



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**“Estudio del tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina en
la células de Astrocitoma Cerebral (D-384)”**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR:

Cueva Quiroz, Ruth Magdalena.

DIRECTOR:

Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Dra.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Doctora.

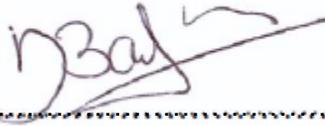
Natalia Catalina Bailón Moscoso

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo, denominado: “Estudio del Tipo de Muerte Celular inducido por la Dehidroleucodina en las células de Astrocitoma cerebral (D-384)”, realizado por la profesional en formación: Ruth Magdalena Cueva Quiroz; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, agosto de 2014

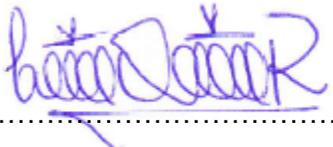
f) .....

Dra. Natalia Bailón Moscoso

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Ruth Magdalena Cueva Quiroz declaro ser la autora del presente trabajo de fin de titulación: Estudio del Tipo de Muerte Celular inducido por la Dehidroleucodina en células de Astrocitoma cerebral (D-384), de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Dra. 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, procedimiento y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....

Ruth Magdalena Cueva Quiroz

C.I. 1717902207

DEDICATORIA

Este proyecto de fin de Titulación va dedicado con todo mi amor y admiración a mis Padres, Dormila y Lautaro, quienes han sido el pilar fundamental de mi vida, por siempre creer en mí y por ser siempre mi apoyo incondicional.

A mis amorosas hermanas Sara, Laura y Mercedes, por todo su apoyo y amor brindado en el transcurso de mi vida, por incentivarme siempre a ser mejor persona, superando cualquier obstáculo. De la misma manera a mi cuñado Geo por brindarme buenos consejos, cariño y formar parte de nuestra familia.

A mis hermosas sobrinas Rosita y Anahí que llenan de felicidad y luz mi vida con solo una sonrisa.

Ruth Magdalena Cueva Quiroz.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa
que el vapor, la electricidad
y la energía atómica: la voluntad”.*

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por abrir sus puertas a los estudiantes y guiarlos hacia el camino del éxito, y conjuntamente a la Titulación de Bioquímica y Farmacia por la formación académica recibida.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, mi tutora de tesis, por su exigencia, por su templanza y por enseñarme que siempre podemos dar más de lo que pensamos poder, por compartir sus conocimientos día a día, por todo el apoyo para la culminación de este proyecto, por esto y más muchas gracias.

A quienes forman parte del Laboratorio de Genética Toxicológica, Mgs. María Isabel Ramírez y BqF. Luis Guamán, por todos los conocimientos y experiencias impartidas.

A mi amados Padres, que les debo todo, gracias por hacer de mí una persona luchadora, por enseñarme a no rendirme ante las adversidades, por los valores impartidos y por sobre todo por todo el amor que me brindan día a día, porque aunque no estemos juntos los siento acompañándome a cada instante.

A mis bellas Hermanas Sary, Laury y Mechita, por siempre estar apoyándome, incentivándome, por no dejar de alentarme ni por un momento, por todo el amor que brindan gracias amadas hermanas mías.

A mí querida Señora Fanny, Jonhsito, Julián, Ma. Dolores, Carlos Iván, Sol y Juan Cristóbal, que se volvieron una familia para mí, por su cariño, sus palabras de aliento y sus cálidos abrazos, mil gracias.

A mis compañeras y más que eso a mis amigas, Gaby y Saryta, con las he compartido la carrera universitaria, que han sido un apoyo, que me han brindado su amistad sincera, gracias.

A mis amigas del laboratorio, Gaby V y Sofí, gracias por apoyarme en todo momento, por hacer de los momentos compartidos, recuerdos gratos.

A tod@s gracias infinitas, los llevaré siempre en mi mente y en mi corazón.

Ruth Magdalena Cueva Quiroz

ÍDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.	
1.1. Cáncer.....	6
1.2. Causas del Cáncer.....	8
1.3. Factores de Riesgo.....	8
1.4. Incidencia.....	9
1.5. Cáncer Cerebral.....	10
1.5.1. Gliomas.....	10
1.6. Tratamiento.....	11
1.6.1. Cirugía.....	11
1.6.2. Radioterapia.....	12
1.6.3. Quimioterapia.....	12
1.7. Antineoplásicos de Origen Natural.....	12
1.7.1. Metabolitos secundarios de Plantas.....	13
1.7.1.1. Lactonas sesquiterpénicas.....	13
1.7.1.1.1. Dehidroleucodina.....	14
1.8. Tipos de Muerte Celular.....	15
1.8.1. Apoptosis.....	15
1.8.2. Necrosis.....	17
1.8.3. Senescencia.....	18

1.8.4. Catástrofe Mitótica.	18
1.8.5. Oncosis.	19
1.8.6. Piroptosis.	19
1.8.7. Autofagia.....	19
1.9. Biomarcadores.	20
1.9.1. Biomarcadores Apoptóticos.	20
1.9.2. Determinación del Tipo de Muerte Celular por Citometría de Flujo.....	21
1.9.3. Técnica de Western Blot.	21
 CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO.	
2.1. Objetivo general del proyecto.	24
2.2. Objetivos específicos del proyecto.	24
 CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.	
3.1. Molécula de estudio.	26
3.2. Cultivo celular.	26
3.3. Siembra.	26
3.4. Determinación de viabilidad celular.	27
3.5. Determinación del tipo de muerte celular.	27
3.6. Extracción y Cuantificación de Proteínas.....	28
3.7. Western Blot.	29
3.8. Análisis Estadístico.....	30
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
4.1. Viabilidad Celular..	32
4.2. Determinación del Tipo de Muerte Celular por Citometría de Flujo.....	35
4.3. Estudio de p21 mediante Western Blot.....	38
 CONCLUSIONES.....	 42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula Dehidroleucodina.....	14
Figura 2. Células de Astrocitoma Cerebral (D-384).....	26
Figura 3. Representación Gráfica del análisis de muerte de Citometría de Flujo....	28
Figura 4. Porcentaje de Viabilidad Celular en 1 Ciclo de Replicación y Morfología de Células D-384.....	33
Figura 5. Porcentaje de Viabilidad Celular en 2 Ciclos de Replicación y Morfología Células D-384.....	34
Figura 6. Análisis de la expresión de Tubulina (proteína constitutiva) y la expresión de p21.....	39

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Muerte Celular.....	36
Gráfica 2. Porcentaje de muerte.....	37

ABREVIATURAS

AA: Astrocitoma Anaplásico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1

ASB: Albúmina de Suero Bovino

ATP: Adenosintrifosfato

Bcl-2: B-cell lymphoma 2 – Linfoma de células B 2

CDK: Ciclinas Dependientes de Kinasas

CIP: Proteínas Inhibidoras de Ciclinas

D-384: Línea celular de Astrocitoma Cerebral

DhL: Dehidroleucodina

DMSO: Dimetilsulfóxido

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain – Proteína con Dominio de muerte asociada a Fas

FasL: Fas ligando

FITC: Fluorescein isothiocyanate - Isocianato de Fluororceína

GBM: Glioblastoma Multiforme

GTPasas: Guanosina Tri Fosfatasa

IL: Interleucina

IP: Ioduro de Propidio

LS: Lactona Sesquiterpenica

MCP: Complejo Promotor de Mitosis

P21: Proteína p21

P53: Proteína p53

PBS: Buffer de Sales de Fosfato

PCD: Programer of Cell Death – Muerte Celular Programada

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen - Antígeno Nuclear de Células en Proliferación

PS: Phosphatidylserine - Fosfatidilserina

PVDF: Polifluoruro de Polivinilideno

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico

SFB: Suero Fetal Bovino

TNF: Tumor Necrosis Factor – Factor de Necrosis Tumoral

TRAIL: TNF-related, apoptosis-inducing ligand – Ligando inductor de Apoptosis relacionado con TNF.

VHB: Virus de Hepatitis B

VHC: Virus de Hepatitis C

VPH: Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El cáncer es la denominación a un grupo de enfermedades que forman neoplasias malignas, estas se pueden desarrollar en cualquier parte del cuerpo y se caracterizan por un crecimiento incontrolado de células y la diseminación a otros tejidos. Para que una célula se vuelva cancerígena debe sufrir ciertas modificaciones genéticas entre las que se encuentran la desregulación del ciclo celular y la resistencia a morir luego de sufrir daño en el material genético. El glioblastoma es uno de los tumores principales del sistema nervioso central, y uno de los más difíciles de tratar. Las plantas han jugado un papel importante en el descubrimiento de nuevos fármacos con propiedades antineoplásicas. La Dehidroleucodina (DhL) es una lactona sesquiterpénica aislada de *Gynoxys verrucosa* Wedd, la cual ha mostrado una actividad antineoplásica en varias líneas celulares. En el presente estudio se determinó que la DhL causa una muerte apoptótica en las células D-384 a partir de la concentración de 10 μ M a un tiempo de exposición de 16 horas y esta desencadenada por una detención en el ciclo celular modulada por p21.

PALABRAS CLAVES: Glioblastoma, Dehidroleucodina, Lactona sesquiterpénica, muerte celular, p21.

ABSTRACT

Cancer is the term for a group of diseases that are malignant neoplasms, these can develop anywhere in the body and are characterized by uncontrolled cell growth and spread to other tissues. For a cell to become cancerous must undergo certain genetic changes found between cell cycle deregulation and resistance to die after suffering damage to the genetic material. Glioblastoma is major central nervous system tumors, and one of the most difficult to treat. Plants have played an important role in the discovery of new drugs with antineoplastic properties. The Dehidroleucodina (LDH) is a sesquiterpene lactone isolated from *Gynoxys verrucosa* Wedd, which has shown antitumor activity in several cell lines. In this study it was determined that the DhL causes apoptotic death in the D-384 cells after 10 uM concentration to an exposure time of 16 hours and is triggered by an arrest in cell cycle modulated by p21.

KEYWORDS: Glioblastoma, Dehidroleucodina, sesquiterpene lactone, cell death, p21.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030 (Globocan 2008, 2008; IARC, 2010; OMS, 2013).

Otros tipos de cáncer que, si bien no son tan frecuentes en la población presentan mayor agresividad, como es el caso del cáncer cerebral, en el Ecuador se presenta con un 2,4% de incidencia y un 3,4% de mortalidad (Globocan 2008, 2008). El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más frecuente en el sistema nervioso central, y una de las malignidades más difíciles de tratar. Durante mucho tiempo se ha considerado que el tratamiento del glioblastoma multiforme (GBM) es de índole paliativo, sin esperanza de cura, convirtiéndose en una patología de significativa mortalidad (Lacroix *et al.*, 2001; Stewart, 2002). El tratamiento actual del glioblastoma multiforme es una combinación de diferentes modalidades de tratamiento, tales como la cirugía, quimioterapia y radiación (INC, 2013).

Se ha observado en la mayoría de las células cancerosas el aumento de expresión de las quinasas dependientes de ciclinas o CDK y ciclinas, proteínas claves para la progresión del ciclo celular. Especialmente, la pérdida de control del ciclo celular en la fase G1 se ha implicado en el desarrollo de tumores y la proliferación (Malumbres M *et al.*, 2008; Musgrove EA *et al.*, 2011). Por cuanto, la inducción de la detención del ciclo celular mediante fármacos quimiopreventivos podría ser un método eficaz para el tratamiento de la proliferación celular incontrolada y la supervivencia de las células tumorales finalizando de manera específica en muerte celular.

Así mismo se conoce que en muchos tipos de neoplasias malignas, las proteínas pro apoptóticas se han inactivado por mutaciones o las proteínas anti apoptóticas se sobre expresaron, lo que lleva al crecimiento sin control del tumor y la incapacidad para responder al estrés celular, las mutaciones perjudiciales y daños en el ADN. De hecho, la evasión de la muerte celular programada ha sido reconocida como una de las diez alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan el crecimiento maligno y es una característica de la mayoría, y quizá todos, los tipos de cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Por otra parte, los cánceres que poseen alteraciones en las proteínas

implicadas en la señalización de la muerte celular son más difíciles de tratar con el uso de agentes quimioterapéuticos que funcionan mediante la inducción de la apoptosis. Por lo tanto, los fármacos diseñados para restaurar la muerte celular programada pueden ser eficaces contra muchos cánceres (Nicolson, 2000).

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer y de hecho, la mayoría de las nuevas aplicaciones clínicas durante el último medio siglo de los metabolitos secundarios de plantas y sus derivados, han sido aplicados a la lucha contra el cáncer (Newman *et al.*, 2000, 2003; Butler, 2004).

Estudios de la relación estructura actividad sobre las lactonas sesquiterpénicas, mostraron que los efectos citotóxicos se deben a reacciones con grupos tioles, tales como los residuos de cisteína en las proteínas, por la adición rápida tipo Michael. Estas reacciones están mediadas químicamente por el α , β -carbonilo insaturado presente en las LS. Estos estudios apoyan la opinión de que las LS logran inhibir el crecimiento tumoral mediante alquilación selectiva de macromoléculas biológicas tales como enzimas reguladoras claves que controla la división celular, inhibiendo de este modo una variedad de funciones celulares, que dirigen a la célula en la apoptosis (Chaturvedi, 2011).

Una de las lactonas de interés es la molécula Dehidroleucodina (DhL) que en estudios recientes sobre el efecto anti proliferativo producido por la DhL en células D-384 , se reportó que a la concentración de 10 μ M produce un arresto del ciclo celular a un tiempo de exposición de 12 horas (Velásquez, 2013), Junto con este dato se conoce que el mecanismo por el cual las lactonas alteran la proliferación celular es variado, algunas afectan la progresión del ciclo celular y conducen a la apoptosis mediante el bloqueo de las células en la fase G2/M y otras producen un bloqueo de la célula en la fase G0/G1 (Revisado en Kreuger *et al.*, 2012).

Por todo lo citado anteriormente el objetivo principal de este estudio fue establecer el tipo de muerte celular que la molécula Dehidroleucodina induce en células de Astrocitoma cerebral D-384 a partir de la concentración de 10 μ M y si esta muerte es posterior a la detención del ciclo celular por la modulación de p21 en los cultivos tratados.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.

1.1. Cáncer

“Cáncer” es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades que forman tumores o neoplasias malignas, se pueden desarrollar en cualquier parte del cuerpo y se caracterizan por el crecimiento incontrolado de células anormales y su diseminación a otros tejidos por el sistema linfático, sistema sanguíneo o por propagación directa (OMS, 2013; ACS, 2013).

La transformación de una célula normal a una cancerosa es un proceso complejo que sigue diversos pasos o etapas. Las células del cáncer, y los tumores formados por ellas, deben adquirir un sistema específico de capacidades (Hanahan & Weinberg, 2011).

La evidencia acumulada durante los últimos 30 años demuestra que el cáncer es una enfermedad genética, con cambios presentes en oncogenes y/o genes supresores de tumores que conducen a la diferenciación anormal de células y la proliferación incontrolada. De hecho, la proliferación no programada, como resultado de la desregulación del ciclo celular, es una característica común de células de cáncer humano, que a su vez se asocia con la inestabilidad genómica y cromosómica (Cerveira, Bizarro, & Teixeira, 2012). Por lo tanto podemos destacar la importancia del papel que juega la regulación del ciclo celular en la proliferación y supervivencia de las células cancerosas.

El ciclo celular eucariótico está regulado por vías de transducción de señales mediada por una serie de reguladores del ciclo celular, incluyendo ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y los inhibidores de CDK (CDKIs). Moléculas de ciclina regulan la progresión de cada fase del ciclo celular mediante la asociación con las CDK específicas correspondientes a cada fase. La Ciclina D se activa mediante la asociación a CDK4 y CDK6, que ayudan a mantener la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Proteínas como la ciclina E y CDK2 juegan un papel importante en la transición de G1 a la fase S del ciclo celular (Massagué J, 2004). P21^{WAF1} y p27^{Kip1} pertenecen a la familia de los CDKIs, cuya expresión regula las CDK de la fase G1 (Lee B, *et al.*, 2006). El aumento de expresión de las CDK y ciclinas se ha observado en la mayoría de las células cancerosas. Especialmente, la pérdida de control del ciclo celular en G1 se ha implicado en el desarrollo de tumores y la proliferación (Malumbres M *et al.*, 2008; Musgrove EA *et al.*, 2011). Por cuanto, la inducción de la detención del ciclo celular mediante fármacos quimiopreventivos podría ser un método eficaz para el tratamiento de la proliferación

celular incontrolada y la supervivencia de las células tumorales finalizando de manera específica en muerte celular.

El inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 1^a o también conocido como CDKN1A, P21 o Cip 1 es un gen que codifica un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina potente. La proteína codificada se une e inhibe la actividad de los complejos de ciclina-CDK2 o -CDK4, y por lo tanto funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en G1 (NCBI, 2014). La expresión de este gen está estrechamente controlada por la proteína supresora de tumores p53, a través del cual esta proteína media la detención del ciclo celular en fase G1 dependiente de p53 en respuesta a una variedad de estímulos de estrés. Esta proteína puede interactuar con la proliferación de células antígeno nuclear (PCNA), un factor accesorio del ADN polimerasa, y desempeña un papel regulador en la replicación del ADN de la fase S y la reparación de daños producidos en el ADN. Esta proteína se informó que se escinde específicamente por las caspasas-CASP3 similares, que por lo tanto conduce a una activación dramática de CDK2, y puede ser instrumental en la ejecución de la apoptosis después de la activación de la caspasa (NCBI, 2014). Por tanto el estudio de ésta proteína p21 nos permitiría relacionar la detención del ciclo celular con la posterior inducción a una muerte celular programada.

El concepto de que la muerte celular programada por apoptosis actúa como una barrera natural para el desarrollo del cáncer ha sido establecido por estudios funcionales convincentes realizadas en las últimas dos décadas (Adams y Cory, 2007; Lowe *et al*, 2004; Evan y Littlewood, 1998). En muchos tipos de cáncer, las proteínas pro apoptóticas se han inactivado por mutaciones o las proteínas anti apoptóticas se sobre expresaron, lo que lleva al crecimiento sin control del tumor y la incapacidad para responder al estrés celular, las mutaciones perjudiciales y daños en el ADN. De hecho, la evasión de la muerte celular programada ha sido reconocida como una de las diez alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan el crecimiento maligno y es una característica de la mayoría, y quizá todos, los tipos de cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Por otra parte, los cánceres que poseen alteraciones en las proteínas implicadas en la señalización de la muerte celular son más difíciles de tratar con el uso de agentes quimioterapéuticos que funcionan mediante la inducción de la apoptosis. Por lo tanto, los fármacos diseñados para restaurar la muerte celular programada pueden ser eficaces contra muchos canceres (Nicolson, 2000). La destrucción selectiva de las células tumorales podría ser alcanzable con estos fármacos porque a diferencia de las células

normales, las células cancerosas se encuentran bajo estrés, destinadas a morir y son dependientes de las aberraciones en la apoptosis y de las vías de señalización para mantenerse con vida (Fesik, 2005).

1.2. Causas del Cáncer.

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos:

- ❖ Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes;
- ❖ Carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida); y,
- ❖ Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad (OMS, 2013).

1.3. Factores de Riesgo.

La investigación realizada por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos indica que ciertos factores de riesgo aumentan las probabilidades de que una persona padezca cáncer.

El factor de riesgo más importante de cáncer es el envejecimiento. La mayoría de los cánceres ocurren en las personas después de los 65 años de edad. Aunque personas de todas las edades, incluyendo los niños, pueden padecer cáncer también (INC, 2013). El consumo de tabaco y alcohol, la dieta malsana y la inactividad física son también considerados como principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo. Las

infecciones crónicas por Virus de Hepatitis B (VHB), Virus de Hepatitis C (VHC) y algunos tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH) son factores de riesgo destacados en los países de ingresos bajos y medianos. El cáncer cérvix uterino, causado por VPH, es una de las principales causas de defunción por cáncer en las mujeres de países de ingresos bajos (OMS, 2013; INC, 2013).

1.4. Incidencia.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030 (Globocan, 2008; IARC, 2010; OMS, 2013).

En el Ecuador para el año 2008 con una población de 13'481000 habitantes, se establecieron 20200 nuevos casos de cáncer y 13300 muertes. Encabezando cinco en la lista de los canceres más comunes para ambos sexos, el cáncer de estómago con el 15%, el cáncer de próstata con el 13,2%, el cáncer de mama de 9,3%, el cáncer cérvix uterino con el 8,3% y el cáncer colorectal con el 6,1% (Globocan, 2008).

En el cantón Loja, el número total de casos de cáncer para periodo 1997-2006 es de 3067, de ellos 1822 son mujeres (59,4%) y 1245 son varones (40,6%). Siendo el cáncer de cuello uterino (23%) como el más frecuente para mujeres y el cáncer gástrico (20,4%) para varones (Garrido & Yunga, 2010).

Otros tipos de cáncer que, si bien no son tan frecuentes en la población presentan mayor agresividad como es el caso del cáncer cerebral, en el Ecuador se presenta con un 2,4% de incidencia y un 3,4% de mortalidad (Globocan, 2008). En la ciudad de Loja el cáncer cerebral ocupa el octavo lugar de incidencia, siendo los más afectados los hombres que las mujeres, con una incidencia del 4,7 por cada 100.000 y 2,3 por cada 100.000 respectivamente. Como cáncer cerebral se han diagnosticado los gliomas con un porcentaje del 0,6% para mujeres y del 2,2% para hombres en el periodo 1997-2006 (Garrido & Yunga, 2010).

1.5. Tumor Cerebral.

Tumor cerebral es el crecimiento anormal de las células en los tejidos del cerebro. Los tumores cerebrales pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos) (INC, 2013). Los tumores cerebrales primarios son los que empiezan en el cerebro y tienden a permanecer en el cerebro, se producen en personas de todas las edades, pero son estadísticamente más frecuentes en niños y adultos mayores. Los tumores cerebrales metastásicos (malignos) son los que empiezan como un cáncer en el cuerpo y se extendió a partes del cerebro, estos son más comunes en adultos que en niños.

1.5.1. Gliomas

Glioma es un término general para cualquier tumor que surja en el tejido conjuntivo o “pegajoso” del cerebro. Este tejido, llamado glía, ayuda a mantener en su lugar y en buen funcionamiento a las neuronas (“células que piensan”). Hay tres tipos de tumores de células gliales normales de las que se pueden generar tumores:

- a) Un astrocito (célula en forma de estrella) generará astrocitomas, incluyendo a los glioblastomas,
- b) Un oligodendrocito (célula con brazos cortos que forma el aislamiento de las neuronas) generará oligodendrogliomas; y,
- c) Las células endimarias (es decir, las células que conforman el recubrimiento de las cavidades de fluido en el cerebro) que generarán endimomas.

“Astrocitoma de grado IV”, “glioblastoma” y “GBM” son nombres diferentes del mismo tumor. Este tumor representa cerca del 17% de todos los tumores cerebrales primarios y entre el 60 y el 75% de todos los astrocitomas. Su frecuencia aumenta con la edad y afecta a más hombres que a mujeres. Únicamente el 3% de los tumores cerebrales infantiles son glioblastomas. Los glioblastomas generalmente se encuentran en los hemisferios cerebrales, pero se pueden encontrar en cualquier parte del cerebro o la médula espinal (ABTA, 2012).

Astrocitoma maligno es la neoplasia primaria más común del sistema nervioso central (DeAngelis, 2001; Behn *et al*, 2003; Gupta & Sarin, 2002). A pesar de las mejoras en el tratamiento, la mayoría de los pacientes mueren de esta enfermedad. La supervivencia

media es de aproximadamente 3 años para los pacientes con astrocitoma anaplásico (AA) y de 1 año para aquellos con glioblastoma multiforme (GBM) (DeAngelis, 2001; Behn *et al*, 2003; Gupta & Sarin, 2002; Stewart, 2002; Curran *et al*, 1993; Scott *et al*, 1998; Marjinen, 2005).

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más frecuente en el sistema nervioso central, y una de las malignidades más difíciles de tratar. Durante mucho tiempo se ha considerado que el tratamiento del glioblastoma multiforme (GBM) es de índole paliativo, sin esperanza de cura, convirtiéndose en una patología de significativa mortalidad (Lacroix *et al*, 2001; Stewart, 2002). El tratamiento actual del glioblastoma multiforme es una combinación de diferentes modalidades de tratamiento, tales como la cirugía, quimioterapia y radiación (INC, 2013).

La falta de células exactamente iguales de punta a punta del tumor hace que los glioblastomas sean uno de los tumores cerebrales más difíciles de tratar. Mientras un tipo de célula podría responder al tratamiento, los demás tipos podrían ser resistentes (ABTA, 2012). Una lista finita de agentes farmacológicos han sido reportados como potenciales agentes terapéuticos contra el Astrocitoma anaplásico (AA) y GBM (Gilbert & Loghin, 2005), la tasa de curación es todavía muy baja, lo que demuestra la gran necesidad de identificar agentes antitumorales más eficaces contra estas neoplasias.

1.6. Tratamiento.

Hasta el momento, el manejo del cáncer es un proceso fundamentalmente multidisciplinario. Los tratamientos utilizados se describen a continuación:

1.6.1. Cirugía.

Es el tratamiento más antiguo de todos y contra el cual se comparan las otras formas terapéuticas. El objetivo esencial es retirar el tumor o la mayor cantidad de tejido canceroso como sea posible, procurando alterar lo menos posible la funcionalidad y estética. Muy a menudo se la utiliza conjuntamente con quimioterapia y radioterapia (Garrido & Yunga, 2010).

1.6.2. Radioterapia.

La radioterapia es una parte integral en el manejo de tumores malignos sea como único tratamiento o como parte del tratamiento combinado con cirugía, quimioterapia o ambas. Esta se basa en la utilización de ciertos tipos de energía para reducir tumores o eliminar las células malignas. Su mecanismo de acción es a través de daño al ADN celular imposibilitando su reproducción (Garrido & Yunga, 2010).

1.6.3. Quimioterapia.

La quimioterapia ejerce su función a nivel sistémico, comúnmente más se utiliza como adyuvante luego de la resección del tumor primario o neoadyuvante cuando se aplica antes de la terapéutica local. Para el uso se prefiere agentes quimioterapéuticos con diversos mecanismos de acción para atacar de forma múltiple a las células neoplásicas. Los factores limitantes a su uso son la toxicidad sobre los tejidos sanos y la aparición de resistencia a estos medicamentos.

En la actualidad se están investigando y utilizando factores relacionados con la angiogénesis o medicamentos dirigidos contra blancos moleculares específicos. Se cuenta ya con anticuerpos monoclonales e inhibidores de proteosomas (Garrido & Yunga, 2010).

1.7. Antineoplásicos de Origen Natural.

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer y de hecho, la mayoría de las aplicaciones clínicas durante el último medio siglo de los metabolitos secundarios de las plantas y sus derivados, han sido aplicados a la lucha contra el cáncer (Newman *et al.*, 2000, 2003; Butler, 2004).

Los agentes naturales derivados principalmente de las plantas, tiene una larga historia en cuanto al uso para el tratamiento del cáncer, entre algunos de los antineoplásicos más conocidos se encuentran el paclitaxel, la campotencina, los conocidos como alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina), así como también el etopósido y tenipósido (Akao *et al.*, 2008; Crag & Newman, 2013).

La meta para la búsqueda de nuevos medicamentos contra el cáncer es encontrar fármacos que actúen a través de un modo de acción específico. De esta manera, se espera que el efecto ocasionado a las células cancerosas produzca poco o ningún daño a las células no cancerosas. Los productos naturales están perfectamente adaptados a la aproximación molecular actual de desarrollo de fármacos, ya que producen pocos efectos adversos secundarios al tratamiento (Saikali, *et al.*, 2012).

1.7.1. Metabolitos secundarios de Plantas.

Las plantas producen una amplia y diversa variedad de compuestos orgánicos, la gran mayoría de los cuales no parecen participar directamente en el crecimiento y el desarrollo. Estas sustancias, a las que tradicionalmente se hace referencia como metabolitos secundarios, a menudo se distribuyen diferencialmente entre los grupos taxonómicos limitados dentro del reino vegetal. Sus funciones, muchas de las cuales siguen siendo desconocidos, están siendo dilucidadas con creciente frecuencia (Croteau, Kutchan, & Lewis, 2000).

1.7.1.1. Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas (LS) son un grupo grande y diverso de productos naturales presentes en más de 100 familias de plantas con flores. Entre ellos, el mayor número de LS se encuentra distribuidos en la familia de las *Compositae* (Asteraceae), con más de 3,000 estructuras reportadas (Kreuger *et al.*, 2012). La mayoría de las LS se han aislado de las partes aéreas como hojas o flores de las plantas donde pueden constituir hasta el 5% del peso seco (Merfort, 2002).

Las LS a menudo son incoloras y de sabor amargo, están compuestas de 15 carbonos, con un éster cíclico o lactona (Ghantous, *et al.*, 2010). En relación carbono-cíclico se pueden clasificar en cuatro grupos: germacranoides, eudesmanolides, guaianolides y pseudoguaianolides (Chaturvedi, 2011; Saikali *et al.*, 2012).

Las LS son de gran interés debido a que muchas de ellas poseen una amplia actividad biológica y propiedades farmacológicas, entre los que destacan efectos citotóxicos, antiinflamatorio, antiviral, antibacterianos, antifúngico, así como efectos sobre los sistemas nervioso central y cardiovascular y una potencia alérgica (Zhang *et al.*, 2005; Chaturvedi, 2011).

Por todas estas características y funcionalidades antes mencionadas de las lactonas sesquiterpénicas es importante investigar la actividad que pueden presentar, ya que serían de gran utilidad en la creación de nuevos fármacos con propiedades antineoplásicas.

1.7.1.1.1. Dehidroleucodina

La Dehidroleucodina (DhL) es una lactona sesquiterpénica (LS) obtenida de las partes aéreas de *Gynoxys verrucosa* Weed, un arbusto perteneciente a la familia *Asteraceae*, nativa del sur de Loja y Zamora, la cual es comúnmente conocida como guangalo o congona suele ser utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones de la piel y la cicatrización de heridas por la aplicación tópica, así como para el tratamiento de verrugas (Tene *et al.*, 2007; Ordóñez *et al.*, 2011).

Se conoce que la dehidroleucodina tiene un efecto anti-inflamatorio, antimicrobiano en la especie *Staphylococcus spp.* (Ordóñez *et al.*, 2011), un efecto inhibidor del crecimiento en la línea celular tumoral humana D-384 (Astrocitoma Cerebral) determinado mediante el ensayo de cristal violeta, en el que además se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}), la cual es mucho menor a la de algunos medicamentos utilizados actualmente en la quimioterapia del cáncer (Ojeda, 2012), así como un efecto anti proliferativo, anti inflamatorio y una buena actividad como protector gástrico (Penissi *et al.*, 2006; Costantino *et al.*, 2013).

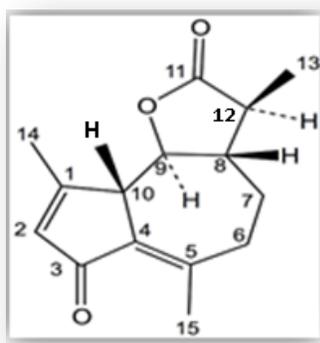


Figura 1. Molécula Dehidroleucodina

Fuente: Tomado de Velásquez, 2013.

En estudios recientes sobre el efecto anti proliferativo producido por la DhL en células D-384, se reportó que a la concentración de 10 μM a un tiempo de 12 horas se provoca un arresto del ciclo celular (Velásquez, 2013), Junto con este dato se conoce que el mecanismo por el cual las lactonas sesquiterpénicas alteran la proliferación celular es variado, algunas afectan la progresión del ciclo celular y conducen a la apoptosis mediante el bloqueo de las células en la fase G2/M y otras producen un bloqueo de la célula en la fase G0/G1 (Revisado en Kreuger *et al.*, 2012). Por lo tanto es importante establecer el tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina para establecer si conduce a una muerte apoptótica o conduce a otro tipo de muerte.

1.8. Tipos de Muerte Celular.

La homeostasis se mantiene en los organismos multicelulares por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Se han descrito varios tipos de muerte celular (Krysko *et al.*, 2008) y entre ellas están:

1.8.1. Apoptosis

Apoptosis es la forma más común y bien definida como Muerte Celular Programada (PCD, *por sus siglas en inglés*), un proceso fisiológico de “suicidio celular” que es esencial para el desarrollo embrionario, la función normal del sistema inmunitario y el mantenimiento de la homeostasis de tejidos en organismos multicelulares (Kerr *et al.*, 1972; Ellis *et al.*, 1991; Jacobson *et al.*, 1997). La desregulación de la apoptosis se ha implicado en numerosas condiciones patológicas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias y el cáncer (Okada & Mak, 2004).

Este tipo de muerte celular está caracterizado principalmente por la contracción celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación de la célula; esto da como resultado la formación de cuerpos apoptóticos que luego son absorbidos por las células fagocíticas (Cotter, 2009). Otra característica de la apoptosis es el movimiento de la fosfatidilserina (PS) lipídica del interior al exterior de la membrana plasmática, donde funciona entonces como una señal para el reconocimiento llevado a cabo por las células fagocíticas (Cotter, 2009).

Hay dos grandes vías de señalización de la apoptosis, es decir, la vía del receptor de muerte o extrínseca y la vía mitocondrial o intrínseca (Hengartner, 2000). Bajo la

mayoría de circunstancias, la activación de cualquiera de las rutas finalmente conduce a la escisión proteolítica y por lo tanto la activación de las caspasas, una familia de cisteína proteasas que actúan como moléculas efectoras comunes de la muerte celular (Degterev *et al.*, 2003).

La ruta de apoptosis o Muerte Celular Programada (MCP) es llevada a cabo en cuatro etapas:

- **El inicio**, donde los estímulos y señales de muerte desencadenan sus efectos sobre las células que han sufrido daño. Varios agentes pro apoptóticos, tanto en condiciones fisiológicas y patológicas que estimulan los receptores de muerte celular o que inician y promueven el daño del ADN pueden desencadenar la apoptosis (Guamán, 2012).
- **La decisión**, en donde tanto la apoptosis y la maquinaria de reparación se activan y dependiendo de la severidad del daño, las células todavía puede decidir si morir o no, es decir la muerte aún es reversible (Guamán, 2012).

Después de la iniciación, las células activan su maquinaria de reparación y proteínas pro apoptóticas con el fin de decidir si vivir o morir. Un ejemplo bien conocido es p53, el “ángel” guardián del genoma humano (Shloush *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2011). Este factor de transcripción es la principal proteína supresora de tumores; p53 se activa en respuesta al daño del ADN y varias señales de estrés, los que indican detención del ciclo celular, senescencia o apoptosis (Aramayo *et al.*, 2011), a través de la expresión y la sobre expresión de proteínas pro apoptóticas tales como CIP (CDK Inhibidor de Proteínas), una familia de proteínas que inhiben CDK (quinasas dependiente de ciclina) incluyendo a p21, que permite la detención del ciclo celular en la fase G1 e inhibir el crecimiento de las células, para reparar el daño o causar la muerte (Chipuk & Green, 2006; Guan *et al.*, 2011; Shiheido *et al.*, 2011).

La vía extrínseca en el inicio de la muerte, esta mediada por receptores de muerte que se unen a ligandos específicos, que pueden ser TNF (Tumor necrosis factor), TRAIL (TNF-related, apoptosis-inducing ligand) y FasL (Fas ligand) (Blankenberg, 2008). La asociación de los ligandos con los receptores de muerte en el citoplasma reclutan a moléculas como FADD (Fas-associated death domain) o TRADD (tumor-associated death domain), que actúan como proteínas adaptadoras intracelulares, activando caspasas iniciadoras 8 y 10 que a su vez

activarán a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 (Kabore *et. Al.*, 2004; Ashkenazi, 2008).

La vía intrínseca o vía mitocondrial es iniciada por la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria hacia el citosol de la célula (Blankenberg, 2008); esta ruta se encuentra controlada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Ashkenazi, 2008; Amelio *et al.*, 2007). El citocromo *c* interactúa con Apaf-1 (apoptosis-activating factor 1), con el ATP (adenosine triphosphate) y con la pro-caspasa 9 para dar lugar a la formación de una estructura conocida como apoptosoma (Blankenberg, 2008). El apoptosoma mediante clivación activa a la caspasa 3, que es la principal caspasa ejecutora responsable de la activación de apoptosis (Kabore *et. Al.*, 2004).

- **La ejecución**, en este paso se activan todos los mecanismos proteolíticos. Por lo tanto, la muerte celular es irreversible.

Tanto las vías extrínseca e intrínseca dan como resultado la activación de la caspasa 3, que promueve varios cambios morfológicos en el proceso de apoptosis, donde las células no pueden escapar de la muerte. En esta etapa, la caspasa 3 y otras enzimas proteolíticas desencadenan una serie de eventos de degradación en las principales proteínas que mantienen la integridad y la funcionalidad de las células (Blankenberg, 2008).

- **La recolección**, como último paso, los cuerpos apoptóticos de las células muertas son fagocitadas por los macrófagos o células adyacentes (Jordan & Harrison, 2003). Las pequeñas vesículas resultantes, denominados cuerpo apoptóticos son reconocidos por los fagocitos gracias a receptores expresados en su superficie. Uno de estos receptores es fosfatidilserina (PS), un fosfolípido sintetizado en el retículo endoplásmico y transportado exclusivamente a la cara externa de la membrana citoplasmática (Blankenberg, 2008; Chen *et al.*, 2010).

1.8.2. Necrosis

La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por una ganancia en el volumen celular, hinchazón de los orgánulos, ruptura de la membrana plasmática y la consiguiente pérdida de contenido intracelular. Durante mucho tiempo, la necrosis ha sido considerada como una simple forma incontrolada accidental de la muerte celular, pero se están acumulando evidencias de que la ejecución de la muerte celular necrótica

puede ser finamente regulado por un conjunto de vías de transducción de señal y mecanismos catabólicos (Golstein & Kroemer, 2007; Festjens *et al.*, 2006). Por ejemplo, los receptores de dominio de muerte (TNFR1, Fas/CD95 y TRAIL-R) y los receptores de tipo Toll (TLR3 y TLR4) se muestran al inducirse la necrosis, en particular en presencia de inhibidores de caspasas (Kroemer *et al.*, 2009).

1.8.3. Senescencia.

La senescencia ocurre cuando las células desaceleran su crecimiento celular y entran en una forma de arresto permanente del ciclo celular replicativo. Una célula senescente típicamente muestra cambios morfológicos, tales como un citoplasma aplanado y aumento de la granularidad. A nivel bioquímico, la senescencia se acompaña de cambios en el metabolismo y la inducción de la actividad β -galactosidasa (Dimri *et al.*, 1995). A nivel genético, se observan alteraciones en la estructura de la cromatina y en los patrones de expresión de los genes (Narita *et al.*, 2003). Este tipo de muerte se relaciona con el envejecimiento, debido al acortamiento de los telómeros en cada fase S del ciclo de replicación que llevan a cabo las células y por otro lado esto ocurre gracias a diversos daños ocasionados en el ADN que detienen por completo el ciclo de vida celular (Dey, *et al.* 2008; Jordan & Harrison, 2003). Las técnicas para determinar este tipo de muerte pueden ser a través de ensayos de inhibición de la proliferación celular (Okada & Mak, 2004).

1.8.4. Catástrofe Mitótica.

Catástrofe mitótica es un tipo de muerte celular que se produce, ya sea durante o poco después de una mitosis no regulada o fallida y puede ser acompañado por alteraciones morfológicas incluyendo micronucleación (que a menudo resulta de cromosomas y/o fragmentos de cromosomas que no han sido distribuidos de manera uniforme entre los núcleos hijos) y multinucleación (la presencia de dos o más núcleos con tamaños similares o heterogéneos, que se derivan de una separación deficiente durante la citocinesis). Sin embargo, no existe un amplio consenso sobre el uso de este término (Roninson *et al.*, 2001; Castedo *et al.*, 2004; Okada & Mak, 2004). La catástrofe mitótica puede concluir tanto en una morfología apoptótica como en una morfología necrótica (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008).

1.8.5. Oncosis.

Oncosis, deriva de la palabra griega “hinchazón”, es una forma de muerte celular que inicialmente se caracteriza por un incremento del tamaño tanto de las organelas como de la célula misma, presencia de permeabilidad y pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática. Producidas por un agotamiento de la reserva energética y fallas de las bombas iónicas en la membrana citoplasmática que incrementan la concentración de Ca^{2+} dentro de la célula. Agentes nocivos pueden activar procesos en donde se requiere gran cantidad de ATP, de esta manera la reserva energética se consume inactivando otros procesos dependientes de ATP que son indispensables para la célula. En cambio, los altos niveles de Ca^{2+} intracelular pueden resultar en la activación de proteínas pertenecientes a la familia de la calpaína; las cuales al igual que las caspasas poseen actividad proteolítica; especialmente a nivel de las proteínas que mantienen la integridad de la membrana citoplasmática. Como resultado, la célula revienta, liberando sus componentes intracelulares al igual que necrosis (Fink y Cookson, 2005).

1.8.6. Piroptosis.

La piroptosis es un tipo de muerte producida característicamente por infecciones de las especies *Salmonella* y *Shigella* a través de un proceso pro-inflamatorio dependiente únicamente de caspasa 1. Esta caspasa al igual que la caspasa 3, procesa una serie de sustratos tales como la Interleucina-1 β (IL-1 β) y la Interleucina (IL-18), que a diferencia de la apoptosis expresan respuestas inflamatorias. El método por el cual se puede evaluar este tipo de muerte es a través de la determinación de la activación de la caspasa 1 (Raupach, et al. 2006; Fink y Cookson, 2005).

1.8.7. Autofagia

Autofagia deriva del griego comer (fagia) uno mismo (auto), o sea auto digestión. Este es un proceso altamente conservado en la evolución, ocurre virtualmente en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos, como parte de su desarrollo normal (Mizushima & Levine, 2010). “Muerte celular autofágica” se define morfológicamente como un tipo de muerte celular que se produce en ausencia de condensación de la cromatina, pero está acompañado por vacuolización autofágica masiva del citoplasma. En contraste con las células apoptóticas, las células que mueren

con una morfología autofágica tienen poca o ninguna asociación con los fagocitos (Baehrecke, 2005; Clarke, 1990).

En la autofagia ocurre una secuencia de cambios morfológicos en un proceso altamente regulado (Fink y Cookson, 2005). La vía autofágica comienza con el secuestro de material citoplasmático formando vesículas de doble membrana conocidos como los autofagosomas (Kromer et. Al., 2005), este proceso está bajo el control de las GTPasas y quinasas de fosfatidilinositol; los autofagosomas se fusionan con los lisosomas, formando los autofagolisosomas, en un proceso en función de los microtúbulos para su degradación (Okada y Mak, 2004; Fink y Cookson, 2005). In vivo, las células sometidas a la autofagia pueden ser fagocitadas por las células vecinas (Kroemer et. Al., 2005).

1.9. Biomarcadores.

Los marcadores biológicos o biomarcadores son 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 (Garte & Bonassi, 2005). Existe una serie de marcadores biológicos que se utilizan en el ámbito de la investigación, para este caso en que el objetivo de estudio es determinar el tipo de muerte celular, nos enfocaremos en los marcadores útiles para este estudio y los utilizados en este proyecto.

1.9.1. Biomarcadores Apoptóticos.

Pozarowski *et al.* (2003) han señalado que determinar el método adecuado para medir niveles de apoptosis en cultivo depende principalmente del tipo de célula, las características posibles de inducción, las restricciones técnicas, el presupuesto, entre otras condiciones. Sin embargo, Elmore (2007) ha clasificado los métodos de detección de apoptosis en:

1. Alteraciones citomorfológicas;
2. Fragmentación de ADN;
3. Detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores;
4. Alteraciones de membrana; y
5. Ensayos mitocondriales.

En la categoría de alteraciones de la membrana se reporta uno de los ensayos más importantes, el de Anexina V conjugada con una variedad de fluorocromos, para la

detección de células apoptóticas. La anexina V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática, y es un marcador efectivo en células apoptóticas (Bratton *et al.*, 1997; Arur *et al.*, 2003; Pozarowski *et al.*, 2003; Vermes *et al.*, 1995; Elmore, 2007). La anexina V puede ser combinada con un marcador de ADN que no sea permeable a la membrana a menos que esta se vea comprometida, con el fin de distinguir células apoptóticas de necróticas.

Se ha evidenciado que la combinación de anexina V-FITC y el marcador catiónico yoduro de Propidio (IP) puede garantizar esta diferenciación, registrando células no apoptóticas (anexina V-FITC negativo/ IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FITC positivo/ IP negativo) y células necróticas (anexina V-FITC positivo/ IP positivo) (Pozarowski *et al.*, 2003; Zhivotovsky & Orrenius, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Gasser *et al.*, 2009). Las muestras son analizadas mediante Citometría de flujo brindando una cuantificación objetiva y rápida (Salazar, 2009)

1.9.2. Determinación del Tipo de Muerte Celular por Citometría de Flujo

Un citómetro de flujo es un instrumento que “ilumina” las células a medida que pasan individualmente delante de una fuente de luz, posteriormente detecta y correlaciona las señales obtenidas de la iluminación celular.

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} que tiene una alta afinidad para la fosfatidilserina (PS) y se une a las células con PS expuesta en ellas, por esta característica en particular puede ser utilizada para detectar células en apoptosis. La tinción con anexina V precede a la pérdida de integridad de la membrana, que acompaña a las últimas etapas de la muerte celular resultante de cualquiera de los procesos apoptóticos o necróticos. Junto con el biomarcador anexina V se utiliza el yoduro de propidio (IP), que posee gran afinidad para intercalarse en el ADN, este marcador permite distinguir principalmente si las células están en apoptosis o necrosis.

1.9.3. Ensayo Western Blot.

La técnica del Western Blot (también llamado “inmunoblotting” debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés) fue descrita por primera vez por Towbin *et al.*, en 1979 y en la actualidad es una técnica de rutina en

todos los laboratorios que realizan análisis de proteínas. La especificidad de la unión antígeno – anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas. En la actualidad se utiliza como criterio de identificación positivo de una proteína específica en una mezcla compleja y para obtener datos cualitativos y semicuantitativos sobre la misma.

El primer paso de todo Western Blot es la separación de las macromoléculas mediante geles de electroforesis; después de la misma, las macromoléculas ya separadas en función de su diferente peso molecular se transfieren a una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o Polifluoruro de vinilideno (PVDF). Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. En el siguiente paso, se une a dicha proteína transferida un anticuerpo específico marcado con una enzima y, finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana. En la actualidad, los métodos más sensibles emplean sustratos quimioluminiscentes que cuando se combinan con la enzima correspondiente, producen luz como producto final, que puede detectarse mediante una película o una cámara. En todos los casos y sea cual sea el sustrato que se utilice, la intensidad de la señal se correlaciona con la cantidad del antígeno en la superficie de la membrana.

CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO.

2.1. Objetivo general del proyecto.

Determinar el tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina en células de Astrocitoma cerebral (D-384).

2.2. Objetivos específicos del proyecto.

- Determinar mediante Citometría de flujo el tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina a través del biomarcador Anexina V e ioduro de Propidio.
- Determinar el porcentaje de células en apoptosis y necrosis, luego de ser tratadas con la Dehidroleucodina.
- Determinar por medio de la técnica western blot la expresión de la proteína p21 en respuesta al tratamiento con la molécula en estudio.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.

3.1. Molécula de estudio.

Se empleó como molécula de estudio a Dehidroleucodina (DhL) que fue aislada y donada por el Ph.D. Omar Malagón de la Sección Departamental de Química Básica y Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja. La concentración madre (1000 μ M) de Dehidroleucodina se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenó a 8 °C, las concentraciones de trabajo se realizaron al momento de utilizarlas en los ensayos.

3.2. Cultivo celular

Como material biológico se utilizó la línea celular humana Astrocitoma Cerebral (D-384) la cual fue cultivada en medio de cultivo RPMI (GIBCO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2 mM) (GIBCO), y 1% Antibiótico-Antimicótico (100 U/ml de Penicilina G, 100 μ g/ml de Estreptomina y 25 μ g/ml de Amphotericina B) (GIBCO). El cultivo celular fue mantenido a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, el tiempo de replicación de las células es de 16 horas, tiempo que se tomó en cuenta para los ensayos.



Figura 2. Células de Astrocitoma Cerebral (D-384). Cultivo de células mantenido a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Visualizadas el microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Magnificación 40X.
Fuente: Autor.

3.3. Siembra

Para los ensayos se partió de un cultivo celular con una confluencia del 80%, se sembró 1,8x10⁵ células por pocillo en una caja multipocillos de 6, en medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-

glutamina (2 mM) (GIBCO), y 1% Antibiótico- Antimicótico (100 U/ml de Penicilina G, 100 µg/ml de Estreptomicina y 25 µg/ml de Amphotericina B) (GIBCO), se mantuvo a las mismas condiciones de incubación durante 16 horas.

3.4. Determinación de viabilidad celular.

Luego de las 16 horas de cultivo, se aplicó tratamiento con Dehidroleucodina en concentraciones de 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 µM y como control positivo doxorubicina (2 µM), se dejó incubar por 16 y 32 horas, pasado este tiempo se despegaron las células, seguido a ello se procedió a determinar la viabilidad celular por inclusión de azul tripán, realizando una disolución 1:4 (1 suspensión celular: 4 azul tripán), de la cual se contó el número celular con ayuda del hemocitómetro.

3.5. Determinación del tipo de muerte

Al cultivo celular del multipocillo de 6 se le aplicó tratamiento con DhL en concentraciones de 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 µM y como control positivo se usó Doxorubicina (2 µM), se dejó incubar por 16 horas, pasado este tiempo se despegaron las células usando tripsina (0,25%), se le adicionó medio suplementado con SFB (10%) para inactivar la acción de la tripsina, las muestras fueron recolectadas en tubos de 15 mL y centrifugadas a 3500 rpm. a 4 °C, al sedimento celular obtenido se lo pasó a tubos de 1,5 mL y se le realizó 2 lavados con 1 mL de PBS no estéril, posterior a esto se resuspendió el sedimento celular en 500 µL de Buffer vinculante 1X (BD Biosciences), de ésta solución se transfirió 100 µL a tubos de citómetro de 5 mL, seguido a esto protegido de la luz se agregó 5 µL de Annexina V-FITC y 5 µL de IP, se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (25°C). Para la lectura al citómetro, a las muestras se le agregó 400 µL de Buffer vinculante 1X (BD Biosciences), se homogenizó y se procedió al análisis. Este ensayo se realizó analizó 2 veces por duplicado cada uno.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo [®]BD FACSCanto II a las siguientes condiciones y parámetros (Excitación= 488 nm; Emisión = 530 nm), usando un detector de señal FITC e Ioduro de Propidio con la señal de detección de Ficoeritrocina. De acuerdo al gráfico representado en la Figura 3, el marcaje con Ioduro de Propidio permite la diferenciación de las células viables, en donde el cuadrante 3 es un indicativo de Annexina V -/IP-, el cuadrante 4 a las células apoptóticas tempranas e indica un Annexina V+/IP-, las células apoptóticas tardías en el cuadrante 2 y corresponde a Annexina V+/IP+ y el cuadrante 1 que corresponde a muerte celular por necrosis, donde Annexina V-/IP+.

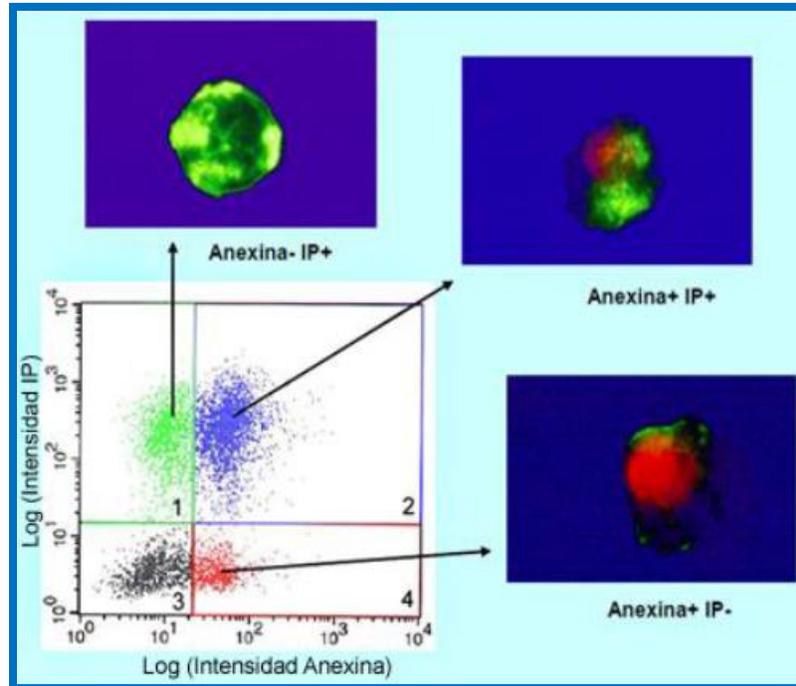


Figura 3. Representación Gráfica del análisis de muerte en Citometría de Flujo.
Fuente: González, 2011

3.6. Extracción y cuantificación de proteínas

Para este ensayo se partió de un cultivo celular con una confluencia del 80%, se sembró 1×10^6 células en cajas petri de 6 cm, dos cajas por concentración, en medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2 mM) (GIBCO), y 1% Antibiótico- Antimicótico (100 U/ml de Penicilina G, 100 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomicina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de Amphotericina B) (GIBCO), se mantuvo a las mismas condiciones de incubación durante 16 horas. Pasado este tiempo se aplicó tratamiento con la DhL a las concentraciones de 12.5, 15 y 17.5 μM y como control positivo se usó Doxorubicina (2 μM), se dejó incubar por 16 horas, pasado este tiempo se despegaron las células usando tripsina (0,25%), se le adicionó medio suplementado con SFB (10%) para inactivar la acción de la tripsina, las muestras fueron recolectadas en tubos de 15 mL y se contaron las células en el hemocitómetro, a los tubos se los centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, al sedimento celular obtenido se lo pasó a tubos de 1,5 mL y se le realizó un lavado con 1 mL de PBS no estéril. Al sedimento antes obtenido se le adicionó Buffer Coip completo (H_2O , Tris/HCl 1M pH 7.6, EDTA 0.5M pH 8, NaCl 5M, Igpal 0.5%, Inhibidor de proteasas 1 mM, Inhibidor de fosfatasa 100 μM), 106.25 μL por

cada 2.5×10^6 células, homogenizando suavemente sin formar burbujas, se dejó por 30 minutos en hielo, transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 8000 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se pasó a tubos de 1,5 mL y se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

La cuantificación de las proteínas antes extraídas se realizó por el método de Bradford, mediante la comparación de una curva estándar con Albúmina Sérica Bovina (BSA). La BSA fue utilizada en 1, 1.5, 2, 3 y 4 mg, al igual que las muestras de las proteínas y se leyó a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro. Después se determinó la concentración proteica interpolando el valor de las muestras en la curva estándar de BSA.

3.7. Western Blot.

Para este ensayo se utilizó una concentración proteica de 20 µg, las cuales fueron separadas por el método SDS-PAGE (SDS-Poliacrilamide gel electrophoresis), el porcentaje del gel fue de 12% y el gel concentrador de 5%, se dejó correr las muestras en el gel por 30 minutos a 60 voltios, luego se subió el voltaje a 80 y se dejó por aproximadamente 2 horas y 30 minutos.

Una vez transcurrida la electroforesis, se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, formando el "sándwich" típico de la transferencia en dirección del ánodo hacia el cátodo. La transferencia húmeda se llevó a cabo en el sistema Mini-Trans Blot Cell System (Bio-Rad) durante 3 horas a 100 voltios a 4°C. Al término de la transferencia, se colocó la membrana en rojo Ponceau (Sigma Aldrich), para verificar la correcta transferencia de las proteínas.

Seguido se bloqueó la membrana con TBS-Tween al 5% de leche semidescremada (Svelty NESTLÉ) durante 1 hora, luego se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween por 5 minutos cada uno y posterior a esto se incubó con el anticuerpo primario (anti-p21, anti-tubulina) (BD, Bioesciense) durante 24 horas a 4°C protegido de la luz. Una vez incubadas las membranas se realizó tres lavados con TBS-Tween por 5 minutos, seguido se dejó incubar las membranas con el anticuerpo secundario (APC-H7 Mouse anti-Human CD8) (BD Pharmingen) por una hora a temperatura ambiente protegido de la luz, se lavó tres veces las membranas con TBS-Tween por 5 minutos cada una y se procedió al revelado con el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). La señal emitida por las membranas fue capturada en una película de revelado.

3.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos fueron analizados con ANOVA post-test de Dunnett para analizar la diferencia significativa entre el control y los grupos expuestos a tratamiento utilizando GraphPad Prisma® 5.0. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Viabilidad celular.

Lo primero que se determinó en este trabajo fue la viabilidad celular mediante la inclusión de azul tripán. En la figura 4A se puede observar el efecto de la DhL sobre la viabilidad de la línea celular tumoral D-384 después de 16 horas de exposición (1 ciclo de replicación). La prueba bilateral de Dunnet aplicada con los datos obtenidos, nos muestra que existen diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad del control negativo con respecto a los obtenidos para cada una de las concentraciones utilizadas (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM). En estudios previos con la DhL sobre la línea D-384, se estableció que en la concentración de 10 μM se observa un efecto citostático (Velásquez, 2013), razón por la cual las concentraciones utilizadas en nuestros ensayos fueron superiores a 10 μM hasta la concentración de 20 μM , con la finalidad establecer el efecto citotóxico de la molécula DhL en nuestros cultivos. Obtuvimos porcentajes de viabilidad $\leq 50\%$, lo que nos indica que efectivamente a estas concentraciones y a un ciclo de replicación las células están sufriendo un efecto citotóxico, pero que también para la concentración de 20 μM aún nos permite tener una viabilidad del 27% (Figura 4A).

En la figura 4B se pueden apreciar los cambios morfológicos de las células D-384 al ser tratadas durante 16 horas a diferentes concentraciones de DhL (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM). En nuestro control negativo se observa la morfología características de esta línea celular, con una confluencia de un 70%, notándose un gran cambio en cuanto a las células expuestas a tratamiento con DhL, las células a partir de la concentración 10 μM se tornan redondas, algunas flotan en el medio y existe una notable disminución de la población celular, observándose para la concentración de 20 μM los cambios más drásticos, se observa que ya toda la población ha perdido su morfología y sólo algunas de ellas presentan una morfología redonda; con estos cambios en la morfología es evidente que las células a estas concentraciones ingresan en un proceso de muerte celular estrechamente relacionado con morfología apoptótica.

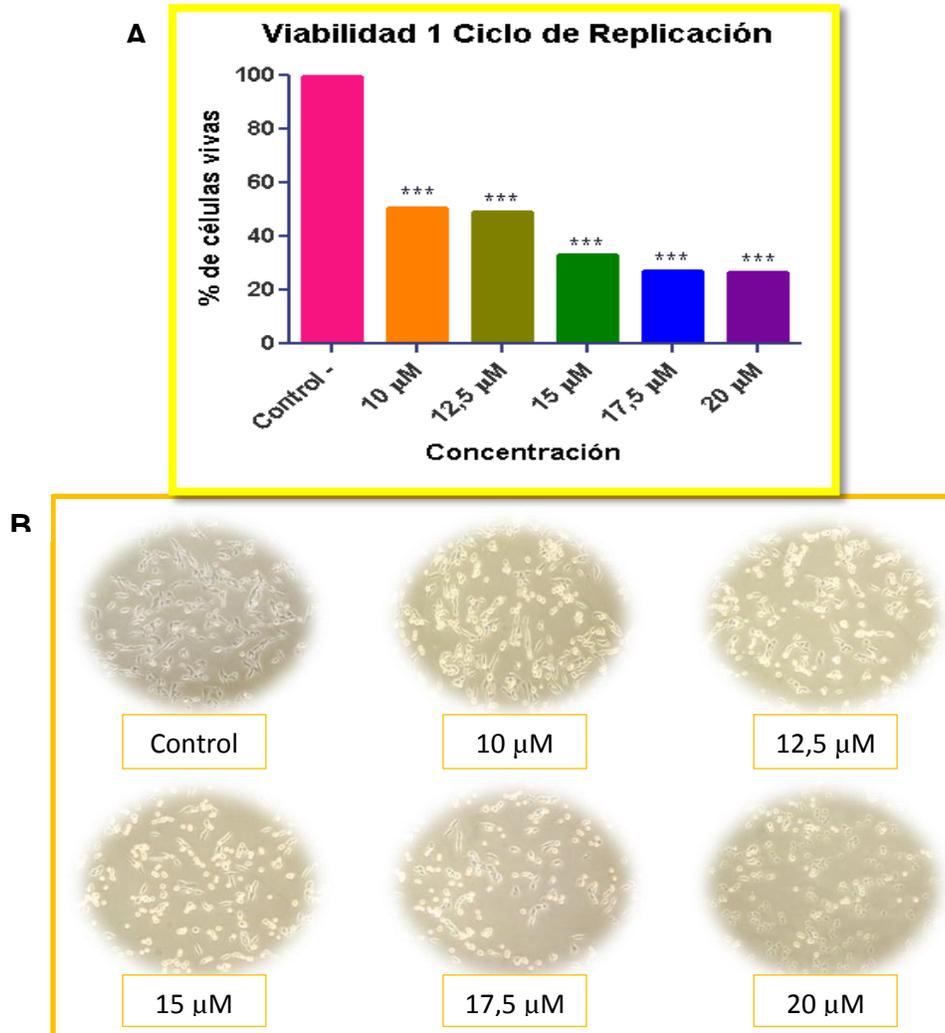


Figura 4. Porcentaje de Viabilidad Celular en 1 Ciclo de Replicación y Morfología Células D-384. (A) Células D-384 tratadas por 16 horas a diferentes concentraciones de Dehidroleucodina (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM) y su control. Se analizó mediante ANOVA post-test Dunnet (** $p < 0.0001$). (B) Cambios en la morfología de las células, luego de ser expuestas por 16 horas a Dehidroleucodina a las concentraciones de 10, 12.5, 15, 17.5, 20 μM. Visualizadas el microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Magnificación 40X.
Fuente: Autor.

En la figura 5A se observa el efecto de la molécula DhL sobre la viabilidad de la línea celular tumoral D-384 después de 32 horas de exposición (2 ciclos de replicación). La prueba bilateral de Dunnet aplicada con los datos obtenidos, nos muestra que existen diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad del control negativo con respecto a los obtenidos para cada una de las concentraciones utilizadas (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM). Los porcentajes obtenidos de viabilidad a las 32 horas de exposición van por debajo

del 30%, llegando a ser cercano a 0% para la concentración de 20 μM , ya que el objetivo de nuestro ensayo es determinar el tipo de muerte, es de interés que las células estudiadas se encuentren iniciando o cursando el proceso de muerte celular, mas no que todas ellas estén muertas, razón por la cual este modelo se omitió para los ensayos de muerte.

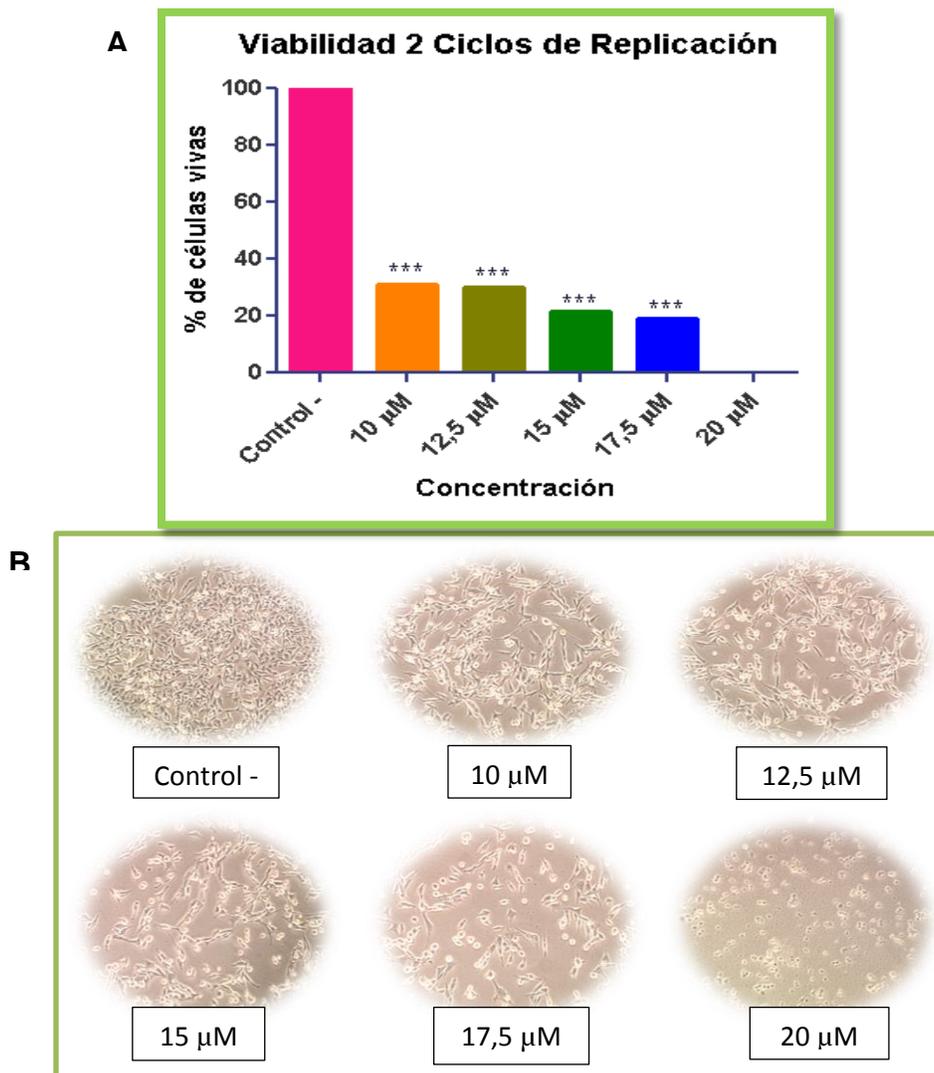


Figura 5. Porcentaje de Viabilidad Celular en 2 Ciclos de Replicación y Morfología Células D-384. (A) Células D-384 tratadas por 32 horas a diferentes concentraciones de Dehidroleucodina (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM) y su control. Se analizó mediante ANOVA post-test Dunnet (***) $p < 0.0001$). (B) Cambios en la morfología de las células, luego de ser expuestas por 32 horas a Dehidroleucodina a las concentraciones de 10, 12.5, 15, 17.5, 20 μM . Visualizadas el microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Magnificación 40X.

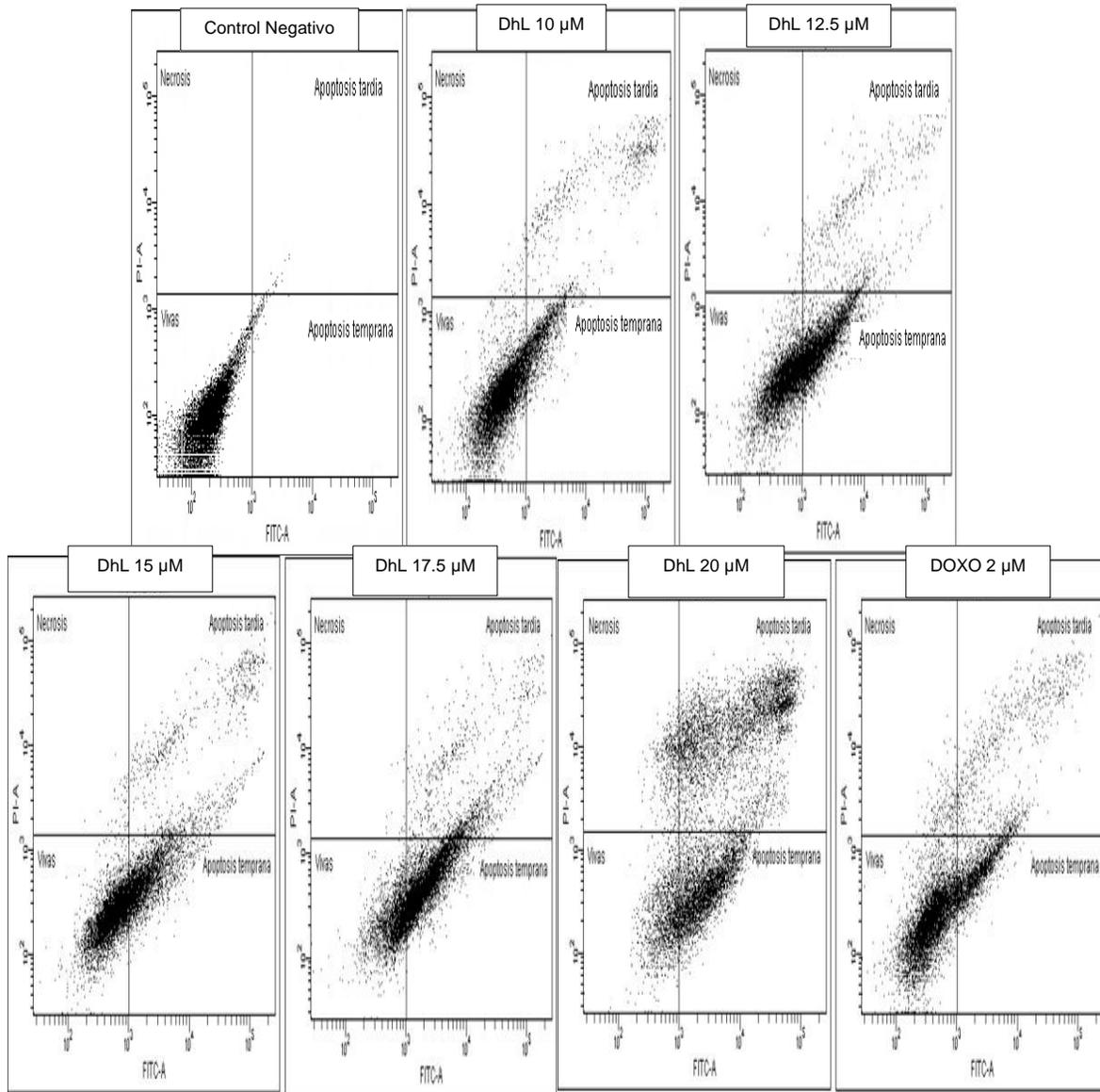
Fuente: Autor.

Los cambios morfológicos presentados por las células D-384 al ser tratadas con la molécula Dehidroleucodina a diferentes concentraciones (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM) por 32 horas o dos ciclos de replicación se pueden observar en la figura 5B. El control negativo presenta una confluencia celular del 90%, siendo menor dicha confluencia conforme aumenta la dosis de DhL para las células tratadas, quedando claro que existe un efecto citostático y citotóxico en las células en respuesta al tratamiento. Las células conforme aumenta la dosis van perdiendo su morfología características, volviéndose estas de forma redonda, hasta que en la concentración de 20 μM ya solo se aprecian restos celulares. Es evidente que las células sufren un efecto citotóxico muy elevado al someterlas a tratamiento por 32 horas, por lo tanto el número de células que están ingresando a procesos de muerte o cursando el mismo es inferior al requerido para poder continuar con los ensayos de muerte.

4.2. Determinación del tipo de muerte por Citometría de Flujo.

Las gráficas obtenidas del análisis en el citómetro fueron representadas por la intensidad de la fluorescencia de Anexina (fluoresceína) y la intensidad del IP. De tal forma que si las células tratadas tienen un mayor marcaje de Anexina se encontrarán por encima del umbral de Anexina, al igual que con el marcaje con IP.

Una vez que se estableció el tiempo de exposición de los cultivos celulares a la DhL al que se produce un efecto citotóxico capaz de permitir el estudio del tipo de muerte, con la presencia de células que se encuentren iniciando el proceso, se continuó con el análisis de la distribución de muerte a las mismas dosis antes mencionadas (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM). En la gráfica 1 se pueden observar los resultados del análisis por citometría de flujo, en la cual se muestra claramente la migración celular desde el cuadrante 3 correspondiente a células vivas, hacia el cuadrante 4 (apoptosis temprana) y cuadrante 2 (apoptosis tardía) según se incrementa la dosis de DhL, lo que indica que la molécula está produciendo una muerte apoptótica en las células D-384.

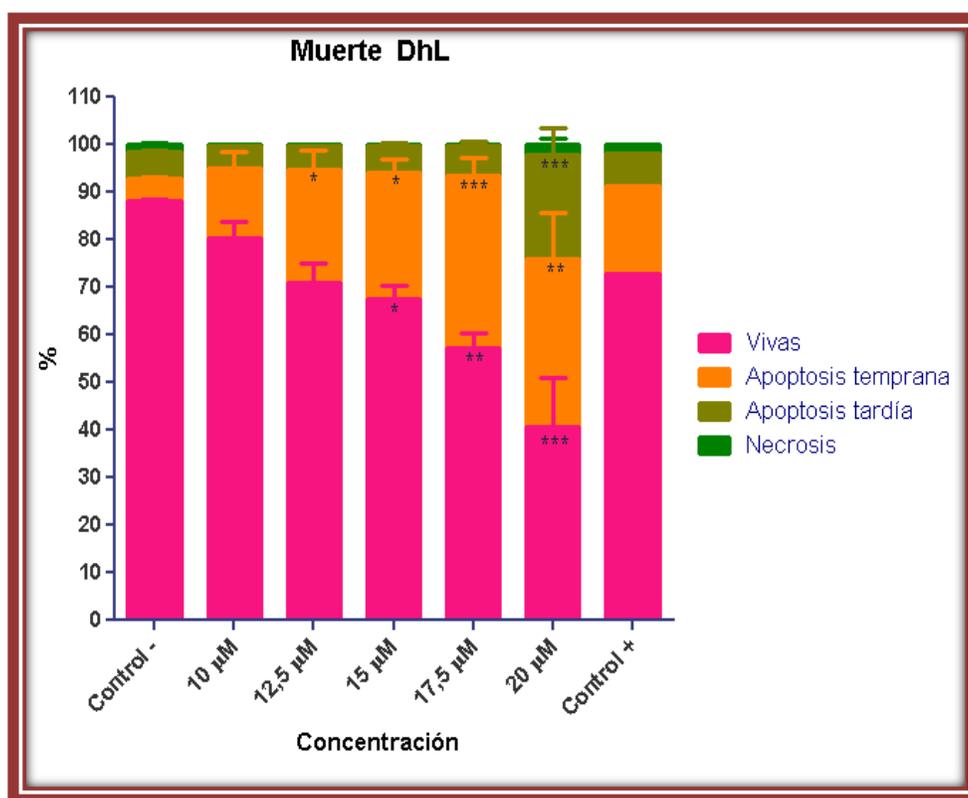


Gráfica 1. Muerte Celular. Población de Células D-384 tratadas por 16 horas a diferentes concentraciones de Dehidroleucodina (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM) y sus controles.

Fuente: Autor.

En la gráfica 2 se esquematiza los porcentajes dados por el citómetro de células vivas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas, para cada uno de los controles como para las células tratadas con DhL a las diferentes concentraciones (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM). El porcentaje de células vivas en nuestro control negativo fue del 88%, las concentraciones que mayor grado de diferencia significativa presenta en cuanto a células vivas son 20 μM con el 40.8%, 17.5 μM con el 57.3% y 15 μM con el 67.6%, lo que muestra que conforme aumenta la dosis existe una

disminución considerable las células vivas. En cuanto al proceso de muerte en nuestro control negativo las células en apoptosis temprana representa un 4.8%, valor que se encuentra aumentado significativamente para la concentración de 17,5 μM en el cual representa el 38.4%, siguiéndole la concentración de 20 μM con el 33.3% y casi con el mismo porcentaje las concentraciones de 15 μM y 12.5 μM con el 25.5 % y el 21% correspondientemente, lo que nos indica que la mayoría de la células se encuentran iniciando o transitando en un proceso de muerte apoptótica. Las células en apoptosis tardía en el control negativo representan un 5.5%, siendo la concentración de 20 μM la única que presenta un valor de diferencia significativa con el 19.5%, con lo que se diría que a esa concentración las células sufren un paso más brusco al proceso de muerte. El tipo de muerte que lleva a cabo la Dehidroleucodina en cuanto a los datos arrojados por el citómetro es la muerte inminentemente apoptótica.



Gráfica 2. Porcentaje de Muerte. Células D-384 tratadas por 16 horas a diferentes concentraciones de Dehidroleucodina (10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM) y sus controles, los resultados se presentan como la media \pm EE de dos experimentos que se realizaron por duplicado. Se analizó mediante ANOVA post-test Dunnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Fuente: Autor.

4.3. Estudio de p21 mediante Western Blot.

Para el presente estudio se utilizó el producto de la extracción de proteínas de los cultivos de células D-384 tratados con la DhL a las concentraciones de 12.5, 15 y 17.5 μM durante 16 horas y de su respectivo control negativo. En la figura 6A se observa la evaluación del control de carga en este caso tubulina, una proteína constitutiva que forma parte del citoesqueleto celular, ésta se encuentra presente en cada uno de los carriles.

Una vez que se analizó la tubulina y que se constató que está presente para todas las muestras, se determinó la expresión de p21. En la figura 6B podemos observar que la expresión de p21 se da a partir de la dosis de 12.5 y 15 μM y cualitativamente aumenta en la dosis de 17.5 μM .

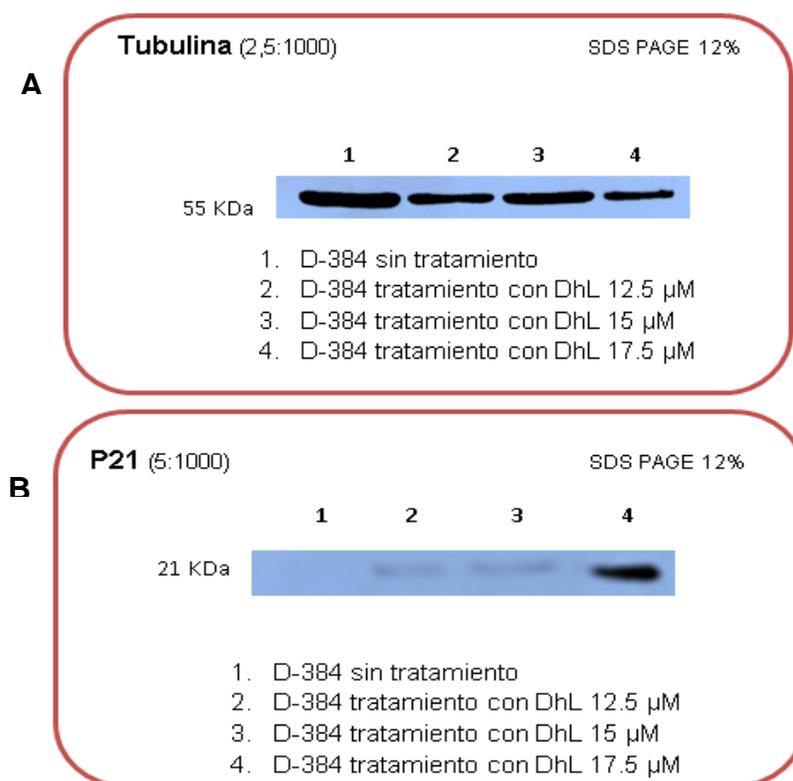


Figura 6. Análisis de la expresión de Tubulina (proteína constitutiva) y la expresión de p21. (A) Expresión de tubulina en cultivos de células D-384 luego de ser expuestas durante 16 horas a Dehidroleucodina a las concentraciones de 12.5, 15, 17.5 μM . (B) Expresión de p21 en cultivos de células D-384 luego de ser expuestas durante 16 horas a Dehidroleucodina a las concentraciones de 12.5, 15, 17.5 μM .

Fuente: Autor.

DISCUSIÓN

Estudios en la relación estructura actividad de las lactonas sesquiterpénicas mostraron que los efectos citotóxicos se deben a reacciones con grupos tioles, tales como los residuos de cisteína en las proteínas, por la adición rápida tipo Michael. Estas reacciones están mediadas químicamente por el α , β -carbonilo insaturado presente en las LS. Estos estudios apoyan la opinión de que las LS logran inhibir el crecimiento tumoral mediante alquilación selectiva de macromoléculas biológicas tales como enzimas reguladoras claves que controlan la división celular, inhibiendo de este modo una variedad de funciones celulares, que dirige a la célula a la apoptosis. Las diferencias en la actividad entre las LS individuales pueden ser explicadas por un número diferente de alquilación de elementos estructurales (Chaturvedi, 2011).

Los resultados de porcentajes de viabilidad y cambios morfológicos obtenidos en este ensayo concuerdan con los obtenidos en estudios realizados para diferentes lactonas sesquiterpénicas, en los cuales a dosis superiores a los 10 μ M producen una detención en el ciclo celular y una posterior muerte por apoptosis (Cho, J.Y., *et al.*, 2004; Choi, J.H., *et al.*, 2002; Lee, M.G., *et al.*, 2001). Reportes que se han realizado específicamente de la DhL también indican que a dosis altas la molécula logra erradicar las células tumorales por apoptosis tanto en líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) como en la línea celular HeLa (cáncer cérvix-uterino) (Costantino *et al.*, 2013).

La reducción en el número de células después de la adición DhL podría resultar de la muerte celular, la detención del ciclo celular o ambos. Existe evidencia reciente de un efecto intracelular letal desencadenado por las LS en las células. La interrupción de la bomba de calcio en el retículo endoplasmático (Christensen SB *et al.*, 2009; Denmeade SR & Isaacs JT, 2005), aumento de la generación de radicales libres hierro-dependiente (Efferth T, 2006; Nakase I *et al.*, 2009), el control del factor nuclear kB (NFkB), la activación de p53 supresor de tumores (Dey A *et al.*, 2008 ; Gopal YN *et al.*, 2009; Hehner SP *et al.*, 1998), la alteración del código epigenético (Gopal YN *et al.*, 2007; Liu Z *et al.*, 2009), y la alquilación del ADN (Woynarowski JM & Konopa J, 1981), han sido reportados como eventos intracelulares alterados por el tratamiento con LS que podrían explicar el efecto anti-tumorigénico de ellas (Ghantous A *et al.*, 2010). En conjunto, los hallazgos anteriores indican un posible efecto multifactorial de LS en las células cancerosas.

En nuestro caso, con estudios más específicos del efecto que posee la DhL en las células D-384, se estableció que las alteraciones en la transición del ciclo celular son permanentes para la concentración de 10 μ M produciéndose una detención en la fase G2/M del ciclo celular (Velásquez, 2013), con lo que a dosis superiores a 10 μ M se confirma que esa detención se mantiene y finalmente conduce a una muerte por apoptosis, lo que coincide con estudios realizados en LS que afectan en la progresión ciclo celular y conducen a una posterior muerte por apoptosis con el bloqueo de las células en la fase G2/M (Revisado en Kreuger *et al.*, 2012).

La apoptosis, o muerte celular programada, se refiere a un proceso de muerte celular altamente regulado y conservado en células eucariotas que es morfológica y bioquímicamente distinta de la muerte celular necrótica. La desregulación del proceso de apoptosis ha demostrado estar implicada en el desarrollo y en la quimio-resistencia de los tumores (Hengartner M.O, 2000; Kaufmann, S. & Hengartner, M., 2001). Se ha sabido durante mucho tiempo que muchas LS son citotóxicas para las células de cáncer (Lee, K. *et al.*, 1977; Lee, K. *et al.*, 1973; Hall, I. *et al.*, 1978). Los estudios que utilizan sistemas de cultivo de células *in vitro* demostraron que las LS son capaces de inducir muerte celular por apoptosis en diversas células de cáncer. Aunque los mecanismos moleculares detallados implicados en la apoptosis inducida por las LS no han sido bien dilucidados, se cree que la estructura α -metileno- β -lactona que se encuentran comúnmente en el LS es esencial para su actividad apoptogénica (Zhang, Won, Ong, & Shen, 2005).

Por otra parte se ha reportado que los mecanismos que regulan el ciclo celular y la apoptosis están estrechamente relacionados, a modo que varias proteínas que regulan la progresión del ciclo celular también pueden inducir apoptosis en condiciones en las que este proceso no se desarrolle correctamente (Evan, G. *et al.*, 1995; Harbour, J. & Dean, D., 2000; King, K. & Cidlowski J., 1995; Nahle, Z. *et al.*, 2002). La proteína p21 juega un papel esencial en la detención del ciclo celular después de que se presente daño en el ADN (Dulic, V. *et al.*, 1994; Deng, C. *et al.*, 1995; Brugarolas, J. *et al.*, 1995), y la sobreexpresión de ésta conduce a la detención en las fases G1 y G2 (Niculescu, A. *et al.*, 1998) o en la fase S (Ogryzko, V. *et al.*, 1997). La expresión de p21 ha demostrado ser regulada en gran medida a nivel transcripcional por mecanismos dependientes e independientes de p53 (Revisado en Gartel, A. & Tyner, A, 1999). Como inhibidor de la proliferación, p21 está preparada para desempeñar un papel importante en la prevención

del desarrollo de tumores (Gartel & Tyner 2002). Es por eso que, en el presente ensayo se evaluó la expresión de p21 en respuesta al daño del ADN provocado por DhL.

La muerte celular inducida por la molécula DhL nos hace suponer que esta mediada por un daño irreversible del ADN, ya que la expresión de p21 en nuestros cultivos nos indica que hay un arresto en el ciclo celular, en el cual se supone se producirá una reparación del material genético, dado que esa reparación no se lleva a cabo la célula se ve obligada a ingresar en el proceso de muerte celular apoptótica y este resultado concuerda con los datos obtenidos mediante citometría de flujo y que este efecto citotóxico es directamente proporcional a la dosis empleada, resultados que se ven correlacionados con estudios reportados para líneas celulares como células tumorales mamarias, gliomas y carcinomas de ovario donde la sobreexpresión de p21 independiente de p53 aumenta la apoptosis en respuesta al tratamiento con cisplatino (Revisado en Gartel *et al.*, 2002).

Las lactonas sesquiterpénicas (LS) al poseer una actividad antineoplásica dada por su estructura química y su interacción con moléculas esenciales para la progresión del ciclo y la supervivencia, se vuelven compuestos de origen natural con un gran potencial para aplicación a nivel clínico.

La muerte apoptótica desencadenada por la Dehidroleucodina reportada en el presente trabajo de investigación, hace de la molécula un potencial antineoplásico, ya que bloquea la resistencia a la muerte, característica que es una de las barreras más difíciles de combatir con las terapias actuales.

CONCLUSIONES

- La molécula DhL a partir de las concentraciones de 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μM en un tiempo de exposición de 16 horas produce en la células de Astrocitoma cerebral (D-384) una muerte apoptótica.
- Los porcentajes de células en apoptosis en los cultivos celulares tratados con DhL aumentan conforme se incrementa la dosis de la molécula, mientras que los porcentajes de células en necrosis no aumenta. Confirmando que la muerte llevada a cabo por la DhL es de tipo apoptótica.
- La proteína p21 se encuentra expresada para las concentraciones de 12.5, 15 y 17.5 μM de la DhL, siendo cualitativamente mayor para la concentración de 17.5 μM .
- La muerte celular inducida por la Dehidroleucodina está modulada por la expresión de la proteína p21 en las células D-384 tratadas por 16 horas, ya que el daño en el ADN ocasionado por la molécula es irreparable.

RECOMENDACIONES

- Una vez establecido el tipo de muerte que induce la molécula Dehidroleucodina en las células de Astrocitoma cerebral D-384 y que esta va acompañada de un incremento en la expresión de la proteína p21, se recomienda estudiar la ruta por la que la DhL desencadena la muerte apoptótica en las células cancerígenas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABTA. American Brain Tumor Association. Sobre tumores cerebrales. Manual para pacientes y cuidadores. Datos publicados en el 2002. <http://www.abta.org/understanding-brain-tumors/>
2. Brugarolas, J., Chadrsekaran, C., Gordon, J., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature (Lond.)*, 377: 552–557, 1995.
3. Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 67 (12), 2141–2153
4. Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, and G. Kroemer. 2002. Cyclin- dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 9:1287–1293.
5. Chaturvedi D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 661(2):313–34.
6. Costantino V., Mansilla S., Speroni J., Amaya C., Cuello-Carrión D., Ciocca D., Priestap H., Barbieri M., Gottifredi V. & Lopez L. (2013). The sesquiterpene lactone dehydroleucodine triggers senescence and apoptosis in association with accumulation of DNA damage markers. *PLoS one*, 8(1):e53168.
7. Cho, J.Y.; Kim, A.R.; Jung, J.H.; Chun, T.; Rhee, M.H.; Yoo, E.S. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 492, 85
8. Choi, J.H.; Ha, J.; Park, J.H.; Lee, J.Y.; Lee, Y.S.; Park, H.J.; Choi, J.W.; Masuda, Y.; Nakaya, K.; Lee, K.T. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002, 93, 1327.
9. Christensen SB, Skytte DM, Denmeade SR, Dionne C, Moller JV, et al. (2009) A Trojan horse in drug development: targeting of thapsigargin towards prostate cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 9: 276–294.
10. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 82: 675–684, 1995.
11. Denmeade SR, Isaacs JT (2005) The SERCA pump as a therapeutic target: making a “smart bomb” for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 4: 14–22. 1505 [pii].

12. Dey A, Tergaonkar V, Lane DP (2008) Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. *Nat Rev Drug Discov* 7: 1031–1040. nrd2759 [pii]; 10. 1038/nrd2759 [doi].
13. Dulic, V., Kaufman, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Reed, S. I. p53-dependent inhibition of cyclindependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 76: 1013–1023, 1994.
14. Efferth T (2006) Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cells. *Curr Drug Targets* 7: 407–421.
15. Evan, G. I., L. Brown, M. Whyte, and E. Harrington. 1995. Apoptosis and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:825–834
16. Garrido H. & Yunga E. (2010). Incidencia del Cáncer en Loja. Estudio de una década. SOLCA núcleo de Loja. Imprenta UTPL.
17. Gartel, A. L., and Tyner, A. L. Transcriptional regulation of the *p21(WAF1/CIP1)* gene. *Exp. Cell Res.*, 246: 280–289, 1999.
18. Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N (2010) What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today* 15: 668–678. S1359-6446(10)00194-7 [pii];10.1016/j.drudis.2010.06.002 [doi]
19. Globocan 2008. Ecuador. Datos publicados en el 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
20. Gopal YN, Arora TS, Van Dyke MW (2007) Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated. *Chem Biol* 14: 813–823. S1074-5521(07)00212-8 [pii];10.1016/j.chembiol.2007.06.007 [doi].
21. Gopal YN, Chanchorn E, Van Dyke MW (2009) Parthenolide promotes the ubiquitination of MDM2 and activates p53 cellular functions. *Mol Cancer Ther* 8: 552–562. 1535-7163.MCT-08-0661 [pii];10.1158/1535-7163.MCT-08-0661 [doi].
22. Hall, I.H.; Lee, K.H.; Starnes, C.O.; Eigebaly, S.A.; Ibuka, T.; Wu, Y.S.; Kimura, T.; Haruna, M. *J. Pharm. Sci.*, 1978, 67, 1235.
23. Hanahan D. & Weinberg R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–74.

24. Harbour, J. W., and D. C. Dean. 2000. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2:E65–E67.
25. Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, et al. (1998) Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem* 273: 1288–1297.
26. Hengartner, M.O. *Nature*, 2000, 407, 770.
27. Kaufmann, S.H.; Hengartner, M.O. *Trends Cell Biol.*, 2001, 11, 526.
28. King, K. L., and J. A. Cidlowski. 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell Biochem.* 58:175–180.
29. Kreuger, M. R. O., Grootjans, S., Biavatti, M. W., Vandenabeele, P., & D'Herde, K. (2012). Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drugs*, 23(9), 883–96. doi:10.1097/CAD.0b013e328356cad9.
30. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival, *J Neurosurg*, 2001; 95:190–98.
31. Lee, K.H.; Hall, I.H.; Mar, E.C.; Starnes, C.O.; ElGebaly, S.A.; Waddell, T.G.; HADGRAFT, R.I.; Ruffner, C.G.; Weidner, I. *Science*, 1977, 196, 533
32. Lee, M.G.; Lee, K.T.; Chi, S.G.; Park, J.H. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24, 303
33. Lee, K.H.; Meck, R.; Piantadosi, C.; Huang, E.S. *J. Med. Chem.*, 1973, 16, 299.
34. Liu Z, Liu S, Xie Z, Pavlovicz RE, Wu J, et al. (2009) Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 505–514. jpet.108.147934 [pii];10.1124/jpet.108.147934 [doi].
35. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ (2009) Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11:1275-1276
36. Musgrove EA: Cyclins: roles in mitogenic signaling and onco- genic transformation. *Growth Factors* 2006, 24(1):13-19.
37. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products* 66 (7), 1022–1037.

38. Nahle, Z., J. Polakoff, R. V. Davuluri, M. E. McCurrach, M. D. Jacobson, M. Narita, M. Q. Zhang, Y. Lazebnik, D. Bar-Sagi, and S. W. Lowe. 2002. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* 4: 859–864
39. Nakase I, Gallis B, Takatani-Nakase T, Oh S, Lacoste E, et al. (2009) Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis. *Cancer Lett* 274: 290– 298. S0304-3835(08)00787-8 [pii];10.1016/j.canlet.2008.09.023 [doi]
40. Niculescu, A. R., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. Effects of p21 (Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication [published erratum appears in *Mol. Cell. Biol.*, 18: 1763, 1998]. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 629–643, 1998.
41. Ogrzyzko, V. V., Wong, P., and Howard, B. H. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 4877–4882, 1997.
42. Ojeda C. (2012). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares tumorales humanas, para la valoración citotóxica in vitro de extractos vegetales y metabolitos secundarios, mediante el ensayo de tinción con violeta cristal. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
43. OMS. Organización mundial de la salud. Cáncer: Nota descriptiva N° 297. Datos publicados en el 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
44. Ordóñez P., Quave C., Reynolds W., Varughese K., Berry B., Breena P., Malagón O., Smeltzerb M. & Compadre C. (2011). Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *Journal of ethnopharmacology*, 137(2):1055- 9.
45. Penissi A., Giordano O., Guzman J. & Rudolph M. (2006). Chemical and Pharmacological Properties of Dehydroleucodine, A Lactone isolated from *Artemisia douglasiana* Besser. *Molecular Medicinal Chemistry*, 1(11)
46. Sun Y, St Clair DK, Xu Y, Crooks PA, St Clair WH. A NADPH oxidase- dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70:2880–2890.

47. Velásquez G. (2013). Determinación del efecto citostático en células de Astrocitoma Cerebral (D-384). Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
48. Woynarowski JM, Konopa J (1981) Inhibition of DNA biosynthesis in HeLa cells by cytotoxic and antitumor sesquiterpene lactones. *Mol Pharmacol* 19: 97–102.
49. Zhao LJ, Xu YH, Li Y. Effect of parthenolide on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line SGC7901. *J Dig Dis* 2009; 10:172–180.