



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA  
*La Universidad Católica de Loja*

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO DEL TIPO DE MUERTE INDUCIDO POR  
ARGENTATINA B, SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON  
(RKO) Y CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA (U251)**

Previo a la obtención del título  
de Bioquímico Farmacéutico

**AUTOR:**

Jennifer Yajaira Ordóñez Calvas

**DIRECTORA:**

Dra. Natalia Catalina Bailón Moscoso

Loja- Ecuador  
2010

## **CERTIFICACIÓN**

Dra.

Natalia C. Bailón M.

**DIRECTORA DE TESIS**

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la Srta. Jennifer Yajaira Ordóñez Calvas, previo a la obtención del título de **BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Dra. Natalia C. Bailón Moscoso

**DIRECTORA**

## **AUTORÍA:**

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

Jennifer Yajaira Ordóñez Calvas

## **DEDICATORIA:**

Quiero dedicar este trabajo de investigación primero a Dios, por haberme regalado la vida y a la Virgencita de El Cisne, ya que sin Ellos no hubiese sido posible culminar esta etapa de mi vida.

Y con todo mi amor dedico también este trabajo a mi querida mamita Patricia Calvas y a mi adorado papito Marco Ordóñez, por ser mi inspiración y la fuerza que motiva mi vida, por haberme apoyado en todo momento, por su amor y confianza y por todos los sacrificios que hicieron para que yo pueda alcanzar una de mis metas, que es el acabar mis estudios superiores.

Finalmente dedico este trabajo a mis queridos hermanos Katyta y Marquito, que con su cariño, han sabido motivarme y apoyarme en todos los aspectos de mi vida.

Jennifer Yajaira Ordóñez Calvas

## **AGRADECIMIENTO:**

El presente trabajo ha sido posible gracias a la participación de varias personas, que de alguna manera han aportado con un granito de arena para la culminación del mismo; es por ello que aprovechando este espacio, les expreso a todas y cada una de ellas mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, Directora del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL y Directora de este trabajo de investigación, quien acertadamente ha sabido guiarme tanto en el campo científico como personal.

Al Dr. PhD. Luis Miguel Romero, Rector Canciller de la UTPL por su apoyo y por brindarnos toda la facilidad y accesibilidad a las instalaciones de la UTPL.

Al Dr. Alejandro Zentella, Investigador Titular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; y del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (México); y, al Dr. Mariano Martínez, Investigador Titular ‘C’ de Tiempo Completo en el Instituto de Química de la UNAM, y, Representante del Instituto de Química ante los Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y en Ciencias Químicas. UNAM; ya que gracias a su contribución académica y científica, hicieron posible el desarrollo del presente trabajo.

A todos mis queridos maestros, que con su sabiduría han sabido inculcarme sus conocimientos a lo largo de mi carrera, permitiéndome culminar con éxito mis estudios superiores.

A mis compañeros de clase y de escuela, por su amistad y por haber compartido muchos momentos de mi vida, especialmente a Diana Loaiza, Gabriela Ordóñez, Isabel

Vivanco, Verónica Morocho y Daniela Castillo (mi gremio), que más que mis amigas han sido y son como mis hermanas.

A todos mis compañeros de laboratorio; docentes investigadores, becarios y demás, por su colaboración y apoyo; al B.F. Luis Miguel Guamán y al Ing. Juan Carlos Romero, por haberme ayudado en todo lo que necesité para poder culminar este trabajo.

Y especialmente quiero agradecer a mis padres y hermanos, quienes han sido, son y serán los pilares fundamentales de mi vida, por ser siempre incondicionales y por darme su amor en todo momento.

De todo corazón, mil gracias a todos.

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS**

Yo, Jennifer Yajaira Ordóñez Calvas declaro ser la autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Jennifer Yajaira Ordóñez Calvas

**AUTORA**

Dra. Natalia C. Bailón Moscoso

**DIRECTORA DE TESIS**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	I
AUTORÍA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. CÁNCER	1
1.1.1. Causas del Cáncer	1
1.1.2. Factores de Riesgo	2
1.1.3. Incidencia	2
1.1.4. Tratamiento del Cáncer	3
1.1.4.1. Procedimientos quirúrgicos	3
1.1.4.2. Radioterapia	3
1.1.4.3. Quimioterapia	3
1.1.5. Tipos de Antineoplásicos	4
1.1.5.1. Antineoplásicos que actúan sobre el DNA	4
1.1.5.2. Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis	5
1.1.5.3. Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario	5
1.1.5.4. Hormonas y Antagonistas de Hormonas	5
1.1.6. Antineoplásicos de Origen Natural	5
1.1.6.1. Triterpenos	6
1.1.7. <i>Parthenium argentatum</i> (GUAYULE)	7



1.2. TIPOS DE MUERTE CELULAR	9
1.2.1. Apoptosis	9
1.2.2. Necrosis	12
1.2.3. Senescencia	13
1.2.4. Autofagia	14
1.2.5. Catástrofe Mitótica	15
1.2.6. Oncosis	16
1.3. BIOMARCADORES CELULARES	17
1.3.1. Determinación de la Viabilidad Celular	17
1.3.1.1. Viabilidad por Captación de FDA-BrEt	18
1.3.2. Anticoagulante Vascular $\alpha$	18
1.3.3. Determinación de Caspasas	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1 General	20
2.2 Específicos	20
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1. CULTIVO CELULAR	21
3.1.1. Medios de Cultivo	21
3.2. VIABILIDAD CELULAR	21
3.3. ACTIVIDAD APOPTÓTICA: CUANTIFICACIÓN DE CASPASA 3.	22
3.4. EXTERNALIZACIÓN DE LA FOSFATIDILSERINA	24
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
<b>4. RESULTADOS:</b>	<b>26</b>
4.1. VIABILIDAD CELULAR	26
4.1.1. Línea Celular de Cáncer de Colón (RKO)	26
4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA: CUANTIFICACIÓN DE CASPASA 3	27
4.2.1. Línea Celular RKO	27

4.2.2. Línea Celular U-251	28
4.3. EXTERNALIZACIÓN DE LA FOSFATIDILSERINA	29
4.3.1. Línea Celular RKO	29
4.3.2. Línea Celular U-251	32
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>44</b>

## **ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS**

Fotografía 1. <i>Parthenium argentatum</i>	7
--	---

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura Química de las Argentatinas A, B y C.	8
--	---

## **ÍNDICE DE GRÁFICAS**

Gráfico 1. Curva de Calibración para Bradford	23
Gráfico 2. Viabilidad Celular RKO	26
Gráfica 3. Actividad de Caspasa 3 de la Línea Celular RKO	27
Gráfico 4. Actividad de Caspasa 3 de la Línea Celular RKO, durante varios de tiempo de Exposición a Argentatina B.	28
Gráfico 5. Actividad de Caspasa 3 de la Línea Celular U-251	29
Gráfico 6. Porcentaje de Células RKO en apoptosis Temprana	30

Gráfico 7. Porcentaje de Células RKO necróticas	31
Gráfico 8. Comparación entre el porcentaje de células RKO vivas, obtenidas con Anexina V y FDA-BrEt	32
Gráfico 9. Porcentaje de Células U-251 en apoptosis Temprana	33
Gráfico 7. Porcentaje de Células U-251 necróticas	34
Gráfico 8. Comparación entre el porcentaje de células U-251 vivas, obtenidas con Anexina V y FDA-BrEt	35

## RESUMEN:

La Argentatina B es un triterpeno aislado de la resina de *Parthenium argentatum*, según los estudios realizados, puede inhibir el desarrollo celular. La importancia de determinar el tipo de muerte que una molécula puede inducir en este caso Arg. B, radica principalmente en que la muerte celular se da por varias vías, entre ellas: apoptosis, necrosis, senescencia, autofagia, catástrofe mitótica, oncosis; de estas la apoptosis es considerada como una de las alternativas para erradicar el cáncer, ya que es una muerte no invasiva y controlada genéticamente, es por ello que en la actualidad se está buscando moléculas que puedan inducir apoptosis. Mediante el uso de biomarcadores se puede determinar el posible tipo de muerte por el que ha cursado la célula, en este estudio se utilizó previo a un estudio de viabilidad por captación de colorante (FDA-BrEt), Anexina V y cuantificación de caspasa 3; todos los resultados obtenidos en los diferentes ensayos nos indican que Arg. B no es un buen inductor de apoptosis sobre las líneas celulares tumorales humanas RKO y U-251 y que la muerte inducida posiblemente es por necrosis, ya que se observó una baja expresión de caspasa 3 y un porcentaje no significativo de células apoptóticas mediante Anexina V, ocurriendo lo contrario con el porcentaje de células necróticas. Tomando en cuenta los resultados obtenidos, sería conveniente realizar investigaciones con los derivados de Argentatina B, para evaluar su actividad sobre líneas celulares tumorales humanas, para así determinar el tipo de muerte que éstas induzcan, con el fin de encontrar una molécula que estimule la activación de la vía apoptótica y pueda ser usada como un antineoplásico potencial.

**Palabras Claves:** Argentatina B, muerte celular, biomarcadores, apoptosis.

## **ABSTRACT:**

The Argentatina B is an isolated triterpeno of the *Parthenium argentatum* resin, which, according to the studies, can inhibit the cellular development. The importance of determining the type of death that certain molecule may induce, in this case Arg. B, resides mainly in that the cellular death is given by several causes, among them are: apoptosis, necrosis, senescencia, autofagia, mitotic catastrophe, oncosis; of all these, the apoptosis is considered as one of the alternatives to eradicate cancer, because this a non invasive death and it is genetically controlled, this is why nowadays molecules that can induce apoptosis are being looked for. Through bio-indicators it is possible to determine the probable type of death the studied cell has been through, in this research, previous to a study of viability for reception of coloring, (FDA-BrEt), Anexina V and the caspasa 3 quantification were used; all the results obtained in the different rehearsals indicate us that Arg. B is not a good apoptosis inductor on the human tumor cell lines RKO and U-251 and that the possible death that this molecule induces is due to necrosis, since a low caspasa 3 incidence was observed and through Anexina V, a non significant percentage of apoptotic cells was observed, being the opposite with the necrotic cells percentage. Taking into account the obtained results, it would be convenient to carry out investigations with derivatives of Argentatina B, to evaluate its activity over the human tumor cell lines, to determine the type of death that these induce, with the purpose of finding a molecule that stimulates the activation of the apoptotic road and can be used as a potential anti-neoplasico.

**Key Words:** Argentatina B, cellular death, biomarkers, apoptosis.

## **1. INTRODUCCIÓN:**

### **1.1. CÁNCER**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo; también se lo conoce con otros términos como tumores malignos o neoplasias; el cáncer está caracterizado por un crecimiento descontrolado de las células debido a cambios en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Aragues *et. al.*, 2008)

Normalmente, las células crecen y mueren de manera controlada, pero las células cancerígenas se multiplican sin control y se caracterizan de manera importante porque evaden la muerte por apoptosis, esta característica es considerada como un sello de las células de cáncer, pudiendo presentar resistencia a los tratamientos usados para erradicar esta enfermedad (Hitoshi y Tak, 2004).

#### **1.1.1. Causas del cáncer**

El cáncer inicia a partir de una sola célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso de varias etapas, por lo general una progresión de una lesión precancerosa a tumores malignos, estos cambios son el resultado de la interacción entre factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes externos, entre ellos:

- Carcinógenos físicos: luz ultravioleta y radiación ionizante.
- Carcinógenos químicos: el amianto, los componentes del humo del tabaco, la aflatoxina y arsénico.
- Carcinógenos biológicos: infecciones por determinados virus, bacterias o parásitos.

Otro factor fundamental para el desarrollo del cáncer es el envejecimiento, la incidencia del cáncer aumenta conforme aumenta la edad. La acumulación de riesgos en general se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación

celular a ser menos eficaz cuando una persona envejece (OMS, 2007).

### **1.1.2. Factores de Riesgo:**

Un factor de riesgo es cualquier cosa que aumente las probabilidades de que una persona padezca de una enfermedad como el cáncer. Diferentes tipos de cáncer tienen distintos tipos de factores de riesgo

El consumo de tabaco y alcohol, ingesta insuficiente de frutas y hortalizas, las infecciones crónicas de hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC) y algunos tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH) son los principales factores de riesgo de cáncer en los países de bajos y medianos de ingresos.

Todos estos factores aumentan el riesgo de la persona, pero no siempre "causan" la enfermedad. Muchas personas que tienen uno o más factores de riesgo nunca desarrollan un cáncer, mientras que otras que padecen de esta enfermedad no tienen ningún factor de riesgo conocido. No obstante, es importante conocer acerca de estos factores de riesgo, de manera que puedan tomarse medidas apropiadas para poder prevenir o realizar una detección temprana de un posible cáncer.

### **1.1.3. Incidencia:**

De acuerdo con la OMS, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. Los tipos de cáncer más comunes son el de pulmón, estómago, colon y recto, hígado, y mama. Más del 70% de todas las muertes se produjeron en países de bajos y medianos ingresos. En el Ecuador durante el año 2007, se le atribuyen al cáncer aproximadamente 7.329 muertes (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008). Las muertes por cáncer en el mundo se prevé que siga aumentando, con un estimado de 12 millones de muertes en 2030 (Yunga y Garrido 2006).

En hombres los tipos de cáncer más comunes en orden de número de muertes son el de pulmón, estómago, hígado, colon y recto, esófago y próstata; y, en las mujeres el de mama, pulmón, estómago, colorrectal y de cuello uterino (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, 2007).

Según el Registro Nacional de Tumores del Ecuador, se producen al año alrededor de 55 mil muertes por distintas causas, el 12% tienen origen en el cáncer, especialmente de mama y cérvix (cuello uterino) en las mujeres y próstata y estómago en los hombres (Yépez, 2006). En la provincia de Loja durante el periodo 1997 al 2002 se ha presentado una alta incidencia de cáncer, la cual representa el 45,28% del total de casos a nivel nacional (Yunga y Garrido 2006).

#### **1.1.4. Tratamiento del cáncer:**

En la actualidad, se cuenta con tres estrategias principales para el tratamiento curativo o paliativo del cáncer: procedimientos quirúrgicos, quimioterapia y radioterapia (García, 2000).

**1.1.4.1. Procedimientos quirúrgicos:** Por medio del cual se extirpa el tumor y el tejido de su alrededor para evitar que el tumor vuelva a crecer. Por lo general, después de la cirugía, el tratamiento se complementa con quimioterapia, radioterapia y/o terapia de bloqueo de hormonas (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, 2007).

**1.1.4.2. Radioterapia:** Es un procedimiento terapéutico que utiliza cantidades altas de radiación ionizante para destruir células cancerosas y evitar que se diseminen (Zomeño, 2002).

**1.1.4.3. Quimioterapia:** Es un procedimiento terapéutico farmacológico, que consiste en la utilización de fármacos, denominados antineoplásicos o quimioterápicos para el tratamiento curativo o atenuante del cáncer. Se emplea en fases tempranas del tratamiento ya que es



entonces cuando los tumores son más curables y el paciente tiene mayor capacidad de tolerar el tratamiento (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, 2007). Los agentes quimioterápicos se pueden administrar por inyección directa al flujo sanguíneo o por dosificación oral para ser absorbidos hacia la sangre (Lindholm, 2005).

En contraste con la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia es la forma de terapia sistémica más efectiva (Lindholm, 2005).

La mayoría de los fármacos que se utilizan actualmente parecen ejercer su efecto principalmente sobre la multiplicación celular y sobre el crecimiento del tumor (Skeel, 2000). Pero uno de los aspectos negativos de estos fármacos es que además de actuar sobre las células cancerosa actúan también sobre las células normales, particularmente sobre las que tienen un recambio rápido (células de la médula ósea y las de las mucosas); por lo tanto a la hora de seleccionar un fármaco eficaz, el objetivo será encontrar el que inhiba el crecimiento celular o controle la célula cancerosa con el mínimo efecto tóxico sobre el paciente (Skeel, 2000).

### **1.1.5. Tipos de antineoplásicos**

Los fármacos antineoplásicos tienen características especiales que los hacen diferentes a otros grupos farmacológicos; son fármacos con un estrecho margen terapéutico, una elevada toxicidad y pueden inducir la aparición de resistencia en células cancerosas (Pradillo, 2002).

Los fármacos antineoplásicos, en función del punto de acción en la célula, se clasifican en:

**1.1.5.1. Antineoplásicos que actúan sobre el ADN:** Afectan a la integridad de las cadenas de ácidos nucleicos, impidiendo

la replicación celular normal (por ejemplo ciclofosfamida, cloranbucil, bleomicina, etopocidos, etc.) (Pradillo, 2002).

**1.1.5.2. Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis celular:** Interfieren en el proceso de la mitosis y por tanto bloquean el proceso de división celular, tienen pocos efectos sobre las células que no se dividen. Afecta a los microtúbulos necesarios para formar el huso cromático en la mitosis impidiendo o promoviendo la formación de estructuras microtubulares alteradas, pero no afectan directamente al DNA (por ejemplo taxol, vincristina, vindesina, vinblastina, docetaxel, etc.) (Pradillo, 2002).

**1.1.5.3. Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario:** estos potencian la acción del sistema inmunitario, ya que éste es capaz de reconocer y destruir las células cancerosas (por ejemplo rituxan, herceptina, etc.) (Pradillo, 2002).

**1.1.5.4. Hormonas y Antagonistas de Hormonas:** cada fármaco tiene efecto distinto. Algunos son mediados directamente a nivel celular por unión del fármaco a receptores citoplasmáticos específicos o por inhibición de la estimulación de la producción o de acción hormonal. También pueden actuar estimulando o inhibiendo los factores de crecimiento naturales autocrinos o paracrinos.(Skeel, 2000).

## **1.1.6. Antineoplásicos de origen natural**

Muchos principios activos de origen natural han resultado ser compuestos líder a partir de los cuales se ha logrado desarrollar numerosos fármacos, es por ello que el estudio de estos se mantiene vigente como una estrategia de búsqueda de nuevos agentes terapéuticos (Gragg, 2005).

La búsqueda de drogas de origen vegetal para el tratamiento del cáncer, involucra una combinación de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares; con el fin de obtener

agentes clínicamente eficaces, que nos permitan conocer su modo de acción y que presenten menos efectos secundarios para el paciente (Parra, 2006).

Las plantas proporcionan un amplio espectro de sustancias farmacológicas para el tratamiento del cáncer, con múltiples efectos (Laszczyk, 2009), entre ellas están los metabolitos secundarios; es posible encontrar en cada grupo de metabolitos secundarios por lo menos un representante con características anticancerosas; destacándose principalmente los triterpenos, además de las cumarinas, los flavonoides, los sesquiterpenos, los diterpenos (Parra, 2006).

#### **1.1.6.1. Triterpenos:**

Muchas especies se caracterizan por su amplia gama de sustancias triterpenoides, presentes en sus órganos en donde desempeñan diferentes actividades (Rocha *et al.*, 2000). Pueden ser parte constitutiva de la planta o su expresión se puede inducir a través de estrés biótico (Salminen *et al.*, 2008). Los triterpenos constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios derivados del escualeno o de precursores acíclicos de 30 átomos de carbono (Parra, 2006).

Hasta el momento se conoce que los triterpenos pueden actuar como antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores, cardioprotectores, antagonistas de los receptores de estrógenos, antiproliferativos, citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano antiangiogénicos y propapoptóticos (Parra 2006; Salminen *et al.*, 2008).

Se han estudiado más de 100 triterpenos con actividad citotóxica (Setzer y Setzer, 2003), a algunos de estos triterpenos se los ha atribuido como anticancerosos, por ejemplo los del tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, cucurbitacinas y las quinonas metilúricas (Parra, 2006).

Investigaciones recientes han demostrado que es posible obtener nuevos antineoplásicos a partir de los triterpenos, pudiéndose obtener nuevos fármacos que tengan propiedades no tóxicas, antimutagénicas y anticarcinogénicas, disminuyéndose así los efectos adversos (Scarpato *et. al.*, 1998).

### **1.1.7. *Parthenium argentatum* (GUAYULE)**

*P. argentatum* (Fotografía N° 1), es un pequeño arbusto conocido con el nombre de “Guayule” que significa “planta que contiene hule”, es decir es productor de hule natural. Nativo del norte de México y del sur de Estados Unidos, ha demostrado ser una fuente rica de compuestos biológicamente activos entre los que se encuentran algunos triterpenos (Parra, 2006).



Fotografía N° 1. *Parthenium argentatum*  
(Fuente: DeLange y DeLange, 2008)

Mientras se da el proceso de industrialización del guayule se obtiene como subproducto un componente resinoso que constituye aproximadamente el 5% del peso seco de la planta. El estudio sistemático de la resina del guayule ha revelado la presencia de compuestos aromáticos, terpenos y ácidos grasos. Además, se encontró que la resina estaba constituida por una gran cantidad de compuestos triterpénicos, de tipo cicloartano y lanostano conocidos como argentatinas e

isoargentatinas respectivamente. Estos compuestos constituían cerca del 55% de los componentes totales; de los cuales, el 27% representaban los cicloartanos de tipo argentatinas A, B y C (Fig. 1.) (Parra, 2006).

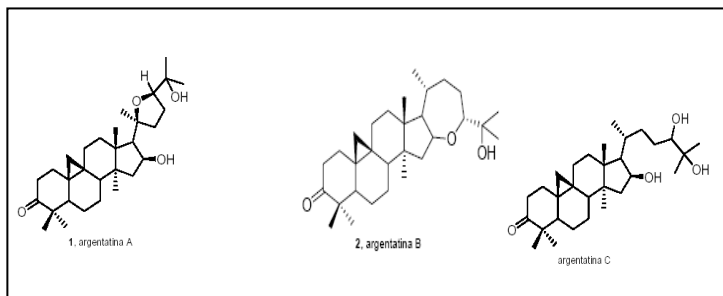


Fig. 1. Estructura Química de la Argentatinas A, B y C.  
(Fuente: Parra, 2006)

Según estudios preliminares realizados en el Instituto de Química de la UNAM (2006), se demostró que las argentininas A y B inhibían, de manera dosis- dependiente, el edema inducido por el promotor de tumores 13-acetato-12-O-decanoil forbol (TPA) en el modelo de inflamación de la oreja de ratón. Además, la argentinina A posee actividad antimicrobiana, mientras que, la argentinina B es un inhibidor no competitivo de la unión de estradiol a los receptores hormonales (en tumores de mama dependientes de estrógeno) (Parra, 2006).

De igual manera las pruebas de inhibición del crecimiento en varias líneas celulares de cáncer humano (K-562, MCF-7, PC-3, HCT-15 y U-251), demuestran que la Argentinina B presenta una  $IC_{50}$  de entre 20.22 a 79.38  $\mu M$ , mientras que en el Ensayo de Micronucleos con bloqueo de la citocinesis (Mn) se demostró que no es genotóxica en linfocitos humanos (Parra *et. al.*, 2005).

Cada molécula actúa de diferente manera sobre las células tumorales, es por ello la importancia de determinar el tipo de muerte que estos pueden inducir para así conocer el mecanismo de acción y poder encontrar un posible antineoplásico que produzca menos efectos secundarios sobre los pacientes, pero que no pierdan la eficacia para el tratamiento y la erradicación del cáncer.

## **1.2. TIPOS DE MUERTE CELULAR**

A mediados del siglo XIX se determinó que la muerte celular cumple una función fisiológica importante en organismos multicelulares (Kerr *et. al.*, 1972). La muerte celular se da por varias vías, entre ellas están: apoptosis, necrosis, senescencia, autofagia, catástrofe mitótica, oncosis, entre otros.

### **1.2.1. Apoptosis:**

El término apoptosis se deriva de las palabras griegas “apo” y “ptosis”, que en conjunto significan “Caída de las hojas en otoño” (Schinoni y Parana, 2006). La apoptosis o muerte celular programada, se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento celular, como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones adecuadas de células en los tejidos, que se encuentran en un delicado equilibrio entre proliferación y muerte celular (Engeland *et. al.*, 1998); también ocurre como un mecanismo de defensa, por ejemplo en reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Elmore, 2007).

A la apoptosis también se la conoce con el nombre de “suicidio celular” que se activa en beneficio del organismo (Chipuk y Green, 2006). Existe una gran variedad de estímulos y condiciones tanto fisiológicos como patológicos, que pueden desencadenar la apoptosis; no necesariamente todas las células mueren en respuesta al mismo estímulo (Elmore, 2007).

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

La apoptosis está dada por cuatro etapas:

1. Inicio: varios agentes a través de procesos tanto fisiológicos como patológicos pueden estimular a los receptores de muerte de la célula o causan daño al DNA desencadenando sus efectos sobre la misma (Li *et. al.*, 2004). Fisiológicamente, la apoptosis se da para permitir el remodelamiento de estructuras del organismo, para liberar espacio o para dar paso a la formación de un nuevo tejido u órgano (Elmore, 2007); además la apoptosis se puede activar para la eliminación de células producto de una sobreproliferación (hiperplasia o procesos de cicatrización) (Jordan y Harrison, 2003). Patológicamente la apoptosis puede ser activada por agentes externos (virus, bacterias, químicos, radiación, etc.) alterando el metabolismo normal de las células conduciéndola hacia la muerte; la exposición del DNA a mutágenos puede dar lugar a mutaciones o activar genes con carácter patológico (oncogenes) (Jordan y Harrison, 2003).
2. Decisión: La maquinaria de reparación es activada, permitiendo que la célula decida entre seguir viviendo o morir. p53 actúa como guardián del genoma que estimula la expresión de otras proteínas que detienen el ciclo celular y regulan la apoptosis; dependiendo del daño celular la célula puede repararlo o morir (Offer *et. al.*, 2002). La apoptosis puede darse por dos vías: una extrínseca y otra intrínseca (Kabore *et. al.*, 2004).

La vía extrínseca esta mediada por receptores de muerte que unen ligandos específicos, que pueden ser TNF (Tumor necrosis factor), TRAIL (TNF-related, apoptosis-inducing ligand) y FasL (Fas ligand) (Blankenberg, 2008). La asociación de los ligandos con los receptores de muerte en el citoplasma reclutan a moléculas como FADD (Fas-associated death domain) o TRADD (tumor-associated death domain), que actúan como proteínas adaptadoras intracelulares, activando a los iniciadores de caspasas 8 y 10 que a su vez activará a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 (Kabore *et. al.*, 2004; Ashkenazi, 2008).

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

3. Ejecución: cada caspasa que interviene en el proceso de apoptosis está asociada con un inhibidor específico, permitiendo que el sistema sea estrictamente regulado por varios mecanismos de retroalimentación positivos y negativos (Blankenberg, 2008). La enzima final activada a lo largo de esta cascada de reacciones es la caspasa 3 (Kabore *et. al.*, 2004).

Después de la activación de caspasa 3, la cadena de reacciones proteolíticas ya no se puede detener; y, los acontecimientos morfológicos de la apoptosis ocurren rápidamente, dando lugar a una serie de eventos



proteolíticos sobre las estructuras y proteínas que mantienen la integridad y funcionalidad de las células (Blankenberg, 2008).

4. La ablución: La etapa final de la apoptosis se la denomina ablución o aclaramiento, este proceso se da a través de la fagocitosis (Jordan y Harrison, 2003). Los cuerpos apoptóticos son reconocidos por los fagocitos profesionales (macrófagos) y por los fagocitos semi-profesionales (monocitos) para ser englobados y digeridos (Taylor *et. al.*, 2008).

La interacción de los fagocitos con los cuerpos apoptóticos se debe a una serie de receptores atrayentes que se expresan y exponen en la superficie de la membrana de las células apoptóticas (Jordan y Harrison, 2003).

La resistencia a la apoptosis se considera una característica de las células cancerosas; estos defectos de la apoptosis no sólo producen tumorigénesis, sino también la resistencia a los tratamientos de cáncer.

### **1.2.2. Necrosis:**

En contraste con la muerte celular por apoptosis, la necrosis es una muerte violenta y accidental, es un proceso no regulado de destrucción traumática de las células que se sigue por la liberación de componentes intracelulares (Okada y Mak, 2004).

La necrosis suele ser consecuencia de una condición fisiopatológica como: infección, inflamación o isquemia, escasas o ausencia de los mecanismos de adaptación y resistencia o por agentes nocivos (Okada y Mak, 2004; Taylor *et. al.*, 2008).

La necrosis se caracteriza principalmente por ser un proceso de muerte irreversible y por la catástrofe bioenergética que

ocasiona, traduciéndose en la desaparición de la célula en una forma desordenada; además este tipo de muerte está caracterizada por el incremento del volumen celular, degradación de organelas y de material genético, originando así la fragmentación de la membrana citoplasmática (Zong y Thompson, 2009).

Los componentes genéticos de la necrosis involucran básicamente a dos grupos de genes, unos que induzcan a un proceso bioenergético de muerte irreversible; y, otro grupo de genes que son liberados selectivamente al medio extracelular para desencadenar la respuesta en el huésped (respuesta autoinmune: inflamación) (Zong y Thompson, 2009), provocando un fallo extenso sobre las vías fisiológicas normales que son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular como por ejemplo en la regulación del transporte de electrones, la producción de energía, el balance del pH entre otros (Okada y Mak, 2004).

### **1.2.3. Senescencia:**

Se conoce como senescencia a las células que han perdido su capacidad de replicación (Jordan y Harrison, 2003), la célula desacelera su crecimiento y detienen su ciclo celular en forma permanente a pesar de que cuenten con óptimas condiciones para su crecimiento y proliferación (Okada y Mak, 2004).

Este estado de senescencia se caracteriza por el acortamiento de los telómeros (a lo largo de las replications celulares, envejecimiento), en la célula se observa cambios morfológicos típicos, como una forma aplanada y un citoplasma con mayor granularidad (Okada y Mak, 2004). A nivel bioquímico se acompaña de cambios en el metabolismo; y, a nivel genético se ha observado modificaciones de la estructura de la cromatina y de los patrones de expresión génica.

Por otro lado, la senescencia también puede ser inducida por stress celular o por diversos daños en el DNA (activación de oncogenes), obligando a la célula para que detenga su ciclo celular (Kroemer *et. al.*, 2005).

Cuando existe daño en el DNA, se inicia en la célula un programa de envejecimiento celular que induce la activación de diferentes inhibidores del ciclo celular que requieren el funcionamiento de p53, del gen *CDKN1A*, *CDKN2A* y de la proteína del retinoblastoma. La activación de todos estos supresores de tumores implica que una de las principales funciones de la senescencia sea la de suprimir la tumorigénesis (Okada y Mak, 2004; Jordan y Harrison, 2003).

#### **1.2.4. Autofagia:**

La muerte celular autofágica es una forma de muerte no apoptótica y no necrótica (Okada y Mak, 2004), también es definida como un tipo de muerte celular que ocurre casi sin condensación de la cromatina, acompañada de vacuolización autofágica masiva del citoplasma (Kroemer *et. al.*, 2005).

Las características morfológicas de la autofagia incluyen vacuolización, la degradación de contenido citoplasmático, y ligera condensación de la cromatina (Fink y Cookson, 2005).

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

La función principal de la autofagia es mantener la supervivencia durante el ayuno de nutrientes catabolizando componentes intracelulares y la eliminación de orgánulos dañados (Okada y Mak, 2004).

### **1.2.5. Catástrofe Mitótica:**

Catástrofe mitótica es un término usado para describir el fracaso de la mitosis; causada principalmente por daños en el DNA (Huang *et. al.*, 2005); actualmente la definición de catástrofe mitótica es utilizada para explicar el tipo de muerte en células de mamíferos ocasionadas por una aberración en el proceso de mitosis; la mitosis aberrante es comúnmente asociada con la formación de células multinucleadas gigantes que contienen cromosomas condensados, y son morfológicamente distintas a las células que han cursado por apoptosis, necrosis o autofagia (Okada y Mak, 2004).

La catástrofe mitótica se da cuando una célula es forzada prematuramente a entrar en mitosis debido a una sobreexpresión de Cdc2 ó por un mecanismo de respuesta al estrés celular. Se produce por fallas en el chequeo del ciclo celular (fallan en detener la mitosis antes o durante el proceso, permitiendo una segregación aberrante de los cromosomas, produciendo la activación de una apoptosis defectuosa y por lo tanto la muerte celular, dicho en otras palabras mitosis catastrófica es la forma de muerte celular que resulta de una mitosis anormal (Kroemer *et. al.*, 2005; Okada y Mak, 2004).

Aún no se tiene claro los mecanismo moleculares que regulan la catástrofe mitótica, pero existe una teoría acerca de la molécula citoprotectora “survivina”, estudios recientes han demostrado que esta molécula está encargada del control en el huso e impide la formación de acúmulos celulares, por lo tanto si existiera una mutación de esta proteína la células se someterían a una mitosis aberrante (Okada y Mak, 2004).

### **1.2.6. Oncosis:**

La oncosis se define como un camino preletal que conduce a la muerte celular, se caracteriza principalmente por la hinchazón celular y el aumento de volumen de los orgánulos celulares, éste fenómeno se da debido a un aumento de la permeabilidad de la membrana (Fink y Cookson, 2005), a menudo se ha asociado el aspecto morfológico de la oncosis con el de la necrosis (Kromer *et. al.*, 2005). Este tipo de muerte celular puede ser resultado de agentes tóxicos que interfieren con la producción de ATP o pueden causar el consumo incontrolado de la energía celular. Otra causa importante para que se dé la oncosis es el aumento de la concentración de calcio intracelular, este aumento activa a la familia de las cistein-aspartato-proteasas, que median la ruptura de la membrana plasmática través de la proteólisis del citoesqueleto y de proteínas de la membrana plasmática, causando aumento de su permeabilidad (Fink y Cookson, 2005; Kroemer *et. al.*, 2005). Otras investigaciones sugieren que la oncosis también puede darse por la infección por patógenos (Rotavirus, *Pseudomona aeruginosa*) (Fink y Cookson, 2005).

La célula sufre de un agotamiento de las reservas de energía, originando fallas en las bombas de transporte iónico de la membrana plasmática; estos acontecimientos se producen como respuesta a lesiones graves del DNA (Fink y Cookson, 2005).

### **1.3. BIOMARCADORES CELULARES**

Según el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH) un biomarcador o marcador biológico es un indicador de uno o varios procesos biológicos normales, patológicos o de respuestas farmacológicas a un agente terapéutico, haciendo posible que estos procesos puedan ser medidos y analizados. El uso de biomarcadores en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer es cada vez más importante, ya que conociendo las bases moleculares del cáncer, va a ser posible

que estos nuevos fármacos actúen en lugares específicos de las alteraciones moleculares de las células tumorales (Cummings *et. al.*, 2008).

Los biomarcadores se utilizan básicamente para medir la exposición a un agente tóxico, para detectar la gravedad de las reacciones tóxicas, y para predecir el posible resultado (Abu-Qare y Abou-Donia, 2001). Existe una serie de biomarcadores dependiendo de los procesos que se quiera analizar, en esta ocasión nos centraremos únicamente en los biomarcadores que nos sean útiles para la identificación de los distintos tipos de muerte celular y que serán utilizados en el presente proyecto.

### **1.3.1. Viabilidad Celular**

La determinación de la viabilidad celular es de vital importancia en el cultivo de tejidos y en los estudios de citotoxicidad (Jones y Senft, 1985). La prueba más común para la determinación de la viabilidad celular es mediante la tinción con Azul Tripán, pero esta prueba puede ser un tanto inexacta debido a que si se deja pasar más tiempo del adecuado, la coloración azul va a aumentar producto del aumento de la muerte celular ya que el azul tripan posee propiedades citotóxicas, pudiendo arrojar falsos positivos; otro colorante utilizado es la eosina, es menos crítica en cuestión del tiempo pero la identificación de células muertas se la hace de una forma más subjetiva; por los inconvenientes que estas técnicas colorimétricas presentan en la actualidad se está utilizando reactivos fluorescentes, que son más fiables por que permiten contrastar con la ayuda de un microscopio de fluorescencia las células vivas de la muertas (Jones y Senft, 1985; Bivén *et. al.*, 2003).

#### **1.3.1.1. Viabilidad por Captación de FDA-BrEt.**

Para esta técnica se utilizan los fluorocromos: Fluorescein Diacetato (FDA) y Bromuro de Etidio (BrEt). El FDA es una prueba positiva para las células vivas, atraviesa fácilmente la membrana citoplasmática y es hidrolizada por esterasas

intracelulares para producir fluoresceína, esta se acumula dentro de la célula viva y emite una fluorescencia verde al ser irradiada (Jones y Senft, 1985); el BrEt en cambio se introduce fácilmente en las células que tienen la membrana citoplasmática fragmentada, interactúa directamente con el DNA emitiendo una fluorescencia roja (Laufer *et. al.*, 2008). Estas fluorescencias pueden ser detectadas por microscopia de fluorescencia o a través de citometría de flujo (Jones y Senft, 1985).

### **1.3.2. Anexina V**

Conocida también como VAC $\alpha$  o Anticoagulante Vascular  $\alpha$ , presenta propiedades de unión con la fosfatidilserina (FS), esta unión es calcio-dependiente y es totalmente reversible en el agotamiento de calcio (Andree *et. al.*, 1990). La muerte celular por apoptosis está acompañada de un cambio en la estructura de la membrana citoplasmática, provocando la exposición de la FS, pero la membrana como tal sigue íntegra (Engeland *et. al.*, 1998). La FS expuesta en la superficie puede ser detectada mediante el uso de la Anexina V.

El análisis de FS se realiza utilizando Anexina V-Fluos (fluorocromo) y yoduro de propidio (IP) para la diferenciación con las células necróticas (Roche). La FS en presencia de Ca<sup>2+</sup> atrapa a la Anexina V-Fluos haciendo que la célula emita una fluorescencia verde, que serán las células que hayan cursado por apoptosis; mientras que las células que emiten una fluorescencia roja, debido al IP serán consideradas como necróticas ya que el IP al igual que el BrEt puede atravesar la membrana citoplasmática fragmentada interactuando directamente con el DNA, además la fluorescencia roja indica que estas células no externalizaron su FS, por lo tanto no murieron por apoptosis. La fluorescencia emitida por las células puede ser medida por citometría de flujo o mediante el uso de la microscopia de fluorescencia (Engeland *et. al.*, 1998; Jones y Senft, 1985; Andree *et. al.*, 1990).

### **1.3.3. Determinación de Caspasas:**

Como se mencionó anteriormente la caspasa 3 es la caspasa ejecutora de la apoptosis. Pertenece al grupo de las cisteín-aspartato-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteini-aspartato-proteasas) (Cross *et. al.*, 2000).

La cuantificación de caspasas se puede hacer mediante el uso de sustratos colorimétricos sintéticos como el Ac-DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) que por lo general está unido a un cromóforo el pNA, al momento que las caspasa 3 o 7 se active éste sustrato es clivado liberando el pNA produciendo una coloración amarillenta que es medida y monitoreada mediante un espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda. (PROMEGA; Clontech 2009).



## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. General:**

- Determinar el tipo de muerte inducido por Argentatina B, sobre células de cáncer de Colon (RKO) y células de glioblastoma (U-251).

### **2.2. Específicos:**

- Determinar las concentraciones, a las cuales Argentatina B induce la muerte celular en células RKO y U-251, mediante la técnica por captación de colorante (FDA-BrEt).
- Determinar la actividad apoptótica de la Argentatina B mediante la cuantificación de Caspasa 3 utilizando el kit "CaspACE™ Assay System Colorimetric".
- Determinar el posible tipo de muerte inducido por Argentatina B sobre las líneas celulares tumorales humanas RKO y U-251, mediante el uso de los biomarcadores: Anexina V y Yoduro de Propidio.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. CULTIVO CELULAR**

Los modelos biológicos que se usaron presentan p53 normal (sin mutación), la línea celular de cáncer de colon (RKO), fue donada por la Dra. Patricia Ostrosky y la línea celular de glioblastoma (U-251), fue donada por la Universidad de Pavia.

##### **3.1.1 Medios de Cultivo**

Para la línea celular RKO se utilizó el medio de cultivo Dulbeccoll's (GIBCO); y, para la línea celular U-251 el medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO), estos dos medios de cultivo fueron suplementados con 10% suero fetal bovino, antibiótico-antimicótico al 1% (Penicilina G sodio 100 UI/mL, estreptomycin sulfato 100 ug/mL y anfotericina B 0,25 µg/mL), piruvato de sodio 1mM al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y L-Glutamina 2mM al 1%.

Las líneas celulares fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2. VIABILIDAD CELULAR**

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de Estimación de Viabilidad por Captación de Colorante (FDA-BrEt). Para realizar el ensayo se sembró en un multiplato de 24 pocillos 5x10<sup>4</sup> células/pocillo y se incubó durante 24h, transcurrido este tiempo, se colocó nuevo medio con las concentraciones a probar de Arg. B, (5, 15, 25 y 35 µM), además se utilizó como control negativo Etanol al 0,25% (EtOH 0,25%), y como control positivo Doxorubicina (DXO) 1 µM). Las células se incubaron por 24 h más.

Pasado este tiempo se colectó el medio en tubos de 15ml, se lavó las células con buffer fosfato salino (PBS) frío y luego se las despegó usando PBS-EDTA 0,02% y se realizó un último lavado con PBS frío, posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 1750 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó

nuevamente las células con PBS frío, el pellet de células fue mantenido en frío.

La solución de trabajo FDA-BrEt se la preparó tomando 3,75  $\mu\text{L}$  de Diacetato de Fluoroscéina (SIGMA) 5 mg/mL, 25  $\mu\text{L}$  de Br-Et (SIGMA) 0,2 mg/mL y 600  $\mu\text{L}$  de PBS. Tanto el pellet celular como la solución de trabajo se las mantuvo en hielo. De la solución de trabajo tomamos 20  $\mu\text{L}$ , resuspendimos con el pellet celular; de ésta mezcla se tomó 20  $\mu\text{L}$ , se colocó en un portaobjetos y cubrimos con un cubreobjetos.

Cada placa fue observada en el microscopio de fluorescencia (ZEISS) con un filtro de 450-490 nm de excitación y 515 nm de emisión; se contó alrededor de 200 células por cada placa utilizando el objetivo de 40 X.

### **3.3. ACTIVIDAD APOPTÓTICA: CUANTIFICACIÓN DE CASPASA 3.**

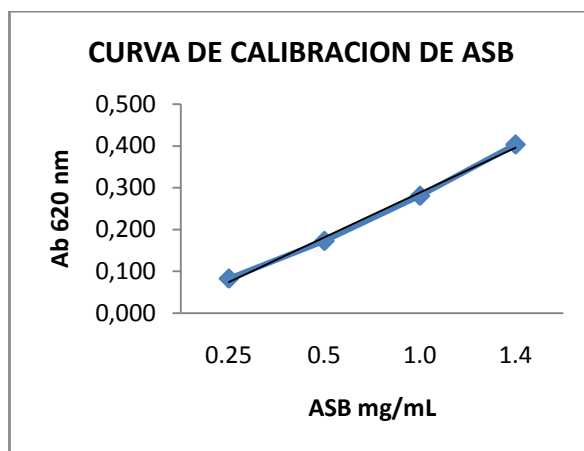
Para la cuantificación de caspasa 3 se utilizó el kit "CaspACE™ Assay System Colorimetric" (Promega) que contiene dos reactivos sintéticos, el Ac-DEVD-pNA que es el sustrato para caspasa y el Z-VAD-FMK, que actúa como inhibidor específico de caspasa 3.

Para desarrollar el ensayo se sembró  $2,4 \times 10^5$  células/pocillo en un multiplato de 6 pocillos que se incubaron por 24 h. Transcurrido este tiempo se colocó nuevo medio de cultivo que contenía las diferentes concentraciones de Arg. B (se trabajó con las mismas concentraciones utilizadas para realizar viabilidad tomando en cuenta los resultados previos obtenidos) y los respectivos controles negativo y positivo, se incubó por 24 h más. El pellet celular se lo obtuvo siguiendo el mismo protocolo usado en viabilidad celular.

Al pellet celular se lo traspasó a microtubos de 1.5 mL y se lo resuspendió con buffer de lisis (proporcionado en el kit) a una concentración de  $10^8$  células/mL, se sometió a las células a períodos de 15 minutos de congelación-descongelación;

finalmente se centrifugo las células lisadas se las centrifugo a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y lo almacenamos a -70°C.

Para la concentración de proteína (50 µg de proteína), fue necesario realizar una curva de calibración (Gráf. 1) utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como proteína patrón empleando la técnica de Bradford.



Gráf. 1. Curva de calibración empleada en Bradford utilizando ASB como proteína patrón

En un multidish de 96 pocillos se colocó el extracto con el reactivo de Bradford en una proporción 1:30, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz, luego se midió la absorbancia con la ayuda de un espectrofotómetro (Tecan) a una longitud de onda de 620 nm. Con estos resultados se realizó una interpolación con la curva estándar de ASB mediante el software estadístico Graphpad, permitiéndonos así tomar el volumen correcto de extracto celular.

Para la cuantificación de caspasa 3, se siguió el protocolo establecido en el kit, obteniéndose un volumen final de 200 µL

por cada muestra. Se incubó durante 3h30 a 37°C, en oscuridad. Finalmente se midieron las absorbancias a 405 nm.

### **3.4. EXTERNALIZACION DE LA FOSFATIDILSERINA**

Para este ensayo se utilizó Anexina V (Roche), que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  posee una alta afinidad a la fosfatidilserina (FS) (Balasubramanian y Schroit, 2003).

Se sembró  $2,4 \times 10^5$  células/pocillo en un multiplato de 6 pocillos y se incubó por 24 h. Luego de este tiempo se colocó nuevo medio de cultivo con  $35 \mu\text{M}$  de Arg. B, los respectivos controles negativo y positivo, se incubó por 12 h, 18 h y 24 h más.

El extracto celular se lo obtuvo siguiendo el mismo protocolo usado en viabilidad celular, con la diferencia que en lugar de despegar las células con PBS-EDTA, se despegaron mediante raspado.

Se preparó la solución de trabajo que contenía  $20 \mu\text{L}$  de Anexina V (Roche),  $20 \mu\text{L}$  de Ioduro de propidio  $50 \mu\text{g/mL}$  (sigma) y  $960 \mu\text{L}$  de Buffer de HEPES (HEPES  $10\text{mM}$ , NaCl  $140 \text{mM}$  y  $\text{CaCl}_2$   $5\text{mM}$ ).

A cada pellet celular se resuspendió con  $50 \mu\text{L}$  de la solución de trabajo, y lo incubamos a temperatura ambiente por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se tomó  $20 \mu\text{L}$  de esta mezcla, colocamos sobre un portaobjetos y cubrimos con un cubreobjetos. Se contó alrededor de 200 células utilizando el microscopio de fluorescencia en las mismas condiciones que para viabilidad. A las células contadas se las clasificó como apoptóticas a aquellas que emitieron una fluorescencia verde, las células fluorescentes rojas fueron consideradas como necróticas, a las células que presentaron ambas fluorescencias se las clasifico como apoptóticas tardías; además se contaron todas las células con luz normal que se veían incoloras, a las células vivas se las determinó mediante

la resta de las células vistas con luz normal menos las células vistas con fluorescencia.

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico fue mediante ANOVA, utilizando post-test las pruebas de rango múltiple de Dunnet y Tukey, realizado con el software estadístico Graphpad.

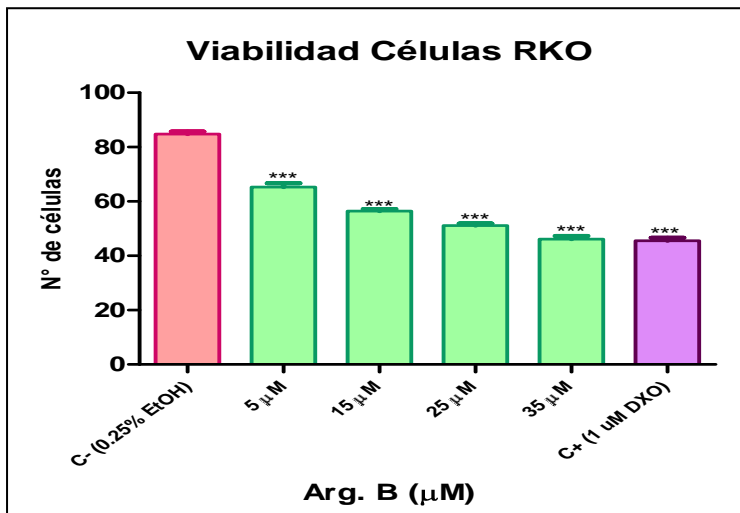
Todos los experimentos fueron realizados por duplicado en dos repeticiones independientes.

## 4. RESULTADOS:

### 4.1. VIABILIDAD CELULAR:

#### 4.1.1 Línea Celular RKO

En el gráfico 2 se observa el efecto de la Arg. B sobre la viabilidad de la línea celular tumoral RKO después de 24h de exposición. Mediante la prueba bilateral de Dunnet se determinó que en todas las concentraciones utilizadas de Arg. B (5, 15, 25 y 35  $\mu\text{M}$ ) existe diferencia significativa comparadas con el control negativo, observándose el mismo efecto comparando el control negativo con el control positivo. Se calculo además el valor de concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) de la molécula de Arg. B mediante el test de mínimos cuadrados, siendo de 24,68  $\mu\text{M}$ .

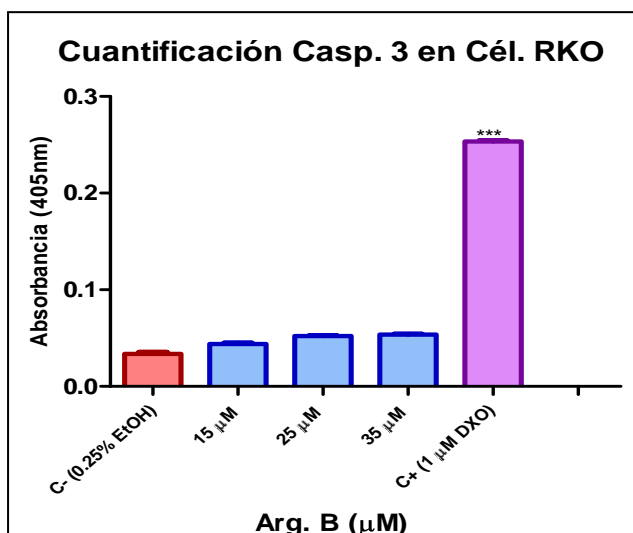


Gráf. 2. Porcentaje de células vivas, expuestas por 24h a cuatro concentraciones diferentes de Arg. B.  $P < 0,001$ .

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA: CUANTIFICACIÓN DE CASPASA 3.

### 4.2.1 Línea Celular RKO

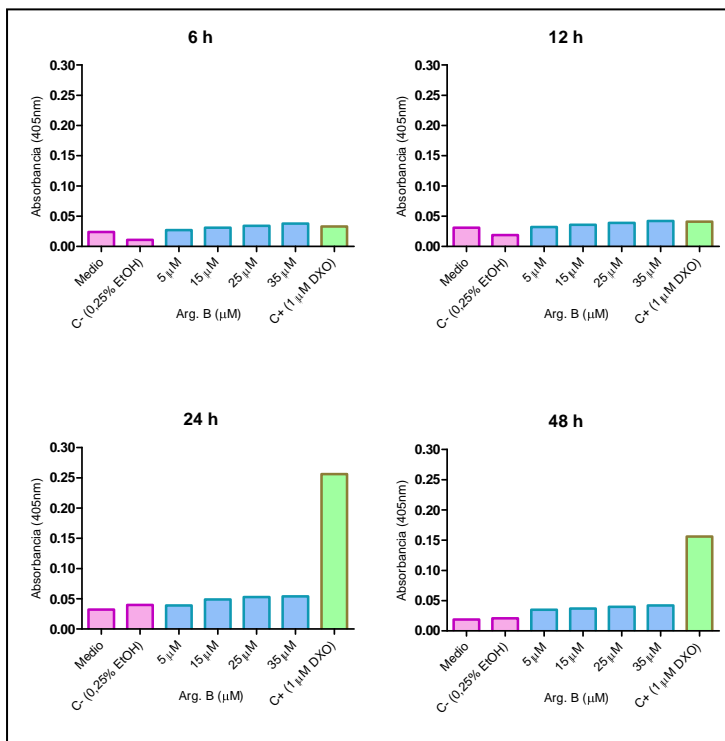
En el gráfica 3, podemos observar la actividad de Caspasa 3, luego de 24 h de exposición a tres concentraciones de Arg. B (15, 25 y 35  $\mu\text{M}$ ). Mediante la prueba bilateral de Dunnet, se observó que únicamente con el control positivo existen diferencias estadística y biológicamente significativas.



Gráf. 3. Actividad de Caspasa 3 expresada en absorbancias de la línea celular RKO, después de 24H de exposición a tres diferentes concentraciones de Arg. B.  $P < 0,05$ .

En el gráfico 4, está representada la actividad de Caspasa 3, luego de 6, 12, 24 y 48 h de exposición a 4 concentraciones diferentes de Arg. B (5, 15, 25, 35  $\mu\text{M}$ ), en la cual no se observa un aumento de la actividad de caspasa 3 en todos los tiempos probados con las 4 concentraciones de Arg. B.

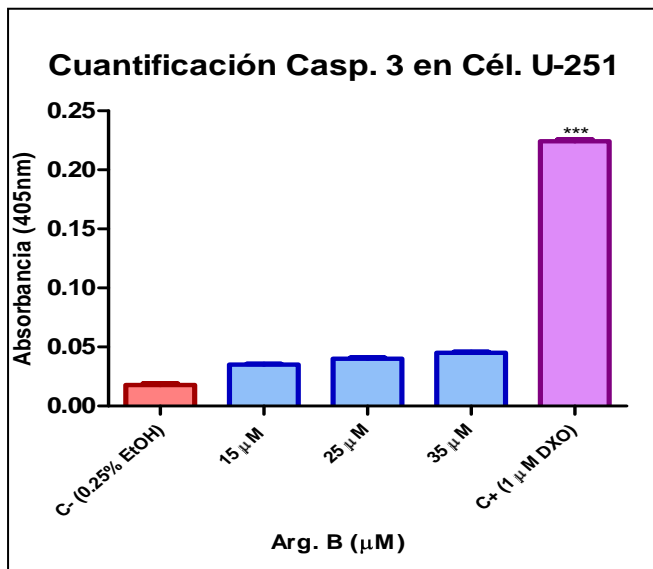




Gráf. 4. Actividad de caspasa 3 en la línea celular RKO a, durante varios tiempos de exposición a cuatro diferentes concentraciones de Arg. B

#### 4.2.2. Línea Celular U-251

En el gráfico 5, se observa la actividad de Caspasa 3, luego de 24 h de exposición a tres concentraciones de Arg. B (15, 25 y 35 μM). De igual forma que en la línea celular RKO, mediante la prueba bilateral de Dunnet, únicamente el control positivo es el que presenta una diferencia significativa con respecto al control negativo.



Gráf. 5. Actividad de Caspasa 3 expresada en absorbancias de la línea celular U-251, después de 24H de exposición a tres diferentes concentraciones de Arg. B. P <0,05.

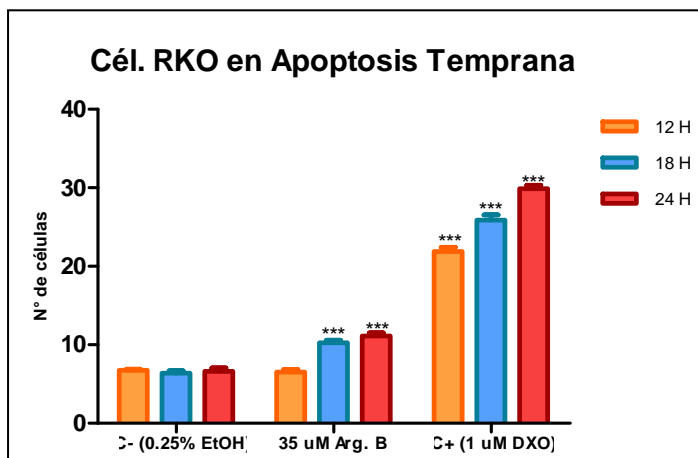
### 4.3. EXTERNALIZACION DE LA FOSFATIDILSERINA

#### 4.3.1 Línea Celular RKO

La técnica empleada nos permite la diferenciación de las células vivas, apoptóticas y necróticas.

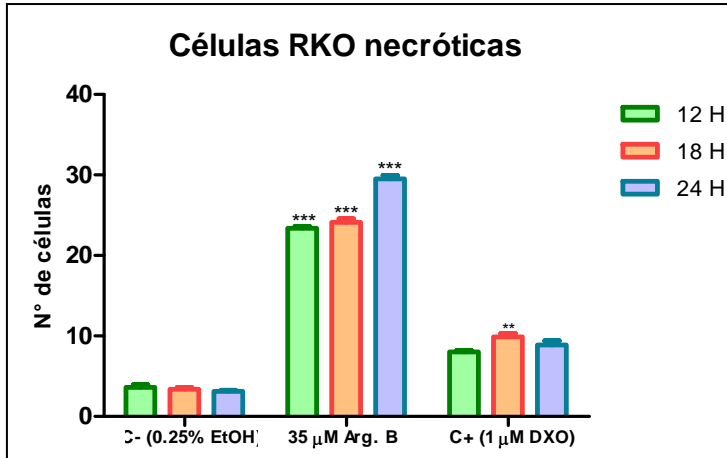
En el gráfico 6, se observa el porcentaje de células RKO en estado de apoptosis luego de la exposición a Arg. B en una sola concentración (35 μM) por 12, 18 y 24h. Se analizó los datos mediante la prueba bilateral de Dunnet comparando el control negativo, con la concentración de Arg. B y con el control positivo, cada comparación se hizo por tiempos

independientes, dando como resultado una diferencia significativa pero no una relevancia biológica con la concentración de 35  $\mu$ M Arg. B con respecto al control negativo.



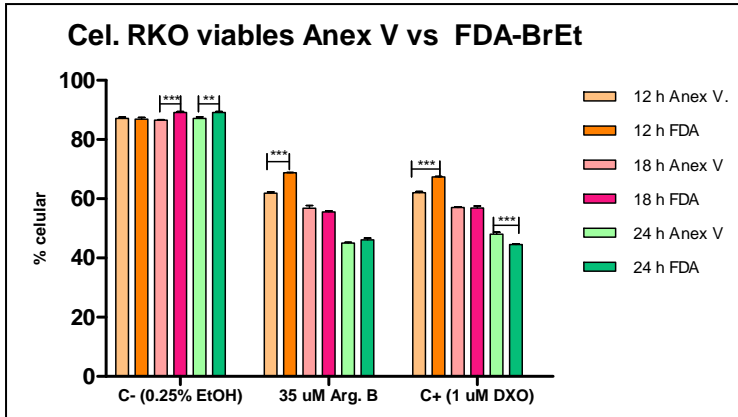
Gráf. 6. Porcentaje de células en apoptosis temprana luego de haber sido expuestas por 12, 18 y 24H a Arg. B. Dunnet P <0,001.

En el Gráfico 7, se puede observar a las células necróticas luego de 12, 18 y 24 h de exposición a 35  $\mu$ M de Arg B. Mediante la prueba bilateral de Dunnet se observó una diferencia significativa en la concentración de 35uM con respecto al control negativo,



Gráf. 7. Porcentaje de células necróticas luego de la exposición a Arg. B por 12, 18 y 24H. Dunnet P <0,001.

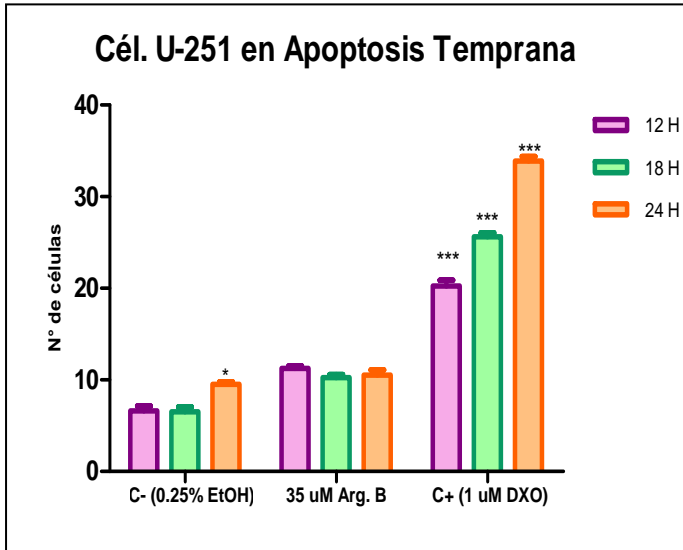
Conjuntamente con el ensayo de externalización de FS, realizamos el ensayo de viabilidad por captación de colorante (FDA-BrEt), con el fin de corroborar el número de células vivas obtenidas en ambos ensayos, la comparación de las células viables está representada en el gráfico 8, en donde se observa que en los dos ensayos se obtuvo un número similar de células vivas tanto en los controles y en la concentración de Arg. B como en todos los tiempos probados.



Gráf 8. Comparación del porcentaje de células vivas obtenidas con los ensayos Anexina V y FDA-BrEt, luego de la exposición a Arg. B por 12, 18 y 24 h. Tukey \*\* P <0,01, \*\*\* p<0,001.

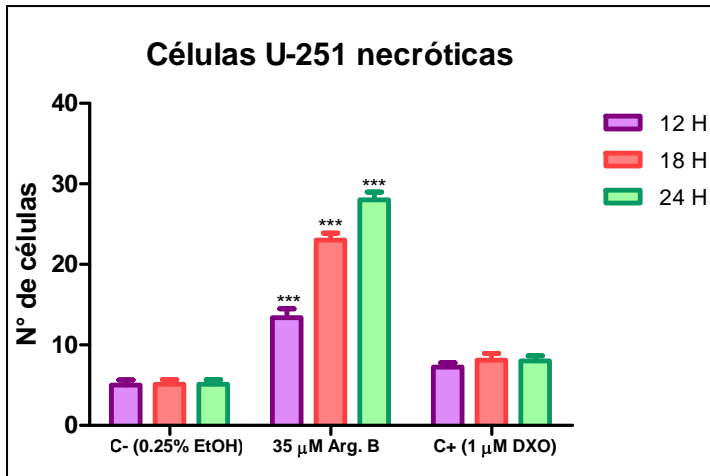
#### 4.3.2. Línea Celular U-251

El gráfico 9, representa el porcentaje de células U-251 en estado de apoptosis luego de la exposición a Arg. B en una sola concentración (35 µM) por 12, 18 y 24h. Se analizó los datos mediante la prueba bilateral de Dunnett, no se observó una diferencia significativa con la concentración de 35µM Arg. B.



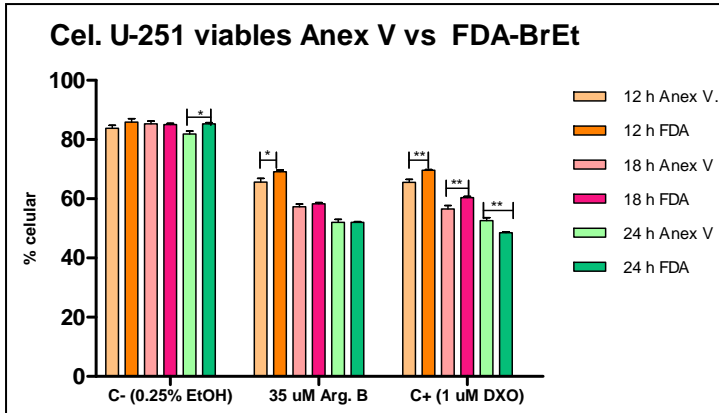
Gráf. 9. Porcentaje de células apoptóticas luego de haber sido expuestas por 12, 18 y 24 h a Arg. B. Dunnet P <0,001.

En el Gráfico 10, se puede observar a las células necróticas luego de 12, 18 y 24 h de exposición a 35  $\mu$ M de Arg B. Mediante la prueba bilateral de Dunnet se observó una diferencia significativa en la concentración de 35uM con respecto al control negativo.



Gráf. 10. Porcentaje de células necróticas luego de la exposición a Arg. B por 12, 18 y 24 h. Dunnet P <0,001

De la misma manera que en la línea celular RKO, se realizó conjuntamente con el ensayo de externalización de FS, el ensayo de viabilidad por captación de colorante (FDA-BrEt), se pudo comprobar que el porcentaje de células vivas obtenidas en estos dos ensayos son similares, esta comparación está representada en el gráfico 11.



Gráf 11. Comparación del porcentaje de células vivas obtenidas con los ensayos Anexina V y FDA-BrEt, luego de la exposición a Arg. B por 12, 18 y 24 h. Tukey \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .



## 5. DISCUSIÓN:

En los seres humanos se producen alrededor de cien mil células cada segundo por mitosis y un número similar de células mueren por apoptosis, este es un proceso fisiológico esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular y sirve para eliminar las células patógenas (Amelio *et. al.*, 2007; Aragues *et. al.*, 2008).

El cáncer se origina por una o varias mutaciones sobre las células normales, que logran escapar de los distintos mecanismos de control del ciclo celular (Lowe *et. al.*, 2004), estas mutaciones dan lugar a cambios en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Aragues *et. al.*, 2008).

Muchos son los tratamientos que se usan para la erradicación del cáncer, entre ellos están: los procedimientos quirúrgicos, la quimioterapia y la radioterapia (Garcia, 2000), pero en la actualidad se ha vuelto cada vez más necesario encontrar una fármaco que pueda eliminar el cáncer de forma eficaz con menos efectos secundarios sobre los pacientes, es por ello que muchas investigaciones sugieren la utilización de metabolitos secundarios aislados de plantas, ya que éstas proporcionan un amplio espectro farmacológico para tratamiento del cáncer (Laszczyk, 2009). En el reino vegetal han sido identificadas cerca de 250 000 especies de plantas, de las cuales se consideran como plantas medicinales un 10%; en 1982, Hartwell informó que aproximadamente 3000 especies de plantas usadas en etnomedicina tienen propiedades anticancerígenas.

En el presente trabajo, se estudió el tipo de muerte inducido por Argentatina B sobre células de cáncer de colon (RKO) y de glioblastoma (U-251), esta molécula fue aislada a partir de la resina de *Parthenium argentatum* (Parra, 2006), esta especie pertenece a la familia Asteraceae, de la cual se ha reportado la presencia de importantes metabolitos secundarios con propiedades medicinales (Villareal, 1996).

Previo a la realización de los ensayos que nos permitieron la determinación del tipo de muerte que esta molécula induce, se realizó el ensayo de viabilidad por captación de FDA-BrEt, para así evaluar el efecto en la viabilidad inducido por esta molécula, además mediante este ensayo se determinó las concentraciones a probar de Arg. B para los siguientes ensayos.

Basándonos en lo informado por Parra en el 2006, en donde demostró que para la línea celular U-251 y HCT-15 (línea celular de cáncer de colon) la  $IC_{50}$  de Arg. B luego de 24 h de incubación oscila entre 24.14 y 36.40  $\mu M$ , se tomó concentraciones que estén por debajo de la  $IC_{50}$ , por lo tanto se trabajó con concentraciones entre 5 y 35  $\mu M$  y se evaluó su actividad sobre la línea celular RKO. Los resultados obtenidos en este ensayo van de la mano con los obtenidos por Parra (2006), ya que la Arg. B presentó una actividad citotóxica dependiente de la dosis después de 24 h de exposición, obteniéndose una  $IC_{50}$  de 24.60  $\mu M$  en la línea celular RKO (Gráf. 2).

La actividad citotóxica de la Arg. B, fue muy similar a la de otros triterpenos ya reportados entre ellos están: los ácidos betulínicos, ursólico y oleanólico (Falkiewicz, 2006; Parra, 2005). En cuanto al ácido ursólico, se sabe que inhibe la expresión de la ciclooxygenasa II, es citostático e induce la muerte por apoptosis mediante activación de caspasa 3, del ácido oleanólico se sabe que posee actividad citotóxica sobre varias líneas celulares cancerosas humanas, además de tener actividad antiinflamatoria, antioxidativa, antiviral, antibacterial, entre otras (Falkiewicz, 2006). Estos tres triterpenos incrementan los niveles de calcio y citocromo c intracelular y presentan actividad citostática y apoptótica (Parra, 2005). Otro triterpeno ampliamente estudiado es el 2-ciano-3,12 dioxodeano-1.9 dien-28 ácido oico (CDDO), se ha revelado que promueve la activación del ROS y a su vez está asociado con el estrés oxidativo promoviendo apoptosis celular (Hail, 2004).

Además se ha demostrado que las argentatinas A y B así como sus derivados inhiben de manera dosis-dependiente, el edema inducido por el promotor de tumores 13-acetato-12-O-decanol forbol (TPA) en el modelo de inflamación de la oreja de rata (Morales, 2007); Arg. B es también un inhibidor no competitivo de la unión a estradiol de los receptores hormonales (en el cáncer de glándulas mamarias), aparte de ello esta molécula no es genotóxica en linfocitos humanos determinado mediante el ensayo de micronúcleos (Parra *et. al.*, 2005).

Por lo tanto la Arg. B no provoca daño al DNA como resultados de eventos clastogénicos o aneugénicos (Palacios, 2009), pero se sabe que mediante el ensayo cometa, que es una prueba más eficaz y sensible para la evaluación de la genotoxicidad (Tice *et al.*, 2000) y usando como modelo biológico a linfocitos humanos, Arg. B si puede inducir daño indirecto el DNA, posiblemente causado por estrés oxidativo (Ramirez 2008).

Tanto para viabilidad celular como para los ensayos de determinación de la actividad proteolítica de caspasa 3 y el ensayo de externalización de FS, se uso como control negativo Etanol al 0.25% (dosis subtóxica) y como control positivo DXO 1 uM, ya que en estudios realizados por Guamán (2009), demostró que a esta concentración de DXO, la viabilidad celular disminuye aproximadamente a la mitad (42,42%) luego de 24 h de exposición, y además con esta concentración existió mayor inducción a apoptosis (en la línea celular RKO), que es uno de los blancos terapéuticos para el tratamiento y erradicación del cáncer.

Mediante la determinación de la actividad proteolítica de caspasa 3 (Gráf. 3 y 4) (Schinoni y Parana, 2006), se observó que en ninguna de las dos líneas celulares tratadas (RKO y U-251) existió la inducción de la apoptosis, en los gráficos se puede observar claramente que a medida que se incrementa la dosis no se observa un incremento notable de la actividad de caspasa 3. Al contrario, en el control positivo, se observa

una marcada actividad de esta enzima proteolítica, en estudios anteriores ya se ha comprobado que la DXO es un buen inductor a muerte por apoptosis (Guamán, 2009).

La baja expresión de caspasa 3 en inicio se creyó que era por el tiempo de exposición a la molécula, por ello se establecieron distintos tiempos (6, 12, 24 y 48 h) para monitorear la expresión de esta proteasa, los resultados obtenidos fueron los mismos en todos los tiempos probados no se observó un aumento considerable de la expresión de caspasa 3 en las cuatro concentraciones usadas de Arg. B (5, 15, 25, 35  $\mu\text{M}$ ), en contraste con la DXO que a mayor tiempo se observó mayor actividad de caspasa 3, excepto a las 48 h (Gráf. 4), en donde su actividad fue disminuyendo. Los tiempos prolongados de exposición a DXO a concentraciones elevadas puede matar por completo a las células por apoptosis, sin embargo las concentraciones bajas a tiempos prolongados podrían mantener en un inicio a las células en un estado senescente seguido de apoptosis (Eom, *et al.* 2005). Es por ello que en nuestro estudio, a las 48 h de exposición a 1  $\mu\text{M}$  DXO, se encuentra disminuida la actividad de caspasa 3.

En el proceso apoptótico incluye cambios en la estructura de la membrana citoplasmática, provocando la externalización de la FS sin que la membrana citoplasmática pierda su integridad (Engeland *et al.*, 1998). La FS expuesta en la superficie puede ser detectada mediante el uso de Anexina V conjugada con un fluorocromo (FLUOS), en conjunto con IP para la diferenciación de las células necróticas (de acuerdo al inserto del reactivo) (Engeland *et al.*, 1998; Jones y Senft, 1985; Andree *et al.*, 1990). Para este ensayo se descartaron las concentraciones de 15 y 25  $\mu\text{M}$ , ya que mediante el ensayo de determinación de la actividad de caspasa 3 se observó que a estas concentraciones no había mayor actividad apoptótica; es por ellos que únicamente se trabajo con la concentración de 35  $\mu\text{M}$  en la cual se observó un nivel más elevado de caspasa 3 activa.

En los Gráficos 5 y 9, están representadas el porcentaje de células apoptóticas de la línea celular RKO y U-251 respectivamente. De la misma manera que en la determinación de la actividad proteolítica de caspasa 3, no se observó un gran porcentaje de células en estado de apoptosis en la concentración probada de Arg. B (35  $\mu$ M); en la línea celular RKO se observó un 24% de células en apoptosis y en la línea celular U-251 20% luego de 24 h de exposición a Arg. B, pero si se observó gran actividad apoptótica en el control positivo (DXO 1  $\mu$ M) 34,87% para la línea celular RKO y para la línea celular U-251 39,37% de células en apoptosis después de 24 h de exposición. Mediante el mismo ensayo se pudo obtener el porcentaje de células en estado de necrosis (Gráf. 6 y 10); en la concentración de 35  $\mu$ M de Arg. B se observó un elevado porcentaje de células necróticas, comparadas con el control negativo y con el control positivo, en donde no existió un número considerable de células necróticas.

Tanto la actividad medida de caspasa 3 como el porcentaje de células en apoptosis (externalización de FS) coinciden en la concentración de 35  $\mu$ M de Arg. B, donde no existió actividad apoptótica significativa; lo contrario ocurre con el control positivo, las células expuestas por 24 h a 1  $\mu$ M de DXO presentaron gran actividad apoptótica, por lo tanto, mediante los resultados obtenidos con estos dos biomarcadores es muy probable que la muerte que Arg. B induce no sea por apoptosis sino mas bien por necrosis.

Como se mencionó anteriormente las células pueden cursar por varias vías de muerte celular, entre ellas están: apoptosis (proceso de suicidio celular programado genéticamente), necrosis (muerte violenta y accidental de la célula, inducida por factores fisiopatológicos), senescencia (pérdida de la capacidad de división), autofagia (las células se comen a sí mismas, es dependiente de las GTPasas y quinasas de fosfatidinositol), catástrofe mitótica (célula prematura inducida a proliferación, causando fallas en los sistemas del chequeo del ciclo celular), oncosis (producida por un agotamiento de la

reserva energética de ATP y falla de las bombas iónicas de la membrana citoplasmática).

Los biomarcadores usados en este trabajo son útiles para determinar el tipo de muerte que induce Arg. B sobre las líneas celulares de cáncer en este caso RKO y U-251, todos los resultados obtenidos en los diferentes ensayos nos indican que nuestra molécula no es un buen inductor de apoptosis sobre las líneas celulares tumorales humanas en estudio, la muerte celular sobre estas líneas se da posiblemente por necrosis. Como ya se mencionó una de las principales características de las células del cáncer es que evaden la apoptosis (Hitoshi y Tak, 2004). Por lo tanto, una de las alternativas para la erradicación del cáncer es la búsqueda de antineoplásicos que puedan inducir apoptosis sobre las células cancerosas.

Existe una amplia gama de biomarcadores que pueden ser útiles para la determinación del tipo de muerte celular, para la determinación de apoptosis como ya mencionó la cuantificación de caspasa 3 y el uso de Anexina V, además de ellos se puede emplear la cuantificación de las diferentes proteínas anti y pro-apoptóticas como Bcl-2 o p53 respectivamente, o la clivación por caspasas de sustratos proteicos como PARP (Sambrook y Russell, 2001; Clontech, 2009; Yang, et al. 2001). En cuanto a la determinación de necrosis, se puede realizar mediante métodos de tinción celular o del DNA con BrEt o IP (Okada y Mak, 2004), que son los biomarcadores empleados en el presente trabajo, además se puede realizar la cuantificación de ROS (Fink y Cookson, 2005). Para la determinación de senescencia se pueden hacer a través de ensayos de inhibición de la proliferación celular (Okada y Mak, 2004); la muerte celular por autofagia, se puede determinar por medio de técnicas que nos permitan cuantificar o identificar la degradación de proteínas (Fink y Cookson, 2005); a la oncosis, se la puede identificar mediante métodos de tinción celular con BrEt o IP (Okada y Mak, 2004; Fink y Cookson, 2005); a la catástrofe mitótica la podemos identificar mediante el uso de marcadores mitóticos

(Okada y Mak, 2004). Es por ello que dada la complejidad de las vías de muerte por las que una célula puede cursar, para poder identificar con certeza el tipo de muerte celular que determinada molécula induce, es aconsejable el uso de varios biomarcadores que nos permitan la cuantificación de diferentes respuestas celulares.

Con la ayuda de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares; es posible la modificación de la estructura química de las moléculas, permitiéndonos obtener nuevas estructuras con un mecanismo de acción diferente (Parra, 2006); en el caso de Arg. B, tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, sería conveniente realizar investigaciones con los derivados de la misma, producto de la modificación de la estructura química, para evaluar su actividad sobre líneas celulares tumorales humanas, para así determinar el tipo de muerte que éstas induzcan, con el fin de encontrar una molécula que estimule la activación de la vía apoptótica y pueda ser usada como un antineoplásico potencial con mayor eficacia y con propiedades no tóxicas, antimutagénicas y anticarcinogénicas.

## **6. CONCLUSIONES:**

- La molécula de Arg. B presenta actividad citotóxica dependiente de la dosis sobre las líneas celulares U-251 y RKO.
- De acuerdo a los resultados obtenidos por los dos biomarcadores empleados en el presente trabajo, es posible que la muerte celular que Arg. B induce sobre las dos líneas celulares estudiadas sea por necrosis, ya que no se observó un aumento relevante biológicamente de caspasa 3 y del porcentaje de células en estado apoptótico.
- En las dos líneas celulares utilizadas en este trabajo se observó un comportamiento similar al ser tratadas con Argentatina B, sin embargo en la línea celular RKO se observó mayor sensibilidad a la molécula, tanto en los ensayos de viabilidad como en los ensayos de cuantificación de caspasa 3 y de externalización de FS.



## 7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Abu-Qare A., Abou-Donia M. 2001. Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *Toxicol Environ Health B*, **4(3)**, 313-32.
2. Amelio M., Tino E., Cecconi F. 2007. The Apoptosome: Emerging Insights and New Potential Targets for Drug Design. *Pharmaceutical Research*, **25**, 740-751.
3. Andree H., Reutelingsperger C., Hauptmann R., Hemker H., Hermens W., Willems G. 1990. Binding of Vascular Anticoagulant  $\alpha$  (VAC  $\alpha$ ) to Planar Phospholipid Bilayers. *The Journal of Biological Chemistry*, **9**, 4920-4928.
4. Andree H., Reutelingsperger C., Hauptmann R., Hemker H., Hermens W., Willems G. 1990. Binding of Vascular Anticoagulant  $\alpha$  (VAC  $\alpha$ ) to Planar Phospholipid Bilayers. *The Journal of Biological Chemistry*, **9**, 4920-4928.
5. Aragues R., Sander C., Oliva B. 2008. Predicting cancer involvement of genes from heterogeneous data. *BCM Bioinformatics*, **27**, 172.
6. Ashkenazi A. 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonist. *Nature*, **7**, 1001-1012.
7. Balasubramanian K., Schroit A. 2003. Aminophospholipid Asymmetry: A Matter of Life and Death. *Annual Review Physiology*. 65: 701-34.
8. Bivén K., Erdal H., Hägg M., Ueno T., Zhou R., Lynch M., Rowley B., Wood J., Zhang C., Toi M., Shoshan M., Linder S. 2003. A novel assay for discovery and characterization of pro-apoptotic drugs and monitoring apoptosis in patient sera. *Apoptosis*, **8**, 263-268.
9. Blankenberg F. 2008. In Vivo Detection of Apoptosis. *The Journal of Nuclear Medicine*, **49**, 81-95.
10. Chipuk J., Green D., 2006. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **13**, 994-1002.
11. Cotter T. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 501-507.

12. Cross T., Scheel D., Henriquez N., Deacon E., Salmon M., Lord J. 2000. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. *Experimental Cell Research* **256**, 34–41.
13. Cummings J., Ward T., Greystoke A., Ranson M., Dive C. Biomarker method validation in anticancer drug development. *British Journal of Pharmacology*, **153**: 646-656.
14. DeLange G., Delange A. 2008. Xeriscape Landscaping Plants For The Arizona Desert Environment Pictures, Photos, And Information Shrubs, Page Seven. [www.delange.org/XeriscapeSh7/XSh7.htm](http://www.delange.org/XeriscapeSh7/XSh7.htm).
15. Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programed Cell Death. *Toxicol Pathol*, **35 (4)**, 495-516.
16. Engeland M., Nieland L., Ramaekers F., Schutte B. 1998. Annexin V.Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*, **31**,1–9.
17. Eom Y., Kim M., Park S., Goo M., Kwon H., Sohn S., Kim W. Yoon G., Choi K. 2005. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogen*, **24**, 4765-4777.
18. Falkiewicz B, üukasiak J, Vilcadora. 2006. [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. y *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.], Intercollegiate Faculty of Biotechnology. University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk.
19. Fink S., Cookson B. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, **73**, 1907-1916.
20. García F, 2000. Evaluación de los efectos citotóxicos, citostaticos y genotóxicos de las Argentatinas A y B. Tesis de grado previa a la obtención del título de Química Farmacéutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. México – D.F.
21. Garcia M. 2007. *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.
22. Guamán L. 2009. Implementación de dos Biomarcadores para la determinación de Actividad Apoptótica, en el CBCM". Tesis previa a la obtención del título de

- bioquímico farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
23. Hail N., Konopleva M., Sporn M., Lotan R., Andreeff M. 2004. Evidence Supporting a Role for Calcium in Apoptosis Induction by the Synthetic Triterpenoid 2 – Cyano - 3 ,12 – dioxooleanoma – 1,9 – dien – 28 oic Acid (CDDO). *Biol. Chem*, **279**, 11179-11187.
  24. Hitoshi O., Tak W. 2005. Pathways of Apoptotic and Non-apoptotic death in Tumour Cells. *Nature*, **4**, 592-603.
  25. Huang X., Tran T., Zhang L., Hatcher R., Zhang P. 2005. DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the ChK1- dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *The National Academy of Sciences*, **102** (4), 1065-1070.
  26. Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. 2007. [www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov).(con acceso en Octubre 2008).
  27. Jones K., Senft J. 1985. An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **33**, 77-79.
  28. Jordan L., Harrison D., 2003. Apoptosis and Cell Senescence. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Second edition. Willey. New York.
  29. Kabore A., Johnston J., Gibson S. 2004. Changes in the Apoptotic and Survival Signaling in Cancer Cells and Their Potential Therapeutic Implications. *Current Cancer Drug Targets*, **4**, 147-163.
  30. Kroemer G., El-Deiry W., Golstein P., Peter M., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M., Malorni W., Knight R., Piacentini M., Nagata S., Melino G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, **12**, 1463-1467.
  31. Laszczyk M. 2009. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Groups as Tools in cancer Therapy. *Panta Med*, DOI: 10.1055/s-0029-1186102.
  32. Laufer E., Reutelingsperger C., Narula J., Hofstra L. 2008. Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk. *Basic Research Cardiology*, **103**, 95-104.

33. Li Z., Hu D., Chu Q., Wu J., Gao C., Zhang Y., Huang Y. 2004. Cell apoptosis and regeneration of hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization. *World Journal of Gastroenterology*, **10 (13)**, 1876-1880.
34. Lindholm P. 2005. Cytotoxic Compounds of Plant Origin (Biological and Chemical Diversity). Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from The Faculty of Pharmacy. Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala.
35. Lowe S., Cepero E., Evan G. 2004. Intrinsic Tumour Suppression. *Nature Publishing Group*, **432**, 307-315.
36. Morales J. 2007. Aproximaciones *IN SILICO* de la actividad biológica de triterpenos tetracíclicos: Argentatinas. Tesis de grado previa a la obtención del título de Química. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
37. Offer H., Erez N., Zurer I., Tang X., Milyavsky M., Goldfinger., Rotter V. 2002. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*, **23**, 1025-1032.
38. Okada H., Mak T. 2004. Pathways of Apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews*, **4**, 592-603.
39. Palacios L. 2009. Evaluación del efecto genotóxico de la Argentatina B, mediante el ensayo CBMN en células MCF-7 (Cáncer de Mama). Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
40. Parra H., Garcia F., Sordo M., Ramírez T., Martinez M., Ostrosky P. 2005. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatina A and Argentatina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences*, **77**, 2855-2865.
41. Promega. Junio de 2009. Protocols & Applications Guide: Apoptosis. <http://www.promega.com/paguide/chap3.htm>
42. Ramirez T. 2008. Evaluar los efectos genotóxicos “*in vitro*” de la Argentatina B en cultivo de linfocitos humanos de

- sangre periférica. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
43. Salminen A., Lehtonen M., Suuronen K., Kaarniranta K., Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 2979 – 2999
  44. Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third Edition. New York.
  45. Scarpato A., Bartoli A., Naccariti L., Migliore L., Cochi R., Barale L. 1998. Different effects of newly isolation saponins on the mutagenicity and cytotoxicity of the anticancer drugs mitomycin C and bleomycin in human lymphocytes. *Mutation Research*, **420**,49-54.
  46. Schinoni M., Parana R. 2006. Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterol Latinoam*, **36**, 211-217.
  47. Setzer W., Setzer M., Bates R., Jackes B. 2000 Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, North Queensland, Australia. *Planta Medica*, **66**, 176-177.
  48. Skeel R, Ruppert R. *Quimioterapia del Cáncer*. Quinta ed. Editorial Marban. 2000.
  49. Taylor R., Cullen S., Martin S. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the celular level. *Nature*, **9**, 231-241.
  50. Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J., Sasaki Y. 2000. Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Enviromental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206 – 221.
  51. Villareal J. 1996. Corología de las Asteraceas de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*, **36**, 29-42.
  52. Yang X., Sladek T., Liu X., Butler B., Froelich C., Thor A. 2001. Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer to Doxorubicin- and Etoposide-induced Apoptosis. *Cancer Research*, **61**, 348-354.
  53. Yépez J. 2006. Instituto Nacional de Tumores. Quito – Ecuador.

54. Yunga E., Garrido H. 2006. Incidencia de cáncer en Loja. Registro de tumores Loja. Primera edición. Editorial UTPL. Loja-Ecuador.
55. Zomeño M. 2002. Glosario de radioterapia. Panacea. **3**: 9-10.
56. Zong W., Thompson C. 2009. Necrotic Death as a cell fate. Genes Dev, **20**, 1-15.