



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto metanólico de tallos
de *Grias neuberthii* en varias líneas celulares**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Romero Espejo, Luisa Jessenia

DIRECTORA: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Ph.D.

LOJA – ECUADOR



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* en varias líneas celulares, realizado por Romero Espejo Luisa Jessenia ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Romero Espejo Luisa Jessenia declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* en varias líneas celulares, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso directora 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. 88 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.

Autor. Luisa Jessenia Romero Espejo

Cédula. 1150015632

DEDICATORIA

A la memoria de papá

Porque siempre me impulsaste a ser mejor persona, me enseñaste que la vida no es fácil, pero si llevadera y que el truco es volverse fuerte de corazón. Porque de ti aprendí que pierde solo el que deja de luchar, que ser derrotado es opcional y que las cicatrices producto del vaivén de la vida están para recordarnos que somos capaces de convertir el dolor en una simple cicatriz.

Gracias papá por trabajar incansablemente para darnos siempre lo mejor

Gracias por enseñarme con el corazón

Te extraño.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien ha sido el promotor de mi existencia.

A mi querida mamá, gracias por absolutamente todo. No dejes que la vida te aplaste, sonríe.

A mi tutora la Ph.D. Natalia Bailón, por su constante exigencia y apoyo.

A la Mgtr. María Isabel Ramírez y el Ph.D. Luis Guamán, por compartirme sus conocimientos.

A mis hermanos, gracias por siempre estar dispuestos a ayudarme. Los quiero a todos.

A Aldo, por ser parte de esta aventura.

A Gaby y Andrea, por su amistad y apoyo incondicional a lo largo del presente.

A mis amigos con quienes he compartido la carrera universitaria, por todos los momentos vividos.

A todos mis profesores de la titulación.

“Pregúntate si lo que estás haciendo hoy te acerca al lugar en el que quieres estar mañana”

Walt Disney

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICAS	ix
LISTA DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I: PROPÓSITO Y FIN DEL PROYECTO	5
1.1 Justificación del proyecto.....	6
1.2 Objetivo general del proyecto.	7
1.3 Objetivos específicos del proyecto.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Cáncer.....	9
2.2 Incidencia.	10
2.3 Cáncer de próstata.	10
2.3.1 Cáncer de próstata en el Ecuador: incidencia y tratamiento.	11
2.4 Genética: oncogenes y genes supresores de tumores.	11
2.4.1 Alteraciones genéticas comunes en cáncer de próstata:	12
2.5 Rutas de muerte celular: proteínas implicadas.	13
2.5.1 Apoptosis.....	14

2.5.2	Autofagia.....	17
2.5.3	Necroptosis.....	17
2.5.4	Senescencia.....	18
2.6	Antineoplásicos de origen natural: metabolitos secundarios.....	18
2.6.1	Género <i>Grias</i>	18
2.6.2	Extracto metanólico de tallos de <i>Grias neuberthii</i>	19
2.7	Biomarcadores.....	19
2.7.1	Biomarcadores apoptóticos.....	20
2.7.2	Detección de la fosfatidilserina en células apoptóticas.....	20
2.7.3	Identificación de proteínas apoptóticas mediante Western Blot.....	20
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....		23
3.1	Obtención del extracto.....	24
3.2	Cultivo celular.....	24
3.3	Siembra celular.....	24
3.4	Detección de la fosfatidilserina en células apoptóticas.....	24
3.5	Extracción y Cuantificación de proteínas.....	25
3.6	Identificación de proteínas apoptóticas mediante Western Blot.....	26
3.7	Análisis estadístico.....	27
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....		37
4.1	Detección de la fosfatidilserina en células apoptóticas.....	38
4.2	Identificación de proteínas apoptóticas mediante Western Blot.....	41
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....		45
CONCLUSIONES.....		50
RECOMENDACIONES.....		51
BIBLIOGRAFÍA.....		52
ANEXOS.....		53

Anexo 1. Tabla de descripción de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blot.....	54
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía intrínseca de la apoptosis	15
Figura 2. Vía extrínseca de la apoptosis	16
Figura 3. Cambios morfológicos de la línea celular PC-3 sometida a tratamiento con el extracto metanólico de tallos de <i>Grias neuberthii</i>	41

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Línea celular PC-3 expuesta a tratamiento con GNTM.	42
Gráfica 2. Cuantificación proteica.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones genéticas comunes en cáncer de próstata.	12
Tabla 2. IC ₅₀ del extracto metanólico de tallos de <i>Grias neuberthii</i> en líneas celulares de cáncer de: colon, pulmón, mama, próstata y cerebro	19
Tabla 3. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular D-384	38
Tabla 4. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular MCF-7	38
Tabla 5. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular RKO	39
Tabla 6. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular A-549	39
Tabla 7. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular U-251	40
Tabla 8. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular PC-3.....	40

ABREVIATURAS

A-549: Línea celular de cáncer de pulmón.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Afap1: Factor activador de proteasas apoptóticas 1.

ASB: Albúmina de suero bovino.

Atg: Familia de proteínas activadoras de autofagia.

Bax: Proteína Bcl-2 asociada a X.

Bcl-2: Linfoma 2 de las células B.

CDK: Quinasas dependientes de ciclina.

D-384: Línea celular de astrocitoma cerebral.

DIABLO: Proteína de union directa a IAP con bajo pl.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FADD: Fas dominio de activación de muerte.

FLIP: Inhibidor celular proteico de FLICE.

GNTM: Extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*.

hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa.

HtrA2/Omi: Serina proteasa mitocondrial.

IAP: Inhibidor de proteínas apoptóticas.

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.

MCF-7: Línea celular de adenocarcinoma mamario.

p53: Proteína p53 (Supresor tumoral).

P63: Proteína p63 (Supresor tumoral).

p73: Proteína p73 (Supresor tumoral).

PBS: Buffer fosfato salino.

PC-3: Línea celular de adenocarcinoma protático grado IV.

PSA: Persulfato de amonio.

PTEN: Gen de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

Rb: Proteína del retinoblastoma.

RIPK1: Receptores de interacción quinasa 1.

RIPK3: Receptores de interacción quinasa 3.

RKO: Línea celular de carcinoma de colon humano.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

SFB: Suero fetal bovino.

Smac: Segundo activador mitocondrial de las caspasas.

TBS: Tampón salino de Tris.

TNFR1: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

U-251: Línea celular de glioblastoma cerebral.

RESUMEN

El cáncer es un desorden genético de las células somáticas que consiste en la pérdida de la capacidad de éstas para: mantener su diferenciación, controlar su proliferación y regular su muerte. Varias son las alternativas de tratamiento dirigidas a combatir esta enfermedad; sin embargo, todas ellas tienen fuertes efectos secundarios y una tasa de respuesta relativamente baja. Mediante la medicina natural, se busca implementar potenciales fitofármacos cuya principal característica sea su alta selectividad, baja toxicidad y gran potencial terapéutico; *Grias neuberthii* es una especie de la familia Lecythidaceae que se encuentra en la región amazónica del Ecuador y se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias, desinfectantes y antitumorales. A través de la evaluación de la distribución de fosfatidilserina, se determinó que el extracto de esta especie es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales en líneas celulares de cáncer de: colon, pulmón, mama, próstata y cerebro; además pudimos establecer que dicho extracto, en células de cáncer de próstata, induce apoptosis a través de la modulación dependiente de p73 que regula la expresión de p21 y Bax.

Palabras clave: *Grias neuberthii*, apoptosis, p21, p73.

ABSTRACT

Cancer is a genetic disorder of somatic cells that becomes the loss of the ability to: keep their differentiation, control their proliferation and regulate their death. There are several treatment alternatives aimed to fight against this disease, however, they all have strong side effects and a relatively low response rate. By the natural medicine, it is sought to implement potential phytopharmaceuticals which the main characteristic be its high selectivity, low toxicity and great therapeutic potential; *Grias neuberthii* is a species of the Lecythydaceae family found in the Amazon region of Ecuador and is attributed anti-inflammatory, antiparasitic, disinfectant and anti-tumor properties. Through the evaluation of phosphatidylserine distribution, it was determined that the extract of this specie is able to inhibit the growth of tumor cells in colon, lung, breast, prostate and brain cancer cell lines and also, we were able to establish that this extract, in prostate cancer cells, induces apoptosis through p73-dependent modulation that regulates p21 and Bax expression.

Key words: *Grias neuberthii*, apoptosis, p21, p73.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un desorden genético de las células somáticas que consiste, principalmente, en la pérdida de la capacidad de éstas para controlar su proliferación, mantener su diferenciación y regular su muerte (González-Espinosa, Jiménez-Ríos, y Gutiérrez-López, 2002). Curtis, *et al.* (2008) manifiestan que cuando una célula de un organismo multicelular pierde la capacidad de regular el ciclo celular, puede reproducirse sin restricciones y transformarse en cancerosa; interrumpiendo así la organización y funciones normales del organismo. El origen de esta patología, proviene de una serie de mutaciones en el material genético, que provocan un desequilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte celular (Jordán, 2003); producto de una serie de factores genéticos de riesgo subyacente y por otro lado factores ambientales (Redondo-Blanco, 2014) que predisponen al individuo a desarrollar esta enfermedad.

El impacto progresivo del cáncer, a escala mundial, se refleja en las estadísticas presentadas por la OMS, en donde se manifiesta que el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo y a la que además en 2015 se le atribuyeron 8,8 millones de defunciones; considerando que en la actualidad 1 de cada 6 muertes en el mundo es causada por esta anomalía. Los tipos de cáncer de mayor incidencia en población masculina son cáncer de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; y en población femenina, los cánceres que con mayor frecuencia se registran son cáncer de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (OMS, 2017).

En el Ecuador, el cáncer que con mayor frecuencia se presenta en mujeres, es el de mama con aproximadamente 34,7 casos por cada 100000 habitantes y en varones, el cáncer que se registra con mayor incidencia es el de próstata con aproximadamente 37,8 casos por cada 100000 habitantes (Cueva, 2015). En consecuencia, el cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y en el Ecuador, constituye el cáncer de mayor incidencia en población masculina; en 2014, el INEC registró 833 defunciones por neoplasia prostática. Estas cifras revelan que, el cáncer de próstata es un problema de salud pública a nivel nacional, razón por la cual se incentiva a investigar y desarrollar nuevas técnicas de tratamiento que permitan generar nuevas dianas terapéuticas, con el fin de mitigar el comportamiento celular que el organismo adopta frente a esta enfermedad.

A través de la denominada “Medicina natural”, se pretende recurrir a productos de origen natural, para tratar diversas patologías. Scovassi y Guamán (2013) mencionan que el uso de plantas con propiedades farmacológicas es el principal recurso médico alrededor del mundo; los compuestos químicos, responsables de la actividad farmacológica de la planta, son conocidos como metabolitos secundarios, que se sintetizan de manera natural y se acumulan en un número limitado de plantas de distintas especies y en diversas concentraciones (Sánchez, *et al.* 2000). La producción de metabolitos secundarios se ve favorecida por un microambiente diverso que Ecuador posee, siendo el escenario perfecto para la concentración de vida, que se expresa en una altísima biodiversidad.

Es así que *Grias neuberthii*, es una especie de la familia Lecythidaceae (Cornejo y Mori, 2012), que se encuentra en la región amazónica del Ecuador (Lozano, 2013); es utilizada etnomedicinalmente como: antidiurético, antiparasitario, antiinflamatorio, purgativo, laxante, desinfectante, para combatir la sinusitis y detener hemorragias (Alva, *et al.* 2002; Moya, 2012). Además, gracias a los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, se atribuye a la especie, un potente efecto citotóxico en diversas líneas celulares tumorales.

Con estos antecedentes y a través del presente trabajo de fin de titulación se pretende identificar los mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* en varias líneas celulares tumorales, en base a la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina, que consiste en evaluar la simetría de la membrana celular, mediante la distribución del fosfolípido con carga negativa, fosfatidilserina, que normalmente, se localiza en la cara citosólica de la bicapa lipídica de la membrana plasmática; pero que se transloca a la monocapa externa en células apoptóticas (Alberts, *et al.* 2008; Baeza-Martín, 2014). Se busca, además, evaluar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular de la línea celular más sensible, expuesta a tratamiento con el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*, mediante Western Blot, técnica que permite identificar proteínas específicas empleando técnicas de inmunodetección (Calderón, 2007).

CAPÍTULO I: PROPÓSITO Y FIN DEL PROYECTO

1.1 Justificación del proyecto.

Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, el cáncer forma parte de las enfermedades catastróficas reconocidas en el país. Las altas cifras de incidencia y mortalidad, convierten a esta enfermedad, en uno de los más grandes desafíos que enfrenta el sistema de salud pública. A pesar de la existencia de una amplia gama de tratamientos que van desde cirugía durante los estadíos iniciales de la enfermedad hasta posibles tratamientos adyuvantes como: radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal; no se ha podido controlar y mucho menos erradicar esta patología.

La presente investigación, surge con el objetivo de proporcionar nuevas alternativas de tratamiento natural que permitan contrarrestar el comportamiento celular que el organismo adopta frente a esta enfermedad. Con la intención de seguir un orden lógico en el estudio de las propiedades antitumorales que el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* posee, se da inicio al presente trabajo dirigido a identificar los mecanismos de muerte celular que el extracto de interés induce.

Gracias a una variedad de análisis previos, desarrollados en el Laboratorio de Biología celular y Genotoxicología de la Universidad Técnica Particular de Loja, se conoce la capacidad citotóxica que el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* posee frente a diversas líneas tumorales; siendo los resultados más relevantes las bajas IC_{50} generadas a partir del tratamiento con el extracto mencionado. Es así que en líneas celulares de: carcinoma de colón humano (RKO), adenocarcinoma mamario (MCF-7), adenocarcinoma prostático grado IV (PC-3), astrocitoma cerebral (D-384), glioblastoma cerebral (U-251) y carcinoma de pulmón (A-549), encontramos las siguientes IC_{50} : 31,8; 39,1; 17,4; 21,7; 18,5; 55,4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Por todo lo citado anteriormente se plantean los siguientes objetivos:

1.2 Objetivo general del proyecto.

Identificar el mecanismo de muerte celular inducido por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*.

1.3 Objetivos específicos del proyecto.

Determinar el porcentaje de células en apoptosis tras ser tratadas con el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*, a través de la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina mediante el uso de Anexina V, en varias líneas celulares.

Evaluar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular de la línea celular más sensible, expuesta a tratamiento con el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer: definición y origen.

El cáncer es una enfermedad heterogénea que constituye una patología de origen multifactorial en donde participan factores ambientales en estrecha relación con factores genéticos de riesgo subyacente (Redondo-Blanco, 2014). La Sociedad Americana contra el cáncer lo establece como un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (OMS, 2017). El cáncer es un desorden genético de las células somáticas que consiste, principalmente, en la pérdida de la capacidad de éstas para controlar su proliferación, mantener su diferenciación y regular su muerte (González-Espinosa, *et al.* 2002). De la misma manera Curtis, *et al.* (2008) manifiesta que cuando una célula de un organismo multicelular pierde la capacidad de regular el ciclo celular, ésta puede reproducirse sin restricciones y transformarse en cancerosa, interrumpiendo así la organización y funciones normales del organismo.

Alberts, *et al.* (2008) declaran que el cáncer es un proceso micro-evolutivo, cuyo inicio proviene de que una mutación pueda proporcionar a una célula cierta ventaja selectiva, permitiendo que se divida más vigorosamente que sus células vecinas; convirtiéndose de esta manera, en la fundadora de un clon mutante en crecimiento. En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen, con el fin de mantener un tamaño constante (Jordán, 2003). Cuando existe un desequilibrio entre proliferación y muerte celular, el organismo empieza a adoptar un comportamiento ajeno, que rompe las reglas básicas de la organización celular; entre las características clave que llevan al desarrollo de esta enfermedad se encuentran: Auto-abastecimiento y señalización de proliferación sostenida, Evasión de la respuesta inmune, Respuesta inflamatoria promotora de tumores, Desregulación de la energía celular, Inestabilidad a señales inhibitorias de crecimiento y mutaciones del genoma, Resistencia a muerte celular programada, Potencial replicativo ilimitado, Inducción de la Angiogénesis y Activación de procesos de invasión y metástasis (Bailón-Moscoso, *et al.* 2011). Todas estas características, confieren a la célula las capacidades de sobrevivir, dividirse y diseminarse (Moiola, 2012), provocando tasas de división más grandes, muerte disminuida y otras características aberrantes de las células cancerosas (Alberts, *et al.* 2008).

2.2 Incidencia.

“Una de cada cinco personas morirá de cáncer” así lo afirman Alberts, *et al.* (2008). Lamentablemente esta afirmación no está lejos de la realidad; según datos provenientes de la organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial a la que solo en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de defunciones en todo el mundo y 14 millones de nuevos casos. En Ecuador, anualmente se registran, 162 casos de cáncer por cada 100000 habitantes. A escala mundial, los tipos de cáncer de mayor incidencia en población masculina son cáncer de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado y en población femenina, los cánceres que con mayor frecuencia se registran son cáncer de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (OMS, 2017).

2.3 Cáncer de próstata.

La American Cancer Society (2014), señala que el cáncer de próstata es una patología cuyo origen involucra el crecimiento descontrolado de células prostáticas. El cáncer de próstata es una enfermedad multifactorial, en la que participan factores hormonales, además de los relacionados con la edad, raza, dieta y una historia familiar de cáncer prostático (Álvarez, *et al.* 2008). Desde el punto de vista genético y molecular, el cáncer de próstata constituye un proceso secuencial, acumulativo y no necesariamente ordenado que conduce a que factores genotóxicos adquiridos y epigenéticos conformen una enfermedad con pasos bien definidos, los cuales son: Iniciación, Progresión, Metástasis y Hormonoresistencia (Uribe-Arcila, 2005).

INICIACIÓN: En donde según Álvarez, *et al.* (2008), el cáncer prostático se origina por el crecimiento clonal de una célula epitelial alterada en su genoma. Las alteraciones producidas en el ADN involucran siete factores definidos que son: mutaciones en los genes ubicados en los cromosomas 1 y 8, polimorfismos genéticos: 5 α -reductasa, vitamina D y receptor androgénico, telomerasa, estrés oxidativo, células madre y finalmente aumento de niveles del factor de crecimiento IGF-I (Uribe-Arcila, 2005).

PROGRESIÓN Y METÁSTASIS: El incremento en la expresión de metaloproteinasas de matriz e incremento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), se presentan como principales indicadores de angiogénesis y metástasis (Reiter y de Kernion, 2002; Uribe-Arcila, 2005).

HORMONORESISTENCIA: Que se presenta en pacientes con cáncer de próstata avanzado (Uribe-Arcila, 2005).

2.3.1 Cáncer de próstata en el Ecuador: incidencia y tratamiento.

La Sociedad Americana contra el cáncer establece, a escala mundial, que el adenocarcinoma prostático es la neoplasia maligna más frecuente en hombres, después del cáncer de piel y superando al cáncer pulmonar y de colon (Álvarez, *et al.* 2008). En el Ecuador, constituye el cáncer de mayor incidencia en población masculina. En 2005, a través de la Sociedad de Lucha contra el Cáncer (SOLCA), se detectaron un total de 268 casos de cáncer de próstata en Quito, el 56% en etapa avanzada y un 44 % en fase inicial; en 2014, el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) registró, en todo el país 833 defunciones por neoplasia prostática.

Existe una amplia gama de alternativas de tratamiento para combatir esta patología, la primera de ellas se basa en cirugía durante los estadios iniciales de la enfermedad. Además de las opciones quirúrgicas, se registran tratamientos adyuvantes, entre los que destacan: radioterapia, quimioterapia, y terapia hormonal; todos estos métodos presentan fuertes efectos secundarios y una tasa de respuesta relativamente baja (Redondo-Blanco, 2014).

Las cifras anuales presentadas por entidades como SOLCA e INEC ponen de manifiesto el impacto progresivo de esta enfermedad, además de revelar que el cáncer de próstata constituye un problema de salud pública a nivel nacional. A través de la presente investigación se pretende, desarrollar nuevas fuentes de tratamiento contra el cáncer, cuya principal característica sea su alta selectividad, baja toxicidad y gran potencial terapéutico frente a distintos tipos de cáncer; para ello será necesario conocer cómo actúa, a nivel genético y molecular nuestro organismo.

2.4 Genética: oncogenes y genes supresores de tumores.

El ciclo celular está regulado por la fosforilación y la degradación de diversas proteínas que promueven o inhiben la progresión del ciclo de división celular (Curtis, *et al.* 2008). Los proto-oncogenes son genes normales que dirigen la producción de proteínas que regulan el crecimiento y desarrollo celular; a diferencia de los genes supresores de tumores que, en organismos sanos, actúan como reguladores negativos de crecimiento (Ríos y Hernández, 2001). Uribe-Arcila (2005) indica que los tumores necesitan activar genes inductores que se encuentran en formas pasivas

denominadas proto-oncogenes e inactivar otros genes que se comportan como supresores del tumor.

Las formas mutadas de proto-oncogenes dan lugar a los oncogenes, cuya sobreexpresión está vinculada con el desarrollo del cáncer. De igual manera, las mutaciones producidas en genes supresores de tumores provocan disminución de su actividad, lo que genera cierta inestabilidad genómica, que predispone a los individuos portadores de estas mutaciones a desarrollar diversas neoplasias malignas.

2.4.1 Alteraciones genéticas comunes en cáncer de próstata:

El desarrollo y progresión tumoral es consecuencia de la adquisición de diversas modificaciones en la base molecular de varias proteínas, condición que se ve influenciada por la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores. A continuación, se detallan aquellas alteraciones genéticas que se han relacionado con la formación de un tumor en la próstata:

Tabla 1. Alteraciones genéticas comunes en cáncer de próstata.

	Función normal	Alteración
Gen supresor de tumor		
<i>RB1</i>	Controla fase G1/S del ciclo celular y diferenciación	Mutaciones germinales Mutación/pérdida de ambos alelos
<i>TP53</i>	Factor de transcripción Regula reparación de ADN, ciclo celular y apoptosis	Mutación/pérdida de ambos alelos
<i>PTEN</i>	Regula la proliferación celular, apoptosis y senescencia	Mutación/ delección

<i>BRCA1</i>	Factor de transcripción Forma parte del complejo proteico para detectar daño al ADN Participa en el proceso de recombinación homóloga	Mutación
Oncogenes		
<i>RAS</i>	Transducción de señales Activa proliferación	Mutación
<i>MYCC</i>	Factor de transcripción Activa vías de proliferación	Amplificación
<i>TERT</i>	Replicación funcional Alargamiento de telomeros	Amplificación
<i>BCL-2</i>	Inhibición de la apoptosis	Sobreexpresión
Proteínas de metabolismo intermediario		
<i>FASH</i>	Síntesis de ácidos grasos	Sobreexpresión
Citocinas		
<i>MIC-1</i>	Citotcina	Sobreexpresión

Fuente: (González-Espinosa, *et al.* 2002; Salas, *et al.* 2014; Uribe-Arcila, 2005).

Elaboración: Autor

2.5 Rutas de muerte celular: proteínas implicadas.

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permitan a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos (Lizarbe, 2007). Para ello, una gran variedad de sistemas y procesos están envueltos en el mantenimiento de la integridad celular, que implica mantener un equilibrio entre proliferación y muerte celular (Krysko, *et al.* 2008; Lizarbe, 2007); además de

interferir en procesos de endocitosis y exocitosis, cambios metabólicos y de expresión génica; mecanismos de defensa y sistemas de reparación (Lizarbe, 2007).

Una serie de proteínas controlan los diversos mecanismos por los cuales la célula busca mantener su integridad, obedeciendo al equilibrio entre proliferación y muerte, se expondrán a continuación las rutas de muerte celular de mayor interés.

2.5.1 Apoptosis.

Conocida como muerte celular programada de tipo I, es un proceso biológico fundamental por el que las células que han finalizado su función o no son necesarias para el organismo se “suicidan” (Naval, Marzo, y Anel, 2004) sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos (Guamán-Ortiz, 2012). La apoptosis es un mecanismo de muerte celular controlada por el cual el organismo mantiene la homeostasis celular eliminando células dañadas (Kroemer, *et al.* 2009). El desajuste de este proceso implica, por un lado: la activación masiva de esta ruta, desencadenando diversas patologías graves, como las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), cardiovasculares (muerte celular tras isquemia) o inmunodeficiencias (SIDA); por otro lado, un déficit de apoptosis supone la supervivencia anómala de células con diferenciación incompleta o defectuosas, este es el caso de las enfermedades autoinmunes y diversos tipos de cáncer (Naval, *et al.* 2004).

Este proceso de muerte tiene dos vías ya caracterizadas que dependen de una cascada proteolítica irreversible y amplificadora mediada por caspasas (Alberts, *et al.* 2008). La vía extrínseca se activa mediante ligandos extracelulares que se unen a receptores de muerte de la superficie celular, a diferencia de la vía intrínseca que se activa por señales intracelulares que se generan cuando las células experimentan estímulos de estrés. Cada vía utiliza sus propias procaspasas iniciadoras, que se activan en complejos de activación diferentes, denominados DISC y apoptosoma, respectivamente. En la vía extrínseca, los receptores de muerte celular reclutan las procaspasas-8 y -10 mediante proteínas adaptadoras, formando el DISC; mientras que en la vía intrínseca el citocromo c, que se libera del espacio inter-membrana de las mitocondrias, activa a Afap1, que se ensambla formando un apoptosoma, estructura que recluta y activa la procaspasa-9 (Figura 1) (Alberts, *et al.* 2008).

Las proteínas antiapoptóticas (Bcl2, Bcl-XL, Bcl-w, Bcl-b y Mcl-1) y proapoptóticas (Bax, Bak, Bim, Bid, Puma, Noxa) regulan la vía intrínseca controlando la liberación de proteínas mitocondriales, mientras que las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) inhiben las caspasas activadas induciendo su degradación (Alberts, *et al.* 2008; Jordán, 2003; Lizarbe, 2007).

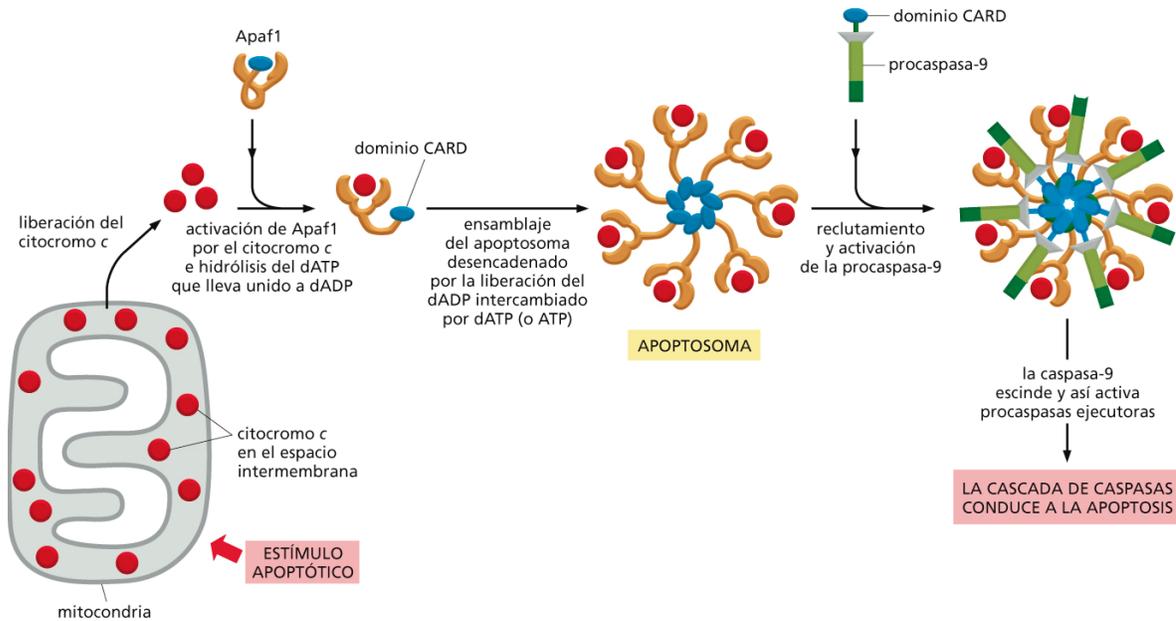


Figura 1. Vía intrínseca de la apoptosis.

Fuente: (Alberts, *et al.* 2008)

Elaboración: (Alberts, *et al.* 2008)

La activación intracelular de la apoptosis se produce a través de la vía intrínseca, la cual depende de la liberación, en el citosol, de proteínas mitocondriales que por lo general residen en el espacio intermembrana de estos orgánulos (Alberts, *et al.* 2008; Baeza-Martín, 2014). En respuesta a una lesión u otras formas de estrés, como daño en el ADN o la falta de oxígeno, de nutrientes o de señales de supervivencia extracelulares (Alberts, *et al.* 2008; Baeza-Martín, 2014) se producen cambios significativos en la estructura de las membranas mitocondriales, estos cambios comprometen la función de las membranas induciendo el incremento de la permeabilidad de estas (Dubin y Stoppani, 2000); condición que estimula la liberación de las siguientes estructuras: citocromo c, Smac/DIABLO y la enzima HtrA2/Omi (Saikumar y Venkatachalam, 2009).

La formación del apoptosoma surge de la unión de la proteína Afap1 con el citocromo c, esta estructura recluta moléculas de procaspasa iniciadora (procaspasa-9), que se activan por su

estrecha cercanía en el apoptosoma (Alberts, *et al.* 2008). Una vez activa, la caspasa-9 promueve la activación de una serie de caspasas ejecutoras (caspasa-3) que finalmente, desencadenaran la apoptosis. Sin embargo, este sistema se encuentra regulado por las IAPs; cuya activación inhibe la función de las caspasas, impidiendo la muerte celular. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, son proteínas anti-IAP, que bloquean la actividad de las IAPs, estimulando así la apoptosis (Saikumar y Venkatachalam, 2009).

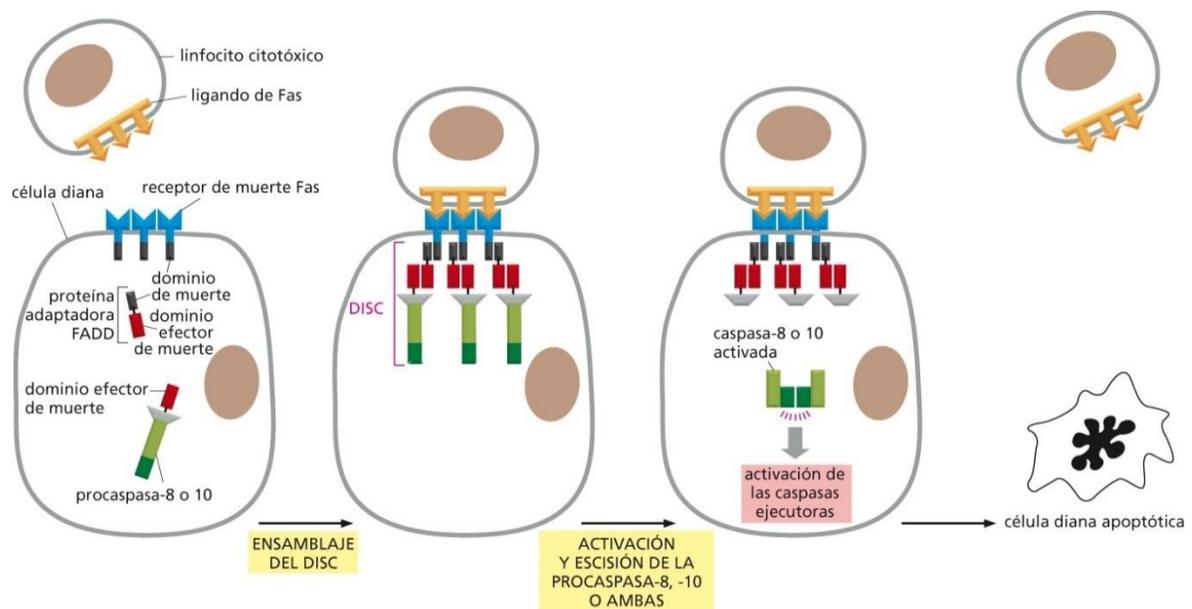


Figura 2. Vía extrínseca de la apoptosis.

Fuente: (Alberts, *et al.* 2008)

Elaboración: (Alberts, *et al.* 2008)

Los receptores de muerte de la superficie celular activan la vía extrínseca de la apoptosis (Alberts, *et al.* 2008), que se produce tras la unión de ligandos extracelulares (mensajero de muerte) que se unen a receptores de muerte (receptor de muerte) de la superficie celular (Naval, *et al.* 2004). Los receptores de muerte poseen en su región intracelular el denominado dominio de muerte, necesario para la activación del programa apoptótico (Alberts, *et al.* 2008). Como se indica en la Figura 2, FasL (Ligando), induce apoptosis tras la unión a su receptor Fas; que tras su aleación y oligomerización se une a la proteína adaptadora FADD, a través de su dominio de muerte. FADD a su vez, a través de su dominio efector de muerte, se une a la caspasa-8; formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que finalmente activará una serie de caspasas ejecutoras que inducirán la apoptosis (Naval, *et al.* 2004).

La vía extrínseca se encuentra regulada negativamente por una serie de estructuras que limitan la apoptosis; tal es el caso de los receptores señuelo de superficie celular, que tiene un dominio de unión al ligando, pero no un dominio de muerte (Baeza-Martín, 2014) o las proteínas bloqueantes intracelulares como c-FLIP, que se asemeja a una procaspasa iniciadora, pero carece del dominio proteolítico (Alberts, *et al.* 2008).

2.5.2 Autofagia.

Aredia, *et al.* (2012) indican que la autofagia es un proceso catabólico de auto-degradación que busca mantener la homeostasis celular normal, siendo un mecanismo de adaptación frente al estrés celular (Criollo, 2009). Peña-Sanoja y De Sanctis (2013) manifiestan que la autofagia tiene un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular y la integridad genómica; a pesar de ello, este mecanismo podría contribuir con la supervivencia del tumor, protegiendo a las células cancerígenas ante condiciones adversas (Aredia, *et al.* 2012; Choi, 2012).

La maquinaria central del proceso de autofagia involucra a las proteínas denominadas Atg y a Beclina-1, cuya fusión es crucial para desencadenar autofagia, inhibiendo el crecimiento celular y promoviendo la tumorigénesis (Herrero, 2008). La vía de la autofagia procede a través de cinco fases: la nucleación, que es la formación de una estructura de doble membrana o membrana de aislamiento, que también se denomina fagóforo; la expansión de la membrana del fagóforo por la incorporación de la proteína LC3-II; la maduración de esta estructura en el autofagosoma y el secuestro de material citoplásmico a degradar; la fusión del autofagosoma con el lisosoma, lo que resulta en la formación de los autofagolisosomas y, por último, la degradación de los materiales biológicos secuestrados por las enzimas hidrolíticas del lisosoma y el reciclamiento de moléculas, ante todo aminoácidos, lípidos, azúcares y nucleótidos (Maciel-Herrerías y Cabrera-Benítez, 2016).

2.5.3 Necroptosis.

Se asume como un mecanismo que se genera a partir de la entrada masiva de iones y agua al interior celular. Dentro de los agentes o mecanismos desencadenantes de la necroptosis se encuentra el TNF- α que activa a TNFR1 (López, *et al.* 2012), quien induce la activación de proteínas con actividad quinasa como: RIPK1 y RIPK3 (Baeza-Martín, 2014), cuya interacción forma un complejo denominado necrosoma que media toda esta ruta; este proceso es

independiente de caspasas, sin embargo, es regulada negativamente por caspasa-8 (Remijsen, *et al.* 2014)

2.5.4 Senescencia.

Es el proceso en el cual, el ciclo celular se suspende de manera permanente, las células quedan detenidas en la fase G_0/G_1 , no responden a estímulos mitógenos, pero, permanecen vivas, aunque metabólicamente alteradas (López, Marínez, y Konigsberg, 2005). Se conocen dos vías por las cuales la célula entra en un estado senescente; una de ellas mediada por Rb, proteína del retinoblastoma, que se encuentra hipofosforilada en las células senescentes, deteniendo la proliferación en la fase G_1 del ciclo celular; y otra vía regulada por miembros de familia p53, que induce la sobreexpresión de p21, que inhibe la transición en fase G_1/S (López, *et al.* 2005).

2.6 Antineoplásicos de origen natural: metabolitos secundarios.

A pesar de la existencia de una amplia gama de tratamientos para combatir el cáncer, que van desde cirugía durante los estadios iniciales de la enfermedad hasta posibles tratamientos adyuvantes como: radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal; no se ha podido controlar y mucho menos erradicar esta patología. A través de la denominada “Medicina natural” que constituye una herramienta médica, que recurre a productos de origen natural, para tratar diversas patologías, se pretende desarrollar nuevas técnicas de tratamiento que permitan contrarrestar el comportamiento celular que el organismo adopta frente a esta enfermedad. Scovassi y Guamán, (2013) mencionan que el uso de plantas con propiedades farmacológicas es el principal recurso médico alrededor del mundo. Los compuestos químicos, responsables de la actividad farmacológica de la planta, son conocidos como metabolitos secundarios que se sintetizan de manera natural y se acumulan en un número limitado de plantas de distintas especies y en diversas concentraciones (Sánchez, *et al.* 2000). La presente investigación busca establecer el mecanismo de muerte celular inducido por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*, un compuesto con actividad antitumoral ya conocida.

2.6.1 Género Grias.

El género *Grias* corresponde a un grupo de plantas pertenecientes a la familia Lecythidaceae (Cornejo y Mori, 2012). Las especies más representativas que surgen en los bosques húmedos tropicales del Ecuador, cuyo rango altitudinal es de 300 – 1150 msnm (MAE, 2017; Ojeda y Patiño,

2010), son: *Grias angustipetala*, *Grias ecuadorica*, *Grias peruviana* y *Grias neuberthii*; todas ellas utilizadas para la alimentación diaria de las comunidades étnicas de las regiones en donde cada especie se origina (Cornejo y Mori, 2012; Mori, *et al.* 2017).

2.6.2 Extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*.

La especie *Grias neuberthii* es nativa del sur de Colombia, Ecuador y del norte del Perú (Lozano, 2013); es utilizada en medicina tradicional, como: antidisentérico, purgativo, laxante; para combatir la sinusitis y detener hemorragias (Alva, *et al.* 2002). Moya, (2012) menciona que la especie *Grias neuberthii* tiene además propiedades antibacterianas y desinfectantes.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo confirman la actividad citotóxica del extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*. A continuación, se presentan los resultados de mayor relevancia que el estudio previo ha generado:

Tabla 2. IC₅₀ del extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* en líneas celulares de cáncer de: colon, pulmón, mama, próstata y cerebro.

RKO	A-549	MCF-7	PC-3	D-384	U-251
31,8 ± 0,01	55,4 ± 0,12	39,1 ± 0,08	17,4 ± 0,07	21,7 ± 0,07	18,5 ± 0,13

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Fuente: Samaniego, 2017 (Tesis en desarrollo)

Elaboración: Autor

Una vez conocido el potencial citotóxico que el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* posee en diversas líneas celulares, es necesario identificar los mecanismos de muerte celular que el extracto mencionado induce, razón por la cual tiene lugar la presente investigación.

2.7 Biomarcadores.

Conocidos como marcadores biológicos, representan los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles, que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Cueva, 2014; Neri, *et al.* 2005). A continuación, se expondrán los biomarcadores de interés para el presente trabajo, aquellos utilizados para

identificar el mecanismo de muerte celular inducido por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*.

2.7.1 Biomarcadores apoptóticos.

Alfaro, García, y Dueñas (2000), mencionan que la apoptosis es un proceso dinámico que promueve diversas características dependiendo del estado en el que se encuentre la célula; esta condición permite disponer de los denominados marcadores de la apoptosis. Entre los métodos de detección de apoptosis, Elmore, (2007), destaca la identificación de alteraciones de membrana, detección de caspasas y fragmentación de sustratos reguladores e inhibidores.

2.7.2 Detección de la fosfatidilserina en células apoptóticas.

En donde se evalúa la simetría de la membrana celular, mediante la distribución del fosfolípido con carga negativa fosfatidilserina que normalmente se localiza en la cara citosólica de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Baeza-Martín, 2014), pero se transloca a la monocapa externa en las células apoptóticas (Alberts, *et al.* 2008); esta condición constituye un biomarcador efectivo de este tipo de células. A través de la Anexina V, una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio, se puede detectar células apoptóticas; además mediante la aplicación simultánea de un marcador de ADN que no sea permeable a la membrana como el yoduro de propidio, un marcador catiónico, se puede determinar diferentes tipos de células que comprenden: células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas (Martínez-Salazar, 2009).

2.7.3 Identificación de proteínas apoptóticas mediante Western Blot.

El ciclo celular se encuentra regulado por una serie de proteínas, que resguardan la integridad del genoma. En respuesta a la acción de agentes deletéreos tales como la luz ultravioleta, la radiación o agentes químicos (Salamanca-Gómez, 2009), el ADN se ve alterado; esta condición provoca que las células evadan los diversos puntos de control de las fases del ciclo de división celular (Lagunas, Valle, y Soto, 2014), ocasionando la supervivencia anómala de células con diferenciación incompleta o defectuosas (Naval, *et al.* 2004). El crecimiento celular es controlado entre otros factores por los miembros de dos grandes familias de moléculas: los oncogenes y los genes supresores de tumores (Chávez, 1999); estos últimos son moléculas que inhiben la

proliferación celular descontrolada. Tal es el caso de p53/p73, fosfoproteínas que se localizan en el núcleo celular (López, *et al.* 2001), y que se activan en respuesta al daño en el genoma. p53 ejerce sus efectos inhibidores en el ciclo celular, uniéndose al ADN e induciendo la transcripción de p21 que, a su vez, codifica una proteína que se une a los complejos Cdk necesarios para la progresión del ciclo celular. Al bloquear la actividad quinasa de estos complejos Cdk, la proteína p21 impide que la célula entre en la fase S del ciclo celular y, en consecuencia, inhibe la replicación del ADN (Curtis, *et al.* 2008), con el objetivo de reparar el daño provocado.

En aquellas condiciones en las que el daño en el ADN no puede repararse, p53 (Gómez-Lázaro, *et al.* 2004) y/o p73 inducen la activación de las vías de señalización apoptóticas. Por un lado, p53 regula la expresión de los miembros de la familia Bcl-2, que participan en los procesos de permeabilización mitocondrial (Jutinico-Shubach, Mantilla-Galindo, y Sánchez-Mora, 2015) provocando la muerte de la célula. Por otro lado, p73 induce apoptosis a través de sus isoformas TAp73 (Ramadan, *et al.* 2005; Rossi, *et al.* 2004), que se activan cuando la célula experimenta estímulos de estrés que alteran el correcto funcionamiento del retículo endoplasmático (Ramadan, *et al.* 2005), lugar en donde son sintetizados un sin número de proteínas; Melino, *et al.* (2004) describen como p73 promueve la apoptosis a través de la activación directa de PUMA y Bax, proteínas que se encuentran relacionadas con la vía intrínseca de la apoptosis (Rossi, *et al.* 2004); por último, se ha demostrado también que las isoformas TAp73 inducen apoptosis mediante la activación de receptores de muerte celular (Ramadan, *et al.* 2005; Rossi, *et al.* 2004).

La Electroinmunotransferencia o Western Blot, es una técnica utilizada para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en homogenados celulares complejos (Iñaki, 2015). Constituye una de las técnicas más importantes en el análisis y caracterización de fracciones antigénicas (Chávez-Salas, Vásquez, y Escalante, 2007); es un proceso cualitativo que combina la selectividad de la electroforesis, en geles de acrilamida-bisacrilamida, que permiten fraccionar al antígeno; con la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática, que pone en evidencia los complejos antígeno-anticuerpo formados (Chávez-Salas, *et al.* 2007). Para desarrollar esta técnica se deben extraer las proteínas de los modelos biológicos de interés a través de métodos que impliquen la disrupción mecánica o química de las células; tras su obtención, las proteínas son separadas por electroforesis de acuerdo a su carga y peso molecular y bajo condiciones desnaturalizantes (García Pérez, 2000; Morales-Sánchez y Gallo-Ramírez, 2006). A continuación, las proteínas son transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante la aplicación de un campo eléctrico, que permite el correcto traspaso de proteínas desde

el gel hacia la membrana. Finalizada la transferencia, se añade un agente de bloqueo, con el propósito de reducir los lugares de unión no específicos del anticuerpo a identificar. Luego, se incuba un anticuerpo primario dirigido contra el epítipo específico de la proteína diana; tras varios lavados de la membrana, se adiciona un anticuerpo secundario, el mismo que se une de forma específica al anticuerpo primario, proporcionando una forma de detección, que se puede visualizar a través de la adición de agentes quimioluminiscentes (Towbin, 2011).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Obtención del extracto.

El extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* (GNTM) fue aislado y donado por el Ph.D. Juan Carlos Romero, Docente investigador de la Sección Departamental de Química Básica y Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja. La concentración madre (10000 µg/mL) del extracto fue preparada utilizando como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA). Se almacenó a 8° C hasta su uso, las concentraciones a utilizar se realizaron mediante la disolución de la concentración madre en medio de cultivo RPMI (GIBCO) en el día de tratamiento.

3.2 Cultivo celular.

Se ha tomado como modelo biológico las siguientes líneas celulares tumorales correspondientes a: carcinoma de colon humano (RKO), adenocarcinoma mamario (MCF-7), adenocarcinoma prostático grado IV (PC-3), astrocitoma cerebral (D-384), glioblastoma cerebral (U-251) y carcinoma de pulmón (A-549); las cuales fueron cultivadas en medio RPMI, suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB), 1 % de L-glutamina (2mM) y 1 % de Antibiótico-Antimicótico (100 U/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de Estreptomina y 25 µg/mL de Anfotericina B); y mantenidos a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Todos los reactivos utilizados son de marca GIBCO.

3.3 Siembra celular.

Se partió de un cultivo celular con una confluencia equivalente al 80 %, se realizó la siembra de cada línea celular en cajas de 12 pocillos en donde, a cada pocillo fue colocada una suspensión celular con aproximadamente $3,8 \times 10^4$ células para realizar el ensayo de detección de fosfatidilserina en células apoptóticas; por otro lado, para ejecutar el proceso de extracción de proteínas, fueron sembradas aproximadamente 9×10^5 células en cajas de cultivo de 75 cm³.

3.4 Detección de la fosfatidilserina en células apoptóticas.

Transcurrido el tiempo y una vez adaptadas las células se aplicó el tratamiento respectivo, que consistió de un control negativo a base de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5 %, un control positivo con doxurrubicina a 0,5µM y la dosis IC₅₀ de GNTM correspondiente para cada línea celular tumoral de interés; se volvió a incubar la caja durante 48 horas más.

Las células fueron tripsinizadas, la suspensión generada fue centrifugada a 4° C a 3500 rpm. Se realizó dos lavados con PBS al pellet resultante y posterior a ello se resuspendió con 200 µL de buffer vinculante 1X (BD Biosciencias). Finalmente fueron añadidos 2 µL de Anexina V-FITC (Santa Cruz Biotechnology) y 2 µL de yoduro de propidio (Santa Cruz Biotechnology); la suspensión fue incubada por 15 min a temperatura ambiente y se procedió a realizar las placas respectivas para su posterior lectura en el microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 plus) (Zeiss Alemania) con el objetivo de identificar células en apoptosis.

Fueron contabilizadas 200 células entre: Vivas (Anexina V-/IP-), en apoptosis temprana (Anexina V+/IP-), en apoptosis tardía (Anexina V+/IP+) y necróticas (Anexina V-/IP+). Para ello, se realizó el conteo de células vivas utilizando contraste de fases, entre las células contabilizadas y mediante fluorescencia (Excitación: BP 450-490, Divisor óptico: FT 510, Emisión: LP 515) fueron contadas las células en apoptosis temprana, tardía y células necróticas.

3.5 Extracción y Cuantificación de proteínas.

La extracción y cuantificación de proteínas apoptóticas se realizó en la línea celular más sensible al tratamiento con GNTM, es decir la línea celular PC-3. El tratamiento consistió en la aplicación de la dosis IC₅₀ (17 µg/mL) y una dosis duplicada (34 µg/mL) del extracto; además, se utilizó como control negativo: DMSO al 0,5 % (v/v), y como control positivo: doxurrubicina a 1 µM, por 48 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron tripsinizadas; la suspensión resultante fue recogida en un tubo de 15 mL y centrifugado por 5 min a 2000 rpm, a continuación, se realizaron una serie de lavados, al pellet resultante, con 1 mL de PBS; para posteriormente contabilizar el número de células vivas y muertas presentes en cada tratamiento. Finalmente, al sedimento obtenido se le agregó el buffer de lisis RIPA (Azida, Ortovanadato, PMSF, Aprotinina) calculado (1 mL por cada 10×10⁶ células), a partir de este paso, cada suspensión celular se mantuvo en hielo y se procedió a dar vortéx una serie de veces consecutivas hasta completar 30 min. Pasados 30 minutos, las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 4° C a 12000 rpm. El sobrenadante fue recuperado y conservado en tubos eppendorf de 0,5 mL a -80° C.

La cuantificación de las proteínas extraídas se ejecutó por el método Bradford en una caja de 96 pocillos; a la cual se adicionó 5 µL de cada muestra con 145 µL de reactivo Bradford (SIGMA), tras la preparación de las muestras, se dejó reposar durante 15 min protegida de la luz. Las

absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro (Sunrise™) a una longitud de onda de 620 nm; mediante la comparación de una curva estándar realizada con Albúmina de Suero Bovino (ASB), se determinaron las concentraciones de la proteína.

3.6 Identificación de proteínas apoptóticas mediante Western Blot.

La concentración proteica utilizada fue de 50 µg. La separación de proteínas se realizó mediante un gel SDS-PAGE (SDS-políacramide gel electrophoresis) utilizando geles separadores de 12 % y 15 % dependiendo del peso molecular de la proteína a identificar, y un gel concentrador de 4 %.

Una vez que los geles han polimerizado, se procedió a cargar la muestra previamente desnaturalizada; la electroforesis se desarrolló dejando un tiempo de corrida inicial de 15 min a 100 voltios. Luego de ello, se modificó el tiempo, que varió según la proteína a identificar.

Finalizada la electroforesis, se dió paso a la transferencia de proteínas, desde el gel hacia una membrana de PVDF, formando el denominado “sándwich”. La transferencia se llevó a cabo en un sistema Mini-Trans Blot Cell System (Bio-Rad) por 1 hora y 30 min a 100 volteos y a 4° C. La correcta transferencia de proteínas se confirmó mediante la tinción de la membrana con el colorante rojo ponceau 0,1% (SIGMA).

A continuación, se llevó a cabo durante 1 hora el bloqueo de la membrana utilizando leche descremada (Nestlé Carnation, Instant nonfat dry milk) al 5 %, la disolución de esta se realizó con TBS-Tween 1X; pasado el tiempo, se desechó la leche, para después incubar por toda la noche con el anticuerpo primario según corresponda (anticuerpos monoclonales: p21, β-tubulina; anticuerpos policlonales: Bcl-2, Bax, p73) (Santa Cruz Biotechnology, INC) (Anexo 1). Al día siguiente, fueron realizados una serie de lavados consecutivos con TBS-Tween 1X y TBS 1X; posteriormente se incubó con el respectivo anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology; EMD Millipore) (Anexo 1) durante 2 horas y protegido de la luz, después de ello se volvieron a realizar lavados con las soluciones antes descritas. Finalmente, las bandas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el kit de quimioluminiscencia Luminata™ Forte Western HRP Substrate; Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (Millipore); las bandas fueron capturadas en una película de rayos X CL-XPosure™ Film (Thermo Scientific).

3.7 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados con ANOVA post-test de Dunnett para analizar la diferencia significativa entre el control y los grupos expuestos a tratamiento; utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Detección de la fosfatidilserina en células apoptóticas.

La evaluación de la distribución de la fosfatidilserina se realizó aplicando la dosis IC₅₀ de GNTM correspondiente para cada línea celular tumoral de interés (RKO: 32 µg/mL; A-549: 55 µg/mL; MCF-7: 39 µg/mL; PC-3: 17 µg/mL; D-384: 22 µg/mL; U-251: 19 µg/mL), además de un control negativo con DMSO (0,5 %) y doxorrubicina (1 µM) para el control positivo.

En el caso de la línea celular D-384 (Tabla 3), con respecto al control negativo, se evidencian valores estadísticamente significativos ($p < 0,0001$) que reflejan disminución de la población celular ($87,65 \pm 1,22$ %) así como inducción de apoptosis temprana ($5,47 \pm 1,54$ %) y tardía ($6,72 \pm 1,93$ %) en las células expuestas a tratamiento con GNTM.

Tabla 3. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular D-384, tras la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.

Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas \pm SD en línea celular D-384				
	Apoptosis			
	Vivas	Temprana	Tardía	Necrosis
Control negativo	95,67 \pm 2,63	2,13 \pm 1,83	2,19 \pm 0,93	-
Control positivo	85,36 \pm 3,10	7,39 \pm 0,71	4,07 \pm 1,24	3,18 \pm 1,99
GNTM	87,65 \pm 1,22 ***	5,47 \pm 1,54 ***	6,72 \pm 1,93 ***	0,17 \pm 0,27

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis fue realizado mediante la prueba de Dunnett (***: $p < 0,0001$, **: $p < 0,001$, *: $p < 0,01$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Tabla 4. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular MCF-7, tras la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.

Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas \pm SD en línea celular MCF-7				
	Apoptosis			
	Vivas	Temprana	Tardía	Necrosis
Control negativo	97,28 \pm 1,48	1,90 \pm 1,26	0,82 \pm 0,42	-
Control positivo	75,20 \pm 5,90	6,18 \pm 3,41	13,57 \pm 3,49	5,06 \pm 3,13
GNTM	83,91 \pm 9,02 **	12,36 \pm 7,91 **	3,47 \pm 1,69	0,26 \pm 0,32

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis fue realizado mediante la prueba de Dunnett (***: $p < 0,0001$, **: $p < 0,001$, *: $p < 0,01$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Para la línea celular MCF-7 en las células tratadas con GNTM, los porcentajes de células vivas, de apoptosis temprana y de apoptosis tardía corresponden a $83,91 \pm 9,02$ %; $12,36 \pm 7,91$ % y $3,47 \pm 1,69$ % respectivamente; observándose una diferencia significativa ($p < 0,001$) en los porcentajes de células vivas y apoptosis temprana con respecto al control negativo (Tabla 4).

En la línea celular RKO se evidencia con respecto al control negativo, que existe una diferencia significativa ($p < 0,01$) en el porcentaje de apoptosis tardía ($7,03 \pm 5,56$ %) de las células sometidas a tratamiento con GNTM (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular RKO, tras la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.

Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas \pm SD en línea celular RKO				
	Apoptosis			
	Vivas	Temprana	Tardía	Necrosis
Control negativo	$93,12 \pm 3,17$	$5,54 \pm 2,52$	$1,27 \pm 0,84$	$0,07 \pm 0,17$
Control positivo	$77,50 \pm 4,09$	$10,32 \pm 5,33$	$9,16 \pm 4,52$	$3,02 \pm 0,79$
GNTM	$87,48 \pm 6,37$	$5,42 \pm 1,99$	$7,03 \pm 5,56$ *	$0,15 \pm 0,22$

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis fue realizado mediante la prueba de Dunnett (***: $p < 0,0001$, **: $p < 0,001$, *: $p < 0,01$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Tabla 6. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular A-549, tras la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.

Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas \pm SD en línea celular A-549				
	Apoptosis			
	Vivas	Temprana	Tardía	Necrosis
Control negativo	$97,77 \pm 1,32$	$1,47 \pm 0,89$	$0,76 \pm 0,78$	-
Control positivo	$73,04 \pm 5,87$	$6,50 \pm 2,26$	$3,58 \pm 3,27$	$16,87 \pm 4,68$
GNTM	$72,50 \pm 7,64$ ***	$23,39 \pm 7,42$ ***	$3,39 \pm 1,59$	$0,85 \pm 1,51$

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis fue realizado mediante la prueba de Dunnett (***: $p < 0,0001$, **: $p < 0,001$, *: $p < 0,01$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

En la Tabla 6 se puede observar que para el control negativo los porcentajes de células vivas, en apoptosis temprana y tardía en la línea celular A-549 corresponden a: $97,77 \pm 1,32$ %, $1,47 \pm 0,89$ % y $0,76 \pm 0,78$ % respectivamente; mientras que para las células tratadas con GNTM los porcentajes equivalen a: $72,50 \pm 7,64$ %, $23,39 \pm 7,42$ % y $3,39 \pm 1,59$ %; observándose una

disminución significativa ($p < 0,0001$), con respecto al control negativo, en los porcentajes de células vivas y apoptosis temprana.

En la línea celular U-251 (Tabla 7) con respecto al control negativo, se nota la disminución de la población celular tratada con GNTM ($75,47 \pm 4,89 \%$) ($p < 0,0001$) e incremento de los porcentajes de apoptosis temprana ($17,95 \pm 4,60 \%$) ($p < 0,0001$) y tardía ($6,57 \pm 0,66 \%$) ($p < 0,01$).

Tabla 7. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular U-251, tras la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.

Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas \pm SD en línea celular U-251				
	Apoptosis			
	Vivas	Temprana	Tardía	Necrosis
Control negativo	92,03 \pm 1,11	5,78 \pm 1,08	2,18 \pm 0,96	-
Control positivo	79,27 \pm 4,91	8,87 \pm 3,68	8,08 \pm 4,19	3,78 \pm 1,62
GNTM	75,47 \pm 4,89 ***	17,95 \pm 4,60 ***	6,57 \pm 0,66 *	-

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis fue realizado mediante la prueba de Dunnett (***: $p < 0,0001$, **: $p < 0,001$, *: $p < 0,01$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Finalmente, para la línea celular PC-3 se observa una diferencia significativa ($p < 0,0001$) en los porcentajes de viabilidad ($78,81 \pm 5,71 \%$) y apoptosis temprana ($15,63 \pm 4,59 \%$) de las células expuestas a tratamiento con GNTM frente a los porcentajes de viabilidad celular ($95,47 \pm 1,50 \%$) y apoptosis temprana ($3,28 \pm 1,36 \%$) del control negativo (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas en línea celular PC-3, tras la evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.

Porcentaje de células: vivas, apoptóticas y necróticas \pm SD en línea celular PC-3				
	Apoptosis			
	Vivas	Temprana	Tardía	Necrosis
Control negativo	95,47 \pm 1,50	3,28 \pm 1,36	1,25 \pm 0,58	-
Control positivo	67,66 \pm 6,76	10,19 \pm 2,52	18,01 \pm 9,42	4,14 \pm 0,88
GNTM	78,81 \pm 5,71 ***	15,63 \pm 4,59 ***	5,56 \pm 0,52	-

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis fue realizado mediante la prueba de Dunnett (***: $p < 0,0001$, **: $p < 0,001$, *: $p < 0,01$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

GNTM provoca descensos en los porcentajes de viabilidad de las líneas celulares: D-384, MCF-7, A-549, U-251 y PC-3. A través de este resultado, se demuestra que GNTM compromete el mecanismo de división celular inhibiendo la replicación masiva de células cancerosas. Pese a que en la línea celular A-549 se ha evidenciado una mayor disminución de la población celular tratada con GNTM ($72,50 \pm 7,64 \%$), se ha optado por analizar las proteínas apoptóticas involucradas en el mecanismo de muerte de la línea celular PC-3 sometida a tratamiento con el extracto de interés, cuya IC_{50} es menor ($17 \mu\text{g/mL}$).

4.2 Identificación de proteínas apoptóticas mediante Western Blot.

GNTM aplicado a dosis de 17 y 34 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 horas, es capaz de modular la expresión de una serie de proteínas relacionadas con la muerte y control del ciclo de división celular. En la Figura 3 se puede evidenciar la morfología celular de la línea cultivada, sometida a tratamiento con GNTM a la dosis de 17 $\mu\text{g/mL}$ se evidencia disminución de la población celular y a 34 $\mu\text{g/mL}$ se puede observar, además del descenso de células, la presencia de los denominados cuerpos apoptóticos que se forman tras la fragmentación celular.

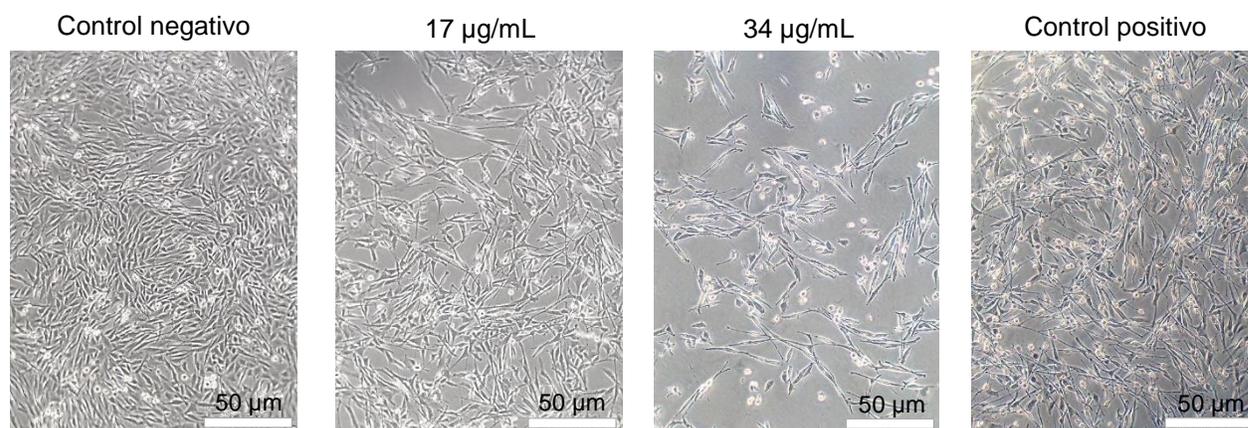


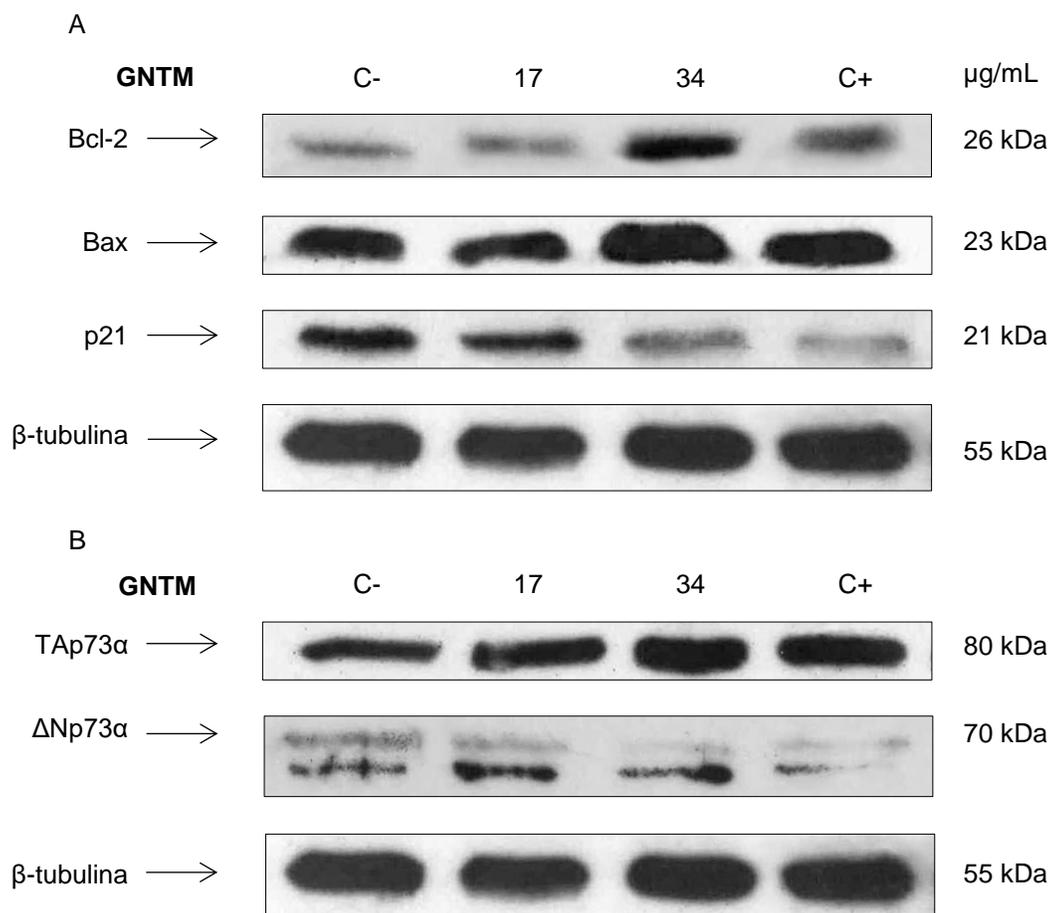
Figura 3. Cambios morfológicos de la línea celular PC-3 sometida a tratamiento con el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*. A dosis de 17 y 34 $\mu\text{g/mL}$ y sus controles: negativo (DMSO 0.5%) y positivo (Doxorrubicina 0.5 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 horas; visualizadas en microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Aumento 40x.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor

El ciclo celular, se encuentra regulado por una serie de proteínas, que resguardan la integridad del genoma. Los miembros de la familia p53 (p53, p63 y p73), desempeñan un papel fundamental en el control del ciclo de división celular que, en respuesta a diversos inductores y agente dañinos

del ADN, regulan: la detención del ciclo celular, la apoptosis, la autofagia y el metabolismo de células expuestas a agentes deletéreos que comprometen su función (Bailon-Moscoso, *et al.* 2015).



Gráfica 1. Línea celular PC-3 expuesta a tratamiento con GNTM. A dosis de 17 y 34 µg/mL durante 48 h. Proteínas: Bax, Bcl-2, p21 (Panel A), p73 (Panel B) y β-tubulina como control de carga para los extractos celulares totales. Los lisados de proteína total fueron separados mediante un gel de SDS-PAGE al 15% e identificadas mediante el análisis de Western Blot con la adición de anticuerpos indicados contra las proteínas mencionadas.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

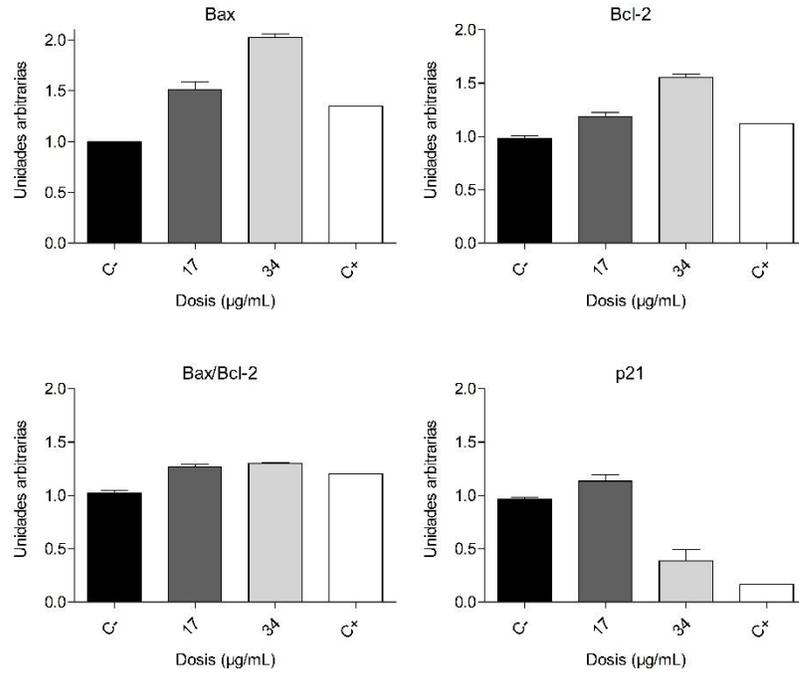
En la Gráfica 1A y 2A también se puede visualizar que GNTM es capaz de modular la expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular por apoptosis. Según lo observado, GNTM induce sobreexpresión de las proteínas Bax (pro-apoptótico) y Bcl-2 (anti-apoptótico), que regulan los procesos de permeabilización mitocondrial (Jutinico Shubach, *et al.* 2015), y cuya relación,

expresada en el complejo regulador de apoptosis Bax/Bcl-2, determinará el potencial apoptótico de la célula (Perlman, *et al.* 1999); analizando los resultados obtenidos encontramos que, con respecto al control negativo, la relación Bax/Bcl-2 se encuentra aumentada en ambas dosis probadas, condición que promueve la apoptosis.

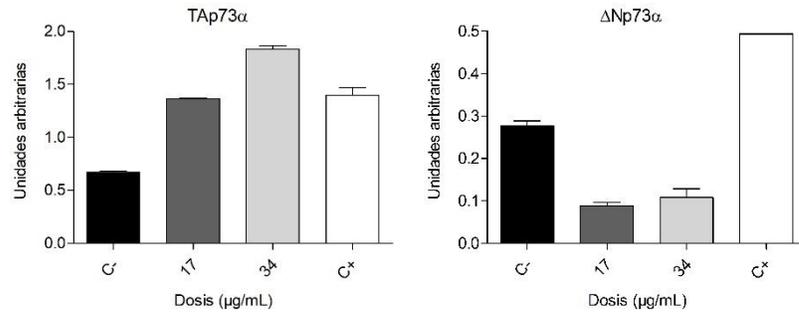
El eficiente mecanismo de acción de p53 puede verse alterado por mutaciones y deleciones parciales o completas del gen *TP53*, que dan lugar a la pérdida total o parcial de la expresión de la proteína (Fondevila-Campo, 2002), alterando su correcto funcionamiento. En la presente investigación, el análisis de proteínas apoptóticas fue realizado en la línea celular PC-3 que, presenta deficiencias en el gen *TP53* (Nachshon-Kedmi, Yannai, y Fares, 2004), por lo que se ha optado por evaluar la expresión de otra proteína miembro de la misma familia, p73; que cumple funciones similares a las descritas para p53, por lo tanto, puede actuar induciendo el arresto del ciclo celular e incluso promoviendo la apoptosis a través de sus isoformas TAp73 (Koida, *et al.* 2008).

En la Gráfica 1B y 2B pueden observarse dos isoformas de p73, incluyendo a aquellas que pueden inhibir la proliferación celular, promover diferenciación e inducir apoptosis: TAp73 (Díaz Martínez, 2011); y a aquellas que bloquean las propiedades supresoras de TAp73: Δ Np73 (Díaz Martínez, 2011; Koida, *et al.* 2008). GNTM a las dosis de 17 y 34 μ g/mL induce la sobreexpresión de la isoforma TAp73 α la cual estaría mediando el proceso apoptótico producido en línea celular PC-3; además la evidente disminución de la isoforma Δ Np73 α (Gráfica 2B) demuestran que la vía de señalización apoptótica no estaría bloqueada ni interrumpida.

A



B



Gráfica 2. Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-Digit Blot Scanner.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Evaluar el mecanismo de muerte por el que determinada línea celular cesa su crecimiento, requiere de una serie de ensayos previos que expongan: por un lado, los componentes fitoquímicos del extracto en estudio, y por otro, la capacidad antiproliferativa del mismo. El presente trabajo, apoyado en investigaciones realizadas por el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja, da a conocer el mecanismo de muerte que diversas líneas celulares adoptan frente al tratamiento con GNTM.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se deduce que GNTM a la dosis IC_{50} aplicada provoca descensos en los porcentajes de viabilidad de las líneas celulares: D-384, MCF-7, RKO, A-549, U-251 y PC-3. Sin embargo, como se indica en las Tablas 3, 4 y 5, en las líneas celulares: D-384, MCF-7 y RKO, el porcentaje de apoptosis no supera el 15 %; por lo que se considera que probablemente GNTM, en estas líneas celulares, estaría generando otros fenómenos de inhibición. Se considera además que en las líneas celulares de: cáncer de próstata (PC-3), pulmón (A-549) y glioblastoma cerebral (U-251), GNTM incrementa los porcentajes de apoptosis que, en las tres líneas celulares analizadas, representan hasta el 26 % del efecto producido (Tabla 6).

Las sustancias bioactivas o fitoquímicos forman parte de una serie de “sustancias no nutritivas” que intervienen en el metabolismo secundario de la especie vegetal; por ejemplo: los mecanismos de defensa de las plantas a menudo se basan en su capacidad de generar sustancias químicas que posean un efecto citotóxico o citostático (Muñoz-Cendales y Cuca-Suárez, 2016); de aquí, la importancia de conocer la composición fitoquímica del extracto en cuestión. Según estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, el compuesto mayoritario que GNTM posee son las saponinas y en menor cantidad taninos; ambos grupos considerados poseen gran capacidad antioxidante (García-Iturrioz, 2002).

Se ha demostrado que las saponinas fortalecen el sistema inmunitario, aumentando la capacidad del organismo para detectar y desactivar los invasores externos tales como: bacterias y virus e inhibir el crecimiento de células cancerosas (Yeager, 2001). Así mismo, Fernández, Hernández, y Regueira, (2015) destacan la actividad antiproliferativa y citotóxica que las saponinas presentan en células de leucemia, células de carcinoma de pulmón y cáncer cervical; además de líneas celulares de cáncer de mama, estómago y colón (Nakamura, *et al.* 1966), que se suman a lista.

Ramos (2008), manifestó que la presencia de antioxidantes en determinadas especies vegetales otorga una acción protectora en células normales y efectos citotóxicos en células neoplásicas. La actividad antioxidante de los compuestos citotóxicos puede incidir significativamente en la inhibición de la proliferación celular (Ballesteros-Vivas, 2015); tal y como se demuestra en la presente investigación, en donde el porcentaje de células vivas se ve comprometido. Este efecto se produce al neutralizar a los radicales libres exógenos y aquellos producidos por el elevado metabolismo de células tumorales, evitando el daño cromosómico y la expresión de oncogenes (Ballesteros-Vivas, 2015).

Al igual que *Grias neuberthii*, *Barringtonia racemosa*, otra especie de la familia Lecythidaceae tiene la particularidad de presentar un alto contenido de saponinas en su composición fitoquímica (Ragasa, Espineli, y Shen, 2014); Mackeen, *et al.* (1997) destaca la actividad citotóxica del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de *Barringtonia racemosa* en células de carcinoma cérvico-uterino; este efecto dado a partir de una IC_{50} equivalente a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, según Samanta, *et al.* (2010) *Barringtonia racemosa*, en células de leucemia, induce apoptosis mediada principalmente por la fragmentación del material genético y la subsecuente cascada proteolítica que altera a la mitocondria y que desencadena la autodestrucción celular. Ambas especies demuestran cómo la familia Lecythidaceae actúa sobre diversas líneas celulares tumorales, propiciando amplios efectos citotóxicos a bajas concentraciones.

Con respecto a la modulación de proteínas apoptóticas, se evidencia que GNTM podría desencadenar en células de carcinoma prostático muerte celular apoptótica. Además de evaluar la expresión de proteínas apoptóticas como: Bax (pro-apoptóticas) y Bcl-2 (anti-apoptóticas), fueron consideradas, principalmente las proteínas p21 y p73 α , que podrían explicar la ruta de muerte celular inducida. Se debe considerar que el análisis de proteínas apoptóticas, mediante western blot, fue realizado en la línea celular PC-3 que presenta deficiencias en el gen *TP53* (Nachshon-Kedmi, *et al.* 2004), lo cual descarta la identificación de la proteína y además asegura que GNTM media procesos apoptóticos a través de una vía independiente de p53.

González-Espinosa, *et al.* (2002) mencionan que, en células de carcinoma prostático, Bcl-2, sufre una alteración genética que lo posiciona bajo el control de elementos reguladores de genes de inmunoglobulinas, produciendo la sobreexpresión de dicha proteína y prolongando la supervivencia de células tumorales, regulando negativamente el proceso de autodestrucción celular. Tomando en cuenta los resultados obtenidos expuestos en la Gráfica 1A y 2A se nota el

incremento de Bcl-2, que podría generar cierta resistencia al tratamiento; sin embargo, la relación de las proteínas Bax y Bcl-2, expresada en el complejo regulador de apoptosis Bax/Bcl-2, determinará el potencial apoptótico de la célula. En nuestro caso, y a pesar de que en la dosis de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó un incremento en la expresión de Bcl-2, la relación del complejo Bax/Bcl-2 se encuentra aumentada, condición que favorece la inducción de la apoptosis.

Tras estos resultados, se puede considerar que la sobreexpresión de Bax (Gráfica 3A y 4A), podría estar regulada por p73. Melino, *et al.* (2004) demuestran cómo en la línea celular Saos-2, derivada de osteosarcoma humano y que presenta al igual que PC-3 deficiencia total del gen p53, la apoptosis puede estar mediada por una vía dependiente de p73, que utiliza como mediadores apoptóticos a PUMA y Bax.

Por medio de la dosis IC_{50} aplicada, GNTM demuestra inhibir la proliferación de células tumorales de carcinoma prostático, asociamos este efecto al mecanismo molecular dependiente de p73, que se activa en respuesta a daño en el genoma y que desempeña, al igual que p53, un papel central en la inducción de senescencia celular (Marudamuthu, *et al.* 2015), a través de la activación de p21 (Jiang, *et al.* 2017), que se une a los complejos Cdk-G₁/S y Cdk/S inhibiendo sus actividades (Alberts, *et al.* 2008) e interrumpiendo el ciclo de división celular (Vicencio, *et al.* 2008). TP73, es un gen supresor de tumores que codifica múltiples isoformas (Koida, *et al.* 2008), incluyendo: las variantes que mantienen el dominio de transactivación: TAp73, que pueden inhibir la proliferación celular, promover diferenciación e inducir apoptosis (Díaz Martínez, 2011); y las formas que pierden el dominio de transactivación: ΔTAp73 , que tienen gran potencial oncogénico al inactivar las propiedades supresoras de TAp73 y p53. (Díaz Martínez, 2011; Koida, *et al.* 2008).

En la Gráfica 1A y 1B, se puede observar como el tratamiento con GNTM provoca el incremento de la proteína p21 en la dosis IC_{50} equivalente a 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y que por el contrario a dosis de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induce descensos en la expresión de la proteína evaluada. La disminución de p21 en la dosis de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puede ser causada por eventos en donde la célula no pueda contener el daño producido disminuyendo su capacidad para detener el ciclo celular e induciendo por lo tanto un mecanismo que permita su desintegración; se considera que TAp73 α se encuentra mediando el arresto del ciclo celular y el proceso de muerte celular por apoptosis, ya que como mencionan Jost, Marin, y Kaelin, (1997); Willis, *et al.* (2003), p73 puede inducir la activación de p21, para detener el ciclo de división celular e inhibir la proliferación celular; analizando además la expresión

de la isoforma $\Delta Np73\alpha$ que se encuentra disminuida, y que por lo tanto no estaría inhibiendo la acción de TAp73 α .

Finalmente, se debe tomar en cuenta los efectos que GNTM produce al inhibir el crecimiento celular, ya que las vías por las cuales induce este efecto pueden variar dependiendo de la línea celular analizada, así como de la dosis y tiempo de exposición; por lo que no se descarta que GNTM en otras líneas celulares, ejerza sus efectos a través de una modulación dependiente de p53/p73; para determinar si sucede será necesario continuar el proceso investigativo.

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii*, aplicado a la dosis IC₅₀, es capaz de inducir descensos de la población celular en líneas celulares de: astrocitoma cerebral (D-384), adenocarcinoma mamario (MCF-7), carcinoma de colon humano (RKO), carcinoma de pulmón (A-549), glioblastoma cerebral (U-251) y adenocarcinoma protático grado IV (PC-3) provocando la detención del ciclo de división celular; además de propiciar el incremento de apoptosis en las líneas celulares: A-549, U-251 y PC-3.

El extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* en células de cáncer de próstata (PC-3), induce detención del ciclo de división celular y muerte celular por apoptosis, a través de la modulación dependiente de p73 que por medio de la isoforma TAp73 α regula la expresión de Bax y p21; indicando que los efectos producidos son dependientes de la dosis aplicada.

RECOMENDACIONES

Expandir la metodología de investigación, con el propósito de emplear técnicas mucho más sensibles que permitan ampliar el estudio realizado además de explorar otros mecanismos de muerte celular.

Se debe considerar que, los resultados expuestos en la presente investigación aún son *in vitro*, por lo que es necesario evaluar gradualmente la actividad del extracto en modelos biológicos más grandes, para así garantizar la seguridad de este y descartar sus posibles efectos tóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Biología Molecular de la Célula* (5th ed.). Barcelona-España: Ediciones Omega, S.A.
- Alfaro, E., García, C., & Dueñas, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones Y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)*, 46(4), 275–280. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/cancer/ca-2000/ca004k.pdf>
- Alva, A., Vásquez, O., Cuniberti, R., Castillo, A., & Guerra, W. (2002). Extracción y Caracterización de Ácidos Grasos de la especie *Grias neuberthii* Macht (Sachamango). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 2(1), 103–106. Retrieved from <http://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol2/11.pdf>
- Álvarez, M., Escudero, P., & Hernández, T. (2008). Cáncer de próstata. *Revista Mexicana de Urología*, 68(4), 250–259. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/uro/ur-2008/ur084l.pdf>
- American Cancer Society. (2014). Cáncer de próstata. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer.html>
- Aredia, F., Guamán, L. M., Giansanti, V., & Scovassi, I. (2012). Autophagy and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), 520–534. <https://doi.org/10.3390>
- Baeza-Martín, R. (2014). *Diecinueve formas de morir las células*. Universidad de Valladolid. Retrieved from <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/7194/1/TFM-M150.pdf>
- Bailon-Moscoso, N., González-Arévalo, G., Velásquez-Rojas, G., Malagon, O., Vidari, G., Zentella-Dehesa, A., ... Ostrosky-Wegman, P. (2015). Phytometabolite Dehydroleucodine induces cell cycle arrest, apoptosis, and DNA damage in human astrocytoma cells through p73/p53 regulation. *PLoS ONE*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136527>
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumor Biology*, 35(5), 3981–3995. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1649-y>
- Ballesteros Vivas, D. (2015). *Estudio comparativo sobre la obtención de extractos con actividad citotóxica a partir de residuos frutícolas*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/52021/>

- Calderón, R. V. (2007). *Inmunología*. Instituto de Biotecnología UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
- Chávez-Salas, F., Vásquez, O., & Escalante, H. (2007). Evaluación de la técnica Western blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 283–286.
- Chávez, A. (1999). *Participación de los genes blanco de p53: p21 y bax, en la muerte embrionaria causada por p53 en ratones carentes de mdm2*. Monterrey, Nueva León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/6752/1/1080124391.PDF>
- Choi, K. S. (2012). Autophagy and cancer. *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*, 44(2), 109–120. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.2.033>
- Cornejo, A., & Mori, S. (2012). *Grias angustipetala* and *G. ecuadorica*, two new species of Lecythidaceae from western Ecuador. *The New York Botanical Garden Press*, 64(3), 318–324. <https://doi.org/10.1007/s12228-012-9248-y>
- Criollo, A. (2009). *Regulación de la autofagia por el receptor del inositol trisfosfato (IP3R)*. Universidad de Chile. Retrieved from http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-criollo_ag/pdfAmont/qf-criollo_ag.pdf
- Cueva, P. (2015). El cáncer en el Ecuador. Retrieved from <https://www.saludsapersonas.com/vivesaludtotal/index.php/cancer/el-cancer-en-el-ecuador/423-el-cancer-en-el-ecuador>
- Cueva, R. M. (2014). *Estudio del tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina en la células de Astrocitoma Cerebral (D-384)*. Universidad Técnica Particular de Loja. Retrieved from http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10741/1/Cueva_Quiroz_Ruth_Magdalena.pdf
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología* (7th ed.). Madrid-España: Editorial Médica Panamericana.
- Díaz Martínez, R. (2011). *IMPLICACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE EN DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO TUMOROGÉNICO. VALOR PRONÓSTICO p73 EN PACIENTES CON CÁNCER*. Universidad Autónoma de Madrid. Retrieved from

https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/6216/37764_d%EDaz_mart%EDnez_raquel.pdf?sequence=1

Dubin, M., & Stoppani, A. O. M. (2000). Muerte celular programada y apoptosis Funcion de las mitocondrias. *Medicina*, 60(3), 375–386. Retrieved from http://www.medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol60-00/3/v60_n_3_p375_386.pdf

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fernández, M., Hernández, I., & Regueira, S. (2015, May). Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 40(7). Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Ivones_Hernandez/publication/303020423_Bioactivos_marinos_en_el_tratamiento_del_cancer_Marine_bioactives_in_cancer_treatment/links/5735bc2c08ae9ace840adbde.pdf

Fondevila Campo, C. (2002). *Valor pronóstico de la expresión del gen p53, del VEGF y de la angiogénesis tumoral en pacientes intervenidos por cáncer gástrico y la influencia de estos factores sobre la respuesta al tratamiento quimioterápico adyuvante*. Universidad de Barcelona. Retrieved from file:///C:/Users/Yuyi/Desktop/Downloads/01.CFC_1de2.pdf

García Iturrioz, M. (2002). De los fitonutrientes a la alimentación vegetariana. Evidencias fisiopatológicas*. *Natura Medicatrix*, 2(20), 55–66.

García Pérez, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos , actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1(2), 31–41.

Gómez-Lázaro, M., Fernández-Gómez, F. J., & Jordán, J. (2004). La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *Revista de Neurología*, 39(3), 243–250. Retrieved from <https://previa.uclm.es/profesorado/jjordán/pdf/review/15.pdf>

González-Espinosa, D., Jiménez- Ríos, M. A., & Gutiérrez- López, A. (2002). Aspectos clínicos de la biología molecular del cáncer de próstata. *Rev Oncol*, 4(5), 241–249.

Guamán- Ortiz, L. M. (2012). Chronicles of a Silent Death: Apoptosis. *Research in Cell Biology*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.5923/j.cellbiology.20120101.01>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Herrero, G. (2008). *Mecanismos moleculares de inducción de autofagia por trail en células epiteliales de mama y su relación con apoptosis y transformación oncogénica*. Universidad de Granada.
- INEC. (2014). Estadísticas de cáncer. Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/home/>
- Iñaki, M. L. (2015). *Manejo de la técnica Western Blot. Determinaciones relacionadas con obesidad y diabetes*. Universidad del País Vasco.
- Jiang, C., Liu, G., Luckhardt, T., Antony, V., Zhou, Y., Carter, A. B., ... Liu, R.-M. (2017). Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/accel.12643>
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: Muerte celular programada, 22(6), 100–106. <https://doi.org/0212-047X>
- Jost, C., Marin, M., & Kaelin, W. (1997). p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389(6647), 191–4. <https://doi.org/10.1038/38298>
- Jutinico Shubach, A. P., Mantilla Galindo, A., & Sánchez Mora, R. M. (2015). Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con Chlamydia trachomatis. *NOVA*, 13(24), 83. Retrieved from <http://ezproxy.leedsbeckett.ac.uk/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=113913265&site=eds-live&scope=site>
- Koida, N., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ono, S., Koda, T., Ando, K., ... Nakagawara, A. (2008). Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8555–8563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710608200>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... 2009., N. C. on C. D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Krysko, D., Vanden, B., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis., 44(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>

- Lagunas, M., Valle, A., & Soto, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, 17(2), 98–107. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142e.pdf>
- Lizarbe, M. A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 101(2), 1–33. Retrieved from <http://www.rac.es/ficheros/doc/00553.pdf>
- López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M., & Martínez de Pancorbo, M. (2001). P53, Un Gen Supresor Tumoral. *Gaceta Médica de Bilbao*, 98(1), 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(01\)74350-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(01)74350-8)
- López, M. L., Juárez, E., Medel, J., Alvarez, D. M., Zamora, R., Estudillo, C., ... Manzo, J. (2012). Necrosis Neuronal Programada. *Revista Médica Universidad Veracruzana*, 52(228), 17–22. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2012/muvs121b.pdf>
- López, N., Marínez, C., & Konigsberg, M. (2005). La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Mechanisms of Ageing and Development*, 24(2), 47–53. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852008000100007>
- Lozano, A. (2013). "GERMINACION DE SEMILLAS DE *Grias neuberthii* J.F. MACBRIDE Sachamango, SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS PRE - GERMINATIVOS" T. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA. Retrieved from http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/214/1/TESIS_ADRIANA_LOZANO_PARA_LIBROS.pdf
- Maciel-Herrerías, M., & Cabrera-Benítez, S. (2016). El papel de la autofagia en enfermedades pulmonares. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 75(3), 227–236. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2016/nt163g.pdf>
- Mackeen, M. M., Ali, A. M., El-Sharkawy, S. H., Manap, M. Y., Salleh, K. M., Lajis, N. H., & Kawazu, K. (1997). Antimicrobial and cytotoxic properties of some Malaysian traditional vegetables. *International Journal of Pharmacognosy*, 35(3), 174–178.
- MAE. (2017). Resumen Ejecutivo. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/Parque-Nacional-Yasuni.pdf>
- Martínez Salazar, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152–166. Retrieved from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200016&lng=es&nrm=iso&tling=es

- Marudamuthu, A., Shetty, S., Bhandary, Y., Karandashova, S., Thompson, M., Sathish, V., ... Shetty, S. (2015). Plasminogen activator inhibitor-1 suppresses profibrotic responses in fibroblasts from fibrotic lungs. *Biol. Chem*, 6.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., ... Vousden, K. H. (2004). p75 Induces Apoptosis via PUMA Transactivation and Bax Mitochondrial Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8076–8083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307469200>
- Moiola, C. P. (2012). *Nuevos blancos moleculares en el cáncer de próstata*. Universidad de Buenos Aires. Retrieved from http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5279_Moiola.pdf
- Morales Sánchez, D., & Gallo Ramírez, L. (2006). *Plataformas de Proteómica*. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf
- Mori, S. A., Kiernan, E. A., Smith, N. P., Kelley, L. M., Huang, Y.-Y., Prance, G. T., & Thiers., B. (2017). Observations on the phylogeography of the lecythidaceae clade (Brazil nut family). *Phytoneuron*, 30(April), 1–85. Retrieved from <http://www.phytoneuron.net/2017Phytoneuron/30PhytoN-Lecythidaceae.pdf>
- Moya, G. (2012). *Etnobotánica De Las Comunidades De Puerto Bolívar, Tarapuya, Aboquëhuira Y Sototsiaya De La Nacionalidad Siona, Provincia Sucumbios, Ecuador. 2004- 2005*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Muñoz Cendales, D. R., & Cuca Suárez, L. E. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(3), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2015.10.002>
- Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., & Fares, F. (2004). Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3'-diindolylmethane through the mitochondrial pathway. *British Journal of Cancer*, 91(7), 1358–1363. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602145>
- Nakamura, T., Komori, C., Lee, Y., Hashimoto, F., Yahara, S., Nohara, T., & Ejima, A. (1966). Cytotoxic Activities of Solanum Steroidal Glycosides. *Biol. Pharm. Bull*, 19(4), 564–566.

<https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>

- Naval, J., Marzo, I., & Anel, A. (2004). Mecanismos celulares de muerte celular programada. *Hamatologica (Ed. Esp.)*, 89, 126–148. Retrieved from file:///C:/Users/Usuario/Downloads/13066671_S300_es.pdf
- Neri, M., Filiberti, R., Taioli, E., Garte, S., Paracchini, V., Bolognesi, C., ... Puntoni, R. (2005). Pleural malignant mesothelioma, genetic susceptibility and asbestos exposure. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1–2), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.003>
- Ojeda, D., & Patiño, A. (2010). *Herpetofauna de un bosque húmedo tropical en la Estación El Padmi, de la Universidad Nacional de Loja. Acuicultura*. Loja.
- OMS. (2017). Cáncer. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Peña-Sanoja, M. J., & De Sanctis, J. B. (2013). Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investigacion Clinica (Venezuela)*, 54(3), 325–337. <https://doi.org/0535-5133>
- Perlman, H., Zhang, X., Chen, M. W., Walsh, K., & Buttyan, R. (1999). An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(1), 48–54. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400453>
- Ragasa, C. ., Espineli, D. ., & Shen, C. . (2014). Cytotoxic Triterpene from *Barringtonia asiatica*. *Pharmaceutical Chemistry*, 48(8), 529–533.
- Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M. V., Sayan, A. E., Knight, R. A., Mueller, M., ... Candi, E. (2005). P73 Induces Apoptosis By Different Mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 713–717. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.156>
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(5), 507–526. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700326>
- Redondo-Blanco, S. (2014). “ *Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mediante compuestos bioactivos .*” Universidad de Oviedo.
- Reiter, R., & de Kernion, J. (2002). *Epidemiology, Etiology and prevention of prostate cancer*. (C. Urology, Ed.) (8th ed.).
- Remijsen, Q., Goossens, V., Grootjans, S., & Van Den Haute, C. Vanlangenakker, N. Dondelinger,

- Y., ... & Baekelandt, V. (2014). Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.531>
- Ríos, M. de los A., & Hernández, M. (2001). Los genes ssupresores de tumores y el cáncer. *Revista Cubana de Oncología*, 17(1), 65–71.
- Rossi, M., Sayan, A. E., Terrinoni, A., Melino, G., & Knight, R. A. (2004). Mechanism of induction of apoptosis by p73 and its relevance to neuroblastoma biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028, 143–149. <https://doi.org/10.1196/annals.1322.015>
- Saikumar, P., & Venkatachalam, M. (2009). Apoptosis and Cell Death. *Basic Concepts of Molecular Pathology*, 2, 29–40. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-89626-7>
- Salamanca-Gómez, F. (2009). Células troncales, cáncer y p53. *Gaceta Medica de Mexico*, 145(5), 441–442. Retrieved from http://www.anmm.org.mx/GMM/2009/n5/76_vol_145_n5.pdf
- Salas, F., Rada, F., Kobashigawa, A., Torres, C., Milla, P., Huarcaya, G., & Aliaga, C. (2014). Revisión Cáncer de próstata: Conceptos biomoleculares, 4(2), 22–33. Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/carcinos/v4n2_2014/pdf/a05v4n2.pdf
- Samanta, S. K., Bhattacharya, K., Mandal, C., & Pal, B. C. (2010). Identification and quantification of the active component quercetin 3-O-rutinoside from *Barringtonia racemosa*, targets mitochondrial apoptotic pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Asian Natural Products Research*, 12(8), 639–648. <https://doi.org/10.1080/10286020.2010.489040>
- Sánchez, A., Fonseca, G., Capiro, N., & Fernández, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de lantanas medicinales en Cuba. *Rev Cubana Farm*, 34(1). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100005
- Scovassi, I., & Guamán, L. M. (2013). Traditional Medicine: An Ancient Remedy Rediscovered. *Biochemistry & Pharmacology*, 2(1), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000110>
- SOLCA. (2010). Registro de Tumores. Retrieved from <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/index.jsp>
- Towbin, H. (2011). Análisis de Proteínas: Electroforesis, Transferencia e Inmunoprecipitación. *Proc Natl Acad Sci*, 76, 350–384. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-33>
- Uribe-Arcila, J. (2005). Cáncer de próstata. ¿Por qué se produce el cáncer de próstata?.

Aproximación a un modelo genético y molecular. *Revista Urología Colombiana*, 14(3), 25–38.

Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., ... Kroemer, G. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? *Gerontology*, 54(2), 92–99. <https://doi.org/10.1159/000129697>

Willis, A. C., Pipes, T., Zhu, J., & Chen, X. (2003). P73 Can Suppress the Proliferation of Cells That Express Mutant P53. *Oncogene*, 22(35), 5481–5495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206505>

Yeager, S. (2001). *La Guía Médica de Remedios Alimenticios*. (Prevention, Ed.). Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=pRY9S_VYgW0C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de descripción de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blot.

Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Código	Peso Molecular (KDa)	Dilución Recomendada	Casa Comercial.
	Goat anti-rabbit IgG-HRP	sc-2004	-	1:500-1:10000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	Goat anti-mouse IgG-HRP conjugate/AP308P	AP308P	-	1:2000-1:5000	EMD Millipore
Bcl-2 (C 21)	Goat anti-rabbit	sc-783	26	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Bax (P-19)	Goat anti-rabbit	sc-526	23	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
p21 (187)	Goat anti-mouse	sc-817	21	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
p73 (H-79)	Goat anti-rabbit	sc-7957	73	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
β Tubulin (D-10)	Goat anti-mouse	sc-5274	55	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.