



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“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.”

Previo a la obtención del título
de Bioquímico Farmacéutico

AUTORA:

Carla Belen Ojeda Ojeda

DIRECTORA:

Dra. Natalia Bailón Moscoso

Loja – Ecuador
2010

Dra.
Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

CERTIFICA:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por la Srta. Carla Belen Ojeda Ojeda, previo a la obtención del Título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, diciembre 2010

Dra. Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA

AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías, esquemas, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autora.

Carla Belen Ojeda Ojeda

DEDICATORIA

Dedicado a:

Mi Familia, quienes con su amor, fuerza de voluntad, confianza en Dios, apoyo, perseverancia, templanza, esfuerzo, paciencia, lealtad e ideología, supieron hacer de mí una persona íntegra, enseñándome a soñar, tener visión del futuro, ir tras mis sueños y alcanzarlos como una realidad.

Todas aquellas personas que algún día necesitarán mi servicio profesional o simplemente una amiga con quien contar, por ser fuerza vital durante mi vida estudiantil, ya que cuando el cansancio me vencía yo me daba valor diciendo: “Hay que hacerlo no por mí, sino por las personas que serán mis pacientes”.

Esos seres humanos excepcionales, héroes anónimos que cada día con su forma de actuar, son ejemplo de vida, que se esfuerzan por ir más allá de las estrellas, cuyo único límite es el horizonte y llegan a dar la vida para no abdicar de sus convicciones morales.

Carla Belen

AGRADECIMIENTO

En primera instancia guardo enorme gratitud a Dios mi fuente de amor, inspiración y bendiciones, por permitirme tener el valor para luchar mis sueños, darme la fortuna de encontrar en el recorrido de mi vida personas buenas, leales y muy valiosas.

Mi Familia piedra angular de mi vida, gracias por haber hecho de mí quien soy, sin cada uno ustedes no sería la persona que estoy feliz de ser hoy en día pero que está en constante batalla por mejorar.

Reconociendo el gran aporte que han tenido en mi vida, expreso mi más sincero agradecimiento a:

La Universidad Técnica Particular de Loja resaltando la labor de su Rector, Docentes, Personal administrativo y Técnico.

La Escuela de Bioquímica y Farmacia en la persona de la Dra. Paula Torres y la Bq. Gabriela Cevallos, en la que siempre me acogieron para ayudarme en mis problemas académicos.

La Dra. Natalia Bailón, Directora de mi tesis, que me permitió ingresar a la familia de Genética Toxicológica, desarrollar capacidades que no conocía que poseía.

Todos los que considero mis amigos, que por obvias razones no nombrare, pero que ustedes saben que pueden contar conmigo en las buenas, en malas y en las situaciones imposibles; por su apoyo en mis días grises y por alegrarse con mis logros, les manifiesto gracias de todo corazón.

A cada uno de mis amigos y compañeros de todas las Áreas del Centro de Biología Celular y Molecular, en especial de Genética Toxicológica; que aunque hubieron instantes muy difíciles de un típico “que estrés”, también existieron momentos de risa, diversión y esparcimiento, en los que todos nos escuchaban a lo lejos porque hay que reconocer que hablo “un poquito alto”.

Carla Belen

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Carla Belen Ojeda Ojeda declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 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 investigadores, trabajos científicos, técnicos o tesis de grado que se realicen a través, con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Carla Belen Ojeda Ojeda
AUTORA

Dra. Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA DE TESIS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁG.
Certificación	i
Autoría	ii
Dedicatoria	lii
Agradecimiento	iv
Contrato de Cesión de Derechos de Tesis	v
Índice de Contenidos	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Fotografías	viii
Índice de Tablas	viii
Resumen	ix
Abstract	x
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Cáncer:	1
1.1.1 Definición:	1
1.1.2 Características del cáncer.	4
1.1.3 Estadísticas de cáncer a nivel mundial, en Latinoamérica, el Ecuador y Loja.	4
1.1.4 Tratamiento.	6
1.2 Antineoplásicos:	8
1.2.1 Propiedades buscadas en un antineoplásico.	10
1.2.2 Tipos de moléculas utilizadas como antineoplásicos.	10
1.3 Citotoxicidad:	11
1.3.1 Aplicación e importancia del screening primario en líneas celulares tumorales.	11
1.3.2 Tipos de ensayos de citotoxicidad según su blanco.	11
1.3.3 Estrategias de búsqueda de antineoplásicos.	13
1.3.3.1 Sistema de tamizaje según el Instituto Nacional del Cáncer.	13
1.3.3.2 Tinción con violeta cristal.	14
1.4 Antineoplásicos de origen natural.	16
1.4.1 Especies vegetales y metabolitos secundarios estudiados en la presente investigación.	16
1.4.1.1 <i>Annona montana</i> Macfad:	16
1.4.1.1.1 Descripción taxonómica.	17
1.4.1.1.2 Descripción morfológica.	18
1.4.1.1.3 Uso en la medicina tradicional.	18

1.4.1.2	<i>Oreopanax andreanus</i> Marchal	20
1.4.1.2.1	Descripción taxonómica.	20
1.4.1.2.2	Descripción morfológica.	21
1.4.1.2.3	Uso en la medicina tradicional.	21
1.4.1.3	dehidroleucodina.	22
1.4.1.4	acetato de β -amirina y friedelina.	24
2.	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo General	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	Líneas Celulares	28
3.2	Condiciones de cultivo	29
3.2.1	Conteo Celular	29
3.3	Extractos vegetales y metabolitos secundarios en estudio.	29
3.3.1	Preparación de dosis para tratamiento	30
3.4	Tinción con violeta cristal (CVS).	31
3.5	Ensayos	31
3.5.1	Determinación del punto de saturación por pocillo.	31
3.5.2	Estandarización mediante curvas dosis-respuesta con doxorubicina.	32
3.5.3	Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> para tamizaje primario.	32
3.5.3.1	Descripción del procedimiento de valoración citotóxica <i>in vitro</i> de extractos vegetales y metabolitos secundarios.	32
3.6	Análisis estadístico	35
4.	RESULTADOS	36
4.1	Estandarización de la densidad celular mediante curvas de saturación en RKO (cáncer de Colon) para el ensayo CVS.	36
4.2	Estandarización mediante curvas dosis-respuesta.	37
4.3	Evaluación de la sensibilidad de líneas celulares tumorales humanas a extractos o metabolitos secundarios de origen vegetal.	38
4.4	Determinación de la IC ₅₀ .	40
5.	DISCUSIÓN	42
6.	CONCLUSIONES	47
8.	BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
1. Proceso de la carcinogénesis.	2
2. Agentes de iniciación carcinogénica.	3
3. Tipos de cáncer en relación con el sexo.	5
4. Principales tipos de muertes causadas por antineoplásicos.	8
5. Visión microscópica de la tinción con violeta cristal.	15
6. Tinción de violeta cristal en multiplacas de 96 pocillos.	15
7. Fórmula estructural de la DhL.	23
8. Estructura química del acetato de β -amirina.	25
9. Fórmula química de la friedelina.	26
10. Procedimiento del ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> de tinción con violeta cristal (CVS).	34
11. Curva de saturación en la líneas celular tumoral RKO.	36
12. Curva dosis-respuesta de doxorubicina.	37
13. Curva de respuesta de la línea celular A-549 expuesta al extracto de <i>A. montana</i> (AcOEt).	40

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA	PÁG.
1. <i>Annona montana</i> Macfad.	17
2. Fruto de <i>Annona montana</i> .	18
3. <i>Oreopanax sp.</i>	21
4. <i>Gynoxis verrucosa</i> .	23
5. <i>Clusia latipes</i> .	24
6. Panel de líneas celulares tumorales.	28

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁG.
1. Cifras de defunciones a nivel mundial por cáncer en el 2007.	5
2. Clasificación de agentes quimioterapéuticos.	10
3. Descripción del tamizaje primario y de la IC ₅₀ .	35
4. Concentración de doxorubicina capaz de inhibir el 50 % de la población celular en diversas líneas tumorales humanas.	38
5. Porcentajes de inhibición en panel celular expuesto a extractos de especies vegetales mediante tamizaje primario.	39
6. Porcentajes de inhibición de líneas celulares tumorales expuestas a metabolitos secundarios mediante tamizaje primario.	39
7. Concentración inhibitoria del 50 % de la población celular en líneas celulares tumorales humanas.	41

RESUMEN

Actualmente, la investigación de especies vegetales para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad anticancerígena sigue siendo promisoría. Una herramienta válida para la caracterización de perfiles de sensibilidad, es el ensayo de tinción con violeta cristal (CVS), que permite descartar extractos y moléculas no citotóxicas. Logrando así una valoración citotóxica *in vitro* efectiva en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios. En este estudio se encontró que el extracto en diclorometano de *Oreopanax andreanus* y los metabolitos secundarios de *Clusia latipes*, friedelina y acetato de β -amirina, pese a la información etnobotánica donde son reconocidas dentro de la medicina tradicional, no inhibieron el crecimiento en líneas celulares tumorales. En contraste, la *Annona montana*, presentó un efecto inhibitorio (citotóxico), en todas las líneas celulares, el cual es dependiente del disolvente de extracción, ya que el extracto en acetato de etilo mostró ser más citotóxico que el metanólico. De manera similar, la dehidroleucodina (metabolito secundario de *Gynoxis verrucosa*) tuvo efecto inhibitorio en las líneas celulares probadas, siendo la IC_{50} calculada mucho menor a la de algunos fármacos que en la actualidad son utilizados en la quimioterapia de cáncer, además se halló cierta especificidad por la línea tumoral D-384 (astrocitoma).

Palabras claves: tinción con violeta cristal, citotoxicidad, dehidroleucodina, *Annona montana*.

ABSTRACT

The research of species for the new molecules discovery with anticancer activity is currently a field very studied. For this, a valid tool for the sensitivity profiling is the crystal violet staining (CVS) that permits discard extracts and non-cytotoxic molecules. So, we can assessment *in vitro* cytotoxic effect on early stages of selection of promising compounds. This study found that the extract in dichloromethane of *Oreopanax andreanus* and secondary metabolites of *Clusia latipes*, friedelin and β -amyrin acetate, despite the ethnobotanical information and be recognized in traditional medicine, it did not showed inhibit growth of tumor cell lines. The *Annona montana* extracts presented an inhibitory effect (cytotoxic) in all cell lines, which is dependent on the extraction solvent, since the ethyl acetate extract was more cytotoxic effects than methanol. On the other hand, dehydroleucodine (DhL) showed inhibitory effects in all cell lines tested; it has specificity for D-384 tumor cell line (astrocytoma). In addition, DhL presented an IC_{50} lower than some drugs, which they are currently applied in the treatment of cancer.

Keywords: crystal violet staining, cytotoxicity, dehydroleucodine, *Annona montana*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Cáncer:

Durante milenios, el proceso que conllevan las enfermedades es el principal campo que la humanidad busca entender en detalle, entre estas el cáncer, en todas sus formas, siendo pobremente entendido, temido y normalmente letal (Mukherjee *et al.*, 2001).

1.1.1 Definición:

El cáncer es un complicado conglomerado de enfermedades, caracterizadas por la proliferación descontrolada y diseminación de células anormales, ocasionadas por cambios múltiples en la expresión de genes que controlan el equilibrio entre la división, la diferenciación y la muerte celular (Ponder B, 2001; Yoder B, 2005).

Anteriormente, esta enfermedad fue considerada como un grupo heterogéneo de desórdenes relacionados, que era a menudo diagnosticado en base a rasgos macroscópicos, tales como una masa, crecimiento implacable y propagación dada por metástasis (Mukherjee *et al.*, 2001). En la actualidad, el cáncer es un término genérico para denominar a un conjunto de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier órgano del cuerpo, donde exista crecimiento tisular patológico.

El desarrollo del cáncer, o carcinogénesis (fig. 1), se define como un proceso multifase de alta complejidad, que puede requerir varios años para su progreso, en el cual se describen una serie de eventos que transforman una célula normal en cancerígena (Ruddon, 2007). Estos estadios en un futuro llevan a un último resultado de invasividad o metástasis, que es el final de esta enfermedad crónica proliferativa, donde propiamente se le llama cáncer (Kingham *et al.*, 2003).

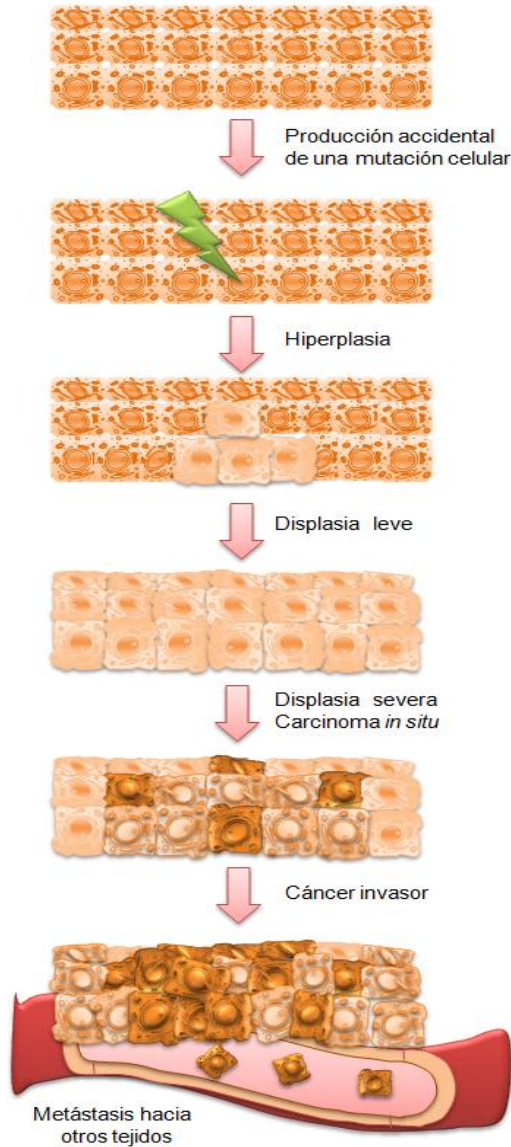


Figura 1. Proceso multifase de la carcinogénesis.
Fuente: Autor.

El agente de iniciación que ocasiona el desarrollo del cáncer se denomina carcinógeno, término que describe a cualquier sustancia o agente físico (luz U.V. y radiación ionizante), químico (asbesto y humo de cigarrillo) o biológico (infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos), los cuales incrementan la incidencia de tumores, algunos de los factores más conocidos son el cigarrillo, sustancias tóxicas, fármacos, entre otros (fig. 2).



Figura 2. Agentes de iniciación carcinogénica. **Fuente:** Autor.

Los carcinógenos pueden ser neutralizados mediante: excreción (químicos), desactivación (químicos o físicos en el caso de la radiación), o inhibición (biológicos) después de ingresar al organismo. Hay un riesgo alto que cualquier carcinógeno que no sea neutralizado por uno de estos mecanismos, puede activar a

una célula normal induciendo en el futuro a una mutación genética (Lindholm P, 2005).

1.1.2 Características del cáncer.

Los organismos han desarrollado mecanismos que mantienen la integridad genómica, induciendo la detención del ciclo celular en respuesta al daño del ADN. Estos mecanismos de control permiten la reparación del daño en el ADN, antes que la progresión del ciclo celular continúe o, si el daño es demasiado extenso, estos activan apoptosis o senescencia celular; es así que, los puntos de control defectuosos pueden producir inestabilidad genómica y llevar a la transformación de células normales en células tumorales (Motoyama & Naka, 2004).

Por los antecedentes ya mencionados, el cáncer es considerado como el resultado de la mutación de genes que regulan el crecimiento, sobrevivencia, diferenciación y muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2000; Sherr C, 2004; Hahn W, 2004). Estos cambios genéticos que subyacen a la oncogénesis alteran varias propiedades fundamentales de las células, de manera que les permiten evadir controles de crecimiento normales y les confieren un fenotipo de cáncer completo caracterizado por:

- ⊕ Autosuficiencia de señales de crecimiento.
- ⊕ Evasión de la apoptosis.
- ⊕ Angiogénesis.
- ⊕ Insensibilidad a señales de inhibición de crecimiento.
- ⊕ Potencial de replicación ilimitado.
- ⊕ Metástasis.

1.1.3 Estadísticas de cáncer a nivel mundial, en Latinoamérica, el Ecuador y Loja.

Datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2007, establecieron que el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial, es decir fallecieron en el mundo 7,9 millones de personas por alguna neoplasia, que representan el

13 % de las defunciones generales. Los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial (ordenados según el número de defunciones mundiales) varían según el sexo (figura 3), estableciéndose con mayor incidencia en mujeres el cáncer de mama, y en hombres el de pulmón.

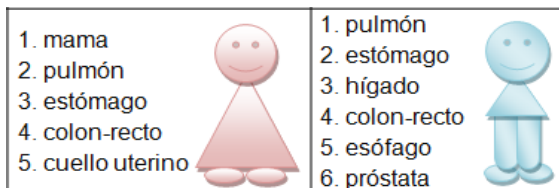


Figura 3. Tipos de cáncer en relación con el sexo.
Fuente: OMS, 2008.

De acuerdo con las estimaciones de la OMS, se proyecta que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015; y se espera que las muertes sigan en aumento y alcancen 11,8 millones de casos para el 2030. Además establecieron que los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual en el 2007 son el de pulmón, estomago e hígado, mostrados en la tabla 1:

Tabla 1. Defunciones mundiales por cáncer.
Fuente: OMS 2008.

CÁNCER	DEFUNCIONES
Pulmón	1 400 000
Estómago	866 000
Hígado	653 000
Colon	677 000
Mama	548 999

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en los indicadores básicos de las Américas para el 2007, el cáncer es la segunda causa principal de muerte en América Latina y El Caribe, donde se produjeron unas 480.000 defunciones por cáncer en el 2005. De acuerdo al INEC, en el Ecuador, al igual que en América Latina, la mortalidad por cáncer se ha

incrementado, siendo el gástrico más prevalente en la población tanto en hombres como en mujeres (Garrido H, *et al.*, 2003; Calderón A, *et al.*, 2006).

Los indicadores básicos de salud para el Ecuador, muestran que en la provincia de Loja el cáncer es la segunda causa de mortalidad con un 12,9 % de las defunciones, después de las enfermedades cardiovasculares, seguido por las enfermedades hipertensivas, diabetes mellitus e infecciones (MSP, 2009).

1.1.4 Tratamiento.

Con un mejor entendimiento de la patofisiología e historia natural de la enfermedad, el escenario es rápidamente cambiante en torno al cáncer. El área de la terapéutica ha ganado enorme atención de todos los científicos alrededor del mundo (O'Neil *et al.*, 1993; Hartwell J, 1967).

La quimioterapia ha sido utilizada en el tratamiento del cáncer por más de 50 años, a veces en combinación o paralelamente con cirugía y radioterapia, demostrando ser una de las estrategias más eficaces para tratar dicha enfermedad (Lindholm P, 2005; Stehman *et al.*, 2003).

El fundamento de la quimioterapia ortodoxa, se basa en el uso de fármacos que inhiben el desarrollo descontrolado de células anormales (Laza *et al.*, 2003), pero debido a mutaciones presentes en estas células transformadas pueden desarrollar resistencia al tratamiento (Köhnlechner M, 1980; Barbounaki-Konstantakou E, 1989), siendo este el mayor problema en la clínica del cáncer.

La quimioterapia actual consiste en la aplicación de un sin número de técnicas mediante el uso de agentes de lucha contra el cáncer entre las que tenemos el uso de sustancias citotóxicas, que producen muerte celular y de fármacos antihormonales que reducen la proliferación celular, permitiendo manejar al tumor y facilitando el tratamiento. Algunos de los problemas más

relevantes de los agentes anticancerígenos para que lleguen a ser fármacos, son:

- ⊙ La falta de distinción entre los efectos en el tumor y el tejido normal.
- ⊙ La dependencia del ciclo celular de fármacos citotóxicos y su frecuente susceptibilidad a la resistencia inducida por el fármaco.
- ⊙ Los severos efectos provocados en los pacientes expuestos al tratamiento.

Los agentes citotóxicos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer entran en una amplia gama de clases de mecanismos por ejemplo agentes alquilantes, intercalantes del ADN, antifolatos, binders de tubulina e inhibidores de la topoisomerasa (Barton *et al.*, 2000).

Entre los fármacos quimioterapéuticos que se ha observado que pueden inducir apoptosis en las células de cáncer se incluyen: etopósido, camptothecina, vincristina, cis-platinum, cyclophosphamida, paclitaxel, 5-fluorouracil y doxorubicina (Tan *et al.*, 2005; Kaufmann & Earnshaw, 2000; Johnstone *et al.*, 2002).

Los agentes que alteran el ciclo celular han sido de interés particular desde la regulación del ciclo celular, que es el mecanismo básico en el destino celular subyacente, hasta la proliferación, diferenciación o muerte (Dobashi *et al.*, 2003).

Entre los tipos de muerte ocasionadas por los antineoplásicos se distinguen principalmente dos modelos (Mukherjee *et al.*, 2001), apoptosis y necrosis mostrados en la figura 4.

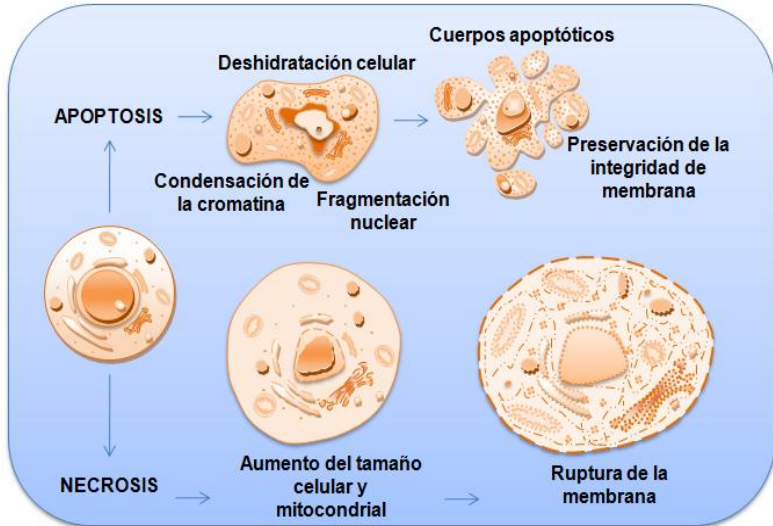


Figura 4. Principales tipos de muertes causadas por antineoplásicos. **Fuente:** Modificado de Díaz D, 2006. Características de la apoptosis.

Es relevante mencionar que la quimioterapia representa una de las pocas situaciones farmacológicas en las cuales las personas son expuestas intencionalmente a dosis terapéuticas de sustancias potencialmente carcinógenas, y constituye una fuente de riesgo que es más fácilmente controlada, lo cual produce una situación útil para definir la dosis-respuesta y la interrelación con un segundo cáncer recurrente (Allan & Travis, 2005).

1.2 Antineoplásicos:

Antineoplásico se denomina a cualquier sustancia que impide el desarrollo, crecimiento y/o proliferación de células cancerígenas; estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.

Un producto antineoplásico natural tiene que mostrar inhibición en la proliferación de células tumorales, en cualquiera de sus vías incluyendo por ejemplo: interferencia con la formación del

citoesqueleto, prevención en la replicación del ADN o interferencia con la señal de transducción (Konoshima & Takasaki, 2000; Setzer & Setzer, 2003).

Dentro de este campo las mayores dificultades encontradas en los fármacos quimioterapéuticos fabricados a partir de productos naturales son la solubilidad limitada en los solventes acuosos e índices terapéuticos estrechos (Mukherjee *et al.*, 2001), lo que evidentemente se traduce en la deficiencia de estos fármacos activos para la terapia curativa de tumores (Valeriotte *et al.*, 2002; Kinghorn *et al.*, 2003).

Uno de los acercamientos usados en el descubrimiento de fármacos son los datos sobre etnomedicina que ayudan en la selección de plantas, fundamentándose en información anterior sobre el uso de especies en la medicina tradicional, generalmente esto permite el aumento de la probabilidad de encontrar sustancias activas (Abdolmohammadi *et al.*, 2008) en la especie en estudio.

Además hay que tener en cuenta que las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, los cuales han existido por cientos de años y se han transmitido de una generación a otra (Laza *et al.*, 2003). Una gran parte de esta medicina tradicional involucra el uso de extractos de especies vegetales o sus principios activos, debido a la propensión que poseen las plantas de sintetizar mezclas de compuestos estructuralmente bioactivos.

Estas moléculas, los metabolitos secundarios, tienen acción potencialmente citotóxica siendo esta la razón por la cual algunos de estos en la actualidad han llegado a ser fármacos comerciales; tales como: vinblastina, vincristina (Elder *et al.*, 2000), etopósido (Manfredi & Horwitz, 1984; Cherington *et al.*, 2000), paclitaxel (Lee K, 1999), topotecan (Grabley & Thiericke, 1999), irinotecan (Wani *et al.*, 1971), entre otros (Kintzios E, 2006; Vega *et al.*, 2006; Balunas & Kinghorn, 2005; Newman *et al.*, 2003).

1.2.1 Propiedades buscadas en un antineoplásico.

Desde una perspectiva farmacológica el antineoplásico "ideal" destruiría las células tumorales sin dañar las células normales del sujeto, aun esto no es una realidad, por lo cual, se mantiene la búsqueda de principios activos aislados de fuentes naturales como potenciales agentes quimioterapéuticos (Paolini M, 1998; Cragg & Newman, 1999).

1.2. 2 Tipos de moléculas utilizadas como antineoplásicos.

Basado en las actividades se han identificado tres tipos de agentes quimiopreventivos principales que son de origen vegetal: inhibidores de formación carcinógena (principalmente por la formación de nitroso-aminas de amina secundaria), agentes bloqueadores (impedir a los carcinógenos alcanzar o reaccionar a los sitios designados) y agentes supresores o anti-progresión. Es importante reconocer que sus actividades se pueden enmascarar entre sí (Nandi *et al.*, 1998).

Los agentes quimioterapéuticos presentan varios mecanismos de acción, como por ejemplo, la doxorrubicina que produce inhibición de la Topoisomerasa, entre otros fármacos que se observan en la tabla 2.

Mecanismo de acción	Fármaco
Alquilación	Melphalan
Antimetabolito	Methotrexate
Interacción con el ADN	Bleomycin
Perturbación con la membrana	Miltefosin
Inhibición de la topoisomerasa	Doxorrubicin
Interacción con la microtubulina	Vincristine
Delección de aminoácidos	Asparaginase

Tabla 2. Clasificación de agentes quimioterapéuticos. **Fuente:** Lindholm P, 2005.

1.3 Citotoxicidad:

Muchos experimentos *in vitro* son llevados a cabo con el propósito de determinar el potencial citotóxico de compuestos que están siendo usados como fármacos, aditivos de alimentos o cosméticos que deben ser aptos para el consumo humano; o, porque se diseñan nuevos fármacos como agentes anticancerígenos y citotóxicos, donde es crucial conocer su mecanismo de acción (Freshney I, 2000).

De esta manera es vital la introducción de cultivos de líneas celulares especializadas y órganos para la evaluación de seguridad. Sin embargo, las consideraciones económicas y éticas, junto con un incremento del conocimiento en los modelos animales relacionados con el metabolismo humano, no garantiza el desarrollo de métodos que aseguren la inocuidad de tales productos (Walker J, 1999).

1.3.1 Aplicación e importancia del screening primario en líneas celulares tumorales.

La implementación de estos métodos para evaluar la viabilidad (conteo de células viables) y la proliferación celular (ensayos en cultivos celulares), es aplicable en la determinación de la citotoxicidad de posibles agentes medicinales y materiales tóxicos, ya que la exposición de modelos biológicos a estos agentes estimula o inhibe la viabilidad y la división celular. Es relevante la aplicación de cultivos primarios, debido a que permiten determinar el potencial de citotoxicidad de los compuestos en estudio (Freshney I, 2000).

1.3.2 Tipos de ensayos de citotoxicidad según su blanco.

En la búsqueda de antineoplásico para el desarrollo fármacos anticancerígenos los ensayos *in vitro* que se aplican son fundamentalmente de dos tipos:

- **Ensayos moleculares** son altamente específicos (dirigidos a un objetivo subcelular único).
- **Ensayos celulares** son dirigidos a un grupo celular, a su vez, pueden ser divididos en: ensayos citotóxicos y otros tipos de ensayos, que incluyen exámenes morfológicos (Rahman *et al.*, 2001).

Se debe tener claro el significado del término citotoxicidad ya que este depende de factores como: la naturaleza del estudio, producción de mortalidad o alteración del metabolismo celular.

Conviene procurar que las pruebas de citotoxicidad cuenten con características que faciliten su aplicación siendo ensayos económicos, fácilmente cuantificables y reproducibles, de manera que se utilicen en el screening citotóxico primario (Freshney I, 2000), conociendo que tradicionalmente han sido basados en índices de viabilidad celular y supervivencia (Walker J, 1999). La viabilidad es un parámetro instantáneo considerado predictivo de la supervivencia celular que puede determinarse por el crecimiento de la colonia, cambio neto en el tamaño de la población, masa, o totalidad en la actividad metabólica. De esto se desprende los ensayos de viabilidad que determinan la proporción de células viables remanentes subsiguientes a la exposición al toxico. Las células viables tienen la capacidad de excluir colorantes como la eosina, nigrosina, azul tripano, violeta cristal o el rojo neutral; e incluir colorantes (tal como rojo neutral y diacetato de fluoresceína) o isotopos usados en la determinación de índices de viabilidad celular.

La aplicación de estos test para supervivencia celular es limitada y deben hacerse las comparaciones con el ensayo Clonogénico que sigue dos o tres tiempos después de la exposición a la sustancia de la prueba, esto es una indicación de supervivencia a largo plazo.

Los ensayos basados en microtitulación en multiplacas (96 pocillos) permiten amplios rangos, los efectos tóxicos pueden ser fácilmente cuantificables espectrofotométricamente en un lector de placas y son relativamente automatizados.

1.3.3 Estrategias para la búsqueda de antineoplásicos.

La búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad anticancerígena a partir de productos naturales es un campo vigente en la actualidad (Cordell G, 2000; Mans *et al.*, 2000), la cual inició en los años cincuenta con la exploración de agentes antineoplásicos a partir de plantas mediante la evaluación de las propiedades citotóxicas de sus extractos, resultando en hallazgos para el descubrimiento y desarrollo de medicamentos (Pezzuto J, 1997; Reddy *et al.*, 2003; Tsuda *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005; Villavicencio *et al.*, 2008).

También hay que tomar en cuenta que los fármacos antineoplásicos son metabolitos secundarios o derivados sintéticos de plantas, microorganismos y organismos marinos (Cragg *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2003). Por lo tanto, es importante mencionar que posee potencial como antineoplásicos por su capacidad de producir un efecto citotóxico, el cual se puede dar por dos vías, directamente sobre las células o modulando el tumor en el curso de su desarrollo y eventualmente inhibiéndolo (Kintzios & Barberaki, 2004).

Es así que la identificación de blancos moleculares explotables ha permitido establecer programas exclusivos enfocados en la búsqueda de productos naturales de gran potencial permitiendo el perfeccionamiento, avance y aplicación de técnicas exitosas (Rothenberg *et al.*, 2003).

1.3.3.1 Sistema de tamizaje según el Instituto Nacional del Cáncer.

El Instituto Nacional del Cáncer de U.S.A. (NCI) es una entidad que se ha convertido en un referente internacional en lo que se refiere al cáncer y en temas relacionados a este, proporcionando soporte a investigadores alrededor del mundo. Inicialmente se enfocó en tres principales frentes: la investigación de ensayos alternativos *in vitro* de sensibilidad a fármacos, desarrollo de un panel de líneas celulares e información tecnológica (Boyd M, 2001).

Hoy en día una de sus líneas de investigación más reconocidas son los ensayos de crecimiento y viabilidad para el tamizaje primario *in vitro* en la búsqueda de nuevos fármacos. Es así que implementaron técnicas para tamizaje primario (primera fase) en paneles de líneas celulares tumorales organizados en subpaneles representativos de los principales tipos de tumores, que tras la exposición a extractos, compuestos o fracciones (productos naturales) a probar en concentraciones altas, determinaban la citotoxicidad o inhibición del crecimiento del modelo biológico. La segunda fase de tamizaje se realizaba en los compuestos seleccionados mediante técnicas *in vivo* en modelos de xenotransplantes empleando las líneas celulares sensibles en el screening primario *in vitro*.

Más tarde implementaron ensayos en microcultivos *in vitro* de crecimiento celular y viabilidad con 3 alternativas MTT, XTT y SRB. Originariamente fue implementado el ensayo de MTT y posteriormente el XTT, basados en la capacidad metabólica de las células viables para transformar una sal de tetrazolio en formazán, un compuesto coloreado (Mosmann *et al.*, 1983); presentaron varias desventajas como variaciones y ruido en las absorbancias, también se detectó que otras patologías celulares diferentes a la muerte pueden aumentar o disminuir la actividad metabólica celular.

Así, se dio paso a otro tipo de pruebas como la SRB (2 - (3-dietilamino -6- diethylazaniumylidene - xanthen -9- il)-5- sulfo - benzenesulfonate), un ensayo no metabólico basado en la tinción de proteínas acopladas a células en cultivo que ofrece un punto final colorimétrico no destructivo, visible y de estabilidad por tiempo indefinido, proporcionando una medida sensible de la citotoxicidad inducida, útil en la cuantificación de clonogenicidad y adaptable a un panel numeroso de líneas celulares pudiendo ser automatizado (Skehan *et al.*, 1990).

1.3.3.2 Tinción con violeta cristal.

Siguiendo este mismo patrón tenemos a la tinción de violeta cristal se realiza en base a un colorante de acumulación nuclear

(figura 5), el cual se determina fotométricamente después de su solubilización, permitiendo correlacionar la intensidad del color con el número celular.

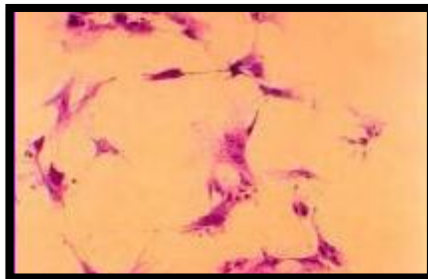


Figura 5. Visión microscópica de la tinción con violeta cristal. **Fuente:** ANIARA, 2007.

Este es un ensayo de citotoxicidad simple y reproducible, que permite evaluar la inhibición celular (IC_{50}) (Itagaki *et al.*, 1991; Saotome *et al.*, 1989), basado en la tasa de crecimiento mediante la determinación colorimétrica de las células teñidas (fig. 6), es decir, el colorante retenido en las células residuales adheridas a la microplaca (Chiba *et al.*, 1998).

Esta técnica tiene la ventaja de que limita la subestimación al permitir la identificación de las células muertas que aún no han sido objeto de importantes modificaciones estructurales, una desventaja es la falta de discriminación del tipo de muerte (apoptosis o necrosis) (Galluzzi *et al.*, 2009).

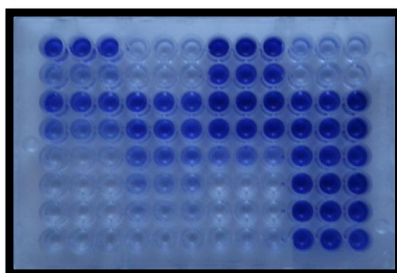


Figura 6. Tinción de violeta cristal en multiplacas de 96 pocillos. **Fuente:** autor.

1.4 Antineoplásicos de origen natural.

Por miles de años los productos naturales han jugado un papel importante a nivel mundial en el tratamiento y prevención de enfermedades humanas (Chin *et al.*, 2006); a excepción de los minerales y materiales sintéticos, la naturaleza está compuesta completamente por productos naturales orgánicos de fuentes microbianas, vegetales o animales.

Cabe recalcar que más del 60 % de los agentes anticancerígenos actualmente usados se derivan de fuentes naturales (Cragg & Newman, 2003; Balunas & Kinghorn, 2005; Cragg & David, 2005). En otras palabras, la naturaleza ha sido fuente de tratamientos médicos por miles de años, de igual manera que hoy en día los sistemas de medicina tradicional basados en el uso de plantas continúan jugando un papel esencial en el cuidado primario de la salud en un 80 % de la población mundial (Das & Yadav, 1998; Nakanishi K, 2000).

1.4.1 Especies vegetales y metabolitos secundarios estudiados en la presente investigación.

La actual investigación basada en la búsqueda de moléculas con potencial anticancerígeno se fundamentó en el estudio de extractos y metabolitos secundarios de especies vegetales; de los cuales se determinó su capacidad como inhibitoria (antineoplásica). Entre estas especies *Annona montana* Macfad y *Oreopanax andreanus* Marchal; los metabolitos secundarios dehidroleucodina, friedelina y acetato de β -amirina.

1.4.1.1 *Annona montana* Macfad.

La familia *Annonaceae* es un grupo de plantas tropicales fuente importante de frutas comestibles y aceites fragantes (Alvarez *et al.*, 2008), ha sido investigada intensamente durante los últimos 15 años debido al descubrimiento de estructuras químicas denominadas acetogeninas (Alali *et al.*, 1999). Las hojas, raíces, corteza, fruto y semillas de las *Annonas* contienen numerosos

compuestos químicos bioactivos tales como las acetogeninas, alcaloides, terpenos, flavonoides y aceites (Liaw *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005).

1.4.1.1.1 Descripción taxonómica.

La especie vegetal *Annona montana* Macfad (Fotografía 1), es conocida como chirimoya de campo, pertenece a la familia *Annonaceae*, incluye aproximadamente 129 géneros encontrados principalmente en las áreas tropicales de América, África y Sudeste de Asia, con más de 2000 especies siendo el género *Annona* el más conocido (Alvarez *et al.*, 2008).



Fotografía 1. *A. montana* Macfad.

Las *Annonas* son originariamente de la tierra baja tropical de Centro y Sudamérica y de las Indias Orientales (Cautín & Agustí, 2005). La chirimoya de campo es nativa de los valles andinos entre Ecuador y Perú, se desarrolla a una altitud de 1500 – 2000 msnm dónde crece espontáneamente (Bonaventure L, 1999).

1.4.1.1.2 Descripción morfológica.

Es un árbol de tamaño mediano de hasta 6 metros (Geilfus & Bailón, 1994), frondoso, con la corteza lisa y café (Jossang *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2001), su tronco ramifica desde la base y su copa es irregular, las hojas son simples (más largas que anchas y puntiagudas) y alternas. Las flores son carnosas, solitarias, de color amarillo oscuro con vellosidades cortas (Duno *et al.*, 2007).

Los frutos (Fotografía 2) son globosos de forma acorazonada, miden de 8 a 12 cm de largo, se observan físicamente con restos del gineceo en su periferia a modo de espinas, su pulpa es de color blanco, sabor dulce y las semillas son de color negro (Morton J, 1999).



Fotografía 2. Fruto de *A. montana*.
Fuente: INFOJARDIN, 2008.

1.4.1.1.3 Uso en la medicina tradicional.

Dentro de la medicina tradicional varios pueblos alrededor del mundo conocen las propiedades curativas de las diferentes *Annonas sp.*, siendo así reconocida y mencionada como un remedio casero. En la medicina tradicional de Trinidad se administra la infusión de las hojas de *A. montana* para el

tratamiento de influenza e insomnio (Morean F, 1999; Mootoo *et al.*, 2000). En Santa Cruz de la Sierra, Bolivia se utiliza en infusión las hojas de *A. montana* (sinini) para el tratamiento de piojos, influenza e insomnio (Colom *et al.*, 2008). Para aliviar el dolor en la gestación se usa la infusión de las hojas de *A. montana*, en la medicina tradicional de Perú (Brack A, 1995).

En México, el polvo de dos semillas de *A. cherimolla* mezclado con agua o leche, es un potente emético y catártico (Lizana & Reginato, 1990). En Jamaica las flores son conocidas por su propiedad como sazonador de exquisito aroma, no teniendo reportes medicinales. En Perú la *A. cherimolla* sirve para calmar la cefalalgia, colocando en las sienes emplastos de hojas soasadas (Brack A, 1995).

La *A. reticulata* es aplicada en problemas dermatológicos como la disípela, haciendo emplastos de las hojas machacadas y colocando sobre las partes afectadas, también se emplea para dolores estomacales e intestinales aplicando sobre el estomago las hojas soasadas, además en las dislocaciones se coloca en la parte lesionada las hojas soasada de la planta, en caso de sinusitis e influenza se ingiere la infusión de sus hojas.

Las hojas de la *A. muricata* L. tienen aceites esenciales con actividad antiparasitarias, anti-diarreica, reumatológica y neurálgica (Moura, 1988). La infusión de sus hojas posee propiedades antiespasmódica, astringente (Khan *et al.*, 1997), ayuda en el tratamiento de la diabetes y en trastornos gástricos (Calzavara *et al.*, 1987). La *A. muricata* se emplea tradicionalmente en Perú tiene actividad como sedante, preparando una infusión de las hojas (Brack A, 1995).

Las raíces de la *A. senegalensis* son usan en el tratamiento del cáncer, convulsiones, diarrea, disentería, fiebre, tiene acción antineoplásica y antiprotozoarial (Fatope *et al.*, 1996). Las hojas son usadas en las enfermedades de los ojos, estómago e intestinos (Philipov *et al.*, 1995; You *et al.*, 1995).

La eficacia de las raíces de la *A. squamosa* es conocida en el tratamiento de la disentería aguda, depresión y enfermedades de

la médula espinal (Chao-Ming *et al.*, 1997), el té de las raíces es altamente purgativo, mientras que el té de las hojas es ligeramente laxativo. Algunas tribus en la India acostumbran provocar aborto en las tribus en Madhya Pradesh State con el extracto de las semillas para (Salluja & Santani, 1990). Según la tradición de Perú la *A. squamosa* sirve para aliviar el resfriado e indigestiones preparando una bebida mediante infusión de los brotes (Brack A, 1995).

1.4.1.2 *Oreopanax andreanus* Marchal.

La familia *Araliaceae* es un conjunto de más de 700 especies distribuidas lugares tropicales y subtropicales alrededor del mundo, este grupo de plantas están caracterizadas a nivel fitofarmacológico por la presencia de saponinas, terpenoides y algunos compuestos acetilénicos (Gurib A, 2006). En general las especies de *Oreopanax* son árboles ornamentales cultivados en los jardines públicos en Egipto y conocido por ser rico en las saponinas con actividades biológicas y moluscoquicidas (Melek *et al.*, 2002). Algunas especies de este género como *Oreopanax oroyanus* (yaquil), son de madera suave por lo cual se usan en construcciones y agroforestería en Perú (Brack A, 1995). El género *Oreopanax* consta de 80 especies distribuidas en América tropical, se considera que en Ecuador existen alrededor de 30 especies (Calles J, 2007).

1.4.1.2.1 Descripción taxonómica.

La especie medicinal *Oreopanax andreanus* Marchal es parte de la familia *Araliaceae*, el género *Oreopanax* consta de 80 especies distribuidas en América tropical; en Ecuador se considera que existen no menos de 30 especies, siendo un componente importante de los bosques andinos y altoandinos donde están representadas por 19 especies. *Oreopanax* es llamado pumamaqui o mano de puma, este nombre está dado por la forma de sus hojas (Calles J, 2007). Se ha reportado el crecimiento silvestre de *O. andreanus* (Fotografía 3) en el bosque de neblina montano de los Andes Orientales de 2500- 3500

msnm en la provincias de Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Moncayo J, 1989).



Fotografía 3. *Oreopanax* sp. Fuente: Moncayo J, 1989.

Es un arbusto o árbol endémico de Ecuador donde es característico de los altos Andes centrales, conocido a partir de 30 sub-poblaciones distribuidas en el sureste andino, halladas en el Parque Nacional Podocarpus y Parque Nacional Cajas (Montúfar & Pitman, 2003).

1.4.1.2.2 Descripción morfológica.

Son árboles o arbustos algunas veces epífitos, dioicos o poligamodioicos, glabros o con pelos estrellados. Las hojas son lobuladas o enteras, pecíolo dilatado en la base. Las panículas o racimos terminales o subterminales, con brácteas. Las flores son sostenidas por bractéolas pubescentes; el tubo floral obcónico, unido al ovario. El Fruto es globoso o elipsoide con cáliz y estilo persistentes (Moncayo J, 1989).

1.4.1.2.3 Uso en la medicina tradicional.

En Loja y Zamora es conocida como Pumamaki, donde es utilizada como desinfectante para sanar heridas en dermatitis, mediante la decocción de las hojas frescas (maduras) aplicándolas en la parte afectada; otra especie utilizada es *O. ecuadorensis* Seem, para aliviar el dolor de cabeza preparando infusión de las hojas maduras (Tene *et al.*, 2007). Otros miembros conocidos de esta familia utilizados tradicionalmente alrededor del mundo son la *Hedera hélix*, *Panax ginseng*, *Oreopanax xapalensis* y *Dendropanax arboreus*.

1.4.1.3 Dehidroleucodina.

Una de las moléculas actualmente en estudio es la dehidroleucodina (DhL) que corresponde al grupo de las lactonas sesquiterpénicas (SLs) de tipo guaianolido, aislada por primera vez de la especie *Artemisia douglasiana* Besser, conocida popularmente como matico, de la cual se ha reportado que posee propiedades gástricas citoprotectoras (Giordano *et al.*, 1990) y preventivas del daño gastrointestinal en respuesta a agentes que induzcan necrosis, tales como el etanol absoluto de manera dosis-dependiente (Penissi *et al.*, 2006).

La DhL utilizada en los ensayos fue aislada de la especie *Gynoxis verrucosa* (fotografía 4) que forma parte de la familia *Asteraceae*, la cual es conocida como Congona o Guángalo, en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe donde crece a 1800 – 2400 msnm (Proyecto P-FN 0133, 2004).

Es un arbusto que alcanza 4 m de altura, semileñoso, con médula esponjosa en los tallos. Las hojas son opuestas con pubescencias de color café blanquecino, en el envés la lámina mide 12–16 cm x 7–9 cm, su inflorescencia es en capítulos, con flores marginales de color amarillo (Astudillo A, 2006). En la medicina tradicional la utilizan en caso de presión sanguínea baja, depresión psicológica y problemas visuales y respiratorios, también como sedante para cólicos (De Feo V, 2003).



Fotografía 4. *Gynoxis verrucosa*. **Fuente:** Herbario N° 80 IQA, UTPL.

Además se ha reportado que esta lactona presenta un efecto inhibitorio sobre cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, es decir, su presencia a concentraciones entre 5 y 50 mg/mL inhibe la replicación de estos parásitos (Bregio *et al.*, 2000) su fórmula estructural se muestra en el figura 7.

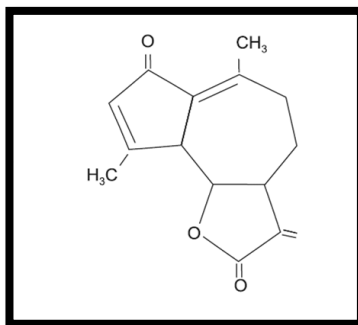


Figura 7. Fórmula estructural de la DhL. **Fuente:** Penissi *et al.*, 2006.

Por otra parte se conoce que inhibe la proliferación de las células moduladoras vasculares del musculo liso (VSMCs) en fase G2, mediante la inhibición de un gran número de enzimas o factores clave en los procesos biológicos, incluso a concentraciones de 12 μ M produce apoptosis (Polo *et al.*, 2007).

1.4.1.4 Acetato de β -amirina y friedelina.

Estas moléculas fueron aisladas de la especie *Clusia latipes* Planch & Triana (fotografía 5), que es parte de la familia *Clusiaceae*, a esta planta se la utiliza en la medicina tradicional para eliminar las verrugas (Tene *et al.*, 2007).

Las especies del género *Clusia* producen una gran cantidad de látex que es rico en benzofenonas polipreniladas (Cerrini *et al.*, 1993). *Clusia* compromete aproximadamente 250 especies las cuales crecen en regiones tropicales y subtropicales de América del Sur y Central son arbustos y árboles de hasta 20 m, con el follaje de hojas perennes (Moura *et al.*, 2008).



Fotografía 5. *Clusia latipes*. **Fuente:** eFloras.org, 2004.

En relación a estas especies se han encontrado acciones farmacológicas tales como: actividad antimicrobiana de amplio espectro, antiinflamatoria (Linuma *et al.*, 1996), quimiopreventiva del cáncer, antioxidante, antihepatotóxica y acción inhibitoria del virus de inmunodeficiencia humana (Ito *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2004).

El acetato de β -amirina (figura 8) se halla entre los triterpenos más importantes, están distribuidos en forma de glicósidos, es parte del grupo de las β -amirinas que se encuentran constituidas por un esqueleto de anillo básico denominado oleonano; formado por insaturaciones, grupos hidroxilo y carbonilos adicionados, grupos que proporcionan diferencias estereoquímicas en comparación con las α -amirinas siendo parte esencial en su actividad biológica (Valencia C, 1995).

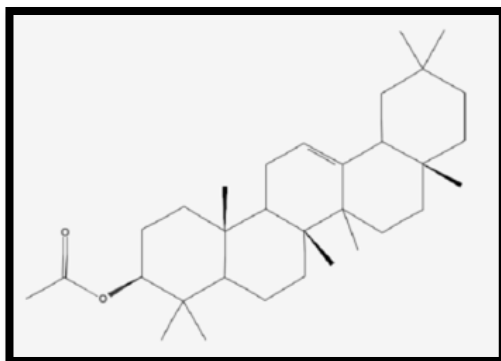


Figura 8. Fórmula química del acetato de β -amirina. **Fuente:** Chemicalland21, 2010.

La friedelina es un triterpeno (figura 9) considerado como una estructura formada por el reagrupamiento de la β -amirina (González *et al.*, 1990), tiene un esqueleto de anillo básico denominado friedelano (Valencia C, 1995), que tendría participación en la actividad antiulcerogénica (Oliveira *et al.*, 1992).

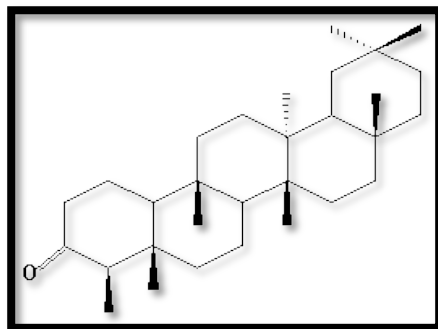


Figura 9. Estructura química de la friedelina.
Fuente: Melillo, 2002.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

- Establecer el potencial inhibitorio de extractos vegetales y metabolitos secundarios, en un panel de líneas celulares tumorales, mediante el bioensayo de tinción con violeta cristal (VCS).

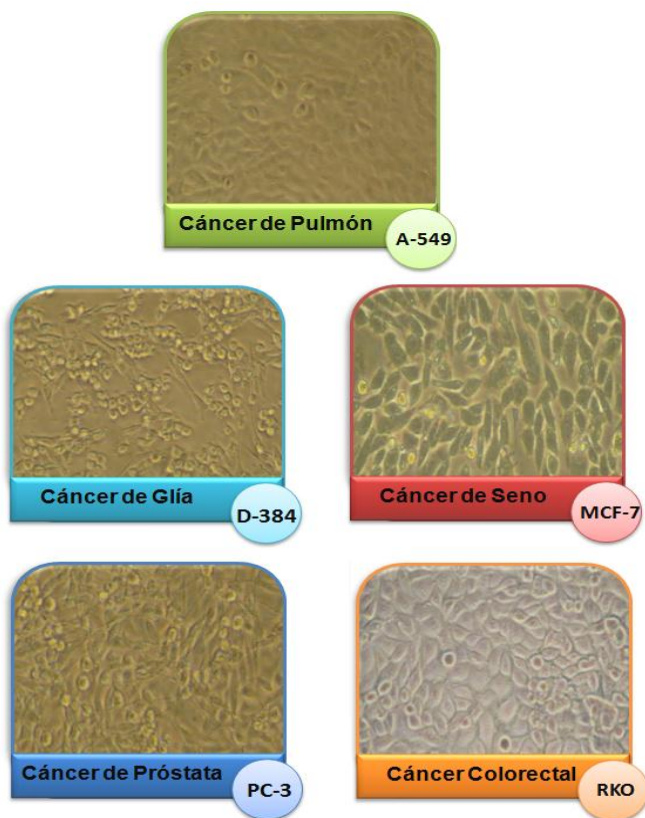
2.1.1 Objetivos Específicos:

- Estandarizar el ensayo de tinción con violeta cristal, utilizando como control positivo doxorrubicina, en las líneas celulares tumorales humanas A-549, D-384, MCF-7, PC-3 y RKO.
- Evaluar el potencial inhibidor de los extractos de las especies *Annona montana* y *Oreopanax andreanus*, en las líneas celulares tumorales humanas A-549, D-384, MCF-7, PC-3 y RKO, mediante VSC.
- Evaluar el potencial inhibidor de los metabolitos secundarios friedelina, acetato de β -amirina y dehidroleucodina, en las líneas celulares tumorales humanas A-549, D-384, MCF-7, PC-3 y RKO, mediante VSC.
- Determinar la IC_{50} de los extractos vegetales que inhiban a más del 50 % de la población celular en estudio.
- Determinar la IC_{50} de los metabolitos secundarios que inhiban a más del 50 % de la población celular en estudio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

En los ensayos se utilizó como modelo biológico un panel de 5 líneas celulares tumorales (fotografía 6), que fueron: **A-549** (adenocarcinoma pulmonar), **D-384** (astrocitoma cerebral), **MCF-7** (cáncer de mama), **PC-3** (cáncer protático) y **RKO** (cáncer de colon), todas de procedencia humana, donadas por la Dra. Patricia Ostrosky del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Fotografía 6. Panel de líneas celulares tumorales. Fuente: Autor.

3.2 Condiciones de cultivo

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio base RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con Suero Fetal Bovino al 10 % (GIBCO), aminoácidos no esenciales al 1 % (GIBCO), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO), antibiótico-antimicótico (100 unidades/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de Estreptomicina y 0,25 µg/mL de Amphotericina B como Funfizona) (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO), bicarbonato de sodio al 0,2 % (MERK). Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación a 37°C de temperatura en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂. Los cultivos al presentar una confluencia del 75 al 95 %, se procedió a realizar múltiples lavados de cada uno con Buffer Fosfato Salino (PBS), para luego ser tratados con Tripsina al 0,25 % (GIBCO), durante 3 minutos a una temperatura de 37°C, obteniendo una suspensión celular a partir del mismo.

3.2.1 Conteo celular

La cuantificación del número de células por mililitro se realizó mediante el método de exclusión con azul de tripano, contando en la cámara de Neubauer 5 campos, por duplicado. Se calculó el número de células mediante la aplicación de la fórmula:

$$\frac{\text{\# de células contadas} \times \text{dilución}}{\text{\# de cuadrantes contados}} \times 10000 = \text{\# células/mL}$$

3.3 Extractos vegetales y metabolitos secundarios en estudio.

Se realizó la evaluación del efecto inhibitorio en las líneas celulares tumorales humanas expuestas a extractos y metabolito secundarios de especies vegetales:



Extractos vegetales: *Annona montana* en acetato de etilo (AcOEt), *Annona montana* en metanol (MeOH) y *Oreopanax andreanus* en diclorometano.



Metabolitos secundarios: acetato de β -amirina, dehidroleucodina (DhL), y friedelina.

En los ensayos realizados se utilizó los extractos de *Anona montana* Macfad en acetato de etilo y metanol, obtenidos por el Ing. Juan Carlos Romero, del Instituto de Química Aplicada, de la UTPL. Los extractos fueron obtenidos mediante maceración sucesiva del fruto completo de *Anona montana*, con acetato de etilo y metanol, respectivamente.

Además, en las pruebas de citotoxicidad se trabajó con dehidroleucodina, molécula aislada a partir del extracto metanólico de las hojas de *Gynoxis Verrucosa* Wedd, por el Dr. Omar Malagón, en el Instituto de Química Aplicada de la UTPL.

El extracto de las hojas de *Oreopanax andreanus* Marchal en diclorometano y los dos metabolitos secundarios extraídos d del extracto hexánico de *Clusia latipes* Planch. & Triana, friedelina y acetato de β -amirina, que fueron extraídos y donadas por la Dra. Natalia Bailón, del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL.

3.3.1 Preparación de dosis para tratamiento.

- ✿ **Control Negativo:** Dimetil sulfóxido (DMSO) al 0,1 % en medio RPMI-1640 suplementado.
- ✿ **Control Positivo:** Doxorubicina (Dox) a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio RPMI-1640 suplementado.
- ✿ **Extractos:** Cada extracto se disolvió en medio RPMI-1640 suplementado a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a partir de esta solución madre se prepararon las dosis aplicadas durante los tratamientos, se almacenaron y mantuvieron en congelación a -20°C .

- ✿ **Metabolitos:** Cada molécula fue disuelta en medio RPMI-1640 suplementado, a una concentración de 1000 μM , a partir de solución se prepararon las dosis aplicadas en las pruebas.





3.4 Tinción con violeta cristal (CVS).

Al cabo de 96 horas de la siembra, fue aspirado el medio y se enjuagó los pocillos con 100 μL de PSB, enseguida fueron fijadas las células en monocapa con 50 μL de formol al 4 % durante 10 min, luego teñidas con 50 μL de violeta cristal al 0,1 % por 10 min y se realizó múltiples lavados de la placa con agua corriente, hasta retirar todo el exceso de colorante. Finalmente se resuspendió con 100 μL de ácido acético al 10 % y de inmediato se midió la absorbancia espectrofotométrica de cada pocillo a una longitud de onda de 620 nm en el lector de multiplacas (SUNRISE).

La coloración es inversamente proporcional a la inhibición celular, por lo cual una reducción en la absorbancia implica disminución en la supervivencia celular (Figura 10).

3.5 Ensayos.

Se realizaron ensayos para:

-  Determinar el punto de saturación.
-  Curvas dosis-respuesta.
-  Pruebas de citotoxicidad *in vitro* para tamizaje primario
-  Determinación de la IC_{50} .

3.5.1 Determinación del punto de saturación por pocillo.

Para conocer el punto de saturación por pocillo, fueron sembradas diversas concentraciones celulares en un rango de 1000 a 32000 células por pocillo (escala exponencial) en un multiplacas de 96 pocillos y se incubó a las condiciones antes

descritas. Luego de transcurridas 96 horas de incubación aplicamos la metodología antes detallada para CVS.

3.5.2 Estandarización mediante curvas dosis-respuesta con doxorubicina.

Para constatar que la respuesta de nuestro modelo biológico es proporcional, a las dosis de exposición, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando un quimioterapéutico conocido como es la doxorubicina (Adriamicina), en dosis entre 0,25 – 2,5 μM .

El ensayo se basó en sembrar una densidad de 4000 células en un volumen de 200 μL de medio por pocillo en un multiplacas de 96 pocillos. A las 24 horas de la siembra se dio el tratamiento correspondiente con doxorubicina e incubamos por 48 horas, posterior a este lapso de incubación teñimos mediante la técnica de CVS (figura 10).

3.5.3 Ensayo de citotoxicidad *in vitro* para tamizaje primario.

En los extractos o moléculas que mostraron ser citotóxicos, es decir, los que ocasionaron inhibición celular mayor al 50 %, para esta discriminación tomamos como criterio de exclusión porcentajes de inhibición menores a 50, los cuales no pasaron a la siguiente fase.

3.5.3.1 Descripción del procedimiento de valoración citotóxica *in vitro* de extractos vegetales y metabolitos secundarios.

Posteriormente se obtuvo la concentración inhibitoria para el 50 % de la población celular (IC_{50}), para lo cual se probaron varias dosis entre 0 a 50 μM o $\mu\text{g/mL}$ (Fase 2) como se detalla más adelante (tabla 3):



Tamizaje primario: evaluación de la sensibilidad de las líneas celulares tumorales a extractos o moléculas derivadas de especies vegetales (FASE 1).

El experimento permitió establecer presencia o ausencia de actividad inhibitoria de los extractos o metabolitos probados, en un panel de 5 líneas celulares tumorales humanas (figura 10). El tratamiento constó de control positivo, control negativo, extractos probados (*A. montana* en acetato de etilo, *A. montana* en MeOH, *Oreopanax andreanus* a 50 µg/mL) y metabolitos probados (DhL, acetato de β-amirina y friedelina a 50 µM) (figura 10).



Determinación de la IC₅₀ (Fase 2).

Con base en los datos obtenidos probamos 7 concentraciones en un rango de 0 a 50 µg/mL o µM, del extracto de *A. montana* AcOEt y el metabolito DhL, respectivamente, con el propósito de obtener la Concentración Inhibitoria para el 50 % de la población (IC₅₀) (figura 10).

Tabla 3. Descripción del tamizaje primario y de la IC₅₀.

Dosis	FASE 1		FASE 2
50µM	DhL	→	Determinación de la IC ₅₀ 50, 40, 30, 20, 10, 5 µM
	friedelina	x	No se continua (% de inhibición < 50)
	acetato de β-amirina	x	No se continua (% de inhibición < 50)
50µg/mL	<i>A. montana</i> MeOH	x	No se continua (% de inhibición < AcOEt)
	<i>A. montana</i> AcOEt	→	Determinación de la IC ₅₀ 50, 40, 30, 20, 10, 5 µg/mL
	<i>O. andreanus</i> diclorometano	x	No se continua (% de inhibición < 50)

El criterio de discriminación de moléculas o extractos en el tamizaje para proseguir a la fase 2, son los porcentajes de inhibición mayores al 50 %.

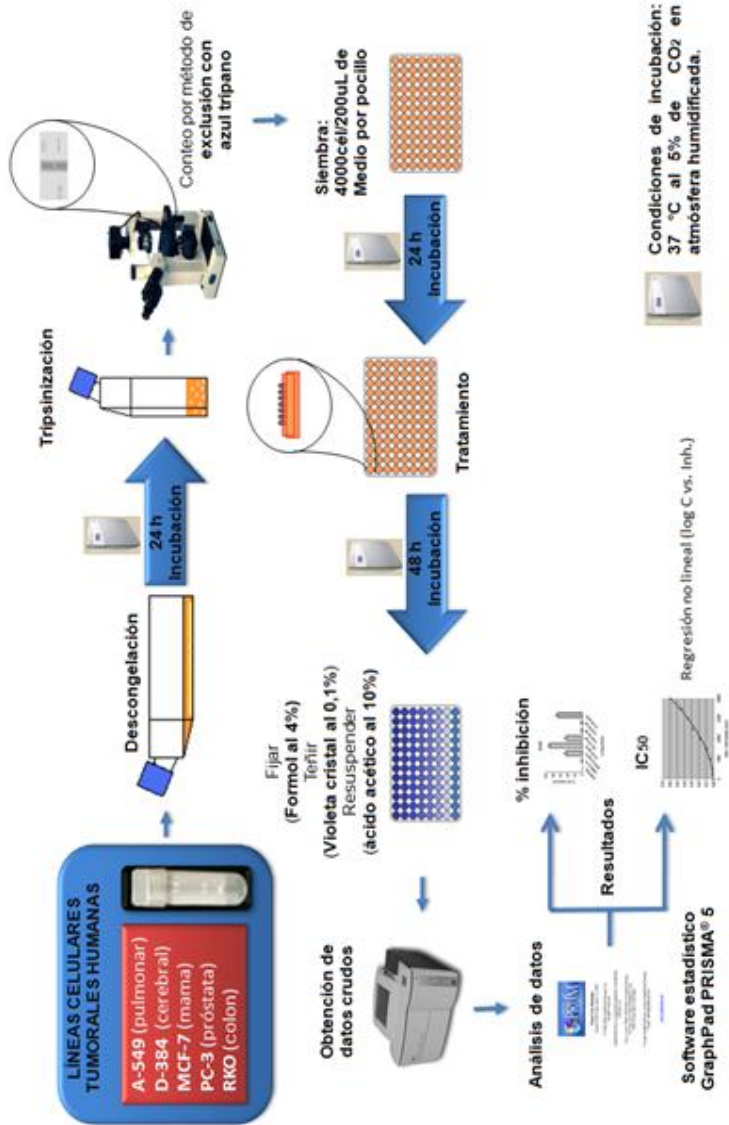


Figura 10. Procedimiento del ensayo de citotoxicidad *in vitro* de tinción con violeta cristal (CVS). **Fuente:** Autor.

3.6 Análisis estadístico.

Inicialmente se obtuvieron los datos de viabilidad que se expresaron como porcentaje de inhibición y fueron analizados mediante el Software Estadístico GraphPad Prism[®] 5, incluyendo datos de los 3 experimentos con sus 3 repeticiones, para obtener gráficas de curvas dosis-respuesta con promedios, desviación estándar y R^2 .

Con base a los primeros resultados se probó concentraciones de 50, 40, 30, 20, 10 y 5 μM o $\mu\text{g/mL}$ en el compuesto o extracto mas citotóxico, respectivamente. Resultando de estos ensayos absorbancias, que se transformaron a porcentajes de inhibición para cada repetición por concentración en los 3 experimentos de las 5 líneas celulares. Consecutivamente se analizaron estos porcentajes de inhibición utilizando el Software Estadístico GraphPad PRISMA[®] 5, para obtener la IC_{50} mediante una regresión no lineal, entre el logaritmo de la concentración versus la respuesta celular en términos de inhibición.

4. RESULTADOS

El paso inicial en la búsqueda de moléculas con potencial como agentes anticancerígenos, es un tamizaje primario, que permita la discriminación de extractos, moléculas, metabolitos o cualquier sustancia a probar, para conocer su potencial inhibidor en un modelo biológico. Es este el motivo para la estandarización del ensayo de tinción con violeta cristal (CVS), por lo cual es importante previo a este, la determinación de la densidad celular por pocillo, por lo cual iniciamos con curvas de saturación.

4.1 Estandarización de la densidad celular mediante curvas de saturación en RKO (cáncer de colon) para el ensayo CVS.

La densidad de saturación es el máximo número de células que se puede mantener bajo condiciones específicas de cultivo, en nuestro caso por pocillo. Para este efecto se utilizó como modelo biológico la línea celular tumoral RKO (colon), sembrando 6 densidades celulares en un rango exponencial de 1000–32000 células por pocillo en un multiplacas de 96 pocillos, fueron incubadas por 96 horas, que es el tiempo que lleva un ensayo completo. Como se observa en la figura 11, existe una saturación del crecimiento celular a una densidad celular de 8000 células.

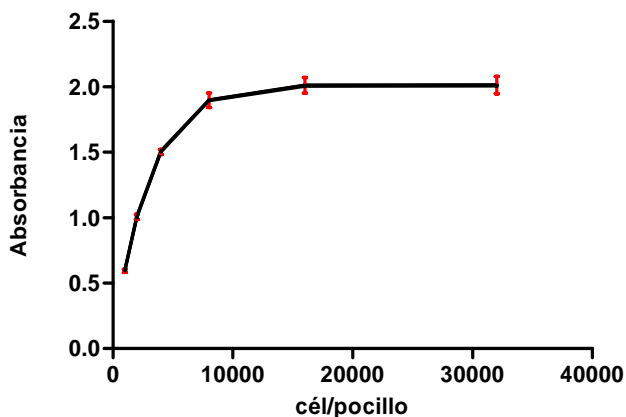


Figura 11. Curva de saturación en la líneas celular tumoral RKO.

Por lo que se decidió sembrar para ensayos posteriores como máximo una densidad de 4000 células por pocillo, que es la concentración máxima a la cual se mantiene el crecimiento lineal en la gráfica. Ya con una densidad celular conocida para la siembra, se continuó con la estandarización del método CVS, mediante curvas dosis-respuesta, en la cual se utilizó varias dosis una sustancia quimioterapéutica conocida, la doxorubicina.

4.2 Estandarización mediante curvas dosis-respuesta.

Para encontrar la relación entre las concentraciones utilizadas de doxorubicina y la respuesta celular, es necesaria una curva dosis-respuesta, empleando una línea celular tumoral, que es en nuestro caso el modelo biológico, así se utilizó la línea celular tumoral humana RKO (colon). El tratamiento constó de 7 dosis de doxorubicina, entre 0,12 – 5 μ M, mas los controles respectivos.

En la figura 12, se muestra una curva que posee comportamiento dosis-dependiente, es decir, que conforme aumenta la concentración de la doxorubicina mayor el porcentaje de inhibición celular.

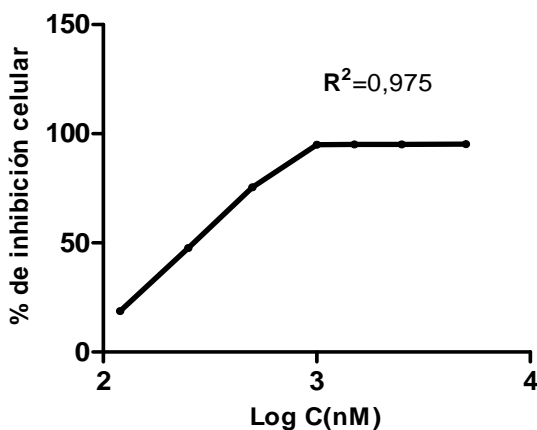


Figura 12. Curva dosis-respuesta de doxorubicina.

Similar procedimiento se realizó con todas las líneas celulares para determinar la IC₅₀, de la doxorubicina en las demás líneas celulares, valores que se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Concentración de doxorubicina capaz de inhibir el 50 % de la población celular en diversas líneas tumorales humanas.

Líneas Celulares Tumorales	IC₅₀ (µM)
A-549 (pulmón)	0,264± 7,478
D-384 (cerebro)	0,099± 2,706
MCF-7 (mama)	1,416±15,132
PC-3 (próstata)	0,176± 2,621
RKO (colon)	0,335± 1,106

Los valores fueron determinados mediante una regresión, a partir de 3 experimentos independientes por triplicado.

Con la estandarización del método mediante curvas dosis respuesta se inició el tamizaje primario de extractos y metabolitos secundarios derivados de especies vegetales.

4.3 Evaluación de la sensibilidad de líneas celulares tumorales humanas a extractos o metabolitos secundarios de origen vegetal.

El tamizaje primario aplicado en las líneas celulares tumorales, fue cuantificado mediante el porcentaje de inhibición a los extractos probados, los cuales podemos observar en la tabla 5. Se puede denotar que el extracto de *A. montana* (AcOEt) produce inhibición en todas las líneas celulares del panel, siendo estos porcentajes mayores al 75 % de inhibición, formando parte de los siguientes ensayos. Así mismo, en el extracto de *A. montana* (MeOH) se muestran una inhibición del crecimiento mayor al 65 % en todas las líneas celulares del panel celular, por lo que proseguiría para las pruebas posteriores.

En contraste, el extracto de *O. andreaeanus* no mostró mayor inhibición, siendo este un porcentaje menor al 50 % en todas las líneas celulares, por lo cual no es un extracto promisorio en la

búsqueda de sustancias antineoplásicas, siendo esta la razón de su descarte en las ensayos ulteriores.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición en panel celular expuesto a extractos de especies vegetales mediante tamizaje primario.

LÍNEAS CELULARES TUMORALES	PORCENTAJES DE INHIBICIÓN		
	<i>A. montana</i> (AcOEt)	<i>A. montana</i> (MeOH)	<i>O. andreanus</i> (diclorometano)
A-549 (pulmón)	90,17±1,71	68,26± 4,64	6,48± 2,34
D-384 (cerebro)	89,68±3,29	73,26±28,35	10,91±10,56
MCF-7 (mama)	78,82±8,56	70,13±19,10	5,23± 8,02
PC-3 (próstata)	80,99±6,88	69,86±20,63	2,29± 3,24
RKO (colon)	88,35±5,79	88,42± 5,48	10,17±10,00

Los extractos se probaron a una concentración de 50 µg/mL. Los valores observados son de 3 experimentos independientes por triplicado.

Conforme al tamizaje primario de los metabolitos secundarios se obtuvo los resultados mostrados en la tabla 6. La molécula de dehidroleucodina tiene un efecto inhibitor mayor al 50 %, hecho por el que prosiguió en los próximos experimentos. Por otra parte los metabolitos secundarios de *C. latipes*, friedelina y acetato de β-amirina inhibieron en un porcentaje menor al 30 % en el panel celular expuesto, lo cual las excluye de ensayos posteriores como compuestos promisorios con actividad antineoplásica.

Tabla 6. Porcentajes de inhibición de líneas celulares tumorales expuestas a metabolitos secundarios mediante tamizaje primario.

LÍNEAS CELULARES TUMORALES	PORCENTAJES DE INHIBICIÓN a 50 µM		
	acetato de β-amirina	DhL	friedelina
A-549 (pulmón)	1,25 ± 2,18	57,16± 4,82	1,27± 1,64
D-384 (cerebro)	30,54±25,35	81,91± 7,12	23,97±17,58
MCF-7 (mama)	15,34±20,40	69,12±14,32	22,03±21,70
PC-3 (próstata)	5,55± 8,48	69,31±13,53	14,32±11,31
RKO (colon)	8,26± 8,96	70,00± 8,76	17,29±12,86

Los metabolitos se probaron a una concentración de 50 µM. Los valores observados son de 3 experimentos independientes por triplicado.

En el caso de la *A. montana* los dos extractos resultaron promisorios, en ese caso seleccionamos al de mayor actividad que fue el de *A. montana* (AcOEt), para establecer la IC_{50} .

4.4 Determinación de la IC_{50} .

Para conocer la IC_{50} de nuestro modelo biológico, se expusieron las líneas tumorales al extracto de *A. montana* (AcEOt) y al metabolito DhL, como ejemplo podemos observar en la figura 13, la curva que presentó una de las líneas celulares D-384.

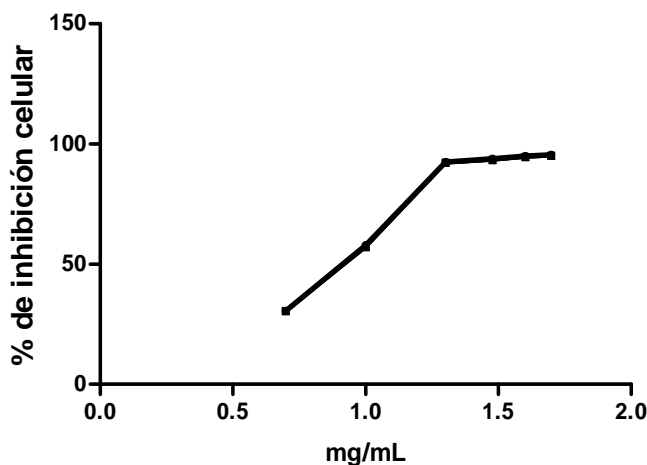


Figura 13. Curva de respuesta de la línea celular D-384 expuesta al extracto de *A. montana* (AcOEt), en 3 experimentos independientes por triplicado.

Establecidas 6 dosis menores de 50 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de *A. montana* (AcOEt) y 50 μM para el metabolito DhL, se calculó la IC_{50} para cada experimento, el promedio de las 3 repeticiones se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Concentración inhibitoria del 50 % de la población celular en líneas celulares tumorales humanas.

LÍNEAS CELULARES TUMORALES	IC ₅₀	
	(µg/mL)	(µM)
	<i>A. montana</i> (AcOEt)	DhL
A-549 (pulmón)	9,67 ± 0,1276	4,33 ± 0,013
D-384 (cerebro)	7,92 ± 0,0369	0,05 ± 0,001
MCF-7 (mama)	6,06 ± 0,0450	11,48 ± 0,380
PC-3 (próstata)	13,12 ± 0,0321	1,86 ± 0,020
RKO (colon)	7,78 ± 0,0407	7,60 ± 0,055

Los valores observados son de 3 experimentos independientes por triplicado.

5. DISCUSIÓN

Actualmente la búsqueda de nuevos compuestos naturales o semisintéticos, que eliminen a células tumorales sin producir mayores efectos tóxicos continua siendo una necesidad; y probablemente será posible al establecer los inhibidores farmacológicos de las vías de señalización alteradas en células e cáncer. Una de las principales fuentes de obtención de nuevos fármacos, son los metabolitos secundarios obtenidos de plantas, las que se caracterizan por poseer nuevas entidades químicas, entre los metabolitos secundarios con actividad antineoplásica están: los triterpenos, cumarinas, flavonoides, sesquiterpenos y diterpenos (Parra *et al.*, 2005). Este estudio se enfoca a la búsqueda de especies vegetales y metabolitos secundarios de la región sur de Ecuador con actividad antineoplásica.

La técnica implementada para el estudio de la actividad antineoplásica, de tinción con violeta cristal, es una técnica rápida, económica y con gran repetitividad (Itagaki *et al.*, 1991; Saotome *et al.*, 1989). Una vez determinados los parámetros más adecuados para el desarrollo de este ensayo en el CBCM, se evaluaron varios extractos vegetales y metabolitos secundarios.

De la familia Araliaceae varias especies se caracterizan por su actividad biológica, como es el caso de la *Dendropanax arboreus*, de la cual se ha aislado el falcarinol, principal compuesto responsable de citotoxicidad *in vitro* (Kintzios & Barberaki, 2004), otro ejemplo es la especie *Panax quinquefolium* usada en la medicina tradicional china (Ginsen), la cual presenta efecto inmunomodulador, sus principios activos conocidos son los Ginsenosidos, que exhiben actividad antitumoral (Kim *et al.*, 1998) y acción en antimetastásica en cáncer de ovario, de mama, de estómago y melanoma) (Kintzios & Barberaki, 2004). El extracto en etanol de *Oreopanax sp.*, ha demostrado tener actividad antitumoral *in vitro* en la línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep G2) (Setzer *et al.*, 1992). A pesar de de ello el extracto en diclorometano de *Oreopanax andreanus*, usado en medicina tradicional para el cáncer, no produjo inhibición en el panel celular, se obtuvieron valores menores al 15% de inhibición celular (tabla 5).

Aunque de los metabolitos secundarios como la friedelina y acetato de β -amirina se ha informado sobre su actividad antiinflamatoria (Recio *et al.*, 1995), en el ensayo de violeta cristal, se encontró que no presentan actividad inhibitoria del crecimiento, el porcentaje de inhibición no fue mayor al 30 % (tabla 6), razón por lo cual no se determinó la IC₅₀.

En cambio, las líneas celulares mostraron ser sensibles a los extractos de *A. montana*, este efecto coincide con la literatura, ya que algunos extractos de diversas *Annonas* así como sus metabolitos secundario, se caracterizan por poseer actividad antineoplásica (García-Barriga, 1974; Kintzios E, 2006; Hopp *et al.*, 1997). De los extractos probados de *A. montana*, como se puede apreciar en la tabla 5, en casi todas las líneas celulares la inhibición es cercana al 80 % con el extracto en AcOEt y un 70 % en el MeOH, una cifra menor pero no despreciable.

Aunque ambos extractos de *A. montana* cumplen con la condición de inhibir a más del 50 % de la población en cada línea celular, que era la norma de exclusión para el tamizaje primario, se decidió continuar trabajando, con un solo extracto, el más potente que en este caso resulto ser el extracto en AcOEt antes que el metanólico.

Es conveniente conocer la eficiencia de la acción inhibitoria del extracto o metabolito en prueba, siendo válida para dicho fin una medida de referencia como es la IC₅₀. La concentración inhibitoria del 50% de la población celular o IC₅₀, es una medida de la eficacia de una sustancia en inhibir la función biológica o bioquímica. Entiéndase el cálculo de la IC₅₀ como la concentración de fármaco que se requiere para reducir la absorbancia a la mitad que la del control. Típicamente, se obtiene una curva sigmoidea e idealmente la IC₅₀ quedará en el centro de la inflexión de la curva (Freshney I, 2000).

La IC₅₀ del extracto *A. montana* AcOEt, en todas las líneas tumorales probadas es menor a 15 μ g/mL, como se detalla en la tabla 7. Por lo publicado se conoce de la presencia de moléculas bioactivas, en la familia *Annonaceae*, estas se distribuyen en grupos químicos como terpenoides, acetogeninas (Kintzios E,

2006) y alcaloides (Krauss *et al.*, 2007), es así que el efecto observado se podría deber a la presencia de algún tipo de estas moléculas. Por lo cual sería importante el establecer el metabolito secundario que responsable de los efectos citotóxicos de los extractos.

En cuanto a la dehidroleucodina se conoce que esta molécula exhibe propiedades antiinflamatorias y acción citoprotectora gastrointestinal, ya que inhibe la degranulación de histamina y serotonina de los mastocitos (intestinales) (Pennisi *et al.*, 2003), es decir posee capacidad selectiva para estabilizar factores citoprotectores e inhibir mediadores proinflamatorios.

Pero otras moléculas como la helenina, que al igual que la DhL es una SLs, ha demostrado compartir algunos efectos como la citotoxicidad, siendo potente contra el crecimiento de leucemia linfocítica murina L1210 y leucemia humana Tmolt3, adenocarcinoma colon, HeLaS3, pulmón broncogénico, KB, osteosarcoma, y células de glioma (Grippio *et al.*, 1992). Lo cual muestra que características químicas estructurales dentro de las SLs, son compartidas y que mejor si esto conlleva un efecto inhibidor.

Es importante acentuar la posible relación existente entre la estructura química y la bioactividad de las SLs, especialmente con su efecto citotóxico, antiinflamatorio y antitumoral (Zhang *et al.*, 2003). Se conoce parcialmente su actividad biológica, la cual está dada por una γ -lactona y el grupo metilo de la DhL que posee un carbono β , el cual actúa como aceptor de Michael (Polo & López, 2004). Adicionalmente se ha sugerido la posibilidad que el grupo exo-metileno en la lactona sea esencial para su efecto citotóxico, ya que las modificaciones estructurales como saturación o adición para el grupo metileno resultan en la pérdida de la inhibición tumoral (Kupchan *et al.*, 1971).

Esta lactona sesquiterpénica (SLs) fue aislada de la especie vegetal *Gynoxis verrucosa*, cuyo extracto metanólico fue reportado que presenta tanto efecto citotóxico como citostático a concentraciones menores a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la línea celular epitelial de ovario de hámster chino CHO-K1 (Astudillo A, 2006), en

ensayos en líneas celulares tumorales humanas obtuvieron la IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en D-384 ($22,06 \pm 10,7$), A-549 ($57,06 \pm 2,61$), MCF-7 ($62,14 \pm 1,69$) y CAKI ($42,73 \pm 8,14$), lo que indicó actividad citotóxica, la cual es evidentemente similar a la observada en la DhL (tabla 7).







Por otro lado, denotamos que la IC_{50} calculada para la DhL (tabla 7) en la presente investigación es menor a la de algunos fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del cáncer, por lo cual es una molécula interesante. Relacionado con esto, se ha señalado que la DhL inhibe la progresión del ciclo celular en células HeLa, en las que conjuntamente reduce la migración y cambia la morfología, razón por la cual es considerada como un nuevo potencial candidato para frenar el crecimiento tumoral y la actividad metastásica (Amaya *et al.*, 2010).

Cabe recalcar que tanto el extracto de *G. verrucosa* como su metabolito secundario la DhL, presentan cierta especificidad por la línea tumoral D-384 (astrocitoma), la cual es muy evidente en el caso de la DhL tomando en cuenta los valores de la IC_{50} (tabla 7) entre las 5 líneas tumorales probadas. Siendo muy interesante, ya que teniendo en cuenta que la IC_{50} de la doxorubicina que es un quimioterapéutico utilizado en el cáncer (tabla 4) es muy similar, estaríamos hablando de una molécula muy prometedora, a nivel farmacológico. Además, reportes experimentales determinan que su Log P es de 2.09, cercano a lo óptimo para penetrar la barrera hematoencefálica (Corwin *et al.*, 2006), hecho que sugiere su posible uso en la clínica del cáncer, por lo que sería recomendable realizar otros estudios comparativos con otros tipos de gliomas, para determinar si presenta efectos similares en este tipo de carcinomas, en las que existen pocas opciones de tratamiento. Dato muy importante, ya que el fin del tamizaje primario es la búsqueda de compuestos con posible efecto antineoplásico a partir de especies vegetales.

En fin el presente tamizaje ha permitido investigar especies vegetales y metabolitos secundarios presentes en la flora endémica de la región sur del Ecuador, de los cuales hay que resaltar que son los más interesantes desde nuestra perspectiva la *Annona montana* y la dehidroleucodina. Dando por sentado

que estos representantes poseen una capacidad inhibitoria importante, digna de seguir siendo estudiada.

6. CONCLUSIONES:

-  La densidad celular óptima en la siembra de las líneas celulares tumorales probadas (A-549, D-384, MCF-7, PC-3, RKO) para la aplicación en el ensayo de tinción con violeta cristal es de 4000 células por pocillo (6,2 mm de diámetro) en multiplacas de 96 pocillos para una incubación de 72 horas.
-  El extracto en diclorometano de *Oreopanax andreanus* y los metabolitos secundarios de *Clusia latipes*: friedelina y acetato de β -amirina, no inhibieron el crecimiento en líneas celulares tumorales.
-  Con los perfiles de sensibilidad generados para las líneas celulares incluidas en el panel, se encontró que éstas responden de manera diferencial, presentando valores de IC_{50} de diferente orden de magnitud frente a la dehidroleucodina, en el extracto de *Annona montana* AcOEt existe un efecto citotóxico marcado similar en todas las líneas probadas.
-  Los extractos de *Annona montana*, tiene un efecto inhibitorio (citotóxico) similar, en las líneas celulares, sin embargo existen diferencias entre los extractos el cual es probablemente debido a la preferencia de los metabolitos secundarios en la extracción con diferentes solventes.
-  La dehidroleucodina muestra efecto inhibitorio, siendo la IC_{50} calculada menor a la de algunos fármacos aplicados en el tratamiento del cáncer, presentando especificidad por la línea tumoral D-384 (astrocitoma).
-  En la estandarización del ensayo de tinción con violeta cristal se comprobó su repetitividad, eficiencia, y efectividad, de manera que es una técnica adecuada para la valoración compuestos como posible agente de quimioterapia.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdolmohammadi M, Fouladdel S, Shafiee A, Amin G, Ghaffari S, Azizi E, (2008). Anticancer effects and cell cycle analysis on human breast cancer T47D cells treated with extracts of *Astrodaucus persicus* (Boiss.) Drude in comparison to doxorubicin. *DARU*. 16(2):112-118.
2. Alali F, Liu X, McLaughlin J, (1999). Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62:504-540.
3. Allan J, Travis L, (2005). Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Review Cancer*. 5:943-955.
4. Alvarez O, Barrachina I, Ayala I, Gonzalez C, Moya P, Neske A, Bardon A, (2008). Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J. Pest. Sci.* 81:85–89.
5. Amaya M, Costantino V, Bertoldi V, Lossino A, López L, (2010). Dehydroleucodine inhibits migration of HeLa cells. *BIOCELL*. 33.
6. ANIARA, (2007). Visión microscópica de la tinción con violeta cristal. Catálogo crystal violet dry elution.
7. Astudillo A, (2006). Estudio citotóxico de plantas medicinales de la región Sur del Ecuador: *Baccharis Latifolia*, *Callisia repens*, *Crotalaria* ssp, *Gynoxis Verrucosa*, *Luchvigia Peruviana*, *Piper Barbatum* y *Tagetes Filifolia*, en la línea celular CHO – K1. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja - Ecuador.
8. Balunas M, Kinghorn A, (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78(5):431-441.
9. Barbounaki-Konstantakou E, (1989). Chemotherapy. Beta Medical Arts, Athens.
10. Barton R, Nakanishi K, Meth-cohn O, (1999). From the book "Comprehensive Natural Products Chemistry". Pergamon. USA. 7(16):593.
11. Bonaventure L, (1999). A cultura da cherimoia e de seu híbrido a atemoia. Edit Nobel. Sao Paulo. 182.
12. Boyd M, (2001). Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval Edited by: B. Teicher Humana Press Inc., Totowa, NJ
13. Brack A, (1995). El Oro verde del Perú – Plantas nativas y Desarrollo. Lima – Perú.
14. Brengio S, Belmonte S, Guerreiro E, Giordano O, Pietrobon E, Sosa M, (2000). The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 86(2):407-412.
15. Calderón A, Vázquez Y, Pablo N. Solís P, Caballero-George C, Zacchino S, Jiménez A, Pinzon R, (2006). Screening of Latin

- American Plants for Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Biology*. 44(2):130–140.
16. Calles J, (2007). Bioindicadores terrestres y acuáticos para las microcuencas de los ríos Illangama y Alumbre, provincia Bolívar. *EcoCiencia*. Quito-Ecuador.
 17. Calzavara B, Müller C, (1987). Fruticultura Tropical: A Gravióleira (*Annona muricata* L.) Belem, EMBRAPA-CPATU. Documentos. 47-36.
 18. Cautín R, Agustí M, (2005). Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill.). *Scientia Horticulturae*. doi:10.1016/j.scienta.2005.01.035.
 19. Cerrini S, Lamba D, Monache F, Pinherio R, (1993). Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hydroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. *Phytochemistry*. 32:1023-1028.
 20. Chao-Ming L, Ning-Hua T, Qing M, Hui-Lan W, Xiao-Jiang H, Yu W, Jun Z, (1997). Cyclopeptide from the sedes of *Annona muricata*. *Phytochemistry*. 45(3):521-523.
 21. Chemicaland21, (2010). Fórmula química del acetato de β -amirina. Disponible en: <http://chemicaland21.com/lifescience/uh/beta-AMYRIN.htm> [consulta enero del 2010].
 22. Cherington M, Strawn M, Shawver K, (2000). *Adv. Cancer Res*. 79:1.
 23. Chiba K, Kawakami K, Tohyama K, (1998). Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. *Toxicology in Vitro*. 12:251-258.
 24. Chin Y, Balunas M, Chai H, Kinghorn A, (2006). Drug Discovery from Natural Sources. *The AAPS Journal*. 8(2):239-253.
 25. Colom O, Barrachina I, Ayala I, Gonzalez M, Moya P, Neske A, Bardon A, (2008). Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J. Pest. Sci*. 81:85-89.
 26. Cordell G, (2000). Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 55:463-480.
 27. Corwin H, Björkroth J, Leo A, (2006). Hydrophobicity and central nervous system agents: On the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 76:663-687.
 28. Cragg G, David J, (2005). Plant as source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:72-79.
 29. Cragg G, Kingston D, Newman D, (2005). *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group. FL-USA.

30. Cragg G, Newman D, (1999). Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investig.* 7(2):153-63.
31. Cragg G, Newman D, (2003). Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. *Ann. Appl. Biol.* 143:127-133.
32. Das B, Yadav J, (1998). In "Role of Biotechnology in Medicinal and Aromatic plants"; I. A. Khan & A. Khanum, Eds; Ukaaz publications. India. 1:13.
33. De Feo V, (2003). Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *J. of Ethnopharm.* 85:243-256.
34. Díaz D, (2006). Características de la apoptosis. Disponible en: <http://www2.uah.es/daviddiaz/Apoptosis/caracteristicas.htm> [consulta enero del 2010].
35. Dobashi Y, Takehana T, Ooi A, (2003). Perspectives on cancer therapy: cell cycle blockers and perturbators. *Curr. Med. Chem.* 10(23):2549-2558.
36. Duno R, Aymard G, Huber O, (2007). "Catálogo anotado e ilustrado de la Flora Vasculare de los Llanos de Venezuela". ISBN 980-379-157-5.
37. eFloras.org, (2004). Fotografía *Clusia latipes*. Disponible en: <http://flora.huh.harvard.edu/FloraData/1001/Images/Clusiaceae/Clusiaceae-Clusia%20sp-001.jpg> [consulta febrero del 2010].
38. Elder D, Halto D, Crew T, Paraskeva C, (2000). *Int. J. Cancer.* 86:553.
39. Fatope M, Audu O, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H, McLaughlin J, (1996). Bioactive Ent-Kaurene Diterpenoids from *Annona senegalensis*. *Journal of Natural Products.* 59:301-303.
40. Freshney I, (2000). Culture of animal cells (a manual of basic technique). Fourth edition. Wiley-Lis. USA.
41. Galluzzi L, Aaronson S, Abrams J, Alnemri E, Andrews D, Baehrecke E, Bazan N, Blagosklonny M, Blomgren K, Borner C, Bredesen D, Brenner C, Castedo M, Cidlowski J, Ciechanover A, Cohen G, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht B, El-Deiry W, Flavell R, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon M, Green D, Gronemeyer H, Hajnó G, Hardwick J, Hengartner M, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky D, Knight R, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton S, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine J, Martin S, Medema J, Mehlen P, Melino G, Moll U, Morselli E, Nagata S, Nicholson D, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter M, Piacentini M, Prehn J, Puthalakath H, Rabinovich G, Rizzuto R, Rodrigues C, Rubinsztein D, Rudel T, Scorrano L, Simon H, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden K, Youle R, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G,

- (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*. 16:1093–1107.
42. Garcia-Barriga, H, (1974). Flora Medicinal De Colombia, vol.1, Universidad Nacional, Bogota.
 43. Garrido H, Yunga E, (2003). Incidencia de Cáncer en Loja. Registro de Tumores 1997-2003. Solca-Loja.
 44. Geilfus F, Bailón P, (1994). El árbol al servicio del agricultor: Guía de especies. Número 9 de Serie técnica. Vol. 2. (El árbol al servicio del agricultor: Manual de agroforestería para el Desarrollo Rural). segunda edición. Biblioteca Orton IICA/CATIE.
 45. Giordano O, Guerreiro E, Pestchanker M, (1990) *J. Nat. Prod.* 53:803-809.
 46. González A, Fraga B, Ravelo A, Luis J, Ferro E, González C, Bazzocchi I, (1990). Consideraciones sobre la biosíntesis de los nor-triterpenos de las Celastraceas. Tomo I. Universidad de Laguna. 389-395.
 47. Grabley S, Thiericke R, (1999). In: *Drug Discovery from Nature*. Springer-Verlag. Berlin –Heidelberg - New York.
 48. Grippo A, Hall I, Kiyokawa H, Muraoka O, Shen Y, Lee K, (1992). *Drug Des Discov.* 8:191.
 49. Gurib A, (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27:1–93.
 50. Hahn W, (2004). Cancer: surviving on the edge. *Cancer Cell*. 6:215-222.
 51. Hanahan D, Weinberg R, (2000). The hallmarks of cancer. *J. Cell*. 100:57-70.
 52. Hartwell J, (1967). Plants used against cancer. A survey. *Lloydia*. 30:379-436.
 53. Herbario N° 80 IQA, UTPL. Fotografía *Gynoxis verrucosa*.
 54. Hopp D, Zeng L, Gu Z, Kozlowski J, McLaughlin J, (1997). Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. *J. Nat. Prod.* 60:581-586.
 55. INFOJARDIN, (2008). *Annona montana* Macfad. Disponible: <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=46860> [consulta marzo del 2010].
 56. INFOJARDIN, (2008). Fruto de *A. montana*. Disponible en: <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=50013&page=3> [consulta marzo del 2010].
 57. Itagaki H, Hagino S, Kobayashi T, Umeda M, (1991). An in vitro alternative to the Darize eye irritation test: evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicology in Vitro*. 5:139-143.

58. Ito A, Chai H, Lee D, Kardono L, Riswan S, Farnsworth N, Cordell G, Pezzuto J, Kinghorn A, (2002). Phytochemistry. 61:171.
59. Johnstone R, Ruefli A, Lowe S, (2002). Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. Cell. 108(25):153-164.
60. Jossang A, Dubaele B, Cavé A, Bartoli M, Bériel H, (1990). Tetrahedron Letters. 31:1861.
61. Kaufmann S, Earnshaw W, (2000). Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. Experimental Cell Research. 256:42-49.
62. Khan D, Kornine K, Omoloso A, (1997). Antibacterial activiti of some Annonaceae Part I. Fitoterapia. 69(4):367-369.
63. Kim G, Zeng L, Alali F, Rogers L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J, (1998). Muricoreacin and murihexocin C, monotetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. Phytochemistry. 49(2):565-71.
64. Kinghorn A, Farnsworth N, Soejarto D, Cordell G, Swanson S, Pezzuto J, Wani M, Wall M, Oberlies N, David J, Keoll D, Kramer R, Rose W, Vite G, Fairchild C, Peterson R, Wild R, (2003). Novel Strategies for the Discovery of Plant-Derived Anticancer Agents. Pharmaceutical Biology. 41:53-67.
65. Kintzios E, (2006). Terrestrial Plant-Derived Anticancer Agents and Plant Species Used in Anticancer Research. Critical Reviews in Plant Sciences. 25(2):79-113.
66. Kintzios E, Barberaki M, (2004). Plants that fight cancer. CRC Press. USA.
67. Köhnlechner M, (1980). Leben ohne Krebs. Wege zum Ziel. Ausgabe 1.-50. Tsd. Knauer - München. ISBN 3-426-26027-1.
68. Konoshima T, Takasaki M, (2000). Anti-tumor-promoting activities (cancer chemopreventive activities) of natural products. Studies in Natural Products Chemistry. 24:215-267. Bioactive Natural Products (Part E).
69. Krauss J, Bracher F, Synowitz K, Unterreitmeier D, (2007). Design and Cytotoxic Evaluation of New Annonaceous Acetogenin Analogues. J. Braz. Chem. Soc. 18(4):691-695.
70. Kupchan S, Eakin M, Thomas A, (1971). J. Med. Chem. 14: 1147.
71. Laza D, Rodríguez I, Sardiña G, (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. Rev. Cubana Plant. Med. 8(3).
72. Lee K, (1999). J. Biomed. Sci. 6:236-250.
73. Liaw C, Chang F, Wu C, Chen S, Bastow K, Hayashi K, Nozaki H, Lee K, Wu Y, (2004). Nine New Ccytotoxic Monotetrahydrofuranic Annonaceous Acetogenins from *Annona montana*. Plant Med. 70:948-959.

74. Lindholm P, (2005). Cytotoxic Compounds of Plants Origin-Biological and Chemical Diversity. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from Faculty of Pharmacy 7, 71 pp. Upsala. ISBN 91-554-6197-2.
75. Linuma M, Tosa H, Tanaka T, Ito T, Tanaka T, Madulid D, (1996). Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Pharm. Pharmacol. 48:861-865.
76. Lizana L, Reginato G, (1990). Cherimoya In: Fruits of tropical and subtropical origin: Composition, properties and uses. Florida Science Source, Florida, USA. 131-148.
77. Manfredi J, Horwitz S, (1984). Pharmacol. Ther. 25: 83.
78. Mans D, Da Rocha A, Schwartzmann G, (2000). Anticancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. Oncologist. 5:185-98.
79. Melek F, Miyase T, Khalik A, Hetta M, Mahmoud I, (2002). Triterpenoid saponins from *Oreopanax guatemalensis*. Phytochemistry. 60:185-195.
80. Melillo P, (2002). Agrotecnologia para o cultivo da Espinheira Santa. CPQBA-UNICAMP, C.P. 6171, CEP: 13.081-970. Disponible en: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm> [consulta febrero del 2010].
81. Ministerio de Salud Pública (MSP), (2009). Indicadores Básicos de Salud. Ecuador 2008.
82. Moncayo J, (1989). Estudio taxonómico de las especies de hojas enteras de *Orepanax* (Araliaceae) en el bosque montano ecuatoriano. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
83. Montúfar R, Pitman N, (2003). *Oreopanax andreanus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Disponible: <http://www.iucnredlist.org/>. [consulta julio del 2010].
84. Mootoo B, Ali A, Khan A, Reynolds W, McLean S, (2000). Three Novel Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona montana*. J. Nat. Prod. 63:807.
85. Morean F, (1999). Herbal Educational Recreational and Biological Services (HERBS) at Arima, Trinidad, personal communication.
86. Morton J, (1999). "Wild Custard Apple". New Crops. Department of Horticulture & Landscape Architecture, Purdue University. 86-88. Disponible: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/wild_custard_apple_ars.html.

87. Mosmann T, Denizot F, Lang R, (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 65:55–63.
88. Motoyama N, Naka K, (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Current Opinion in Genetics & Development.* 14:11-16.
89. Moura A, Perazzo F, Maistro E, (2008). The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term *in vivo* assays. *Genet. Mol. Res.* 7(4): 1360-1368.
90. Moura J, (1988). A cultura da Graviola em Areas irrigadas. In: Uma nova opção. Fortaleza, DNOCS: 42.
91. Mukherjee A, Basu S, Sarkar N, Ghosh A, (2001). Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *Current Medicinal Chemistry.* 8:1467-1486.
92. Nakanishi K, (2000). An historic prospective of Natural Products Chemistry. Vol. 1. Pergamon. USA.
93. Nandi, P, Talukdar, G, Sharma A, (1998). *The Nucleus.* 41(1,2):53.
94. Newman D, Cragg G, Snader K, (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products.* 66:1022-1037.
95. O'Neill M, Lewis J, (1993). In *Human medicinal agents from Plants*; Kinghorn A, & Balandrin M, Eds; Washington D.C.: American Chemical Society. 534:48-55.
96. Oliveira M, Monteiro M, Macaubas C, Pereira Barbosa V, Carlini E, (1991). Pharmacologics and toxicologics effects of two Maytenus species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 34(1):29-41.
97. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2008. Cáncer, Nota descriptiva N° 297. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [consulta diciembre del 2009].
98. Organización Panamericana de la Salud, 2007. Situación de Salud en las Américas: Indicadores Básicos, 2007. Plan de Acción propuesto por la OPS para la Prevención y el Control del Cáncer, 2008–2015.
99. Paolini M, (1998). Brussels sprouts: an exceptionally rich source of ambiguity for anticancer strategies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152(2):293-294.
100. Parra H, Garcia F, Sordo M, Ramírez T, Martinez M, Ostrosky P, (2005). Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentinina A and Argentinina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences.* 77:2855-2865.
101. Penissi A, Giordano O, Guzmán J, Rudolph M, Piezzi R, (2006). Chemical and Pharmacological Properties of Dehydroleucodine,

- A Lactone isolated from *Artemisia douglasiana* Besser. 10: 1-11.
102. Pezzuto J, (1997). Plant-Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology*. 53:121-133.
 103. Philipov S, Kandé K, Machev K, (1995). Alkaloids of *Annona senegalensis*. *Fitoterapia*. 66:275-276.
 104. Pinto A, Cordeiro M, De Andrade S, Ferreira F, Filgueiras H, Alves R, Kinpara D, (2005). *Annona* species, Internacional Centre for Underutilised Crops. University of Southampton, Southampton, UK.
 105. Polo L, Castro C, Cruzado M, Collino C, Cuello-Carrión D, Ciocca D, Giordano O, Ferrari M, López L, (2007). 11,13-dihydro-dehydroleucodine, a derivative of dehydroleucodine with an inactivated alkylating function conserves the anti-proliferative activity in G2 but does not cause cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology*. 556:19-26.
 106. Polo L, López L, (2004). Anti-proliferative activity of 2h-dhl, a dehydroleucodine derivate with an inactivated a,b-unsaturated g-lactone ring. *BIOCELL*. 28(3).
 107. Ponder B, (2001). Cancer genetics. *Nature*. 411:336-341.
 108. Proyecto P-FN 0133. Bioactividad de aceites y extractos de plantas medicinales y aromáticas de la región sur del Ecuador. Septiembre 2004.
 109. Rahman A, Iqbal M, (2001). Thomsen W. Bioassay techniques for drug development. Harward Academic Publishers. USA.
 110. Recio M, Giner R, Mañéz S, Ríos J, (1995). Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Plant Med*. 61:182–185.
 111. Reddy L, Odhav B, Bhoola K, (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 99:1-13.
 112. Reyes R, Estrada E, Ramírez T, Amekrazb B, Aumelasb A, Jankowskib C, Vázquez M, (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences*. 75:1635–1647.
 113. Rothenberg M, Carbone D, Johnson D, (2003). Improvin the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. *Nature Reviews - Cancer*. 3:303-309.
 114. Salluja A, Santani D, (1990). Phytochemical study of *Annona squamosa*. *Fitoterapia*. 61(4):359-360.
 115. Saotome K, Morita H, Umeda M, (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro* 3:317-321.

116. Setzer W, Flair K, Byler G, Huang J, Thompson M, Setzer M, Moriarity D, Lawton R, Windham-Carswell D, (1992). Antimicrobial and cytotoxic activity of crude extracts of Araliaceae from Monteverde, Costa Rica. *Brenesia*. 38:123-130.
117. Setzer W, Setzer M, (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini-Review in *Medicinal Chemistry* 3, 540–556.
118. Sherr C, (2004). Principles of tumor suppression. *J. Cell*. 116:235–246.
119. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren J, Bokesch H, Kenney S, Boyd M, (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 82:1107–1112.
120. Srivastava V, Negi A, Kumar J, Gupta M, Khanuja S, (2005). Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13:5892-5908.
121. Stehman F, Rose P, Greer B, Roy M, Plante M, Penalver M, Jhingran A, Eifel P, Montz F, Wharton J, (2003). Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. *Cancer*. 98(9): 2052:2065.
122. Tan M, Sulaiman S, Najimuddin N, Samian M, Muhammad T, (2005). Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. 96:287-294.
123. Tene V, Malagón O, Vita Finzi P, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T, (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *J. Ethnopharmacology*. 111:63-81.
124. Tsuda H, Ohshima Y, Nomota H, (2004). Cancer Prevention by Natural Compounds. *Drug Metab. Pharmacokin*. 19(4): 245-263.
125. Valencia C, (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. Editorial Trillas. México. Pág. 194 – 198.
126. Valeriote F, Grieshaber C, Media J, Pietraszkewics H, Hoffmann J, Pan M, McLaughlin S, (2002). Discovery and development of anticancer agents from plants. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 2:228-236.
127. Vega E, Velasco R, Jiménez M, (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *J. Bioq*. 31:97-111.
128. Villavicencio M, Perez B, Mendoza E, (2008). Citotoxicidad en células HELA de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, Mexico. *Polibotánica*. 26:137-147.
129. Walker J, (1999). *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. Humana Press Inc. USA.

130. Wang L, Min B, Li Y, Nakamura N, Qin G, Lib C, Hattoria M, (2001). Annonaceous Acetogenins from the Leaves of *Annona montana*. *Bioorganic& Medicinal Chemistry*. 10:561-565.
131. Wani M, Taylor H, Wall M, Coggon P, McPhail A, (1971). *J. Am. Chem. Soc.* 93(9), 2325.
132. Yoder B, (2005). Isolation and structure elucidation of cytotoxic natural products from the rainforests of Madagascar and Suriname. Blacksburg, Virginia.
133. You M, Wickramaratne D, Silva G, Chai H, Chagwedera T, Farnsworth N, Cordell G, Kinghorn A, Pezzuto J, (1995). (-) Roemerine, an Aprocaine Alkaloid from *Annona senegalensis* that Reverses the Multidrug-Resistance Phenotype with Cultured Cells. *Journal of Natural Products*. 58(4):598:604.
134. Zhang Y, (2003). Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J Asian Nat Prod Res* 6, 19-27.