



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
Universidad Católica De Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de los extractos metonólico y de acetato de etilo de *Hedyosmum scabrum*, *H. racemosum* y *H. purpurascens*, en las líneas celulares RKO, MCF-7, D384 y PC3 mediante el ensayo MTS.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Sutherland Nelson, Deyfa Ivy.

DIRECTOR: Bailón Moscoso Natalia Catalina, Dra.

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de los extractos metonólico y de acetato de etilo de *Hedyosmum scabrum*, *H. racemosum* y *H. purpurascens*, en las líneas celulares RKO, MCF-7, D384 y PC3 mediante el ensayo MTS realizado por Sutherland Nelson, Deyfa Ivy, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2013

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Deyfa Ivy Sutherland Nelson, declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de los extractos metonólico y de acetato de etilo de *Hedyosmum scabrum*, *H. racemosum* y *H. purpurascens*, en las líneas celulares RKO, MCF-7, D384 y PC3 mediante el ensayo MTS, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.
Autor **Deyfa Sutherland Nelson**
Cédula 701890101

DEDICATORIA

“La pluma empuñada en son de la verdad confiere versos llenos del saber, son las palabras del alma aquellas que no se pronuncian sin probar el verde cielo de mi boca, confiriéndole fuerza al verbo y pausa al adjetivo. Pronunciando con el cariño de mi corazón y la felicidad de una etapa culminada, dedico con ternura este, el fruto de mi esfuerzo durante un maravilloso viaje que, aunque finiquitado aquí en mi patria adoptiva, no dejará de continuar mientras el saber y el conocimiento estén a mi lado“. Por esta razón le dedico a mis padres, además de mi vida, este documento, sabiendo que ellos fueron quienes nunca dejaron de creer en mi y me apoyaron en cada paso del camino, así también a mi patria que siempre me recibió con los brazos abiertos y en esencia a mi Dios que perpetua mi vida perenne continuamente para dar luz a mis ojos.

AGRADECIMIENTO

Dios no nos da más de lo que podamos manejar, y le agradezco el brindarme el discernimiento que me ha permitido atravesar la jornada que pasé conociendo un nuevo mundo, cuyas costumbres y paisajes me han cautivado. Ver como lo moderno se conjuga con el ancestral y como estos convergen de una manera tan única me da, tanto alegría como nostalgia. Así también les agradezco a mis padres y todas aquellas personas que conocí en el camino, tan maravillosas como interesantes, con corazón cálido que me dieron abrigo cuando estuve peregrinando mi camino por esta noble nación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
RESUMEN	9
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Capítulo I	5
Perspectivas cáncer y crecimiento tumoral	5
1.1. Definición del cáncer	6
1.2. Incidencia del cáncer	6
1.2.1. Cáncer de colon	8
1.2.2. Cáncer de mama	8
1.2.3. Cáncer prostático:	9
1.2.4. Astrocitoma cerebral	10
1.3. Aspectos generales del crecimiento tumoral	11
1.4. Inducción, evolución y proliferación tumoral	12
1.4.1. Fases de crecimiento tumoral	14
1.5. Inhibición del crecimiento tumoral	17
1.5.1. Modelos de estudio para la inhibición del crecimiento tumoral	20
1.5.2. Crecimiento exponencial y el modelo Skipper-Schabel-wilcox	22
1.6. Quimioterapia	23
Capítulo II	25
<i>Etnobotánica y genero Hedyosmum en Ecuador</i>	25
2.1. Metabolitos secundarios en la búsqueda de agentes antitumorales	26
2.2. Bioconocimiento en la búsqueda de nuevos agentes fitoterapéuticos	28
2.3. Antecedentes experimentales	30
2.4. Género Hedyosmum	31
2.5. Especies Hedyosmum	32
Capítulo III	34
<i>Modelo experimental</i>	34
3.1. Ensayos de proliferación celular en la obtención de nuevos metabolitos.	35
3.2. Metodologías de análisis de plantas antitumorales	36
3.3. Ensayos con quimiosensibilidad	37
3.4. Principios Ensayo MTS	38

3.5. Condiciones de trabajo	39
3.5.1. Extractos y compuestos	40
3.5.2. Modelos biológicos	40
3.6. Metodología experimental	41
3.7. Interpretación de resultados	44
3.7.1. Porcentaje de inhibición:	44
3.8. Determinación de IC ₅₀ :	44
CAPÍTULO IV	46
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	46
4.1 Determinación de porcentaje de inhibición:	47
4.2 Determinación de IC ₅₀	57
<i>CONCLUSIONES</i>	59
<i>RECOMENDACIONES</i>	59
BIBLIOGRAFÍA	60
<i>ANEXOS</i>	68

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

Figura 1 Mortalidad de cáncer en hombres a nivel mundial.....	7
Figura 2 Mortalidad de cáncer en mujeres a nivel mundial.....	7
Figura 3:Hitos del cáncer.	12
Figura 4: Gráfica de crecimiento logatímico.....	16
Figura 5. Ruta metodológica completa de la experimentación para la búsqueda de agentes antineoplásicos provenientes de plantas.....	36
Figura 6 Moléculas implicadas en el ensayo MTS.	40
Figura 7 . Modelos biológicos en donde se evaluó la capacidad inhibitoria de los extractos del genero <i>Hedyosmum</i>	42
Figura 8 Metodología experimental.....	44
Figura 9 Modelo de curva resultante de la determinación del IC ₅₀ , en DT030.	46
Figura 10 Curva de regresión de primer orden de D384 y MCF-7 en exposición de <i>H. racemosum</i> y <i>H. purpurascens</i>	

TABLAS

Tabla 1. Caracterización de las especies del género <i>Hedyosmum</i> con presunta actividad antitumoral y sus metabolitos secundarios	34
Tabla 2 Porcentaje de inhibición en extractos d género <i>Hedyosmum</i> (50µg/ml) mediante ensayo MTS.....	478
Tabla 3 Modelo de proliferación celular de D384 con respecto a la cantidad de células en el control negativo.	51
Tabla 4 Resultados relativos a la ley de Skipper (<i>log-kill 3</i>) en las líneas celulares de interés con respecto a los extractos con un porcentaje de inhibición significativo (>50%).	52
Tabla 5. Resultados de la obtención de la IC ₅₀ en metabolitos secundarios obtenidos a partir del género <i>Hedyosmum</i>	54

ABREVIATURAS

DMSO: Dimetilsulfóxido.

D-384: Línea celular correspondiente a astrocitoma cerebral.

DT030: compuesto con presunta actividad antitumoral proveniente de *H.racemosum*.

H.racemosum: *Hedyosmum racemosum*.

H.scabrum: *Hedyosmum scabrum*.

H. purpurascens: *Hedyosmum purpurascens*.

MCF-7: Línea celular correspondiente al cáncer de mama.

MTS: Reactivo de Owen [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolium.

MTT: Metil tiazol tetrazolium.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotide.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PC-3: Línea celular correspondiente al cáncer de próstata.

PMS: metosulfato de fenazina.

RKO: Línea celular correspondiente al cáncer de colon.

TR: Tiempo de replicación.

VMZ 111: compuesto aislado de *H. scabrum*.

VMZ 194: compuesto aislado de *H. scabrum*.

VMZ 204: compuesto aislado de *H. scabrum*.

UTPL: Universidad Técnica Particular de Loja.

RESUMEN

El cáncer es un grupo de enfermedades consideradas una de las principales causa de muerte por patologías crónicas. Extractos metanólicos y en acetato de etilo de *H. purpurascens*, *H. scabrum*, *H. racemosum*, fueron probados en las líneas celulares tumorales (MCF-7, PC-3, D-384, RKO) determinando su porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral, teniendo como resultado una inhibición en todas las líneas celulares cuando fueron expuestas a los extractos de acetato de etilo de *H. purpurascens* (59%, 80%, 73% y 70% respectivamente) y *H. racemosum* (56%, 57%, 70%, 64% respectivamente). Seguidamente se determinó el IC_{50} de metabolitos secundarios de *H. racemosum* (DT030) y *H. scabrum* (VMZ194, VMZ204 y VMZ111) los cuales no presentan actividad antitumoral ($IC_{50} > 100 \mu M$). Con dichos resultados obtenidos se puede determinar que aunque los extractos de *H. purpurascens* y *racemosum* tuvieron efectos inhibitorios significativos, no se encontraron los metabolitos secundarios responsables de dicha acción, por lo cual se deben indagar en nuevos metabolitos dentro de las especies anteriormente mencionadas en las líneas celulares de estudio.

PALABRAS CLAVES: Extractos, IC_{50} , líneas celulares, metabolitos secundarios , porcentaje de inhibición,.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases considerate the principal cause of death by chronic pathologies. Metanolic and ethyl acetate extracts of *Hedyosmum purpurascens*, *scabrum* and *racemosum* species were tested on four cell lines, MCF-7, RKO, D-384 and PC-3, determining the percentage of their tumor growing inhibition, resulting into a significant inhibition for all cell lines tested on the for *H. purpurascens* (59%, 80%, 73% y 70% respectively) and *H. racemosum* (56%, 57%, 70%, 64% respectively) both in ethyl acetate. Consequently IC₅₀ of *H. racemosum* (DT030) and *H.scabrum* (VMZ194, VMZ204 and VMZ111) have been tested, having as result a poor inhibition of antitumor activity (IC₅₀>100 µM) in all metabolites. Previous results could determine that despite the significance obtained from *H. purpurascens* and *racemosum*, the associated metabolites were not founded this inhibitory property, for this reason new metabolites have to be proved in the mentioned species in the correspondent cell lines.

KEYWORDS: Extracts, Cell lines, IC₅₀, inhibition percentage, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad cuya particularidad incurre en la proliferación celular descontrolada, las células proliferan escapando a los mecanismos de control (Cancer research UK, 2013). La Organización mundial de la salud (OMS, 2013), define el término cáncer a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer.

Los descubrimientos farmacológicos de las últimas décadas basados en la evaluación sistemática de plantas superiores, han contribuido en la fabricación y diseño de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. Este hecho ha provocado un creciente interés por el aprovechamiento de los recursos naturales, así como el desarrollo de la industria de las plantas aromáticas y medicinales a nivel mundial, desarrollando cadenas productivas de derivados de extractos de plantas aromáticas, la cual ha demostrado crecimientos anuales del 10% a nivel mundial (Castañeda, 2007).

Los metabolitos secundarios son productos de origen natural, los cuales juegan un rol importante en la aminoración enfermedades. Adicionalmente, los estudios de nuevos agentes anticancerígenos con estos agentes han demostrado ser descubrimientos de alto interés tanto científico como económico (Orhan, 2012). Los metabolitos secundarios son sumamente reactivos y ello da a lugar a reacciones indiscriminadas como un amplio rango de componentes celulares (Marroquin, 2010).

En el presente documento se describen cuatro capítulos en donde se pretende guiar al lector en perspectiva al conocimiento del cáncer, como enfermedad de gran trascendencia a nivel mundial, fundamentando el crecimiento tumoral, conjunto con teorías de relevancia para la investigación y llegando hacia la quimioterapéutica como tratamiento antitumoral. A continuación se toman en cuenta las bases fitoquímicos de la quimioterapéutica y las nuevas tendencias con respecto al conocimiento ancestral dando como referencia los especímenes de estudio de la investigación. El tercer capítulo compete la metodología del ensayo incurriendo en las bases celulares y moleculares concernientes, que permiten llegar a la determinación de la actividad antitumoral, así

como una descripción de la metodología y materiales empleados. Por último se presentan los resultados de la fase experimental con su respectiva discusión en donde se llevará al lector las conclusiones y recomendaciones referentes a dicha actividad.

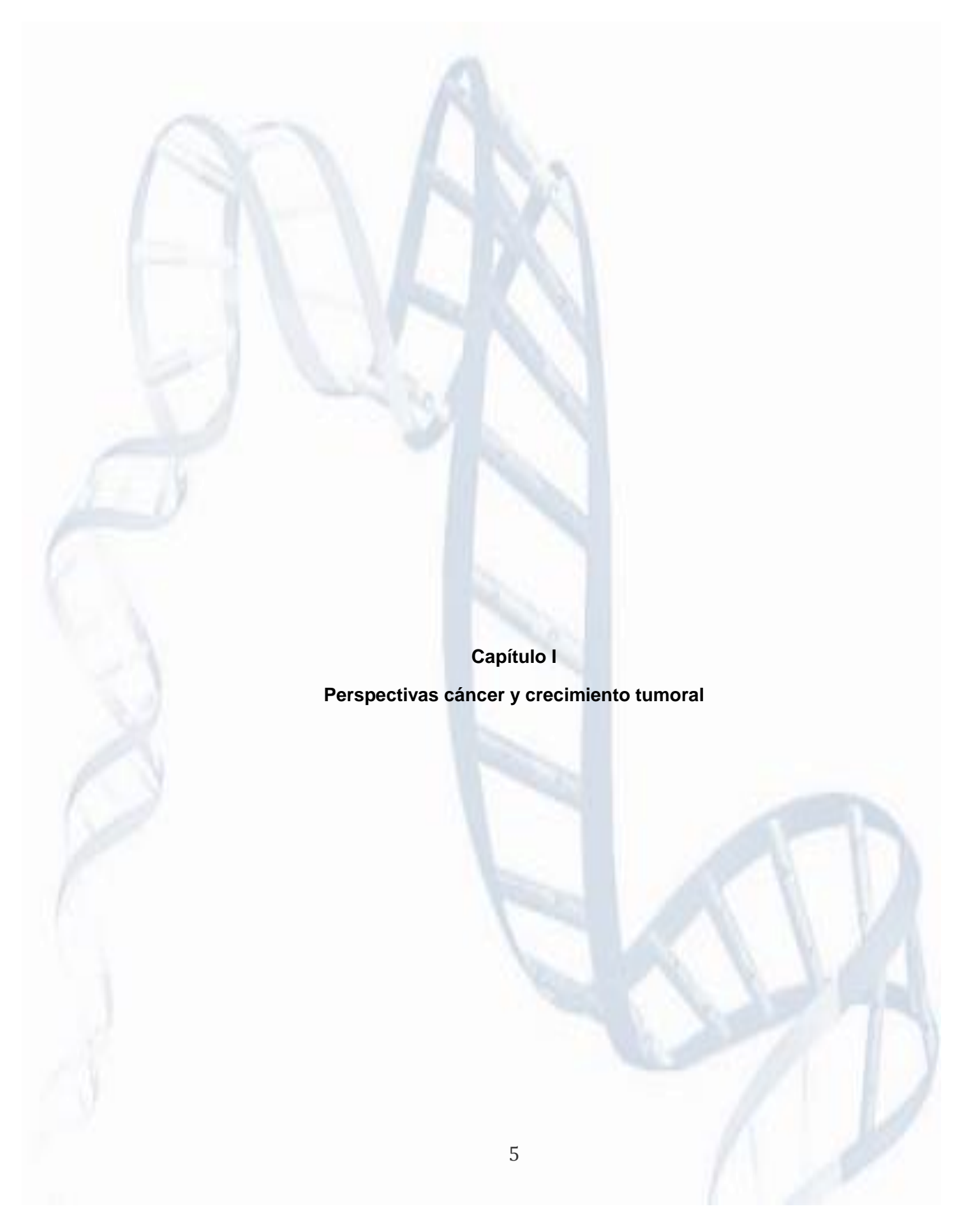
Este trabajo forma parte del proyecto de investigación: "Estudio ecológico y químico de *Hedyosmum* spp. (*Chloranthaceae*) en la provincia de Loja y Zamora, que se desarrolla en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

El objetivo de dichos ensayos es servir de precedente de la actividad antitumoral de los extractos del género *Hedyosmum*, así como también la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos de interés clínico a partir de metabolitos secundarios provenientes de especies de este mismo género.

Para efectos de la presente investigación se realizó una experimentación en dos fases: la primera en donde se probó la actividad inhibitoria tumoral de tres especies en particular *Hedyosmum purpurascens*, *H. scabrum* y *H. racemosum*, determinándose su porcentaje de inhibición con respecto al control negativo (DMSO<0,5%).

En la segunda fase se emplearon metabolitos secundarios de *H. racemosum* (DT030) y *H. scabrum* (VMZ194, VMZ204 VMZ111) con presunta actividad antineoplásica frente las líneas celulares RKO, MCF-7, D384 y PC3, estableciendo su IC₅₀, la cual corresponde a una medida de muerte del 50% de la población.

La experimentación de las fracciones de extractos, respecto a su actividad antitumoral, se realiza frecuentemente mediante ensayos de citotoxicidad in vitro (Marroquin, 2010). Siendo el ensayo MTS mediante el cual se determinó la respuesta metabólica de las células vivas a manera de supervivencia ante el estímulo dado por los posibles agentes quimioterapéuticos probados en los ensayos. La viabilidad celular mediante la reducción del MTS, es ampliamente utilizada actualmente como punto final de la medición de citotoxicidad por microtitulación (Freshney, 2010). Por ello este es el ensayo de elección de la fase experimental del proyecto en cuestión.



Capítulo I
Perspectivas cáncer y crecimiento tumoral

1.1. Definición del cáncer

La Organización mundial de la Salud (OMS, 2013) define al «Cáncer» como un término genérico que se designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». El cáncer es un crecimiento anormal de las células causado por múltiples cambios en la expresión génica, lo cual lleva a la desregularización del balance de la proliferación y muerte celular. Esto lleva a la población procedente de la neoplasia a la invasión de tejidos y a producir metástasis, causando un índice de morbilidad considerable (Ruddon, 2007).

1.2. Incidencia del cáncer

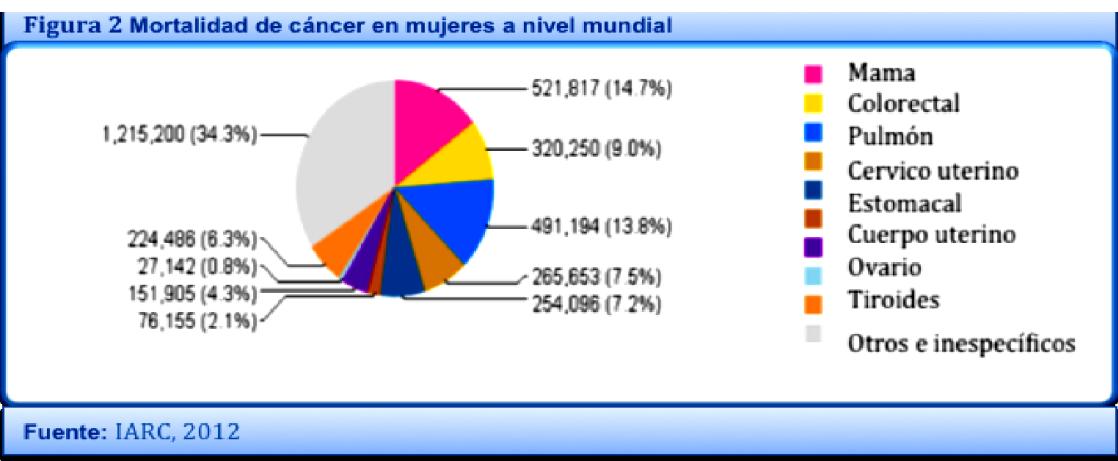
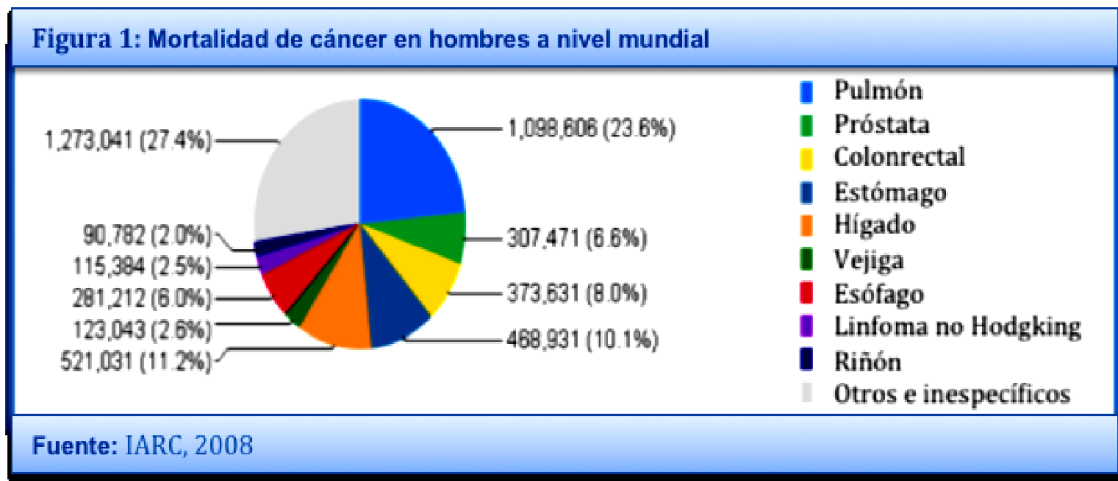
El cáncer es catalogado como una de las principales causa de muerte a nivel mundial, causando 8.2 millones de muertes (alrededor de 13% de todas las muertes); los principales exponentes de estos decesos son el cáncer de mama próstata, pulmón, colorectal y cervicouterino, divergiendo su mortalidad entre la población con respecto al sexo.

Con respecto al sexo, el IARC (2008) hace una distinción entre los hombres (**Figura 1**), cuya mortalidad se encuentran dada en los primeros lugares el cáncer de pulmón, próstata, colonrectal y estomacal y en las mujeres (**Figura 2**), se ve representada esta misma trascendencia por el cáncer de seno, colonrectal, pulmonar y cervicouterino.

En el Ecuador la incidencia de cáncer incurre en más de 20.200 nuevos casos por año, con más de 13.300 muertes, siendo los cánceres más frecuentes de estómago, prostático, mama, cervico-uterino y colonrectal (IARC., 2008a).

Cerca del 30% de las muertes por cáncer son causadas por exposición del paciente a factores de riesgo, entre ellos dietarios y habituales: el alto índice de masa corporal, la ingesta deficiente de frutas y vegetales, poca actividad física, uso de tabaco y el abuso del alcohol se perfilan entre los principales factores de riesgo. El cáncer causado por

infecciones víricas, como el VHB/VHC (virus de la hepatitis B y C respectivamente) y el HPV (Virus del Papiloma Humano, por sus siglas en ingles), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países subdesarrollos y en vía de desarrollo; en el 2008 alrededor del 70% de las muertes por cáncer ocurrieron en esta población.



Se tiene proyectado que para el 2030 habrá un incremento de aproximadamente 13.1 millones de decesos por cáncer alrededor del mundo (OMS, 2013).

En el presente trabajo se pretenden evaluar cuatro líneas celulares que se encuentran dentro de las neoplasias de mayor incidencia tanto a nivel mundial como en el Ecuador, a continuación se explica cada uno de ellos:

1.2.1. Cáncer de colon

Es una patología de alta importancia con respecto a la salud pública alrededor del mundo. Es la tercera causa de muerte en hombres (663.000 casos en el 2008, 10% de todos los casos) y el segundo en mujeres (570.000 casos: 9,4% de todos los casos) a nivel mundial. Por muchos años se han observado variaciones significantes a nivel mundial con respecto a la distribución del cáncer colorectal (Young, Hobbs, & Kerr, 2011).

El riesgo de cáncer de colon se incrementa con la edad. La mayoría de los casos ocurren en personas por encima de los sesenta años. En personas entre los cuarenta y cincuenta años la incidencia de este tipo de cáncer es de quince nuevos casos por cada cien mil habitantes, mientras que en personas mayores a los ochenta años la incidencia aumenta hasta cuatrocientos nuevos casos por cada cien mil personas. Al presentarse en jóvenes (menores de veinte años) representa menos del 1% de los casos. En este grupo poblacional, la incidencia es mayor en la raza negra que en la población caucásica (ocurre lo opuesto en adultos). Además en los jóvenes, existe la tendencia muy remarcada a incurrir en un tipo particular de cáncer, conocido como carcinoma mucinoso (lo que significa que el cáncer produce mucina, el mayor componente de la mucosidad, en grandes cantidades) (Adrouny, 2002).

1.2.2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es por mucho, el cáncer mas frecuente en mujeres con un estimado de 1,38 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2008 (23% de todos los cáncer), y el segundo con respecto en ambos sexos (10,9% de todos los cáncer). Es bien conocido como el cáncer más común en países en desarrollo y en vías de

desarrollo con alrededor de sesenta y nueve mil nuevos casos estimados en cada región. Los rangos de incidencia varían desde diecinueve por cada cien mil mujeres en el norte de África a ochenta y siete por cada cien mil mujeres en Europa Occidental, y en la mayor parte de los países desarrollados.

La mortalidad es mucho menor (aproximadamente seis a diecinueve por cada cien mil habitantes) debido a que las condiciones son más favorables para la supervivencia de dicho cáncer en estas regiones. Como resultado, el cáncer de mama figura como la quinta causa de muerte por cáncer con respecto al resto de neoplasias (cuarenta y ocho mil muertes), pero es aún la causa más frecuente de muerte en mujeres en vías de desarrollo (doscientos sesenta mil muertes, 12,7% del total) y en países desarrollados, se estimaron ciento ochenta y nueve mil muertes, las cuales son casi iguales al estimado número de muertes por cáncer de pulmón (ciento ochenta y ocho mil muertes) (IARC, 2008b).

El cáncer de mama es una enfermedad de lento desarrollo, lo cual concuerda con el incremento de los casos con los años, el periodo para que una sola célula pueda convertirse en un tejido detectable (entre los 0,5 y 1cm de diámetro) (Pardee, 2011).

1.2.3. Cáncer prostático:

Es el segundo cáncer más diagnosticado en hombres (ochocientos noventa y nueve mil nuevos casos, 13,6% del total) y el quinto más común entre el resto de neoplasias. Recientemente tres cuartos de los casos registrados ocurren en países en desarrollo (seiscientos cuarenta y cuatro mil casos). Los rangos de incidencia del cáncer de próstata varían y la incidencia de muerte son generalmente mayores en la población afrodescendiente, siendo la minoría de los casos en Asia (IARC., 2008b). La edad juega un papel importante en este tipo de cáncer, entre mayor sea la edad del paciente, mayor será la probabilidad de presentar este tipo de cáncer; siendo la edad el factor de riesgo número uno (Cramer, Alcamo, & Heymann, 2007).

Existen claros factores genéticos que anteceden al cáncer de próstata, así como los factores referentes al estilo de vida que le anteceden. Esta patología no discrimina entre

ningún hombre virtualmente cualquier hombre se encuentra en riesgo de desarrollar cáncer prostático. Cuando se comparan las tasas de incidencia y mortalidad es claro que es claramente más mortífero que los otros, junto con el cáncer pancreático y de pulmón. Más del 15% de todos los hombres serán diagnosticados con el cáncer de próstata invasivo. Sin embargo cuando los números son afectados con la edad surgen ciertas diferencias (Cramer et al., 2007).

1.2.4. Astrocitoma cerebral

Con respecto a los cánceres ya mencionados se hace referencia especial a los gliomas ya que estos tienen una incidencia que llega al 30% de los tumores cerebrales y un 80% de los tumores malignos (Velásquez, 2013). Forman parte del grupo de los gliomas (tumores gliales), se trata de tumores cerebrales primarios, es decir, tumores que se originan a partir de las células que conforman la estructura cerebral normal. Dentro del grupo de los gliomas, los astrocitomas suponen los tumores más frecuentes. Comprometen así los cromosomas 10 y 17 (Uribe, Chacón, & Pombo, 2002).

Pueden localizarse en cualquier punto del neuroeje (cerebro y médula espinal) si bien especialmente frecuente a nivel de los hemisferios cerebrales. Especial mención merecen los gliomas de nervio óptico, astrocitomas talámicos y astrocitomas de tronco cerebral y médula espinal, pues presentan características propias tanto por su localización como por su histología que hace que debe personalizarse el tratamiento en estos tipos de lesiones (Neurocirugía Barcelona, 2012).

Los astrocitomas hemisféricos componen la mayor parte de los gliomas, con cifras constantemente altas. Con respecto de los tumores intracraneales, las cifras oscilan alrededor del 15%, con un 9,8% en la serie de Cushing (1935). Las cifras dependen de la consideración, y se elevan considerablemente si las consideramos en comparación con el resto de gliomas, en cuyo caso los astrocitomas vienen siendo el 23%. Los astrocitomas hemisféricos afectan a pacientes en edades medias de la vida, con una edad mínima de 4 años y máxima de 66, con promedios entre 37 y 47 años y de 33,22

años de promedio. Son neoplasias propias de varones, que predominan en todas las casuísticas, con una proporción de 4/3(Escalona, 1996).

1.3. Aspectos generales del crecimiento tumoral

La célula es una estructura compleja que se encuentra sujeta a múltiples procesos bioquímicos, con capacidad de autodividirse y desempeñar funciones sinérgicas de alto valor para la conservación de la vida. Cuando estos procesos se ven comprometidos de alguna forma se interrumpe el funcionamiento normal, produciéndose una enfermedad. La información genética de cada célula controla los procesos necesarios para mantener la homeostasia. Entre los procesos fundamentales se encuentra la regeneración celular, que permite la reparación del daño causado a lo largo de la vida del individuo, y se encuentra bajo una estricta regulación(Gutiérrez & Salsamendi, 2001). Cuando existe un desequilibrio en los distintos mecanismos de control del organismo conocidos como los hitos del cáncer (**Figura. 3**) se genera una neoplasia.

Los hitos del cáncer corresponden a un principio organizacional que racionaliza las complejidades de la enfermedad neoplásica. Incluye supresores de sustancias, resistencia a la muerte, permisión de la inmortalidad, inducción a la angiogénesis activación de la invasión y metástasis. Remarcándose en estos hitos se encuentra la inestabilidad genética la cual genera una diversidad génica, la cual expedita la adquisición de estas características; una inflamación que indicia múltiples funciones de estos hitos (Hanahan y Weinberg, 2011).

Según Hanahan y Weinberg las células normales derivan en células neoplásicas progresivamente, adquiriendo subsecuentemente las características mostradas en la **Figura 3**, y ese proceso multipasos dentro de la tumorigénesis en la patología humana puede ser racionalizado por la necesidad incipiente de las células cancerígenas de adquirir estas características que le permitan transformarse en tumoral y consiguientemente en una célula maligna.

Dentro de esta investigación también se propuso al cáncer como, no solo un una masa proliferativa de células tumorales. En cambio se le denominó un tejido complejo compuesto por múltiples y distintos tipos de células que participan en una interacción entre sí (Hanahan y Weinberg, 2011).



1.4. Inducción, evolución y proliferación tumoral

Dentro del proceso de multiplicación celular, podemos identificar que normalmente comprende dos periodos distintos: un periodo de reposo y un periodo activo. El periodo de reposo o fase quiescente, llamada G₀, corresponde a todas las células susceptibles a entrar en ciclo, estas células momentáneamente en reposo mantienen una mínima síntesis proteica. El periodo activo comprende cuatro fases:

- La primera fase (G₁), ocurre justo después de la mitosis; es una fase postmitosis. Esta fase asegura la síntesis de ARNm codificantes de las proteínas de los elementos necesarios para cada célula.
- La segunda fase (S), es una fase de síntesis de ADN. A la salida de esta fase se duplica la cantidad de ADN; se trata de una fase de duplicación del ADN.

- La tercera fase (G2), es una fase premitótica y corresponde a la síntesis de proteínas de elementos precursores del huso acromático.(Lanore & Delprat, 2004)
- Por último se encuentra la mitosis (M), la cual conduce al desdoblamiento de los cromosomas y a la escisión en dos células hijas genéticamente iguales. El ADN se reparte de igual manera en cada una de la células hijas. Sin embargo, lo que caracteriza a un tumor maligno es la multiplicación celular desordenada y descontrolada, que da lugar a la aparición de células progresivamente más malignas que, por lo general, invaden el tejido circundante e incluso algunas adquieren la capacidad de emigrar a otras zonas distantes del organismo en donde se desarrollan tumores secundarios(Lanore & Delprat, 2004).

El inicio del cáncer se presenta cuando una sola célula sufre una mutación que la hace dividirse a una velocidad anormalmente elevada. La célula prolifera y origina un clon de células cada una de las cuales porta la misma mutación. La velocidad de crecimiento de este tumor depende, de la duración del ciclo celular y, por otra parte, de la proporción entre el número de células en reposo sobre el número de células activas.(Lanore & Delprat, 2004).

Como las células del clon se dividen más rápidamente que las normales, pronto las sobrepasan en número. Una mutación adicional que surja en algunas de las células del clon puede aumentar más su capacidad de proliferar, y las células que porten las dos mutaciones pronto serán las dominantes del clon(Lanore & Delprat, 2004). Finalmente podrían ser superadas por células que contienen aún más mutaciones que aumentan la proliferación. En este proceso, llamado evolución clonal, las células tumorales adquieren más mutaciones que les permiten hacerse cada vez mas agresivas en sus propiedades proliferativas(Pierce, 2009).

Las mutaciones en los genes que participan en la segregación de los cromosomas también pueden contribuir a la evolución clonal de los tumores. Muchas células son

aneuploides y está claro que las mutaciones cromosómicas contribuyen a la progresión del cáncer mediante la duplicación de algunos genes (aquellos de los cromosomas extra) y la eliminación de otros (los cromosomas eliminados). Los defectos celulares que interfieren con la separación de los cromosomas incrementan la aneuploidía y pueden, por lo tanto, acelerar la progresión del cáncer(Pierce, 2009).

En los tumores malignos la tasa de producción celular supera a la tasa de pérdida debido a la falta de mecanismos de control para mantener un número limitado de células, y este desequilibrio es la base de la progresión tumoral. Las células tumorales pueden diferenciarse en tipos citológicos de mayor durabilidad lo que permite una acumulación que favorezca el crecimiento tumoral. Este hecho ciertamente puede comprometer la efectividad del agente quimioterapéutico, debido a que muchas veces las células proliferantes con mayor vulnerabilidad a la quimioterapia no son necesariamente las células que deben eliminarse a fin de erradicar el tumor(García, 2000).

1.4.1. Fases de crecimiento tumoral

Existe una equiparación lógica entre las fases in vivo e in vitro del crecimiento y desarrollo tumoral, en la primera se establecen las fases de iniciación, promoción y progresión, estas condiciones suceden dentro de un proceso neoplásico en el cuerpo del paciente; en el segundo modelo in vitro se realiza en condiciones controladas en el laboratorio (**Figura. 4**), en donde existe relación con la concentración celular en contraste al tiempo de subcultivo, mostrando la fase Lag, exponencial, y plateau.

En esta gráfica el eje vertical corresponde al tiempo de cultivo y el vertical al crecimiento tumoral. Durante la división inicial de las células, el crecimiento tumoral parece seguir un patrón exponencial. Este patrón de crecimiento exponencial y retardo del crecimiento es conocido como el crecimiento Gompertziano. Conforme el tumor crece, el tiempo requerido para doblar el volumen tumoral también se incrementa(Hoskins, 2005)..

Tratándose de recrear el modelo in vitro por medio de líneas celulares en la fase experimental (capítulo 3), el cual permita evaluar los efectos farmacológicos sin el uso de modelos biológicos superiores, en este último se destacan las fases de latencia, de crecimiento exponencial y la fase estacionaria, a continuación se profundizará acerca de estos dos modelos:

Crecimiento In vivo (Torre, 2002)

Fase de iniciación: es el proceso por el cual un daño crítico del ADN se hace permanente en la célula, debido a que ésta se divide antes que se repare, o bien por un fallo en el proceso de reparación.

Fase de promoción: se define como el proceso mediante el cual se cree que determinados sucesos epigenéticos influyen de forma selectiva en la proliferación de la(s) células iniciadas.

Fase de progresión: Implica que la producción de cambios hereditarios más profundos que aparezcan

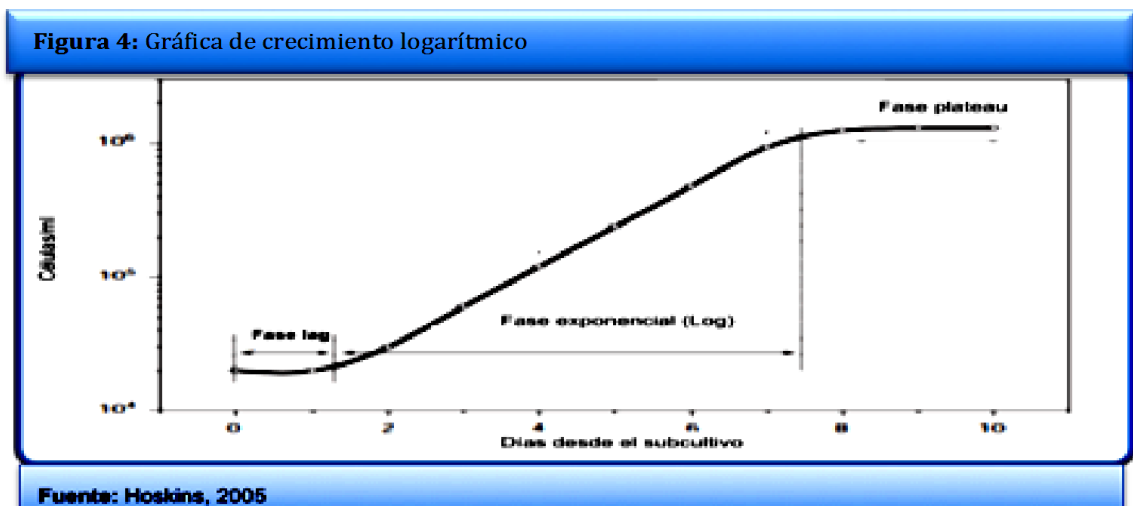
Crecimiento in vitro(Rubin, 2002)

Fase de latencia (lag). Es el periodo inicial que sigue a la siembra, durante el cual la célula renueva elementos relacionados con el gliocaliz (que se había perdido durante la Tripsinización), se adhiere al sustrato y se disemina por este. En este intervalo reaparece el citoesqueleto y aumenta la actividad DNA-polimerasa, seguido de una importante síntesis de DNA y de proteína. Algunos productos celulares pueden desaparecer durante esta fase para aparecer posteriormente cuando cesa la proliferación al haberse alcanzado altas densidades celulares.

Fase de crecimiento exponencial (log). Es la fase de mayor crecimiento (exponencial), sigue a la fase de latencia y se alarga hasta una o dos duplicaciones

siguientes a la denominada “confluencia”, que es la etapa en la cual toda la superficie del sustrato ha sido ocupada y las células entran en contacto con otras. La duración de esta fase depende de la densidad de la siembra, la tasa de crecimiento celular y la densidad a la cual se produce la inhibición del crecimiento. En esta fase la fracción de crecimiento representa entre el 90 y el 100%, y el cultivo se encuentra en la fase con mayor viabilidad y reproductividad.

Fase estacionaria (*plateau*). Al final de la fase de crecimiento exponencial el cultivo se convierte en confluyente, disminuyendo la tasa de crecimiento y, en algunos casos, cesando completamente la capacidad de crecimiento, momento en el que las células pierden movilidad y aumentan la síntesis relativa de proteínas especializadas (algunas de ellas de secreción) con respecto a la de proteínas estructurales. En esta fase empieza debido a que las células experimentan un inhibición por contacto del crecimiento.



En el caso particular de las células transformadas, no hay inhibición por contacto, alcanzándose densidades celulares muy altas que dan lugar a la aparición de los denominados *foci*, donde las células han abandonado el crecimiento en monocapa. En

este tipo de cultivo la fase estacionario se alcanza como consecuencia de un equilibrio entre la proliferación y la muerte celulares.

1.5. Inhibición del crecimiento tumoral

Los tumores, se forman a partir de células desdiferenciadas (transformadas) que debido a defectos genéticos crecen en forma descontrolada. Casi todas las células transformadas son reconocidas por el sistema inmune y eliminadas, pero cuando los mecanismos de defensa del organismo no son suficientes se produce un rápido crecimiento del tumor. En esos casos se utilizan medios físicos o quimioterapia para tratar de inhibir el desarrollo tumoral(Koolman & Röhm, 2004).

Al exponer al tumor a una sustancia química que produzca la inhibición del crecimiento o agente citostático; presentando cambios químicos en el ADN celular que impiden la transcripción y la replicación, así como mediante la inhibición de la síntesis de los precursores del ADN(Koolman & Röhm, 2004) La proliferación celular descontrolada es una característica de los tumores. Mientras que en un cultivo las células normales se dividen solamente unas 20 a 60 veces, las células tumorales son potencialmente inmortales y su división no se detiene por inhibición por contacto(García, 2000).

La división de las células tumorales in vivo no está inhibida y a menudo se trata de células indiferenciadas, es decir con algunas propiedades de las células embrionarias. Su superficie está modificada, lo que significa particularmente una alteración de la inhibición por contacto con las células vecinas. El citoesqueleto de las células tumorales tienen una estructura modificada y a menudo está reducido, lo que le confiere una forma redondeada. Los núcleos de las células tumorales pueden ser atípicos en lo que se refiere a su forma, su número y su tamaño(Koolman & Röhm, 2004).

Los factores que determinan el enlentecimiento del crecimiento tumoral a medida que aumenta su volumen no son del todo conocidos, pero entre los factores implicados figuran la hipoxia, por problemas en su irrigación, disminución de la disponibilidad de

nutrientes y factores de crecimiento, acumulación de metabolitos tóxicos y comunicación inhibitoria intercelular(García, 2000).

De manera similar existen factores que afectan las velocidades de crecimiento de los tumores y su influencia en el pronóstico clínico y las respuestas terapéuticas. La velocidad de crecimiento de un tumor se determina por tres factores principales: el tiempo de duplicación de las células tumorales, la fracción de células tumorales que están en el fondo común replicativo y la velocidad a las que se elimina o mueren las células(Kumar, Abbas, Fausto, & Aster, 2009). Puesto que en la mayoría de los tumores los controles del ciclo celular están alterados, el ciclo de las células tumorales puede estar desenfrenado con respecto a las restricciones habituales(Kumar et al., 2009).

La proporción de células en la población tumoral que están en el fondo común proliferativo se les denomina fracción de crecimiento. Estas se encuentran en una proporción mayor en el inicio de la formación del tumor con respecto a la del tumor maduro, siendo esta fracción sólo de aproximadamente un 20% o menos en algunos tumores(Kumar et al., 2009).

En algunos tumores, especialmente aquellos con una fracción de crecimiento relativamente alta, el desequilibrio en el que la producción celular supera la pérdida celular corresponde un margen pequeño. Algunas leucemias y linfomas y ciertos cánceres pulmonares tienen una fracción de crecimiento relativamente alta y su evolución clínica es rápida. En comparación, muchos tumores frecuentes, como los cánceres de colon y mama, tienen fracciones de crecimiento bajas y la producción celular supera la pérdida celular solo por aproximadamente en un 10%, y por eso tienden a crecer a un ritmo mucho mas lento(Kumar et al., 2009).

La fracción de crecimiento de las células tumorales tiene un profundo efecto sobre su susceptibilidad a la quimioterapia del cáncer. Puesto que la mayoría de las sustancias anticancerosas actúan sobre las células que están en ciclo, no es difícil imaginar que un

tumor que contienen un 5% de todas las células en el fondo común replicativo será de lento crecimiento, pero relativamente resistente al tratamiento, ya que este mata a las células en división (Kumar et al., 2009). En la práctica clínica se tiende a emplear la estrategia de tratamiento basada en desplazar las células de tumores con baja fracción de crecimiento a entrar al ciclo celular nuevamente desde G_0 . Esto puede lograrse por medio de radiación o cirugía.

En cultivos in vitro, las células se encuentran en un estado de adaptación al medio, el cual contiene las condiciones fisicoquímicas requeridas para el crecimiento, tales como el pH, temperatura, presión osmótica y la tensión de CO_2 y O_2 ; alcanzando las características fenotípicas y confluencia requeridas para proveer al investigador una referencia significativa que le permita asociar, una fracción de crecimiento similar a la expresada en el tumor al ser estimulado (Freshney, 2005).

La utilidad de saber si el agente quimioterapéutico puede llegar a inhibir el crecimiento tumoral, es el conocer su efectividad, a medida que disminuye o retarda el crecimiento del tumor. La resistencia cinética está íntimamente relacionada con la cinética de crecimiento Gompertziana (**Figura 4**); a medida que se reduce el volumen tumoral con tratamiento, la fracción de crecimiento del tumor restante aumenta (dado que la curva Gompertziana se sitúa en su fase de máximo crecimiento cuando el volumen tumoral es pequeño) (García, 2000).

La mayoría de quimioterapéuticos inducen a los tumores Gompertzianos una regresión de tipo Gompertziano, con tasas de regresión más lentas cuando el volumen tumoral es grande que a volúmenes intermedios. Este es distinto a la cinética de regresión exponencial, en la que la tasa de regresión es máxima en tumores voluminosos y mínima en tumores pequeños (García, 2000).

Las implicaciones fundamentales que resultan de la aplicación de la cinética Gompertziana a la cinética de regresión tumoral son:

1. El tratamiento utilizado para inducir una regresión tumoral o incluso una remisión completa puede ser suficiente para erradicar el tumor.
2. El tratamiento necesario para provocar la regresión de un tumor voluminoso, por ejemplo en fase metastásica, puede no ser suficiente para curar tumores pequeños en situación adyuvante.
3. En tumores en los que se consigue remisión completa, el tratamiento que prolonga la duración de la remisión puede no ser curativo, incluso si se administra indefinidamente.

La literatura indica que, un factor determinante de la resistencia es la intensidad del tratamiento; dosis mayores de agentes quimioterapéuticos producen mayor regresión tumoral que dosis menores. La intensificación, consiste en la utilización de una quimioterapia determinada para inducir una respuesta seguida de la administración del mismo o de los mismos agentes, pero con mayor intensidad de dosis. La segunda estrategia denominada intensificación cruzada o secuencial, consiste de un régimen de inducción seguido, una vez obtenida la respuesta, de un tratamiento quimioterapéutico distinto, en general a altas dosis(García, 2000).

1.5.1. Modelos de estudio para la inhibición del crecimiento tumoral

El metabolismo de las células neoplásicas han sido inferidas a una similitud tal con las células normales, que los investigadores fueron forzados a emplear las más ínfimas diferencias entre los compuestos empleados para lograr un efecto diferencial. Tradicionalmente, la diferencia mas importante a considerar era el amplio índice de división presente en las células del cáncer, relativamente mayor a la mayoría de los tejidos corporales. El pionero trabajo de Skipper demostró que hasta la más mínima diferencia demuestra una cura quimioterapéutica en tumores de rápido crecimiento en animales, tales como la leucemia en ratones probada en la línea celular L1210(Perry, 2008).

Skipper (1970's) condujo una serie de experimentos clásicos en el Instituto de investigación en Birmingham, Alabama, empleando las cepas de leucemia en ratón L1210, que preceden una serie de leyes concernientes a la quimioterapia contra el cáncer. Estas leyes son actualmente empleadas, sin embargo la comprensión del crecimiento Gompertziano sugiere una aplicación mas compleja(Perry, 2008).

Las células tumorales L1210 poseen un crecimiento logarítmico, el cual se refiere a un estado en el cual todas las células se encuentran en el ciclo celular y en constante división, con ninguna en una fase de resistencia, y que el número de células, dobla la tasa de crecimiento tumoral específico. La denominada Ley de Skipper se aplica solamente a las células cuya tasa de crecimiento se represente como se vio anteriormente(Perry, 2008).

Con respecto a las leyes de Skipper, podemos clasificarlas en dos: primeramente que el tiempo de duplicación de las células cancerígenas en estado proliferativo es una constante, formando una línea recta semilogarítmica. Furth y Kahn demostraron en 1937 que la supervivencia de las células proviene del fracaso del tratamiento.

Skipper muestra que los resultados de muerte celular, cuando las células llegan a un número crítico o alcanzan una cierta fracción del peso corporal. Por otro lado la supervivencia se da en función del número de células tumorales inyectadas en el ratón (o, por analogía, el tumor en concreto en los humanos a la hora del diagnóstico(Perry, 2008).

La segunda ley propone que la muerte de las células por el medicamento procede a una cinética del primer orden; es decir que el porcentaje de células muertas que una dosis de un determinado medicamento puede provocar es una constante, sin importar la cantidad de células tumorales presentes. Sin embargo un medicamento que mate el 99% de las células tumorales, mata esta fracción independientemente del tamaño del tumor(Perry, 2008).

El aspecto más relevante a rescatar del modelo Skipper dentro de este proyecto de investigación, se enfoca en que, asumiendo que la población tumoral presente una sensibilidad homogénea, ésta sigue una cinética de primer orden; una dosis

determinada de un agente destruye una fracción constante de células. Entonces el desempeñar un ambiente controlado en el que las células proliferen hasta un crecimiento exponencial homogéneo menor a su población letal, podría servir para la determinación de la efectividad de un potencial agente inhibidor del crecimiento tumoral. Siendo los pilares hipotéticos de esta investigación, la disminución de la tasa de proliferación celular sostenida equivalente al 50% de la población celular (IC_{50}), y el que la escala ascendente dosis-dependiente del compuesto logre la disminución logarítmica de la población.

1.5.2. Crecimiento exponencial y el modelo Skipper-Schabel-wilcox

El modelo de curva de crecimiento Skipper-Schabel-Wilcox, también llamado “*log-kill model*”, fue el primer y el más importante, así como el más influyente de los conceptos biomatemáticos con respecto a la oncología. Conjunta tanto las ideas básicas como las multidisciplinarias de la quimioterapia, la importancia de la medición parcial y completa de los rangos de remisión y duración, y las asociaciones entre la citotoxicidad y la prolongación de la supervivencia, denominado “el concepto de Skipper del crecimiento tumoral”(Perry, 2008).

El modelo *log-kill* fue formulado a partir de las observaciones de la leucemia L1210 en ratones como se mencionó anteriormente en la sección 1.5. El descubrimiento del fenómeno *log-kill* no lleva a la revelación del crecimiento exponencial, pero si plantea una observación fundamental en la manera en la que los tumores exponenciales responden a la terapia. La observación empírica redundante en que si el crecimiento tumoral es exponencial y si es homogéneo en la sensibilidad a los compuestos farmacéuticos, y la fracción de las células muertas por un régimen de un agente quimioterapéutico (Perry, 2008).

Una de las conclusiones planteadas en este modelo incurre en que independientemente a las afirmaciones de homogeneidad y crecimiento exponencial, el modelo *log-kill*, no trabaja bien en algunas líneas celulares las cuales son refractarias a la dosis aplicada de los agentes empleados. Si esto sucede, una vez que se eliminen las células con mayor

proliferación las células remanentes no responderán al mismo tipo de agente quimioterapéutico (Perry, 2008).

1.6. Quimioterapia

La quimioterapia se refiere a una clase de terapia heterogénea que incluye numerosos productos fabricados a partir de distintas moléculas. Cada tipo de cáncer tiene características e interacciones distintas tanto a nivel genético, bioquímico, inmunológico y fisiológico, siendo su etiología tan diversa como las alteraciones que le preceden, caracterizándose por su ubicación, edad del paciente, susceptibilidad genética, entre otros factores(Sánchez et al., 2006).

Con respecto a la investigación de agentes quimioterapéuticos se puede rescatar el descubrimiento del mostaza nitrogenada, siendo este una durante la investigación previa a la guerra química, siendo este el primer ejemplo bien documentado, pero inclusive en ese tiempo, la hidroxurea se habría encontrado disponible por más de medio siglo con una actividad aún no descubierta. En los siguientes años, agentes que fuesen descartados como excesivamente tóxicos fueron empleados como una fuente fértil de medicamentos anticancerígenos(Perry, 2008).

El desarrollo de los medicamentos quimioterapéuticos disponibles en ese momento contra las células cancerígenas, eran, con algunas excepciones, resultado de empirismo, suerte o prueba y error. Los agentes dirigidos eran excepciones a esta regla. El primer diseñador de un agente claramente efectivo contra el cáncer fue Heidelberger con el 5-fluorouracil (5-FU). Otro ejemplo remarcable fue la mostaza de fenilalanina, designada para melanoma por que la fenilalanina es el precursor de la melanina, este agente sin embargo fue ineficaz en dicho tumor, pese a la lógica bioquímica de su constitución. A lo largo de los años, numerosos compuestos anticancerígenos fueron descubiertos, la mayoría por accidente, y algunas por diseño experimental, y una variedad de inhibidores metabólicos fueron desarrollados.(Perry, 2008).

Solamente desde el punto de vista de su origen se han descubierto más de 100 tipos de cáncer, siendo los más frecuentes los carcinomas originarios del epitelio, derivando del intestino, pulmón, cuello uterino y glándulas mamarias(Sánchez et al., 2006). En el cáncer de mama, por ejemplo, se diferencian a partir de su recepción a hormonas, su tamaño e invasión a estructuras mamarias como ganglios, por estas características la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador (SOLCA) lo clasifica en cinco grupos, para los cual se administra una combinación de agentes quimioterapéuticos para cada tipo de paciente.

Con lo anterior se explica como una terapia puede ser efectiva para un tipo de cáncer específico, en cuanto puede ser ineficiente como tratamiento en otro, por lo cual es efectivo la prueba de un agente experimental en diferentes líneas celulares. El conglomerado de posibles tipos de cáncer lleva a la comunidad científica a establecer nuevas terapias, las cuales proceden de diversos orígenes, naturales y artificiales.

El propósito del uso de agentes quimioterapéuticos tradicionales en la lucha contra el cáncer, es evitar que las células cancerígenas sigan diseminándose por el organismo, incurriendo en el mecanismo de metástasis que a la larga acaban con la vida del paciente. Los agentes quimioterapéuticos empleados frecuentemente, producen su principal efecto en las células en proliferación. La multiplicación celular es una característica de muchas de las células normales, así como de las células cancerígenas, sin embargo la mayoría de los agentes quimioterapéuticos no poseen la capacidad de distinción; por lo cual terminan causando toxicidad en ambas células, en especial en aquellas células que tienen una alta tasa de replicación (Skeel & Khleif, 2011).

El éxito en la selección de una terapia efectiva radica en encontrar al agente que tenga un marcado efecto inhibitorio del crecimiento tumoral o el cual controle los efectos de las células cancerígenas y que minimice los efectos tóxicos en el paciente. En los regímenes más efectivos, los antineoplásicos son capaces de no solo inhibir el crecimiento sino también erradicar completamente las células neoplásicas mientras preservan la médula normal, o al menos mejoran satisfactoriamente la calidad de vida del paciente (Skeel & Khleif, 2011)



Capítulo II

Etnobotánica y genero *Hedyosmum* en Ecuador

2.1. Metabolitos secundarios en la búsqueda de agentes antitumorales

Las plantas son una fuente ferviente de un gran número de productos metabólicos, mediante los cuales se producen los medios de supervivencia y su relación con el hombre se han beneficiado con las virtudes que estos productos le brindan. Durante muchos años la medicina se ha basado en el uso de estos agentes (Orhan, 2012).

Los agentes fitoquímicos pueden ser clasificados en metabolitos primarios y secundarios, dependiendo si estos fueren esenciales en su rol en el metabolismo de la planta o se presentasen universalmente en todas las plantas. Los constituyentes primarios incluyen azúcares comunes, aminoácidos proteicos, las purinas y pirimidinas de los ácidos nucleicos, las clorofilas, entre otros. Mientras tanto los metabolitos secundarios serán los que permitan las interacciones ecológicas de la planta con su entorno. Es decir, algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica. Aun así los metabolitos secundarios tienen estructuras u orígenes muy similares a los metabolitos primarios, aunque sus funciones son distintas (Orhan, 2012).

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura) (Orhan, 2012).

Los metabolitos secundarios bioactivos en una planta han jugado un papel significativo en la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos en las pasadas cuatro décadas. El descubrimiento e introducción al mercado de paclitaxel, vinca alcaloides y etopósidos, entre otros, han ayudado a respaldar los programas para el descubrimiento de agentes basados en productos naturales (Orhan, 2012).

Las funciones de los metabolitos secundarios en las plantas pueden ser controladas por medio del crecimiento y desarrollo celular. A lo largo de los años una variedad de estructuras mostraron efectos los cuales fueron reconocibles a bajas concentraciones, y monitoreados por ensayos in vitro e in vivo. Para que el programa de descubrimiento de un nuevo agente fitoterapéutico sea efectivo, este deberá depender no sólo de la calidad de los extractos, sino además de la disponibilidad de análisis para el descubrimiento del tratamiento para una enfermedad determinada (Orhan, 2012).

En los últimos años cientos de estudios se han enfocado en la actividad antitumoral de los componentes herbarios provenientes de zonas endémicas para la utilización comercial, con el fin de encontrar agentes quimioterapéuticos de alto valor curativo. Las plantas superiores producen un amplio espectro de metabolitos secundarios que han sido empleados en diversos productos industriales, entre los cuales se encuentran los fitofármacos (Orhan, 2012). Esto debido a que las propiedades citotóxicas que probablemente provengan de la evolución de las plantas hacia el desarrollo de pesticidas naturales para su defensa personal contra organismos patógenos (Orhan, 2012).

En recientes análisis fitoquímicos de plantas que gozan de historia por su empleo popular para el tratamiento contra el cáncer han dado en muchas ocasiones resultado, en cuanto al aislamiento de principios con actividad antitumoral. En los estudios sistemáticos más recientes, respecto a la utilidad de componentes de plantas, cada porción y cada fracción del extracto se ensayan biológicamente antes de haber aislado y caracterizado componente alguno (Marroquin, 2010).

Representantes de las plantas de uso diario y ancestral de las comunidades autóctonas han exhibido una actividad anticancerígena y cabe recalcar que a partir de la misma planta, dos o mas componentes pueden ser los responsables de la función anticancerígena observada (Walton & Brown, 1999).

Los análisis empleados para evaluar la actividad de estos metabolitos con respecto al cáncer han ido cambiando con el tiempo, reflejando un incremento en el conocimiento de los mecanismos que envuelven las distintas formas del cáncer. Siendo así un objetivo fundamental para las ciencias humanas, formular fitomedicamentos, a partir de extractos vegetales estandarizados y debidamente regularizados, basados en estudios fitoquímicos, farmacológicos y biotecnológicos, además de pruebas preclínicas y clínicas. Los estudios fitoquímicos deberían incluir, el aislamiento y elucidación estructural de los nuevos compuestos bioactivos y su concentración; los farmacológicos y toxicológicos, consistirán en la evaluación de las propiedades medicinales atribuidas a las plantas, en diferentes modelos biológicos(Torres, Pérez, & Contreras, 2005).

Para la obtención de metabolitos secundarios es imperativo llegar a la fracción del extracto que posee la propiedad deseada, siendo el extracto un sólido que se obtiene a partir de la unión de un sólido triturado con un líquido de extracción en el cual se obtienen un producto, siendo generalmente más diluido que un aceite esencial, sin embargo puede ser bastante concentrado(M. Sánchez, 2006). Un solo extracto puede contener una docena de biomoléculas que interactúan entre ellas. Resulta imperativo conocer las respuestas terapéuticas para su uso terapéutico(Zyadl et al., 2012).

2.2. Bioconocimiento en la búsqueda de nuevos agentes fitoterapéuticos

La medicina tradicional es la suma total del conocimiento, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias inherentes de las diferentes culturas, las cuales pueden o no ser explicables, y son empleadas para la prevención, diagnóstico, desarrollo o tratamiento de enfermedades tanto físicas como mentales. La práctica de la medicina tradicional varía entre países y regiones, siendo influenciados por factores como lo son la cultura, historia, altitud y filosofía, entre otras (WHO, 2000).

La secretaría nacional para la educación superior del Ecuador, en su informe **“Universidades para transformar la sociedad”** reconoce al bioconocimiento “como el conjunto de teorías, saberes y aplicaciones científicas y tradicionales que la sociedad ha desarrollado a lo largo de la historia sobre la biodiversidad y sus sistemas complejos y

autogestionados, el orden natural y modificado, donde se realiza y sustenta la vida que contribuyen al Buen Vivir y a la sostenibilidad del planeta “(Ramírez, 2012).

El Ecuador, país rico por sus diversas culturas ancestrales, ha consentido el uso de múltiples medicinas tradicionales (Gualavisí, 2008). Por esta razón es importante incentivar la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos que le den una nueva apreciación a los conocimientos ancestrales. Cabe recalcar que su extenso bioconocimiento es debido a su amplia biodiversidad, el gran número de especies vegetales por kilómetro cuadrado, además de los ecosistemas variados que le permiten ser una fuente muy rica y variada de material con fines fitoterapéuticos (Paredes, 2013).

Se ha generado un gran interés en base a los constituyentes fitoquímicos. Las plantas fueron empleadas en múltiples propósitos a raíz del bioconocimiento. Debido a esto se han domesticado las plantas con dichas propiedades para el uso del hombre, dentro de este hecho podemos contemplar el estudio de la relación recíproca entre el hombre y la vegetación, denominado etnobotánica, el cual también es vinculado con el uso de estas en las sociedades tradicionales (Ocampo, 1994). Los descubrimientos de las pasadas décadas se han basado en la evaluación sistemática de las plantas superiores; y la contribución de las investigaciones etnobotánicas en el descubrimiento de nuevos medicamentos procedentes plantas de uso medicinal (Heinrich & Paul, 2006).

La química de las plantas provienen de una disciplina en las universidades alrededor del siglo pasado, siendo desarrollado alrededor de 1950, por el descubrimiento de nuevos constituyentes de formas cristalizadas y su caracterización, gracias a los resultados de los experimentos basados en la degradación química y la resonancia magnética(Walton & Brown, 1999).

Las plantas tienen una larga historia en su uso contra el cáncer. Para el descubrimiento de nuevos tratamientos anti-cáncer es de amplia utilidad el encontrar especies, cuyos componentes tengan un uso específico como moléculas de propiedades fitoterapéuticas

(Heinrich & Paul, 2006). Constituyen una alternativa común para el tratamiento del cáncer alrededor del mundo. Actualmente más de 3000 plantas han reportado propiedades anticancerígenas. A nivel global la incidencia del uso de los productos fitoderivados para el tratamiento contra el cáncer se ha incrementado de 10% a un 40% (Castro et al., 2011). La diversidad estructural encontrada en la naturaleza supera por mucho a lo que puede ser sintetizado en el laboratorio, más aún los productos naturales contienen por lo general moléculas pequeñas con propiedades farmacológicas (Monks et al., 2002).

En el Ecuador se reportan 3118 usadas con fines medicinales, pertenecientes a 206 familias, siendo el 75% nativas y 5% endémicas. Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas, y cada año se describen aproximadamente 1600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Paredes, 2013). A partir de estos antecedentes, se constituyen las bases para el escudriño de nuevas propiedades brindadas a partir de las plantas, que congruentemente al bioconocimiento ancestral de la cultura Ecuatoriana se apunta a propiedades fitoterapéuticas cuyo interés radica como agentes antitumorales.

2.3. Antecedentes experimentales

Los principios naturales antitumorales aislados suelen ser productos nuevos que se extienden a una amplia gama de estructuras, entre ellos monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides y alcaloides (Marroquin, 2010). En la familia Chloranthaceae, las lactonas sesquiterpénicas se distribuyen ampliamente (Acebey et al., 2007). Con respecto al uso farmacológico de este género, se pueden resaltar sus cualidades antiespasmódicas, antisépticas, alivio del dolor, dermatopatías y anticancerígenas en Asia (Cao, Peng, Shi, & Xiao, 2008). Con respecto a las especies *Hedyosmum*, en *H. orientale* se ha evidenciado la presencia de compuestos sesquiterpenoides, comprobada actividad citotóxica en las líneas celulares A-549 y HL-60 (Su et al., 2008).

A partir de *H. arborescens*, se han aislado lactonas sesquiterpénicas provenientes de sus hojas (Bercion, Baltaze, & Bourgeois, 2005). Igualmente en *H. bonplandianum* se encontraron hidrocarburos monoterpénicos; mientras que *H. costarricensis* se encuentra constituida en su mayoría de hidrocarburos sesquiterpénicos, en especial germacreno-D (Carles, Casanova, Mundina, Vila, & Tomi, 1999).

Se han encontrado componentes sesquiterpénicos y monoterpénicos presentes en el aceite esencial de *H. scabrum*, 52 compuestos identificados, siendo el *estragol* su principal constituyente (Soria, De Feo, & Urrunaga, 2007). Este último compuesto comprobado como un antiinflamatorio (Vanaclocha & Folcara, 2003). Lee Kuo y colaboradores establecen los requerimientos para la actividad antitumoral o citotóxica de más de 100 lactonas sesquiterpénicas, como lo son las *santanolidas* y *xanthanolidas*, en distintas líneas celulares, encontrándose actividad antitumoral (Lee, Huang, Piantadosi, Pagano, & Geissman, 1971).

2.4. Género *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum* forma parte de la familia *Chloranthaceae*, la cual es una familia paratropical integrada por cuatro géneros, los cuales claramente en dos grupos. En cuanto a sus flores bisexuales, *Sarcandra* y *Chloranthus* (ambos en el este de Asia, Indonesia) aparentan ser más cercanas unas de otras que al género *Ascaria* (Malasia, Polinesia y Nueva Zelanda) y al género *Hedyosmum*, el cual tiene flores unisexuales (Kubitzki, Rohwer, & Bittrich, 1993). Este último es el único presente en América (Condit, Pérez, & Daguerre, 2010). Este género es el de mayor abundancia en la región andina de Sur América, donde se encuentran más de dos tercios de sus especies. Su crecimiento se da a partir de los 500 m s. n. m, y puede alcanzar una altitud de los 2800, su hábitat es en las montañas encontrándose en regiones que estén bajo la influencia de las nieblas o, en zonas más secas.

Debido a que muchas especies se encuentran en hábitad semialterados, y son comúnmente encontradas en el campo (Bercion et al., 2005). *Hedyosmum* es fácilmente reconocido por sus hojas opuestas y dentadas con la base de sus peciolos revestida, inflorescencia en espiga, ebracteada; estambres solitarios; flores con pistilos simples, con una sola bráctea floral, además de un agradable aroma a acre que emanan las zonas expuestas de la planta. El nombre *Hedyosmum* deriva del griego *hedy* (placentero) y *osmum* (olor), refiriéndose a este olor el cual es asociado con la pimienta, el limón y el anís (Kubitzki et al., 1993).

2.5. Especies *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum* es el más abundante de la familia Chloranthaceae, en particular se ve representado por alrededor de 40 especies de árboles y arbustos, oriundo de terrenos montañosos y es encontrado principalmente en América, se extiende de la parte central de México, continuando a través de Centro América hasta la parte central de Bolivia, este de Guayana y las Antillas, y al suroeste de Asia. Dentro de esta familia exceptúa una especie (*H. orientale*) proveniente de Asia (Carles et al., 1999).

Esta especie crece en altitudes aproximadamente de 500 a 2800 m.s.n.m., su hábitad es en las montañas encontrándose en regiones que están bajo la influencia frecuente de las nieblas o, en zonas más secas. La infusión de las hojas de varias especies de este género se consume en té o bien como sustituto del café. A algunas especies se les atribuyen propiedades medicinales contra varias afecciones (Paredes, 2013)

A continuación (**Tabla 1**) se presentan las plantas cuyos presuntos efectos antitumorales fueron estudiados en este trabajo, de las cuales se obtuvieron los extractos estudiados, así como sus usos según la etnobotánica. También se presentan los metabolitos secundarios obtenidos a partir de estas mismas especies, además de su clasificación dentro de su origen fitoquímico:

Tabla 1. Caracterización de las especies del género *Hedyosmum* con presunta actividad antitumoral y sus metabolitos secundarios

Especie	Nombre común	Ubicación	Uso popular	Referencia	
<i>H. purpurascens</i>	Toronjil	Loja, Zamora Chinchipec (endémica)	Se usa para preparar bebidas aromáticas, el tallo como combustible y para fabricar carbón	(Paredes, 2013)	
<i>H. racemosum</i>	Alcoba, Asarcito, Masamoche, Asarcito, Asarquiro, Choleta, Asancito Acha Guayusa, Úntuntup (shuar chicham), Guayusa de monte, Jicamilla grande (castellano).	Cañar, Carchi, Loja, Morona- Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbios, Zamora.	Reumatismo	(Castañeda, 2007)	
			Antibacteriano	(R Bussmann et al., 2010)	
			Bronquitis, resfriado, tos, asma, dolor óseo y sistema nervioso.	(Rainer Bussmann et al., 2008)	
			Estomacal, digestivo	(Ginatta, 2012)	
Compuestos					
	Fracción	Nombre	Fórmula molecular	Clasificación	Peso molecular
	Acetato	DT030	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	Lactona sesquiterpénica	229g/mol
<i>H. scabrum</i>	Granizo, Pavón Tarqui, Matico y Guayusa de cerro	Loja, Zamora .	Anticonceptivo	(Soria et al., 2007)	
			Antirreumático y resfriado	(Lorenzo, Loayza, & Dellacassa, 2003)	
Compuestos					
	Fracción	Nombre	Fórmula molecular	Clasificación	Peso molecular
	Acetato	VMZ 204/92	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	Acido acoplado a alcohol	298g/mol
	Acetato	VMZ111/75 (Oplodiol)	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	Sesquiterpeno	238,19g/mol
	acetato	VMZ194/84	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	Sesquiterpeno	238,19g/mol
* <i>H. purpurascens</i> carece de conocimientos ancestrales registrados debido a su reciente descubrimiento. Esta especie es parte del proyecto denominado “Estudio ecológico y químico de <i>Hedyosmum</i> spp (<i>Chloranthaceae</i>) en la provincia de Loja y Zamora” desarrollado en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja (Paredes, 2013).					



Capítulo III

Modelo experimental

3.1. Ensayos de proliferación celular en la obtención de nuevos metabolitos.

La comprobación de la quimiosensibilidad es un medio *in vitro* para la determinación del efecto citotóxico, citostático, o inductor de la apoptosis de los agentes anticancerígenos. Con el fin de encontrar nuevos agentes contra el cáncer es necesario el escudriño de nuevos agentes derivados de compuestos sintéticos o productos naturales y sus extractos, para ello, la determinación de la actividad antitumoral juega un papel de trascendencia, en donde se requieren de la evaluación *in vitro* en un cultivo de células y su apropiada evaluación en organismos modelo. Si el agente resulta efectivo en este sistema, entonces el medicamento será evaluado en ensayos clínicos. Este paradigma sirve para la identificación del mejor tratamiento individual para el paciente promedio para un determinado tipo de cáncer, empleándose como prospecto en ensayos al azar (Blumenthal, 2005).

Los ensayos basados en el uso de células son empleados con frecuencia en la búsqueda de una variedad de compuestos para determinar si las moléculas tienen efectos en la proliferación celular o mostrar efectos citotóxicos directos que lleven a la muerte celular (Riss, Moravec, Niles, & Minor, 2013). Estos estudios representan un impacto positivo tanto en el aspecto económico como en la experimentación animal, en donde es necesario el evaluar mas a fondo las respuestas específicas de estas células a las toxinas (Stacey, Doyle, & Ferro, 2001).

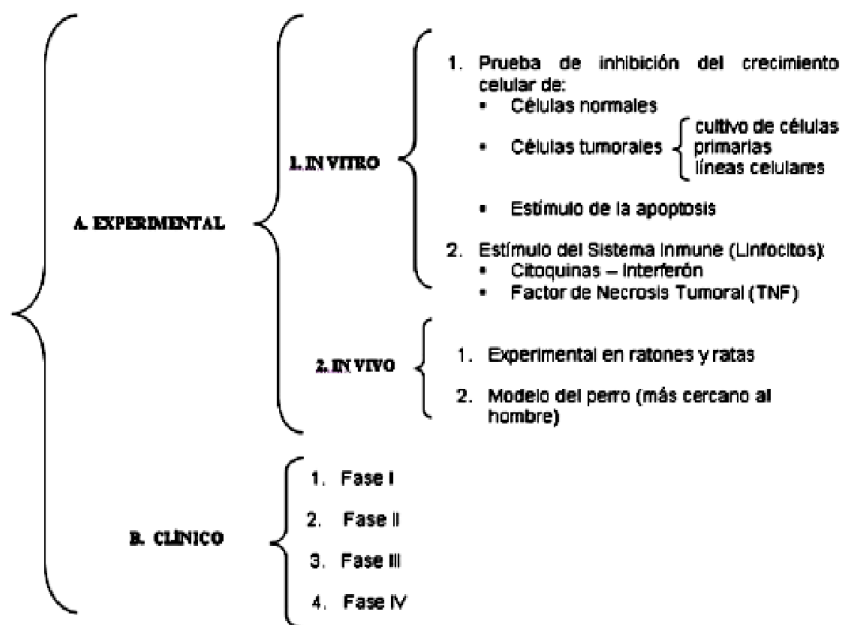
Existen muchos métodos disponibles para la medición de la quimiosensibilidad. En general estos ensayos generan curvas dosis-respuesta en donde la dosis del fármaco se relaciona con el porcentaje de efecto, como lo es la muerte celular. Determinando la concentración molar en la cual se reduce el 50% de la supervivencia (IC_{50}) puede ser empleada para comparar la eficacia de los diferentes fármacos en un línea celular o la mismo fármaco en distintas líneas celulares. La mayoría de los ensayos *in vitro* pueden dividirse en las siguientes categorías: ensayos clonogénicos y de proliferación, valoración de la actividad metabólica, y la medición de la integridad de membrana (Blumenthal, 2005).

3.2. Metodologías de análisis de plantas antitumorales

La búsqueda de plantas con propiedades antitumorales se inicia, frecuentemente, con la disminución del universo de probables plantas citotóxicas, aprovechando los aportes de la medicina folklórica y tradicional, y de conocimiento etnobotánicos que suelen ser acertados y alentadores (Peña & Pérez, 2013).

De las plantas seleccionadas se obtienen extractos con solventes orgánicos y agua. Particularmente se usan los extractos alcohólicos o hidroalcohólicos por su sencillez y fácil manejo, y con el fin de abrir un amplio espectro polar y apolar. El extracto obtenido, para su utilización posterior, se resuspende o disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) de preferencia, con este material se trabaja en diversos diseños experimentales. La mayoría de ellos toma en cuenta las variables y modelos siguientes:

Figura 5: Ruta metodológica completa de la experimentación para la búsqueda de agentes antineoplásicos de plantas.



Fuente: Peña & Pérez, 2013

En la **Figura 5**, se plantean el modelo experimental para obtener un agente con efectividad antineoplásica, siendo los pasos a seguir: primeramente una fase experimental preliminar, en donde se inicia con ensayos in vitro, los cuales plantean un precedente que le permite al investigador tener un punto de partida con respecto a la efectividad del agente en aislamiento, con factores más controlados, menos ruido experimental y menor cantidad de variables. En los ensayos in vivo, se toman en cuenta organismos, en los cuales existen mayor cantidad de interacciones entre las células, tomando en cuenta que en la primera fase se trabajan con líneas celulares aisladas. En esta fase existe mayor cantidad de variables implicadas y los organismos modelo suelen ser con una alta tasa reproductiva (Peña & Pérez, 2013).

En consecuencia, si los ensayos in vitro e in vivo son concluyentes, se procede a realizar la investigación clínica, en donde los pacientes son expuestos a estos agentes, y así, si los metabolitos aislados (o la combinación de estos) son efectivos, se les procede a aprobar como medicamentos para el uso en neoplasias (Peña & Pérez, 2013).

La primera fase de la investigación para la obtención de un agente con actividad antineoplásica corresponde a ensayos in vitro donde se puedan probar su capacidad inhibitoria del crecimiento tumoral. En el presente trabajo de fin de titulación se pretendió comenzar el proceso de estudio de la actividad antitumoral de *H. racemosum*, *H. purpurascens* y *H. scabrum* procediéndose en un futuro a la determinación de las vías de muerte, las proteínas implicadas, seguidos por los ensayos in vivo con animales de experimentación, y por último las fase clínica que permita determinar la actividad en seres humanos. Si todos los análisis anteriormente mencionados son efectivos para un tipo de cáncer se podría obtener una posible terapia antineoplásica (Peña & Pérez, 2013).

3.3. Ensayos con quimiosensibilidad

La investigación preclínica y el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos requieren de una asociación entre los ensayos in vitro e in vivo para la prueba de la

efectividad contra los diferentes estirpes de líneas tumorales. Esto incluye la búsqueda y prueba contra distintos tipos de células tumorales in vitro, la prueba contra especímenes clínicos in vitro, y la prueba in vivo con modelos de xenotrasplante de tumores humanos en ratones desnudos (Reinhold & Tilgen, 2003).

Entre los ensayos más destacados para la determinación de la quimiosensibilidad se encuentra el ensayo de MTT, disponible para el uso a lo largo del transcurso de la enfermedad. Este ensayo fue primeramente empleado para quimiosensibilidad en 1953 en una sección delgada de tejido, pero no fue hasta el advenimiento de la tecnología de microtitulación que ésta técnica fue ampliamente utilizada. Este ensayo semiautomatizado fue adaptado para el desarrollo de ensayos preclínicos para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, comprobándose así una serie de compuestos contra una variedad de líneas celulares tumorales (Reinhold & Tilgen, 2003).

Se ha preferido este ensayo a lo largo del tiempo debido a la simplicidad, rapidez (con respecto al tiempo empleado a escala clínica), y de alta repetitividad. Consiste en una preparación de una muestra la cual se le debe exponer a un agente con una posible actividad, seguida por la medición de la supervivencia celular. La medición de la supervivencia celular se basa en el hecho de que hay una relación lineal entre el número de células vivas por pocillo y la cantidad de formazán producido por las enzimas deshidrogenasas intracelulares. La curva dosis-respuesta resultante es trazada para cada prueba, y la sensibilidad o resistencia es obtenida mediante el uso de criterios predefinidos los cuales brindan al investigador una mayor precisión (Reinhold & Tilgen, 2003).

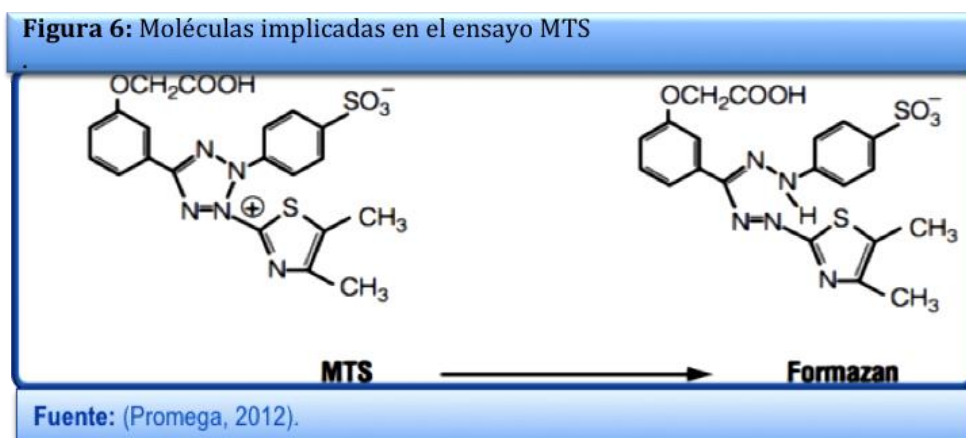
3.4. Principios Ensayo MTS

El ensayo MTS es una modificación del ensayo MTT el cual se basa en la biotransformación del MTS tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolium] (Promega, 2012) por las enzimas celulares en un compuesto coloreado llamado formazán (Schantz, 2010). El MTS es una tinción amarilla

soluble en agua, que es reducido a formazán por las células vivas únicamente (R Freshney, 2010).

La conversión es realizada mediante NADH, producido por las deshidrogenasas en las células metabólicamente activas. El ensayo es destructivo hacia las células (Schantz, 2010). . La diferencia entre el MTS y el MTT es que el primero es una sal, lo cual le permite ser soluble en el medio de cultivo, evitando la formación de cristales, permitiendo así poder efectuar una lectura directa después de su exposición.

La intervención química de un agente aceptor de electrones (metosulfato de fenazina; PMS), un producto intermediario el cual transfiere un electrón desde el NADH en el citoplasma para reducir el MTS en el medio de cultivo en un formazán soluble (Riss & Moravec, 2013). El agente puede penetrar las células viables, reduciendo al reactivo combinado en el citoplasma, saliendo finalmente de las células donde se puede convertir el tetrazolium en un producto soluble (Riss & Moravec, 2013). La cantidad de formazán es medida en proporción a la absorbancia, la cual es directamente proporcional al número de células vivas (**Figura 6**)



3.5. Condiciones de trabajo

La fase experimental se efectuó, en las instalaciones del Laboratorio de Genética Celular y Genotoxicidad de la UTP (LGGT). Todos los procedimientos descritos a

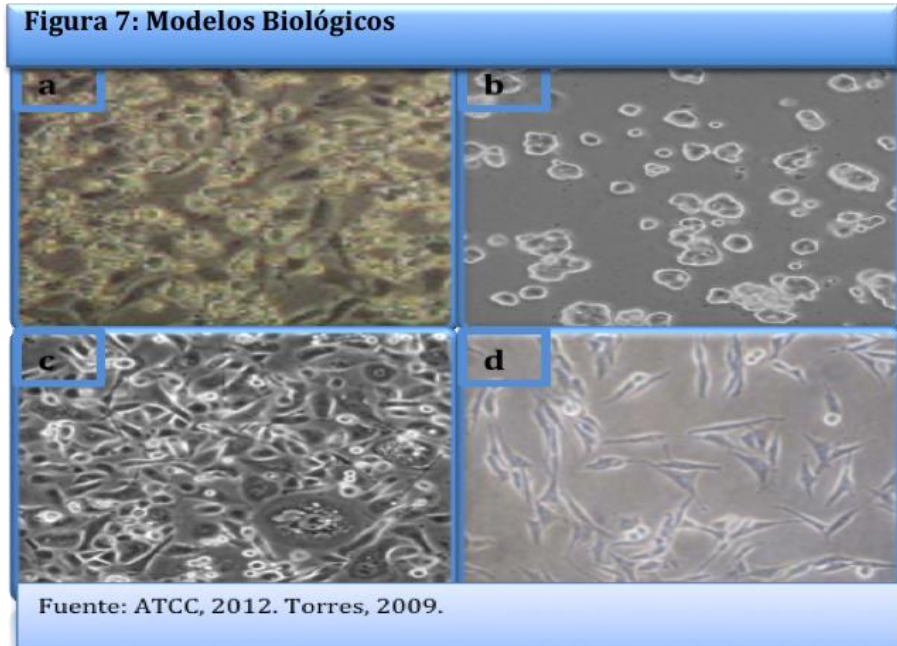
continuación se ajustaron a las normativas expuestas por dicho laboratorio. La metodología MTS se realizó con respecto a lo descrito en el protocolo (CellTiter 96 AQueous one solution cell proliferation Assay, MTS), de PROMEGA. Empleando el equipo de lectura de placas SUNRISE de TECAN.

3.5.1. Extractos y compuestos

Los extractos y compuestos analizados fueron donados por el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, por el Ingeniero Vladimir Segundo Morocho Zaragocin. La metodología de obtención se observa en el anexo 1. El proyecto es parte de Los extractos de metanol y acetato de etilo; fueron obtenidos a partir de *Hedyosmum purpurascens*, *scabrum* y *racemosum*. Así también se analizaron metabolitos secundarios obtenidos a partir de *H.racemosum* (DT030) y *H.scabrum* (VMZ194, VMZ204, VMZ111). Tanto los compuestos como los extractos fueron disueltos en DMSO <0,5%.

3.5.2. Modelos biológicos

Para la determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento tumoral se trabajó con cuatro líneas celulares; las células RKO, MCF-7, PC3, y D-384 (**Figura 5**). Estos modelos biológicos fueron proporcionadas por el laboratorio de Biología Celular y Genotoxicidad (LBCGT) de la Universidad Técnica Particular de Loja. Cada línea celular se descongeló y mantuvo, incubándose a 37°C, en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂, previo a cada tratamiento.



En la figura 7 se muestran las líneas celulares en donde se evaluó la capacidad inhibitoria de los extractos del género *Hedyosmum*: a) Línea celular RKO. Carcinoma de colon humano (ATCC, 2012). b) Línea celular MCF-7 adenocarcinoma mamario. c) Línea celular PC-3 adenocarcinoma prostático grado IV (ATCC, 2012). d) Línea celular D-384 células de cáncer de cerebro humano (Torres, 2009)

3.6. Metodología experimental

El ensayo del presente proyecto trató de conocer la capacidad inhibitoria de los extractos metanólicos y en acetato de etilo de las tres especies estudiadas del género *Hedyosmum* en las cuatro líneas celulares de interés (RKO, MCF-7, D384 y PC3), mediante la microtitulación en 96 micropocillos, cultivadas con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2% de antibiótico-antimicótico y 1% de L-glutamina.

La fase experimental se llevó a cabo dos fases; en la primera se aplicó un tratamiento con extractos a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Seguidamente se procedió a determinar el IC_{50} de los metabolitos secundarios de *H.racemosum* (DT030) y *H.scabrum* (VMZ194, VMZ204, VMZ111) los cuales fueron probados a concentraciones de (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 μM), en las líneas celulares de interés; se tomó como control

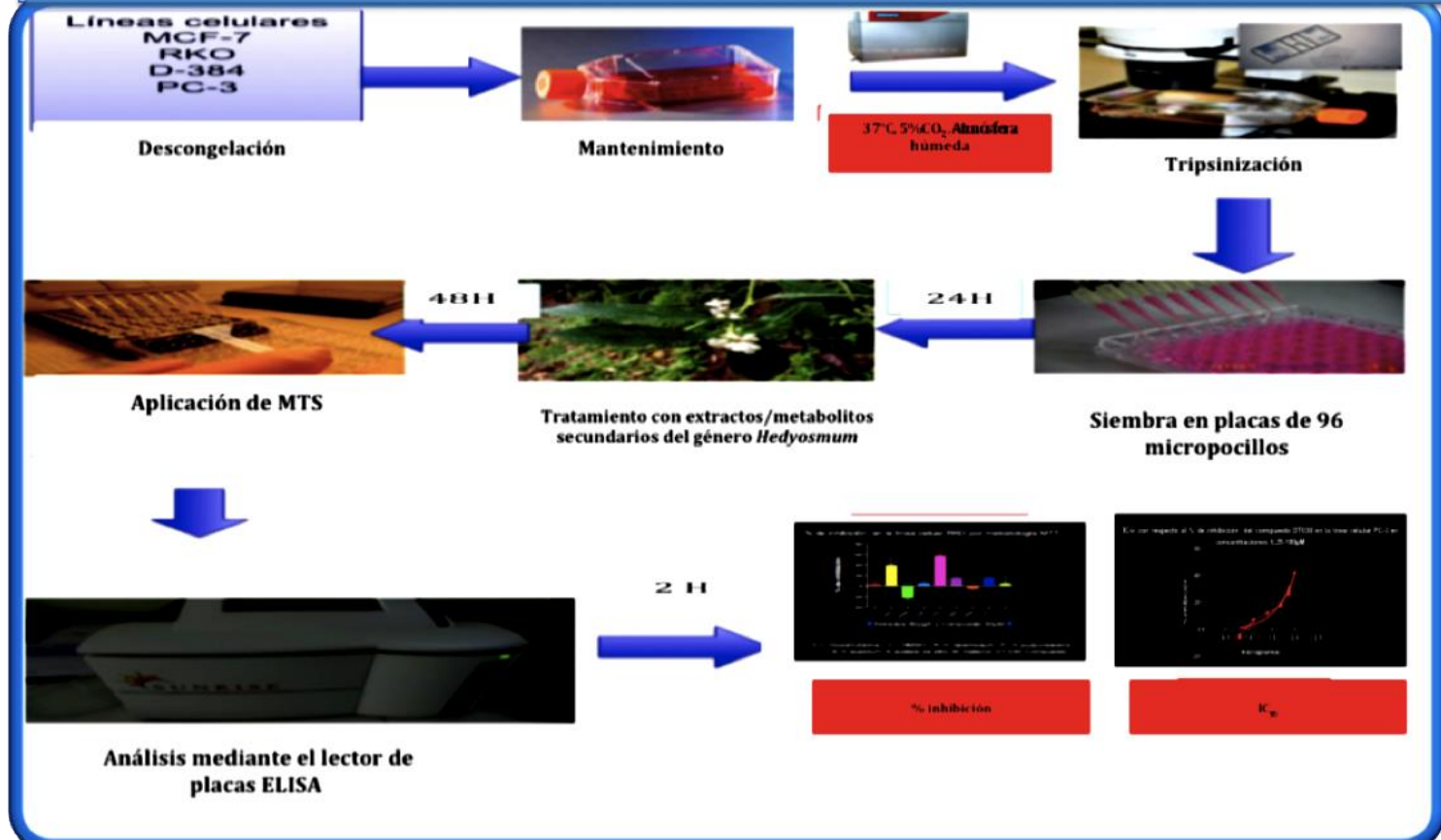
positivo a la Doxorrubicina ($2\mu\text{M}$) y como control negativo el DMSO ($<0,5\%$). Cada ensayo se efectuó por triplicado.

Al tratar la línea celular, se descongeló y mantuvo hasta que alcance la adaptación y/o confluencia adecuada (aproximadamente el 80%). Para el ensayo de cada línea celular se emplearon 4000 células/pocillo, con excepción de la línea celular D-384 a la cual se le coló una solución de 3000 células/pocillo, debido a que el tiempo de replicación de estas células es de 16 horas en esta línea en contraste con MCF-7, PC3 y RKO, cuyo TR asciende hasta 24 horas. Se aplicó el tratamiento correspondiente durante de 48h, incubándose a 37°C , en una atmosfera húmeda, con 5% de CO_2 .

Una vez culminado el tiempo de exposición se le procedió a aplicar la tinción de MTS durante 2 horas, para la respectiva línea celular, a 37°C , en condiciones de cultivo. Para la medición cuantitativa se empleó la espectrofotometría, por medio del equipo TECAN SUNRISE, determinando la capacidad metabólica celular ante el estímulo. Como punto de cierre del ensayo se procedió al análisis estadístico.

El análisis estadístico en la primera fase se realizó por medio del porcentaje de inhibición con respecto al control (%inhibición) conjunto al análisis de varianza (ANOVA). En la segunda fase se procede a realizar la determinación de IC_{50} . El siguiente esquema resume a la metodología aplicada (**Figura 8**)

Figura 8: Metodología experimental aplicada CellTiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay, MTS



Fuente: Promega, 2012

3.7. Interpretación de resultados

A partir de la absorbancia que se presenta con respecto a lectura del equipo SUNRISE a 492nm se procede a transformar estos valores en el porcentaje de inhibición con respecto a los extractos y el IC₅₀ correspondiente a los metabolitos secundarios:

3.7.1. Porcentaje de inhibición:

El porcentaje de inhibición se traduce en el porcentaje en que las líneas celulares inhiben su crecimiento con respecto al control negativo (<0,5% DMSO), es decir como se detiene el proceso de proliferación celular en las células analizadas, tomando al control negativo como un 100% de crecimiento tumoral. La presente inhibición del crecimiento tumoral fue calculado con respecto a la siguiente ecuación:

$$\% \text{inhibición} = 100 - ((\text{Abs-blanco}) \times 100 / \text{C-})$$

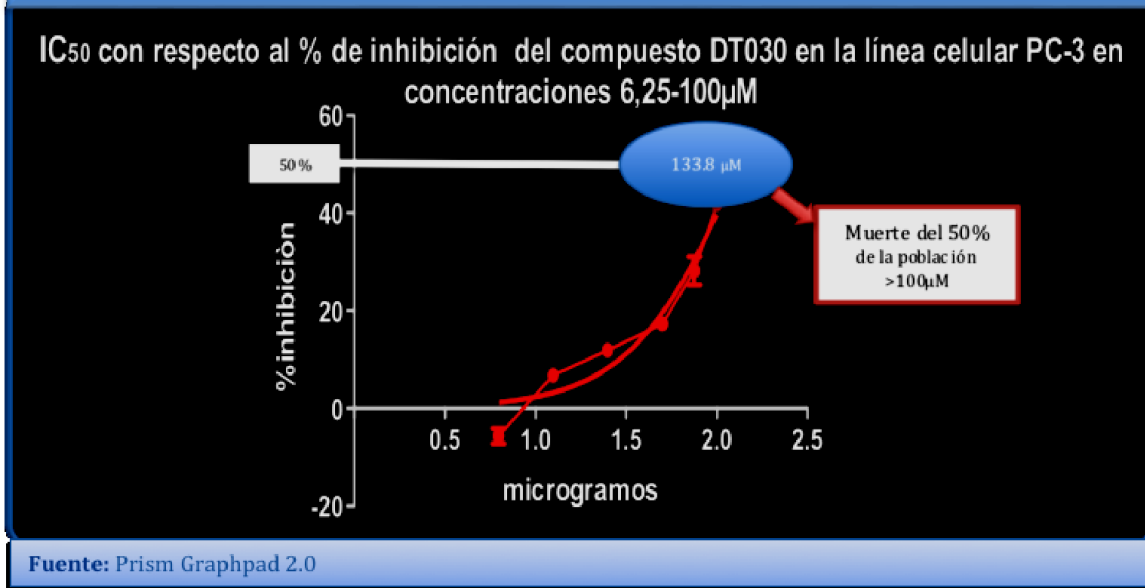
Este porcentaje es a partir de concentraciones de 50µg/ml debido a que corresponde a una media de la concentración máxima en la que estos metabolitos suelen ser analizados, por lo cual los resultados son interpretados con respecto a que tanto disminuye la población celular.

3.8. Determinación de IC₅₀ :

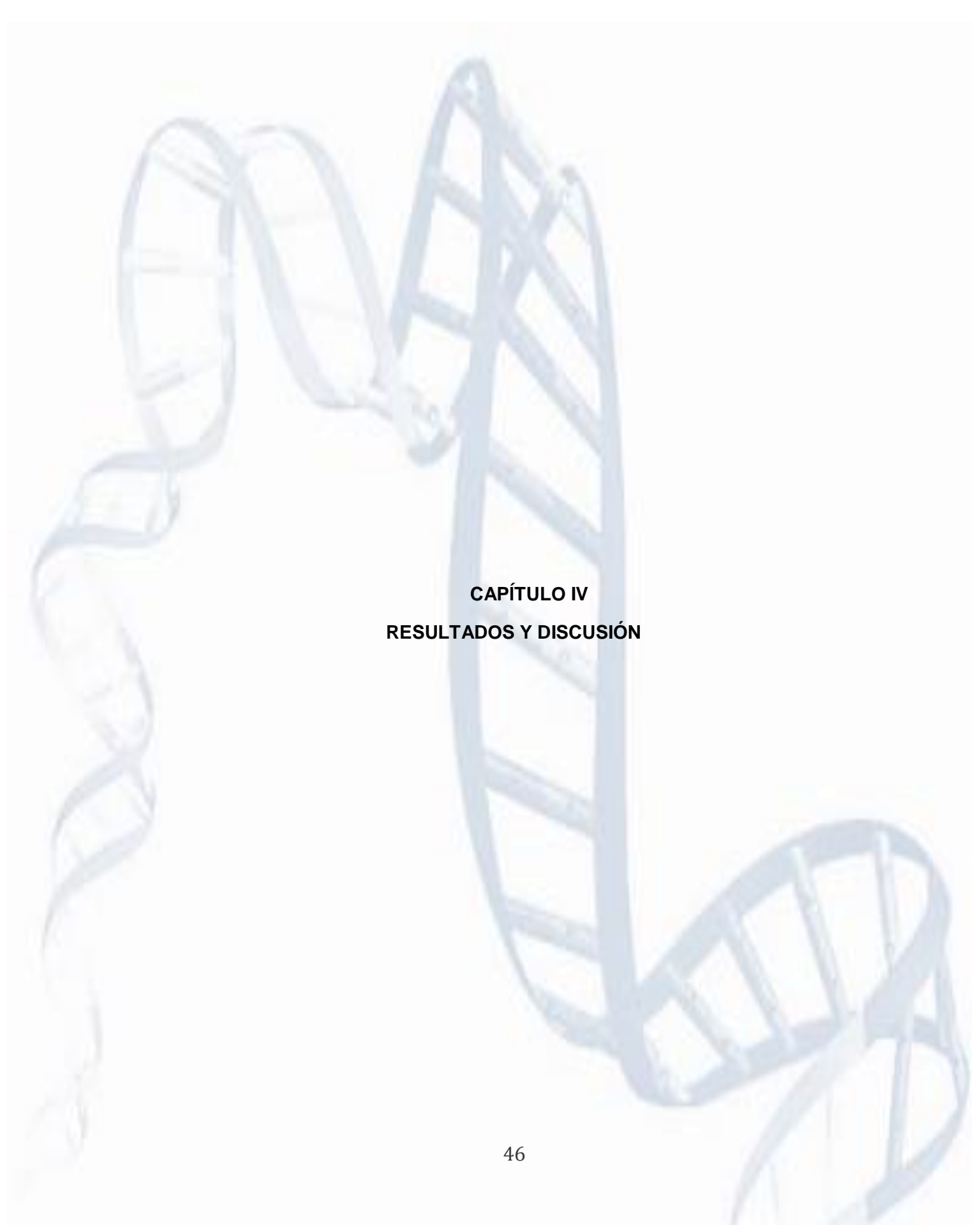
Es empleada básicamente para la medición de la inhibición, en la cual la concentración del inhibidor causa el 50% de inhibición de la actividad enzimática en condiciones experimentales establecidas. La determinación del IC₅₀. La determinación del IC₅₀ es apropiada cuando existe una gran número de compuestos que requieren ser evaluados de las cuales se requiere saber su potencial inhibitorio. Una ventaja de la determinación del IC₅₀ es que este es independiente del mecanismo de inhibición y requiere pocas muestras para generara un resultado significativo. Sin embargo el valor obtenido es significativo en un substrato en el cual

la concentración a ser determinada por todas las formas de inhibición (excepto la inhibición no-competitivo).

Figura 9: Modelo de curva resultante de la determinación del IC₅₀ en DT030.



Para el análisis estadístico del IC₅₀ se realiza la determinación del porcentaje de inhibición de cada una de las dosis evaluadas (6,25 a 100micromolar), y estas son graficadas (**Figura 9**), con respecto al log10 de cada una de estas concentraciones en donde resultan los microgramos de metabolito secundario aplicado. Al hacer una estimación estadística con respecto a los resultados de los porcentajes de inhibición establecidos para cada dosis se puede establecer una dosis en la cual se aniquilaría el 50% de la población. Cuando la IC₅₀ supera las dosis probadas entonces se indica que es mayor a 100 micromolar (>100µM)



CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de porcentaje de inhibición:

A partir de las pruebas preclínicas realizadas en el presente ensayo se obtuvo la proporción en la que el extracto detiene el crecimiento de las células tumorales en el cultivo celular, denominado porcentaje inhibición. Los resultados de las experiencias de crecimiento tumoral realizadas por medio del ensayo MTS presentados a continuación en la **Tabla 2** corresponden a la quimiosensibilidad de las líneas celulares descritas en extractos de *H. scabrum*, *H. purpurascens* y *H. racemosum* (acetato/metanol) con respecto al control negativo (DMSO <0,5%), en concentraciones de 50µg/mL, congruentes a la actividad metabólica presente en las células viables.

Tabla 2 Porcentaje de inhibición en extractos d género *Hedyosmum* (50µg/ml) mediante ensayo MTS

Extractos		MCF7 Cáncer de mama	PC3 Cáncer de próstata	D384 Astrocitoma	RKO Cáncer de colon
<i>Hedyosmum scabrum</i>	Acetato	SA	11 ± 13,85	8 ± 0,289	6 ± 4,649
	Metanol	SA	20 ± 13,09	14 ± 18,54	14 ± 1,226
<i>Hedyosmum purpurascens</i>	Acetato	59 ± 22,29	80 ± 13,85	73 ± 15,28	70 ± 19,8
	Metanol	5 ± 13,18	20 ± 10,64	19 ± 14,28	SA
<i>Hedyosmum racemosum</i>	Acetato	56 ± 3,143	57 ± 1,956	70 ± 1,484	64 ± 8,248
	Metanol	SA	10 ± 7,654	13 ± 0,752	SA

Resultados correspondientes a la media ± SD de dos experimentos independientes por triplicado
SA: Sin actividad inhibitoria del crecimiento tumoral.

Los resultados de la **Tabla 2** , indican una tendencia poco significativa (<50%) en los extractos de *H. scabrum* en metanol y acetato, sin embargo se puede apreciar resultados favorables (>50%) de inhibición en los extractos correspondientes a *H. racemosum*/acetato (MCF-7 = 56%; PC-3= 57%; D-384 =70% ,RKO64%), así como en *H. purpurascens*/acetato (MCF-7 =59%, PC-3=80%, D-384= 73%, RKO=70%).

La actividad de estos extractos puede que se atribuya a los metabolitos con actividad antineoplásica encontrados en ensayos con respecto a la familia *Cholantaceae* en especial el descubrimiento de lactonas sesquiterpénicas en esta familia (Cao et al., 2008), las cuales fueron encontradas en especies como *H. orientale* (Su et al., 2008), *H. Angustifolium* (Acebey et al., 2007), y *H. racemosum* (Castañeda, 2007), estos representan metabolitos con actividad citotóxica comprobada, lo cual pudiese encaminar al escudriño de nuevos metabolitos en las especies reactivas.

Influencia de solventes

Con respecto a los extractos es importante conocer que la polaridad del solvente influye en la cualificación y la cuantificación de los metabolitos dicho extracto (Lang, Anaya, Espinosa, & Cruz, 2001) por lo cual al observar la baja actividad de *H. scabrum*, no podemos asumir definitivamente que esta especie no tiene actividad inhibitoria del crecimiento celular, pero si podemos, conforme a los resultados, indicar que los extractos en metanol y acetato de etilo no presentan esta capacidad.

La cualidad fitoterapéutica de un extracto puede presentarse en muestras extraídas con diversos tipos de solventes, sabiéndose que, cuanto menos polar sea el solvente, más rápidamente eluirán los compuestos orgánicos en la columna cromatográfica (Olmedo, 2005). Acetato de etilo, al ser un solvente de mediana polaridad, es capaz de extraer los compuestos orgánicos en un mayor rango que el metanol(Duran, 2007), esto puede explicar que los resultados más favorables obtenidos fuesen en las porciones de *H. racemosum* y *H. purpurascens* en su fracciones de acetato de etilo con respecto al metanol, asumiéndose que el metabolito de interés se encuentra vinculado con esta porción del arrastre.

Como se mencionó anteriormente el cáncer es un conjunto de enfermedades, que presentan particularidades con respecto a su crecimiento y reacción a agentes quimioterapéuticos, por lo que no es de extrañar que reaccionen de manera variada a los tratamientos aplicados. Con respecto a los extractos citotóxicamente activos, se

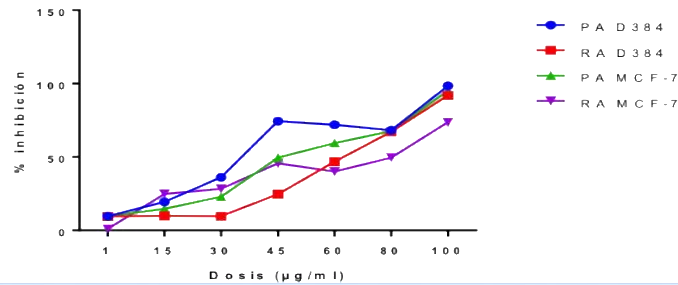
aprecia en células de crecimiento rápido, como D384, una mayor inhibición del crecimiento tumoral, por lo que concuerda con Kumar., et al, 2009, en donde se establece que la velocidad de crecimiento de un tumor se determina por el tiempo de duplicación de las células tumorales, la fracción de células tumorales que están en el fondo común replicativo y la velocidad a las que se elimina o mueren las células y que esta ataca principalmente a las células que se encuentren en el fondo replicativo.

Así en *H. racemosum/acetato* se puede observar una disminución en el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral en las líneas celulares de menor índice de replicación celular, correspondientes al cáncer de colon (RKO) y mama (MCF-7) (Kumar et al., 2009). Por lo que con respecto a la velocidad de crecimiento, los agentes quimioterapéuticos tienden a atacar a las células de mayor índice de replicación, proponiendo que la actividad de *H. racemosum/acetato* tiene que ver con los factores de replicación celular o el ataque a células que se encuentren en el fondo replicativo.

Al observar los resultados de la **Figura 10** se puede apreciar que las líneas celulares siguen un modelo de cinética primer orden (dosis dependiente) en donde se indica una gráfica de regresión lineal del tumor, lo que significa la validez de la ley de Skipper para la medición de la efectividad quimioterapéutica. En ella se puede ver el tratamiento de *H. racemosum* y *H. purpurascens* aplicados a MCF-7 y D384 como dosis dependientes.

En esta gráfica se muestran dosis de 1, 15, 30, 45, 60, 80, y 100 µg/ml a partir de extractos de *H. racemosum/acetato* (RA), *H. purpurascens/acetato* PA, las cuales son evaluadas por su velocidad contrastante con respecto al crecimiento representando los dos tipos tumorales: de lento crecimiento (RKO, PC3 y MCF-7) y los de rápido crecimiento (D384). El contraste planteado, es congruente con relación a la dosis empleada para determinar el porcentaje de inhibición, siendo este congruente con la **Tabla 2** en donde solamente se empleó una dosis de 50µg/ml.

Figura 10. Curva de regresión lineal en las líneas celulares MCF-7 y D-384 en exposición de *H. racemosum* y *H. purpurascens*



Fuente: Autor Graphpad Prism

Con respecto a la velocidad de crecimiento la línea celular D384 tiene la particularidad de tener un tiempo de replicación de 16 horas, en contraste con las demás líneas celulares de 24 horas. Al realizar una comparación de las líneas celulares de mayor velocidad de crecimiento (D384) o a las células que se encuentran con mayor cantidad de células en el fondo replicativo, con las de menor índice podemos ver que MCF-7, PC3 y RKO son menormente afectadas por *H. racemosum*; indicando que puede haber un componente que interfiera con la división celular y que ataque a las células que se encuentren en el fondo replicativo.

Furth y Kahn en 1937, establecen que al no haber una muerte celular efectiva el tratamiento no es satisfactorio, al hablarse de una muerte celular efectiva para esta investigación se establece como parámetro que esta cumpla con la ley Log Kill de Skipper, según esto se puede ver la efectividad de dicho agente; por ejemplo, *log-kill 2* es el que pudiese reducir a la población de 10^9 a 10^7 , es decir que aunque pudiese aniquilar el 99% de la población celular, todavía quedarían 10^7 células residuales, lo que se espera es un resultado que demuestre un *log-kill 3* es decir que mate el 99.9% de las células tumorales (Perry, 2008). Según esto para que el tratamiento cumpla con el cometido debe haber al menos un 50% de muerte celular. El modelo matemático establece que si este resultado es menor a la dosis establecida, no se alcanzaría lo requerido en ley de Skipper sería mayor a $100\mu\text{g/ml}$, es decir:

Sí;

50µg/ml	→	50% (inhibición)
100µg/ml	→	99,9% (inhibición)

La segunda ley de Skipper propone que la muerte de las células por el medicamento procede a una cinética del primer orden; es decir que el porcentaje de células muertas que una dosis de un determinado medicamento puede provocar es una constante, es decir, la muerte de las células a 50µg/ml es proporcionalmente ascendente a su muerte en dosis mayores, sin importar la cantidad de células tumorales presentes. Sin embargo esto aplica a que este medicamento mate el 99% de las células tumorales, siendo este el escenario ideal, en el cual se mate esta fracción independientemente de la confluencia celular; es decir que si se encuentran 10^4 células debería reducirse a 1 célula, siguiendo una curva exponencial de muerte celular (*log-kill*).

Para realizar un parámetro hipotético con respecto a la muerte del 99.99% (log kill 3) de las células tumorales, se procede a hacer una relación entre los resultados a 50µg/ml con los resultados esperados para alcanzar este parámetro, debido a que, si existe una constante en la dosis, se establece que el efecto va a aumentar proporcionalmente. A continuación se explicará el modelo usando a D384 como ejemplo:

Con respecto a los resultados obtenidos con D384 se muestra una disminución de un 70% a partir del inóculo principal de 3000 células para un tiempo de replicación de 16 horas, con un incubación de 48 horas a partir de la adición del tratamiento aplicado (extracto) **Tabla 3**, se puede observar la siguiente relación:

Tabla 3 modelo de proliferación celular de D384 con respecto a la cantidad de células en el control negativo.

Día	Tiempo de replicación	Población final
0 (siembra)	0	3000células
1 (Tratamiento)	24 (1,5 ciclos de replicación)	7500células
2 (tratamiento)	48 (3 ciclos de replicación)	9000células
3 (cosecha)	72 (4,5 ciclos de replicación)	13500 células

Al disminuirse de $1,3 \times 10^4$ células a un 30% de proliferación sería la siguiente relación:

$$\begin{array}{l}
 1,3 \times 10^4 \longrightarrow 100\% \\
 x \longrightarrow 30\%
 \end{array}$$

donde x corresponde a 4050 células es decir disminuyo de $1,3 \times 10^4$ a $4,05 \times 10^3$ por lo cual se puede decir que no llega a una regresión tumoral, en la línea celular D384, además no tiene una disminución de 99,9 al 90% que la coloque dentro de la ley de Skipper en el rango *log-kill* bajo esta dosificación. Al ser esta la mayor inhibición con respecto a las líneas celulares para este extracto, se toma este mismo modelo para ubicarlas fuera de la ley de Skipper para esta dosificación (50µg/ml), sin embargo estos son resultados significativos debido a que se puede buscar una respuesta a partir de concentraciones mayores (50-100µg/ml), en donde se presume que al ser resultados dosis dependiente llegarán a ser mayores conforme se aumente la dosis:

$$\begin{array}{l}
 50 \mu\text{g/ml} \longrightarrow 70\% \\
 100 \mu\text{g/ml} \longrightarrow <100\%
 \end{array}$$

Al ser mayor al 100% se establece que se llegaría a una regresión tumoral, es decir que el tumor se vería disminuido en su totalidad, sin embargo se desea conocer cual sería la dosis que llegaría a alcanzar un 99,9% de muerte (*log-kill* 3), en este caso de

71,35µg/ml, a partir de lo anterior podemos colocar los datos correspondientes a todas las líneas celulares de los extractos de interés, señalando el porcentaje de inhibición para 50µg/ml y la dosis requerida para alcanzar la Ley log-kill 3 siguiendo este mismo modelo (**Tabla 4**):

Tabla 4 Resultados relativos a la ley de Skipper (*log-kill 3*) en las líneas celulares de interés con respecto a los extractos con un porcentaje de inhibición significativo (>50%).

Línea celular	%inhibición en <i>H. purpurascens</i> (acetato de etilo)	Ley de Skipper (<i>log-kill 3</i>)	%inhibición en <i>H. racemosum</i> (acetato de etilo)	Ley de Skipper (<i>log-kill 3</i>)
D384	73%	68 µg/ml	70%	71 µg/ml
MCF7	59%	85 µg/ml	56%	89 µg/ml
PC3	80%	62 µg/ml	57%	88 µg/ml
RKO	70%	71 µg/ml	64%	78 µg/ml

Con respecto a los resultado las dosificaciones de la **Tabla 4**, ya que estos para alcanzar el 99.9% de inhibición correspondiente a la ley de Skipper no sobrepasan los 100 µg/ml se puede decir que estos proceden a ser efectivos con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral; sabiéndose que en relación a la dosis un compuesto es más potente cuanto menor sea la dosis necesaria para obtener un efecto determinado (Toro, 2008), por lo cual al sobrepasar esta dosificación en una relación dosis dependiente un resultado menor al 50% no sería significativo .

A continuación se planteará un análisis de los datos entre sí con respecto a las leyes establecidas y además entre dos líneas celulares que discrepan en la velocidad de crecimiento siendo MCF-7 una línea de menor crecimiento y D-384 de un crecimiento acelerado, mediante los análisis realizados en el laboratorio con respecto a estas líneas celulares y presentados en la **Figura 10**:

Al hacer una comparación entre los resultados esperados **Tabla 4** y los resultados obtenidos y presentados en la **Figura 10**, se puede observar una divergencia, por lo que aunque se muestra una cinética de primer orden (dosis dependiente), con una relación entre la inhibición del crecimiento tumoral y la dosis establecida, estos no expresan una potencialidad que represente el 99,9% de las muertes con respecto a una dosis menor esperada, por ejemplo en D-384 con respecto a *H. purpurascens* la ley de Skipper establece que debería haber un deceso celular de un 99.9% en la dosis de 67µg/ml, sin embargo esto ocurre en el modelo experimental.

Si tomamos en consideración los resultados obtenidos de MCF-7 tiene una cercanía mayor por el retroceso lento de las células con respecto al fondo proliferativo que se encuentra en menor proporción que en D-384, de esta última se esperaría un mayor deceso celular con respecto a las dosis, sin embargo los datos indican, que puede que las células no mueren a la velocidad esperada (no se contribuye a los mecanismos de muerte) o que puede que este fenómeno resulte a partir de que las células estén llegando a la fase plateau, en la cual no habría un efecto mayor del agente quimioterapéutico (**Figura 4**). Puede ser que a su vez que no hubo una proliferación celular en la cual aunque se muriesen el 99,9% de las células y que estas quedasen fuera del manto proliferativo (véase sección 1.5), quedando así en un estado de latencia G0 por lo que no llegasen a ser afectadas por el extracto, es decir que se dio un detenimiento del crecimiento sin embargo no se alcanzó la muerte celular en esta sección poblacional hasta el punto final de la reacción MTS.

Con respecto a *H. purpurascens* hasta ahora no se ha reportado la evaluación química y biológica de esta especie vegetal que plantee un precedente claro acerca de sus usos farmacológicos debido a su escaso estudio (Paredes, 2013), sin embargo en otras especies más estudiadas del género se han reportado agentes que pueden explicar los resultados obtenidos en la **Tabla 2**; por ejemplo, *H. racemosum* se ha empleado para tratar la esterilidad ayudando a la concepción (Lopes & Vido, 2009), además *H. brasiliense* de estar asociado al tratamiento en las disfunciones de ovario (Resende,

2009), pudiendo afectar los receptores de estrógeno (Levenson & Jordan, 1997), por otro lado se ha reportado en *H. bonplandianum* (Cárdenas et al., 1993) la presencia de kaempferol, el cual es un flavonoide reportado como un fitoestrógeno (estrógeno natural)(Roth, Schaffner, & Hertel, 1999), todas estas propiedades tienen en común el factor hormonal.

En el estudio de Pierre y colaboradores, muestra como la interacción entre los receptores de estrógeno de las células MCF-7 (estrógeno dependiente) con diferentes fitoestrógenos, en donde se muestra una competencia con el estradiol para este receptor. En su estudio se demostró que estos compuestos se unen y traslocan los receptores de estrógeno del citoplasma al núcleo en MCF-7, y que el complejo de receptor de fitoestrógenos es entonces procesado de manera análoga al complejo nuclear de receptor de estrógeno, y que además estos compuestos tienen potenciales efectos biológicos, como lo son la promoción del crecimiento de las células tumorales.

Wang y Kurzer, 1978 en su investigación donde evalúan trece isoflavonoides, flavonoides y sus ligandos, en donde incluyeron varios fitoestrógenos conocidos, tomando en cuenta sus efectos en la síntesis de ADN en células humanas estrógenos-dependientes (MCF-7) y estrógeno independiente (MDA-MB-231).

El tratamiento aplicado en tratamientos de 24 horas con la mayoría de los compuestos se inhibió la síntesis en las células estrógeno independiente. Sin embargo en MCF-7, se observaron efectos bifásicos(Piere, Horwitz, Dale, & McGuire, 1978). Cabe recalcar que este estudio es nuevamente corroborado en pruebas mas recientes en ratones en donde se examina la influencia de la genisteína en la línea celular MCF-7, utilizando el principio de Piere, viéndose incluso una regresión tumoral cuando este componente es eliminado de la dieta(Wu, Yang, Yu, & Jin, 2012)

En el estudio se concluye que concentraciones menores, fitoestrógenos tales coumestrol, la genisteína, la biochanina A, la apigenina, la luteolina, el kaempferol y la enterolactona provocaron la síntesis del ADN en un 150-235%. La estimulación continua

de las células MCF-7 durante 10 días con genisteína o coumestrol dio como resultado la estimulación continua del ADN a bajas concentraciones (Piere et al., 1978).

El estudio insta a una conexión con el efecto estrogénico de los componentes debido a la inducción que se presenta en la síntesis de ADN en las células MCF-7 pero no en las MDA-MB-231. Concluyéndose que si bien en altas cantidades de estos componentes flavonoides se inhibe el crecimiento tumoral en la ya antes mencionada línea celular, esta misma cualidad puede ser inhibida en bajas concentraciones de los mismos metabolitos (Wang & Kurzer, 1997).

Según lo citado anteriormente puede relacionarse el bajo deceso de la muerte celular en MCF-7 (59%) con respecto a las demás líneas celulares, el cual puede ser debido a su receptores sensibles a hormonas (esta es una línea celular de cáncer de mama estrógeno dependiente), las cuales puede que se encuentren en una baja proporción en el extracto analizado, por lo cual una estimulación de este tipo podría aumentar la población celular en contraste con efecto citotóxico que este extracto pudiese tener sobre MCF-7. Al tener un porcentaje de inhibición significativo que le permite asumir una disminución importante en la población, es decir que el efecto causado se puede atribuir a algún factor que interfiera con la proliferación o muerte celular.

Así también se toma a PC-3(80%) como ejemplo, debido a que este se ha reportado como una línea celular con expresión de receptores de andrógenos (Divaker et al., 2006). Los estrógenos pueden estimular en forma directa o indirecta los elementos del estroma de la próstata (Wein et al., 2008) sabiéndose que los estrógenos son un tratamiento en el cáncer de próstata (Instituto Nacional del Cancer, 2013). En investigaciones con fitoestrogenos de la soja (genisteína y daidzeína) en esta línea celular se ha demostrado una disminución en la viabilidad celular, incrementando la apoptosis (Gortazar & Calahorra, 2006). Tomando en cuenta estos hallazgos con respecto a los fitofármacos se podría justificar la disminución de esta línea celular.

Sin embargo observándose el resultado de D-384 (73%) y RKO (70%), dos líneas celulares distintas con respecto a su crecimiento y propagación celular, se puede observar que consecuentemente los factores de crecimiento son una variable descartable con respecto a la inhibición tumoral, en este caso sería ideal el observar la intervención en los factores de muerte celular con respecto a la propiedad citotóxica.

4.2 Determinación de IC₅₀

De los extractos *H.scabrum* (VMZ 111, 194, 204) y de *H.racemosum* (DT030) fueron aislados compuestos, los mismos que fueron evaluados para establecer si ellos son los responsables de la acción observada anteriormente. Para ello se estudió respuesta inhibitoria estableciendo la dosis que represente la muerte en el 50% de la población (IC₅₀). La **Tabla 5** presenta dichos resultados:

Tabla 5. Resultados de la obtención de la IC₅₀ en metabolitos secundarios obtenidos a partir del género *Hedyosmum*

Especies	Líneas celulares			
	D-384	MCF-7	PC-3	RKO
<i>H.scabrum</i>				
Compuestos				
VMZ 204/92	>100	>100	>100	>100
VMZ 111/75	>100	>100	>100	>100
VMZ194/84	>100	>100	>100	>100
<i>H. racemosum</i>				
Compuestos				
DT030	>100	>100	>100	>100

Resultados referentes a concentraciones expresadas en micromolar (μM), las cuales al ser mayores a 100μM evidencian una nula actividad antineoplásica con respecto a las líneas celulares de interés.

Debido a la “red metabólica”, representada por el metabolismo de los compuestos ya sea ácidos fenólicos, terpenos o alcaloides, etc., presentes en las vías de biotransformación de metabolitos secundarios dentro la célula, por la exposición al tratamiento con los extractos, se esperaría que debido a los antecedentes presentes en

el género *Hedyosmum* con respecto a la fitoterapéutica antineoplásica, se produjese una reacción citotóxica en las células (Lang et al., 2001).

En las células existe una serie de reacciones paralelas e interconversionales que se dan en un arreglo pluridimensional que se conjunta con el hecho de existir una serie de vías metabólicas de la planta que permiten la producción y obtención de metabolitos secundarios, afectados por varios factores como el tiempo y condiciones de recolección y aislamiento de la muestra, así como una asociación entre los diferentes metabolitos presentes en la planta (Lang et al., 2001).

La asociación entre varios metabolitos secundarios promuevan que uno solo no sea el causante de la actividad biológica buscada. Esto puede ser evidenciado en el caso de *H. racemosum*/acetato, con respecto al compuesto *DT030*; observándose una acción inhibitoria en el primero, en contraste con la inaparente acción de *DT030* con respecto a la dosis establecida para la experimentación., aunque que supondría una acción, ya que los análisis mediante resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases realizadas en el Instituto de química aplicada de la UTPL la definen como una lactona sesquiterpénica, a este grupo de terpenos se les ha atribuido una cualidad antitumoral. Cabe recalcar que la inhibición probada es dosis-dependiente, por lo cual podemos decir que las dosis probadas indican que no existe un efecto significativo en porciones menores a 100 μM debido a que las IC_{50} de los metabolitos aislados son mayores a las probadas.

Con respecto a los metabolitos aislados de *H. scabrum*, podemos aseverar que pueden existir metabolitos que enmascaren la actividad de otros, por lo cual aunque los compuestos VMZ 204, 194 y 111, no presentaron una inhibición del crecimiento de la población en dosis menores a 100 μM . No podemos descartar que otros metabolitos, que sean aislados de esta misma planta no pudiesen actuar satisfactoriamente con respecto a esta propiedad.

Todos los resultados expuestos en ambas fases suponen solamente una actividad inhibitoria correspondientes a las líneas celulares de interés, no se descarta la actividad de los extractos/moléculas con otras líneas celulares.

CONCLUSIONES

El extracto de acetato de *H. racemosum* presenta una acción antitumoral en las líneas celulares RKO, MCF-7, PC-3 y D384, presentando un mayor porcentaje de inhibición en D-384 (astrocitoma cerebral), al ser evaluado mediante MTS.

El extracto de acetato de *H. purpurascens* mostró una inhibición del crecimiento tumoral en las líneas tumorales RKO, MCF-7, PC-3 y D384, minoritariamente en MCF-7(cáncer de mama).

Los extractos de *H. scabrum* tanto en metanol como en acetato de etilo, no presentaron una actividad antitumoral significativa (<50%), ante las líneas celulares RKO, MCF-7, PC-3 y D384.

Los metabolitos secundarios extraídos de *H. scabrum*, VMZ 204, 194 y 111, no presentaron un IC₅₀ que demuestre actividad antitumoral hasta una dosis de 100 uM DT030, es una lactona sesquiterpénica extraída de *H. racemosum* no presentó una IC₅₀, en dosis menores a 100uM

RECOMENDACIONES

Complementariamente a los análisis realizados se recomienda el continuar el escudriño de las propiedades de inhibición del crecimiento tumoral, en más líneas celulares de interés poblacional, en especial tomando como referencia los extractos de *H. racemosum* y *H. purpurascens* en fracción acetato. Con los resultados positivos de dichos extractos se puede continuar la búsqueda de metabolitos secundarios de interés para la comunidad científica. El fraccionamiento con solventes más polares como el hexano podría ser recomendable para conseguir un efecto quimioterapéutico de *H. scabrum* debido a que este extracto del género *Hedyosmum* pudiese tener compuestos que aún no fuesen evaluados, esto se aplica igualmente a los demás extractos



BIBLIOGRAFÍA

- Acebey, L., Sauvain, M., Beck, S., Moulis, C., Gimenez, A., & Jullian, V. (2007). Bolivianine, a new sesterpene with an unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. *Organic Letters*, 9(23), 4693–6. doi:10.1021/ol7015725
- Adrouny, A. (2002). *Understanding Colon Cancer*. Mississippi: University Press of Mississippi. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=AOAEqOmOBqoC>
- Bercion, S., Baltaze, M.-A., & Bourgeois, J.-P. (2005). A new α -methylene γ -lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 620–624. doi:10.1016/j.fitote.2005.06.006
- Blumenthal, R. (2005). *Chemosensitivity: Volume I: In Vitro Assays*. Humana Press. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=sXoSejtgzckC>
- Bussmann, R., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., ... Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–8. doi:10.1016/j.jep.2010.07.048
- Bussmann, R., Sharon, D., A, F. P., P, D. D., Ford, T., Rasheed, T., ... Silva, R. (2008). Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants, 15(1), 127–148.
- Cancer research UK. (2013). Cancer. Retrieved October 04, 2013, from <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/what-is-cancer/cells/what-cancer-is>
- Cao, C.-M., Peng, Y., Shi, Q.-W., & Xiao, P.-G. (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*, 5(2), 219–38. doi:10.1002/cbdv.200890020
- Cárdenas, L., Rodríguez, J., Villaverde, M., Riguera, R., Cadena, R., & Otero, J. (1993). The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Medica*, 57, 26–27.
- Carles, I., Casanova, J., Mundina, M., Vila, R., & Tomi, F. (1999). Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 15, 201–205.
- Castañeda, M. L. (2007). *Estudio de la composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas Colombianas*. Univer. Universidad Industrial de Santander.

- Castro, A., Villarreal, M., Salazar, L., Gomez, M., Dominguez, F., & Garcia, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945–72. doi:10.1016/j.jep.2010.11.055
- Condit, R., Pérez, R., & Daguerre, N. (2010). *Trees of Panama and Costa Rica*. New Jersey: Princeton University Press. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=TqIGnkl8rPIC>
- Cramer, S., Alcamo, I., & Heymann, D. (2007). *Prostate Cancer*. New York: Chelsea House.
- De la Torre, A. M. (2002). *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*. Glosa. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=qGA402PCFNsC>
- Duran, M. (2007). *Universidad Del Azuay*. Cuenca. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=EX8zAQAAMAAJ>
- Escalona, J. (1996). *Tumores del sistema nervioso central*. Editorial Complutense. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=lltqPtcjJAKC>
- Fatouma, A., Jianming, C., Zane, B., Xin, H., & Divaker, C. (2006). DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters*, 580(9), 2294–300. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.041
- Freshney, R. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. *media.matthewsbooks.com.s3. ... , Edition, F*, 359–373. Retrieved from <http://media.matthewsbooks.com.s3.amazonaws.com/documents/tocwork/047/9780470528129.pdf>
- Freshney, R. (2010). Citotoxicity. In *Culture of animal cell* (pp. 357–367). London: John Wiley & Sons.
- García, J. (2000). *Oncología clínica básica*. Madrid: ARAN. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=co3E3qO8_zoC
- Ginatta, G. (2012). Biocomercio Andino: Base de datos de flora comercializada en el Ecuador. Retrieved from http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum_rsFlora=5&totalRows_rsFlora=299

- Gortazar, A., & Calahorra, F. (2006). Diferentes dosis de los fitoestrógenos genisteína y daidzeína afectan de distinto modo a la viabilidad celular y a la expresión de factores implicados en el desarrollo de cáncer de próstata. *REEMO*, 15(5), 91–7.
- Gualavisí, L. (2008). *Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del Ministerio de Salud Pública*.
- Gutiérrez, J., & Salsamendi, A. (2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Madrid: Díaz de Santos. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=EwQk094_IKcC
- Heinrich, M., & Paul, B. (2006). Ethnobotany and Ethnopharmacy- Their Role for Anti-Cancer Drug Development. *Benthan Science Publishers*, 7, 239–245.
- Hoskins, W. (2005). *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=KW9esgo759EC>
- IARC. (2008). Breast Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 Summary. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
- IARC. (2008a). All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *GLOBOCAN*. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
- IARC. (2008b). Prostate Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 Summary.
- Instituto Nacional del Cancer. (2013). Aspectos generales de las opciones de tratamiento del cáncer de próstata. Retrieved from http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/HealthProfessional/page3#Section_2242
- Koolman, J., & Röhm, K. (2004). *Bioquímica: texto y atlas*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=f61Mvd-vl60C>
- Kubitzki, K., Rohwer, J., & Bittrich, V. (1993). *Flowering Plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*. New York: Springer. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=yjlzrzbRXNQC>
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Aster, J. (2009). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=_1Zmvm4JVNCc

- Lang, A., Anaya, A., Espinosa, F., & Cruz, R. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Mexico D.F: Plaza y Valdés. Retrieved from <http://books.google.co.cr/books?id=8Gt7CoKx3W4C>
- Lanore, D., & Delprat, C. (2004). *Quimioterapia anticancerosa*. Barcelona: Masson. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=5-hHBJ8iw0kC>
- Lee, K., Huang, E., Piantadosi, C., Pagano, J. S., & Geissman, T. (1971). Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones¹, 1649–1654.
- Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line ', 3071–3078.
- Lopes, D., & Vido, R. (2009). Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart . ex Miq . provenientes da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica) Comparação da composição química e.
- Lorenzo, D., Loayza, I., & Dellacassa, E. (2003). Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(1), 32–35. doi:10.1002/ffj.1146
- Marroquin, L. (2010). *Manual de Fitoterapia* (Vol. 1). Mexico D.F: Editorial Trillas.
- Monks, N., Bordignon, S., Ferraz, A., Machado, K., Faria, D., Rafael, L., ... Gilberto, S. (2002). Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. *Pharmaceutical Biology*, 40(8), 603–616.
- Neurocirugía Barcelona. (2012). *Astrocitomas*.
- Ocampo, R. (1994). *Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica: actas de la reunión técnica centroamericana celebrada del 30 de mayo al 3 de junio de 1994 en el CATIE, Turrialba, Costa Rica*. CATIE. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=WBQRAQAIAAJ>
- Olmedo, M. (2005). *Experimentación en química: química orgánica, ingeniería química*. Valencia: Universidad Politécnica. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=ZxYTJD65gV8C>
- OMS. (2013). Cancer. Retrieved from <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>.

- Orhan, I. (2012). *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites* (pp. 53–54). Bentham Science Publishers. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=FMyxLR6C5n0C>
- Pardee, J. (2011). *Breast Cancer*. Morgan & Claypool. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=ZiombMr6NmsC>
- Paredes, M. (2013). *Composición química y actividad antimicrobiana de Hedyosmum purpurascens (Chlorantaceae) de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Peña, D., & Pérez, J. (2013). METODOLOGIAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN DE PLANTAS ANTITUMORALES : DESCRIPCIÓN Y COMENTARIOS. Retrieved from http://cientifica.edu.pe/_data/archivos/Investigaciones/Metodologias_utilizadas_en_la_investigacion_de_Plantas_Antitumorales_Descripcion_y_Comentarios.pdf
- Perry, M. C. (2008). *The Chemotherapy Source Book*. 2008: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=CDADMzS0TKUC>
- Pierce, B. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Madrid: Editorial Medica Panamericana Sa de. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=ALR9bgLtFhYC>
- Piere, M., Horwitz, K., Dale, R., & McGuire, W. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 103(5), 1860–7. doi:10.1210/endo-103-5-1860
- Promega. (2012). Solution Cell Proliferation CellTiter 96® AQ ueous One Solution Cell Proliferation Assay.
- Ramírez, R. (2012). *La universidad para transformar la sociedad*.
- Reinhold, U., & Tilgen, W. (2003). *Chemosensitivity Testing in Oncology*. Springer. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=U8DRrUbq6swC>
- Resende, D. (2009). *Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de hedyosmum brasiliense provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)*. Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente (São Paulo - Estado). São Paulo, SP, Brasil.

- Riss, T., & Moravec, R. (2013). Assay Guidance Manual. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/mttassays.pdf>
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays.
- Roth, A., Schaffner, W., & Hertel, R. (1999). Phytoestrogen kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) protects PC12 and T47D cells from beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroscience*, *57*, 399–404.
- Rubin, P. (2002). *Oncologia Clinica*: Elsevier. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=-whwqAxxacMC>
- Ruddon, R. (2007). *Cancer Biology*. Oxford University Press, USA. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=PymZ1ORk0TcC>
- Sánchez, D., Vásquez, I., & Trejo, N. (2006). *Biología molecular del cáncer*. Mexico D.F: Alfil.
- Sánchez, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. aiyana ediciones. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=cW5TsDKqx9wC>
- Schantz, J. (2010). *A Manual for Primary Human Cell Culture*. World Scientific. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=kiDpauK826MC>
- Skeel, R. T., & Khleif, S. N. (2011). *Handbook of Cancer Chemotherapy*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=6Nz_87OLrtcC
- Soria, V., De Feo, D., & Urrunaga, R. (2007). Composition of the essential oil of *Hedyosmum scabrum*.pdf. *Jeobp*, *10*, 41–45.
- Stacey, G., Doyle, A., & Ferro, M. (2001). *Cell Culture Methods for in Vitro Toxicology*. Springer. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=ttiT9xpZfuoC>
- Su, Z., Yin, S., Zhou, Z., Wu, Y., Ding, J., & Yue, J. (2008). Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*, (1), 16–19.
- Toro, M. (2008). *Farmacología para fisioterapeutas*. Editorial Medica Panamericana Sa de. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=vP_lwaVKrz4C
- Torres, D. (2009). *EVALUAR LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE Gynoxis verrucosa MEDIANTE EL ENSAYO CBMN EN LA LÍNEA CELULAR ASTROCITOMA CEREBRAL (D384)*. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.

- Torres, L., Pérez, M., & Contreras, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=KxxiKJ9Q_LMC
- Uribe, C., Chacón, A., & Pombo, P. (2002). *Neurología*. Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Vanaclocha, B., & Folcara, S. (2003). *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. Barcelona: Masson. Retrieved from http://books.google.com.ec/books?id=K3V4p5Pj_dAC
- Velásquez, M. G. (2013). *La Universidad Católica de Loja*.
- Walton, N., & Brown, D. (1999). *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Imperial College Press. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=eMnI7Y9LYLsC>
- Wang, C., & Kurzer, M. S. (1997). Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 28(3), 236–247. doi:10.1080/01635589709514582
- Wein, A. ., Kavoussi, L., Novick, A., & Partin, A. (2008). *Campbell-Walsh Urologia/ Campbell-Walsh Urology*. Editorial Medica Panamericana Sa de. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=Rc4NFKLJL4sC>
- WHO. (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine World Health Organization.
- Wu, Q., Yang, Y., Yu, J., & Jin, N. (2012). Soy isoflavone extracts stimulate the growth of nude mouse xenografts bearing estrogen-dependent human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Biomedical Research*, 26(1), 44–52. doi:10.1016/S1674-8301(12)60006-2
- Young, A., Hobbs, R., & Kerr, D. (2011). *ABC of Colorectal Cancer*. Wiley. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=F3AVxE-HuwMC>
- Zyadl, A., Tilaouil, M., Mousel, H., M'barki, L., Abdelmajid, R., Chaitl, A., & LepoivreIII, M. (2012). Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22.

ANEXOS

Anexo 1 Proceso de obtención de extractos/metabolitos secundarios

