



**UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA
ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO
GENOTÓXICO DE LA
ARGENTATINA B MEDIANTE EL
ENSAYO DE CBMN EN
CÉLULAS MCF-7 (CÁNCER DE
MAMA)”**

Previo a la obtención del título
de Bioquímico Farmacéutico

AUTORIA:

Lorena Elizabeth Palacios Arrobo

DIRECTORA:

Dra. Natalia Bailón Moscoso

Loja – Ecuador
2009

Dra.

Natalia Bailón Moscoso

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la Srta. Lorena Elizabeth Palacios Arrobo, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACEUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Enero 2009

Dra. Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA

AUTORIA:

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son absoluta responsabilidad de su autor:

Lorena Elizabeth Palacios Arrobo

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado primeramente a Dios puesto que gracias a Él he podido culminar una etapa muy importante en mi vida.

A mis padres, de manera especial a mi madre, quien ha sido el pilar fundamental de mi formación tanto personal como profesional y gracias a su apoyo y amor me fue posible llegar hasta el final de mi meta universitaria.

AGRADECIMIENTO

A Dios principalmente, por sus infinitas bendiciones.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la persona del Ph. Luis Miguel Romero Fernández, por haberme acogido durante 5 años en la familia utepelina y formarme para buscar la verdad a través de la ciencia y poder servir a la sociedad.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por haberme brindado la oportunidad de aprender y desarrollar mis aptitudes, y así formarme para enfrentar mi vida profesional.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, bajo la dirección tanto de la Dra. Paula Torres como del Dr. Juan Pablo Suárez quienes siempre estuvieron prestos a escuchar mis inquietudes y por su lucha constante para que nuestra formación profesional sea la mejor. De una manera muy especial quiero agradecer a cada uno de mis grandes y queridos profesores de quienes aprendí cada día no solo en el ámbito académico sino también personal.

A Natalia, mi Directora de Tesis, mil gracias por formarme y enseñarme con su ejemplo a ser una profesional eficaz, eficiente y ética y sobre todo por ser una gran amiga, por sus consejos y por su apoyo.

A mis Padres, especialmente a mi Madre por su infinito amor y apoyo que toda mi vida me ha brindado, por ponerme siempre en las mejores manos: en las de Dios.

A mis hermanos Aracelly, Danny, Paulina y Tania por su apoyo, por cada día darme ánimo, y por ser mis mejores amigos.

A mi gran ejemplo: mi Abuelito, y toda la familia Arrobo Narváez por todo el apoyo que me han dado y sobre todo por sus sabios consejos.

A todos mis compañeros de aula, de manera especial a mis grandes amigos: Karla, Diana V., Verito, Alexandra, Ximena, Diana H., Anita, Luis y Nayo, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente al área de Genética Toxicológica: Andrea, Tíbel, Gabriel, Zoraida, Luis y Diana por estar siempre prestos a escucharme y ayudarme. Mil gracias Andrea por ser mi apoyo incondicional durante mi tesis y por ser una gran amiga.

A todas y todos mis grandes amigos que siempre me han apoyado, me han dado ánimo, me han enseñado a levantarme y a luchar por conseguir mis sueños.

Y a todas y cada una de las personas que por la fragilidad de mi memoria no recuerdo en este momento, pero que siempre me apoyaron desinteresadamente. Mil Gracias...

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Lorena Elizabeth Palacios Arrobo declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresarme a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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”.

Lorena Elizabeth Palacios Arrobo
Tesista

Dra. Natalia Bailón Moscoso
Directora de Tesis

INDICE DE CONTENIDOS	PAG.
CERTIFICACION	II
AUTORIA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS	
DE TESIS	VII
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCION	
1.1. CÁNCER	1
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Incidencia del cáncer	1
1.1.3. Tratamiento del cáncer	2
1.1.4. Principios Activos de Origen Vegetal	5
1.1.5. Triterpenos	7
1.1.6. <i>Argentatina B</i>	13
1.2. GENOTOXICIDAD	17
1.2.1. Micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN)	18
1.2.2. Utilidades del ensayo de CBMN	18
1.2.3. Criterios de selección para recuento de células de Mn	20
2. OBJETIVOS	24

3.	MATERIALES Y METODOS	25
3.1.	Compuesto de prueba	25
3.2.	Modelo Biológico	25
3.3.	Viabilidad	26
3.4.	Ensayo de Micronucleos con Bloqueo de Citocalasina B (CBMN)	27
3.4.1.	Control positivo	27
3.4.2.	Evaluación del efecto citostático en células MCF-7	28
3.4.3.	Evaluación del efecto genotóxico en células MCF-7	30
4.	RESULTADOS	31
4.1.	Doxorrubicina (DOX)	31
4.1.1.	Actividad citotóxica de la DOX	31
4.1.2.	Efecto citostático de la DOX	32
4.1.3.	Efecto genotóxico de la DOX	32
4.2.	Argentatina B	33
4.2.1.	Actividad citotóxica de la Argentatina B	34
4.2.2.	Efecto citostático de la Argentatina B	35
4.2.3.	Efecto genotóxico de la Argentatina B	36
5.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	37
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	42
7.	BIBLIOGRAFIA	43

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. <i>Parthenium argentatum</i>	14
---	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos citotóxicos derivados de plantas	6
---	---

Tabla 2. Esquema de tratamiento	26
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Argentatina A, B y C	15
--	----

Figura 2. Se muestran las posibles rutas de las células cultivadas con bloqueo de citocinesis expuestas a agentes citotóxicos/genotóxicos.	19
---	----

Figura 3. Microfotografía de células binucleadas típica (a, b) y una células binucleadas que presentan un puente nucleoplásmico (c)	21
--	----

Figura 4. Microfotografía de células binucleadas con Micronúcleos (a, b, c)	22
--	----

Figura 5. Microfotografía de células polinucleadas (a, b) y células en proceso de apoptosis (c, d).	23
--	----

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de viabilidad (FDA) de MCF-7 tratados con Doxorubicina. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado. $P < 0.001$	31
---	----

Gráfico 2. Índice de división nuclear calculado para la Doxorubicina. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P < 0,05$. 32

Gráfico 3. Efecto de la Doxorubicina en relación al control negativo (DMSO 0.1%) sobre la frecuencia de CBN con MN. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P > 0,001$ 33

Gráfico 4. Porcentaje de viabilidad de MCF-7 tratadas con Argentatina B y DOX (0.1 μ M). Cada barra representa la media de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar cada uno por duplicado. $p < 0,001$ 34

Gráfico 5. Índice de división nuclear calculado para las células MCF-7 tratados con Argentatina B. La doxorubicina se empleó como control (DOX) a 1 μ M. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P < 0.001$. 35

Gráfico 6. Efecto de la Argentatina B (5, 15, y 25 μ M) y DOX (0.1 μ M) sobre la frecuencia de CBN con MN. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P > 0,001$ 36

RESUMEN:

Usando el modelo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, se evaluó las propiedades citostáticas y genotóxicas en células MCF-7 en proliferación de la Argentatina B, cicloartano aislado de *Parthenium argentatum*.

Para determinar los posibles efectos citostáticos de un compuesto de prueba es importante que la supervivencia sea alta, por lo que se inició con la determinación del efecto de la Argentatina B en la viabilidad en células MCF-7, obteniendo las dosis subtóxicas a probar en los ensayos de micronúcleos. El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis nos permitió evaluar la actividad citostática del compuesto, en donde se observó que la Argentatina B, a las concentraciones probadas, no mostró efecto citostático estadísticamente significativo.

Al evaluar la genotoxicidad, se observó que existe una respuesta dosis-dependiente, puesto que conforme aumenta la concentración de Argentatina B se incrementa el número de MN; pero, ninguna de las concentraciones de prueba indujo un incremento en la frecuencia de Micronúcleos en las células MCF-7 estadísticamente significativo. Esto indica que la Argentatina B no presenta efectos genotóxicos a ninguna de las concentraciones probadas.

ABSTRACT

We evaluated the cytostatic and genotoxic properties of argentatin B isolated from *Parthenium argentatum*, in MCF-7 cells on proliferation using the Cytokinesis-block micronucleus.

In order to determine the possible cytostatic effects of a testing compound is important to have a high survival. Therefore, we started with the determination of the effect of Argentatin B on the viability of MCF-7 cells, getting subtoxic doses tested. The nuclear proliferation index allowed us to evaluate the cytostatic activity of the compound, where we observed that the concentrations tested of Argentatin B showed no statistically significant cytostatic effect.

When we tested genotoxicity, we observed that there was a dose-dependent effect, but none of the tested concentrations induced a statistically significant increase in the micronuclei frequency. This indicates that the Argentatin B has not genotoxic effects with any of the concentrations tested.

1. INTRODUCCION

1.1. CÁNCER

1.1.1. Definición

Cáncer es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, que se caracterizan por un crecimiento descontrolado de las células debido a cambios en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular (OMS, 2008).

1.1.2. Incidencia del cáncer

Según la Sociedad Americana del Cáncer, alrededor de 12.3 millones de personas desarrollaron algún tipo de cáncer durante el 2007, cifra que está en ascenso respecto a la de otros años (10.9 millones en 2002). Además, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial; es así que cerca de 7.6 millones de personas fallecieron por cáncer en todo el mundo (20.000 muertes por día), de los cuales 2,9 millones en países desarrollados y 4,7 millones en países subdesarrollados. Los cánceres que con mayor frecuencia se presentan son los de pulmón, próstata y colon en los hombres y el de pulmón, mama y colon en mujeres (American Cancer Society, 2007).

En América Latina el cáncer es una de las tres primeras causas de muerte, al igual que en el Ecuador de acuerdo a los datos del INEC (Garrido *et al.*, 2003).

En Ecuador, con una población de 13.1 millones de habitantes, alrededor de 12000 personas desarrollaron cáncer en el 2006. Cada año se producen alrededor de 55 mil muertes por distintas causas (Yépez, 2006) de las cuales el 14.9% son debidas al cáncer, siendo el cáncer

de estómago el más frecuente tanto en hombres como en mujeres (OMS, 2006).

Según el estudio “Incidencia del Cáncer en Loja”, Registro de Tumores de Loja, entre 1997 y 2003, en la ciudad de Loja se registran 1615 casos (647 hombres y 968 mujeres). El número de muertes por cada 100 enfermos de cáncer, es de 43,12 para hombres y 33.26 para mujeres, por lo que estas enfermedades ocasionan la muerte a 46 hombres y 40 mujeres, por año en Loja (Garrido *et al.*, 2003).

1.1.3. Tratamiento del cáncer

Hasta hoy, las estrategias principales para el tratamiento curativo o paliativo del cáncer son los procedimientos quirúrgicos, la radioterapia y la quimioterapia (Parra, 2005).

En contraste con la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia (uso de fármacos antineoplásicos) es la forma de terapia sistémica más efectiva (Lindholm, 2005). Actualmente, el uso de antineoplásicos especialmente en pacientes con enfermedad en estadio avanzado (metastásica), constituye el método más usado en todo el mundo como tratamiento adyuvante. La gran mayoría de los fármacos antineoplásicos interactúan en gran medida con el ADN o sus precursores e inhiben la síntesis del nuevo material genético o causan daños irreparables sobre este (Rodríguez *et al.*, 2004). En base a ello se ha clasificado a los antineoplásicos atendiendo al punto de acción:

- **Antineoplásicos que actúan sobre el ADN:** afectan a la integridad de las cadenas de ácidos nucleicos, fundamentalmente al ADN, impidiendo la replicación celular normal, como

ciclofosfamida, cloranbucil, bleomicina, etopósidos, etc (Pradrillo, 2002)

- **Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis celular:** actúan interfiriendo en el proceso de la mitosis y, por tanto, impiden la reproducción celular. No afectan directamente al ADN y tienen poco efecto sobre las células que no se dividen. Afectan a los microtúbulos, necesarios para formar el huso cromático en la mitosis, impidiendo su formación o promoviendo la formación de estructuras microtubulares alteradas que no pueden participar en la mitosis. Entre estos tenemos: la vincristina, vindesina, vinblastina, docetaxel, entre otros (Pradrillo 2002).
- **Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario:** los fármacos de este grupo potencian la acción del sistema inmunitario, ya que éste es capaz de reconocer y destruir las células cancerosas. Tal es el caso de el Rituxan y la Herceptina (Pradrillo 2002).

La gran desventaja de los antineoplásicos, radica principalmente en su elevada toxicidad, es decir, estos medicamentos no actúan únicamente sobre las células tumorales, sino también sobre las sanas, especialmente sobre las células con mayor velocidad de proliferación, como las de la mucosa digestiva, las de la médula ósea y de los folículos pilosos; como consecuencia de ello se producen alteraciones gastrointestinales, anemia, trombocitopenia, leucopenia y alopecia (Pradrillo, 2002). Por tal motivo y debido a sus características especiales como un estrecho margen terapéutico, elevada toxicidad y capacidad de inducir resistencia en células cancerosas, son de uso muy delicado (Pradrillo, 2002). Hoy en día, para contrarrestar la resistencia celular cancerosa se han adoptado técnicas de politerapia con

fármacos antineoplásicos que cuenten con mecanismos de acción sinérgico o complementario.

Otro tipo de estrategias para el tratamiento del cáncer, tales como: terapia génica, manipu-

laciones del sistema inmunitario y de los sistemas hematopoyéticos normales, así como la inducción de la diferenciación en tejidos tumorales y la inhibición de la angiogénesis, se están desarrollando (García, 2007).

A pesar de las inversiones multimillonarias en la investigación sobre el cáncer, los métodos convencionales de tratamiento del cáncer no han sido del todo exitosas, de ahí el hecho de que las enfermedades antineoplásicas hoy en día sean un problema de salud mundial (Rath, 2007). De ahí la importancia de desarrollar nuevos fármacos con mayor efectividad y selectividad. Una de las principales fuentes de obtención de fármacos han sido las especies vegetales, puesto que estas poseen una gran cantidad de metabolitos secundarios, que podrían tener actividad antineoplásica.

1.1.4. Principios Activos de Origen Vegetal

Desde la antigüedad los hombres han utilizado las plantas medicinales en el tratamiento de diferentes enfermedades humanas (Marquez, P. *et al.*, 2002). Una proporción grande de la población de los países en desarrollo usa la medicina tradicional como un recurso en salud primaria (Verschaev L. *et al.*, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80 % de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Laza y Rodríguez, 2003). En vista del poder curativo que proporcionaron las plantas en diferentes clases de enfermedades, así como el hecho de que la gran mayoría de los fármacos más importantes fueron

aislados por primera vez de fuentes naturales, además de que estén en uso hoy en día, los productos naturales y sus derivados representan ahora más del 50% de todas las drogas de uso clínico en todo el mundo (Gurib-Fakim, A. *et al.*, 2006).

En el reino vegetal han sido catalogadas aproximadamente 250.000 especies de plantas, de las cuales un 10% se consideran plantas medicinales. En 1982, Hartwell informó de aproximadamente 3000 especies de plantas que etnomédicamente se habían referido como anticancerosas (Hartwell, 1982). Dichos agentes anticancerígenos son clasificados en cinco grupos principales: alcaloides vinca (o alcaloides *Catharanthus*), epipodofilotoxinas, taxanos, camptotecinas y combretastatinas (Astudillo, 2006); los mismos que cumplen las funciones que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Fármacos citotóxicos derivados de plantas. Fuente: Astudillo 2006

GRUPO FARMACOLÓGICO	MECANISMO DE ACCIÓN	PLANTA DE ORIGEN
Alcaloides vinca	Inhibición de la polimerización de la tubulina	<i>Catharanthus roseus</i>
Epipodofilotoxinas	Inhibición de la topoisomerasa II	<i>Podophyllum peltatum</i>
Taxanos	Promoción de la estabilización de la tubulina	<i>Taxus brevifolia</i>
Camptotecinas	Inhibición de la topoisomerasa I	<i>Camptotheca acuminata</i>
Combretastatinas	Inhibición de la polimerización de la tubulina	<i>Combretum caffrum</i>

Aunque los compuestos antes mencionados son los de mayor importancia clínica, existe una gran cantidad de metabolitos estructuralmente diversos, con probada actividad contra líneas celulares de cáncer. Es posible encontrar en cada grupo de metabolitos secundarios algún representante con propiedades anticancerosas. Algunos de estos grupos de compuestos son las cumarinas, los flavonoides, los sesquiterpenos, los diterpenos y los triterpenos (Parra, 2006).

1.1.5. Triterpenos

Los triterpenos constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios derivados del escualeno o de precursores acíclicos de 30 átomos de carbono (Parra, 2006). Más de 200.000 triterpenos son conocidos en la naturaleza; los más estudiados son el ácido oleanólico (AO) y el ácido ursólico (AU).

El estudio sistemático de plantas con antecedentes etnomédicos, ha conducido frecuentemente al aislamiento de diversos triterpenos biodinámicos. Así, se conocen que los triterpenos pueden actuar como: antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores, cardioprotectores, antagonistas de los receptores de estrógeno, antiproliferativos, citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano, antiangiogénicos y proapoptóticos (Parra, 2006).

Se han descrito más de 100 triterpenos con actividad citotóxica. Algunos de éstos son los del tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las quinonas metilúricas (Setzer y Setzer, 2003). Los compuestos referidos más frecuentemente en la literatura pertenecen a los dos primeros tipos los cuales poseen una débil actividad antiinflamatoria y antitumoral (Liby *et al.*, 2007).

Actualmente se conocen 300 nuevos derivados del AO y AU que fueron sintetizados en la Universidad de Dartmouth (USA) (Liby *et al.*, 2007). De ellos, una gran cantidad de compuestos antiinflamatorios y citotóxicos derivados del ácido ursólico (AU).

La actividad biológica del ácido ursólico se atribuye a su acción sobre diferentes blancos moleculares. Así, el ácido ursólico es un inhibidor de algunas de las enzimas involucradas en la duplicación celular, como son la ligasa I y las polimerasas del ADN. En células del cáncer, el ácido ursólico incrementa la concentración de calcio intracelular, induce arresto celular en Go/G1 mediado por p21P^{waf1P}, liberación de citocromo c y finalmente apoptosis mediada por activación de la caspasa 3 (Parra, 2006). Además el ácido ursólico inhibe la activación del factor nuclear-κB (NF-κB) inducida por diversos carcinógenos, como son el factor de necrosis tumoral, el ácido okadaico, entre otros (Shishodia *et al.*, 2003). Es conocido que el factor de transcripción NF-κB regula diversos genes que median procesos de proliferación, angiogénesis y metástasis, por lo que, los efectos inhibitorios que posee el ácido ursólico explican en parte los efectos anticancerosos y quimiopreventivos de dicho triterpeno (Parra, 2006). Los ursanos poseen efectos farmacológicos que los hacen compuestos potenciales para el desarrollo de agentes antineoplásicos.

Por otro lado los triterpenos de tipo oleanano también poseen actividad anticancerosa. El ácido oleanólico posee actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Además, este compuesto induce la diferenciación en líneas celulares de leucemia murina y humana. El ácido oleanólico inhibe las reacciones de adenilación y ligación catalizadas por la ligasa I del ADN humano. También, se conoce que este compuesto inhibe la actividad de la polimerasa β del ADN de rata. Además, el ácido oleanólico estimula la liberación de

óxido nítrico (ON) y TNF- α , a través de la regulación de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y el factor de necrosis tumoral, por el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Parra, 2006).

Sin embargo, el ácido oleanólico no es el único oleanano con actividad anticancerosa importante. Se conoce que algunos triterpenos del tipo oleanano son inhibidores catalíticos de las topoisomerasas humanas; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la actividad citotóxica o antiproliferativa de dichos compuestos. Entre esos compuestos se pueden mencionar al ácido acetil- α -boswélico, al olean-12-en-3 β ,15 α -diol y al olean-12-en-3 β ,15 α ,24-triol (Parra, 2006). Así mismo, se sabe que los 3-p-cumaratos (cis y trans) del ácido oleanólico son capaces de inhibir la polimerasa del ADN.

Al igual que el ácido ursólico, el ácido oleanólico fue sometido a transformaciones químicas para diversos fines. Las primeras transformaciones realizadas en los años sesenta, se efectuaron con el fin de obtener agentes antiinflamatorios novedosos. En 1984, Han y colaboradores, informaron de la síntesis de 11-oxo derivados del ácido oleanólico. Dichos derivados fueron concebidos como antiinflamatorios corticomiméticos. Finlay y colaboradores (1997) informaron de la obtención de algunos derivados del ácido oleanólico con apertura en el anillo A. De dicha serie de compuestos, el más activo fue el ácido 5 β -(1-metil-2-etil)-10 α -(3-aminopropil)-des- A olean-12-en-28-oico, el cual presentó una concentración inhibitoria media de 0.7 μ M contra células NRP.152 de cáncer próstata. Posteriormente, el grupo de investigación bioorgánica encabezada por el binomio Gribble y Sport lograron la síntesis y evaluación de diversos compuestos antiinflamatorios y anticancerosos a partir del ácido oleanólico. Como resultado de tales investigaciones se obtuvo el ácido 2-ciano-3,12-dioxolean-1,19-dien-28-

oico, conocido como CDDO. El CDDO es un agente multifuncional. Dicho compuesto inhibe la proliferación de una gran cantidad de líneas celulares de cáncer humano, induce diferenciación en células de leucemia humana y en fibroblastos murinos, es proapoptótico y además, suprime la formación *de novo* de las enzimas óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Wang *et al.*, (2000) demostraron que CDDO es un agonista parcial del receptor PPAR- γ , un miembro de la superfamilia de receptores hormonales. Además, el éster metílico del CDDO es un antagonista de dicho receptor. En el mismo año, Ito y colaboradores demostraron que CDDO induce la síntesis de citocromo c mitocondrial, activación de la caspasa 3, y la fragmentación del DNA internucleosomal (apoptosis) y diferenciación de células de osteosarcoma humano por un mecanismo dependiente de caspasa 8 (Ito *et al.*, 2000). En un estudio diferencial efectuado en las líneas MCF-7 y MDA-MB-435, con el apoyo de microarreglos, se encontró que el CDDO reguló la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la carcinogénesis en la mama. Por lo que se postuló que esta molécula podría ser empleada para la terapia del cáncer de mama. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad del CDDO se generaron algunos derivados, de los cuales destaca el derivado imidazol (CDDO-Im). Dicho derivado inhibe la proliferación de líneas celulares de leucemia y mama en el orden de 10-30 nM (Parra, 2006).

Place y colaboradores (2003) demostraron que este compuesto también es un ligando de PPAR- γ , aunque también encontraron que este compuesto induce diferenciación en células de leucemia que es independiente de la activación de PPAR- γ , lo cual sugiere su acción sobre otro blanco molecular diferente (Place *et al.*, 2003).

Otros grupos de triterpenos, especialmente importantes, son las cucurbitacinas y las quinonas metilúricas. Las cucurbitacinas son los triterpenos citotóxicos más potentes aislados de la naturaleza. Los efectos antiproliferativos de este tipo de compuestos se correlacionan con la desestabilización del citoesqueleto de las células de cáncer. Por su parte, las quinonas metilúricas (*nor*-friedelanos) son potentes triterpenos cuya estructura presenta un elevado grado de insaturación. Sin embargo, no todas las familias de triterpenos han sido tan estudiadas como las anteriores. Así, se han informado que algunos representantes de los fernanos, lupanos, limonoides y cicloartanos también poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (Parra, 2006).

En base a lo mencionado anteriormente se puede considerar a los triterpenos junto a otros metabolitos secundarios como promisorios para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos.

Además, el interés terapéutico y el empleo industrial de triterpenos, que se mencionan a continuación, hacen de este un grupo de metabolitos secundarios de gran importancia (Bruneton, 2001).

- Interés de los heterósidos cardiotónicos, a los que ningún producto sintético ha podido todavía sustituir completamente.
- Interés en las sapogeninas espirostánicas, del sitosterol o del estigmasterol que son materias primas muy útiles en procesos biotecnológicos. Siguen siendo indispensables para cubrir la necesidad de la industria farmacéutica en medicamentos esteroideos (anticonceptivos, anabolizantes, antiinflamatorios).
- Interés terapéutico de numerosas drogas con saponósidos utilizadas para la extracción de moléculas activas (escina, glicirricina), para la

obtención de formas galénicas simples o preparados de fitoterapia.

- Importancia económica de regaliz, edulcorante poco calorígeno, muy utilizado en las industrias agroalimentarias.
- Importancia económica de los saponósidos en la medida en que su presencia puede disminuir de forma importante el valor nutritivo de forrajes o conferir a las plantas de nuestro entorno cotidiano una toxicidad digna de tener en cuenta (Bruneton 2001).

1.1.6. *Argentatina B*

El género *Parthenium* es nativo del hemisferio occidental y la mayoría de sus especies crecen silvestres en suelo mexicano. Para facilitar su estudio se ha dividido en las cuatro secciones siguientes: *Argyrochaeta*, *Bolobhytum*, *Parthenistrum* y *Parthenichaeta*. Se puede considerar que los metabolitos secundarios típicos de este género son las ambrosanólidas, es decir lactonas sesquiterpénicas en las que el metilo de C-10 tiene orientación 13, sin embargo, en la sección *Parthenichaeta*, compuesta por especies arbustivas, los metabolitos secundarios más característicos son los triterpenos tetracíclicos así el *P. argentatum* contiene argentatina A, argentatina B y argentatina C, el *P. incanum* contiene incanilina y el *P. fruticosum* incanilina y fruticinas A y B de estructura aún no establecida (Navarrette 1991).

P. argentatum es un arbusto conocido con el nombre de “guayule”, que significa “planta que contiene hule” (Parra, 2006).



Fotografía No. 1 *Parthenium argentatum*

En México en el año de 1977 a partir de la resina, subproducto del proceso de industrialización de la especie *Parthenium argentatum*, se aislaron las argentatinas A, B e isoargentatina A por medio de técnicas cromatográficas convencionales con un rendimiento del 2.7, 5.5 y 0.13% respectivamente. La caracterización de los tres triterpenos se efectuó por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura. El estudio sistemático de la resina del guayule reveló la presencia de compuestos aromáticos, terpenos y ácidos grasos. Además, se encontró que la resina estaba constituida por una gran cantidad de compuestos triterpénicos, de tipo cicloartano y lanostano. Estos compuestos constituían cerca del 55% de los componentes totales; de los cuales, el 27% lo representaban las argentatinas A, B y C (Parra, 2006).

Los ésteres cinamato y p-anisato de un alcohol derivado del germacrano, denominados guayulinas A y B, respectivamente, la argentatina B presenta fusiones trans-cis-trans para los anillos A/B, B/C y C/D. El anillo B se encuentra distorsionado debido a la presencia del anillo de ciclopropano. En la estructura cristalina, la argentatina B presenta uniones de H entre el alcohol ubicado en posición 25 y el oxígeno del anillo etéreo E (Parra, 2006).

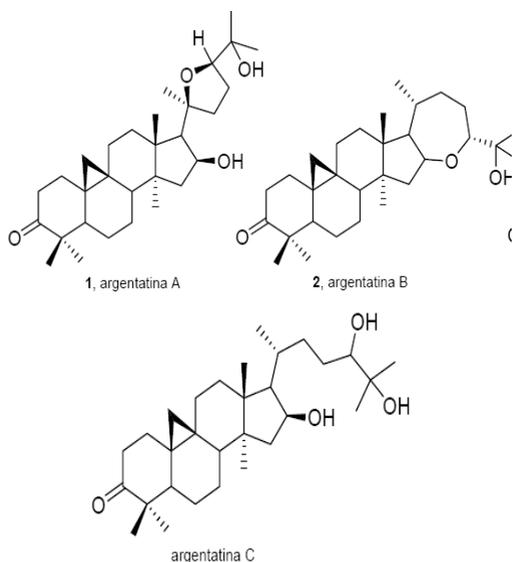


Figura 1. Estructura de la Argentinina A, B y C.

En el Instituto de Química de la UNAM en 1995, se demostró que la argentinina B es un inhibidor no-competitivo de la unión de H-estradiol a su receptor en tumores de mama humanos dependientes de hormonas (Parra, 2006). En el mismo Instituto en 2006 se realizaron pruebas citotóxicas en varias líneas celulares de cáncer humano entre ellas las MCF-7 (mama), obteniendo como resultado que la Argentinina B es citotóxica, mientras que en los Ensayos de Citostaticidad y Genotoxicidad (Mn) se demostró que es citostática y que no es genotóxica en linfocitos humanos (Parra, 2006).

En vista de que las células MCF-7 fueron unas de las más sensibles (CI₅₀: 36.06uM) a la Argentinina B en el estudio de citotoxicidad mencionado anteriormente, en el presente trabajo se escogió este modelo biológico para

determinar si la argemone B produce el mismo efecto en las células tumorales.

1.2. GENOTOXICIDAD

Los distintos ensayos en Genética Toxicológica son utilizados para identificar agentes inductores del daño al material genético en células germinales y somáticas. Estos ensayos son capaces de detectar distintos tipos de alteraciones incluyendo micro y macromutaciones, así como carcinógenos potenciales. Entre ellos, si consideramos los niveles de complejidad creciente de la naturaleza, desde bacterias hasta mamíferos incluyendo al hombre, se reúnen varios cientos de ensayos. Sin embargo los que integran las baterías de análisis más frecuentes aceptados en la actualidad son: toxicidad general (eficiencia en placa, test de viabilidad por exclusión del colorante, retraso en el ciclo celular), daño primario en el ADN (intercambio de cromátidas

hermanas, cometa), reparación (en células de mamíferos, bacterias normales/deficientes en reparación), microlesión génica (test de Ames, mutación de genes y levaduras, en células en cultivo CHO/HGPRT), microlesión (micronúcleos (MN) in vivo e in vitro, aberraciones cromosómicas), transformación in Vitro de líneas celulares, activación metabólica y regulación sistémica y organísmica (Mudry M. *et al.*, 2006).

Algunos agentes antineoplásicos como la doxorubicina, cisplatina o la mitomicina c además de sus efectos citotóxicos, tienen importantes efectos adversos como la genotoxicidad. Por esta razón, resulta importante evaluar la genotoxicidad de cualquier compuesto con potencial antineoplásico. Estos efectos pueden ser evaluados en sistemas in vitro como en el ensayo de Micronúcleos con bloqueo de citocinesis (Parra *et al.*, 2005).

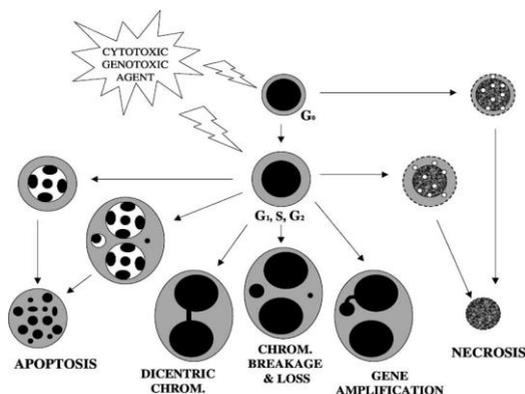
1.2.1. Micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN)

Los MN son pequeños cuerpos celulares que son formados durante la mitosis de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromatina y cromosomas/cromatina entero que no son incluidos en las células hijas (Fenech M *et al.*, 2000). Los MN provenientes de fragmentos cromosómicos son el resultado de: rotura directa del ADN, replicación del ADN dañado o inhibición de la síntesis del ADN. Los procedentes de cromosomas enteros son principalmente formados por alteraciones del huso mitótico, cinetocoro u otras partes del aparato mitótico así como también daño en subestructuras cromosómicas y alteraciones en la fisiología celular (Albertini R *et al.*, 2000). En 1985 Fenech y Morley introdujeron el uso de la citocalacina B (Cyt B), que inhibe la polimerización de la actina requerida para la formación del anillo de microfilamentos que participa en

la división del citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis (Fenech M *et al.*, 2003).

1.2.2. Utilidades del ensayo de CBMN

Por alrededor de 17 años el ensayo de CBMN ha sido conocido como un método eficaz para la medida de rotura cromosómica, pérdida cromosómica, no disyunción, necrosis, apoptosis y citostaticidad, por lo cual es usado para conocer *in vitro* el efecto genotóxico de nuevos agentes químicos tanto a nivel ambiental con nuevos plaguicidas y pesticidas, como en el ámbito



sanitari
o con la
utilizaci
ón de
nuevas
drogas
citostáti
cas en
los
tratamie
ntos
antitum
orales
(Fenec

h M. *et al.*, 2003).

Figura 2. Se muestran las posibles rutas de las células cultivadas con bloqueo de citocinesis expuestas a agentes citotóxicos/genotóxicos. Usando estos biomarcadores dentro del ensayo CBMN es posible la medida de la frecuencia de rotura cromosómica (MN), pérdida cromosómica (MN), rearrreglo cromosómico, por ejemplo: cromosomas dicéntricos (NPB), aplicación de genes (nuclear buds), necrosis y apoptosis. En adición, el efecto citostático es medido por el radio de células mono, bi y polinucleadas. La pérdida cromosómica puede ser distinguida de roturas cromosómicas usando pruebas pancentroméricas y anticuerpos anti-cinetocoro y no disyunción (malsegregación de cromosomas) puede ser medida en células BN usando pruebas centroméricas de cromosoma específica. Fuente: Fenech M *et al.*, 2003

El ensayo de CBMN es efectivo para identificar células que solo se han dividido una vez en el tiempo de cultivo, porque permite observarlas con una apariencia binucleada debido al efecto inhibitor de Cyt B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis. De esta manera es posible observar células mononucleadas (CMN) que representan a las células que no se han dividido en el cultivo, las células binucleadas (CBN) y células tri, tetra o polinucleadas que son aquellas que se han dividido más de una vez en el tiempo de cultivo, permitiendo establecer un índice de proliferación, denominado como Índice de división nuclear (IDN). Este parámetro permite establecer si el agente en estudio es capaz de inducir un efecto citostático. (García, 2000). El IDN se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = \{ \text{CMN} + 2 (\text{CBN}) + 3 (\text{CPN}) \} / \text{N}$$

Donde: CMN; CBN y CPN es la frecuencia de células mono, bi, y polinucleadas en un total de 200 células y N representa el número total de células contadas.

La población de cada población de células será determinada por un análisis microscópico, en el cual se observan características propias de cada población. (García, 2000)

1.2.3. Criterios de selección para recuento de células y MN

La determinación de la frecuencia de MN requiere la observación microscópica de CBN en la placa preparada a partir de los cultivos de células tratadas con el compuesto de interés. La evaluación de la frecuencia de MN se realiza analizando 100 CBN, para lo cual se han descrito criterios de selección para reconocer tanto las células en las que se va a efectuar el recuento, como criterios para seleccionar los MN que presenten las características necesarias para ser

reconocidos como tales y que el recuento realizado sea fiable y objetivo.

1.2.3.1. Criterios de identificación de Células Binucleadas

- La célula debe ser binucleada, es decir presentar dos núcleos redondos u ovales, mantener su membrana casi intacta y distinguible de células adyacentes.
- Los núcleos deben estar separados, ser de tamaño similar y presentar un patrón de tinción similar.
- Los núcleos pueden tocarse pero no solaparse, la membrana nuclear debe distinguirse.
- Ambos núcleos pueden encontrarse unidos por puentes nucleoplásmicos

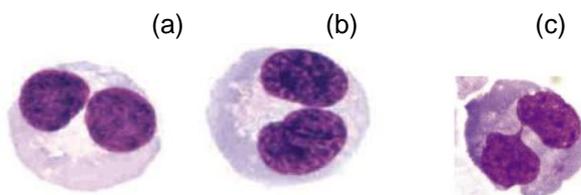


Figura 3. Microfotografía de una célula binucleada típica (a, b) y una célula binucleada que presentan un puente nucleoplásmico (c). Fuente: Fenech M, Chang W.P, Bonassi S., *et al.*, 2003

1.2.3.2. Criterios de identificación de micronúcleos

- Son cuerpos de forma redonda u oval.
- Su diámetro varía entre 1/16 a 1/3 del núcleo principal.

- Deben estar separados de los núcleos principales sin traslapamiento.
- No debe ser refringente
- Debe presentar las mismas características tintoriales del núcleo principal.
- Presentar la misma condensación de cromatina que los núcleos principales.

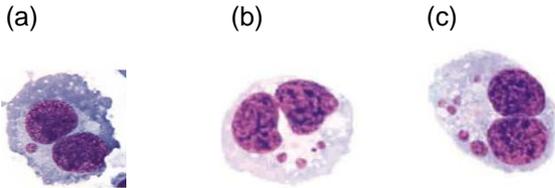
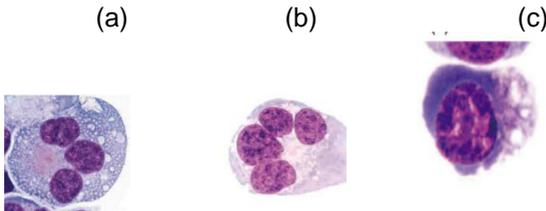


Figura 4. Microfotografía de una células binucleadas con micronúcleos (a, b, c)

Fuente: Fenech M, Chang W.P, Bonassi S., *et al.*,2003.

Para el análisis de la frecuencia de micronúcleos no se toma en cuenta:

- Células trinucleadas, tetranucleadas, o polinucleadas.
- Células donde el (los) núcleo (s) principal(es) se observen en apoptosis.



(d)



Figura 5. Microfotografía de una células polinucleadas (a, b) y células en proceso de apoptosis (c ,d). Fuente: Fenech M, Chang W.P, Bonassi S., *et al.*, 2003.

2. OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar el efecto genotóxico de la Argentatina B mediante el ensayo de CBMN en células MCF-7 (cáncer de mama).

ESPECIFICOS

- Establecer las dosis subtóxicas a probar en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citoquinesis mediante en ensayo de viabilidad (FDA).
- Determinar los efectos genotóxicos de la Argentatina B mediante la evaluación de Micronúcleos en células MCF-7.
- Determinar los efectos citostáticos de la Argentatina B mediante la determinación del Índice de División Nuclear en células MCF-7.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMPUESTO DE PRUEBA

La Argentatina B se la obtuvo gracias a la donación del Dr. Mariano Martínez Vázquez (Instituto de Química de la UNAM).

A partir del compuesto proporcionado se prepararon dos diluciones con DMSO al 0.5% para obtener 2 soluciones con concentraciones de 1 y 5 mM; las mismas que se utilizaron para llevar a cabo el tratamiento correspondiente.

3.2. MÓDELO BIOLÓGICO

El modelo biológico usado fue células MCF-7, una estirpe desarrollada en 1973 a partir de un derrame pleural de un carcinoma de mama humano. (Lanari *et al.*, 2003)

Las células presentan forma epitelial y su carga cromosómica es de 82. Su mantenimiento se realiza con medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 1%, antibiótico y antimicótico 2%, y piruvato de sodio (Gibco). El medio se esterilizó por filtración al vacío.

Las condiciones a las cuales se mantuvieron los cultivos fue a 37°C de temperatura, atmósfera húmeda, 5% de CO₂ y en frascos Roux de 25 cm².

Para su adecuada conservación se realizaron revisiones y cambios de medio diarios; para la obtención de subcultivos se utilizó tripsina al 0,25% (Gibco).

3.3. VIABILIDAD

Para poder determinar el porcentaje de células vivas en los experimentos, se procedió a realizar la técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de Fluoresceína (FDA) – Bromuro de Etidio (EtBr).

- En una caja de 1cc se colocaron 900 ul de medio RPMI 1640 suplementado, 50 ul de células (15 x 10⁵ células) y suero fetal bovino 10%.
- Se incubó durante 48 horas a 37°C y 5 % de CO₂.

- Transcurrido este período se realizó el tratamiento correspondiente (Tabla 2), durante 24 horas.

Tabla 2. Esquema de tratamiento

	Sustancias	Concentraciones
Control negativo	DMSO	0,5%
Sustancia a probar	Argentatina B	5,15 y 25 uM
Control positivo	Doxorubicina	0,1 uM

- Finalizado el tiempo de incubación se retiró el medio de las cajas, se lo colocó en tubos eppendorf de 2cc, inmediatamente se adicionó 1 cc de PBS a las cajas, se lavó y se colocó PBS en los tubos eppendorf que contenían el medio.
- Se centrifugaron los tubos durante 7 min a 1600 rpm, para inmediatamente desechar el sobrenadante, vortex, y se resuspendió con 1 cc de RPMI. Los tubos se centrifugaron nuevamente durante 7 min a 1600 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet.
- Paralelamente, se preparó en un tubo eppendorf la solución FDA de trabajo, para lo cual se colocaron 600 ul de PBS, 25 ul de EtBr y 3.75 ul de FDA.
- En un tubo se mezclaron 20 ul de pellet de células con 20 ul de la solución de trabajo, de ésta se tomo 20 ul y se colocó en un portaobjetos, luego se observó al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40x, evaluando 200 células por placa y por duplicado. Pudiéndose diferenciar por colores

a las células vivas (verdes) de la muertas (anaranjadas).

3.4. ENSAYO DE MICRONUCLEOS CON BLOQUEO DE CITOCALASINA B (CBMN)

3.4.1. Control positivo

Como control positivo se usó Doxorubicina (DOX) que es un antibiótico perteneciente al grupo de las antraciclinas, las cuales son conocidas por sus mecanismos citotóxicos complejos. La DOX es eficaz en linfomas malignos y en ciertos casos sobre tumores sólidos como cáncer de mama (Brunton *et al.* 2007). La DOX previamente ha sido examinada por su efecto de inducir micronúcleos en linfocitos humanos. Además se ha reportado que la DOX es citotóxica y mutagénica en bacterias y en varios tipos de células mamíferas (Dhawan *et al.* 2003).

La dosis escogida para los ensayos como control positivo fue de 0,1 uM, la cual se estableció mediante una curva dosis dependiente, luego de ensayar con varias concentraciones.

3.4.2. Evaluación del efecto citostático en células MCF-7

Para determinar el posible efecto citostático de la Argentatina B se empleó la técnica de Índice de proliferación celular, se utilizaron células MCF-7 (cáncer de mama) realizando tres experimentos independientes por duplicado mediante el siguiente proceso:

- Previo a la siembra se colocó un cubre objetos en cajas de 1 cc.
- Se sembraron 3×10^5 células en cajas de 1 cc con medio RPMI suplementado.
- Se incubaron los cultivos a 37°C y 5% de CO_2 .
- A las 24 horas se lavaron los cultivos con 1000 uL de PBS, se le añadió 1000 uL de RPMI suplementado, seguidamente se agregó 33 uL de Citocalasina B (4.5mg/ml) y se trataron con DMSO, Argentatina B y DOX; 0,5%; 5, 15 y 25 uM; y 0,1 uM respectivamente. (Tabla 2)
- Se incubaron durante 24 horas más a 37°C y 5% de CO_2 .
- Transcurrido el tiempo de tratamiento se desechó el medio.
- Inmediatamente se adicionó lentamente 1000 ul de fijador de carnoy 3:1 (metanol: ácido acético), luego de 1 min de desecho el fijador de carnoy. Se repitió 3 veces este proceso.
- Se colocó en porta objetos los cubre objetos que contenían las cajas y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se procedió a realizar la tinción que consistió en colocar eosina a los porta objetos durante 20 min, luego giemsa por 10 min, se los enjuagó con agua destilada y se dejó secar para luego evaluar al microscopio.
- En la evaluación del efecto citostático se determinó la frecuencia de células mono-, bi- y polinucleadas analizando 200 células por placa; y con estos datos se calculó el Índice de división Nuclear usando la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = \{\text{CMN} + 2 (\text{CBN}) + 3 (\text{CPN})\} / \text{N}$$

3.4.3. Evaluación del efecto genotóxico en células MCF-7

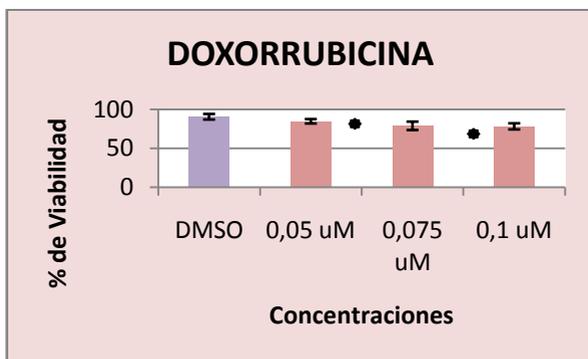
El efecto genotóxico de la Argentatina B se evaluó en el microscopio empleando las mismas preparaciones con las que se evaluó el efecto citostático. Se analizó las frecuencia de CBN con Micronúcleos en un total de 1000 células binucleadas por placa.

4. RESULTADOS

4.1. DOXORRUBICINA (DOX)

4.1.1. Actividad citotóxica de la Doxorrubicina (DOX)

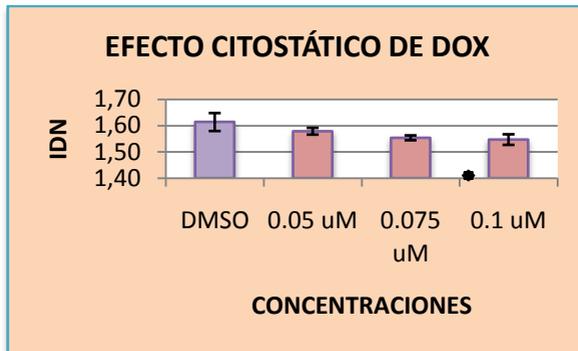
En la gráfica No. 1 podemos observar el efecto en la viabilidad celular producido por la exposición a DOX; la viabilidad disminuye al incrementar las dosis de DOX, pero en ninguno de los casos es menor al 70%. De acuerdo con la prueba bilateral de Dunnett se concluyó que hay diferencia significativa entre el control y las dosis de 0.075 y 0.1 uM.



Gráfica No. 1 Porcentaje de viabilidad (FDA) de MCF-7 tratados con Doxorubicina. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado. $P < 0.001$

4.1.2. Efecto citostático de la Doxorrubicina

Para evaluar la citostaticidad de la DOX se realizaron tres experimentos independientes por duplicado, para lo cual se utilizó un control negativo (DMSO 0.1%). Al analizar los resultados mediante la prueba bilateral de Dunnett se puede observar en la Gráfica No. 2 que la DOX (0.1uM) sí tuvo efectos citostáticos estadísticamente significativos.

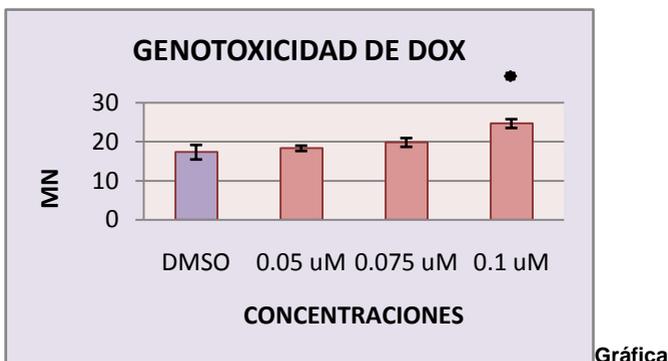


Gráfica No. 2 Índice de división nuclear calculado para la Doxorubicina. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P < 0,05$.

4.1.3. Efecto genotóxico de la Doxorubicina

Se determinó el efecto genotóxico de la DOX en función de la frecuencia de micronúcleos en CBN.

Se puede observar en la grafica 3 que la Doxorubicina (0.1uM) mostró efectos genotóxicos estadísticamente significativos, conclusión obtenida mediante la prueba bilateral de Dunnett.



No. 3 Efecto de la Doxorubicina en relación al control negativo (DMSO 0.1%) sobre la frecuencia de CBN con MN. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P > 0,001$

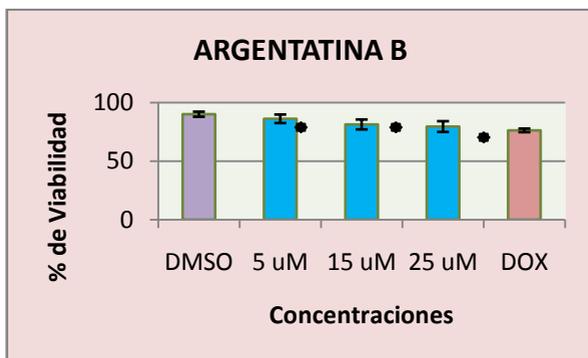
4.2. ARGENTATINA B (ARG B)

Como se mencionó anteriormente, se sabe que la Argentatina B ha presentado actividad citotóxica dependiente de la concentración en linfocitos humanos; basados en ello, en el presente trabajo para determinar los posibles efectos citostáticos y genotóxicos de este triterpeno se determinó el efecto de la argentatina B en la viabilidad de células MCF-7. Lo cual nos llevó a establecer las dosis subtóxicas.

4.2.1. Actividad citotóxica de la Argentatina B

En la Gráfica No. 4 se puede observar que conforme aumenta la dosis de la Argentatina B, la viabilidad disminuye gradualmente. Igual que en el caso de la DOX la viabilidad de todas las dosis evaluadas es mayor al 70% como lo muestra la gráfica No. 4. Una vez realizado el análisis estadístico mediante la prueba bilateral de Dunett se observa una diferencia

significativa entre las dosis de la Argentatina (15 y 25 uM) y la de DOX (0.1 uM) frente al control negativo (DMSO).

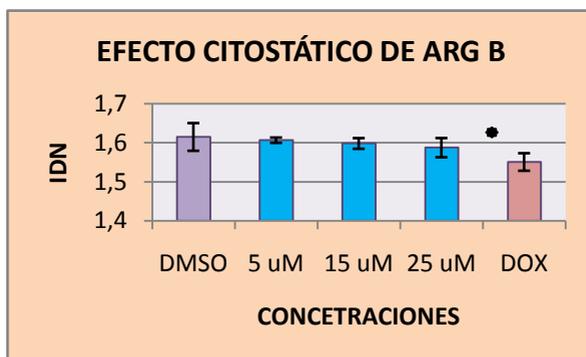


Gráfica No. 4 Porcentaje de viabilidad de MCF-7 tratadas con Argentatina B y DOX (0.1uM). Cada barra representa la media de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar cada uno por duplicado. $p < 0,001$

4.2.2. Efecto citostático de la Argentatina B

Para evaluar la citostaticidad de la Argentatina B se realizaron tres experimentos independientes por duplicado, para lo cual se utilizó un control negativo (DMSO 0.1%) y un control positivo (DOX 0.1uM).

Al realizar el análisis estadístico de los resultados mediante el mediante la prueba bilateral de Dunett se llegó a la conclusión de que la Argentatina B no tuvo efectos citostáticos estadísticamente significativos, lo cual, podemos observar en la gráfica No. 5

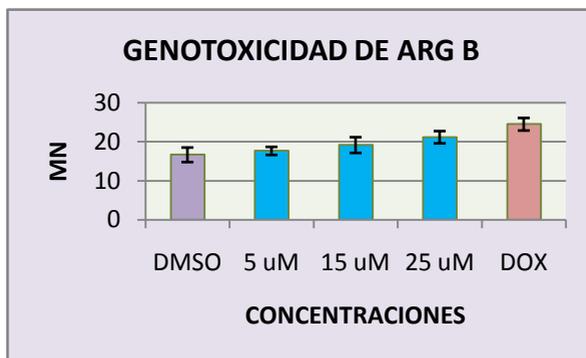


Gráfica No. 5 Índice de división nuclear calculado para las células MCF-7 tratados con Argentinina B. La doxorubicina se empleó como control (DOX) a 1 μ M. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P < 0.001$.

4.2.3. Efecto genotóxico de la Argentinina B

Se determinó el efecto genotóxico de la Argentinina B en función de la frecuencia de micronúcleos en CBN. Para ello se analizaron los resultados mediante la prueba bilateral de Dunnett.

Como se observa en la Gráfica No. 6 la Argentinina B a ninguna de las concentraciones probadas mostró efectos genotóxicos estadísticamente significativos, aunque existe una tendencia a incrementar el número de MN conforme aumenta la concentración.



Gráfica No. 6 Efecto de la Argentatina B (5, 15, y 25 uM) y DOX (0.1 Um) sobre la frecuencia de CBN con MN. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. $P > 0,001$

5. DISCUSIÓN:

Como ya se mencionó anteriormente los triterpenos más estudiados son: el ácido ursólico y el ácido oleanólico. En cuanto al ácido ursólico se sabe que es inductor de apoptosis por activación de la caspasa 3, inhibe la expresión de la ciclooxygenasa II, inactiva la proteincinas C, citostático entre otras características (Falkiewicz, 2006). Por otro lado se sabe también que el ácido oleanólico posee actividad citotóxica sobre varias líneas celulares cancerosas entre ellas las células MCF-7 (cáncer de mama), lo que hace que los triterpenos de este tipo sean muy útiles en el desarrollo de antineoplásicos (Falkiewicz, 2006, Parra, 2006).

Por alrededor de 17 años el ensayo de CBMN ha sido conocido como un método eficaz para la medida de

rotura cromosómica, pérdida cromosómica, no disyunción, necrosis, apoptosis y citostaticidad (Fenech M et al., 2002) por lo cual es usado como una prueba de genotoxicidad y para biomonitoreo de exposición a genotóxicos y sus efectos en humanos. (Norppa H et al., 2003). En 1985 Fenech y Morley introdujeron el uso de la citocalasina B (Cyt B), que inhibe la polimerización de la actina requerida para la formación del anillo de microfilamentos que participa en la división del citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis. (Fenech M et al., 2006). Años más tarde Fenech (2000) propuso la determinación del índice de división nuclear (IDN) en linfocitos en proliferación cuya citocinesis ha sido inhibida con citocalasina B, como parámetro de citostaticidad. Además, durante la determinación del IDN, es posible determinar los efectos genotóxicos de una sustancia de prueba por medio de la cuantificación de los linfocitos binucleados que presentan micronúcleos (Fenech, 2000).

En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico de la Argentatina B en células MCF-7, conocido como un triterpeno tipo cicloartano, aislada a partir de la resina, subproducto del proceso de industrialización de la especie *Parthenium argentatum*. La línea celular MCF-7 es una de las más sensibles al efecto citotóxico de la Argentatina B (CI50 = 33.06 μ M) (Parra, 2006). Además la Argentatina B no incrementa el número de MN en linfocitos humanos, razón por lo cual se escogió a las células MCF-7, línea celular con el objetivo de determinar si la Argentatina B, induce o no el aumento de MN .

Dentro de nuestros objetivos nos planteamos establecer las dosis subtóxicas a probar, puesto que para determinar los posibles efectos citostáticos de un compuesto de prueba, en el modelo biológico a probar debe existir una viabilidad mayor al 70%. En nuestro caso, como se puede observar en la gráfica 4,

conforme aumenta la dosis de la Argentatina B la viabilidad disminuye gradualmente, en donde a 15 uM y 25 uM se observa una disminución de viabilidad estadísticamente significativa frente al control negativo (DMSO 0.1%). Pero en ninguna de las dosis se comprometió la viabilidad de las células MCF-7, puesto que se observó una supervivencia mayor al 70%.

Una vez que se determinó que las dosis a probar eran subtóxicas se procedió a evaluar el efecto citostático de la Argentatina B, como podemos observar en la Gráfica No. 5 ninguna de las tres dosis probadas de Argentatina B (5, 15 y 25 uM) presentó efecto citostático estadísticamente significativo en las células MCF-7. Comparando nuestros resultados con los de *Parra et al.*, encontramos diferencia en la actividad citostática de la Argentatina B en donde encontraron que el IDN disminuyó de 1,8 (DMSO) a 1.4 (Mitomicina C) mientras que en nuestro caso el IDN disminuyó de 1,6 (DMSO) a 1,4 (DOX), probablemente dichas diferencias se debe principalmente al modelo biológico empleado; puesto que como ya se sabe las líneas celulares tumorales se caracterizan por una serie de mutaciones en los mecanismos de control que regulan la proliferación, diferenciación y muerte de las células, probablemente estos cambios hacen que en las MCF-7, la Argentatina B no actué como citostático a las concentraciones probadas, demostrando que las vías que se activan por efecto de la Argentatina B son diferentes en la línea tumoral y los linfocitos humanos en proliferación.

Además, empleando el ensayo de CBMN la Argentatina B no produce un aumento en el número de Micronúcleos en linfocitos humanos (Parra, 2006). Por otro lado la Argentatina B puede incrementar el daño genotóxico medido según el ensayo cometa, Ramirez et. al. (2008), probablemente debido a daño de tipo oxidativo, ya que generalmente los triterpenos producen este tipo de daño.

Por lo mencionado anteriormente podemos suponer que la Argentatina B no provoca daño al ADN como resultados de eventos clastogénicos o aneugénicos medidos por el Ensayo de CBMN, pero si puede causar un efecto directo al ADN los mismos que pueden ser detectados por el Ensayo cometa en linfocitos humanos.

En nuestra evaluación del efecto clastogénico y aneugénico de la Argentatina B, calculado en función de la frecuencia de micronucleos, se observa en la Gráfica No. 6 que aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dosis probadas, existe una tendencia de tipo dosis-respuesta, puesto que conforme aumenta la concentración de Argentatina B incrementa el número de MN.

Nuestros resultados corroboran los expuestos por Parra 2006 en el que de igual manera encontraron que ninguna de las argentatínas (A y B) son genotóxicas en linfocitos humanos calculada en función de la frecuencia de MN.

Sin embargo, cabe mencionar que los resultados obtenidos de la DOX no fueron los esperados, es decir, no se escogió el control positivo adecuado, le atribuimos ello a que posiblemente el reactivo no fue manipulado adecuadamente de tal forma que alteró su mecanismo de acción, por ello no produjo los efectos citostáticos, citotóxicos y genotóxicos esperados.

Para finalizar, la conclusión más importante en nuestro proyecto de tesis es que nuestros resultados demuestran que la argentatina B no fué capaz de inducir daño genotóxico como resultado de un evento clastogénico o aneugénico (grafica No. 3).

Tomando en consideración los antecedentes biológicos de la Argentatina B (cicloartano), así como la naturaleza química y los resultados expuestos anteriormente podemos sugerir extender el estudio de la Argentatina B. Es ampliamente conocido que la mayoría de los agentes antineoplásicos existentes en la clínica posee entre sus efectos adversos, efectos genotóxicos, los mismos que no poseen la Argentatina B, constituyendo un buen candidato para en un futuro desarrollar medicamentos contra el cáncer.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. CONCLUSIONES

- Las concentraciones probadas de Argentatina B no afectan la viabilidad de las células MCF-7, puesto que presentó una supervivencia mayor al 70%.

- La Argentatina B no tiene actividad citostática en la línea celular MCF-7 evaluado mediante el IDN,.
- La Argentatina B no produce daño genotóxico in vitro a concentraciones de 5, 15 y 25 uM en células MCF-7 evaluado mediante MN.

7. BIBLIOGRAFIA:

Aguilar M., Dehesa Z., 2005. Análisis del perfil de proteínas nucleares en células tumorales mcf 7 durante la inhibición de la apoptosis inducida por tnf, mediada por dexametasona. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.13 al 18 noviembre 2005; Oaxaca, Oaxaca.

Albertini R, Anderson D, Douglas G, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan A, Norppa H, Shuker D, Tice R, Waters M, Aitio A. 2000. IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. Mutation Research 463, 128 – 135

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, (404) 320.3333 [on line]. http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PW_secured.pdf

Astudillo A. 2006. Estudio citotóxico de plantas medicinales de la región sur del Ecuador: *Baccharis latifolia*, *Callisia repens*, *Crotalaria ssp.* *Gynoxis verrucosa*, *Ludwigia peruviana*, *Piper barbatum* y *Tagetes filifolia*, en la línea celular CHO-K1. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

Béjar, E., 2001. Herbs of southern Ecuador : a field guide to the medicinal plants of Vilcabamba = Hierbas del sur ecuatoriano : una guía de las

plantas medicinales de Vilcabamba. 1st ed. Spring Valley, Calif.: LH Press. 352.

Bianchi L, Tateó F, Pizzole R, Stivale LA, Grazia Veni M, Melli R, Santamaría L. 1993. Carotenoid reduce the chromosomal damage induced by bleomycin in human cultured lymphocytes. *Anticancer Research* 13 1007-1010.

Brunneton J., 2001. *Farmacognosia*. Segunda ed. Editorial Acriba. Zaragoza- España.

Buitron C. X, 1991. Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación [on line].

<http://www.traffic.org/ecuador/ecuador-acknowledgements.pdf>

Darrell S Rigel, Robert Friedman, Leonard M. Dzubow, Douglas S. Reintgen, M.D., Jean-Claude Bystry, Robin Marks, 2007, *Cancer de Piel*. Elsevier 425-426.

Devi P, Rao B, R Kamath . A method to score micronuclei in vivo using cytochalasin B. 1998. *Induced cytokinesis block*. *Mutation Research* 401 33-37

Fenech M, Morley AA. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 147 29-36.

Fenech M., 1998, Important variables that influence base- line micronucleus frequency in cytokinesis-block lymphocytes – a biomarker for DNA damage

in human populations. *Mutation Research* 404. 155-165.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* **455**: 81-95.

Fenech M, Chang W, Kirsch M, Holland N, Bonassi S, Zaiger E, 2003. Human projecto: detail description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronúcleos assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 584, 65-75

García F, 2000. Evaluación de los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de la argentatina A y B. Tesis de grado previa a la obtención del título de Química Farmacéutica bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Garrido H, Yunga E. 1997-2003. Incidencia de Cáncer en Loja. Registro de Tumores. Solca-Loja. [on line]
http://www.loja.gov.ec/loja/images/stories/geoloja/ca_pitulo4.pdf

González M., 2003. Servicio de Protección da Saúde fronte a Riscos específicos. Subdirección Xeral de programas de Saúde Pública. Dirección Xeral de Saúde Pública. Consellería de Sanidade. Xunta de Galicia, Agentes citostáticos, Ministerio de Sanidad y Salud.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.

Hanahan D, Weinbert R. 2000, The hallmarks of cáncer. Cell, Vol. 100, 57 -70.

Hartwell J. L. 1982. Plants used against cancer. Quarterman, Lawrens, MA.

Katzung, B.G. 1999. Farmacología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. México, Séptima edición, 1011-1013

Kirsch-Volders M, Fenech M. 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. Mutagenesis; 16: 51-58

Laza L. D., Rodríguez L. I. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. ISSN 1028-4796 [online]. ecimed@infomed.sld.cu. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issues&pid=10284796&lng=es&nrm=iso

Liby K., Yore Mark., Sporn M., 2007. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. Nature Reviews Cancer. 337-366.

Lindholm P. Cytotoxic Compounds of Plant Origin (Biological and Chemical Diversity). Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from The Faculty of Pharmacy. Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala. 2005.

Marquez S, Oliveira N, Chaveca T, Rueff J, 2002, Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. *Mutation Research* 517. 39–46

Mudry M, Carballo M. 2006. *Genética Toxicológica*. Editorial De los cuatro veintos. Argentina.

Muñoz W. 2007. Evaluación del Potencial mutagénico y antimutagénico de los extractos totales de *Baccharis latifolia* (Rú & Pav.) pers., *Ludwigia peruviana* L., *Callisia repens* (Jacq.) L., mediante el ensayo de retromutación en *Salmonella typhimurium*. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

Navarrete A, Reyes B., 1991. III Jornada Herbolaria sobre Herbolaria Medicinal en Veterinaria, UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 60-63.

Norppa H, Falck G. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* vol. 18. 23-35

Oliveira R, Ribeiro L, Da Silva A, Matuo R, Mantovani M. 2006. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of B-glucan from barley in CHO –K an HTC cel lines using the micronúcleos test. *Toxicology in vitro*

Organización Mundial de la Salud. 2008. El Cáncer.[online]<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/print.html>

Parra Delgado H., García F, Sordo M., Ramírez T., Martínez M., Ostrosky P. 2005. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatina A and Argentatina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences* 77, 2844-2865.

Paz y Miño C, Creus A, Cabre O, Leone P. 2002. Genética Toxicológica y carcinogénesis, PUCE/FUNDACYT.

Place A.E., Suh N., Williams C.R., Risingsong R., Honda T., Honda Y., Gribble G.W., Leesnitzer L.M., Stimmel J.B., Willson T.M., Rosen E., Sporn M.B. 2003. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-Imidazole, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. *Clinical Cancer Research* 9: 2798-2806.

Pradillo P, 2002. Farmacología Antineoplásica. [on line]. www.um.es/global. Febrero 2007.

Ramírez M., 2008. Estudio genotóxico de Argentatina b mediante ensayo cometa en linfocitos humanos. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímica Farmaceutica. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

Rath A., 2007, Avances de la investigación celular en la lucha contra el cáncer. 6-8. [on line] http://www.stopping-cancer-naturally.org/pdf/brochure_es.pdf

Reddy L., Odhav B., Bhoola K.D. 2003. Natural products for cancer prevention: a global

perspective. *Pharmacology and Therapeutics* 99, 1-13.

Rodeiro, L. Cancino, J.E. González, J. Morffi, G. Garrido, R.M. González, A. Núñez, R. Delgado. 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*.

Rodríguez I, Valdés Y, Proveyer S, 2004. Citostáticos: Medicamentos Reisgosos. Instituto Nacional de Oncología y Radiología, Instituto de Farmacia y Alimentos. *Rev. Cubana Med* 43, 2 – 3.

Scarpato, A. Bartoli, A. Naccarati, L. Migliore, L. Cochi, R. Barale, L. Pistelli. 1998. Different effects of newly isolation saponins on the mutagenicity and cytotoxicity of the anticancer drugs mitomycin C and bleomycin in human lymphocytes. *Mutation Research* 420. 49-54

Setzer W.N., Setzer M.C., Bates R.B., Jackes B.J. 2000. Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, North Queensland, Australia. *Planta Medica* 66: 176-177

Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B. B. 2003. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of IKK kinase and p65 phosphorylation: Correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Research* 63: 4375-4383.

Toledo Z, 2007. Evaluación genotóxica del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* mediante ensayo CBMN en linfocitos humanos. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica. UTPL Loja – Ecuador.

The global Bioresource Center (ATCC). [on line]. www.atcc.org

Verschaev L, Kestens V, Taylor J.L.S, Elgorashi E.E, Maes A, Van Puyvelde L, De Kimpe N, Van Staden J, 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts, *Toxicology in vitro* 18 29-35

Vintimilla A., 2007. Estudio genotóxico de extractos metanólicos de plantas medicinales: *Baccharis latifolia* y *Gynoxis verrucosa*, mediante ensayo cometa en la línea celular CHO K-1. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

Yepez J. 2006. Instituto Nacional de tumores. Quito-Ecuador.

Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A, 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Mutation Research* 28. 227-236.

Zaragoza, T, Malagón O and Tene V, 2003. Estudio Entnomédico de las Plantas de las Provincias de Loja y Zamora–Chinchipec. 2003, Universidad Técnica Particular de Loja.