et al., 2002; Perez-Victoria, J.M. et al., 2001). Otros compuestos como los sesquiterpenos, se unen con baja afinidad al NBD aunque, sin embargo, poseen un significativo efecto reversor del fenotipo MDR tanto en parásitos como en células de mamíferos, lo que sugiere que este tipo de compuestos se une a los dominios transmembrana compitiendo por el sitio de unión a fármacos (Kennedy, M.L. et al., 2001; Perez-Victoria, J.M. et al., 2001).

La progesterona y el antiprogéstágeno RU38486 pueden actuar como moduladores no transportados por el eflujo de P-gp. Sin embargo, sus características hormonales limitan su potencial para los ensayos clínicos. Algunos derivados de progesterona/RU38486 o del estradiol, exhiben una interacción diferenciada con los receptores de la hormona, uniéndose a la P-gp y quimiosensibilizando el crecimiento de las células transfectadas con *mdr1* a la vinblastina más fuertemente que RU38486. La comparación de la estructura de los compuestos indica que RU49953, derivado altamente hidrofóbico del estradiol, y que no actúa recíprocamente con ningún receptor de la hormona, inhibe muy eficazmente el eflujo del fármaco mediado por P-gp y previene el marcaje por fotoafinidad con azidopina. El RU49953 induce una quimiosensibilización mucho más alta que la del verapamilo modulador bien conocido de la P-gp, que es, en sí mismo más eficiente que RU38486. RU49953 por lo tanto constituye un nuevo candidato prometedor para los moduladores tipo esteroideo de la MDR (Perez-Victorias, F.J. et al., 2003).

La posible utilización de los inhibidores de P-gp, se propone como una alternativa para la mejora de la eficacia de los agentes quimioterapéuticos así

como de sus perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos. Este concepto también ofrece nuevas oportunidades para superar la interacción fármaco-fármaco exhibida por una combinación de sustratos y/o inhibidores de P-gp, así como en el desarrollo clínico de las formulaciones orales de fármacos, ya que la vía de administración suele ser únicamente parenteral debido a la pobre absorción oral de dichos fármacos. Además, los inhibidores de P-gp pueden también influir en la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación de los sustratos de P-gp mejorando su farmacocinética (Varma, M.V. et al., 2003).

¿Cuál es el actual estado de los agentes reversores de MDR?. No es posible recopilar en una sola lista todos los compuestos que se han probado “*in vitro*” y se han identificado como potentes agentes reversores del fenotipo MDR. En la tabla 3 se resumen los compuestos quimiosensibilizadores que se ha ensayado en clínica.

Tabla 3: Lista de compuestos que han sido probados en clínica para la reversión de la multirresistencia a fármacos (Robert, J. y Jarry, C., 2003).

	Propiedades Farmacológicas.	Razón por la que se paran los ensayos
Inhibidores de Primera Generación.	Uso Médico.	
verapamilo	Vasodilatador coronario	Demasiado tóxico por sí solo
Nifedipina	Vasodilatador coronario	No suficientemente activo
Trifluoperazina	Antipsicótico	No suficientemente activo
Ciclosporina A	Inmunosupresor	Demasiado tóxico por sí solo
Quinidina	Antiarrítmico	No suficientemente activo
Quinina	Antimalaria	No suficientemente activo
Tamoxifén	Antiestrogenico	No suficientemente activo
Dipiridamol	Vasodilatador coronario	No suficientemente activo
Inhibidores de Segunda Generación.	Analogía con:	
Dexverapamilo	Verapamilo	Demasiado tóxico por sí solo
Dexniguldipina	Nifedipina	No suficientemente activo
Valspodar (psc-833)	Ciclosporina A	Aún en prueba
MS-209	Quinina	No testado aún
Toremifen	Tamoxifén	Aún en prueba
Inhibidores de Tercera Generación	Estructura Química.	
VX-710 (birocodar)	Piperidina Carboxilada	Aún en prueba
S-9788	Triacinopiperidina	Demasiado tóxico por sí solo
GF-120918	Acridona Carboxamida	Sin razón objetiva
LY-335979	Dibenzosuberona	Aún en prueba
XR-9576	Antranilamida	Aún en prueba

La estructura del verapamilo y de la quinina, así como la de los compuestos originales que fueron desarrollados para su uso en clínica, se presentan en la figura 7. A excepción de la Ciclosporina A y de sus análogos, las características estructurales comunes clásicas son obvias, siendo las más destacadas, la presencia de anillos aromáticos y la presencia al menos de un nitrógeno protonable.

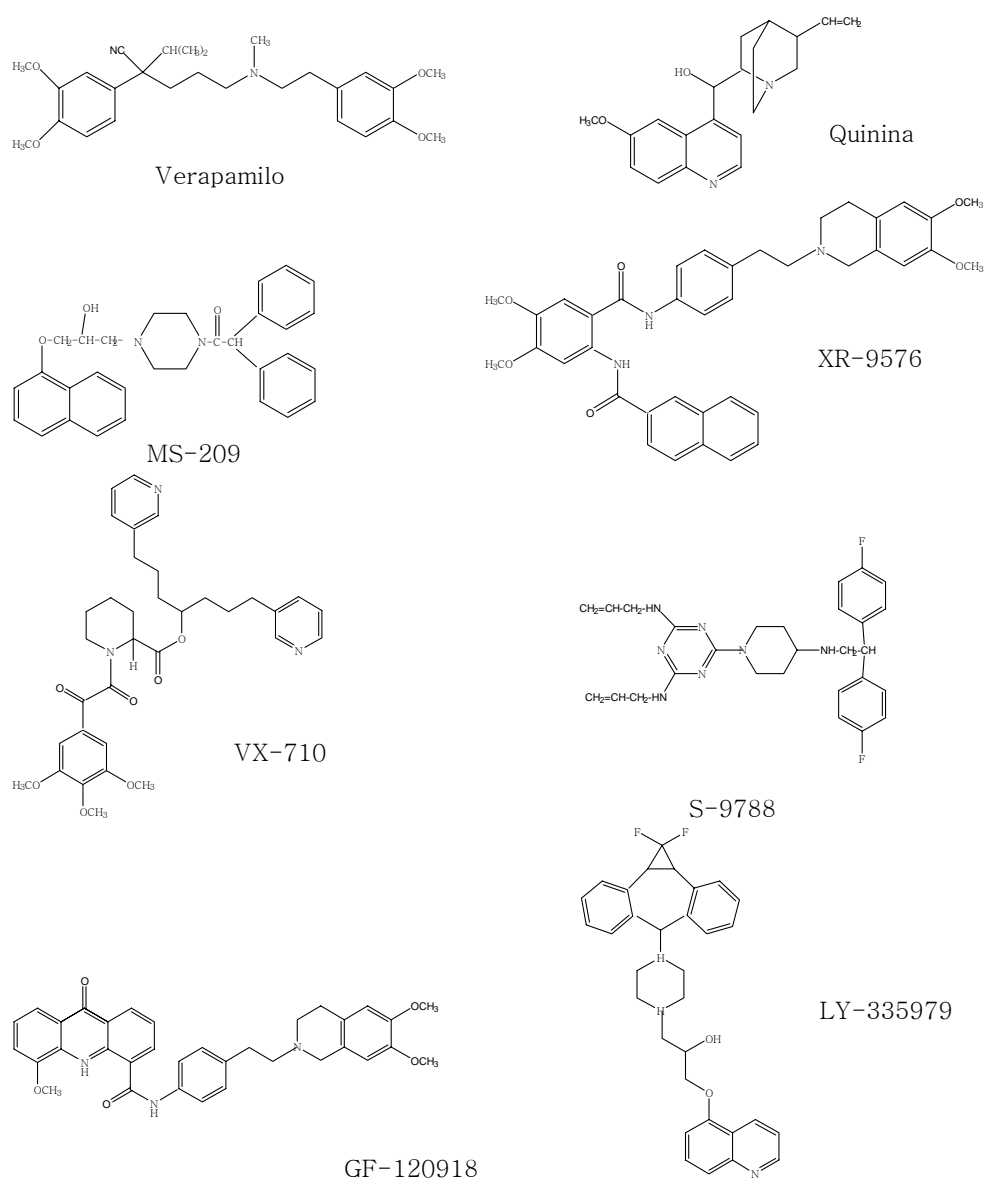


Figura 7: Formulas de las estructuras de algunos de los compuestos que se han desarrollado como reversores de la multirresistencia a fármacos y que además han sido incorporados en ensayos clínicos.

El Verapamilo, es el compuesto quimiosensibilizador más establecido y utilizado. En 1987 fueron publicados los primeros ensayos clínicos con reversores de MDR en cáncer ovárico, en estos ensayos (Ozols, R.F. et al., 1987), se utilizó el verapamilo conjuntamente con la doxorubicina, aunque debido a la significativa toxicidad cardiaca, el estudio fue interrumpido. En mielomas y linfomas no de Hodgkin, el verapamilo se demostró claramente activo en situaciones de resistencia, por lo que se utilizó para estandarizar protocolos con antraciclinas y/o vinca alcaloides. Sin embargo, la supervivencia de los pacientes no aumentó en los estudios de fase III en los que se combinaban verapamilo y fármaco citotóxico en los tratamientos de mieloma múltiple (Dalton, W.S. et al., 1995).

En contraste con los tumores hematológicos, en los tumores sólidos refractarios nunca pudo demostrarse una respuesta al verapamilo cuando este reversor fue añadido junto a la quimioterapia clásica, probablemente esto fue debido a que la dosis de administración era demasiado baja como consecuencia del temor a la toxicidad cardiaca (Demicheli, R. et al., 1989; Langenbuch, T. et al., 1990; Mross, K. et al., 1993). Sin embargo, se llevó a cabo un interesante estudio en pacientes seleccionadas al azar, con metástasis de cáncer de mama resistentes a las antraciclinas y que fueron tratadas con vindesina, con y sin coadministración de verapamilo. Los resultados de estos ensayos revelaron un incremento significativo de la supervivencia de las pacientes que habían recibido la coadministración con verapamilo (Belpomme, D. et al., 2000). Con el objetivo de disminuir la toxicidad del verapamilo, se desarrolló el dexverapamilo que tiene una menor eficacia bloqueando los canales de Ca^{+2} (Bissett, D. et al., 1991). La actividad del dexverapamilo se demostró en estudios en fase I de pacientes de linfoma (Wilson, W.H. et al., 1995) y estudios en fase II de pacientes de cáncer de mama, pero no se encontró actividad en pacientes de cáncer colorectal ni en pacientes de cáncer renal (Lehnert, M. et al., 1998; Motzer, R.J. et al., 1995; Scheithauer, W. et al., 1993). A pesar de su

interés potencial, este fármaco no se ha desarrollado porque su toxicidad cardiaca fue valorada como inaceptable (Warner, E. et al., 1998).

Pese al desarrollo de varias familias de quimiosensibilizadores, todavía no se han obtenido compuestos útiles en clínica. Por tanto, existe en la actualidad un enorme interés en la identificación y desarrollo de nuevas familias de agentes quimiosensibilizadores. Estos nuevos compuestos aportarán esqueletos farmacofóricos que, tras su evolución químico-funcional, rendirán compuestos quimiosensibilizadores de utilidad clínica.

5. Quimiotecas Combinatorias Sintéticas.

La búsqueda de sustancias químicas de origen sintético o a través de fuentes naturales como origen de productos para el descubrimiento de nuevas cabezas de serie con algún tipo de actividad biológica, ha seguido desde el principio de la farmacología diversos enfoques (Grabley, S. y Thiericke, R., 1999).

La síntesis orgánica clásica se añadió como herramienta muy potente para el desarrollo de nuevos fármacos o para la mejora de la actividad de los ya existentes, ya que el paso limitante de ambas estrategias radicaba en la dificultad y lentitud para la obtención de nuevos compuestos con elevada diversidad. Gracias a la incorporación de los conocimientos de la bioquímica molecular y celular se ha podido relacionar la estructura química con la actividad biológica de los compuestos.

La química combinatoria supone un gran avance ya que es capaz de generar en un tiempo relativamente corto grandes colecciones de compuestos diferentes, ofreciendo la posibilidad de una mayor diversidad para la identificación de compuestos individuales. A estas colecciones se les llama quimiotecas combinatoriales. La estrategia de síntesis química combinatorial aplicada a moléculas farmacológicas supone rapidez y eficacia en el proceso de

búsqueda de nuevos fármacos, y permite obtener miles e incluso millones de productos en comparación con la investigación de productos naturales o la síntesis orgánica clásica que únicamente permite la obtención de uno o unos pocos compuestos por etapa. El gran salto de la química combinatoria se produjo cuando se introdujo el concepto de síntesis de mezclas de compuestos, que presentaban la posibilidad de obtener de miles a millones de productos mediante la técnica de partición y mezcla, (“split and mix”). Esta técnica consiste en el acoplamiento aleatorio de una serie de reactivos a soportes poliméricos. Dicho acoplamiento es secuencial y controlado, mezclando los productos de las etapas intermedias y dividiendo en porciones iguales para los posteriores acoplamientos (Wilson, S.R. y Czarnik, A.W., 1999). A través de un proceso conocido como cribado de alto rendimiento o “High Throughput Screening” (HTS), resultaba factible la identificación de cabezas de serie con elevada actividad de entre las quimiotecas generadas, sin el tiempo como factor limitante.

El rastreo posicional (RP) es una forma de etiquetar las quimiotecas para que, posteriormente, resulte más fácil su deconvolución. Las librerías sintéticas por química combinatoria (RP-LSCs), ofrecen una aproximación única y rápida en la identificación de compuestos individuales y activos provenientes de librerías formadas por millones de compuestos para la investigación básica en el descubrimiento de nuevos fármacos. El cribado de las RP-LSCs en muchos casos permite la identificación del radical más activo para cada posición a través de ensayos biológicos (Pinilla, C. et al., 1994). La habilidad de identificar moléculas altamente activas originarias de las librerías sintéticas creadas por química combinatoria y que están constituidas por millones de compuestos diferentes en varios formatos, reside en la selectividad del sistema de los receptores y/o dianas biológicas (Almarsson, O. et al., 1993; Houghten, R.A., 1993; Scott, J.K. y Craig, L., 1994; Zuckermann, R.N., 1993).

6. Quimiotecas Combinatorias de Extractos Vegetales.

Son numerosas las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. El interés por las posibilidades terapéuticas que ofrecen los fármacos de origen vegetal (fitofármacos) ha ido en aumento en los últimos años. El valor de estos productos dentro del marco de la terapia medica moderna tiene cada día mayor relevancia, y se puede afirmar que en el ámbito mundial han alcanzado un interés mayor al observado en cualquier momento anterior de la historia de los medicamentos (Navarro, V. et al., 1998).

Los productos herbolarios fueron la base de todo medicamento hasta finales del siglo XIX. Con la llegada de la química de síntesis, la ciencia redescubre y toma conciencia de los efectos terapéuticos de los principios activos que forman parte de las plantas medicinales. Dicha técnica permitió reproducir en el laboratorio las sustancias activas que antaño sólo se podían extraer de las plantas. Gracias al avance de la ciencia moderna en especial a la biotecnología y la bioquímica molecular podemos conocer a fondo los principios activos de las plantas medicinales y su actividad en el organismo, pudiendo validar los usos de las diversas especies vegetales. Día a día se descubren nuevas moléculas que forman parte de las drogas vegetales, pudiendo identificarse sus propiedades terapéuticas.

La incorporación de fitofármacos en el arsenal terapéutico de los laboratorios tradicionales, es otra señal que estimula el empleo de estos principios activos en el tratamiento de diversas patologías tanto con fines preventivos como curativos. La mayor parte de las empresas farmacéuticas del mundo cuentan con líneas de fitomedicamentos, y existe una constante búsqueda de nuevos medicamentos para poder dar solución a enfermedades como el cáncer, el SIDA, las infecciones microbianas, etc.

Como es sabido, desde tiempos muy remotos el hombre ya manejaba las hierbas, y dichas experiencias quedaron asentadas. Sus usos fueron con

fines alimenticios y medicinales, prueba de ello es la gran cantidad de drogas medicinales de primer orden que han surgido a través del aislamiento de principios activos derivados de las plantas y que dieron origen a los primeros fármacos: aspirina, ipecacuana, digital, quinina, curare, pilocarpina, atropina, vincristina, vinblastina, etc.

A todos esos hallazgos, debemos sumar la investigación moderna, la cual ha realizado importantísimas aportaciones en el área clínica tales como el Taxol (*Taxus* spp), el Etopósido (*Podófilo*), los Gingenósidos (*Panax Ginseng*), los ginkgólidos (*Ginkgo Biloba*), los fitoestrógenos vegetales (*Soja*, *Cimicifuga*), la escina (*Castaño de la India*), la silimarina (*Cardón marino*), los valepotriatos (*Valeriana officinalis*), los complejos lípido-esterólicos (*Sabal*, *Pygeum*, *Palta y Soja*), e hipericína (*Hipérico*). Los tejidos vegetales son los principales sistemas biológicos que sintetizan α -tocoferol, ácido ascórbico y carotenoides, pero además, son ricos en una amplia variedad de polifenoles (Bolshakova, I.V. et al., 1997; Friedman, M., 1997; Rice-Evans, C.A. et al., 1997). Muchos alimentos de origen vegetal son ricos en flavonoides hidroxilados y otros compuestos fenólicos que se encuentran en estado natural en cantidades que oscilan desde trazas hasta gramos por kilogramos de material fresco y que muestran propiedades como: antioxidantes (Miyake, T. y Shibamoto, T., 1997; Rice-Evans, C.A. et al., 1997), antiinflamatorios (Ortega, T. et al., 1996), antiagregantes plaquetarios (Lin, C.N. et al., 1996), antimicrobianos (Hamilton-Miller, J.M., 1995) y quimioprotectores, en el sentido de limitar la transformación maligna (Stoner, G.D. y Mukhtar, H., 1995). La familia de las combretáceas reúne a numerosas especies que han sido estudiadas para su utilización con fines medicinales (Ficarra, R. et al., 1997; Samuelsson, G. et al., 1992).

El importante auge a nivel mundial del empleo de principios activos de origen vegetal en la clínica diaria, ha permitido concretar en varios países una legislación adecuada a este nuevo tipo de fármaco, jerarquizando y blanqueando así una milenaria práctica inserta en zonas grises desde el punto de vista

legislativo, y posicionándola como una verdadera opción terapéutica para el profesional de la salud.

No se conoce la verdadera amplitud de la diversidad biológica, es decir, cuántas especies de plantas y animales comparten el planeta con los seres humanos. Casi todas las estimaciones dan una cifra entre los 10 millones y los 30 millones, con algún consenso alrededor de la cifra de 14 millones (Eldrege, N., 1998; Mann, C.C. y Plummer, M.L., 1996; Myers, N., 1998). De cualquier modo, sólo alrededor de 1,7 millones de especies, una pequeña parte del total, han sido identificadas y categorizadas, y menos aún han sido estudiadas (Myers, N., 1998).

Independientemente del número verdadero de especies, la conservación misma de la diversidad biológica es vital para la humanidad. Actualmente más de 40.000 especies de plantas, animales, hongos y microbios se explotan normalmente para beneficio de la humanidad (Eldrege, N., 1998). Se estima que el 40% de los fármacos modernos provienen de fuentes silvestres, con un valor de unos US\$ 40.000 millones por año en ventas con y sin prescripción (Tuxill, J., 1999).

Pese al estudio y a la rápida expansión de la literatura científica, sólo un pequeño porcentaje de la totalidad de las especies se ha estudiado, quedando, por lo tanto, un gran campo de investigación por realizar.

Hacia finales de 1950 comenzó una intensiva revisión de plantas, microorganismos y animales (estrellas de mar, corales, etc.), analizando su posible actividad antitumoral. Ello fue debido, principalmente, a que el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (INC) instigó y fundó un gran programa de detección selectiva. Se ha adoptado un sistema de selección de plantas al azar, ya que pueden encontrarse nuevos compuestos en cualquier especie del reino vegetal o animal.

Desde el comienzo del programa se han ensayado, respecto a su actividad antitumoral, un gran número de extractos de diversos orígenes. Se

han mostrado con actividad reproductible, alrededor del 4% de los extractos ensayados. Durante más de unos 25 años se han experimentado unas 114.000 muestras vegetales, estando representadas 40.000 especies.

Los compuestos antitumorales aislados suelen ser productos naturales nuevos que se extienden en un amplio margen de tipos estructurales, subdivididos en grupos fitoquímicos (Tabla 4). No obstante, varios de los compuestos aislados son, de hecho, principios naturales ya conocidos anteriormente, pero que probablemente, no habían sido sometidos a ensayos rigurosos respecto a su actividad biológica, especialmente referida a la actividad antitumoral.

Tabla 4: Compuestos antitumorales provenientes de plantas.

<i>Clase</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Fuente</i>	<i>Familia</i>	
Monoterpenos	Alamandina	<i>Allamnada catártica</i>	Apocynaceae	
	4-Ípomeanol	<i>Ipomea batatas</i>	Convolvulaceae	
	Penstimida	<i>Penstemon deutus</i>	Scrophulariaceae	
Sesquiterpenos	Bacarina	<i>Baccharis megapotamica</i>	Compositae	
	Elefantopina	<i>Elephantopus elatus</i>		
	Helenalina	<i>Helenium autumnale</i>		
	Liatrina	<i>Liatris chapmanii</i>		
	Filantósido	<i>Phyllanthus acuminatus</i>	Euphorbiaceae	
	Filantostatina 1			
Vernolepina	<i>Vernonia hymenolepis</i>	Compositae		
Diterpenos	Gnidina	<i>Gnidia lomprantha</i>	Thymelaeaceae	
	Jatrofona	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Euphorbiaceae	
	Mezereína	<i>Daphne mezereum</i>	Thymelaeaceae	
	Taxodiona	<i>Taxodium distichum</i>	Taxodiaceae	
	Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxaceae	
	Tripdiólido	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Celastraceae	
	Triptólido			
Cuasinósidos/Simarubólidos	Bruceantina	<i>Brucea antidysenterica</i>	Simoroubaceae	
	Glaucarubinona	<i>Simatrouba glauca</i>		
	Holacantona	<i>Holocantha emoryi</i>		
Triterpenoides, Esteroides, etc.	Curcubitacinas	Curcubitacina E	<i>Mara oreganus</i>	Cucurbitaceae
	Saponina	Acer saponina P	<i>Acer negundo</i>	Aceraceae
	Cardenólido	Estrofantidina	<i>Parquetina nigrencens</i>	Asclepiadaceae
	Bugfadienólido	Helebrigenin acetato	<i>Bersama abyssinica</i>	Melianeaceae
	Witanólido	Witaferina A	<i>Acnistus arborescens</i>	Solanaceae

Lignanós	α - y β - Peltatina	<i>Podophyllum peltatum</i>	Podophyllaceae
	Podofilotoxina	<i>Podophyllum hexamdrum</i>	
		<i>Podophyllum peltatum</i>	
	Esteganacina	<i>Juniperus chinensis</i>	Crupessaceae
<i>Steganotaenia araliacea</i>		Umbelliferae	
Quinonas	Jacaranona	<i>Jacaranda caucana</i>	Bignoniaceae
	Lapachol	<i>Steganotaenia suaveolens</i>	
Alcaloides			
Pirrolizidina	Monocrotalina	<i>Crotalaria spectabilis</i>	Leguminosae
Isoquinolina	Indicin-N-óxido	<i>Heliotropium indicum</i>	Boraginaceae
	Emetina	<i>Cephaelis acuminata</i>	Rubiaceae
Benzofenantridina	Tetrandrina	<i>Cyclea peltata</i>	Menispermaceae
Fenantroindolizidina	Talicarpina	<i>Thalictrum dasycrapum</i>	Ranunculaceae
Acridona	Fagaronina	<i>Fagara zanthoxyloides</i>	Rutaceae
Piridocarbazol	Nitidina	<i>F. macrophylla</i>	Rutaceae
Pirrolquinoleína	Tilocrebina	<i>Tyophlora crebiflora</i>	Asclepiadaceae
Cefalotaxina	Acronicina	<i>Acronychia baueri</i>	Rutaceae
Bis-indol	Elipticina	<i>Ochrosia eliptica</i>	Apocynaceae
	9- Metoxielipticina	<i>O. moorei</i>	Apocynaceae
Maitansinoide/ Ansamacrólido	Camptotecina	<i>O. maculata</i>	Apocynaceae
	Harringtonina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Nyssaceae
	Homoharringtonina	<i>Mappia foetida</i>	Olinaceae
No heterocíclicos	Leurosina	<i>C. harringtonina</i>	Cephalotaxaceae
	Vinblastina	<i>C. harringtonia</i>	Cephalotaxaceae
Péptidos	Vincristina	<i>Chatarantus lanceus</i>	Apocynaceae
	Maitanacina	<i>C. roseus</i>	Apocynaceae
	Maitansina	<i>C. roseus</i>	Apocynaceae
		<i>C. roseus</i>	Apocynaceae
	Maitanvalina	<i>Maytenus buchananii</i>	Apocynaceae
	Colchicina	<i>M. buchananii</i>	Celasteraceae
	Buwardina	<i>M. serrata</i>	Celasteraceae
	Desoxibuwardina	<i>Putterlickia verrucosa</i>	Celasteraceae
		<i>Maytenus buchananii</i>	Celasteraceae
		<i>Colchiucm speciosum</i>	Celasteraceae
		<i>Bouvardia terniflora</i>	Liliaceae
		<i>B. terniflora</i>	Rubiaceae
			Rubiaceae

Los estudios de rastreo han dado como resultado la identificación y el aislamiento de muchas sustancias nuevas naturales dotadas de actividad antitumoral que se consideran suficientemente activas como para comenzar estudios clínicos.

En este trabajo se ensayaron quimiotecas sintéticas derivadas de la química combinatoria y una quimioteca natural basada en un extracto vegetal

cuyo fraccionamiento nos ha llevado al descubrimiento de una fracción de gran interés por sus características como quimiosensibilizador.

Objetivos.

1. Objetivo General.

El objetivo general de este trabajo es la identificación de quimiosensibilizadores útiles para paliar los efectos del fenotipo MDR dado que éste es uno de los problemas principales en los tratamientos del cáncer con fármacos antineoplásicos. La estrategia experimental propuesta ha sido la utilización de la química combinatoria junto con un ensayo de cribado celular de alto rendimiento como vía para acelerar el descubrimiento de nuevas moléculas quimiosensibilizadoras. Para ello se han utilizado extractos vegetales como fuentes de fitoquimiosensibilizadores.

En este escenario, el presente trabajo ha estado dirigido hacia la caracterización y el desarrollo de nuevas moléculas quimiosensibilizadoras.

2. Objetivos Específicos.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- ❑ Establecer un ensayo de cribado celular mediante citometría de flujo basado en la acumulación intracelular de la antraciclina daunomicina (DNM), aprovechando la fluorescencia intrínseca de la misma.

▣ Analizar el cribado y deconvolución de quimiotecas, combinatorias sintéticas y naturales. Se rastrearán diversas quimiotecas sintéticas. Concretamente, se buscarán compuestos activos en una quimioteca de N-alquilglicinas compuesta por 5.120 compuestos, y una de 2,5-dicetopiperacinas (DKPs) compuesta de 166 compuestos individuales. Así mismo, en paralelo se utilizará una quimioteca natural basada en un extracto vegetal aportado por la compañía ASAC Pharmaceuticals.

▣ Caracterizar funcionalmente los compuestos activos. Tras la síntesis química, o el aislamiento de productos naturales, o la combinación de ambas técnicas, se realizarán diversas pruebas de actividad biológica, con el fin de seleccionar los compuestos con mejor actividad quimiosensibilizadora y baja toxicidad. El (los) candidato(s) seleccionado(s) pasará(n) a la siguiente fase de ensayos en animales en los que se estudiará su toxicidad “*in vivo*”.

Resultados.

1. Ensayo de Acumulación Intracelular de Daunomicina: Validación para el cribado funcional de quimiotecas.

La caracterización del fenotipo MDR a través de la prueba funcional de la actividad de la P-gp y la MRP se realizó mediante un ensayo celular que permite detectar la acumulación intracelular de la daunomicina (DNM). El paradigma experimental se basó en el seguimiento de la acumulación citosólica de la DNM mediante citometría de flujo aprovechando la fluorescencia intrínseca de la antraciclina (figura 8). Los histogramas característicos del citómetro de flujo muestran que las células parentales de leucemia murina L1210 presentan un pico correspondiente a una determinada fluorescencia debida a la acumulación intracelular de DNM (figura 9 A). En cambio, en las células L1210 resistentes al fármaco citostático (L1210R) se observó una disminución en la acumulación de DNM como indica el desplazamiento del pico fluorescente a valores inferiores (figura 9 B). La incubación de las células L1210R con verapamilo (VRP) aumentó significativamente la concentración citosólica de la antraciclina, como se desprende del acercamiento en el histograma de los valores de fluorescencia hacia los característico de las células parentales L1210 (figura 9 C y D). Por tanto, el desplazamiento del pico de acumulación de las células L1210R hacia las parentales L1210 es un

indicador operacional de la actividad quimiosensibilizadora de nuevos compuestos, que puede ser utilizado para el cribado de quimiotecas combinatorias sintéticas.

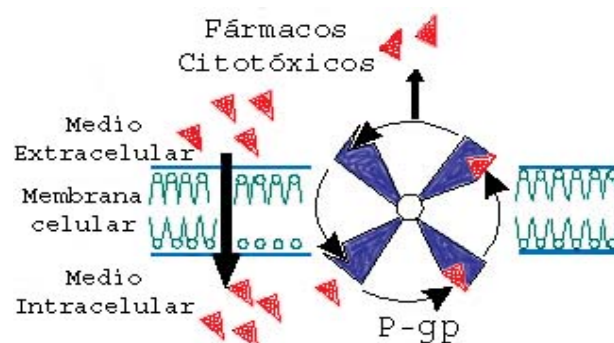


Figura 8: Modelo esquemático del mecanismo extrusor de la Glicoproteína-P (modificado de (van der, H.S. et al., 1995)).

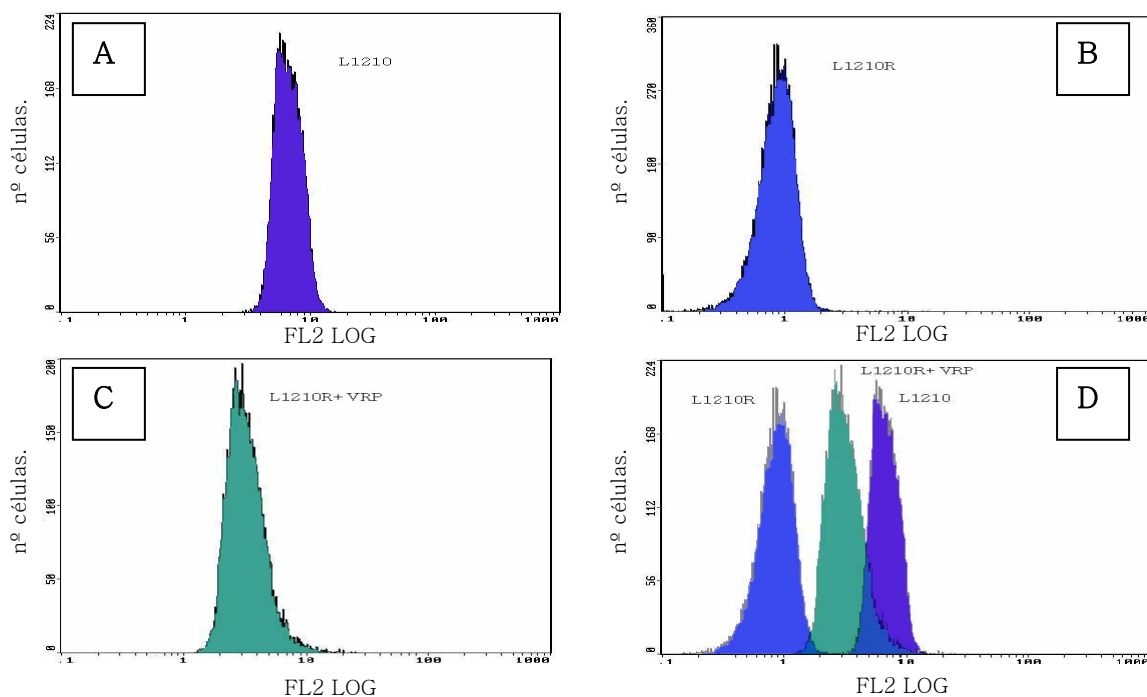
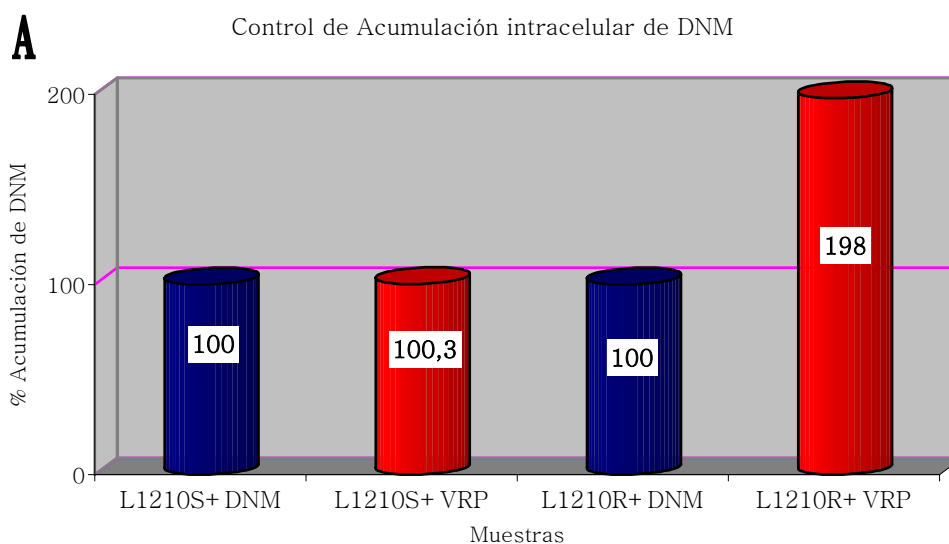


Figura 9: Representación del análisis por citometría de flujo de la acumulación intracelular de DNM en la línea celular L1210 tanto parental como resistente y resistente preincubada con VRP.

La cuantificación y normalización de los histogramas de citometría de flujo permite conocer la acumulación intracelular relativa del fármaco

citostático. Así, la magnitud de la señal mostrada por las células parentales L1210 y L1210R en ausencia de quimiosensibilizador se toma como 100% para cada sublínea celular. De esta forma, la medida de la concentración intracelular de antraciclina en presencia de compuesto quimiosensibilizador se normaliza con respecto a la presentada en su ausencia. Estos datos se representan en diagramas de barras (ver [figura 10 A](#)), facilitando la identificación de compuestos activos. Como control positivo, y a modo comparativo, se incluye el efecto quimiosensibilizador producido por VRP 5 μ M.

Este mismo tipo de ensayo se puede utilizar con otras líneas celulares como la línea HL-60 de leucemia humana tanto en células parentales como en resistentes a la DNM (ver [figura 10 B](#)). Al igual que con las L1210R, las células HL-60R son sensibilizadas por el compuesto VRP. Dado que las células L1210R sobreexpresan principalmente P-gp, y las HL-60R expresan MRP1 (Camarasa, M.V. et al., 2005), este ensayo sirve para identificar moduladores específicos de ambos tipos de bombas de eflujo.



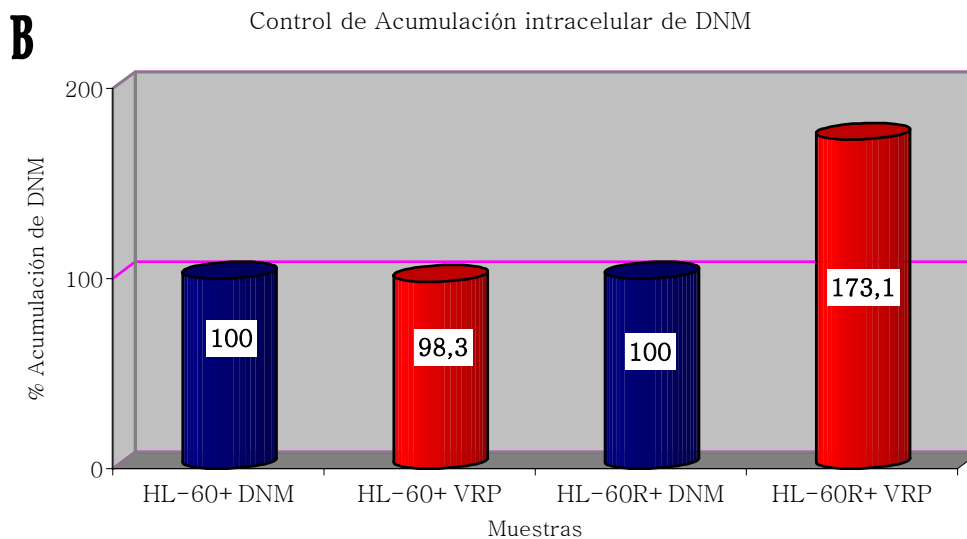


Figura 10: Acumulación relativa de DNM. A) En L1210 parentales y resistentes en ausencia y en presencia de VRP 5 μ M. B) En HL-60 parentales y resistentes en ausencia y en presencia de VRP 5 μ M. En ambas, las barras azules representan las células incubadas únicamente con DNM a 3 μ M, mientras que las rojas han sido preincubadas durante 15 min con VRP.

2. Peptoides.

2.1. Cribado de una Quimioteca.

En los inicios de la química combinatoria se crearon las primeras quimiotecas combinatoriales compuestas por péptidos, beneficiándose de la metodología de síntesis desarrollada en fase sólida, junto con el enorme incremento observado en la investigación en el campo del diseño y desarrollo de fármacos peptídicos (Alluri, P.G. et al., 2003).

Estas quimiotecas peptídicas presentaban importantes ventajas, ya que gracias a su estructura modular su diversidad resultaba casi ilimitada. Además, podían ser fácilmente sintetizadas y secuenciadas, mostrando una importante relevancia biológica como consecuencia de sus variadas aplicaciones, como pueden ser el mapeo de epítopos para el reconocimiento antigénico, la codificación de secuencias ribonucleotídicas con actividad catalítica o la

identificación de cabezas de serie con afinidad por determinados receptores (Alluri, P.G. et al., 2003; Grabley, S. y Thiericke, R., 1999). Sin embargo, pese a sus ventajas, también presentan inconvenientes y uno de los principales problemas que muestran los péptidos en su actividad “*in vivo*” es su elevada inestabilidad metabólica y su baja absorción, acciones múltiples y amplias fluctuaciones en su comportamiento farmacocinético; lo que obliga en ocasiones, a su modificación con el fin de conseguir una mejora a estas desventajas.

Para evitar muchos de estos inconvenientes se propuso el desarrollo de un sistema modular alternativo basado en monómeros “no naturales”, tales como péptidos modificados o peptidomiméticos. Dentro de esa perspectiva, se abordó la alternativa de modificar la cadena principal del péptido trasladando la cadena lateral del átomo de carbono al átomo de nitrógeno adyacente, rindiendo oligómeros de glicinas N-sustituidas (Simon, R.J. et al., 1992). Estos compuestos, bautizados como “**Peptoides**”, tienen una estabilidad metabólica mayor ya que este cambio origina en el peptoide una elevada resistencia a las proteasas y una mejora en la absorción intestinal. Además, hay una libertad conformacional mayor debido a la ausencia de la estructura secundaria característica de los péptidos, al no formarse puentes de hidrógeno intramoleculares entre el hidrógeno de la amida y los carboxilos. Así mismo, la ausencia de quiralidad y la amplia variedad de bloques de construcción hacen de estos compuestos, los peptoides, unos buenos candidatos para interactuar con diferentes dianas terapéuticas (Alluri, P.G. et al., 2003).

La primera síntesis de peptoides en fase sólida y aplicada a la química combinatoria fue realizada por (Simon, R.J. et al., 1992) utilizando una estrategia estándar de péptidos, con las N-alquilglicinas protegidas con Fmoc, como componentes monoméricos y con PyBOP o PyBrOP como agentes de acoplamiento (ver [figura 11 A](#)). Posteriormente, (Figliozzi, G.M. et al., 1996) se planteó una síntesis más sencilla mediante la aproximación del submonómero, donde cada ciclo implica dos etapas, una la formación del enlace amida con el

ácido α -bromoacético y DIC como agente alquilante, y el posterior desplazamiento del bromo por una amina primaria, obteniendo la correspondiente N-alquilglicina para continuar con el siguiente ciclo (ver [figura 11 B](#)). Con esta síntesis se podía obtener un gran número de aminas primarias comerciales y se eliminaban las etapas de síntesis previa de los monómeros, así como la desprotección.

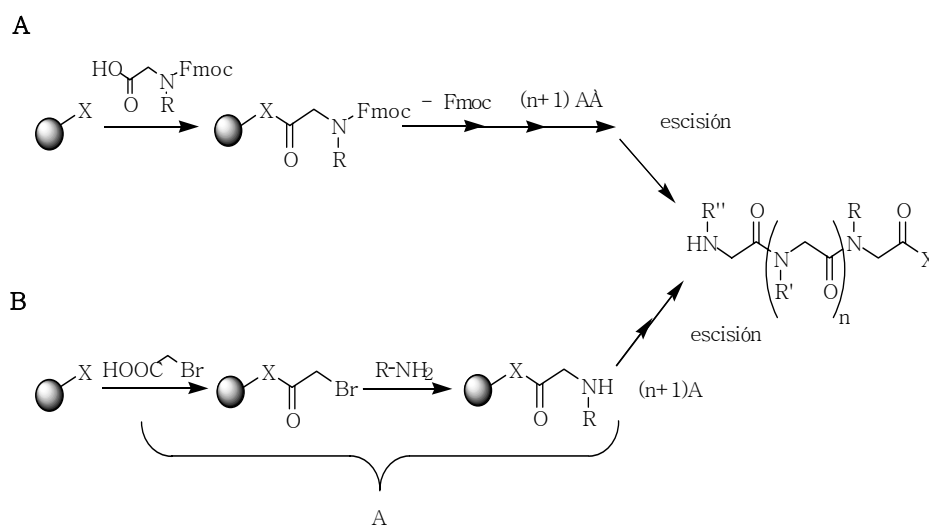


Figura 11: Síntesis en fase sólida de Peptoides. A) acoplamiento de N-alquilglicinas protegidas. B) acoplamiento de submonómeros, haloácidos y aminas primarias. X=NH₂-OH

Como se ha mencionado con anterioridad, los peptoides son propicios para la generación de quimiotecas combinatoriales por posibilitar la introducción de gran diversidad molecular a partir de fuentes de productos comerciales y por realizarse su síntesis en fase sólida (Alluri, P.G. et al., 2003; Simon, R.J. et al., 1992). En cuanto a la acción biológica de esta clase de compuestos existen antecedentes que describen diversas actividades biológicas (Humet, M. et al., 2003; Pinilla, C. et al., 1999; Wilson, D.B. et al., 1999). Por todos estos motivos se planteó el desarrollo y ensayo de una quimioteca combinatorial de peptoides. La síntesis de la quimioteca ha sido realizada en el laboratorio del Dr. Ángel Messeguer por la Dra. Isabel Masip junto con Nuria Cortés y Marisa Guardiola, y los ensayos biológicos para las dianas P-gp y MRP1 de la misma se muestran en el presente trabajo. En

concreto, los peptoides que conformaban la quimioteca sintetizada en fase sólida mediante la vía sintética descrita por Zuckermann (Figliozzi, G.M. et al., 1996), poseían un esqueleto común observable en la [figura 12](#).

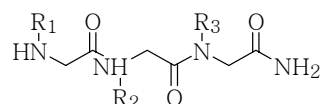


Figura 12: Fórmula genérica de la química combinatoria de peptoides. El esqueleto básico de cada peptoide está conformado por un trímero de glicinas N-sustituidas, donde R_1 , R_2 y R_3 representan las posiciones que permiten la introducción de diversidad química.

La diversidad se introdujo mediante la variación de las cadenas laterales unidas a los nitrógenos (R_1 , R_2 y R_3). Los peptoides se nombran comenzando por el extremo N-terminal y acabando por el C-terminal. Este orden es el contrario al del proceso de síntesis. Por este motivo y para evitar confusiones, la introducción de las fuentes de diversidad se hace en sentido inverso, comenzando por R_3 y terminando por R_1 , como podemos observar en la [figura 13](#).

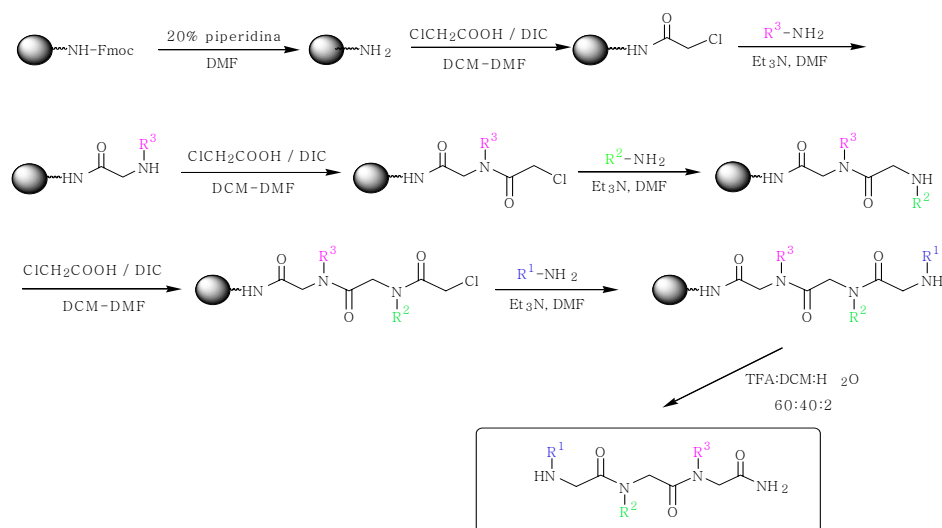
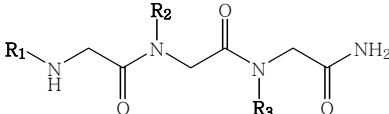

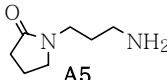
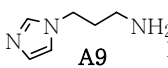
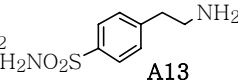

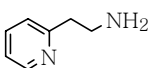
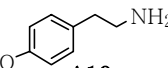
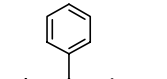

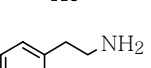
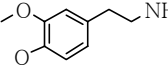
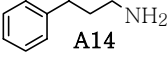
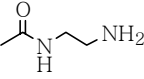
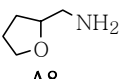
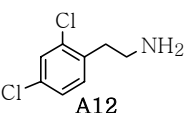
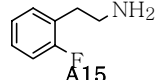
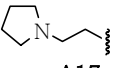
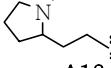
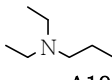
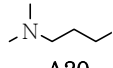


Figura 13: Esquema de síntesis de la quimioteca de peptoides.

Las aminas primarias que se utilizaron para la construcción de esta quimioteca fueron aminas disponibles comercialmente. No obstante, no se utilizó el mismo número de ellas para todas las posiciones, eliminándose en la primera y segunda posición (R_2 y R_3) aquellas aminas que podrían llevar a la formación de compuestos no deseados, es decir, las aminas que tenían un nitrógeno terciario adicional que favorecía la ciclación de los intermediarios originando las correspondientes Diketopiperacinas. Estas aminas si que se introdujeron en la tercera posición (R_1), dado que en esta posición no eran problemáticas. Como resultado, el conjunto de las aminas utilizadas se muestran en la [tabla 5](#).

Tabla 5: Aminas utilizadas en las diferentes posiciones de diversidad de la quimioteca de peptoides.

				
R_1, R_2, R_3	 A1	 A5	 A9	 A13
	 A2	 A6	 A10	 A14
	 A3	 A7	 A11	 A14
	 A4	 A8	 A12	 A15
R_1	 A17	 A18	 A19	 A20

*En la posición R_1 se introdujeron las mismas 20 aminas que en la posición R_2 y R_3 además, de las cuatro que se muestran en la parte inferior de la tabla.

Como ya se ha mencionado la quimioteca se construyó siguiendo el método del rastreo posicional. Los compuestos creados no se encuentran de

forma individual, sino formando mezclas controladas. En este formato se generó una quimioteca constituida por tres subfamilias de peptoides, cada una de ellas tenía definida una posición del oligómero con una de las 20 aminas utilizadas (OXX) o con las 16 (XOX, XXO), y las otras posiciones (X) con una mezcla equimolar de estas aminas. De esta forma, en cada una de las 20 mezclas con la primera posición definida entrarían 256 moléculas, mientras que cada una de las mezclas con las posiciones segunda (XOX) y tercera (XXO) definidas contenían 320 peptoides. La diversidad química total de la quimioteca fue 5.120 compuestos.

2.2. Deconvolución de la Quimioteca.

Las mezclas que comportan esta quimioteca se analizaron en el ensayo celular, monitorizando su efecto sobre la acumulación de DNM en la línea celular L1210R. Para ello, en el ensayo de captación de DNM las células se incubaron a 37°C en presencia de las mezclas [0,1 mg/ml] durante 60 min, seguidos de 60 min, con DNM 3 µM. Como control positivo o de referencia se utilizó el reversor VRP 5 µM, siguiendo un protocolo idéntico al utilizado para las mezclas de peptoides. Tras la incubación las muestras se analizaron mediante citometría de flujo.

El cribado de las 52 mezclas explorando las tres posiciones del oligómero se muestra en la [figura 14](#). Un número sustancial de mezclas para cada posición aumentan la acumulación intracelular de DNM en las células L1210R. Algunas de las mezclas exhibieron un efecto citotóxico a la concentración analizada. Por ello, estas mezclas se ensayaron a una concentración inferior [0,05 mg/ml]. Como muestran las gráficas, la disminución de concentración indujo en algunos casos un incremento significativo de la actividad quimiosensibilizadora, indicando que la citotoxicidad de algunos componentes de las mezclas enmascaraba su actividad reversora.

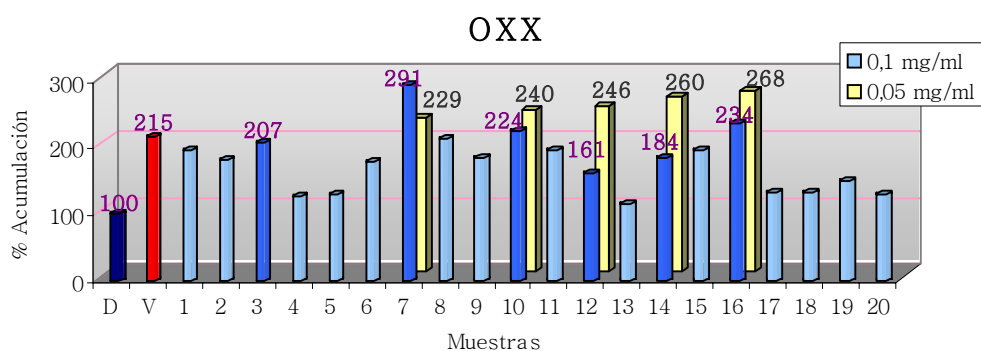


Grafico A: Cribado de la primera posición de la quimioteca de N-alkilglicinas.

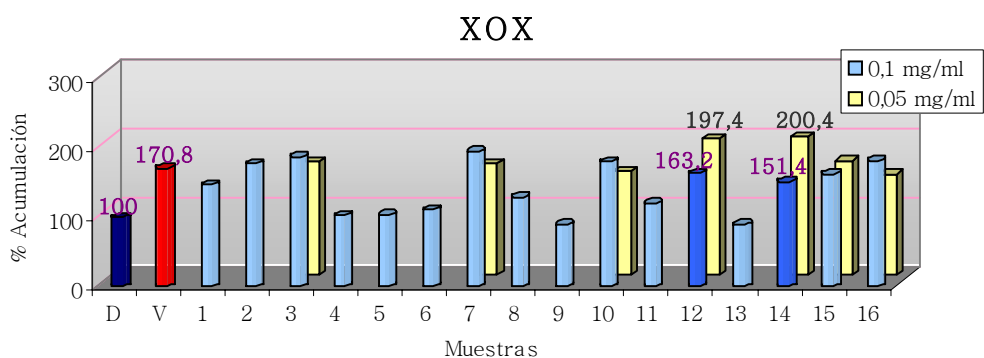


Grafico B: Cribado de la segunda posición de la quimioteca de N-alkilglicinas.

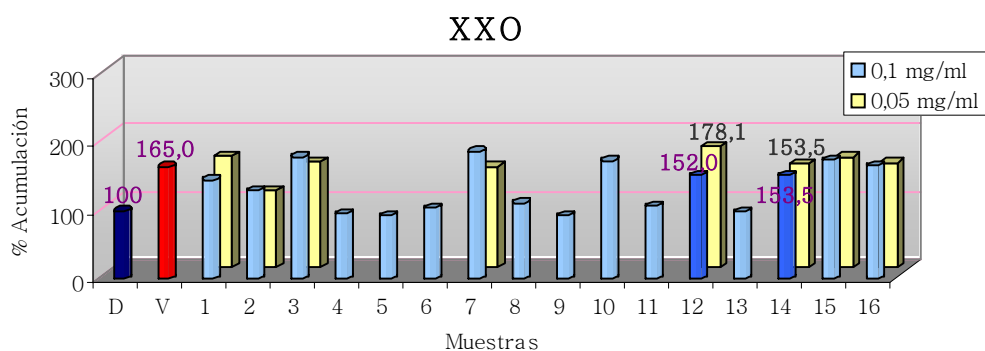


Grafico C: Cribado de la tercera posición de la quimioteca de N-alkilglicinas.

Figura 14: Cribado de las tres posiciones de la quimioteca de N-alkilglicinas en la línea celular L1210R, a una concentración de 0,1 mg/ml las barras azul claro y a 0,05 mg/ml las barras amarillas. Las barras rojas representan el control preincubado con VRP 5 μ M, la azul oscuro representa la captación de las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M.

A partir de los resultados mostrados en la [figura 14](#) se escogieron los siguientes grupos funcionales:

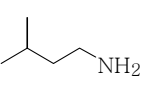
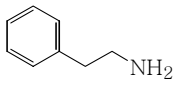
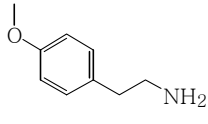
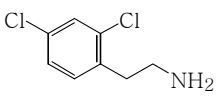
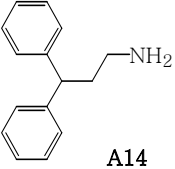
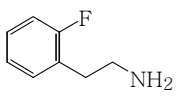
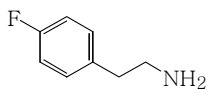
Primera posición. OXX, destacan las aminas 3, 7, 10, 15 y 16.

Segunda posición. XOX, destacan las aminas 12 y 14.

Tercera posición. XXO, destacan las aminas 12 y 14.

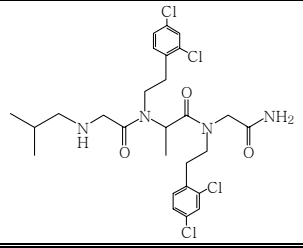
La estructura de aminas correspondientes a estos números seleccionados para cada una de las tres posiciones se muestra en la [tabla 6](#).

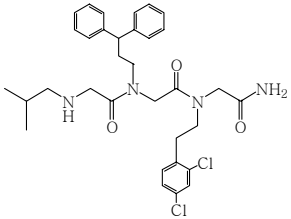
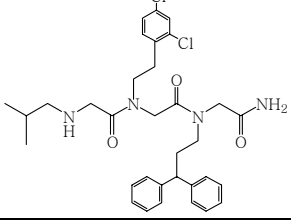
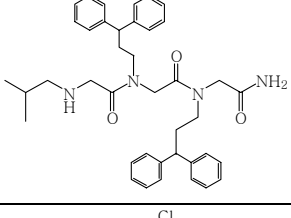
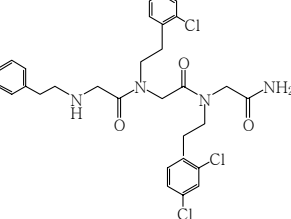
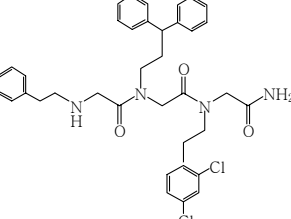
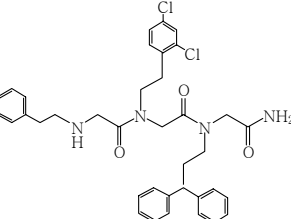
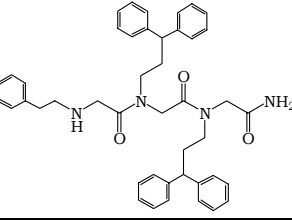
Tabla 6: Aminas seleccionadas para la síntesis de compuestos definidos de la quimioteca de N-alquilglicinas.

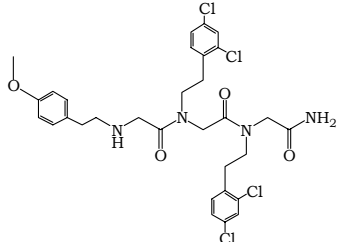
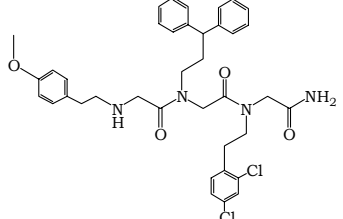
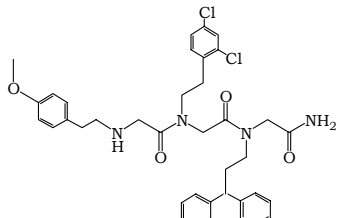
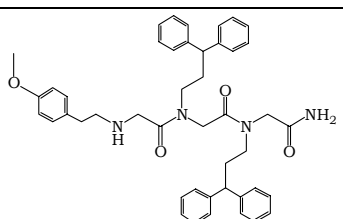
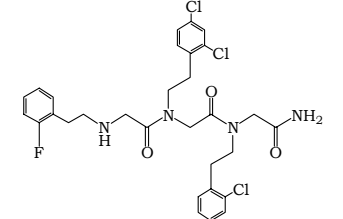
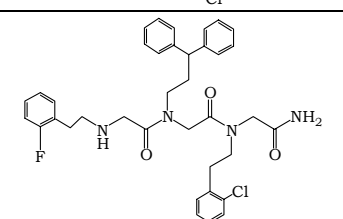
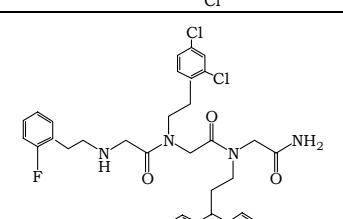
 A3	 A7	 A10	 A12
 A14	 A15	 A16	

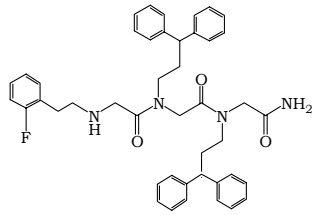
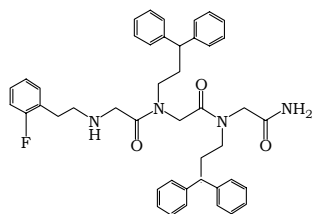
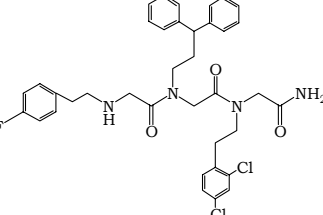
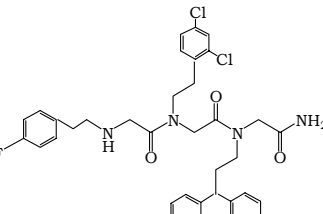
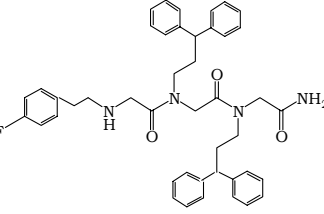
De todas las posibles combinaciones de estas aminas seleccionadas (5x2x2) se sintetizaron 20 compuestos definidos, indicados en la [tabla 7](#).

Tabla 7: Definidos que constituyen la deconvolución de la quimioteca de N-alquilglicinas.

1	$C_{28}H_{40}Cl_4N_4O_3$ Exact Mass: 620.19 Mol.Wt.: 622.45	
<p>[N-(3-Metilbutil)glicil]-[N-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicil]-N-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-3-12-12-C</i></p>		

<p>2</p> <p>[<i>N</i>-(3-Metilbutil)glicil]-[<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-3-14-12-C</i></p>	<p>C₃₆H₅₂Cl₂N₄O₃ Exact Mass: 658.34 Mol.Wt.: 659.73</p>	
<p>3</p> <p>[<i>N</i>-(3-Metilbutil)glicil]-[<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicil]-[<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicilnamida</p> <p><i>N-3-12-14-C</i></p>	<p>C₃₆H₅₂Cl₂N₄O₃ Exact Mass: 658.34 Mol.Wt.: 659.73</p>	
<p>4</p> <p>[<i>N</i>-(3-Metilbutil)glicil]-[<i>N</i>-(3,3-difenilpropil)glicil]-<i>N</i>-(3,3-difenilpropil)glicinamida</p> <p><i>N-3-14-14-C</i></p>	<p>C₄₄H₆₄N₄O₃ Exact Mass: 696.50 Mol.Wt.: 697.00</p>	
<p>5</p> <p>[<i>N</i>-(2-Feniletil)glicil]-[<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-7-12-12-C</i></p>	<p>C₃₃H₄₄Cl₄N₄O₃ Exact Mass: 684.22 Mol.Wt.: 686.54</p>	
<p>6</p> <p>[<i>N</i>-(2-Feniletil)glicil]-[<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-7-14-12-C</i></p>	<p>C₄₁H₅₆Cl₂N₄O₃ Exact Mass: 722.37 Mol.Wt.: 723.81</p>	
<p>7</p> <p>[<i>N</i>-(2-Feniletil)glicil]-[<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicil]-[<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicilnamida</p> <p><i>N-7-12-14-C</i></p>	<p>C₄₁H₅₆Cl₂N₄O₃ Exact Mass: 722.37 Mol.Wt.: 723.81</p>	
<p>8</p> <p>[<i>N</i>-(2-Feniletil)glicil]-[<i>N</i>-(3,3-difenilpropil)glicil]-<i>N</i>-(3,3-difenilpropil)glicinamida</p> <p><i>N-7-14-14-C</i></p>	<p>C₄₉H₆₈N₄O₃ Exact Mass: 760.53 Mol.Wt.: 761.09</p>	

<p>9</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Metoxifenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-10-12-12-C</i></p>	<p>C₃₄H₄₆Cl₄N₄O₄ Exact Mass: 714.23 Mol.Wt.: 716.56</p>	
<p>10</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Metoxifenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-10-14-12-C</i></p>	<p>C₄₂H₅₈Cl₂N₄O₄ Exact Mass: 752.38 Mol.Wt.: 753.84</p>	
<p>11</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Metoxifenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicil]-[<i>N</i>-[3,3- difenilpropil]glicilnamida</p> <p><i>N-10-12-14-C</i></p>	<p>C₄₂H₅₈Cl₂N₄O₄ Exact Mass: 752.38 Mol.Wt.: 753.84</p>	
<p>12</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Metoxifenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicil]-<i>N</i>- (3,3-difenilpropil)glicinamida</p> <p><i>N-10-14-14-C</i></p>	<p>C₅₀H₇₀N₄O₄ Exact Mass: 790.54 Mol.Wt.: 791.12</p>	
<p>13</p> <p>[<i>N</i>-[2-(2'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-15-12-12-C</i></p>	<p>C₃₄H₄₇Cl₄FN₄O₃ Exact Mass: 718.24 Mol.Wt.: 720.57</p>	
<p>14</p> <p>[<i>N</i>-[2-(2'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-15-14-12-C</i></p>	<p>C₄₂H₅₉Cl₂FN₄O₃ Exact Mass: 756.39 Mol.Wt.: 757.85</p>	
<p>15</p> <p>[<i>N</i>-[2-(2'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicil]-[<i>N</i>-[3,3- difenilpropil]glicilnamida</p> <p><i>N-15-12-14-C</i></p>	<p>C₄₂H₅₉Cl₂FN₄O₃ Exact Mass: 756.39 Mol.Wt.: 757.85</p>	

<p>16</p> <p>[<i>N</i>-[2-(2'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-(3,3-difenilpropil)glicil]-<i>N</i>- (3,3-difenilpropil)glicinamida</p> <p><i>N-15-14-14-C</i></p>	<p>C₅₀H₇₁FN₄O₃ Exact Mass: 794.55 Mol.Wt.: 795.12</p>	
<p>17</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-16-12-12-C</i></p>	<p>C₃₄H₄₇Cl₄FN₄O₃ Exact Mass: 718.24 Mol.Wt.: 720.57</p>	
<p>18</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[3,3-difenilpropil]glicil]-<i>N</i>-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida</p> <p><i>N-16-14-12-C</i></p>	<p>C₄₂H₅₉Cl₂FN₄O₃ Exact Mass: 756.39 Mol.Wt.: 757.85</p>	
<p>19</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-[2-(2',4'- diclorofenil)etil]glicil]-[<i>N</i>-[3,3- difenilpropil]glicinamida</p> <p><i>N-16-12-14-C</i></p>	<p>C₄₂H₅₉Cl₂FN₄O₃ Exact Mass: 756.39 Mol.Wt.: 757.85</p>	
<p>20</p> <p>[<i>N</i>-[2-(4'-Fluorofenil)etil]glicil]- [<i>N</i>-(3,3-difenilpropil)glicil]-<i>N</i>- (3,3-difenilpropil)glicinamida</p> <p><i>N-16-14-14-C</i></p>	<p>C₅₀H₇₁FN₄O₃ Exact Mass: 794.55 Mol.Wt.: 795.12</p>	

2.3. Caracterización. Actividad Funcional de los Compuestos.

2.3.1. Las Trialquilglicinas Quimiosensibilizan a las células L1210R.

Los 20 peptoides definidos de la quimioteca de peptoides se ensayaron a una concentración de 5 μ M utilizando el mismo ensayo de citometría de flujo,

con el fin de determinar su actividad quimiosensibilizadora sobre la línea celular L1210R.

La figura 15 muestra que los peptoides 13, 14, 15, 16, 17 y 19 aumentaron la acumulación intracelular de DNM en $\geq 250\%$ una magnitud similar a la mostrada por el VRP a la misma concentración, sugiriendo que estos compuestos poseen actividad quimiosensibilizadora, presumiblemente debida a la inhibición de la actividad extrusora de P-gp. Para investigar si P-gp es la diana molecular de estas trialkilglicinas, se determinó su efecto reversor en la línea celular L1210^{P-gp}. Esta línea celular fue derivada de la línea celular L1210 parental mediante la transfección estable de P-gp murina.

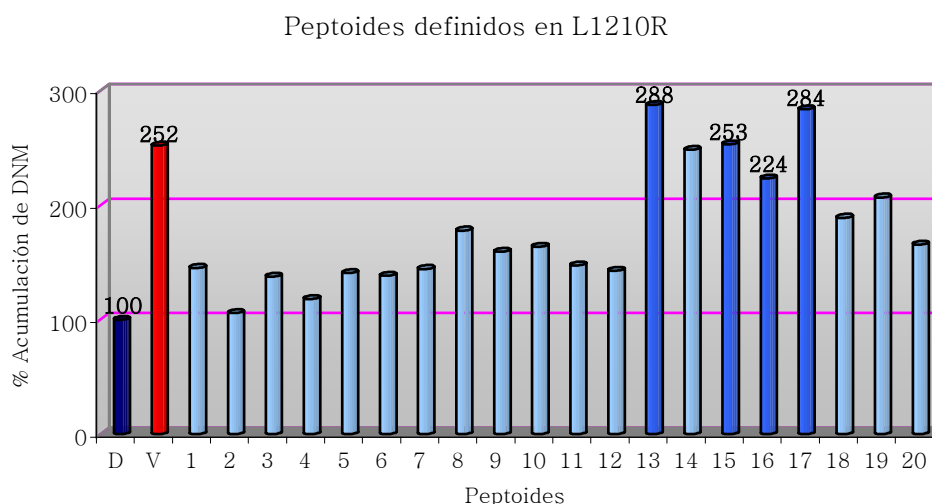


Figura 15: Cribado por citometría de flujo de los 20 peptoides definidos a una concentración de 5 μM en la línea celular L1210R.

Las células L1210^{P-gp} exhiben una acumulación intracelular de DNM disminuida, similar a la mostrada por las células L1210R, pero a diferencia de éstas, carecen del fenotipo pleiotrópico asociado a la MDR (Castro-Galache, M.D. et al., 2003). Estas células son, además, sensibilizadas por el VRP que aumenta la acumulación citosólica de DNM. Por tanto, la menor acumulación de fármaco es debida al eflujo del mismo por P-gp transfectada.

Consecuentemente, la línea L1210^{P-gp} constituye un modelo celular para determinar si la actividad quimiosensibilizadora de las trialquilglicinas está mediada por la inhibición de P-gp.

La incubación de las células L1210^{P-gp} con 5 μ M de peptoides produjo un aumento significativo de la concentración intracelular de DNM (ver [figura 16](#)). Al igual que en las células L1210R, los peptoides 13, 15, 16, 17 y 19 mostraron una potencia similar a la exhibida por el VRP. Obsérvese, además, que la mayoría de los compuestos exhibieron una actividad quimiosensibilizadora.

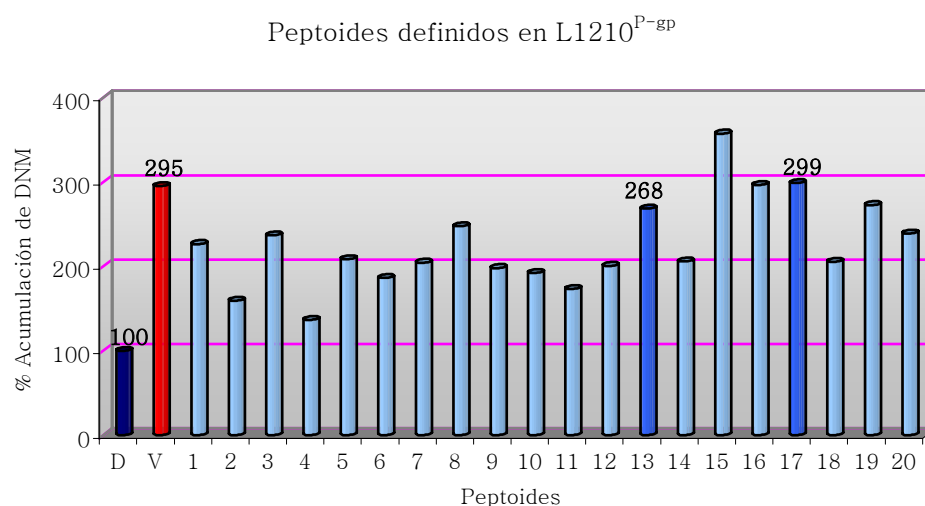


Figura 16: Cribado por citometría de flujo de los 20 peptoides definidos a una concentración de 5 μ M en la línea celular L1210^{P-gp}.

Estos resultados sugieren que la actividad reversora de las trialquilglicinas identificadas está mayoritariamente mediada por la inhibición de P-gp.

2.3.2. Los Peptoides disminuyen el Grado de Resistencia Tumoral de las células L1210R.

La baja toxicidad de los fármacos antineoplásicos en las células tumorales es una característica fundamental del fenotipo MDR. La resistencia de estas células se evalúa mediante ensayos de inhibición de la proliferación celular y la disminución de la viabilidad celular.

Para determinar el índice de resistencia de cualquier población de células tumorales, comparamos la eficacia citotóxica o citostática de un fármaco en la línea resistente con la característica de la línea sensible. Se determinó la concentración de DNM necesaria para inhibir el 50% de la proliferación de un cultivo celular (IC_{50}). Los valores de IC_{50} se determinaron a partir de curvas dosis-respuesta. Para ello, se utilizó el método de reducción de MTT, que mide la viabilidad mitocondrial (Mosmann, T., 1983). Una deshidrogenasa mitocondrial convierte el reactivo de MTT soluble en una sal de formazán de color azul e insoluble en medio acuoso, pero valorable en un espectrofotómetro tras haber sido disuelto en Isopropanol ácido (0,1 N HCl). La absorbancia medida es proporcional al número de células viables de la muestra.

Para comprobar que los peptoides aislados actúan como reversores del fenotipo MDR, los siguientes ensayos evaluaron la potencia de los compuestos incrementando la citotoxicidad del antineoplásico DNM. Con este fin, se obtuvieron las curvas de proliferación celular de células L1210S y L1210R a concentraciones crecientes de DNM. El ajuste de los datos a una función isoterma de Michaelis-Menten permitió calcular la IC_{50} para DNM. En la [figura 17](#) se observa que las células L1210 mostraron una sensibilidad a la antraciclina muy superior a la exhibida por las células L1210R. La sensibilidad diferencial se mostró en los valores de IC_{50} , siendo de $0,09 \pm 0,05 \mu\text{M}$ para las células L1210 parentales y de $14 \pm 2 \mu\text{M}$ para las células L1210R. El cociente entre estos dos valores es un indicador del grado de resistencia adquirido. De este modo, para las células L1210 utilizadas en este estudio, el grado de

resistencia (GR) fue de 149,6 (ver [tabla 8](#)). La evaluación de la actividad quimiosensibilizadora, por tanto, se puede evaluar determinando los efectos sobre el grado de resistencia. Así, por ejemplo, se observa que las células L1210R en presencia de 5 μM de VRP presentan una IC_{50} para la DNM de $3,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ que se traduce en un GR de 36,5, es decir, en una reducción de 4 veces del GR. Nótese que el grado de resistencia de las células parentales L1210 no fue alterado por el VRP.

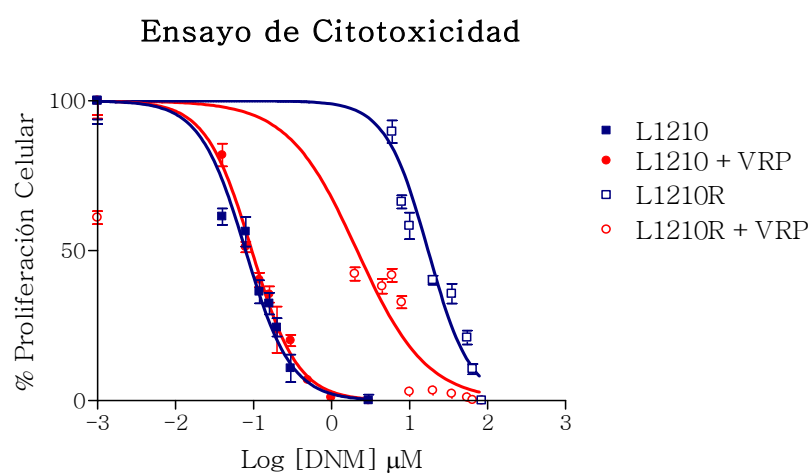


Figura 17: Curvas obtenidas del ensayo de reducción de MTT en células L1210 parentales y resistentes tanto tratadas como sin tratar con VRP 5 μM .

Este ensayo se utilizó para caracterizar la actividad reversora de los peptoides más potentes en el ensayo de acumulación, es decir, las moléculas 13, 15, 16 y 17. Los resultados obtenidos se resumen en la [tabla 8](#). Los compuestos nº 15 y nº 16 no aumentaron la sensibilidad de las células L1210R a la DNM. Sin embargo, los compuestos nº 13 y nº 17 redujeron notablemente la IC_{50} de DNM en células L1210R, ($\cong 3$ veces). Estos trímeros de N-alkilglicinas producen una disminución del GR similar a la producida por VRP. Por consiguiente, estos compuestos son reversores eficaces del fenotipo MDR mediado por la sobreexpresión de P-gp.

Tabla 8: Valor de IC₅₀ para DNM obtenidos en células L1210 parentales y resistentes tanto tratadas con VRP y los peptoides como sin tratar.

<i>Línea Celular</i>	IC ₅₀ (μM de DNM)± SEM	GR.*
L1210	0,09 ± 0,05	1
L1210R	14 ± 2	≈ 149,57
L1210 + VRP	0,09 ± 0,02	1
L1210R + VRP	3,4 ± 0,1	≈ 36,5
L1210R + Peptoide #13	4,5 ± 0,7	≈ 47,8
L1210R + Peptoide #15	14 ± 2	≈ 149,1
L1210R + Peptoide #16	13 ± 2	≈ 128,62
L1210R + Peptoide #17	4,8 ± 0,5	≈ 50,7

*GR: Grado de Resistencia = IC₅₀ resistente/IC₅₀ sensible.

2.3.3. Las Trialquilglicinas Quimiosensibilizan a las células HL-60R.

Además de la P-gp, otras bombas de eflujo contribuyen notablemente a la manifestación del fenotipo resistente. Entre éstas se encuentra la proteína MRP1, relacionada estructuralmente con la P-gp. Con el fin de determinar si los compuestos aislados modulan también la actividad de la MRP1, se evaluó su potencia quimiosensibilizadora en la línea tumoral HL-60R que fundamentalmente expresa esta bomba de eflujo. La actividad reversora a concentración 5 μM de peptoides se muestra en la [figura 18](#). Los resultados indican que la mayoría de los compuestos presentan un perfil quimiosensibilizador similar al VRP. Sorprendentemente, y a diferencia del resultado obtenido en las células L1210R, la práctica totalidad de los 20 compuestos mostraron una buena acción reversora. Estos resultados indican que los trímeros de N-alquilglicinas aislados son quimiosensibilizadores eficaces que actúan sobre la P-gp y la MRP1.

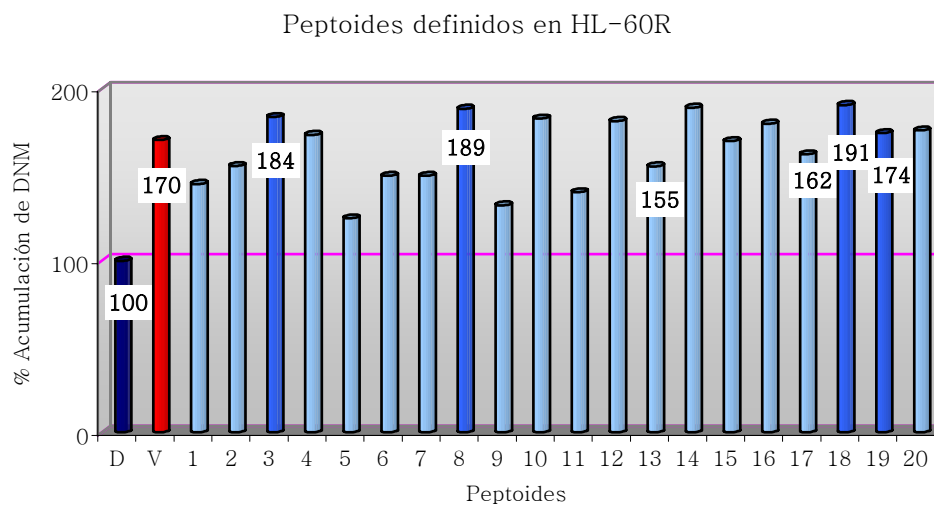


Figura 18: Cribado por citometría de flujo de los 20 peptoides definidos a 5 μ M en la línea celular HL-60R. La barra azul marino hace referencia a las células HL-60R tratadas únicamente con DNM 3 μ M, las barras azules se refieren a las células HL-60R preincubadas con los peptoides y en azul más oscuro señalamos los peptoides que tuvieron valores de reversión mas relevantes. Como control de referencia para la reversión se representan las células preincubadas con VRP 5 μ M y que vienen representadas en el gráfico con una barra.

2.3.4. Los Peptoides disminuyen el Grado de Resistencia Tumoral de las células HL-60R.

Al igual que con las células L1210R, se evaluó el efecto de los peptoides sobre el grado de resistencia de las células HL-60R. Como se muestra en la [figura 19](#) las curvas de citotoxicidad revelan una IC_{50} de $7 \pm 1 \mu$ M para las células HL-60R, un valor notablemente superior al mostrado por células HL-60 sensibles ($IC_{50} 0,29 \pm 0,03 \mu$ M). El grado de resistencia, por tanto, fue de $\approx 24,39$. Este valor se redujo aproximadamente tres veces por la presencia de 5 μ M VRP en el medio extracelular ($IC_{50} \approx 2,7 \pm 0,2 \mu$ M).

Ensayo de Citotoxicidad

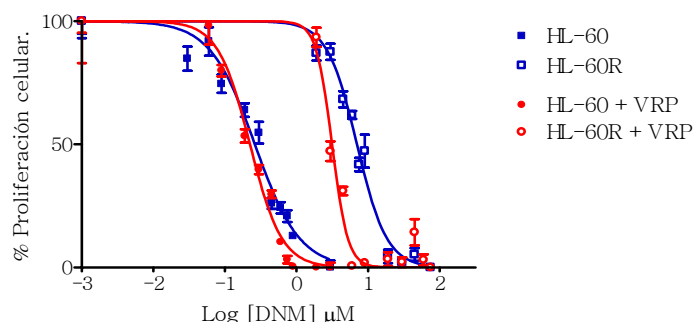


Figura 19: Curvas obtenidas del ensayo de reducción de MTT en células HL-60 parentales y resistentes tanto tratadas con 5 μM VRP como sin tratar.

Como se muestra en la [figura 20](#) los peptoides n^o 13 y n^o 17 que sensibilizaron a las células L1210R, también incrementaron la sensibilidad de las células HL-60R frente a la DNM. Así el valor de IC_{50} para el peptoide n^o 13 fue de $2,1 \pm 0,21 \mu\text{M}$ y para el peptoide n^o 17 de $2,5 \pm 0,25 \mu\text{M}$ lo que representa una disminución del grado de resistencia de 3,2 y 2,6 veces respectivamente. No obstante, dado que la mayoría de los peptoides aumentan la concentración intracelular de DNM en las células HL-60R, se evaluó la actividad quimiosensibilizadora de todos ellos mostrándose el resultado en la [tabla 9](#).

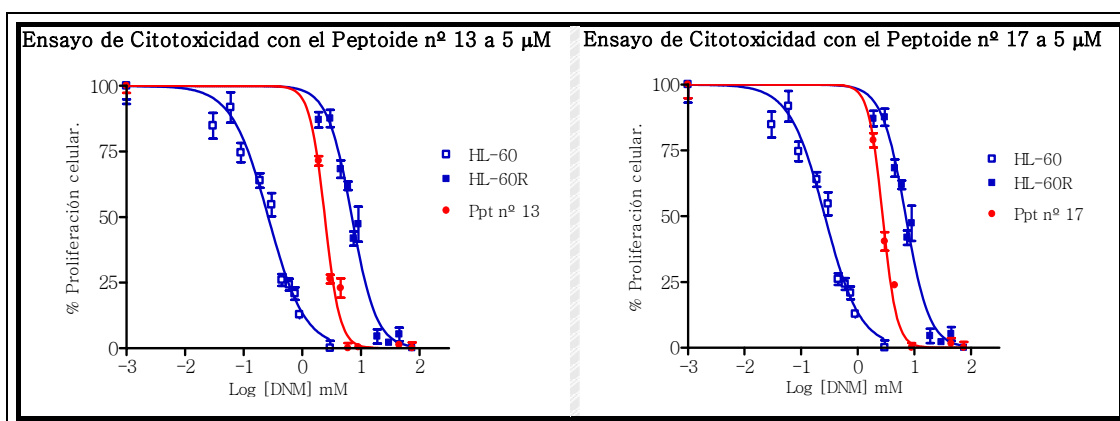


Figura 20: Curvas obtenidas del ensayo de reducción de MTT en células HL-60 parentales y resistentes sin tratar y resistentes tratadas con peptoide (izq. n^o 13, dch. n^o 17).

Tabla 9: Valores de IC₅₀ para DNM obtenidos en células HL-60 parentales y resistentes tanto tratadas con VRP y los Peptoides como sin tratar. Grado de resistencia obtenido.

<i>Línea Celular</i>	IC₅₀ (μM de DNM)± SEM	GR.*
HL-60	0,29 ± 0,03	1
HL-60R	7,0 ± 0,7	≈ 24,4
HL-60 + VRP	0,28 ± 0,06	1
HL-60R + VRP	2,7 ± 0,2	≈ 9,9
HL-60R + Peptoide #1	2,6 ± 0,27	9,2
HL-60R + Peptoide #2	2,6 ± 0,28	9,3
HL-60R + Peptoide #3	2,4 ± 0,22	8,8
HL-60R + Peptoide #4	2,2 ± 0,2	7,9
HL-60R + Peptoide #5	2,4 ± 0,2	8,8
HL-60R + Peptoide #6	3,0 ± 0,27	10,8
HL-60R + Peptoide #7	2,8 ± 0,3	10,2
HL-60R + Peptoide #8	2,6 ± 0,26	9,4
HL-60R + Peptoide #9	2,9 ± 0,3	10,3
HL-60R + Peptoide #10	2,3 ± 0,2	8,3
HL-60R + Peptoide #11	2,5 ± 0,23	9,2
HL-60R + Peptoide #12	2,5 ± 0,24	9,1
HL-60R + Peptoide #13	2,1 ± 0,19	7,4
HL-60R + Peptoide #14	2,7 ± 0,27	9,8
HL-60R + Peptoide #15	3,0 ± 0,29	11,0
HL-60R + Peptoide #16	3,2 ± 0,3	11,4
HL-60R + Peptoide #17	2,5 ± 0,22	9,1
HL-60R + Peptoide #18	2,3 ± 0,2	8,4
HL-60R + Peptoide #19	2,4 ± 0,22	8,6
HL-60R + Peptoide #20	2,1 ± 0,17	7,8

*GR: Grado de Resistencia = IC₅₀ resistente/IC₅₀ sensible.

Estos resultados demuestran que los peptoides aislados tienen fuerte actividad quimiosensibilizadora en las células HL-60R, presuntamente modulando la actividad de la bomba MRP1.

3. Quimioteca de 2,5-Piperacindionas (DKPs).

Las quimiotecas de 2,5-Piperacindionas, denominadas también de manera abreviada con las siglas DKPs, son compuestos estables a la proteólisis y son también particularmente atractivas para el acercamiento a la química combinatoria debido a la presencia de hasta cuatro puntos para introducir la diversidad, al poder hacerse tanto en los grupos NH como en los CH. Nuestra quimioteca como indica su nombre introduce la diversidad en los grupos NH.

La secuencia planteada para la síntesis de la quimioteca de DKPs es muy similar a la descrita anteriormente en el apartado de peptoides (ambas se encuentran caracterizadas con detalle en la tesis doctoral de la Dra. Isabel Masip), pero en esta segunda quimioteca se introdujeron únicamente dos fuentes de diversidad en lugar de tres. La síntesis de la quimioteca de DKPs genera moléculas únicas. Durante la formación de esta quimioteca se produce una ciclación a causa del ataque nucleofílico de una amina terciaria en una de las cadenas laterales del trímero, sobre el derivado de cloro correspondiente después de las etapas de acilación (ver [figura 21](#)).

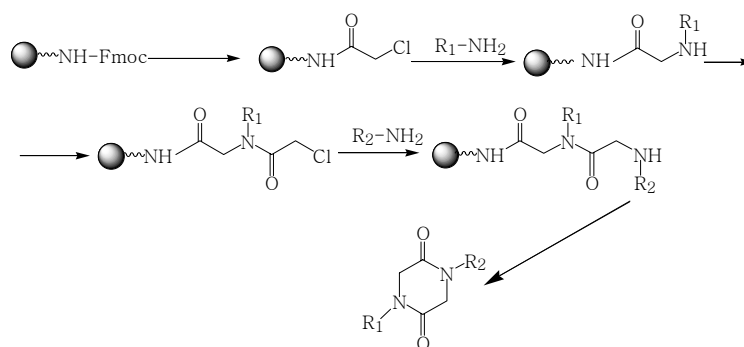


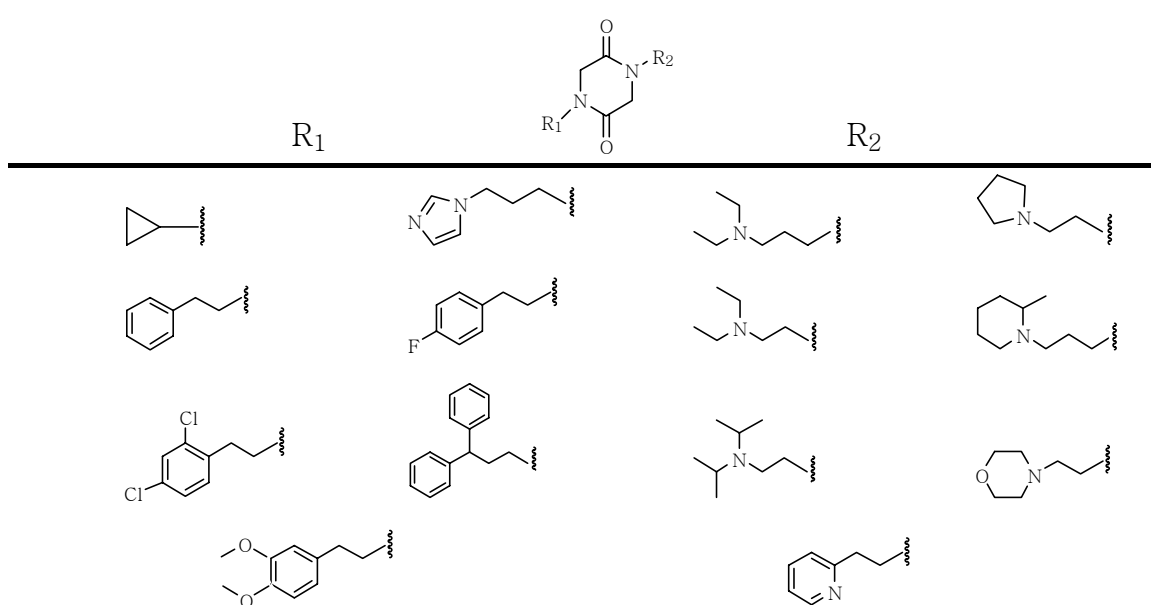
Figura 21: Síntesis en fase sólida de la quimioteca de DKP.

Inicialmente la quimioteca de DKP fue sintetizada con las 12 aminas primarias que se muestran en la [tabla 10](#), estas aminas fueron seleccionadas por su carácter hidrofóbico y su capacidad para la donación del enlace de hidrógeno.

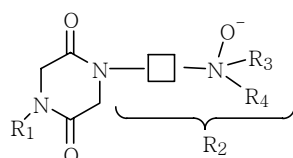
Tabla 10: Diversidad de aminas primarias empleadas en la generación de la quimioteca de DKP.

Posteriormente se pensó que podría ser diseñada una segunda quimioteca siguiendo la estrategia de esta primera de DKP. La segunda era una quimioteca mejorada que contenía residuos hidrofóbicos N-sustituídos y con los grupos amino terciarios adicionales como segunda fuente de diversidad. Por consiguiente, esta segunda quimioteca fue sintetizada utilizando las aminas primarias que se muestran en la [tabla 11](#). A esta segunda quimioteca se le dio el nombre de DKP-II y a la originaria se la denominó DKP-I.

Tabla 11: Diversidad de aminas primarias utilizadas en la generación de la quimioteca hija de DKP.



Además, a esta segunda quimioteca de DKP-II, se le introdujo una carga negativa generando otra quimioteca de N-óxidos de 2,5-Piperacindionas, que se denominó N-óxidos. Su esqueleto básico se muestra a continuación.



3.1. Cribado de las Quimiotecas de DKPs.

Como hemos mencionado anteriormente, la quimioteca de DKPs consta de dos quimiotecas de compuestos individuales: de 2,5-dicetopiperacinas (DKP), compuesta por 113 moléculas individuales nombrando de la 1 a la 64 a las DKP-I, y de la 1 a la 49 a las DKP-II. Además, se introdujo una carga negativa generando una quimioteca de N-óxidos de amina, derivada de la anterior (DKP-II), constituida también por 49 compuestos. Esta quimioteca se cribó en la línea celular L1210R y los resultados del cribado de estos compuestos se muestran a continuación en la tabla 12.

Datos control de la Acumulación.

Línea celular L1210R	% Acumulación
DNM	100
DNM + VRP	267,04

Tabla 12: Valores en porcentaje de la acumulación intracelular de la DNM tras haber preincubado las células con los compuestos que conforman la quimioteca de los DKPs.

Compuestos	DKP-I a 20 μ M	DKP-II a 25 μ M	N-óxidos a 50 μ M
	% Acumulación	% Acumulación	% Acumulación
#1	103,9	164,2	100,8
#2	113,2	136,1	107,7
#3	108,9	112,0	101,9
#4	99,6	74,3	101,8
#5	121,5	79,9	114,6
#6	111,1	121,9	68,9
#7	107,6	121,9	93,9
#8	121,6	94,8	102,1
#9	115,0	91,1	92,0
#10	104,5	88,6	100,2
#11	119,6	95,3	95,0
#12	120,6	79,6	103,3
#13	121,2	125,6	97,0
#14	108,6	97,5	103,3
#15	111,5	105,6	90,7
#16	109,8	176,4	103,3
#17	113,5	153,6	107,2
#18	105,2	98,0	87,8
#19	112,7	107,8	88,3
#20	118,2	163,4	103,4
#21	101,4	178,1	106,9
#22	113,2	119,8	109,4
#23	113,5	176,9	136,4
#24	116,7	113,4	103,1
#25	109,2	105,0	100,3
#26	107,8	103,8	111,6

#27	118,2	107,0	104,4
#28	114,8	101,0	94,0
#29	122,9	119,3	88,1
#30	111,8	100,2	89,3
#31	110,7	117,7	88,7
#32	102,3	107,6	76,5
#33	111,5	116,5	95,6
#34	108,2	149,1	85,6
#35	104,3	103,6	81,5
#36	100,1	115,0	79,6
#37	103,7	89,3	101,2
#38	100,1	92,7	94,4
#39	106,2	105,7	77,7
#40	101,0	71,9	92,5
#41	97,4	94,4	79,0
#42	119,8	99,5	73,7
#43	118,6	86,6	73,0
#44	155,0	103,5	78,1
#45	111,8	97,4	102,2
#46	102,1	96,4	103,2
#47	101,9	99,8	113,0
#48	101,6	105,3	110,6
#49	109,6	102,6	97,0
#50	138,6		
#51	109,6		
#52	115,1		
#53	127,2		
#54	120,9		
#55	143,0		
#56	131,0		
#57	143,2		
#58	125,8		
#59	144,6		
#60	118,1		
#61	120,2		
#62	113,6		
#63	110,4		
#64	110,7		

Las moléculas nº 44, 50, 55, 57 y 59 de la quimioteca de DKP-I presentan un modesto 40-45% de actividad quimiosensibilizadora, mientras que para las DKP-II con una carga positiva, los compuestos activos fueron las moléculas nº 1, 16, 20, 21 y 23. Obsérvese que los compuestos DKP-II mostraron una mayor acumulación que los DKP-I. Por otro lado, la eliminación de la carga positiva de las DKPs elimina completamente su eficacia, aumentando la acumulación intracelular de DNM, como demuestra la ausencia de compuestos activos en la quimioteca de N-óxidos.

Las moléculas nº 1, 16, 20, 21 y 23 de la quimioteca de DKP-II, presentan un 65-75% de actividad quimiosensibilizadora, con ellas se hicieron ensayos de viabilidad utilizando método de azul de tripán, a dos concentraciones, 25 y 100 μM en la línea celular de leucemia linfocítica murina, tanto en la línea parental L1210, como en la sublínea resistente L1210R. Se encontró en ambas sublíneas una viabilidad elevada, lo que significa que las moléculas no son tóxicas. La DKP-II nº 23 (ver [figura 22](#)), que fue la más activa de la quimioteca de DKP-II y, además, mostró ligera actividad reversora en la quimioteca de N-óxidos, se escogió para una caracterización adicional y para determinar las propiedades inhibitorias de P-gp. Se ensayaron tres tiempos de incubación (10, 60 y 120 min) y dos concentraciones (1 y 10 μM) para determinar su perfil quimiosensibilizador. Sorprendentemente, no se encontró quimiosensibilización a bajas concentraciones.

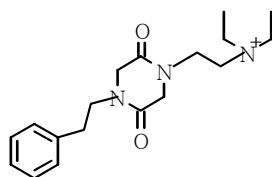


Figura 22: Esqueleto de la molécula nº 23 de la quimioteca de DKP-II.

Dado que las concentraciones bajas eran insuficientes para obtener algún resultado, se planteó la utilización de concentraciones más elevadas (50 y 100 μM). Además, se utilizaron dos tiempos de preincubación con la molécula, (60 y 120 minutos). A una concentración de 50 μM y con un aumento del tiempo de incubación a 120 minutos se observó un incremento de un 27% en la acumulación intracelular de DNM, que fue similar al valor obtenido a 100 μM a los 60 min. Estas concentraciones tan elevadas que se requieren o su sustitución por un aumento en el tiempo de preincubación con la molécula, pueden ser debidos a una baja permeabilidad de la membrana a la molécula. Una difusión reducida es consistente con la baja reversión encontrada para esta molécula.

Una alternativa a la baja eficacia de la DKP-II nº 23 es que interactúe en un sitio diferente al VRP, probablemente en una región extracelular. Para explorar esta posibilidad, se realizó un experimento en el que se comparó la acumulación intracelular de DNM en células tratadas con 50 y 100 μM del compuesto nº 23, y células incubadas con estas concentraciones del compuesto y, posteriormente, expuestas a 5 μM VRP. La [figura 23](#), muestra que la posterior adición de VRP aumentó notablemente la acumulación producida por la DKP-II nº 23. El aumento fue similar al producido por el VRP solo, sugiriendo que la DKP-II actúa en un lugar diferente al del VRP. En cualquier caso, este resultado corrobora la baja eficacia del compuesto nº 23.

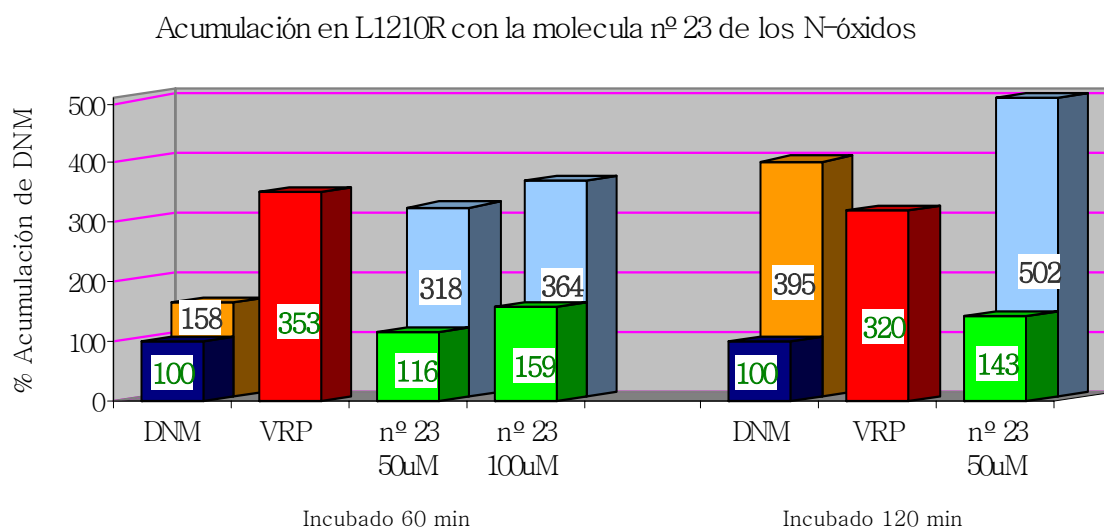


Figura 23: Acumulación intracelular en la línea celular resistente L1210. La barra roja representa el control preincubado con VRP 5 μM , la azul oscuro a la captación de las células incubadas únicamente con DNM 3 μM , las verdes son la molécula nº 23 de los N-ox preincubadas a 60 y 120 min, en azul claro se representan estas mismas muestras vueltas a incubarse 15 min más con VRP 5 μM y en naranja están representados los controles con DNM que también se incubaron con VRP.

Con el fin de comprobar la toxicidad de la molécula a lo largo del tiempo se realizó un ensayo de viabilidad utilizando el método de azul tripán, y se obtuvo un porcentaje de viabilidad aproximadamente del 98% como se muestra en la [figura 24](#).

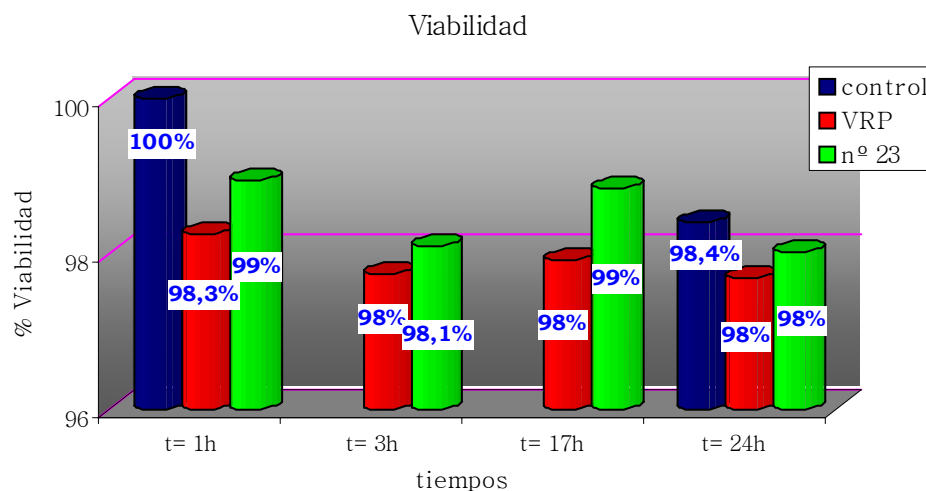


Figura 24: Viabilidad en la línea celular L1210R tras preincubar a distintos tiempos con la molécula n° 23 de los N-óxidos. En azul oscuro se representa el control, las células sin tratar, en rojo las células tratadas con VRP a 5 μM y en verde las células tratadas con la molécula n° 23 de la quimioteca de N-óxidos a 50 μM .

La molécula n° 23 de la quimioteca de DKP-II fue seleccionada para un ensayo de citotoxicidad, ya que, esta molécula fue la más significativa en cuanto a la actividad quimiosensibilizadora de la quimioteca de DKP-II. Para comparar la molécula n° 23 en ambas quimiotecas, DKP-II y N-óxidos, también se realizó este ensayo con la molécula de N-óxidos n° 23 (ver [tabla 12](#)).

3.2. Grado de Resistencia tras tratar con DKPs.

Al igual que se ha descrito en el apartado 2.3.2. relativo a los peptoides, se realizaron los ensayos de citotoxicidad con el fin de determinar el grado de resistencia de las células L1210R tras haber sido tratadas con las moléculas DKP-II n° 23 y N-óxidos n° 23.

A pesar de que la molécula n° 23 de ambas quimiotecas presentara actividad en el ensayo de captación de DNM, no modificó el grado de resistencia celular tal y como puede apreciarse en el ensayo de citotoxicidad (ver [figura 25](#)). Los valores analizados de este ensayo se muestran en la [tabla 13](#).

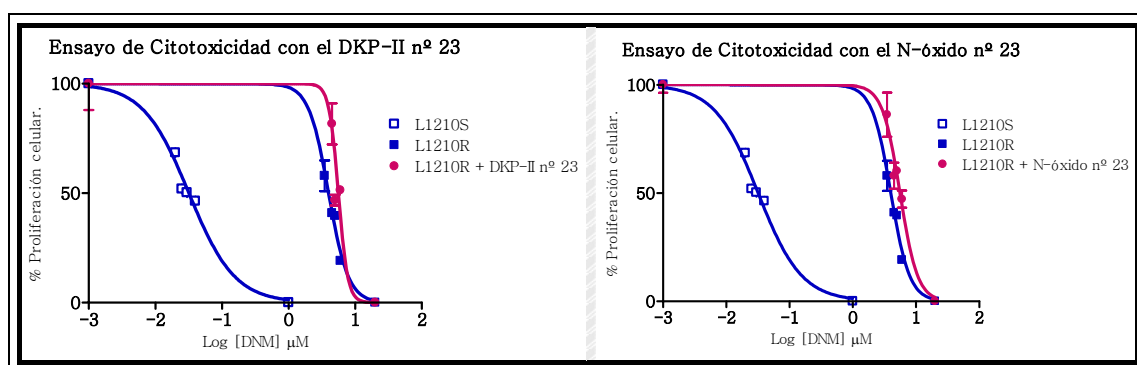


Figura 25: Ensayo de citotoxicidad con la molécula nº 23 de la quimioteca de DKP-II y de los N-óxidos

Tabla 13: Valores de IC_{50} para DNM obtenidos en células L1210 sensibles y resistentes tanto tratadas con VRP y el DKP nº 23 de los N-óxidos y los DKP-II como sin tratar. Grado de resistencia obtenido.

Línea celular	IC_{50}	Grado de Resistencia
L1210	$0,032 \pm 0,003$	162,5
L1210R	$5,2 \pm 0,014$	
L1210 + VRP	$0,025 \pm 0,037$	28,31
L1210R + VRP	$0,7077 \pm 0,07$	
L1210R + N-ox nº 23	$5,581 \pm 0,02$	174,4
L1210R + DKP-II nº 23	$5,607 \pm 0,03$	175,2

*GR: Grado de resistencia = IC_{50} resistente/ IC_{50} sensible

De la quimioteca de los DKPs se puede concluir que en el cribado de las quimiotecas de 2,5-Dicetopiperacinas se seleccionaron moléculas con una actividad reversora baja. El análisis posterior de proliferación celular con alguno de los compuestos seleccionados, reveló que fueron ineficaces al no modificar el Grado de Resistencia, cuestionando su actividad quimiosensibilizadora. No obstante, en esta quimioteca se han identificado esqueletos moleculares que aumentan la acumulación intracelular de antitumorales en células resistentes que, tras la oportuna modificación estructural, podrían derivar en quimiosensibilizadores más potentes. Los resultados obtenidos ofrecen buenas expectativas en la búsqueda de moléculas con actividad reversora del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. No obstante, de los resultados obtenidos se deduce que los compuestos no

resultaron de interés para nuestros objetivos por lo que no se continuó con su estudio.

4. Extractos Vegetales.

Una alternativa clásica a la química combinatoria sintética en la búsqueda de nuevos compuestos son los extractos vegetales. Los fitofármacos han sido utilizados tradicionalmente en farmacología química. De hecho la mayoría de los fármacos antitumorales son de origen vegetal. Para explorar esta estrategia, en la búsqueda de nuevos quimiosensibilizadores se inició una colaboración con la empresa de ASAC Pharmaceuticals para trabajar en el cribado de una quimioteca de productos naturales (fitofármacos), procedente de un extracto vegetal propiedad de la empresa. La empresa aportó los extractos, y se ocupó del fraccionamiento y subfraccionamiento de las fracciones activas. Dada la potencial patentabilidad del procedimiento, la empresa mantuvo la confidencialidad de la planta original y de los métodos de extracción. Por tanto, aquí nos referiremos a las fracciones etiquetadas por la empresa. El extracto CTP-ASAC se dividió en varias fracciones (A-F) aportadas por la empresa.

4.1. Cribado y Deconvolución.

Se cribaron las fracciones del extracto vegetal mediante el ensayo de citometría de flujo. Al igual que con las quimiotecas sintéticas, para este ensayo se utilizó la DNM como sustrato de P-gp y MRP, en células L1210R y HL-60R, respectivamente.

El extracto inicial y las fracciones se ensayaron a 1 mg/ml sobre células L1210R para determinar su potencia aumentando la acumulación intracelular de la antraciclina DNM. La [figura 26](#) muestra que el extracto CTP a 1 mg/ml incrementa modestamente la concentración intracelular de DNM. El fraccionamiento de este extracto rinde fracciones con una actividad reversora

similar a la del extracto original. Sin embargo, la fracción CTP-F aumentó la acumulación de DNM en una magnitud similar a la mostrada por el VRP, indicando la presencia de quimiosensibilizadores potenciales en esta fracción.

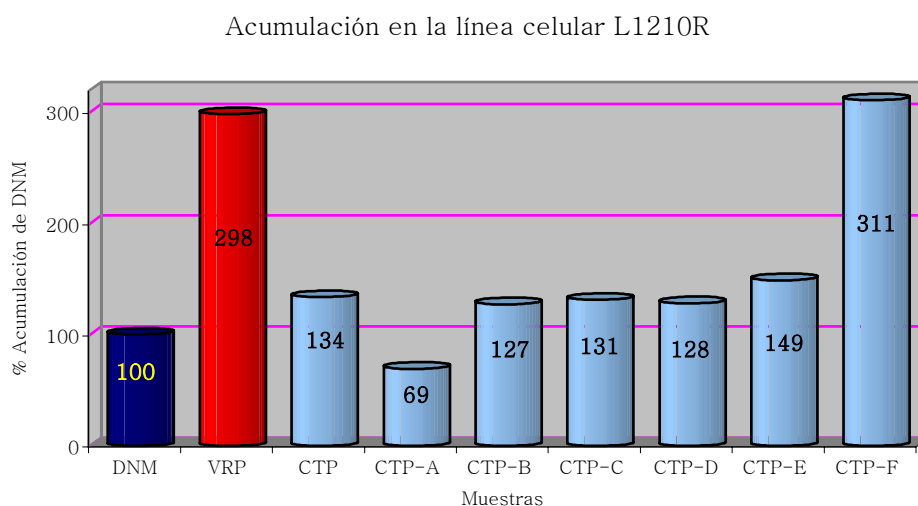


Figura 26: Cribado de la primera fracción del extracto vegetal. La barra en azul oscuro representa a las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M, la barra roja es el control de referencia, i.e. las células preincubadas con VRP 5 μ M, las barras azules claro representan las distintas fracciones del extracto a 1 mg/ml. De entre estas la que corresponde a la fracción CTP-F es la fracción seleccionada.

Este resultado se confirmó también en células HL-60R en las que el extracto CTP-F incrementó sustancialmente la concentración intracelular del citostático (figura 27 B). Cabe destacar que la acumulación de DNM en células HL-60R promovida por CTP-F es muy superior a la producida por VRP. Además, esta fracción no posee actividad citotóxica como sugiere la falta de efecto de las líneas parentales L1210 y HL-60 (ver figura 27).

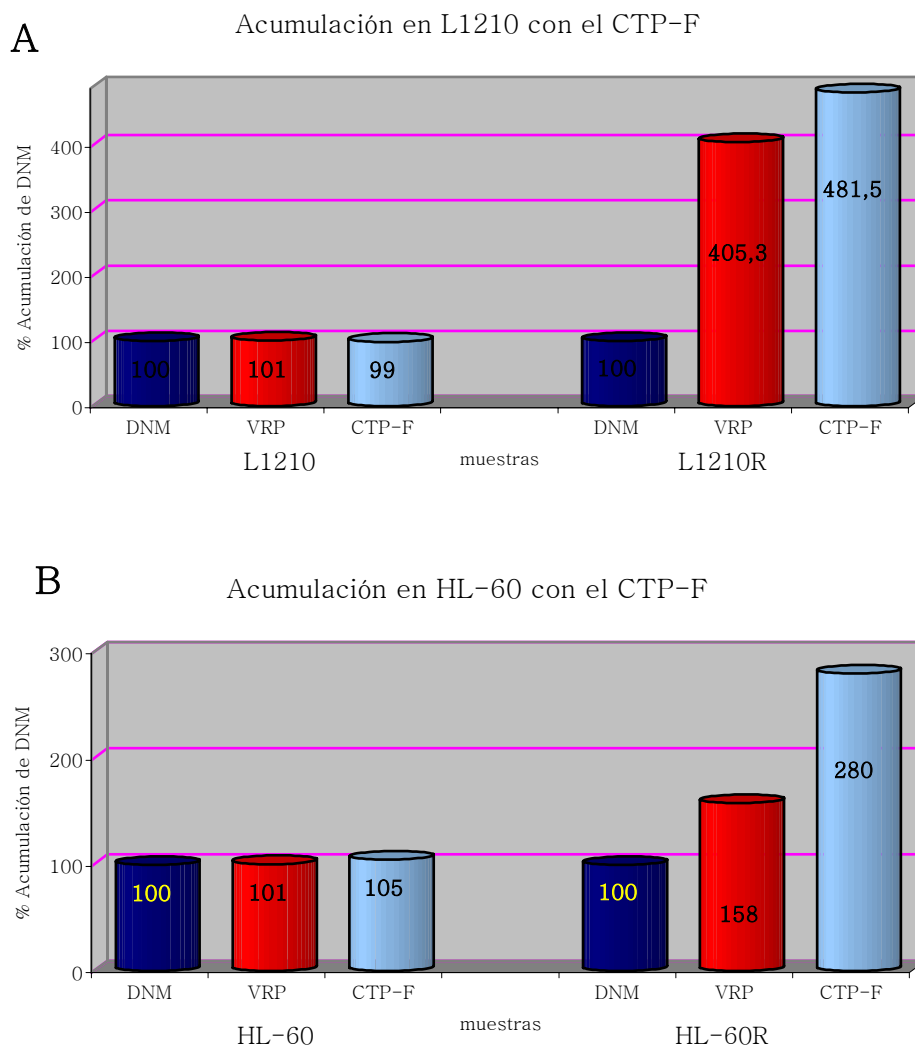


Figura 27: Cribado de la fracción CTP-F en las líneas celulares A) L1210 y B) HL-60. Las barras en azul oscuro representan a las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M, las barras rojas son el control de referencia, i.e. las células preincubadas con VRP 5 μ M, las barras azules claro representan la fracción CTP-F del extracto vegetal a 1 mg/ml.

La fracción CTP-F del extracto vegetal original fue seleccionada tras el análisis de los ensayos de cribado mediante citometría de flujo para el ensayo de citotoxicidad. Esta fracción es una mezcla de compuestos aún sin desglosar y sin identificar su principio activo, pero los resultados de este ensayo son fundamentales para dilucidar si algunos de los compuestos que componen la fracción CTP-F son también capaces de sensibilizar a las células frente a la DNM, o lo que es lo mismo si la fracción CTP-F contiene

componentes capaces de disminuir el grado de resistencia de la línea celular resistente L1210. Como se observa en la [figura 28](#), la curva de citotoxicidad a DNM de las células resistentes está desplazada hacia la derecha respecto a la curva de las células sensibles, lo que indica una elevada supervivencia de la línea resistente en presencia de altas concentraciones del fármaco DNM ($IC_{50} \approx 6,7 \pm 0,02 \mu M$). Cuando estas mismas células resistentes fueron incubadas además con la fracción CTP-F a una concentración de 0,5 mg/ml, se observó el desplazamiento de la curva hacia la izquierda, reflejado en una disminución del valor de IC_{50} a DNM de las células resistentes ($IC_{50} \approx 0,6 \pm 0,05 \mu M$). La disminución en el IC_{50} a DNM inducida por el CTP-F fue similar a la provocada por el VRP ($IC_{50} \approx 0,4 \pm 0,03 \mu M$). Por tanto, la fracción CTP-F contiene moléculas que aumentan la acumulación de DNM en células tumorales L1210R y sensibilizan a éstas frente a la citotoxicidad de la antraciclina. La fracción CTP-F se subfraccionó en cuatro fracciones adicionales, nombradas de CTP/F-1 a F4.

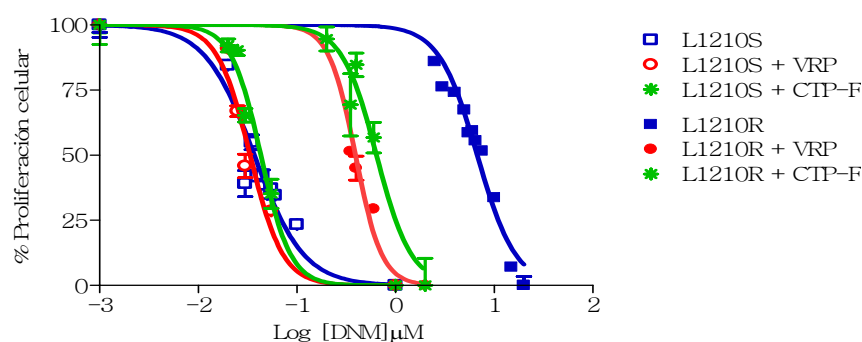


Figura 28: Citotoxicidad con la fracción CTP-F en la línea celular L1210.

Tabla 14: Valores de IC_{50} para DNM obtenidos en células L1210 parentales y resistentes tanto tratadas con VRP y CTP-F como sin tratar. Grado de resistencia obtenido.

Línea celular	IC_{50}	Grado de Resistencia
L1210	$0,0356 \pm 0,003$	189,35
L1210R	$6,74 \pm 0,02$	
L1210 + VRP	$0,0336 \pm 0,004$	11,43
L1210R + VRP	$0,384 \pm 0,003$	
L1210 + CTP-F	$0,043 \pm 0,003$	14,87
L1210R + CTP-F	$0,642 \pm 0,05$	

*GR: Grado de resistencia = IC_{50} resistente / IC_{50} sensible.

Las nuevas fracciones provenientes del CTP-F se ensayaron mediante citometría en las líneas celulares L1210R y HL-60R, ambas a una concentración de 1 mg/ml, con el fin de seguir evaluando la posible actividad quimiosensibilizadora de estas nuevas fracciones y con el objetivo de poder encontrar el principio activo presente en el extracto vegetal.

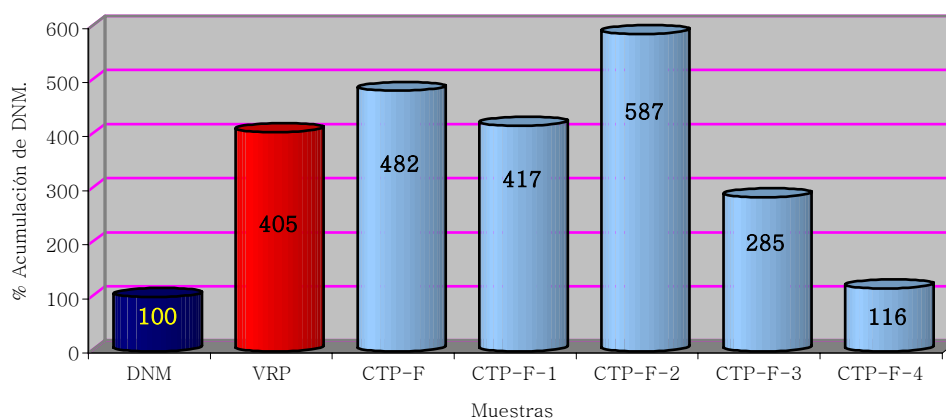


Figura 29: Cribado de la fracción CTP-F y sus fracciones en la línea celular L1210R a [1mg/ml]. La barra en azul oscuro representan a las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M, la barra roja son el control de referencia, i.e. las células preincubadas con VRP 5 μ M, las barras azules claro representan la fracción CTP-F y sus fracciones a [1 mg/ml].

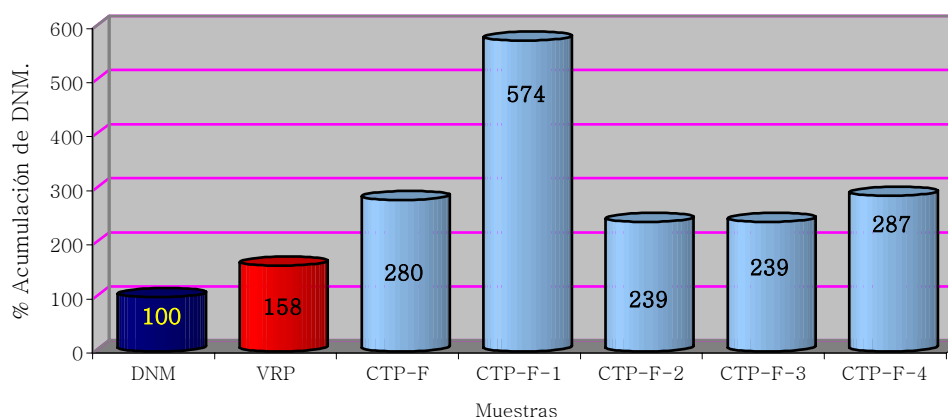


Figura 30: Cribado de la fracción CTP-F y sus fracciones en la línea celular HL-60R. La barra en azul oscuro representan a las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M, la barra roja son el control de referencia, i.e. las células preincubadas con VRP 5 μ M, las barras azules claro representan la fracción CTP-F y sus fracciones a [1 mg/ml].

El ensayo de estas fracciones identificó a CTP/F-1 y CTP/F-2, como las más activas incrementando la acumulación intracelular de antraciclina en células L1210R (ver [figura 29](#)). Además, fue la fracción CTP/F-1 la que presentó una mayor actividad en células HL-60R (ver [figura 30](#)) si bien las otras fracciones también incrementaron la acumulación intracelular de DNM por encima del valor inducido por VRP.

Obsérvese que la fracción CTP/F-4 únicamente incrementó la acumulación de antraciclina en células HL-60R, sugiriendo la posible presencia de antagonistas específicos de la MRP1 en esta fracción. Este resultado es altamente interesante, pues aporta una fuente de compuestos reversores potenciales que actúan específicamente sobre la bomba MRP1. Por tanto, se decidió seguir con la identificación de estos compuestos selectivos para MRP1. La fracción CTP/F-4 representa la fracción más hidrofóbica de las ensayadas. Dado que la vía de extracción fue fundamentalmente hidrofílica, se propuso reiniciar el fraccionamiento del extracto CTP utilizando una estrategia de fraccionamiento más adecuada, que produjera mayores rendimientos en la extracción de compuestos hidrofóbicos que actúen sobre la MRP1. De este modo se obtuvieron las fracciones CTP-J2, I2, A2, E, G2, D2 y E2.

Las nuevas fracciones del extracto vegetal CTP se ensayaron comparativamente en las líneas L1210R y HL-60R para seleccionar aquellas fracciones que específicamente actuaban sobre HL-60R.

El resultado del ensayo de las nuevas fracciones en células L1210R se muestra en la [figura 31](#). Se aprecia que la mayoría de las fracciones incrementaron modestamente la acumulación intracelular de DNM en las células L1210R. Por el contrario, el ensayo en células HL-60R reveló que las fracciones CTP-G2 y CTP-E2 aumentaban la concentración intracelular de antraciclina más que e VRP (ver [figura 32](#)). Por tanto, estas dos fracciones del extracto fueron seleccionadas para proseguir con el fraccionamiento.

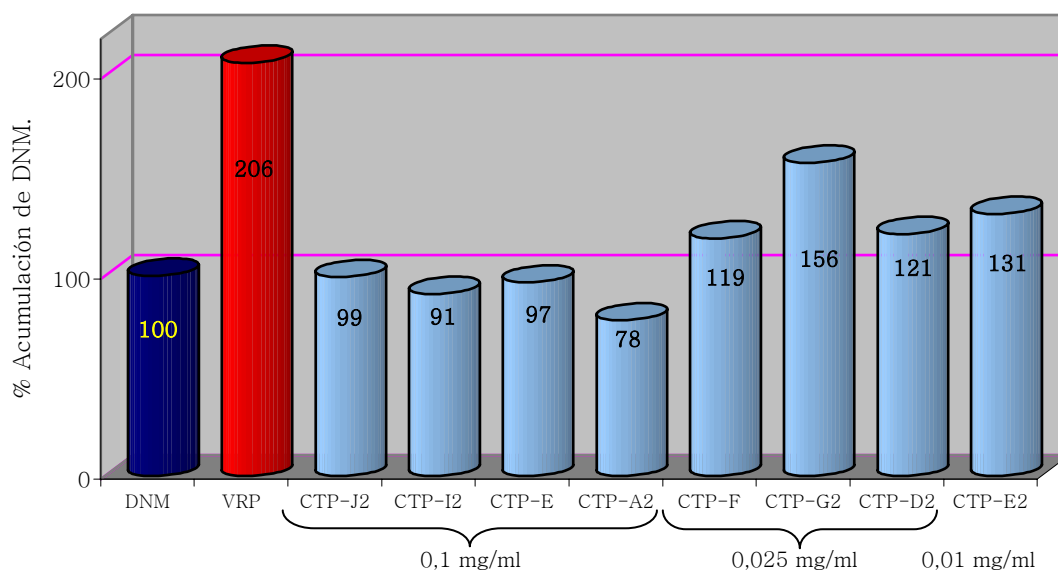


Figura 31: Cribado de las nuevas fracciones del CTP en la línea celular resistente L1210. La barra en azul oscuro representan a las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M, la barra roja son el control de referencia, i.e. las células preincubadas con VRP 5 μ M, las barras azules claro representan las nuevas fracciones del CTP.

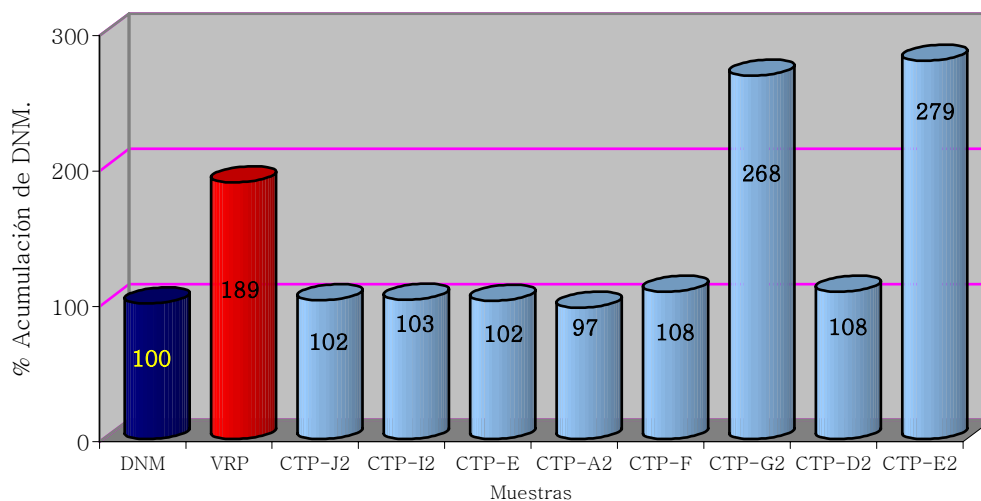


Figura 32: Cribado de las nuevas fracciones del CTP a una concentración de [0,025 mg/ml] en la línea celular resistente HL-60. La barra en azul oscuro representan a las células incubadas únicamente con DNM 3 μ M, la barra roja son el control de referencia, i.e. las células preincubadas con VRP 5 μ M, las barras azules claro representan las nuevas fracciones del CTP.

De este modo, se obtuvieron las fracciones CTPE/S1-S4 y CTPG/S1-S5 que, al igual que las otras, se ensayaron en células L1210R y HL-60R, todas las fracciones fueron analizadas a una concentración de 0,0075 mg/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la [figura 33](#) (L1210R) y en la [figura 34](#) (HL-60R). La fracción CTPE/S4 fue la más activa incrementando la concentración intracelular de DNM en células HL-60R, sin incrementar notablemente la acumulación en células L1210R.

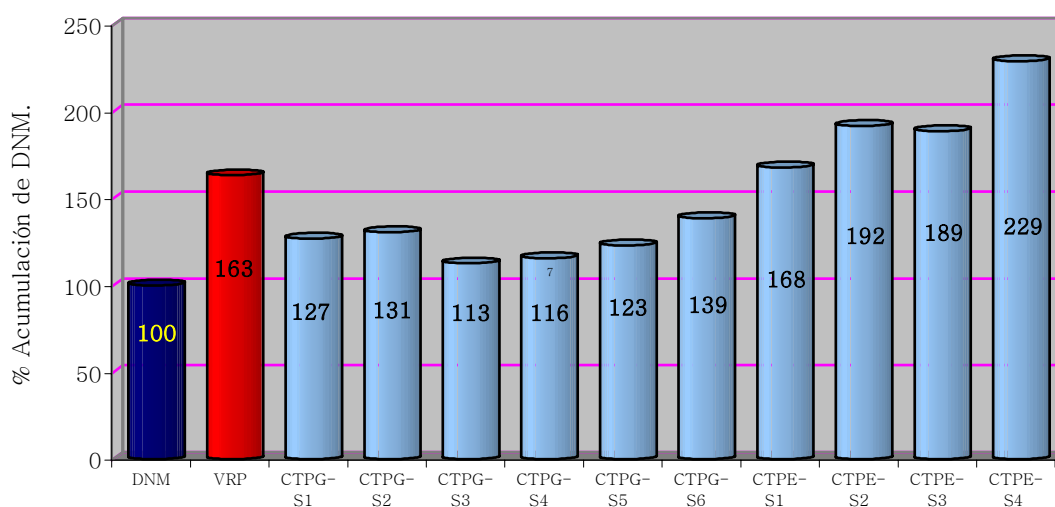


Figura 33: Cribado de las fracciones provenientes del CTP-E2 y CTP-G2 en las líneas celulares L1210R a una concentración de 0,0075 mg/ml.

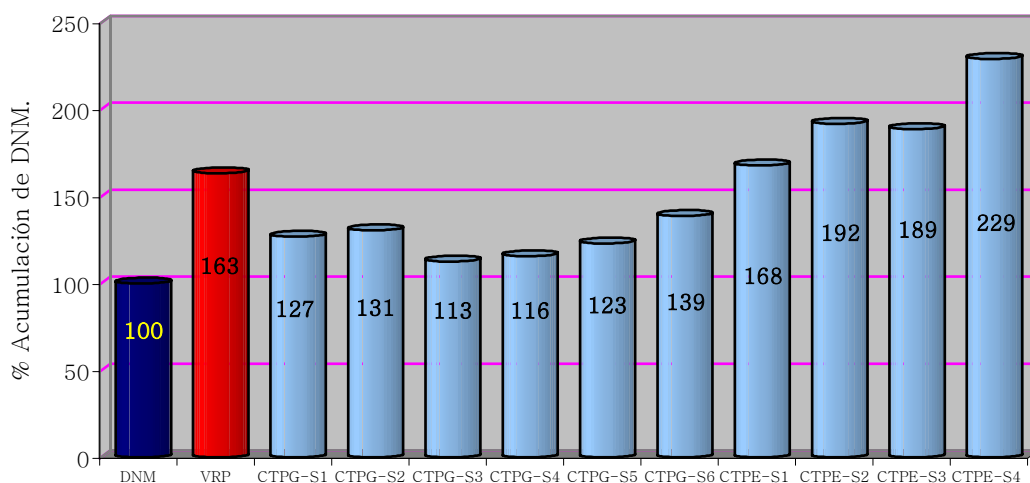


Figura 34: Cribado de las fracciones provenientes del CTP-E2 y CTP-G2 en la línea celular HL-60R a una concentración de 0,0075 mg/ml.

Por tanto, se seleccionó la fracción CTPE-S4 como la más eficaz, se subfraccionó en tres nuevas fracciones (CTPE-S4-56, CTPE-S4-78 y CTPE-S4-910) determinándose su actividad quimiosensibilizadora en las células L1210R (ver [figura 34](#)) y HL-60R (ver [figura 35](#)) a una concentración de 0,0075 mg/ml. Los datos analizados del ensayo y las claves de las fracciones se muestran en la siguiente tabla.

<u>CTPE-S4 y fracciones:</u>	<u>% de acumulación intracelular.</u>	
	L1210R	HL-60
□ CTPE-S4	137.2%	161.4%
□ CTPE-S4-56	147.5%	164.5%
□ CTPE-S4-78	158.9%	160.7%
□ CTPE-S4-910	148.8%	211%

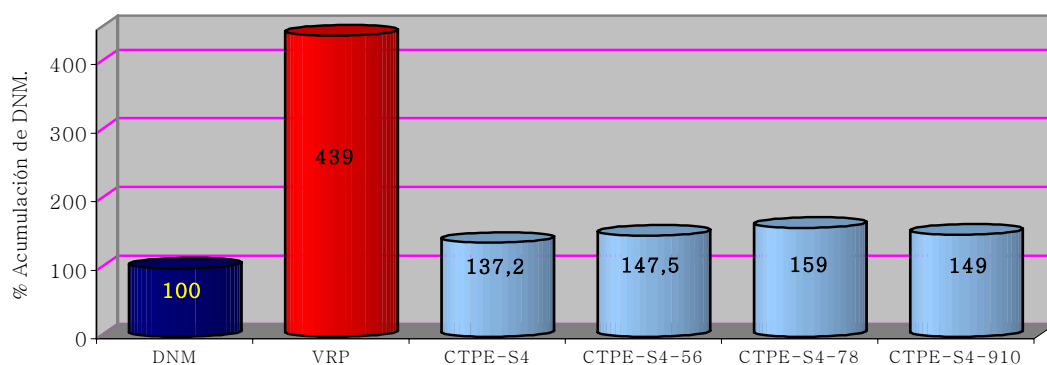


Figura 35: Cribado de las fracciones provenientes del CTPE-S4 en la línea celular L1210R a una concentración de 0,0075 mg/ml.

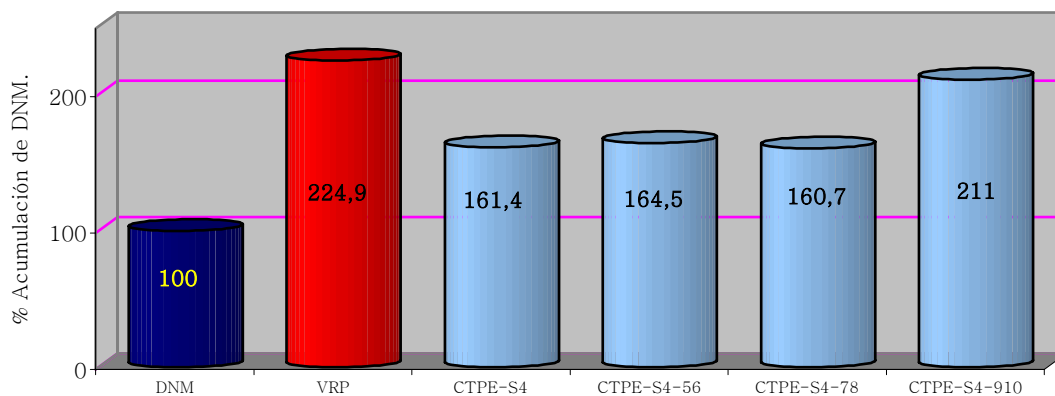


Figura 36: Cribado de las fracciones provenientes del CTPE-S4 en la línea celular HL-60R a una concentración de 0,0075 mg/ml.

De las nuevas subfracciones, ninguna mostró actividad significativa sobre la línea celular L1210R. Por el contrario, la fracción CTP/E5-910 incrementó la acumulación intracelular de antraciclina en células HL-60R con una potencia similar a la del VRP. Esta nueva fracción se subdividió en cuatro fracciones. Las nuevas fracciones vienen renombradas, de modo que la seleccionada CTP/E5-910 se muestra como CTPE-67, y las subfracciones como CTP67-1, CTP67-2, CTP67-3a y CTP67-3b.

Se cribaron la fracción CTPE-67 y sus fracciones a una concentración de [0.0075 mg/ml] mediante citometría de flujo, tanto en la línea celular L1210R (ver [figura 37](#)) como en la HL-60R (ver [figura 38](#)). El ensayo de estas nuevas muestras identificó a la fracción CTPE67-2 como la más activa incrementando selectivamente la acumulación intracelular de fármaco citostático en las células HL-60R. Los datos analizados del ensayo y las claves de las fracciones se muestran en la siguiente tabla:

<u>CTPE-67 y fracciones:</u>	<u>% de acumulación intracelular.</u>	
	L1210R	HL-60R
□ CTPE67-1	140,3%	145,6%
□ CTPE67-2	141,5%	206,5%
□ CTPE67-3a	154,4%	140,9%
□ CTPE67-3b	109,7%	106,8%

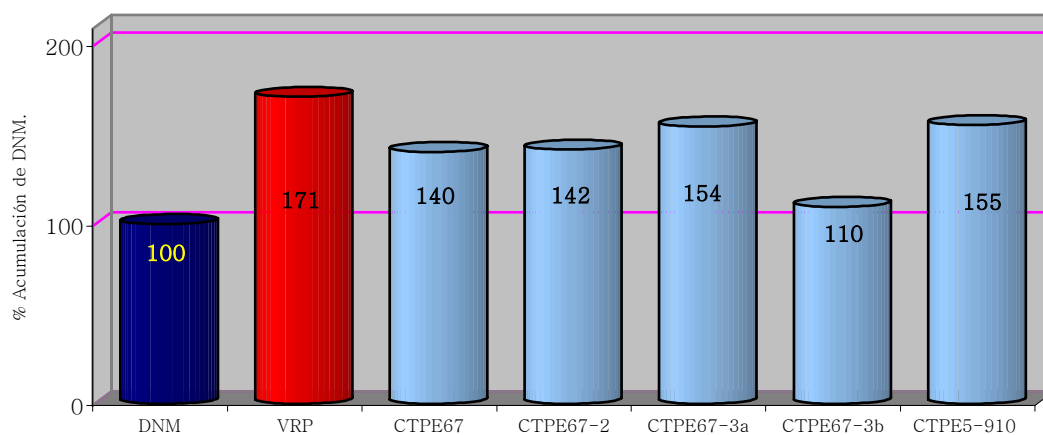


Figura 37: Cribado de las fracciones CTPE67, proveniente del CTPE5-910 en la línea celular L1210R a una concentración de 0,0075 mg/ml.

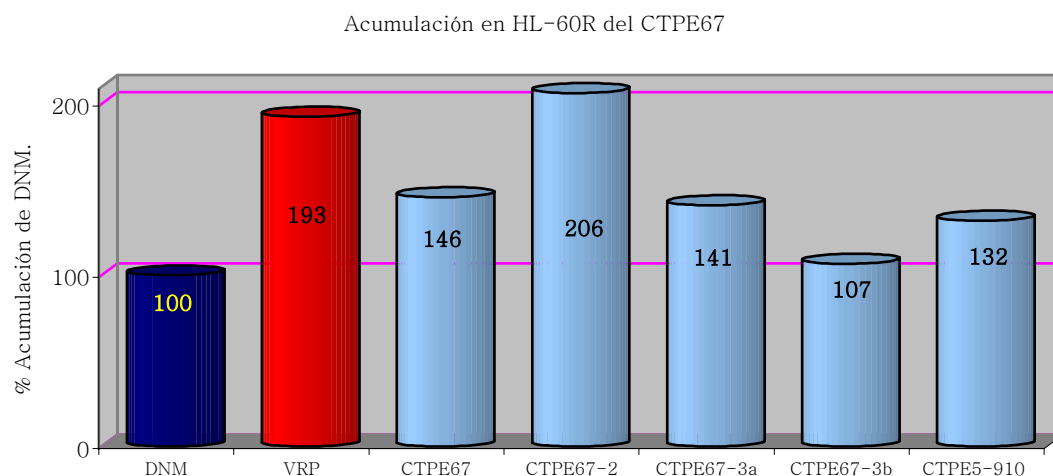


Figura 38: Cribado de las fracciones provenientes del CTPE5-910 en la línea celular HL-60R a una concentración de 0,0075 mg/ml.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad con estas últimas fracciones con el fin de determinar su eficacia quimiosensibilizadora. Las fracciones a ensayar fueron CTPE67-1, CTPE67-2 y CTPE67-3a. La subfracción CTPE67-3b se desechó ya que sus valores de acumulación intracelular no fueron relevantes. Para elegir la concentración de incubación más adecuada en el ensayo de citotoxicidad primero se realizó un ensayo de viabilidad utilizando el método de azul-tripán cuyos datos se muestran en la [tabla 15](#). En función de estos datos, la concentración elegida fue de 0,01 mg/ml.

Tabla 15: Datos del ensayo de viabilidad en la línea celular HL-60, tanto parental como resistentes, por el método de azul-tripán.

Muestras de la línea sensible	concentraciones	% Viabilidad
HL-60 control		97,44
CTPE67-1	0,0075 mg/ml	98,18
	0,01 mg/ml	97,57
	0,05 mg/ml	44,35
	0,1 mg/ml	2,50
CTPE67-2	0,0075 mg/ml	93,42
	0,01 mg/ml	82,73
	0,05 mg/ml	50,00
	0,1 mg/ml	4,67
CTPE67-3a	0,0075 mg/ml	83,55
	0,01 mg/ml	80,99
	0,05 mg/ml	60,78
	0,1 mg/ml	13,86

Muestras de la línea resistente	concentraciones	% Viabilidad
HL-60R control		90,78
CTPE67-1	0,0075 mg/ml	89,02
	0,01 mg/ml	89,12
	0,05 mg/ml	55,17
	0,1 mg/ml	14,04
CTPE67-2	0,0075 mg/ml	84,35
	0,01 mg/ml	83,75
	0,05 mg/ml	58,59
	0,1 mg/ml	62,60
CTPE67-3a	0,0075 mg/ml	88,41
	0,01 mg/ml	87,26
	0,05 mg/ml	86,16
	0,1 mg/ml	64,98

A continuación se realizó el ensayo de citotoxicidad utilizando el método de reducción de MTT (Mosmann, T., 1983). Con este ensayo se determinaron el grado de resistencia celular y la quimiosensibilización producida por cada extracto (ver [figura 39](#)).

Los datos muestran que la disminución del grado de resistencia se da únicamente, y de forma aparentemente muy moderada en la fracción más activa revirtiendo la acumulación de DNM, i.e. la CTPE67-2. El moderado grado de quimiosensibilización es probablemente debido a la reducida concentración del fitoactivo presente en el extracto. No obstante, el resultado es alentador ya que demuestra la presencia de quimiosensibilizadores en la fracción CTPE67-2.

Línea celular	IC ₅₀	Grado de Resistencia
HL-60	0,3101 ± 0,053	19,29
HL-60R	5,982 ± 0,027	
HL-60 + CTPE67-1	0,225 ± 0,1001	19,92
HL-60R + CTPE67-1	4,483 ± 0,029	
HL-60 + CTPE67-2	0,277 ± 0,055	12,82
HL-60R + CTPE67-2	3,553 ± 0,0158	
HL-60 + CTPE67-3a	0,251 ± 0,051	20,4
HL-60R + CTPE67-3a	5,117 ± 0,0223	

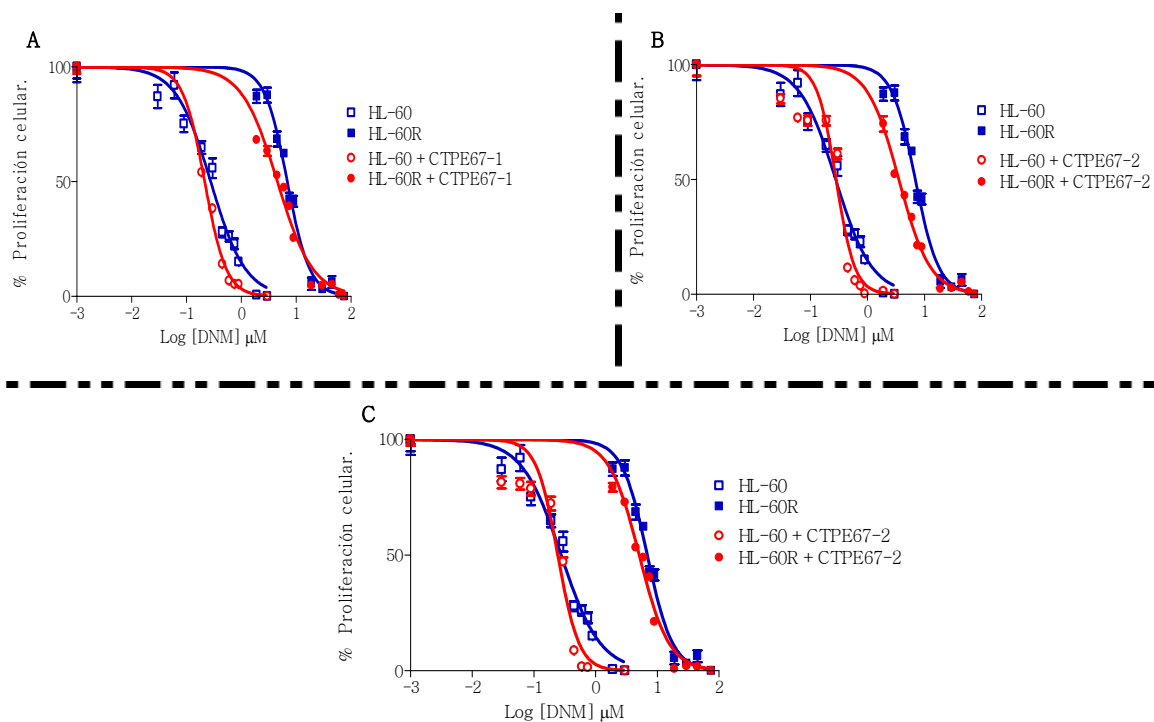


Figura 39: Curvas de citotoxicidad obtenidas del ensayo de reducción de MTT en la línea celular HL-60, se incubaron las fracciones (A) CTPE67-1, (B) CTPE67-2 y (C) CTPE67-3a del extracto vegetal a una concentración de 0,01 mg/ml.

De estos ensayos de citometría y citotoxicidad se seleccionó el CTPE67-2 por ser la fracción más relevante. Se cribaron las nuevas fracciones a una concentración de 0.005 mg/ml mediante citometría de flujo, tanto en la línea celular L1210R (ver [figura 40](#)) como en la HL-60R (ver [figura 41](#)). Los datos analizados del ensayo y las claves de las fracciones se muestran en la siguiente tabla:

CTPE67-2 y fracciones:	% de acumulación intracelular.	
	L1210R	HL-60R
□ CTPE67/2-1	84,3%	123,5%
□ CTPE67/2-2	58%	92,5%
□ CTPE67/2-3	84,3%	170,2%
□ CTPE67/2-4	113,1%	223,6%
□ CTPE67/2-5	176,7%	214,5%
□ CTPE67/2-6	72%	130,5%
□ CTPE67/2-7	90%	160,2%
□ CTPE67/2-8	93%	212,6%

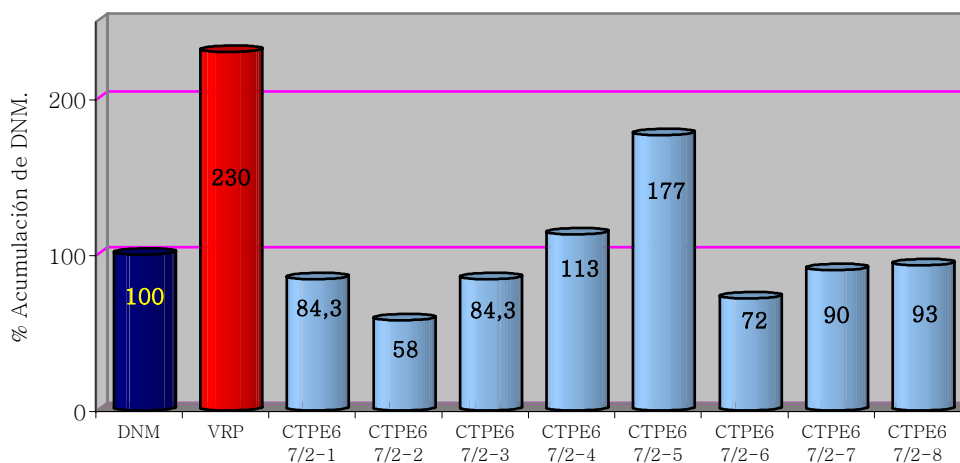


Figura 40: Cribado de las fracciones provenientes del CTPE67/2 en la línea celular L1210R a una concentración de 0,005 mg/ml.

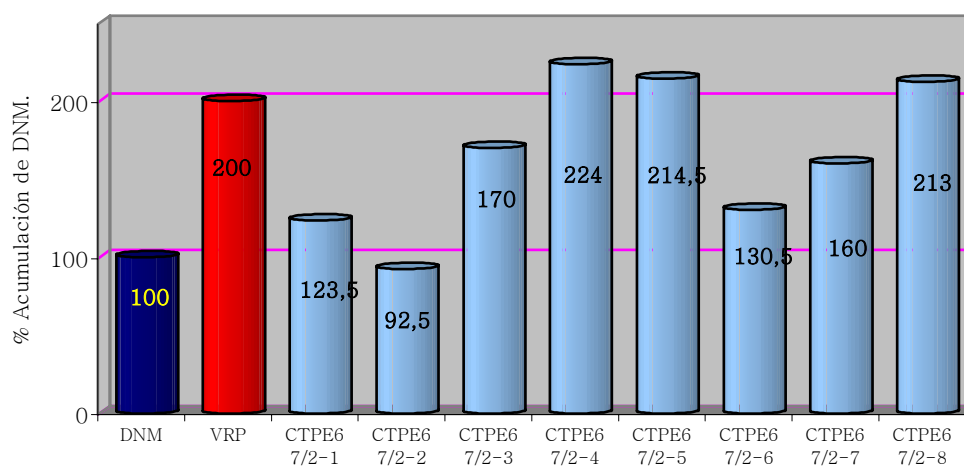


Figura 41: Cribado de las fracciones provenientes del CTPE67/2 en la línea celular HL-60 a una concentración de 0,005 mg/ml.

De entre estas fracciones se seleccionaron la CTPE97/2-4, CTPE67/2-5 y la CTPE67/2-8, con ellas realizando el ensayo de citotoxicidad con el fin de determinar su eficacia quimiosensibilizadora. Nuevamente elegimos la concentración de 0,01 mg/ml ya que ésta no es tóxica *per se*. Tras la incubación con las fracciones y el posterior análisis de los datos

encontramos que tales fracciones siguen teniendo un cierto grado aunque moderado, de actividad quimiosensibilizadora (véase la [figura 42](#)).

Línea celular	IC ₅₀	Grado de Resistencia
HL-60	0,38 ± 0,06	20,4
HL-60R	7,74 ± 0,6	
HL-60R + CTPE67/2-4	6,6 ± 0,09	17,4
HL-60R + CTPE67/2-5	3,8 ± 0,06	10
HL-60R + CTPE67/2-8	4,9 ± 0,055	12,9

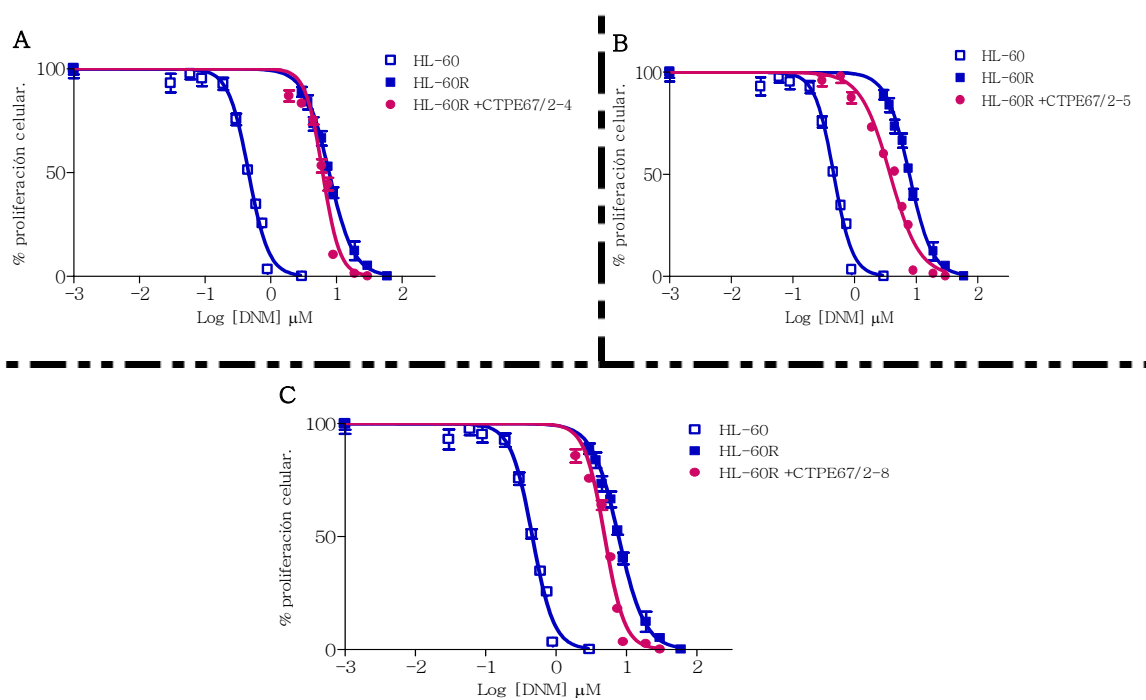


Figura 42: Curvas de citotoxicidad obtenidas del ensayo de reducción de MTT en la línea celular HL-60, se incubaron las fracciones (A) CTPE67/2-4, (B) CTPE67/2-5 y (C) CTPE67/2-8 del extracto vegetal a una concentración de 0,01 mg/ml.

El análisis mediante HPLC de las fracciones CTPE67-2, CTPE67/2-1, CTPE67/2-2, CTPE67/2-3, CTPE67/2-4, CTPE67/2-5, CTPE67/2-7 y CTPE67/2-8 dió como resultado la presencia de picos correspondientes a distintos compuestos (ver [tabla 16](#)). La separación de estos compuestos y

posterior ensayo de acumulación (figura 43) revelaron que las fracciones nº 3 y 6 con tiempos de retención de 16,63 minutos y 23,15 minutos, respectivamente, y un máximo de absorción a 238 nm y 257,7 nm presentaban una actividad quimiosensibilizadora superior a la mostrada por el verapamilo. Actualmente, se está optimizando el método de extracción del compuesto, con el fin de obtener mas cantidad del mismo y finalizar con el ensayo de citotoxicidad, ensayo que nos revelará la funcionalidad del compuesto como quimiosensibilizador, para poder proceder al análisis estructural del mismo y revelar su identidad molecular.

Tabla 16: Datos del análisis por HPLC de las fracciones vegetales.

Muestras	Nº de pico y Tiempo de Retención (min)	Área del pico (255nm)	Máx. U.V. (nm)
CTPE67-2	3 ⇒ 16,63	123.700	238
	5 ⇒ 19,13	178.401	250,5
	6 ⇒ 23,15	2.649.618	257,7
	7 ⇒ 29,15	213.590	250,5
	8 ⇒ 29,98	69.137	250,5; 306,3
	11 ⇒ 36,18	758.242	257,7
	12 ⇒ 37,76	39.474	250,5
CTPE67/2-1	6 ⇒ 23,29	57.136	257,7
	11 ⇒ 36,18	120.118	257,7
CTPE67/2-2	11 ⇒ 36,33	521.110	257,7
CTPE67/2-3	6 ⇒ 23,36	18.918.462	257,7
	9 ⇒ 30,21	226.539	257,7
	11 ⇒ 36,34	603.861	257,7
CTPE67/2-4	6 ⇒ 23,36	8.773.768	257,7
	8 ⇒ 30,26	49.644	306,3
CTPE67/2-5	1 ⇒ 11,02	109.876	230; 257,7
	2 ⇒ 14,21	76.000	282
	6 ⇒ 23,47	271.595	257,7
	8 ⇒ 30,30	55.000	306,3
CTPE67/2-7	4 ⇒ 16,76	208.831	274,6
CTPE67/2-8	3 ⇒ 16,77	22.638	238
	5 ⇒ 19,32	351.023	244
	7 ⇒ 29,35	171.000	250,5

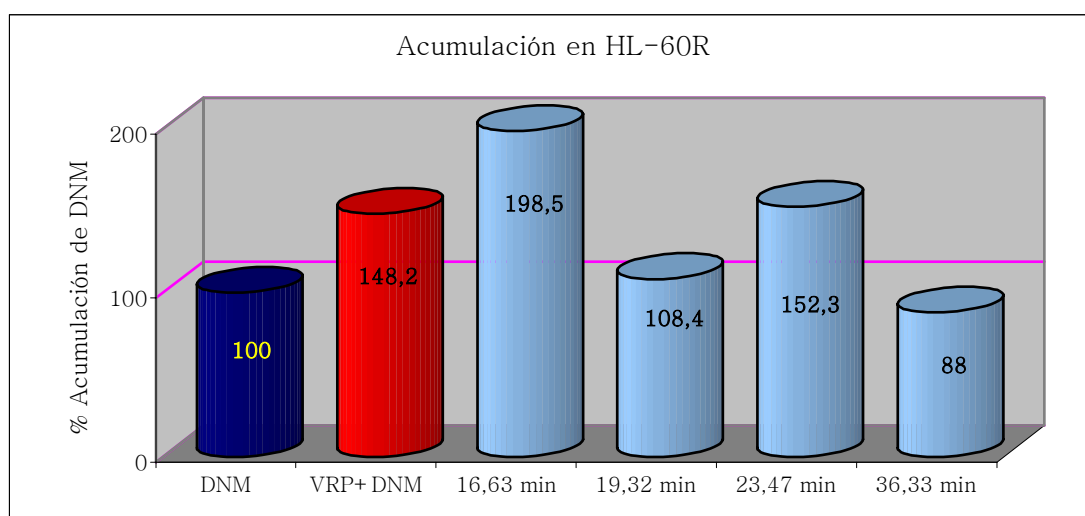


Figura 43: Ensayo de Acumulación intracelular con las moléculas mayoritarias extraídas de las fracciones activas. Cribado a una concentración de 0,005mg/ml.

Discusión.

La resistencia oncológica a agentes antineoplásicos se considera una de las mayores causas de fallo en los tratamientos quimioterapéuticos. Los tumores desarrollan o adquieren resistencia durante el curso del tratamiento a pesar de haber presentado respuesta inicial al mismo. Se estima que la resistencia a los fármacos utilizados contribuye a más del 90% de las muertes por cáncer, por lo que éste es un problema importante que requiere ser abordado con la mayor eficacia posible.

Dicha resistencia a la quimioterapia se ha correlacionado con la presencia de al menos dos bombas moleculares en las membranas de la célula del tumor, que expelen activamente del interior de la célula los fármacos utilizados en la quimioterapia, permitiendo de este modo que los tumores eviten los efectos tóxicos del citostático. Las dos bombas comúnmente encontradas en los tumores resistentes son P-gp y MRP1. Experimentalmente se han obtenido tumores resistentes a fármacos por selección *“in vitro”* de líneas celulares capaces de proliferar a concentraciones crecientes de varios agentes citotóxicos. La caracterización de modelos tumorales seleccionados para resistencia a daunomicina, adriamicina, taxol y otros fármacos han revelado un

fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, en el cual la resistencia al agente de selección está acompañada por una resistencia cruzada a múltiples fármacos citotóxicos de estructura y función no relacionadas. Este fenómeno se denomina resistencia a múltiples fármacos o MDR. Debido a su importancia, estas bombas de eflujo, son los blancos de estudio en el esfuerzo por encontrar diversos fármacos anticancerígenos y moléculas capaces bien de superar o de revertir el fenotipo MDR, volviendo a sensibilizar a la célula tumoral frente a los fármacos antineoplásicos. La mayoría de los agentes quimiosensibilizadores analizados en ensayos preclínicos y clínicos, son compuestos que han tenido que ser desechados por problemas de toxicidad y/o debido a los efectos secundarios indeseados que presentan. Una tercera generación de fármacos reversores del fenotipo MDR puede atenuar parcialmente estas limitaciones. Estos compuestos pueden utilizarse como farmacóforos, que tras las modificaciones necesarias podrían convertirse en nuevos quimiosensibilizadores de utilidad en clínica. No obstante, el enorme desafío de encontrar nuevos agentes quimiosensibilizadores que actúen como inhibidores de P-gp y MRP1 sigue siendo fundamental para el tratamiento quimioterápico del cáncer.

En este trabajo, hemos diseñado una biblioteca de trialquilglicinas integrada por 5.240 compuestos, que examinamos con el fin de encontrar antagonistas de P-gp y de MRP1. Los trímeros de N-alkilglicinas son una familia de moléculas no naturales atractivas en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos debido a su amplia variedad de actividades biológicas y a su estabilidad.

Las N-alkilglicinas se han utilizado con éxito en la identificación de diversas actividades, desde ligandos de alta afinidad para los receptores de membrana, hasta moduladores de complejos macromoleculares (Planells-Cases, R. et al., 2002). Además, las trialquilglicinas se han utilizado para identificar fármacos analgésicos y antiinflamatorios que exhiben actividad *in vivo* (García-Martínez, C. et al., 2002). Así, las diversas actividades asociadas

a las trialquilglicinas, junto con su resistencia proteolítica, su estabilidad *in vivo* y su toxicidad de baja a moderada, hacen de ellos unos buenos candidatos para encontrar agentes quimiosensibilizadores.

La contribución más destacable de este estudio es la identificación de un sistema de 20 trímeros de N-alkilglicinas que aumentan selectivamente la acumulación intracelular de DNM en células cancerosas resistentes. Esta actividad aparece asociada a la inhibición de la bomba de eflujo P-gp, según lo indicado por la actividad quimiosensibilizadora de estas moléculas en una línea sensible de leucemia linfocítica murina que expresa establemente la P-gp. Los dos compuestos significativamente más activos como antagonistas de la actividad de P-gp, son los numerados como 13 y 17. Estos compuestos redujeron el grado de resistencia de las células L1210R en ≥ 3 veces, a una concentración que compitió con el verapamilo, utilizado como quimiosensibilizador establecido. Además, estos 20 compuestos también aumentaron la acumulación intracelular de la antraciclina en células tumorales humanas provenientes de leucemia promielocítica, HL-60R, que sobreexpresan la bomba MRP1. Cabe destacar que prácticamente todas las trialquilglicinas identificadas en la investigación modularon la actividad de MRP1 en un grado análogo, o superior al VRP. Esta observación se verifica más a fondo en el análisis de citotoxicidad de DNM donde todos los peptoides disminuyen el grado de resistencia de las células de HL-60R en ≥ 3 veces de modo similar al efecto observado con las células que expresan P-gp. Teniendo en cuenta todo lo expuesto, los resultados indican que los peptoides identificados son potentes quimiosensibilizadores, con una eficacia similar para P-gp y MRP1.

Todos los peptoides seleccionados contienen invariables los grupos 2,4-diclorofenil del producto químico y difenilpropil en las posiciones R₂ y R₃, sugiriendo un papel dominante de los grupos planares hidrofóbicos en estas posiciones del oligómero. La primera posición de la molécula (R₁), sin embargo, aunque permitió una diversidad química levemente más alta, destacaron los grupos fluorofenilo. La presencia abundante de los grupos planar hidrofóbicos,

junto con aceptores del enlace del hidrógeno es acorde con las características farmacofóricas propuestas para los antagonistas de P-gp. Para apoyar este dogma, se utilizó el software de Catálisis® en el que se comparó la relación del farmacóforo del peptoide N151212C con el modelo de farmacóforo generado de un sistema de inhibidores y diversos sustratos de P-gp, que probablemente se unan al mismo sitio de la proteína, como el (R)- verapamilo, la rodamina 123, la vinblastina, la colchicina y la calceína AM. Estos compuestos generaron un modelo tridimensional para el farmacóforo que ofrecía los dos grupos hidrofóbicos (cadenas aromáticas o alifáticas), un anillo aromático y dos aceptores en el enlace de hidrógeno (figura 44 A), que es similar al modelo divulgado por (Ekins, S. et al., 2002). Según lo ilustrado en la figura 44 B, hay conformaciones del peptoide n° 13 que se alinean cómodamente con el modelo farmacofórico, especialmente con el verapamilo. Nótese, sin embargo, que un aceptor de hidrógeno no fue alineado correctamente, sugiriendo que el compuesto n° 13 requiere el refinamiento estructural para mejorar la unión con P-gp.

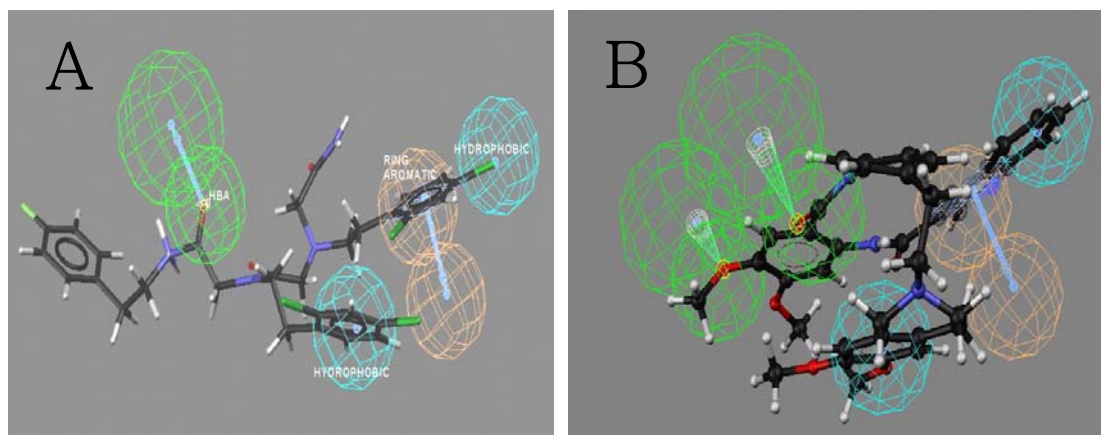


Figura 44: Modelo farmacofórico (A) generado de un sistema de inhibidores y sustratos de P-gp como el verapamilo. (B) alineamiento del farmacóforo del peptoide n° 13 (N151212C).

A diferencia de los peptoides, la quimioteca de 2,5-Dicetopiperacinas no reveló ningún compuesto quimiosensibilizador del fenotipo MDR. Este

resultado fue sorprendente por cuanto se identificaron DKPs que incrementaron la acumulación intracelular de DNM en células resistentes, aunque a un nivel muy inferior al ejercido por los peptoides. Además, estas DKPs no modularon la sensibilidad de las células resistentes a la citotoxicidad de la DNM. Una explicación plausible para esta discrepancia es que los DKPs muestran una reducida difusión a través de la membrana, limitando la acumulación intracelular efectiva de compuesto. Alternativamente, los DKPs pueden ser también pseudosustratos de la P-gp. De este modo el reducido paso a través de la membrana, unido a su expulsión potencial, influirían negativamente en su actividad quimiosensibilizadora, aún cuando mostrasen un efecto en la acumulación inicial del fármaco. En cualquier caso, los resultados indican que los DKPs presentan un esqueleto molecular con potencial para el desarrollo de quimiosensibilizadores.

Se está dedicando un importante esfuerzo para el desarrollo de fármacos quimiosensibilizadores no tóxicos que podrían ser utilizados como coadyuvantes en la quimioterapia actual. La toxicidad indeseada y los efectos secundarios asociados a los quimiosensibilizadores actuales, se han atribuido a interferencias con otros mecanismos celulares o al bloqueo de alta afinidad de P-gp. La inhibición farmacológica de P-gp debe de conducir a la acumulación creciente del fármaco citostático en tejidos delicados tales como el cerebro, tal y como se concluye del estudio de *mdr1*^{-/-} del knock out de ratón (Hendrikse, N.H. et al., 1999). Estas observaciones implican que los antagonistas con afinidad moderada que bloquean parcialmente la actividad de estas bombas pueden desempeñar un papel terapéutico relevante atenuando los efectos secundarios que emergen del bloqueo total de estas bombas extrusoras. Además, los compuestos con afinidad moderada y que actúan con eficacia similar sobre P-gp y MRP1 pueden tener una ventaja adicional ya que, además de que pueden ser coexpresados en diversos tumores, podrían moderar la actividad de otras importantes proteínas involucradas en el fenómeno MDR. Por lo tanto, los peptoides que hemos identificado proporcionan un esqueleto

molecular nuevo del farmacóforo que se podría considerar como pilar para la evolución directa de fármacos quimiosensibilizadores más activos y más seguros. Para apoyar esta idea se realizaron ensayos de toxicidad en animales con los compuestos nº 13 y nº 17 a una dosis ≥ 300 mg/kg, no encontrándose signos de toxicidad.

En paralelo al rastreo de quimiotecas combinatorias sintéticas, se inició una colaboración con la compañía ASAC Pharmaceuticals encaminada a identificar quimiosensibilizadores a partir de extractos vegetales. Estas colecciones de moléculas constituyen quimiotecas naturales de gran diversidad química. Los compuestos activos para un determinado ensayo pueden identificarse mediante una estrategia iterativa de fraccionamiento y ensayo. A diferencia de las quimiotecas sintéticas, los extractos naturales no están codificados no permitiendo el aislamiento directo de los compuestos activos. Consecuentemente, la eficacia del proceso de identificación dependerá de la estrategia de fraccionamiento utilizada. En este estudio, se partió de un extracto hidrosoluble, el CTP, de aislamiento de quimiosensibilizadores. El proceso iterativo de ensayo-fraccionamiento indicó que la naturaleza química del principio activo era hidrofóbica, obligando a modificar el método de extracción con el fin de enriquecer las fracciones con el principio activo. De este modo, y tras sucesivas optimizaciones del proceso se llegó a la identificación de un compuesto de identidad molecular desconocida como un quimiosensibilizador potencial.

En comparación con la quimioteca combinatoria sintética, el aislamiento de compuestos activos como quimiosensibilizadores “fracción nº 3 con un tiempo de retención de 16,63 minutos y fracción nº 6 con un tiempo de retención de 23,47 minutos” (ver [tabla 16](#) y [figura 43](#)) ha sido mucho más lento. Por otro lado, todavía se desconoce la identidad química de los mismos, así como la viabilidad de su síntesis química. Este último objetivo está además limitado por el bajo rendimiento de extracción del compuesto que hace necesario un cambio en la estrategia de extracción fraccionamiento con el fin

de incrementar su aislamiento del extracto crudo. Por tanto, aunque las quimiotecas naturales son adecuadas para la identificación de fotocompuestos activos, su utilización requiere de tiempos de aislamiento mucho más largos que los empleados por la química combinatoria sintética.

No obstante, y a pesar de las limitaciones expuestas, un resultado sobresaliente del uso de los extractos vegetales ha sido la identificación de quimiosensibilizadores específicos del fenotipo MDR mediado por la proteína MRP1. La selectividad de blanco terapéutico de los compuestos con un tiempo de retención de 16,63 minutos y 23,47 minutos, les convierte en candidatos para su posterior desarrollo en quimiosensibilizadores útiles. Probablemente, un proceso de optimización química será necesario para evolucionar al grupo farmacofórico obtenido en un fármaco clínicamente útil.

En conclusión se han identificado dos nuevas familias de compuestos quimiosensibilizadores del fenotipo MDR. La química combinatoria sintética ha conducido al aislamiento de antagonistas de las bombas de eflujo P-gp y MRP1, mientras que el rastreo de quimiotecas naturales ha llevado a la identificación de un antagonista de MRP1. Estos compuestos sin duda expandirán las familias de quimiosensibilizadores actuales, incrementando la probabilidad de desarrollar compuestos con utilidad clínica en el tratamiento de tumores quimiorresistentes.

Conclusiones.

1. Un ensayo de acumulación intracelular de daunomicina ha resultado ser altamente eficaz en el cribado de quimiotecas sintéticas y naturales en la búsqueda de quimiosensibilizadores del fenotipo MDR mediado por las bombas de eflujo P-gp y/o MRP1.

2. A partir de una quimioteca combinatoria sintética de N-alquilglicinas se han identificado compuestos capaces de modular, con una eficacia similar, la actividad extrusora de fármacos de la P-gp y la MRP1 en un grado análogo o superior al promovido por el verapamilo.

3. De los compuestos identificados en la quimioteca, los más relevantes fueron los numerados como 13 y 17. Si bien ambos compuestos requieren un refinamiento estructural, la actividad mostrada les confirma como dos buenos candidatos a quimiosensibilizadores.

4. Del estudio de análisis estructural de la quimioteca de N-alquilglicinas, podemos fundamentar la importancia de los grupos planares hidrofóbicos junto con los aceptores del enlace de hidrógeno, en las características farmacofóricas propuestas para los antagonistas de P-gp.

5. Aunque los ensayos realizados con la quimioteca combinatoria sintética de 2,5-Dicetopiperacinas no condujeron a la identificación de ningún compuesto quimiosensibilizador de MDR, posiblemente por su reducida difusión

a través de la membrana, sus componentes presentan un esqueleto molecular prometedor para el desarrollo de quimiosensibilizadores.

6. Los estudios en la quimioteca combinatoria de extractos naturales han permitido la identificación de dos compuestos activos con un alto potencial quimiosensibilizador del fenotipo mediado por MRP1. Se trata de los compuestos correspondientes a la fracción nº 3 y la fracción nº 6 con tiempos de retención de 16,63 minutos y 23,47 minutos respectivamente, aunque por el momento se desconoce su identidad química y la viabilidad de su síntesis química.

7. Pese a que las quimiotecas naturales son adecuadas para la búsqueda de compuestos quimiosensibilizadores, la identificación de éstos es un proceso muy lento, mientras que la identificación a través de la química combinatoria sintética, nos permite el estudio de un número infinitamente mayor de moléculas en un tiempo mucho menor. No obstante y en favor de las primeras, hay que destacar que la diversidad química de las quimiotecas sintéticas es todavía limitada, comparada con la diversidad y complejidad de las sustancias naturales.

Material y Métodos.

En la búsqueda de nuevos compuestos partimos inicialmente de líneas celulares sensibles a la antraciclina DNM que se han manipulado para inducir a la sobreexpresión de las bombas de eflujo P-gp y MRP, y convirtiéndolas en líneas quimiorresistentes. En este estudio se utilizaron la línea celular de leucemia linfocítica murina L1210, y la línea celular de leucemia promielocítica humana HL-60. La exposición de la línea L1210 a concentraciones crecientes de DNM induce la expresión de la bomba P-gp, mientras que la incubación de las células HL-60 con la antraciclina promueve la expresión de la bomba MRP1.

Complementariamente, se utilizaron las células L1210^{P-gp} (CBMC-6) que corresponden a células L1210 que expresan establemente la P-gp murina. Las L1210^{P-gp} o CBMC-6, son células transfectadas con la glicoproteína -P, estas células provienen de una línea celular sensible, las L1210. Su único mecanismo de resistencia está basado en la transfección estable de la P-gp murina. Este modelo fue creado en el laboratorio del Doctor A. Ferragut por los Doctores M. Saceda y M. D. Castro y su caracterización está ampliamente documentada en la Tesis Doctoral de M.D. Castro o en el artículo de (Castro-Galache, M.D. et al., 2003)

1. Cultivos Celulares.

En este trabajo se utilizaron diversas líneas celulares. La mayoría de los ensayos se realizaron en las dos líneas celulares linfocíticas referidas en el apartado anterior, y que crecen en cultivos en suspensión. Fueron utilizadas igualmente una batería de células que crecen adheridas a la superficie del frasco de cultivo (crecimiento adherente).

1.1. Líneas Celulares en Suspensión.

Las líneas celulares utilizadas fueron: L1210 y HL-60 tanto parentales (sensibles) como resistentes, y las L1210^{P-gp} (CBMC-6). Para su crecimiento, las células se mantienen en RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 50 U/ml de penicilina-estreptomicina y 2mM de L-glutamina, a 37°C en atmósfera humidificada y 5% de CO₂.

Diariamente se controlan el crecimiento y la viabilidad celular, diluyéndose hasta una densidad final de 3x10⁵ células/ml en el caso de las L1210, L1210^{P-gp} y de 2x10⁵ células/ml en las HL-60. La viabilidad se determina por el método de exclusión de Azul-Tripán.

2. Selección de Resistencia de las Líneas Linfoides.

Para mantener el fenotipo MDR de forma estable, periódicamente se incuban los cultivos resistentes a concentraciones crecientes (máximo 6 µM) de DNM durante 6-7 días en el caso de las L1210, o a tratamientos discontinuos con DNM a una concentración de 320 nM en las HL-60.

Las disoluciones de DNM se preparan a partir del reactivo en polvo (DNM, Sigma-Aldrich Química S. A.) que se diluye en agua mili-Q filtrada por una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm. Para calcular la concentración real de la solución stock se preparan varias diluciones en

metanol con el fin de evitar que se formen agregados moleculares (Chaires, J.B. et al., 1982). Mediante medidas de espectrofotometría a una longitud de onda de 480 nm y teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de la DNM en metanol ($11.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm.}^{-1}$) determinamos la concentración real de la solución stock de DNM, a partir de la cual preparamos las disoluciones de trabajo (Barcelo, F. et al., 1986).

3. Selección de Capacidad Tumorigénica.

La capacidad tumorigénica de la línea L1210 se preserva y comprueba mediante la inoculación de células en ratones y posterior recuperación de los tumores generados. Se inoculan 1×10^6 células L1210/0.1 ml por ratón mediante una inyección abdominal, en ratones jóvenes de la cepa DBA/2/J. Tras 10-12 días los animales son sacrificados por dislocación cervical y los tumores ascíticos se utilizan para recuperar las células.

Se corta la membrana peritoneal en condiciones de semisterilidad y se lava la cavidad abdominal con 15 ml de PBS/EDTA 1 mM. El tumor ascítico extraído se centrifuga a 1450 rpm durante 7 min a 20°C. Se realizan, seguidamente, tres lavados, el primero es con PBS/EDTA y los restantes con PBS. Tras determinar el recuento y la viabilidad se siembran las células en medio de cultivo completo, a 37°C en 5% de CO₂.

4. Ensayos de Viabilidad Celular.

El Azul-Tripán es un colorante azul que permea al citoplasma celular cuando la membrana plasmática está dañada, criterio que se utiliza para considerar la célula como no viable.

Se realiza este tipo de ensayo con el fin de determinar la viabilidad celular después de una incubación del cultivo celular tras los tratamientos. Para

esta medida se incuba 5 min la suspensión celular en un 10% del reactivo de tripán y se cuentan las células en la cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad se determina como el cociente entre las células viables y el total de células.

5. Citometría de Flujo (CMF).

El citómetro de flujo es un instrumento que se utiliza fundamentalmente para medir las características físicas y bioquímicas de partículas biológicas. Se pueden realizar medidas de millares de células individuales/partículas en cuestión de segundos. Como blanco en cada experimento, se determina en primer lugar la autofluorescencia, que se relaciona directamente con las características estructurales y morfológicas de la célula. En segundo lugar, se determina la fluorescencia de las células marcadas con un fluoróforo. Este reacciona con las células o las partículas de interés antes del análisis; por lo tanto, la cantidad de fluorescencia emitida como partícula es proporcional a la cantidad de fluorescencia limitada a la célula o al componente celular.

Utilizamos la antraciclina DNM como fluoróforo, ya que entra en las células por difusión pasiva y tiene como característica la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 555 nm.

Después de la adquisición de los datos proporcionados por la dispersión de la luz y de la fluorescencia para cada partícula, la información resultante se puede analizar utilizando un ordenador con el software específico que se asocia al citómetro. El ensayo detallado de acumulación intracelular de DNM que vemos y analizamos a través del citómetro de flujo se explica en el apartado siguiente (apartado numero 6).

6. Acumulación Intracelular de Daunomicina (DNM).

Aprovechando la fluorescencia intrínseca de la DNM, se sigue la cantidad relativa de fluoróforo que se acumula intracelularmente por citometría de flujo (Soto, F. et al., 1992). Con este ensayo se compara la acumulación intracelular de DNM tanto en las líneas parentales como en las resistentes, así como la reversión de dicha acumulación en presencia de sustancias quimiosensibilizadoras como el VRP. La quimiosensibilización por VRP se considera como control de referencia de reversión (ejemplo de acumulación ver [figura 45](#)) respecto al que se comparan los compuestos a ensayar.

En los ensayos de citometría, se utilizan suspensiones celulares a una densidad de 1×10^6 células /ml en HBS (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, y 10 mM de HEPES, a un pH de 7,2) que se preincuban en presencia de distintas dosis de la muestra a ensayar durante 60 min en un baño a 37°C. A continuación se añade DNM 3 μM en presencia y/o ausencia de VRP 5 μM y se incuban otros 60 min a 37°C. La fluorescencia asociada a cada población celular, determinada por citometría de flujo, representa una medida relativa de la concentración de DNM en cada caso.

El equipo utilizado es un citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter Co.) que está equipado con un láser de argón que da una longitud de onda de excitación de 488 nm. El máximo de emisión de la DNM es de 555 nm por lo que para la captación se utiliza un filtro de paso de banda de 575 nm (± 15).

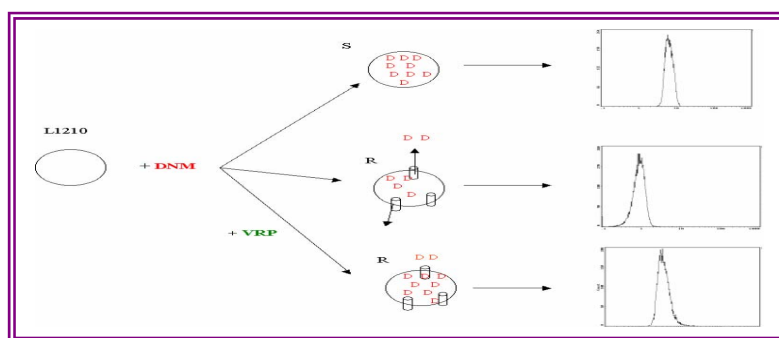


Figura 45: Grafico esquemático del ensayo de Acumulación Intracelular de DNM por Citometría de Flujo.

7. Quimiotecas Sintéticas.

7.1. Quimioteca de N–alquilglicinas.

Para la quimioteca sintética de N–alquilglicinas, tanto las mezclas como los peptoides individuales fueron preparados por síntesis múltiple simultánea en fase sólida (Figliozzi, G.M. et al., 1996). Esta síntesis se realizó en el laboratorio del Dr. Ángel Messeguer por la doctora Isabel Masip junto con Nuria Cortés y Marisa Guardiola. La caracterización y síntesis de la quimioteca se encuentra detallada en la Tesis Doctoral de Isabel Masip. La quimioteca de N–alquilglicinas está formada por mezclas controladas y la constituyen 5120 compuestos diferentes en el conjunto de la quimioteca, divididos en 52 mezclas (cada compuesto está por triplicado).

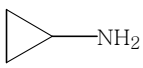
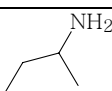
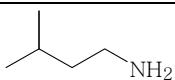
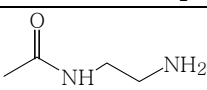
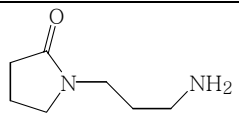
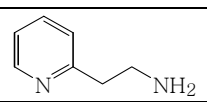
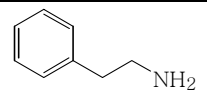
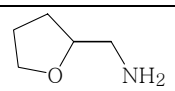
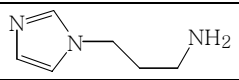
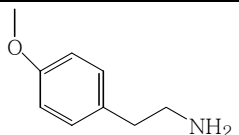
De acuerdo con el formato de rastreo posicional, se puede considerar que se trata de una quimioteca formada por tres subquimiotecas. Cada subquimioteca no tiene los mismos compuestos ya que las fuentes de diversidad no eran las mismas en cada posición, sino que había 20 aminas para la posición R_1 y 16 para las posiciones R_2 y R_3 , de modo que estarían distribuidas en las mezclas de forma diferente. Por lo que habría dos subquimiotecas con 16 mezclas cada una y con 320 compuestos por mezcla y otra con 20 mezclas y 256 compuestos por mezcla. La quimioteca tiene un esqueleto básico como el que se muestra en la [figura 12](#) y diversas aminas (ver [tabla 17](#)) para las correspondientes sustituciones que formarán la diversidad de la quimioteca.

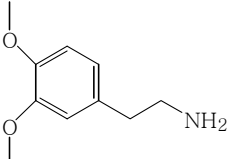
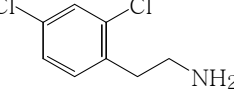
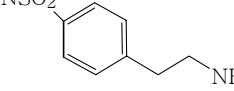
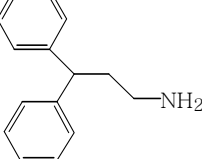
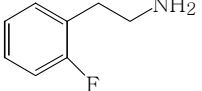
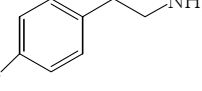
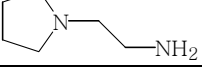
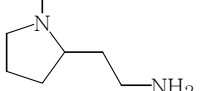
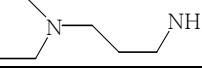
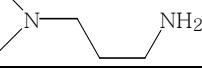
- $16 \times 16 \times 20$ aminas = 5120 compuestos diferentes
- $16 \times 2 + 20 = 52$ mezclas
- $16 \times 20 = 320$ } Compuestos por mezcla
- $16 \times 20 = 320$ }
- $16 \times 16 = 256$ }

Se trata de una quimioteca de Peptoides en cuyo esqueleto básico tenemos tres radicales (R_1 , R_2 , y R_3) de sustitución, puntos en los que se introdujo la diversidad mediante la variación de estas cadenas laterales unidas a los nitrógenos.

Cada una de las tres subquimiotecas daría información sobre una determinada posición del trímero, por lo que en cada mezcla una de las posiciones estaría definida por una determinada amina y el resto de posiciones sería una mezcla de las 16 o 20 aminas utilizadas, dependiendo de la posición que se está introduciendo.

Tabla 17: Aminas utilizadas como fuente de diversidad en la construcción de la quimioteca de peptoides.

#	Nombre	Estructura
1	Ciclopropilamina	
2	2-Butilamina	
3	Isoamilamina	
4	<i>N</i> -Acetiletilenediamina	
5	1-(3-Aminopropil)-2-pirrolidinona	
6	2-(2-Aminoetil)-piridina	
7	Fenetilamina	
8	Tetrahidrofurfurilamina	
9	1-(3-Aminopropil)imidazol	
10	4-Metoxifenetilamina	

11	2-(3,4-Dimetoxifenil)etilamina	
12	2,4-Diclorofenetilamina	
13	4-(2-Aminoetil)benzenosulfonamida	
14	3,3-Difenilpropilamina	
15	2-fluorofenetilamina	
16	4-fluorofenetilamina	
17	1-(2-Aminoetil)pirrolidina	
18	2-(2-Aminoetil)-1-metilpirrolidina	
19	3-Dietilaminopropilamina	
20	3-Dimetilaminopropilamina	

Tal y como se ha mencionado en los puntos R₁, R₂ y R₃ del esqueleto de la quimioteca se sustituyó por las distintas aminas que constituyen la diversidad de moléculas que conforman la quimioteca. El esquema de la secuencia sintética utilizada en la síntesis de mezclas para la creación de la quimioteca se muestra en la [figura 46](#).

En la primera etapa de síntesis se desprotegió el grupo Fmoc de la resina comercial del tipo Rink amida. En el paso del acoplamiento del grupo acilo (etapas 2, 4 y 6) se construyó el esqueleto básico del peptido: el enlace

amida. El paso determinante para generar la quimioteca con la estructura deseada fue la introducción de diversidad mediante el acoplamiento de las aminas primarias (etapas 3, 5 y 7). Se separaron las bolsitas de la subquimioteca que debían de tener la posición definida y a cada una de ellas se le hizo reaccionar por separado, dependiendo de la amina a incorporar. Al resto de mezclas con las posiciones no definidas se les hizo reaccionar conjuntamente y se preparó una mezcla equimolar de las 20 aminas (20 eq de cada amina). Se repitió el ciclo sintético tres veces. En la última etapa se escindieron los productos de la fase sólida mediante tratamiento de ésta con una mezcla formada mayoritariamente por ácido trifluoroacético, diclorometano y agua (etapa 8). Cada etapa sintética se realizó por duplicado empleando un gran exceso de reactivos (20 equivalentes) para llevar las reacciones a la conversión total.

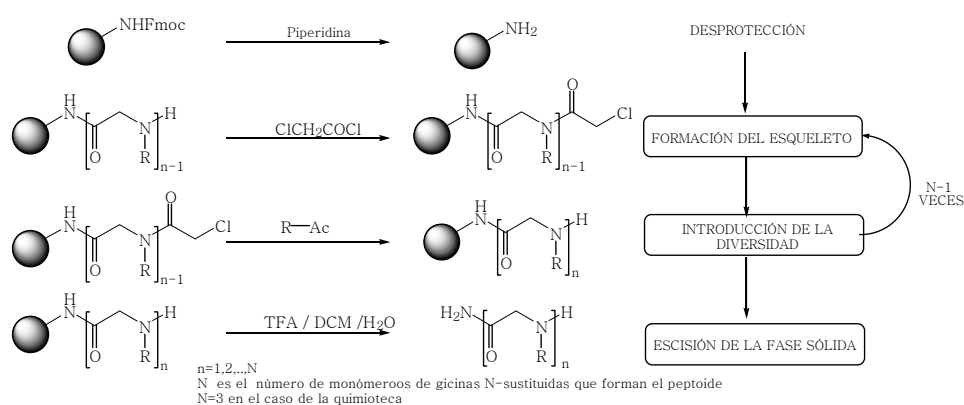


Figura 46: Esquema y etapas de la construcción de peptoides en fase sólida.

Esta síntesis se hizo siguiendo la técnica desarrollada por R. Houhten de dos bolsitas de te, donde en cada bolsita habría una mezcla. Dicha bolsita es porosa a reactivos y disolventes, pero no deja pasar la resina. Las bolsitas se etiquetan de forma permanente con el fin de poder identificar todas las mezclas a lo largo de la síntesis. En la [figura 47](#) se muestra un esquema de la manipulación de las distintas bolsitas para introducir una posición concreta y

definida en la síntesis de la quimioteaca de peptoides en formato de rastreo posicional.

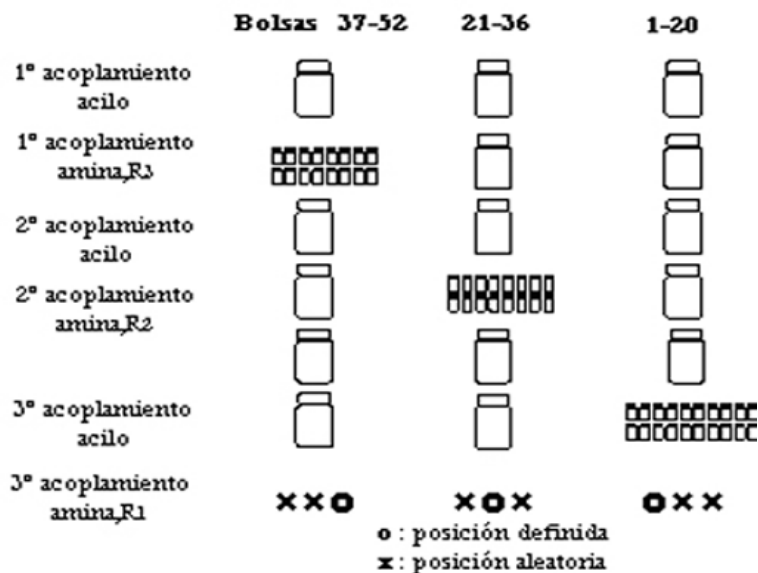


Figura 47: Forma de manipulación de las diferentes bolsitas en la síntesis de la quimioteaca de peptoides en formato de rastreo posicional.

Tal y como se ha mencionado, inicialmente la quimioteaca está formada por mezclas, existiendo una amina fijada en una posición y cubriendo el resto de posiciones con una mezcla equimolar de las 16 o 20 aminas que constituyen la quimioteaca dependiendo de la posición que se esté introduciendo (aminas que constituyen la quimioteaca ver [tabla 5](#)), de modo que son rastreadas todas las posiciones en busca de las aminas que presenten alguna actividad funcional significativa.

7.2. Quimioteaca de DKPs.

Para la síntesis de la quimioteaca de los DKPs se utilizó el procedimiento de síntesis en fase sólida, basado en la estrategia de subfragmentos (Scott, J.K. y Craig, L., 1994) y que consiste en una secuencia sintética de 7 pasos. La versión de la generación de esta quimioteaca consistió

en la introducción de dos puntos de diversidad en los átomos de nitrógeno (ver [tabla 11](#)) Una característica distintiva de este método fue la utilización de una resina de amida en lugar de la resina de éster que se utiliza generalmente. De este modo se excluyen potenciales problemas de lisis de la amina durante su acoplamiento, debido a las aminas que se utilizan, o específicamente a la presencia de aminas sustituyentes que contienen un segundo átomo de nitrógeno.

Así pues, después de retirar el grupo Fmoc de la resina, la amina primaria libre fue acilada por la reacción con el éster N-hidroxisuccinamida del ácido cloroacético. Este éster activo, es de fácil preparación y soluble en diclorometano, al igual que su subproducto N-hidroxisuccinamida, siendo ambos utilizados para evitar la formación de productos laterales que son menos solubles en el medio de reacción. Además, este éster permite el uso de condiciones suaves y neutras que son importantes debido a la naturaleza de los diversos reactivos empleados (Carbonell, T. et al., 2000).

La sustitución nucleofílica subsiguiente del átomo de la clorina fue realizada con una amina primaria, disponible comercialmente, como la primera fuente de diversidad ([tabla 10](#) y [11](#)). Las condiciones de reacción fueron suaves y realizadas a temperatura ambiente, utilizando un exceso de reactivo. Los tratamientos se hicieron por duplicado. La acilación de la amina secundaria ya formada, y seguida de un segundo emplazamiento por una amina primaria completó la inserción de la diversidad deseada.

Hay que destacar que el orden de introducción de las aminas primarias en la secuencia era importante. Para la primera quimioteca de DKP se obtuvieron 64 compuestos en lugar de los 66 esperados (los DKPs que llevan el mismo sustituyente en ambas posiciones no se consideraron en el diseño de la quimioteca). Así, puesto que la síntesis múltiple en paralelo se realizó después del desarrollo de la matriz, las dos aminas primarias empleadas que llevaban el grupo amino terciario adicional N,N-dimetilpropilendiamina y 4-aminoetilmorfolina (ver [tabla 10](#)) fueron utilizadas para la segunda reacción del

reemplazo, excepto en dos casos. Se observó que cuando la 4-aminoetilmorfolina era introducida primero, y una vez que tiene lugar la segunda acilación, la amina terciaria presente en la morfolina, compitió favorablemente con la nueva amina primaria para dar el correspondiente derivado cíclico del tetra-alquilamonio.

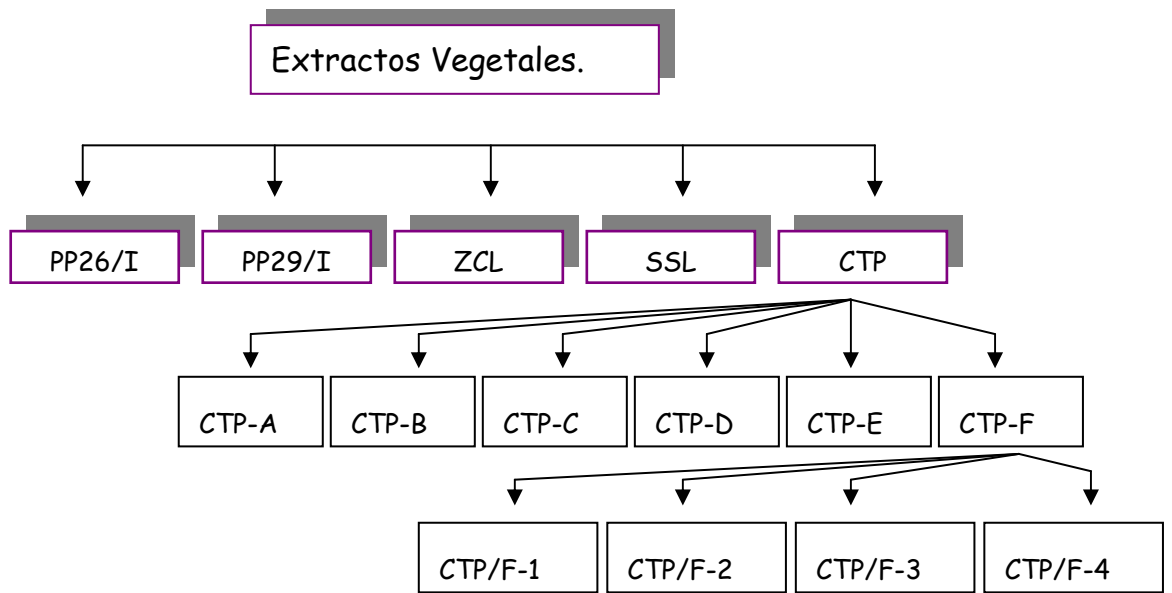
La quimioteca de DKP hija se sintetizó utilizando las aminas que se muestran en la [tabla 11](#) para cada reacción específica de la introducción de la diversidad. Referente a la hendidura de la resina y del paso subsiguiente de la ciclación, se ha descrito que cuando se utilizan los ésteres o las amidas del dipéptido, o ácido o la base puede promover la formación del DKP (Capasso, S. et al., 1998).

Con esta secuencia de la reacción, se generaron 104 DKPs (64 de la primera quimioteca y 40 de la quimioteca hija) fueron sintetizados siguiendo el formato de síntesis múltiple en paralelo. La estructura, la producción y los datos del MS (espectro de masas) fueron determinados para todos los compuestos. Los DKPs mostraron una pureza del 80-90%.

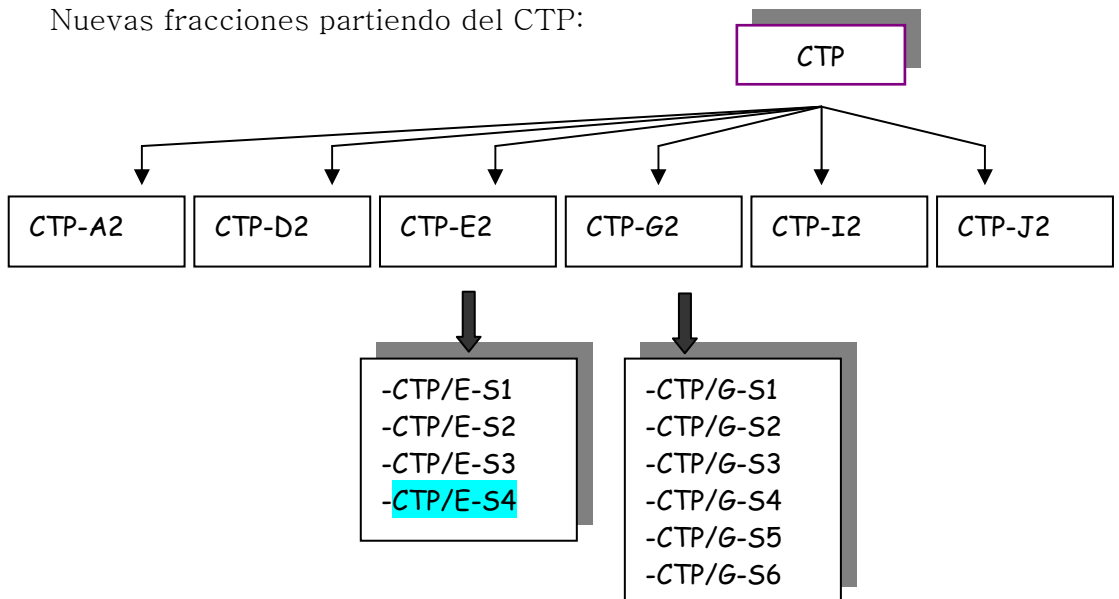
8. Quimiotecas Naturales (Extractos Vegetales).

El estudio con los extractos vegetales presenta una deconvolución lenta. En este trabajo se partió de fracciones grandes con múltiples componentes, que se fueron fragmentando en nuevas subfracciones a medida que se fue avanzando en el estudio de estas fracciones encontrando positivos potenciales, ya que hasta que no finaliza su deconvolución estamos tratando con mezclas y no podemos hablar de ningún principio activo.

Partimos de unas fracciones que nos fueron suministradas por la empresa ASAC Pharma. Todas las fracciones fueron suministradas en clave y algunas de ellas fueron renombradas durante el proceso de deconvolución y subfraccionamiento. El esquema de dichas claves se muestra a continuación.

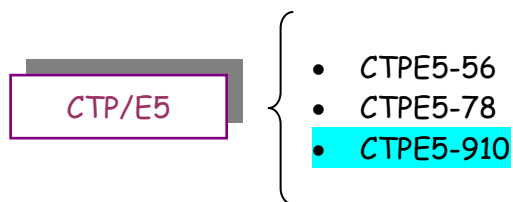


Nuevas fracciones partiendo del CTP:



Seleccionado el CTP/E-S4 y renombrado como:

CTP/E5



Seleccionado el CTPE5-910 y renombrado como:

CTPE-67

CTPE-67

- CTPE67-1
- CTPE67-2
- CTPE67-3a
- CTPE67-3b

Seleccionado el CTPE67-2 y renombrado como:

CTPE67/2

CTPE67/2

- CTPE67/2-1
- CTPE67/2-2
- CTPE67/2-3
- CTPE67/2-4
- CTPE67/2-5
- CTPE67/2-6
- CTPE67/2-7
- CTPE67/2-8

9. Ensayos de Citotoxicidad.

El grado de resistencia (GR) celular de las distintas sublíneas a DNM, se obtuvo a partir del IC_{50} , valor que representa la concentración de DNM a la que se inhibe el crecimiento celular en un 50%. El grado de resistencia de una línea celular al agente quimioestático DNM se calculó analizando la inhibición de crecimiento celular tras haber sido incubadas en presencia de concentraciones crecientes del fármaco (García-Segura, L.M. et al., 1992).

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en un coulter, contador de células electrónico (Ibercell HF-24), o mediante el método de reducción del MTT.

Para el ensayo con el coulter, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/ml en el caso de las incubaciones de

L1210 y de 2×10^5 células/ml en las incubaciones de HL-60. Se realizaron tres incubaciones distintas: 1) Un control de la línea celular para conocer el grado de resistencia inicial. Estas células fueron tratadas únicamente con DNM a concentraciones crecientes. 2) Un segundo grupo incubado con VRP 5 μ M. Este fue el control de referencia para la quimiosensibilización de la línea celular resistente. 3) La tercera incubación fue con la molécula cuyo efecto queríamos analizar. Las células se incubaron durante 24 h a 37° C en una atmósfera humidificada y al 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo las células se contaron en el coulter.

En paralelo, los ensayos de citotoxicidad se realizaron mediante ensayos de reducción del MTT (metiltiazoldifeniltetrazolio) de acuerdo con el método descrito por (Mosmann, T., 1983). Este método permite determinar la viabilidad celular mediante la actividad de una deshidrogenasa mitocondrial que se encuentra activa únicamente en las células viables. La enzima convierte el reactivo de MTT soluble en una sal de formazán de color azul e insoluble en medio acuoso, pero valorable en un espectrofotómetro tras haber sido disuelto en isopropanol ácido o DMSO. La absorbancia medida es proporcional al número de células viables de la muestra.

Para MTT el cultivo celular (L1210, HL-60) se creció en fase exponencial, y se diluyó en medio completo a una densidad de 3×10^5 células/ml en el caso de las células L1210 y de 2×10^5 célula/ml en el caso de las células HL-60, y se distribuyeron (100 μ l/pocillo) en una placa de 96 pocillos (IWAKI). Se añadieron por octuplicado las cantidades de DNM adecuadas para cada línea celular. En estas condiciones se incubaron durante 24h a 37° C en una atmósfera humidificada y al 5% de CO₂. Tras 24 h, se añadieron 10 μ l de la disolución de 5 mg/ml del reactivo MTT y se incubaron 2-3 h adicionales, tras lo cual se centrifugaron para eliminar los sobrenadantes. Una vez bien retirados estos, se añadieron 100 μ l/pocillo de disolvente (Isopropanol 0.1M HCl) y se dejaron a -20° C durante toda la noche. Mediante centrifugación se

eliminaron los restos celulares, se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la absorbancia a 570 nm.

Bibliografía.

1. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, 1996, **Biología Molecular de la célula.**, Barcelona, España.

2. Albet, S., Causeret, C., Bentejac, M., Mandel, J.L., Aubourg, P., Maurice, B., (1997). **Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP-binding transporter proteins of the peroxisomal membrane.** *FEBS Lett.* **405**, p. 394-397.

3. Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A., Dean, M., (1996). **Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database.** *Hum.Mol.Genet.* **5**, p. 1649-1655.

4. Allikmets, R., Raskind, W.H., Hutchinson, A., Schueck, N.D., Dean, M., Koeller, D.M., (1999). **Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A).** *Hum.Mol.Genet.* **8**, p. 743-749.

5. Alluri, P.G., Reddy, M.M., Bachhawat-Sikder, K., Olivos, H.J., Kodadek, T., (2003). **Isolation of protein ligands from large peptoid libraries.** *J Am.Chem.Soc.* **125**, p. 13995-14004.

6. Almarsson, O., Bruice, T.C., Kerr, J., Zuckermann, R.N., (1993). **Molecular mechanics calculations of the structures of polyamide nucleic acid DNA duplexes and triple helical hybrids.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, p. 7518-7522.

7. Alonso, E.M., Snover, D.C., Montag, A., Freese, D.K., Whittington, P.F., (1994). **Histologic pathology of the liver in progressive familial intrahepatic cholestasis.** *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **18**, p. 128–133.
8. Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., (1999). **Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **39**, p. 361–398.
9. Azzaria, M., Schurr, E., Gros, P., (1989). **Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance.** *Mol.Cell Biol.* **9**, p. 5289–5297.
10. Bailar, J.C., III, Smith, E.M., (1986). **Progress against cancer?** *N.Engl.J Med.* **314**, p. 1226–1232.
11. Bakos, E., Evers, R., Szakacs, G., Tusnady, G.E., Welker, E., Szabo, K., de Haas, M., van Deemter, L., Borst, P., Varadi, A., Sarkadi, B., (1998). **Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain.** *J.Biol.Chem.* **273**, p. 32167–32175.
12. Barcelo, F., Barcelo, I., Gavilanes, F., Ferragut, J.A., Yanovich, S., Gonzalez-Ros, J.M., (1986). **Interaction of anthracyclines with nucleotides and related compounds studied by spectroscopy.** *Biochim.Biophys.Acta* **884**, p. 172–181.
13. Barrand, M.A., Bagrij, T., Neo, S.Y., (1997). **Multidrug resistance-associated protein: a protein distinct from P-glycoprotein involved in cytotoxic drug expulsion.** *Gen.Pharmacol* **28**, p. 639–645.
14. Belpomme, D., Gauthier, S., Pujade-Lauraine, E., Facchini, T., Goudier, M.J., Krakowski, I., Netter-Pinon, G., Frenay, M., Gousset, C., Marie, F.N., Benmiloud, M., Sturtz, F., (2000). **Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma.** *Ann.Oncol.* **11**, p. 1471–1476.
15. Bennett, W.M., DeMattos, A., Meyer, M.M., Andoh, T., Barry, J.M., (1996). **Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy.** *Kidney Int.* **50**, p. 1089–1100.
16. Berger, J., Albet, S., Bentejac, M., Netik, A., Holzinger, A., Roscher, A.A., Bugaut, M., Forss-Petter, S., (1999). **The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression.** *Eur.J.Biochem.* **265**, p. 719–727.

-
17. Biedler, J.L., (1992). **Genetic aspects of multidrug resistance.** *Cancer* **70**, p. 1799–1809.
18. Biedler, J.L., Riehm, H., (1970). **Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies.** *Cancer Res.* **30**, p. 1174–1184.
19. Bissett, D., Kerr, D.J., Cassidy, J., Meredith, P., Traugott, U., Kaye, S.B., (1991). **Phase I and pharmacokinetic study of D-verapamil and doxorubicin.** *Br.J.Cancer* **64**, p. 1168–1171.
20. Bolshakova, I.V., Lozovskaya, E.L., Sapezhinski, I.I., (1997). **Antioxidants properties of a number of plant extracts.** *Biofizika* **42** (2), p. 480–483.
21. Booth, C.L., Pulaski, L., Gottesman, M.M., Pastan, I., (2000). **Analysis of the properties of the N-terminal nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein.** *Biochemistry* **39**, p. 5518–5526.
22. Borst, P., Elferink, R.O., (2002). **Mammalian ABC transporters in health and disease.** *Annu.Rev.Biochem.* **71**, p. 537–592.
23. Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J., (2000a). **A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins.** *J.Natl.Cancer Inst.* **92**, p. 1295–1302.
24. Borst, P., Zelcer, N., van Helvoort, A., (2000b). **ABC transporters in lipid transport.** *Biochim.Biophys.Acta* **1486**, p. 128–144.
25. Bourhis, J., Goldstein, L.J., Riou, G., Pastan, I., Gottesman, M.M., Benard, J., (1989). **Expression of a human multidrug resistance gene in ovarian carcinomas.** *Cancer Res.* **49**, p. 5062–5065.
26. Bradley, G., Juranka, P.F., Ling, V., (1988). **Mechanism of multidrug resistance.** *Biochim.Biophys.Acta* **948**, p. 87–128.
27. Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., Plasterk, R.H., (1996). **Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*.** *EMBO J* **15**, p. 6132–6143.
28. Burger, H., Nooter, K., Zaman, G.J., Sonneveld, P., van Wingerden, K.E., Oostrum, R.G., Stoter, G., (1994). **Expression of the multidrug**

resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia* 8, p. 990-997.

29. Camarasa, M.V., Castro-Galache, M.D., Carrasco-Garcia, E., Garcia-Morales, P., Saceda, M., Ferragut, J.A., (2005). **Differentiation and drug resistance relationships in leukemia cells.** *J Cell Biochem.* 94, p. 98-108.

30. Capasso, S., Vergara, A., Mazzarella, L., (1998). **Mechanism of 2,5-dioxopiperazine formation.** *J Am.Chem.Soc.* 120, p. 1990-1995.

31. Carbonell, T., Masip, I., Sanchez-Baeza, F., Delgado, M., Araya, E., Llorens, O., Corcho, F., Perez, J.J., Perez-Paya, E., Messeguer, A., (2000). **Identification of selective inhibitors of acetylcholinesterase from a combinatorial library of 2,5-piperazinediones.** *Mol.Divers.* 5, p. 131-143.

32. Castro-Galache, M.D., Ferragut, J.A., Barbera, V.M., Martin-Orozco, E., Gonzalez-Ros, J.M., Garcia-Morales, P., Saceda, M., (2003). **Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors.** *Int.J.Cancer* 104, p. 579-586.

33. Chaires, J.B., Dattagupta, N., Crothers, D.M., (1982). **Self-association of daunomycin.** *Biochemistry* 21, p. 3927-3932.

34. Childs, S., Ling, V., (1994). **The MDR superfamily of genes and its biological implications.** *Important Adv.Oncol.* p. 21-36.

35. Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G., (1992). **Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.** *Science* 258, p. 1650-1654.

36. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R., Melamed, M.R., (1990). **Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues.** *J Histochem.Cytochem.* 38, p. 1277-1287.

37. Dalton, W.S., Crowley, J.J., Salmon, S.S., Grogan, T.M., Laufman, L.R., Weiss, G.R., Bonnet, J.D., (1995). **A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study.** *Cancer* 75, p. 815-820.

38. Dano, K., (1973). **Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.** *Biochim.Biophys.Acta* **323**, p. 466-483.
39. de Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., Hadchouel, M., (1998). **Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, p. 282-287.
40. Dean, M., Allikmets, R., (1995). **Evolution of ATP-binding cassette transporter genes.** *Curr.Opin.Genet.Dev.* **5**, p. 779-785.
41. Deeley, R.G., Cole, S.P., (1997). **Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP).** *Semin.Cancer Biol.* **8**, p. 193-204.
42. Deleuze, J.F., Jacquemin, E., Dubuisson, C., Cresteil, D., Dumont, M., Erlinger, S., Bernard, O., Hadchouel, M., (1996). **Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis.** *Hepatology* **23**, p. 904-908.
43. Demicheli, R., Jirillo, A., Bonciarelli, G., Lonardi, F., Balli, M., Bandello, A., (1989). **4'epidoxorubicin plus verapamil in anthracycline--refractory cancer patients.** *Tumori* **75**, p. 245-247.
44. di Pietro, A., Conseil, G., Perez-Victoria, J.M., Dayan, G., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Steinfels, E., Jault, J.M., de Wet, H., Maitrejean, M., Comte, G., Boumendjel, A., Mariotte, A.M., Dumontet, C., McIntosh, D.B., Goffeau, A., Castanys, S., Gamarro, F., Barron, D., (2002). **Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters.** *Cell Mol.Life Sci.* **59**, p. 307-322.
45. Dixon, P.H., Weerasekera, N., Linton, K.J., Donaldson, O., Chambers, J., Egginton, E., Weaver, J., Nelson-Piercy, C., de Swiet, M., Warnes, G., Elias, E., Higgins, C.F., Johnston, D.G., McCarthy, M.I., Williamson, C., (2000). **Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking.** *Hum.Mol.Genet.* **9**, p. 1209-1217.
46. Ekins, S., Kim, R.B., Leake, B.F., Dantzig, A.H., Schuetz, E.G., Lan, L.B., Yasuda, K., Shepard, R.L., Winter, M.A., Schuetz, J.D., Wikel, J.H., Wrighton, S.A., (2002). **Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of inhibitors of P-glycoprotein.** *Mol.Pharmacol.* **61**, p. 964-973.

47. Eldrege, N., (1998). **Life in the balance: Humanity and the biodiversity crisis.** *Princeton, New Jersey, Princeton.*
48. Ferry, D., Boer, R., Callaghan, R., Ulrich, W.R., (2000). **Localization of the 1,4-dihydropyridine drug acceptor of P-glycoprotein to a cytoplasmic domain using a permanently charged derivative N-methyl dextrin diphosphate.** *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **38**, p. 130-140.
49. Ficarra, R., Ficarra, P., Tommasini, S., Carulli, M., Melardi, S., Di Bella, M.R., Calabro, M.L., De Pasquale, R., Germano, M.P., Sanogo, R., Casuscelli, F., (1997). **Isolation and characterization of *Guiera senegalensis* J.F.Gmel. active principles.** *Boll.Chim.Farm.* **136**, p. 454-459.
50. Figliozzi, G.M., Goldsmith, R., Ng, S.C., Banville, S.C., Zuckermann, R.N., (1996). **Synthesis of N-substituted glycine peptoid libraries.** *Methods Enzymol.* **267**, p. 437-447.
51. Friedman, M., (1997). **Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols.** *A review.J.Agric.Food Chem.* **45** (5), p. 1523-1540.
52. Gao, M., Loe, D.W., Grant, C.E., Cole, S.P., Deeley, R.G., (1996). **Reconstitution of ATP-dependent leukotriene C4 transport by Co-expression of both half-molecules of human multidrug resistance protein in insect cells.** *J.Biol.Chem.* **271**, p. 27782-27787.
53. Garcia, d.M., O'Valle, F., Andujar, M., Aguilar, M., Lucena, M.A., Lopez-Hidalgo, J., Ramirez, C., Medina-Cano, M.T., Aguilar, D., Gomez-Morales, M., (1995). **Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistological and cell culture study.** *Am.J Pathol.* **146**, p. 398-408.
54. Garcia-Martinez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De La, P.E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A., (2002). **Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, p. 2374-2379.
55. Garcia-Segura, L.M., Soto, F., Planells-Cases, R., Gonzalez-Ros, J.M., Ferragut, J.A., (1992). **Verapamil reverses the ultrastructural alterations in the plasma membrane induced by drug resistance.** *FEBS Lett.* **314**, p. 404-408.
56. Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambudkar, S.V., Licht, T., Cardarelli, C.O., Pastan, I., Gottesman, M.M., (1996). **Characterization of**

phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J Biol.Chem.* **271**, p. 1708-1716.

57. Gottesman, M.M., (1993). **How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture.** *Cancer Res.* **53**, p. 747-754.

58. Gottesman, M.M., (2002). **Mechanisms of cancer drug resistance.** *Annu.Rev.Med.* **53**, p. 615-627.

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

60. Gottesman, M.M., Hrycyna, C.A., Schoenlein, P.V., Germann, U.A., Pastan, I., (1995). **Genetic analysis of the multidrug transporter.** *Annu.Rev.Genet.* **29**, p. 607-649.

61. Gottesman, M.M., Pastan, I., (1993). **Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.** *Annu.Rev.Biochem.* **62**, p. 385-427.

62. Grabley, S., Thiericke, R., (1999). **Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application.** *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* **64**, p. 101-154.

63. Gros, P., Ben Neriah, Y.B., Croop, J.M., Housman, D.E., (1986a). **Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance.** *Nature* **323**, p. 728-731.

64. Gros, P., Croop, J., Housman, D., (1986b). **Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins.** *Cell* **47**, p. 371-380.

65. Hamilton-Miller, J.M., (1995). **Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.).** *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**, p. 2375-2377.

66. Hanania, E.G., Kavanagh, J., Hortobagyi, G., Giles, R.E., Champlin, R., Deisseroth, A.B., (1995). **Recent advances in the application of gene therapy to human disease.** *Am.J Med.* **99**, p. 537-552.

67. Harris, A.L., Hochhauser, D., (1992). **Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment.** *Acta Oncol.* **31**, p. 205-213.

-
68. Hendrikse, N.H., de Vries, E.G., Eriks-Fluks, L., Van Der Graaf, W.T., Hospers, G.A., Willemsen, A.T., Vaalburg, W., Franssen, E.J., (1999). **A new in vivo method to study P-glycoprotein transport in tumors and the blood-brain barrier.** *Cancer Res.* **59**, p. 2411-2416.
69. Higgins, C.F., (1992). **ABC transporters: from microorganisms to man.** *Annu.Rev.Cell Biol.* **8**, p. 67-113.
70. Higgins, C.F., (1994). **P-glycoprotein. To flip or not to flip?** *Curr.Biol.* **4**, p. 259-260.
71. Hipfner, D.R., Deeley, R.G., Cole, S.P., (1999). **Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1.** *Biochim.Biophys.Acta* **1461**, p. 359-376.
72. Houghten, R.A., (1993). **The broad utility of soluble peptide libraries for drug discovery.** *Gene* **137**, p. 7-11.
73. Humet, M., Carbonell, T., Masip, I., Sanchez-Baeza, F., Mora, P., Canton, E., Gobernado, M., Abad, C., Perez-Paya, E., Messeguer, A., (2003). **A positional scanning combinatorial library of peptoids as a source of biological active molecules: identification of antimicrobials.** *J.Comb.Chem.* **5**, p. 597-605.
74. Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F., (1990). **Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport.** *Nature* **346**, p. 362-365.
75. Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., Keppler, D., (1996). **Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump.** *Cancer Res.* **56**, p. 988-994.
76. Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Center, M., Keppler, D., (1994). **ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein.** *Cancer Res.* **54**, p. 4833-4836.
77. Juliano, R.L., Ling, V., (1976). **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.** *Biochim.Biophys.Acta* **455**, p. 152-162.

78. Kast, C., Canfield, V., Levenson, R., Gros, P., (1995). **Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3.** *Biochemistry* **34**, p. 4402-4411.
79. Kavallaris, M., (1997). **The role of multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in multidrug resistance.** *Anticancer Drugs* **8**, p. 17-25.
80. Kaye, S.B., (1988). **The multidrug resistance phenotype.** *Br.J.Cancer* **58**, p. 691-694.
81. Kennedy, M.L., Cortes-Selva, F., Perez-Victoria, J.M., Jimenez, I.A., Gonzalez, A.G., Munoz, O.M., Gamarro, F., Castanys, S., Ravelo, A.G., (2001). **Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*.** *J Med.Chem.* **44**, p. 4668-4676.
82. Kessel, D., Botterill, V., Wodinsky, I., (1968). **Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response.** *Cancer Res.* **28**, p. 938-941.
83. Kickhoefer, V.A., Rajavel, K.S., Scheffer, G.L., Dalton, W.S., Scheper, R.J., Rome, L.H., (1998). **Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines.** *J.Biol.Chem.* **273**, p. 8971-8974.
84. Kirschner, L.S., Greenberger, L.M., Hsu, S.I., Yang, C.P., Cohen, D., Piekartz, R.L., Castillo, G., Han, E.K., Yu, L.J., Horwitz, S.B., (1992). **Biochemical and genetic characterization of the multidrug resistance phenotype in murine macrophage-like J774.2 cells.** *Biochem.Pharmacol.* **43**, p. 77-87.
85. Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D., (1999). **Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance.** *Biochim.Biophys.Acta* **1461**, p. 377-394.
86. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P., (1997). **Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines.** *Cancer Res.* **57**, p. 3537-3547.
87. Langenbuch, T., Mross, K., Jonat, W., Hossfeld, D.K., (1990). **A phase II study of intensive-dose epirubicin/verapamil as induction therapy followed by intensive-dose ifosfamide for advanced breast cancer.** *Cancer Chemother.Pharmacol.* **26 Suppl**, p. S93-S96.

88. Lanning, C.L., Fine, R.L., Sachs, C.W., Rao, U.S., Corcoran, J.J., Abou-Donia, M.B., (1996). **Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein.** *J Toxicol.Environ.Health* **47**, p. 395-407.
89. Lehnert, M., Mross, K., Schueller, J., Thuerlimann, B., Kroeger, N., Kupper, H., (1998). **Phase II trial of dexverapamil and epirubicin in patients with non-responsive metastatic breast cancer.** *Br.J.Cancer* **77**, p. 1155-1163.
90. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S.P., Deeley, R.G., Keppler, D., (1994). **The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates.** *J.Biol.Chem.* **269**, p. 27807-27810.
91. Leveille-Webster, C.R., Arias, I.M., (1995). **The biology of the P-glycoproteins.** *J Membr.Biol.* **143**, p. 89-102.
92. Lin, C.N., Lu, C.M., Lin, H.C., Fang, S.C., Shieh, B.J., Hsu, M.F., Wang, J.P., Ko, F.N., Teng, C.M., (1996). **Novel antiplatelet constituents from formosan moraceous plants.** *J.Nat.Prod.* **59**, p. 834-838.
93. Lincke, C.R., Smit, J.J., van, d., V, Borst, P., (1991). **Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus.** *J.Biol.Chem.* **266**, p. 5303-5310.
94. Ling, V., (1997). **Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance.** *Cancer Chemother.Pharmacol* **40 Suppl**, p. S3-S8.
95. Ling, V., Thompson, L.H., (1974). **Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine.** *J.Cell Physiol* **83**, p. 103-116.
96. Lum, B.L., Fisher, G.A., Brophy, N.A., Yahanda, A.M., Adler, K.M., Kaubisch, S., Halsey, J., Sikic, B.I., (1993). **Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations.** *Cancer* **72**, p. 3502-3514.
97. Mann, C.C., Plummer, M.L., (1996). **Noah's choice. The future of endangered species.** *New York* p. 302.
98. Masters, J.R., (1990). **Biochemical basis of resistance to chemotherapy.** *Radiother.Oncol.* **19**, p. 297-305.

99. Miyake, T., Shibamoto, T., (1997). **Antioxidative activities of natural compounds found in plants.** *J.Agr.Food Chem.* **45**, p. 1819-1822.
100. Mosmann, T., (1983). **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol.Methods* **65**, p. 55-63.
101. Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L., Aubourg, P., (1993). **Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters.** *Nature* **361**, p. 726-730.
102. Motzer, R.J., Lyn, P., Fischer, P., Lianes, P., Ngo, R.L., Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., (1995). **Phase I/II trial of dexverapamil plus vinblastine for patients with advanced renal cell carcinoma.** *J.Clin.Oncol.* **13**, p. 1958-1965.
103. Mross, K., Bohn, C., Edler, L., Jonat, W., Queisser, W., Heidemann, E., Goebel, M., Hossfeld, D.K., (1993). **Randomized phase II study of single-agent epirubicin +/- verapamil in patients with advanced metastatic breast cancer. An AIO clinical trial. Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie of the German Cancer Society.** *Ann.Oncol.* **4**, p. 45-50.
104. Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G., Jansen, P.L., (1994). **Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, p. 13033-13037.
105. Myers, N., (1998). **Overview: Securing the fabric of life.** *People.Planet.* **7**, p. 6-9.
106. Navarro, V., Rojas, G., Delgado, G., Lozoya, X., (1998). **Antimicrobial compounds detected in Bocconia arborea extracts by a direct bioautographic method.** *Arch.Med.Res.* **29**, p. 191-194.
107. Nuti, S.L., Mehdi, A., Rao, U.S., (2000). **Activation of the human P-glycoprotein ATPase by trypsin.** *Biochemistry* **39**, p. 3424-3432.
108. Ortega, T., Carretero, M.E., Pascual, E., Villar, A.M., Chiriboga, X., (1996). **Anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of plants used in traditional medicinen in Ecuador.** *Phytother Res.* **10 (Supl 1)**, p. 121-122.

109. Ozols, R.F., Cunnion, R.E., Klecker, R.W., Jr., Hamilton, T.C., Ostchega, Y., Parrillo, J.E., Young, R.C., (1987). **Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients.** *J Clin. Oncol.* **5**, p. 641-647.
110. Perez-Victoria, J.M., Perez-Victoria, F.J., Conseil, G., Maitrejean, M., Comte, G., Barron, D., di Pietro, A., Castanys, S., Gamarro, F., (2001). **High-affinity binding of silybin derivatives to the nucleotide-binding domain of a Leishmania tropica P-glycoprotein-like transporter and chemosensitization of a multidrug-resistant parasite to daunomycin.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, p. 439-446.
111. Perez-Victorias, F.J., Conseil, G., Munoz-Martinez, F., Perez-Victoria, J.M., Dayan, G., Marsaud, V., Castanys, S., Gamarro, F., Renoir, J.M., di Pietro, A., (2003). **RU49953: a non-hormonal steroid derivative that potently inhibits P-glycoprotein and reverts cellular multidrug resistance.** *Cell Mol. Life Sci.* **60**, p. 526-535.
112. Pinilla, C., Appel, J.R., Houghten, R.A., (1994). **Investigation of antigen-antibody interactions using a soluble, non-support-bound synthetic decapeptide library composed of four trillion (4×10^{12}) sequences.** *Biochem. J* **301** (Pt 3), p. 847-853.
113. Pinilla, C., Martin, R., Gran, B., Appel, J.R., Boggiano, C., Wilson, D.B., Houghten, R.A., (1999). **Exploring immunological specificity using synthetic peptide combinatorial libraries.** *Curr. Opin. Immunol.* **11**, p. 193-202.
114. Planells-Cases, R., Montoliu, C., Humet, M., Fernandez, A.M., Garcia-Martinez, C., Valera, E., Merino, J.M., Perez-Paya, E., Messeguer, A., Felipo, V., Ferrer-Montiel, A., (2002). **A novel N-methyl-D-aspartate receptor open channel blocker with in vivo neuroprotectant activity.** *J Pharmacol Exp Ther* **302**, p. 163-173.
115. Pujol, A., Troffer-Charlier, N., Metzger, E., Chimini, G., Mandel, J.L., (2000). **Characterization of the adrenoleukodystrophy-related (ALDR, ABCD2) gene promoter: inductibility by retinoic acid and forskolin.** *Genomics* **70**, p. 131-139.
116. Raviv, Y., Pollard, H.B., Bruggemann, E.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., (1990). **Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells.** *J Biol. Chem.* **265**, p. 3975-3980.
117. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1997). **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Trends-plant SCL.* **2** (4), p. 152-159.

118. Robert, J., Jarry, C., (2003). **Multidrug resistance reversal agents.** *J.Med.Chem.* **46**, p. 4805–4817.
119. Roninson, I.B., (1992). **The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo.** *Biochem.Pharmacol.* **43**, p. 95–102.
120. Samuelsson, G., Farah, M.H., Claeson, P., Hagos, M., Thulin, M., Hedberg, O., Warfa, A.M., Hassan, A.O., Elmi, A.H., Abdurahman, A.D., .. (1992). **Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia. II. Plants of the families Combretaceae to Labiatae.** *J.Ethnopharmacol.* **37**, p. 47–70.
121. Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J., Clevers, H.C., Scheper, R.J., (1995). **The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein.** *Nat.Med.* **1**, p. 578–582.
122. Scheithauer, W., Kornek, G., Kastner, J., Raderer, M., Locker, G., Depisch, D., Pidlich, J., Tetzner, C., (1993). **Phase II study of D-verapamil and doxorubicin in patients with metastatic colorectal cancer.** *Eur.J.Cancer* **29A**, p. 2337–2338.
123. Scott, J.K., Craig, L., (1994). **Random peptide libraries.** *Curr.Opin.Biotechnol.* **5**, p. 40–48.
124. Simon, R.J., Kania, R.S., Zuckermann, R.N., Huebner, V.D., Jewell, D.A., Banville, S., Ng, S., Wang, L., Rosenberg, S., Marlowe, C.K., .. (1992). **Peptoids: a modular approach to drug discovery.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, p. 9367–9371.
125. Soto, F., Canaves, J.M., Gonzalez-Ros, J.M., Ferragut, J.A., (1992). **Rapid kinetics of the interaction between daunomycin and drug-sensitive or drug-resistant P388 leukemia cells.** *FEBS Lett.* **301**, p. 119–123.
126. Stavrovskaya, A.A., (2000). **Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells.** *Biochemistry (Mosc.)* **65**, p. 95–106.
127. Stoner, G.D., Mukhtar, H., (1995). **Polyphenols as cancer chemopreventive agents.** *J.Cell Biochem.Suppl* **22**, p. 169–180.
128. Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G.,

Freimer, N.B., Gardiner, R.M., Thompson, R.J., (1998). **A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis.** *Nat.Genet.* **20**, p. 233-238.

129. Tan, B., Piwnicka-Worms, D., Ratner, L., (2000). **Multidrug resistance transporters and modulation.** *Curr.Opin.Oncol.* **12**, p. 450-458.

130. Tuxill, J., (1999). **Nature's cornucopia: Our stake in plant diversity.** *Washington, DC., Worldwatch Institute, Sep.(Worldwatch Paper No.148)* p. 85.

131. Twentyman, P.R., (1992). **Cyclosporins as drug resistance modifiers.** *Biochem.Pharmacol* **43**, p. 109-117.

132. van der, H.S., Gheuens, E., DeBruijn, E., Van Oosterom, A., Maes, R., (1995). **P-glycoprotein: clinical significance and methods of analysis.** *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* **32**, p. 221-264.

133. van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G., (1996). **MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine.** *Cell* **87**, p. 507-517.

134. Varma, M.V., Ashokraj, Y., Dey, C.S., Panchagnula, R., (2003). **P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement.** *Pharmacol.Res.* **48**, p. 347-359.

135. Wandel, C., Kim, R.B., Kajiji, S., Guengerich, P., Wilkinson, G.R., Wood, A.J., (1999). **P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies.** *Cancer Res.* **59**, p. 3944-3948.

136. Warner, E., Hedley, D., Andrulis, I., Myers, R., Trudeau, M., Warr, D., Pritchard, K.I., Blackstein, M., Goss, P.E., Franssen, E., Roche, K., Knight, S., Webster, S., Fraser, R.A., Oldfield, S., Hill, W., Kates, R., (1998). **Phase II study of dexverapamil plus anthracycline in patients with metastatic breast cancer who have progressed on the same anthracycline regimen.** *Clin.Cancer Res.* **4**, p. 1451-1457.

137. Willman, C.L., (1997). **The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia: studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program.** *Semin.Hematol.* **34**, p. 25-33.

138. Wilson, D.B., Pinilla, C., Wilson, D.H., Schroder, K., Boggiano, C., Judkowski, V., Kaye, J., Hemmer, B., Martin, R., Houghten, R.A., (1999). **Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands.** *J Immunol.* **163**, p. 6424-6434.
139. Wilson,SR, A W Czarnik, 1999, **Combinatorial chemisty: Synthesis and application.**, New York.
140. Wilson, W.H., Bates, S.E., Fojo, A., Bryant, G., Zhan, Z., Regis, J., Wittes, R.E., Jaffe, E.S., Steinberg, S.M., Herdt, J., ., (1995). **Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphomas refractory to EPOCH chemotherapy.** *J.Clin.Oncol.* **13**, p. 1995-2004.
141. Young, J., Holland, I.B., (1999). **ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on.** *Biochim.Biophys.Acta* **1461**, p. 177-200.
142. Zaman, G.J., Flens, M.J., van Leusden, M.R., de Haas, M., Mulder, H.S., Lankelma, J., Pinedo, H.M., Scheper, R.J., Baas, F., Broxterman, H.J., ., (1994). **The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, p. 8822-8826.
143. Zuckermann, R.N., (1993). **The chemical synthesis of peptidomimetic libraries.** *Curr.Opin.Struct Biol.* **3**, p. 580-584.

Apéndice.

1. Abreviaturas.

ABC	Familia de transportadores con sitio de unión de ATP.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARN-m	ARN mensajero.
ATP	Adenosín trifosfato.
CMF	Citometría de flujo.
DCM	Diclorometano.
DIC	Diisopropilcarbodiimida.
DMF	Dimetilformamida.
DMSO	Dimetilsulfoxido.
DNM	Daunomicina / Daunorrubicina.
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonil.
GR	Grado de Resistencia.

LRP	Proteína asociada a la resistencia pulmonar (Lung resistance-related protein).
MDR	Resistencia a múltiples fármacos (multidrug resistance).
MRP	Proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (Multiple drug resistance protein).
MTT	Metiltiazoldifeniltetrazolio.
NBD	Dominio de unión a nucleótidos.
P-gp	Glicoproteína-P.
PyBOP	O-Benzotriazol-1-yl-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato.
PyBrOP	Bromo-tri-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato.
RP	Rastreo Posicional.
RP-LSCs	Librerías sintéticas por química combinatoria.
TM	Dominio transmembrana.
TFA	Ácido trifluoroacético.
VRP	Verapamilo

2. Índice de Figuras.

Figura 1: Control normal y alterado de la producción de células a partir de células madre. _____	4
Figura 2: Progresión de un tumor. _____	5
Figura 3: Topología de la Glicoproteína-P en la membrana plasmática. ____	13
Figura 4: Estructura tridimensional de Glicoproteína-P. _____	15
Figura 5: Mecanismo de acción de Glicoproteína-P. _____	16
Figura 6: Topología de MRP1 en la membrana plasmática. _____	19
Figura 7: Estructuras de algunos de los reversores de MDR. _____	24
Figura 8: Modelo del mecanismo extrusor de Glicoproteína-P. _____	37
Figura 9: Análisis por citometría de flujo de la acumulación intracelular de DNM. _____	37
Figura 10: Acumulación relativa de DNM.	
A) En la línea celular L1210 _____	38
B) En la línea celular HL-60. _____	39
Figura 11: Síntesis en fase sólida de peptoides. _____	41
Figura 12: Fórmula genérica de la química combinatoria de peptoides. ____	42
Figura 13: Esquema de síntesis de la quimioteca de peptoides. _____	42
Figura 14: Cribado de las tres posiciones (R_1 , R_2 y R_3) de la quimioteca de N-alquilglicinas. _____	45
Figura 15: Cribado de los peptoides definidos en L1210R. _____	50
Figura 16: Cribado de los peptoides definidos en L1210 ^{P-gp} . _____	51
Figura 17: Ensayo de citotoxicidad en L1210. _____	53

Figura 18: Cribado de los peptoides definidos en HL-60R. _____	55
Figura 19: Ensayo de citotoxicidad en HL-60. _____	56
Figura 20: Ensayo de citotoxicidad en HL-60 y HL-60 tratadas con los peptoides numerados como 13 y 17. _____	56
Figura 21: Síntesis en fase sólida de la quimioteca de DKP. _____	58
Figura 22: Esqueleto de la molécula nº 23 de la quimioteca de DKP-II. __	62
Figura 23: Acumulación intracelular de DNM en L1210R preincubadas con la molécula nº 23 de la quimioteca de los N-óxidos. _____	63
Figura 24: Viabilidad en L1210R con la molécula nº 23 de la quimioteca de los N-óxidos. _____	64
Figura 25: Ensayo de citotoxicidad con la molécula nº 23 de la quimioteca de DKP-II y de N-óxidos. _____	65
Figura 26: Cribado de la primera fracción de un extracto vegetal. _____	67
Figura 27: Cribado de la fracción CTP-F del extracto. _____	68
Figura 28: Ensayo de citotoxicidad con la fracción CTP-F del extracto en L1210. _____	69
Figura 29: Cribado de la fracción CTP-F y sus subfracciones en la línea celular L1210R. _____	70
Figura 30: Cribado de la fracción CTP-F y sus subfracciones en la línea celular HL-60R. _____	70
Figura 31: Cribado de nuevas fracciones del CTP en la línea celular L1210R. _____	72
Figura 32: Cribado de nuevas fracciones del CTP en la línea celular HL-60R. _____	72
Figura 33: Cribado de fracciones provenientes del CTP-E2 y CTP-G2 en las líneas celulares L1210R. _____	73
Figura 34: Cribado de fracciones provenientes del CTP-E2 y CTP-G2 en la línea celular HL-60R. _____	73

Figura 35: Cribado de fracciones provenientes del CTPE-S4 en la línea celular L1210R. _____	74
Figura 36: Cribado de fracciones provenientes del CTPE-S4 en la línea celular HL-60R. _____	74
Figura 37: Cribado de fracciones CTPE67, proveniente del CTPE5-910 en la línea celular L1210R. _____	75
Figura 38: Cribado de fracciones CTPE67, proveniente del CTPE5-910 en la línea celular HL-60R. _____	76
Figura 39 Citotoxicidad con las fracciones (A) CTP67-1, (B) CTPE67-2 y (C) CTPE67-3a del extracto vegetal en la línea celular HL-60. _____	78
Figura 40 Cribado de fracciones provenientes del CTPE67/2 en la línea celular L1210R. _____	79
Figura 41: Cribado de fracciones provenientes del CTPE67/2 en la línea celular HL-60R. _____	79
Figura 42 Citotoxicidad con las fracciones (A) CTP67/2-4, (B) CTPE67/2-5 y (C) CTPE67/2-8 del extracto vegetal en la línea celular HL-60. _____	80
Figura 43: Acumulación intracelular de DNM con las fracciones mayoritarias derivadas del extracto vegetal HL-60R. _____	82
Figura 44: Modelo farmacofórico de reversiones de MDR. _____	86
Figura 45: Esquema del ensayo de acumulación intracelular de DNM por citometría de flujo. _____	96
Figura 46: Construcción de peptoides en fase sólida. _____	100
Figura 47: Manipulación en la síntesis de la quimioteca de peptoides con formato de rastreo posicional. _____	101

3. Índice de Tablas.

Tabla 1: Compuestos que interactúan con Glicoproteína-P. _____	16
Tabla 2: Funciones de Glicoproteína-P. _____	17
Tabla 3: Compuestos probados en clínica como reversores de MDR. ____	23
Tabla 4: Compuestos antitumorales provenientes de plantas. _____	31
Tabla 5: Aminas utilizadas en las diferentes posiciones de diversidad de la quimioteca de peptoides. _____	43
Tabla 6: Aminas seleccionadas para la síntesis de compuestos definidos en la quimioteca de N-alquilglicinas. _____	46
Tabla 7: Definidos que constituyen la deconvolución de la quimioteca de N-alquilglicinas. _____	46
Tabla 8: Grado de Resistencia de las células L1210R control y tratadas con VRP y peptoides. _____	54
Tabla 9: Grado de Resistencia de las células HL-60R control y tratadas con VRP y los peptoides. _____	57
Tabla 10: Diversidad de aminas primarias empleadas en la generación de la quimioteca de DKP. _____	58
Tabla 11: Diversidad de aminas primarias utilizadas en la generación de la quimioteca hija de DKP. _____	59
Tabla 12: Valores de acumulación intracelular de DNM tras la preincubación de las L1210R con los DKPs. _____	60
Tabla 13: Grado de Resistencia de las células L1210R tratadas con el DKP nº 23 de los DKP-II y N-óxido. _____	65
Tabla 14: Grado de Resistencia de las células L1210R tratadas con la fracción CTP-F. _____	69
Tabla 15: Viabilidad en la línea celular HL-60, con las fracciones CTP67-1, CTPE67-2 y CTPE67-3a. _____	76

Tabla 16: Análisis por HPLC de fracciones del extracto vegetal. _____ 81

Tabla 17: Aminas utilizadas como fuente de diversidad en la construcción de la quimioteca de peptoides. _____ 98