



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

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“Actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas y actividad genotóxica mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de:(16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil), derivados de Argentatina B”**

*Proyecto de Fin de Carrera previo  
a la obtención del Título de  
Bioquímico Farmacéutico*

**AUTOR:**

*Diego Javier Ojeda Herrera*

**DIRECTORA:**

*Bq. María Isabel Ramírez Orellana*

**LOJA – ECUADOR**  
2012

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

Yo, Diego Javier Ojeda Herrera conecedor del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja Art. 67 acepto la disposición la misma que textualmente dice: “Forma 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”.

Diego Javier Ojeda Herrera

Bq. María Isabel Ramírez O.

**TESISTA**

**DIRECTORA DE TESIS**

Bq.

María Isabel Ramírez Orellana

**DIRECTORA DE TESIS**

**CERTIFICA:**

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

Loja, Enero 2012

Bq. María Isabel Ramírez Orellana

**DIRECTORA**

## **AUTORÍA:**

Los resultados, ideas y conclusiones y demás contenidos vertidos en el desarrollo del presente proyecto de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Diego Javier Ojeda Herrera

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto de investigación va dedicado en primer lugar a Dios y a la Santísima Virgen María, ya que gracias a su intersección pude llegar a culminar con éxito todas y cada una de la metas planteadas.

A mis padres: Javier y Yolanda por el amor, cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos Karina, Richard, Santiago, Juan Pablo y Ronal por estar siempre conmigo y dejarse guiar.

Y a todos los que creyeron en mis capacidades....

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la persona del Ph. Dr. Luís Miguel Romero Fernández y ahora del Ph. Dr. José Barbosa, por impulsar la investigación y formación integral de cada uno de sus estudiantes en la búsqueda del saber.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, bajo la Dirección del Ph. Dr. Omar Malagón, por brindar el apoyo necesario para adquirir todos los conocimientos teóricos y prácticos que me hicieron un buen profesional.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación en el área de Genética Toxicológica, en especial a la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por brindarme la ayuda y el asesoramiento en la realización de este proyecto de investigación.

A la Bq. María Isabel Ramírez, por su asesoría en todo momento que estuve en el CBCM, en especial por brindarme su dirección en la realización del presente proyecto de investigación.

Al Ing. Juan Carlos Romero agradecer su buena predisposición para resolver cualquier inquietud y por haber donado los derivados que se estudiaron en la presente investigación.

A mis compañeros del área de Genética Toxicológica, por ayudarme a crecer en sabiduría y colaborar en la realización del presente proyecto de investigación: especialmente a Gabriela, Javier, Henry, Luis, Jorge y Lorena.

A todos los compañeros del Centro de Biología Celular y Molecular por estar prestos a brindar todo el apoyo que se requiere en la vida estudiantil.

Un agradecimiento a Darío Cruz y Xavier Celi, por haber colaborado en el presente trabajo de investigación en calidad de donantes.

A mis amigos y compañeros, por hacer de la vida universitaria un verdadero hogar y hacerme sentir en familia.

Por último quiero agradecer a todas las personas que leen este trabajo de investigación, gracias por tomarme en cuenta como referencia para sus trabajos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁG.</b>
Portada	i
Contrato de Cesión de Derecho de Tesis	ii
Certificación	iii
Autoría	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de Contenidos	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Fotografías	ix
Índice de Tablas	ix
Índice de Gráficas	x
Artículo Científico	xi
<b>1. OBJETIVOS.</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Cáncer.</b>	<b>2</b>
2.1.1. Causas.	4
2.1.2. Tratamiento.	5
<b>2.2. Citotoxicidad.</b>	<b>8</b>
2.2.1. Tipos de Ensayos de Citotoxicidad.	9
2.2.2. Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorimetría.	11
<b>2.3. Genotoxicidad.</b>	<b>12</b>
2.3.1. Ensayo Cometa Alcalino.	16
<b>2.4. Antineoplásicos de Origen Natural.</b>	<b>18</b>
2.4.1. Estudio de triterpenos como agentes cancerígenos.	20
2.4.2. Argentatina B.	20
2.4.3. Derivados de Argentatina B:(16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil).	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Compuestos de Estudio.</b>	<b>24</b>
3.1.1. Derivados de la Argentatina B.	24

<b>3.2. Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría.</b>	24
3.2.1. Modelo Biológico.	24
3.2.2. Condiciones de cultivo.	25
3.2.3. Conteo celular.	25
3.2.4. Protocolo.	25
<b>3.3. Ensayo de Viabilidad Celular y Ensayo Cometa.</b>	26
3.3.1. Modelo biológico y Donantes.	26
3.3.2. Controles.	26
3.3.2.1. Control positivo.	26
3.3.2.2. Control negativo.	27
3.3.3. Protocolo del Ensayo de Viabilidad (FDA-EtBr).	27
3.3.4. Protocolo del Ensayo Cometa.	28
<b>3.4. Análisis estadístico.</b>	29
3.4.1. Ensayo de Citotoxicidad por Fluorometría (FMCA).	29
3.4.2. Viabilidad Celular (FDA).	29
3.4.3. Ensayo Cometa.	30
<b>3.5. Esquema del Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría.</b>	31
<b>3.6. Esquema del Ensayo Cometa.</b>	32
<b>4. RESULTADOS</b>	33
<b>4.1. Actividad citotóxica de (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletíl), en líneas celulares tumorales (RKO, D-384, MCF-7, PC-3 y U-251).</b>	33
4.1.1. Determinación de la IC50.	33
<b>4.2. Actividad genotóxica de (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletíl), derivados de argentatina B.</b>	34
4.2.1. Viabilidad de: (16S,17R,20S)-dilactona, 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletíl)	35
4.2.2. Largo de cola con (16S,17R,20S)-dilactona.	35
4.2.3. Largo de cola con 1a-(carboxietil).	36
4.2.4. Largo de cola con 1a-(metoxicarboniletíl).	37
4.2.5. Comparación cualitativa de: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletíl), derivados de argentatina B.	37
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	39



<b>6. CONCLUSIONES.</b>	44
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	45
<b>8. ANEXOS.</b>	51
8.1. Actividad citotóxica de (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil), en líneas celulares tumorales (D-384, MCF-7, PC-3 y U-251).	51
8.2. Publicación de poster.	53

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA.</b>	<b>PÁG.</b>
1. Generalidades de los cambios en las células que causan cáncer.	5
2. Espectro del daño del ADN provocado por agentes químicos y físicos.	13
3. Estructura molecular de la argentatina B.	21
4. Esquema del FMCA.	31
5. Esquema del Ensayo Cometa y Viabilidad.	32

### ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA.</b>	<b>PÁG.</b>
1. Multiplato de 96 pocillos teñido con FDA, para ser leído en el fluorómetro.	12
2. Cometa teñido con Bromuro de etidio, donde se observa su cabeza y cola.	17
3. Arbusto de <i>Parthenium argentatum</i> Gray.	21
4. Panel de líneas celulares tumorales.	24
5. Fotografía del ensayo de viabilidad (40X).	28

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA.</b>	<b>PÁG.</b>
1. Tasa de mortalidad por cada 10 mil habitantes.	3
2. Tasa de incidencia estandarizada por cada 100 mil habitantes (2002-2006).	3
3. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción	6

o su origen.	
4. Derivados de argentatina B estudiados en el presente trabajo.	22
5. Diseño de Tratamiento para Viabilidad y Ensayo Cometa.	27
6. Actividad citotóxica de los derivados de argentatina B, expresada en función de la concentración Inhibitoria media.	34
7. Porcentaje de viabilidad de los linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de los derivados de arg B.	35

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA</b>	<b>PÁG.</b>
1. Porcentaje de células vivas de células de cáncer de colon (RKO), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil).	33
2. Largo de cola con (16S,17R,20S)-dilactona.	36
3. Largo de cola con 1a-(carboxietil).	36
4. Largo de cola con 1a-(metoxicarboniletil).	37
5. Comparación cualitativa de: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil), derivados de argentatina B.	38
6. Porcentaje de células vivas de células de astrocitoma cerebral (D-384), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil).	51
7. Porcentaje de células vivas de células de glioblastoma (U-251), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil).	52
8. Porcentaje de células vivas de células de cáncer de próstata (PC-3), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil).	52
9. Porcentaje de células vivas de células de cáncer de mama (MCF-7), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil).	53

## RESUMEN

Uno de los principales problemas que presentan los fármacos obtenidos a partir de metabolitos secundarios extraídos de plantas es su toxicidad, en especial cuando son fármacos antineoplásicos en estos casos es necesario evaluar el daño que causan al ADN. Sin embargo una manera de mejorar la actividad biológica y de reducir la genotoxicidad es realizar cambios estructurales por medios químicos a las moléculas de interés. Es así como en investigaciones anteriores se obtuvieron varios derivados de la Argentatina B, un triterpeno aislado de la resina de *Parthenium argentatum* que demostró una alta actividad anti-proliferativa en varias líneas celulares tumorales humanas. En el presente trabajo se evaluó la actividad citotóxica y genotóxica de 3 derivados de la Argentatina B; la citotoxicidad se determinó mediante el FMCA aplicado a un panel de 5 líneas celulares tumorales humanas, mientras que para cuantificar el daño al ADN se utilizó el ensayo cometa en linfocitos humanos. Nuestros resultados demostraron que (16S, 17R, 20S)-dilactona presenta una mayor actividad citotóxica y genotóxica en comparación con los derivados 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil).

**Assessment of cytotoxic activity in human tumor cell lines and genotoxic activity by the comet assay to human lymphocytes of (16S, 17R, 20S)-dilactone; 1a-(carboxietyl) and 1a-(methoxycarbonyl), argentatin B derivatives**

Diego J. Ojeda Herrera<sup>a\*</sup>, María I. Ramírez Orellana<sup>a</sup>, Juan C. Romero Benavides<sup>b</sup>

Natalia C. Bailón Moscoso<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Genotoxicología y Biología Molecular, Centro de Biología Celular y Molecular,

<sup>b</sup> Instituto de Química Aplicada

Universidad Técnica Particular de Loja/San Cayetano Alto

P.O.Box 11-01-608 Loja - Ecuador.

<sup>a\*</sup> djojeda@utpl.edu.ec

**Abstract:**

One of the main problems that present the drugs obtained from secondary metabolites extracted to plants is its toxicity, especially if are antineoplastic drugs, in these cases is necessary to assess the damage caused to DNA. However, a way to improve biological activity and reduce the genotoxicity is to make structural changes by chemical methods to the molecules of interest. This is how, in previous research have obtained some argentatin B derivatives, a triterpene isolated from *Parthenium argentatum* resin, that demonstrated a high anti-proliferative activity in several human tumor cell lines. In the present study, we evaluated the cytotoxic and genotoxic activity of three argentatin B derivatives; the cytotoxicity was determined by the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) applied to a panel of human tumor cell lines, whereas for quantifying DNA damage we used the comet assay in human lymphocytes. Our results showed that (16S, 17R, 20S)-dilactone has a greater cytotoxic and genotoxic activity derivatives compared to the 1a-(carboxietyl) and 1a-(methoxycarbonyl).

**Key Words:** comet assay, genotoxicity, cytotoxicity, argentatin B derivatives. FMCA

**INTRODUCTION:**

A strategy of search for new anticancer agents is the evaluation of compounds of natural source. The result of this was the obtaining of clinically effective agents such as vincristine, vinblastine, paclitaxel, podophyllotoxin derivatives, the combretastatin, among other. However, there are in literature a lot of secondary metabolites with potential anticancer activity. For example we can cite the coumarins, flavonoids and the terpenes; included in this latter group the triterpenes (Balunas *et al.* 2006; Kinghorn *et al.* 2003).

The triterpenes are an important and structurally diverse group of secondary metabolites, are compounds of 30 carbons from to squalene (Bruneton 2001; Parra *et al.* 2005). To date, more than 100 triterpenes have been described with cytotoxic activity. Some of these are the type ursane, oleanane, cycloartane, lupane, and the methyluric quinones (Setzer y Setzer 2003). Also know that the triterpenes can act as antioxidants, antiinflammatory, hepatoprotective, cardioprotective, antagonists of estrogen receptors, antiproliferative, cytotoxic in human cancer cell lines, antiangiogenic and proapoptotic (Parra *et al.* 2006; Salminen *et al.* 2008).

Among the triterpenes least studied, we can cite the cicloartanes. Such compounds have been reported as cytotoxic in screening studies, where showed that have cytotoxic activity in cancer cell lines (Parra *et al.* 2006).

The argentatin B is a triterpene of cycloartane-type, isolated from the resin of *Parthenium argentatum* Gray, which is cytotoxic in several human cancer cell lines, whereas in genotoxicity assays (Mn) showed no genotoxic effect (Parra *et al.* 2005), and by comet assay showed genotoxic effect in human lymphocytes (Ramírez 2008).

Currently, several derivatives of argentatin B have been obtained, some with greater cytotoxic activity against human tumor cells (Parra *et al.* 2006). In this project will analyze the cytotoxic activity of other 3 derivatives: (16S, 17R, 20S)-dilactone; 1a-(carboxietyl) and 1a-(metoxicarbonietyl), of which is unknown the activity cytotoxic on human tumor lines and their genotoxic effect.

The methodology that has been widely used by several laboratories to evaluate the genotoxic potential of chemical agents, industrial compounds and new drugs is the alkaline comet assay or single cell gel electrophoresis (pH> 13) (Monroy *et al.*, 2005). This is a sensitive technique that detects double-strand breaks, single-strand breaks, alkali-labile sites, incomplete repair sites and cross-linkssingle (Tice *et al.* 2000). In addition to this technique, we implemented the Fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA), a type of culture cell in microplates, which allow the simultaneous evaluation of several replicates per treatment (Lindhagen *et al.* 2008).

## **MATERIALS AND METHODS:**

**Derivates of Argentatin B:** All derivates were donated by Ing. Juan Carlos Romero of IQA-UTPL. Tested chemicals were freshly prepared by dissolving in ethanol.

**Fluorometric microculture cytotoxicity assay:** we used as biological model a panel of 5 human tumor cell lines: RKO (colon), D-384 (brain), U-251 (Central nervous system), PC-3 (prostate) and MCF-7 (breast). The cell lines were cultured in base medium RPMI-1640 (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and 1% L-glutamine (GIBCO) and were incubated at 37°C, in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% humidity for 24 h.

We placed 4x10<sup>3</sup> cells/well in a 96-well multiplate, from cultures than 80-90% of confluence and incubated for 24 h, after this time, we placed new medium with the concentrations of argentatin B derivatives to prove (15, 25, 50, 75 and 100 µM), in addition were used as negative control 1% ethanol and as positive control Doxorubicin (DXO) 1 µM. The cells were incubated for 48 h more. After this, the cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) to remove cell debris. Later, we added 100 µL of FDA: PBS (0.8 µL:120 µL) solution. The plate was incubated in the dark at ambient temperature for 5 min and was read in the Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation) at a  $\lambda_{ex}$ : 485 nm and  $\lambda_{em}$ : 538 nm.

The viability was quantified in function to the fluorescence intensity proportional to the number of cells that survive the treatment. The values were normalized with the fluorescence units of control conditions (100% viability), and from this value was obtained the percentage of live cells in experimental conditions. Consecutively the percentages were analyzed using the statistical software GraphPad Prism 5 to obtain the IC<sub>50</sub> by a non-linear regression, between the logarithms of the concentration versus the percentage of viability.

**Cell Viability and Comet assay:** Experiments were performed using blood from three healthy, non-smoker donors (blood from three men) who had not taken any drug at least 15 days prior to sampling. Average age was 25 years (22-27). The effect of drug on lymphocyte viability was measured by FDA/Ethidium bromide assay. We counted 200 cells between viable (green) and non viable (red). The percentage was > 70% of viable cells.

The comet assay was performed under alkaline conditions following the method of Tice *et al.* 2000. Human lymphocytes treated with each tested chemical at the indicated doses were incubated at 37°C, in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% humidity for 3 h.

Conventional microscope slides were dipped into a solution of 130  $\mu$ L of 0.5% of normal melting point agarose (NMP) and allowed to dry on a flat surface at room temperature. The cell suspension were gently mixed with 75  $\mu$ l of 0.5% (w/v) of LMP, and immediately covered with a 24 x 32 mm coverslip. Slides were left for 5 min at 4°C to solidify the agarose. After removal of the small coverslip, a final layer of 130  $\mu$ l of low melting point agarose was added to the slide and covered. After the agarose solidified the coverslip was removed and the slides immersed into a cooled lysing solution (2.5 M of NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris , 1% (v/v) of Triton X-100 and 10% DMSO added just before use at pH 10) at 4°C or 1 hour. The slides were then placed in the electrophoresis chamber, which was then filled with freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH >13) for 20 minutes. Thereafter, the electrophoresis (300 mA and 25 V) was conducted for 20 minutes at 4°C. After electrophoresis, the slides were placed in a horizontal position and washed three times with 0.4 M Tris buffer, pH 7.5, to neutralize the excess alkali. Slides were dried in methanol for 5 min, and stored in a low humidity environment before staining with 60  $\mu$ l of ethidium bromide (1.5  $\mu$ g/mL). Images of 50 randomly selected cells (25 cells from each of two replicate slides) were analyzed from treatment by visual inspection.

The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 5. One way-ANOVA and the post test Dunnet was used to test for significant defferences in viabilities. For the comet assay was used the non-parametric test Kruskal-Wallis to evaluate the lenght tail of comets. To compare qualitative argentatin B derivatives, they were normalized with respect to ethanol control; we established linear regressions and compared the slopes with two-way ANOVA test.

## **RESULTS AND DISCUSSION:**

The initial step in the search of molecules with potential as anticancer agents is a primary screening, which allows the discrimination of extracts, molecules, metabolites or any test compound, for know their cytotoxic or inhibitor effect in a biological model. Then, you should implement genotoxicity testing that can elucidate if the test compound is able to interact with DNA and may cause damage to this molecule (Piloto *et al.*, 2000).

Considering the above, we posed this project where we studied the cytotoxic and genotoxic activity that presents the argentatin B derivatives: (16S, 17R, 20S)-dilactone;

1a-(carboxietyl) and 1a-(metoxycarbonietyl), in tumor cell lines (RKO, D-384, MCF-7, PC-3 and U-251) and human lymphocytes.

The primary screening applied to tumor cell lines was quantified by the percentage of viability, resulting from exposure at 48 hours to the three argentatin B derivatives. For this, we used the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). In the Table 1 we show the cytotoxic activity of the three derivatives of argentatin B, where was calculated the IC<sub>50</sub> for each experiment, the average of three repetitions we can see in this table. The test used was a nonlinear regression. As you can see, the compounds have values of IC<sub>50</sub> of 23.42 μM up to more 100 μM.

The most active compound was (16S, 17R, 20S)-dilactone, which presented an IC<sub>50</sub> of between 23.42 and 82.38 μM, having a greater effect on cerebral astrocytoma cell line D-384 and less power in line U-251. On the other hand, the compounds 1a-(carboxietyl) and 1a-(metoxycarbonietyl) did not present greater effect on the biological model used, with similar activity in all cell lines, where its IC<sub>50</sub> was greater than 100 μM for most cell lines.

In previous studies, the argentatin B presented a cytotoxic effect on several human cancer cell lines, showing an IC<sub>50</sub> of 36.4 μM in U-251 cells, 33.41 μM in PC-3 and 33.06 μM in MCF-7. In contrast to the results obtained in this research, since the cytotoxic activity shown by the derivative (16S, 17R, 20S)-dilactone was two times lower than the presented by its precursor. On the other hand, the effect shown by 1a-(carboxietyl) and 1a-(metoxycarbonietyl) was 4 times lower than the arg. B.

With the help of botanical, phytochemical, biological and molecular techniques, it is possible to modify the chemical structure of molecules, allowing to obtain new structures with a different action mechanism (Parra et al. 2006).

In our case, the three derivates had chemical transformations from its precursor (argentatin B), these chemical modifications were the addition of two lactone groups in the rings A and E for (16S, 17R, 20S)-dilactone, the incorporation of two carboxylic ester in the rings A and E for 1a-(metoxycarbonietyl) and the addition of two carboxyl groups in the rings A and E in the case of 1a-(carboxietyl).

Little is known about the action mechanisms by which the triterpenes perform their effects. Previous research showed that argentatin B can be considered as a cytostatic



agent; since it is known that the acetone, a triterpene of cycloartano-type similar to argentatin B, has cytostatic effects associated with the inhibition of cyclin levels: CD1, CDK4 and pRb in its hyperphosphorylated form; as well as increased of protein p21cip1 that lead to cell cycle inhibition (Saxe *et al.* 2004). This same behavior could be applicable in the action mechanism of the derivatives evaluated in this research.

The second part of the research consisted in the execution of the genotoxicity test, prior to these, is essential to establish the percentage of viable cells, in our study we used the viability test by FDA-EtBr technique, the demonstration that the cytotoxic potential isn't intervening in the genotoxic effect is essential for any study.

In Table 2, we can see the percentage of viable lymphocytes after 3 hours of exposition with the argentatin B derivatives: (16S, 17R, 20S)-dilactone, 1a-(carboxietyl) and 1a-(metoxycarbonietyl), in all the cases the surviving of the lymphocytes was major to the 70%, noticing in all of the derivatives a significant difference between the ethanol control and the concentrations of 15, 25 and 50  $\mu$ M. In conclusion the viability of the cells decrease according the dose is increased.

On the other hand, we evaluated the genotoxicity of the three argentatin B derivatives through comet assay (pH >13). In the Graph 1, we can see the tail length of the derivatives, we observed a genotoxic effect at different concentrations (5, 15, 25, 50  $\mu$ M). The statistical analysis by Kuskal-Wallis test shows that at doses of 15, 25 and 50  $\mu$ M exist a significant difference compared to negative control with ethanol (\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.001$ ). Since, concentration of the derivatives increased the tail long of comet increased too, with respect to the basal damage.

According to the results obtained in the comet assay, argentatin B derivatives produce genotoxic damage; however, there are differences between them. In the graph 2 we can see the comparison of the slopes of the three derivatives. According to statistical analysis (16S, 17R, 20S)-dilactone, was the derivate with the highest degree of genotoxicity, while 1a-(carboxietyl) produced less damage at genetic material.

Through the statistical analysis two-way ANOVA, we observed a significant difference in the dose of 50  $\mu$ M among (16S, 17R, 20S)-dilactone vs 1a-(metoxycarbonietyl) \* $P < 0.05$  and between (16S, 17R, 20S )-dilactone vs 1a-(carboxietyl) \*\* $P < 0.01$ .

In previous studies, the Argentatin B showed a genotoxic effect through the comet assay (Ramirez, 2008). Bautista 2010 for her part demonstrated the genotoxicity of four derivatives of argentatin B, being the derivatives: 2-formyl-(16 $\beta$ , 24R)-epoxy -16.24-25-hidroxicicloartan-3-one and 2 $\alpha$ -cyano-(16 $\beta$ , 24R) -16.24-epoxy-25-hidroxicicloartan-3-one which have showed higher genotoxic effect. Our results were similar to those obtained by the authors mentioned above.

The damage to genetic material shown by derivatives: (16S, 17R, 20S)-dilactone; 1a-(carboxietyl) and 1a-(metoxicarbonietyl), could possibly have been exercised by direct damage to DNA or an indirect effect by inducing oxidative stress damage in lymphocytes, which could mean as in literature has reported the activity of some triterpenes structurally similar to Argentatin B for example, oleanolic acid derivative called the 2-cyano-3, 12 dioxodeano dien-28-1.9 oic acid (CDDO), promotes the activation of reactive species oxygen (ROS) and is associated with oxidative stress by promoting apoptosis (Hail. et al. 2004).

This work is the first to report the cytotoxic and genotoxic activity of these three derivatives argentatin B. The results obtained in this study can be compared each other, since the derivative (16S, 17R, 20S)-dilactone presented a greater cytotoxic and genotoxic effect with respect to the derivatives 1a-(metoxicarbonietyl), and 1a-(carboxietyl) who had similar responses in their activity.

Finally, is important to note that the generation of new antineoplastic agents is a necessity, is essential the generation of compounds with antiproliferative capacity in cancer cells, but with less toxicity effects in the normal cells; for which, we needed continue with the research about argentatin B derivatives, as the next step would be important to expand the test battery to help us elucidating how the structural change of the molecule influences the genetic material.

## **CONCLUSIONS**

The argentatin B derivatives: (16S,17R,20S)-dilactone; 1a-(carboxietyl) y 1a-(metoxicarbonietyl) induce damage to genetic material measured by the tail length in human lymphocytes, being (16S, 17R, 20S)-dilactone which presented the higher genotoxic effect.

The derivative (16S, 17R, 20S)-dilactone inhibits the growth *"in vitro"* cell lines RKO, D-384, U-251, MCF-7 and PC-3. Presenting an IC<sub>50</sub> between 23,42 to 82,38 μM. On the other hand the derivatives 1a-(carboxyethyl) and 1a-(methoxycarbonylethyl) did not show greater cytotoxic effect, since their IC<sub>50</sub> in most cell lines was above 100 μM.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS:**

I am very grateful to Ing. Juan Carlos Romero. Acknowledges to UTPL-CBCM for financial support.

#### **REFERENCES:**

1. Balunas M, Kinghorn D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78, 431-441.
2. Bautista G. 2010. Evaluación del efecto genotóxico mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de los derivados de Argentatina B ((16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 3-oxima, 25-O-acetil, 2α-ciano, y 2-formil. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
3. Brunneton J, 2001. *Farmacognosia – Fitoquímica - Plantas Medicinales*. Segunda ed. Editorial Acriba. Zaragoza – España.
4. Hail N, Konopleva M, Sporn M, Lotan R, and 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.*, Vol. 279, Issue 12, 11179-11187.
5. Kinghorn A, Farnsworth N, Soejarto D, Cordell G, Swanson S, Pezzuto J, Wani M, Wall M, Oberlies N, Kroll 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*. Vol. 41, Supplement, pp. 53–67.
6. Lindhagen E., Nygren P., Larsson R. 2008. The fluorometric microculture cytotoxicity assay, *Nature Protocols* VOL.3, NO.8. 2008.
7. Monroy C., Cortés A., Sicard D., Groot de Restrepo H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25:335-45.
8. 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.

9. Parra H., Garcia F., Sordo M., Ramírez T., Martinez M., Ostrosky P. 2005. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatin A and Argentatin B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences*, 77, 2855-2865.
10. Parra H., Compadre C., Ramírez T., Muñoz M., Compadre L., Ostrosky P., Martinez M. 2006. Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal Chemistry* 14, 1889-1901.
11. Piloto J, Vizoso A, Ramos A, García A, Remigio A, Vega Y, Lidia M, Rodríguez C, Carballo C, 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (5), 428 – 434.
12. Ramírez M. 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.
13. Salminen A., Lehtonen M., Suuronen K., Kaarniranta K., Huuskonen J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2979 – 2999.
14. Saxe L., Shimizu M., Xiao D., Nuntanakorn P., Lim E., Suzui M., Seter C., Pertel T., Kennelly J., Kronenberg F., Weinstein B. 2004. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 83: 221-231.
15. Setzer W.N. y Setzer M.C. 2003. Plant Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic agents. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* 3: 540-556.
16. Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Roja E, Ryu J, Sasaki Y. 2000 Single Cell Gel /Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol 35, 206 – 221.

## ANEXES

**Table 1.** Effect of argentatin B derivates on the growth of human cancer cell lines. Concentration causing 50% cell growth inhibition ( $IC_{50}$ ).

Human cancer cell lines	$IC_{50} \pm SEM$ ( $\mu M$ )		
	Compound		
	(16S,17R,20S)-dilactone	1a-(carboxietyl)	1a -(metoxycarbonietyl)
RKO (Colon)	44,95 $\pm$ 0,04	98,99 $\pm$ 0,04	84,13 $\pm$ 0,03
D-384 (Brain)	23,42 $\pm$ 0,05	>100	>100
U-251 (CNS)	82,38 $\pm$ 0,04	> 100	> 100
MCF-7 (Breast)	44,04 $\pm$ 0,07	> 100	90,00 $\pm$ 0,05
PC-3 (Prostate)	80,01 $\pm$ 0,02	> 100	> 100

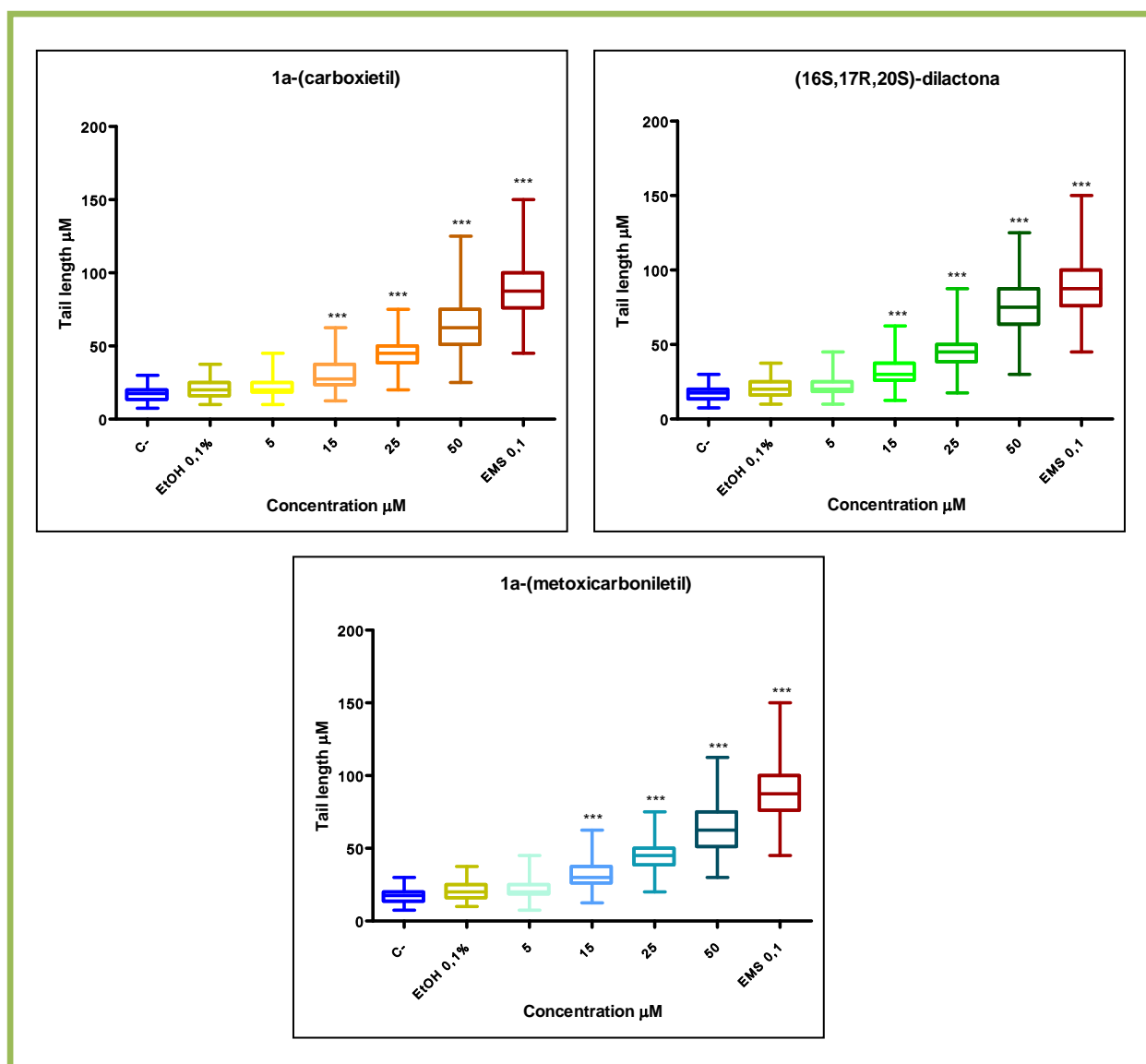
Each data is given as the means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments.

**Table 2.** Percentages of viabilities of human lymphocytes treated with different concentrations (5, 15, 25, 50  $\mu M$ ) of 3 Argentatin B derivates, and the respective controls, using test ANOVA-post test Dunnet (\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ ).

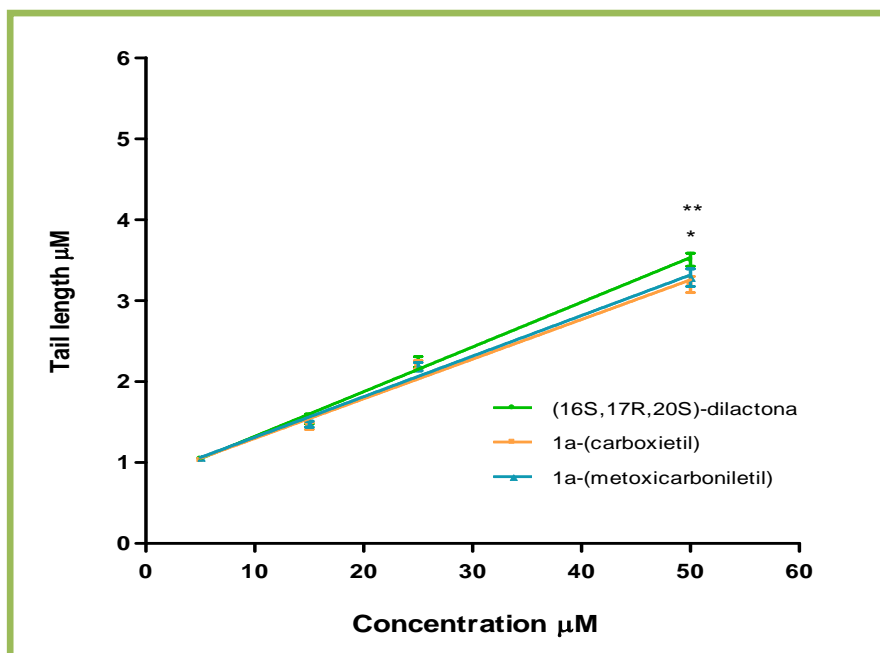
Compound	% of Viability $\pm$ SD		
	(16S,17R,20S)-dilactone	1a-(carboxietyl)	1a -(metoxycarbonietyl)
C <sup>-</sup>	95,72 $\pm$ 1,01	95,72 $\pm$ 1,01	95,72 $\pm$ 1,01
C <sup>-</sup> (Ethanol 0,1%)	95,03 $\pm$ 0,98	95,03 $\pm$ 0,98	95,03 $\pm$ 0,98
5 $\mu M$	94,86 $\pm$ 0,82	95,42 $\pm$ 0,50	95,25 $\pm$ 0,78
15 $\mu M$	92,94 $\pm$ 1,27 **	93,28 $\pm$ 1,18 ***	93,19 $\pm$ 0,73 **
25 $\mu M$	91,36 $\pm$ 1,36 ***	91,89 $\pm$ 1,35 ***	91,50 $\pm$ 0,83 ***
50 $\mu M$	88,97 $\pm$ 1,84 ***	90,36 $\pm$ 0,99 ***	90,11 $\pm$ 1,77 ***
EMS 0,1 $\mu M$	88,72 $\pm$ 1,36 ***	88,72 $\pm$ 1,36 ***	88,72 $\pm$ 1,36 ***

Each data is given as the mean and its  $\pm$  SD of three duplicated independent experiments of three donors.

Derivatives of the Argentatin B : (16S, 17R, 20S)-dilactone; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil),



**Graph 1.** The genotoxic activity of the 3 derivates of Argentatin B expressed by the tail length with three different assays each one by duplicated. Test non parametric ANOVA and post test Kruskal- Wallis (\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*  $p < 0.001$ ).



**Graph 2.** Representation of slopes of the derivatives of the Argentatin B ((16S,17R,20S)-dilactone vs 1a-(carboxietil) \*\* $P < 0.01$ ; (16S,17R,20S)-dilactone vs 1a-(metoxicarboniletel) \* $P < 0,05$ )

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo General:

- Evaluar la actividad citotóxica y genotóxica que presentan los derivados de Argentatina B: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil), en líneas celulares tumorales y linfocitos humanos.

### 1.2. Específicos:

- Determinar el efecto citotóxico y la IC<sub>50</sub> de: (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil), derivados de Arg. B, tras una exposición de 48 horas, mediante el Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorimetría (FMCA), en las líneas celulares tumorales RKO, U-251, MCF-7, PC3 y D-384.
- Determinar la viabilidad de linfocitos humanos luego de exponerlos durante tres horas a los derivados de Arg. B: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil), para establecer las dosis subtóxicas a las que se probara la genotoxicidad.
- Determinar la genotoxicidad mediante el ensayo cometa de los derivados de Argentatina B, en linfocitos humanos.
- Comparar cualitativamente los resultados para determinar si al modificar la estructura química de la Argentatina B, se altera el grado de citotoxicidad y genotoxicidad de los derivados.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. La palabra cáncer abarca todas aquellas neoplasias malignas que tienen en común una proliferación anormal de las células y la capacidad de metastatizar (OMS, 2011).

El cáncer se caracteriza por cambios en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación celular (Gibbs, 2000). Estos cambios son el resultado de anomalías genéticas que pueden aparecer por la mutación de un grupo específico de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y su pérdida o inactivación da lugar a una división celular descontrolada (Burgués *et al.*, 2005).

La OMS y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) destacan al cáncer como la principal causa de muerte en el mundo. Se le atribuyen 7,6 millones (aproximadamente el 13%) de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2008. Los tipos de cáncer más agresivos son los siguientes:

- pulmonar (1,4 millones de defunciones)
- gástrico (740 000 defunciones)
- hepático (700 000 defunciones)
- colorrectal (610 000 defunciones)
- mamario (460 000 defunciones).

En Estados Unidos se produjeron alrededor de 569.490 muertes a causa del cáncer durante el 2010, más de 1.500 personas al día, siendo la segunda causa más común de muerte. Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y pasará de 11 millones en 2030 (OMS, 2011).


Según datos publicados por la IARC (Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer), en toda Latinoamérica y el Caribe se produjeron alrededor de

542.000 defunciones por cáncer en el 2008. De las cuales 386.000 fueron en Sudamérica. En el Ecuador el panorama no es alentador, en 2008 se produjeron cerca de 13.300 defunciones por esta enfermedad. En 2009, la última cifra del Registro Nacional de Tumores de SOLCA (Sociedad de Lucha contra el Cáncer) indica que 14 de cada 100 ecuatorianos murieron de cáncer.

Al separar la cifra por sexos en el Ecuador, el cáncer de estómago continúa siendo el mayor causante de muertes tanto en hombres y mujeres (Tabla 1). De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, Ecuador posee una de las tasas anuales más altas en Latinoamérica con un 11,6 por ciento.

**Tabla 1.** Tasa de mortalidad por cada 10 mil habitantes. **Fuente:** Inec (2009).

<b>Tipos de cáncer que más matan en Ecuador (Hombres y mujeres)</b>	
<b>CÁNCER</b>	<b>TASA</b>
Estómago	50,1
Tejido linfático	22,7
Próstata	12,4
Útero	10,8
Pulmón	9,9



Entre las ecuatorianas, el cáncer de mama ocupa el primer lugar de aparición, con una tasa de 35,4 por cada 100 mil mujeres mayores de 40 años. En los varones, el cáncer de próstata ocupa el primer lugar de prevalencia con un 13 por ciento (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tasa de incidencia estandarizada por cada 100 mil habitantes (2002-2006).

**Fuente:** Registros Nacional de Tumores SOLCA.

<b>Tipos de cáncer más frecuentes por sexo en el Ecuador</b>			
<b>HOMBRES</b>	<b>%</b>	<b>MUJERES</b>	<b>%</b>
Próstata	50,1	Mama	35,4
Estómago	22,7	Piel	32,0
Linfáticos	12,4	Cuello uterino	17,0
Leucemia	10,8	Tiroides	15,5
Colon recto	9,9	Estómago	14,5

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 %, después de las enfermedades cardiovasculares, seguido por las enfermedades hipertensivas, diabetes mellitus e infecciones (MSP, 2009).

### **2.1.1. Causas**

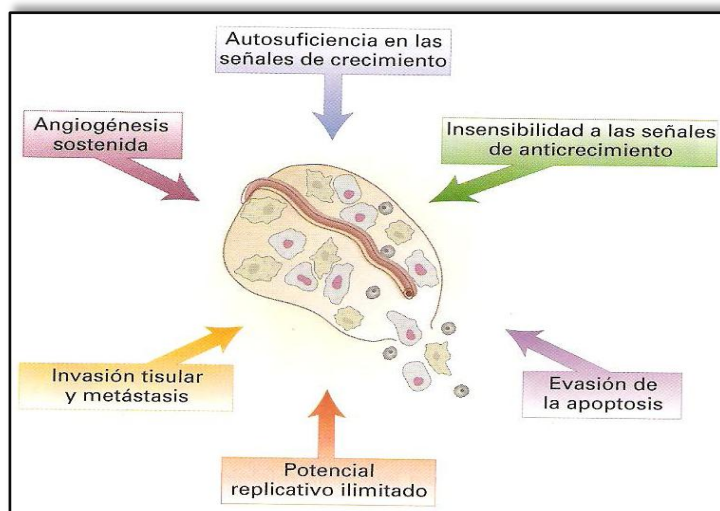
El cáncer suele ser el resultado de mutaciones que aparecen en el curso de la vida durante una exposición a los carcinógenos (Lodish *et al.*, 2005), entre los que están:

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

La capacidad de un agente de producir una neoplasia se denomina carcinogénesis. Se define como un proceso multifase de alta complejidad, que puede requerir varios años para su progreso, en la cual se describen una serie de eventos que transforman una célula normal en cancerígena (Ruddon, 2007). En el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas, se produce la adquisición de autonomía por las mismas, lo que es un reflejo de una regulación y expresión anormal de su carga génica. Como consecuencia final se induce una neoplasia (Domínguez, 2004).

Durante la carcinogénesis, se alteran seis propiedades celulares fundamentales (figura 1), para dar origen al fenotipo completo del cáncer más destructivo. Los tumores menos peligrosos surgen cuando sólo se producen algunos de estos cambios (Lodish *et al.*, 2005).

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación de estos factores se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad (OMS, 2011).



**Figura 1.** Generalidades de los cambios en las células que causan cáncer. **Fuente:** Lodish *et al*, 2005.

### 2.1.2. Tratamiento

El tratamiento para el cáncer es más fácil de llevar y de mejor pronóstico cuando se detecta tempranamente. Se trata de una serie de medidas e intervenciones, como el apoyo psicosocial, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (Foye *et al.*, 1996), que se llevan a efecto con el fin de curar la enfermedad o prolongar considerablemente la vida y mejorar la calidad de esta. Por medio de los cuidados paliativos se puede proporcionar alivio a los problemas físicos, psicosociales y espirituales de más del 90% de los enfermos de cáncer avanzado (OMS, 2011).

En los últimos años se ha comenzado a explorar otro tipo de estrategias para el tratamiento del cáncer, tales como: terapia génica, inmunoterapia (Salmonm *et al.*, 1998) y la fotorradiación con derivados hematoporfirínicos (HTP) (Machado, 2000). El objetivo de cada uno de estos tratamientos es erradicar el cáncer, generalmente por medio de procedimientos combinados, donde se asocia más de un tipo de tratamiento.

La cirugía consiste en un procedimiento quirúrgico por medio del cual se extirpa el tumor y un poco de 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, 2008).

La radioterapia es un procedimiento terapéutico que utiliza cantidades altas de radiación ionizante para destruir células cancerosas y evitar que se diseminen (Zomeño, 2002). La radioterapia destruye o demora el crecimiento de las células cancerosas, pero afecta también a las células sanas (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, 2008).

La quimioterapia, por su parte, es un procedimiento terapéutico farmacológico, que consiste en la utilización de fármacos, denominados antineoplásicos para el tratamiento curativo o atenuante del cáncer. Se emplea en fases tempranas del tratamiento (a menudo en combinación con cirugía o radiación) 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, 2008).

Los fármacos antineoplásicos se definen como sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento y/o proliferación de células tumorales; estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético (Goodman, 2003). Este tipo de medicamentos tiene características especiales que los hacen diferentes a otros grupos farmacológicos; son fármacos con un estrechísimo margen terapéutico, una elevada toxicidad y pueden inducir la aparición de resistencia en células cancerosas (Pradillo, 2002).

La clasificación de los fármacos antineoplásicos está en función del punto de acción que estos ejercen en la célula. La mayoría de estos agentes interactúan en gran medida con el ADN o sus precursores e inhiben la síntesis del nuevo material genético o causan daños irreparables sobre este (Rodríguez *et al.*, 2004). En la Tabla 3 se indican algunos de los agentes antineoplásicos más representativos.

**Tabla 3.** Clasificación de agentes antineoplásicos. **Fuente:** Goodman A. 2003

Clase	Tipo de fármaco	Nombres no comerciales
<b>Fármacos alquilantes</b>	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfafán, clorambucilo
	Etileneiminas	altretamina
	Metilmelaminas	Tiotepa
	Derivado de metilhidrazina	Procarbazina ( <i>N</i> -metil-hidrazina, MIH)
	Alquilsulfonato	Busulfán

	Nitrosoureas	Carmustina, estreptozocina
	Triazenos	Dacarbazina, temozolomida
	Complejos de coordinación de platino	Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino
<b>Antimetabolitos</b>	Análogos del ácido fólico	Metotrexato, pemetrexed
	Análogos de la pirimidina	Fluorouracilo, capecitabina, citarabina, gemcitabina.
	Análogos de la purina e inhibidores relacionados	Mercaptopurina, pentostatina, cladribina, fludarabina.
<b>Productos naturales</b>	Alcaloides de la vinca	Vinblastina, vinorelbina, vincristina
	Taxanos	Paclitaxel, docetaxel
	Epipodofilotoxinas	Etopósido, tenipósido
	Camptotecinas	Topotecán, irinotecán
	Antibióticos	Dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina
	Antracenediona	Mitoxantrona, bleomicina, mitomicina
	Enzimas	L-asparaginasa
<b>Fármacos diversos</b>	Urea sustituida	Hidroxiurea
	Agentes de diferenciación	Tretinoína, trióxido de arsénico.
	Inhibidor de la protein- cinasa de tirosina	Imatinib, gefitinib, erlotinib
	Inhibidor de proteosoma	Bortezomib
	Modificadores de la respuesta biológica	Interferón-alfa, interleucina 2
	Anticuerpos	Anticuerpos monoclonales, rituximab
<b>Hormonas y antagonistas</b>	Supresores adrenocorticales	Mitotano, aminoglutetimida.
	Adrenocortico-esteroides	Prednisona
	Progestágenos	Caproato de hidroxiprogesterona, acetato de megestrol
	Estrógenos	Dietilelbestrol, etinilestradiol.
	Antiestrógenos	Tamoxifén, toremifén
	Inhibidores de aromatasa	Anastrozol, letrozol, exemestano
	Andrógenos	Propionato de testosterona, fluoximesterona
	Antiandrógenos	Flutamida
	Análogo de la hormona liberadora de gonadotropina	Leuprolida

La mayoría de los agentes antineoplásicos que se utilizan actualmente parecen ejercer su efecto principalmente sobre la multiplicación celular y sobre el crecimiento del tumor. Pero uno de los aspectos negativos de estos fármacos es que además de actuar sobre las células cancerosas actúan también sobre las células normales, particularmente sobre las que tienen un recambio rápido (células de la medula 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).

## **2.2. Citotoxicidad**

Desde hace varias décadas el uso de cultivos de células tumorales han permitido evaluar una gran cantidad de sustancias con propiedades citotóxicas, es así que los antineoplásicos que hoy en día están disponibles para el tratamiento farmacológico en la fase inicial de su desarrollo han demostrado un efecto citotóxico en varias líneas tumorales, para posteriormente pasar a los modelos animales y finalmente ser evaluados en humanos, de tal manera, que se pueda predecir las dosis citotóxicas a las cuales aparecerán consecuencias adversas derivadas del tratamiento en estudios con cultivos celulares (Pauwels *et al.*, 2003).

La citotoxicidad celular se ve reflejada en la alteración o cambio en el metabolismo de la célula por algún tipo de sustancia, demostrando de esta manera el límite de toxicidad o la acción citotóxica que ésta induce (Freshney, 2000). Debido a estas razones se han introducido líneas celulares especializadas, cultivos organotípicos y el continuo uso de células, tratando de medir la complejidad del daño. En el caso específico de los agentes anticancerígenos los cuales deben inducir citotoxicidad, se puede evaluar sustancias que requirieran de un análisis más complejo, como pequeños cambios metabólicos, alteración de la señalización intercelular o una respuesta inflamatoria o alérgica (Yanagisawa *et al.*, 1998).

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, 2000).

Algunas de las ventajas que presentan los ensayos de citotoxicidad "*in vitro*" son las condiciones de ensayo y economía (bajo costo). Un buen sistema de ensayo "*in vitro*" tiene que ser capaz de detectar el proceso tóxico que induce un agente, y que sea reproducible, por lo que una de las ventajas que presentan las líneas

celulares establecidas, es la utilización de las poblaciones homogéneas con potencial para propagaciones continuas (Riva y López, 1994).

Por otro lado los ensayos de citotoxicidad "*in vitro*" tienen algunas limitaciones como:

- Es complicado recrear la farmacocinética de un fármaco mediante exposición "*in vitro*", ya que entre experimentos "*in vitro*" e "*in vivo*" existen diferencias significativas que tienen que ver con el tiempo de exposición y la concentración de la droga, la tasa de cambio de la concentración, el metabolismo, la penetración en los tejidos y la excreción.
- Muchas sustancias que no son tóxicas se vuelven tóxicas después de ser metabolizadas por el hígado y, además, muchas sustancias que son tóxicas "*in vitro*" pueden ser desintoxicadas por las enzimas hepáticas. Por esta razón muchos estudios de citotoxicidad se hacen con cultivos de hepatocitos que simulan un ambiente "*in vivo*" (Frazier, 1992).
- *In vitro* no se puede medir eficazmente una respuesta de los tejidos (una reacción inflamatoria, fibrosis, insuficiencia renal) o una respuesta sistémica (fiebre, dilatación vascular). Para que las pruebas "*in vitro*" sean más eficaces, deben construirse modelos como la utilización de cultivos organotípicos convocados desde diferentes tipos de células y mantiene en el entorno hormonal apropiado.

### 2.2.1. Tipos de Ensayos de Citotoxicidad

La elección de uno u otro ensayo de citotoxicidad dependen del tipo de agente a estudiar, de la naturaleza de la respuesta y de la célula diana en particular. Dichos ensayos pueden ser clasificados dentro de los siguientes tipos (Freshney, 2000):

- **Viabilidad:** miden una respuesta inmediata o a corto plazo, como una alteración en la permeabilidad de la membrana o una perturbación de una vía metabólica en particular relacionada con la proliferación celular o la supervivencia. Los ensayos de viabilidad se utilizan para medir el



porcentaje de células viables luego de un procedimiento traumático, como la desagregación, la separación celular o el crio-almacenamiento.

La mayoría de las pruebas de viabilidad se basan en la ruptura de la integridad de membrana, medida por la absorción de un colorante para el cual la célula normalmente es impermeable (por ejemplo, azul de tripano o eritrosina) o por la emisión de un colorante que es tomado y retenido por las células viables (por ejemplo, diacetato de fluoresceína o rojo neutro).

- **Supervivencia:** ensayos que miden la retención a largo plazo de la capacidad de auto-renovación (5-10 generaciones o más). Por ejemplo el ensayo de eficiencia en placa.
- **Metabólicos:** son ensayos de duración intermedia que puede medir respuestas metabólicas (por ejemplo, la actividad deshidrogenasa, síntesis de DNA, RNA, o proteínas) en el momento de la exposición o poco después; o medir el mismo parámetro dos o tres duplicaciones poblacionales después de la exposición cuando se quiere reflejar mejor el potencial de crecimiento celular y la supervivencia.

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

- **Transformación:** miden la supervivencia en un estado alterado (por ejemplo, una mutación genética, alteraciones en el crecimiento o una transformación maligna).
- **Irritabilidad:** miden respuestas similares a la inflamación, alergia o irritación "*in vivo*"; aunque son difíciles de efectuar "*in vitro*", es posible hacer mediante la monitorización de liberación de citoquinas en cultivos organotípicos.

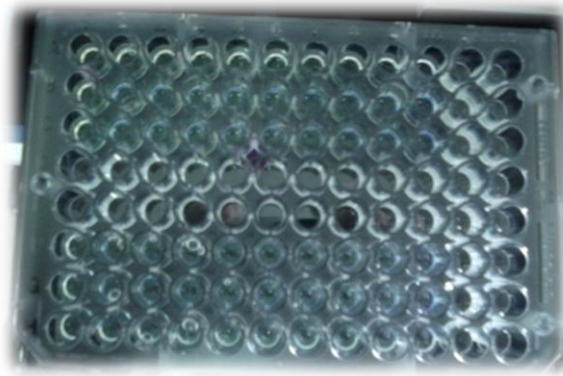
### **2.2.2. Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría**

El Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría (FMCA, por sus siglas en inglés) pertenece a un grupo de ensayos no clonogénicos basado en microcultivo, que mide el total de la densidad celular de las células vivas, después de un tiempo de incubación corto (2-4 días). Las aplicaciones del FMCA son comparables a las de los ensayos comúnmente utilizados como el MTT, ensayo colorimétrico. Los dos ensayos tienen diferentes criterios de valoración: el ensayo de MTT mide el metabolismo celular, mientras que el FMCA mide la actividad esterasa de células con membranas plasmáticas intactas mediante la medición de la fluorescencia generada cuando la sonda no fluorescente, la fluoresceína diacetato (FDA), es hidrolizada (Csoka *et al.*, 2002).

Los ensayos han demostrado que dan resultados similares, pero la detección por fluorescencia hace que el FMCA sea un ensayo más sensible. Además, la preparación de multiplatos con medicamentos junto con un procedimiento de tinción, sin disolventes orgánicos son características que hacen al FMCA más fácil de trabajar (Lindhagen *et al.*, 2008).

El FMCA ha estado en uso desde finales de 1980 y varias publicaciones han indicado sus beneficios en el desarrollo de medicamentos, utilizando tanto las líneas celulares cancerosas, como las células recién preparadas de tumores de pacientes (Larsson *et al.*, 1990). Hasta la fecha, el FMCA se ha utilizado principalmente en células cancerosas, pero también puede utilizarse para el análisis de células tumorales no malignas.

El protocolo incluye la preparación de multiplatos experimentales usando pequeños volúmenes de solución con el agente de prueba en cada pocillo y, normalmente, por duplicado o triplicado para cada concentración. Los agentes o fármacos que contienen las placas se pueden congelar para posteriormente ser aplicada a las células después de la descongelación. Los inconvenientes de este procedimiento son la intolerancia potencial del fármaco a la congelación y las precipitaciones de los fármacos con baja solubilidad (Lindhagen *et al.*, 2008).



**Fotografía 1.** Multiplato de 96 pocillos teñido con FDA, para ser leído en el fluorómetro

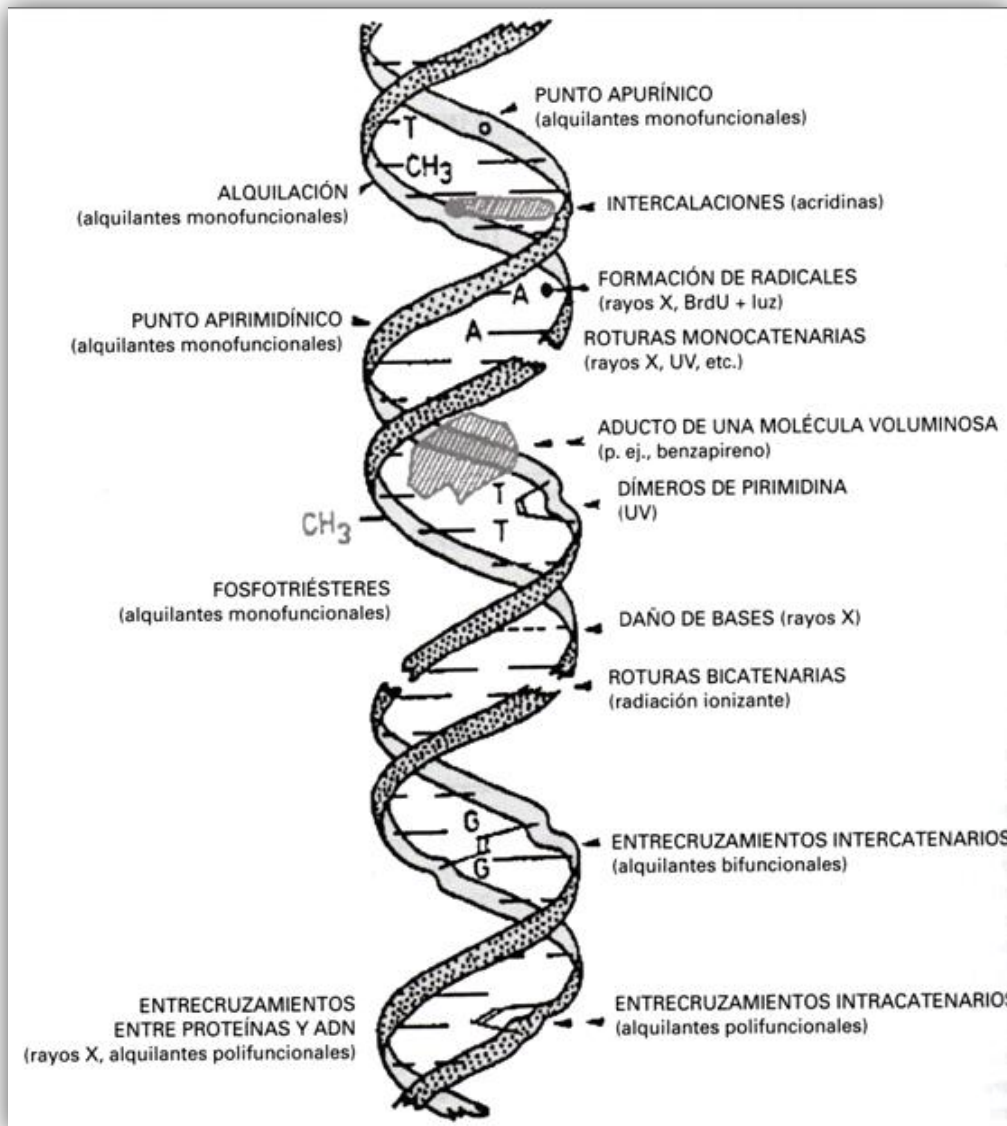
**Fuente.** Autor.

### **2.3. Genotoxicidad**

La toxicología genética estudia los efectos tóxicos que ejercen los agentes químicos, físicos y biológicos sobre el ADN y los procesos genéticos de las células y organismos vivos (Klaassen y Watkins, 2005). Un compuesto es considerado genotóxico si tiene afinidad para interactuar con el ADN e inducir daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas a un bajo grado de toxicidad (Martínez *et al.*, 2005).

Los efectos genotóxicos de un mutágeno potencial dependen de su blanco celular. Todas las sustancias genotóxicas no son activas por sí mismas, algunas de éstas deben convertirse en intermediarios reactivos capaces de interactuar con los sitios nucleofílicos de los constituyentes celulares y otras macromoléculas, valiéndose para ello de reacciones de activación, catalizadas por sistemas enzimáticos celulares; éstos compuestos son denominados genotóxicos indirectos, mientras que los genotóxicos directos poseen propiedades intrínsecas necesarias para interactuar con blancos celulares críticos e iniciar procesos genotóxicos (Mauteca *et al.*, 2006; Arencibia y Rosario, 2003).

El daño causado por los agentes genotóxicos pueden oxidar, reducir o fragmentar a las bases nitrogenadas formando fotoproductos, dímeros, aductos o inducir la formación de sitios básicos; romper las cadenas del ADN, formar uniones intra e intercatenarias de ADN/ADN ó de ADN/proteínas (Figura 2) (Sancar *et al.*, 2004, Gillet y Schärer, 2006).



**Figura 2.** Espectro del daño del ADN provocado por agentes químicos y físicos.

**Fuente:** Klaassen y Watkins, 2005

Los cambios en el ADN inducen diversas respuestas que activan a la célula para eliminar o soportar el daño o desencadenan un proceso de muerte celular programada con el que presumiblemente se eliminan las células con mutaciones potencialmente catastróficas. Las reacciones de respuesta al daño en el ADN incluyen:

- a. restauración de la continuidad de la cadena doble de ADN por conjuntos de enzimas que reconocen y anulan el daño.
- b. activación de un punto de control del ADN dañado, con detención de la progresión del ciclo celular para permitir la reparación y prevenir la transmisión de cromosomas dañados o incompletamente replicados.

- c. respuesta transcripcional, la cual causa cambios en el perfil de la transcripción que pueden ser benéficos a la célula.
- d. apoptosis, con la que se elimina a las células excesivamente dañadas o seriamente desreguladas.

Los mecanismos de reparación del ADN incluyen inversión directa del daño, reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos, reparación por apareamiento desigual (“mismatch”), reparación de uniones cruzadas y reparación de rupturas de cadena doble (Sancar *et al.*, 2004).

El objetivo primordial de realizar estudios de genotoxicidad de diversos agentes es el análisis de su posible acción como mutágeno, mediante pruebas biológicas que pongan en evidencia ese modo de actuar. Por medio de éstas se puede comprobar si una alteración particular en el ADN se traduce en mutación. Los estudios de las modificaciones producidas directamente en esta molécula nos permiten estimar a corto plazo qué podría ocurrir cuando un compuesto dado llegue a tener acceso a ella “*in vivo*” o bien “*in vitro*”, elucidando así los mecanismos más probables implicados en el proceso mutagénico (Mudry y Carballo, 2006).

Para la detección de daño genético se hace uso de los biomarcadores que son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o indicador de la exposición a un agente tóxico; evalúan la magnitud de respuesta del organismo frente al mismo y más o menos cuantifican específicamente la exposición, el efecto biológico temprano y la susceptibilidad (Garte y Bonassi 2005, Moller, 2006).

La importancia del estudio de biomarcadores es su utilidad al indicar el daño provocado por algún agente tóxico, las probables consecuencias de la exposición y el riesgo de adquirir enfermedades producto de la misma, con lo que se generan elementos para fundamentar decisiones de intervención a nivel individual e incluso ambiental y cuyo alcance puede involucrar a distintas esferas de la sociedad. En este sentido, se clasifican en:

- **Biomarcadores de exposición:** miden la concentración del xenobiótico o de sus metabolitos en los fluidos biológicos tales como: orina y sangre y tejidos como pelo, uñas entre otros o el químico unido a macromoléculas como el ADN y proteínas (Albertini *et al.*, 2000).

- **Biomarcadores de efecto:** determinan los cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos o moleculares que ocurren en las células o en los tejidos, entre los más frecuentes encontramos: aberraciones cromosómicas, frecuencia de micronúcleos, etc.; detectan un estado de carcinogénesis que es posterior del detectado por los biomarcadores de exposición (Moller, 2006).
- **Biomarcadores de susceptibilidad:** detectan genotipos responsables de variación interindividual que determinan las diferencias en la habilidad de los individuos para activar o desintoxicar agentes genotóxicos (Albertini *et al.*, 2000, Moller, 2006, Heuser *et al.* 2007).

Las lesiones en el material genético pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer, detener problemas reproductivos y otras afecciones, de ahí que el uso de biomarcadores es útil para detectar el daño genotóxico (Castro *et al.*, 2004).

La adecuada determinación de la actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos. El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permitan evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Estos ensayos de genotoxicidad acorto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones inducidas por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente (Arencibia y Rosario, 2003).

Los principales ensayos para valorar el daño en el material genético son:

- a. **Pruebas de daño y reparación del ADN:** detección directa y pruebas bacterianas para el daño del ADN, pruebas para el daño reparable del ADN en células de mamíferos.
- b. **Pruebas de mutación de genes en procariontes:** pruebas bacterianas de mutación inversa y de mutación anterógrada.
- c. **Pruebas en eucariotas no mamíferos:** pruebas en hongos para mutaciones de genes, para aneuploidía y de recombinación inducida en hongos, pruebas en plantas y en *Drosophila*.
- d. **Pruebas de mutaciones de genes en mamíferos:** pruebas "*in vitro*" para las mutaciones anterógradas, pruebas *in vivo* para las mutaciones de genes en células somáticas y pruebas transgénicas.

- e. **Pruebas citogenéticas en mamíferos:** aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y aneuploidía en células mitóticas.
- f. **Mutagénesis en células germinales:** medición del daño del ADN, mutación de genes, aberraciones cromosómicas, mutaciones letales dominantes y aneuploidía (Klaassen y Watkins, 2005).

### **2.3.1. Ensayo Cometa Alcalino**

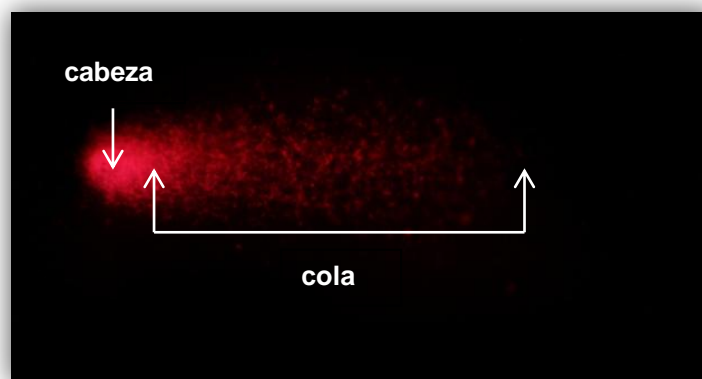
El ensayo de electroforesis alcalina en gel de célula única o ensayo cometa es un método para detección de daño genotóxico a partir de la migración del ADN alterado por los agentes genotóxicos. Es considerado un biomarcador de exposición debido a que el efecto detectado puede ser reparable aunque se están haciendo esfuerzos para desarrollarla como una herramienta para medir riesgo, es decir como biomarcador de efecto (Moller, 2006, Heuser *et al.*, 2007).

Es un método relativamente simple en su desarrollo y económico en el uso de materiales con respecto a otras técnicas (Rojas *et al.*, 1999), se le considera de alta sensibilidad para detectar daño al ADN a nivel de células individuales (Mañas *et al.*, 2006).

Su realización es rápida, requiere pequeñas muestras de células que pueden ser obtenidas de diversos tejidos por procedimientos no invasivos, es posible aplicarla a una variedad muy amplia de organismos y de tipos celulares para estudios "*in vivo*" o "*in vitro*". Las células pueden ser proliferantes o no proliferantes, somáticas o reproductoras (Rojas *et al.*, 1999, Speit *et al.*, 2008). Se ha aplicado en distintas especies tanto vegetales como animales (Avishai *et al.*, 2003, Olive y Banáth, 2006).

El ensayo cometa alcalino consiste en obtener una suspensión de células que son embebidas en agarosa sobre un portaobjetos esmerilado y lisadas por detergentes y una alta concentración de sales con lo que el contenido celular es removido originándose "nucleoides", en los que el ADN liberado permanece altamente enrollado. Posteriormente los portaobjetos son tratados en condiciones alcalinas, lo que permite que el ADN se desenrede desde los sitios de ruptura de las cadenas y en la electroforesis a pH alto los fragmentos de ADN, inducidos por los agentes genotóxicos, migren al ánodo de la cámara.

Subsecuentemente los portaobjetos son lavados con una solución neutralizante y teñidos con un colorante fluorescente (como el bromuro de etidio) que se une al ADN. Al visualizar bajo un microscopio de fluorescencia, las células que presentan daño en el material genético dan la apariencia de un cometa (fotografía 2) con una cabeza fluorescente brillante y una cola cuyo largo e intensidad de fluorescencia está relacionada con la cantidad de rupturas inducidas en el ADN por los agentes genotóxicos. Las colas consisten de una serie de fragmentos retenidos por una estructura altamente ordenada. Estos probablemente permanecen conectados por regiones de cadena sencilla. Las células no dañadas aparecen como núcleos intactos sin colas (Collins *et al.*, 1993, McKelvey *et al.*, 1993, Rojas *et al.*, 1999, Faust *et al.*, 2004).



**Fotografía 2.** Cometa teñido con Bromuro de etidio, donde se observa su cabeza y cola. **Fuente.** Autor.

Con este ensayo es posible detectar un amplio espectro de lesiones primarias al ADN tales como rupturas de cadena sencilla, rupturas de cadena doble, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN/proteína, bases dañadas por oxidación, sitios alcalino lábiles y sitios de reparación de ADN retardada o incompleta. Ha sido también empleado para visualizar degradación de ADN debido a necrosis y apoptosis (Singh, 2000, Hartman *et al.*, 2001, Rundell *et al.*, 2003, Speit *et al.*, 2008, Collins *et al.*, 2008), la detección de diferencias intercelulares en daño y reparación de ADN en virtualmente cualquier población de células eucariontes, así como también identifica sub-poblaciones resistentes o sensibles a agentes dañinos para el ADN cuando se observan resultados diferenciales en una población homogénea o heterogénea de células del mismo tejido (McKelvey *et al.*, 1993, Rojas *et al.*, 1999, Albertini *et al.*, 2000).



La evaluación del daño puede hacerse de forma visual o computarizada y hay muchas formas para reportar efecto en el ADN por el ensayo cometa: nivel de daño en frecuencia de células con cometa o categorizado en escala por gradiente, longitud de la cola, porcentaje de ADN en la cola y momento de la cola, se encuentran entre los más utilizados (Ashby *et al.*, 1995, Angelis *et al.*, 1999, Rojas *et al.*, 1999, Albertini *et al.*, 2000, Faust *et al.*, 2004). Actualmente se está proponiendo cuantificar el número de lesiones por célula (Moller, 2006).

Algunos factores pueden afectar la sensibilidad del ensayo, entre ellos están: la edad, dieta, ejercicio, sexo, contaminación ambiental, infecciones (bacterianas, parasitarias y virales), hábito de fumar y la exposición al sol (Moller, 2006). El estado del ciclo celular puede ser un nivel adicional de complejidad, ya que la estructura de la cromatina afecta el rol de ADN durante la formación de la cola del cometa y los cambios de estructura de la cromatina dependen de la fase del ciclo celular (Rojas *et al.*, 1999).

El ensayo cometa ha sido usado en biomonitorio humano ambiental y ocupacional, en estudios sobre genotoxicidad por exposición a agentes potencialmente mutagénicos, a nivel clínico (en pacientes con cataratas, cánceres, diabetes), efecto del estilo de vida, en la interacción entre dieta y consumo de antioxidantes sobre la carcinogénesis, análisis de alimentos irradiados en ecotoxicología, biología de la radiación, genotoxicidad ambiental y toxicología genética (McKelvey *et al.*, 1993, Rojas *et al.*, 1999, Avishai *et al.*, 2003, Wasson *et al.*, 2008). Además para la determinación de la capacidad genotóxica de productos obtenidos a partir de especies vegetales, el ensayo cometa es uno de los métodos de mayor elección para garantizar la obtención de nuevos fármacos seguros para uso humano (Brugés y Reguero, 2007).

#### **2.4. Antineoplásicos de Origen Natural**

La OMS estima que cerca del 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para recibir atención primaria de salud. En muchos países desarrollados, del 70% al 80% de la población ha recurrido alguna vez a una u otra forma de medicina alternativa o complementaria. Los tratamientos herbarios, que son la forma más popular de medicina tradicional, resultan muy lucrativos en el mercado internacional. En 2003-2004 generaron unos ingresos anuales de US\$

5000 millones. En Brasil, los ingresos generados por la medicina herbaria ascendieron a US\$ 160 millones en 2007 (OMS, 2010).

El uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la medicina tradicional y la medicina complementaria en todo el mundo. Las plantas medicinales se obtienen mediante la recolección de variedades silvestres o el cultivo de variedades domesticadas. Muchas comunidades dependen de los productos naturales recolectados en los ecosistemas para fines medicinales y culturales, además de alimentarios.

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).

El aislamiento de compuestos anticancerosos de origen natural se ha efectuado a partir de diferentes estrategias: una de ellas es aquella que toma encuenta los antecedentes etnomédicos de las especies bajo estudio; otra es el tamizaje; inclusive por medio de la evaluación directa de estructuras novedosas. (Parra *et al.*, 2005).

Entre los agentes anticancerígenos provenientes de plantas están los alcaloides de la Vinca, epipodofitoxinas, taxanos y derivados de la campotecina, los cuales contribuyen en la quimioterapia del cáncer (Balunas *et al.*, 2006; Kinghorn *et al.*, 2003). Otros compuestos con importancia clínica son la camptotecina y sus derivados, el irinotecano y el topotecano; así como la homoharringtonina, laelipticina y su derivado, el eliptinium. Este último empleado en Francia para el tratamiento del cáncer de mama (Newman *et al.*, 2003).

Sin duda, 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 *et al.*, 2006).

#### **2.4.1. Estudio de triterpenos como agentes anticancerosos**

Los triterpenos constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios, son compuestos de 30 carbonos procedentes del escualeno (Bruneton, 2001; Parra *et al.*, 2005). Los triterpenos son compuestos químicos que atraen mucha atención debido a sus actividades biológicas. Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal formando parte de los diferentes órganos de la planta (frutos, raíces, látex, semillas, hojas y partes aéreas en general) (Martín *et al.*, 2009).

Hasta la fecha, se han descrito más de 100 triterpenos con actividad citotóxica. Algunos de éstos son los del tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las quinonas metilúricas (Setzer y Setzer, 2003). También 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 proapoptóticos (Parra *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 2008).

Entre los triterpenos menos estudiados, podemos citar a los cicloartanos. Este tipo de compuestos han sido referidos como citotóxicos en estudios de cernimiento, donde se demostró que también poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (Parra *et al.*, 2006).

Sin duda, los hallazgos anteriormente descritos para algunos triterpenos hacen que este tipo de compuestos junto con otros metabolitos secundarios, se consideren como promisorios para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos (Parra *et al.*, 2005).

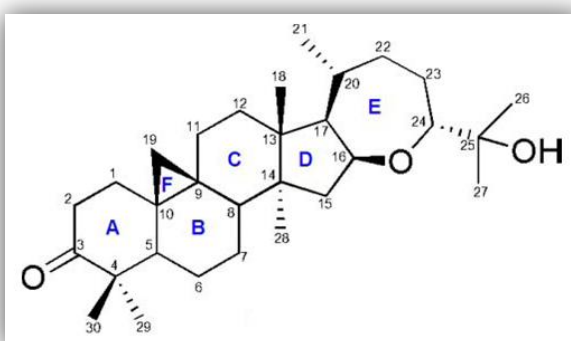
#### **2.4.2. Argentatina B**

La Argentatina B es un triterpeno de tipo cicloartano, aislada de la resina de *Parthenium argentatum* Gray, (Fotografía 3), un pequeño arbusto productor de hule natural, nativo del norte de México y del sur de Estados Unidos, que ha demostrado ser una fuente rica de compuestos biológicamente activos, entre los que se encuentran algunos triterpenos (Parra *et al.*, 2005).



**Fotografía 3.** Arbusto de *Parthenium argentatum* Gray. **Fuente.** Parra. 2006

La Argentatina B (fig. 3), cuyo nombre IUPAC es (16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, demostró ser citotóxica en varias líneas celulares de cáncer humano, mientras que en los ensayos de genotoxicidad (Mn) en linfocitos humanos mostró un efecto no genotóxico (Parra *et al.*, 2005); sin embargo pruebas hechas en el mismo modelo biológico mediante el ensayo cometa mostraron un efecto genotóxico en linfocitos humanos (Ramírez, 2008).



**Figura 3.** Estructura molecular de la argentatina B.

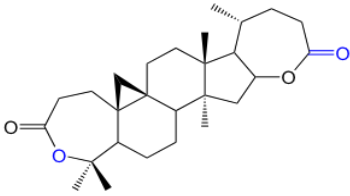
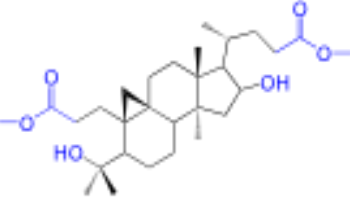
Estudios adicionales basados en la evaluación de la Cinética de Proliferación Celular (CPC) y el cálculo del Índice de División Nuclear (IDN), permitieron determinar que la Argentatina B puede ser considerado como un agente citostático. Es posible que la argentatina B impida la proliferación celular por medio de la inhibición de alguna fase del ciclo celular, ya que se sabe que la acteina, un triterpeno de tipo cicloartano semejante a la argentatina B, posee efectos citostáticos asociados a la inhibición de los niveles de ciclina D1, cdk4 y pRb en su forma hiperfosforilada, así como al incremento de los niveles de la proteína p21 cip1 que conllevan a una inhibición del ciclo celular (Saxe *et al.*, 2004).

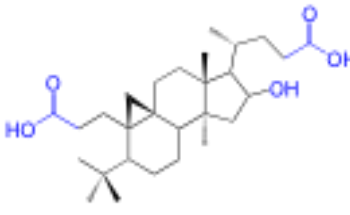
**2.4.3. Derivados de Argentatina B: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil).**

Mediante modificaciones químicas actualmente se han obtenido varios derivados de Argentatina B, algunos de ellos con mayor actividad citotóxica frente a células tumorales humanas. Las transformaciones químicas que mejoran la actividad citostática y/o citotóxica de algunos núcleos triterpénicos en las líneas celulares de cáncer, son la apertura del anillo A o la incorporación de grupos nitrilo, formilo, carboxilo; así como dobles ligaduras en dicho anillo, y la incorporación de grupos carbonilos  $\alpha$   $\beta$  insaturados en los anillos A y C (Parra *et al.*, 2006).

Uno de los principales problemas de los metabolitos secundarios y sus derivados es la solubilidad; nuevas investigaciones sobre la molécula de argentatina B han permitido desarrollar derivados más solubles, de los cuales tres de ellos se estudiaron en el presente proyecto de investigación (Tabla 4): (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil), de los que se desconoce su actividad sobre las líneas tumorales humanas así como su efecto genotóxico.

**Tabla 4.** Derivados de argentatina B estudiados en el presente trabajo.

Nombre trivial	Nombre IUPAC	Clave	Estructura
<b>Dilactona Arg B</b>	(16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona	Dilactona Arg B	
<b>Dilactona apertura metanol</b>	1a -(2-metoxicarbonietil) -2-(1-metil-1-hidroxietil)-4b, 7a - dimetil-7-(1-metil-3-metoxicarbonilpropil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a-dodecahidro-9H-ciclopenta[a]ciclopropa [e]-naftalen-6-ol.	Ap Dilac MeOH	

<p><b>Dilactona apertura agua</b></p>	<p>1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxi-2-etil)-4b,7a-dimetil-7-(1-metil-3-carboxil)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahidro-9H-ciclopenta[a]ciclopropa[e]-naftalen-6-ol</p>	<p>Ap Dilac H<sub>2</sub>O</p>	
---	---	------------------------------------	--

Fuente: Romero J.C. 2010

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Compuestos de estudio

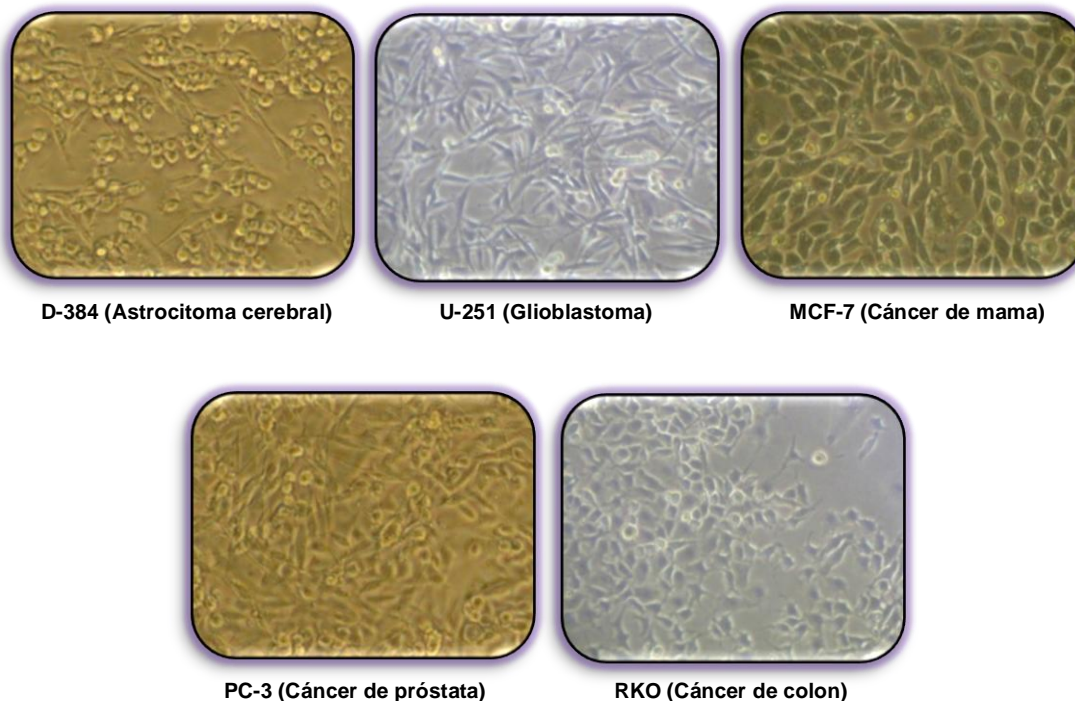
##### 3.1.1. Derivados de la Argentatina B

Los derivados de la argentatina B: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil) fueron donados por el Ing. Juan Carlos Romero del Instituto de Química Aplicada de la UTPL.

#### 3.2. Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría (FMCA)

##### 3.2.1. Modelo Biológico

En los ensayos se utilizó como modelo biológico un panel de 5 líneas celulares tumorales (Fotografía 2), que fueron **RKO** (cáncer de colon), **D-384** (astrocitoma cerebral), **U-251** (glioblastoma), **PC-3** (cáncer de próstata) y **MCF-7** (cáncer de mama); todas de procedencia humana donadas por la Dra. Patricia Ostrosky del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM.



**Fotografía 4.** Panel de líneas celulares tumorales. Microscopio invertido ZEISS (40X) **Fuente.**

Autor.

### 3.2.2. Condiciones de cultivo.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio base RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% (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% (MERCK). Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación a 37°C de Temperatura en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3. 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 Neubaüer 5 campos. Se calculó el número de células mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

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

### 3.2.4. Protocolo

Para la realización del ensayo FMCA se sembró en un multiplato de 96 pocillos 4 x 10<sup>3</sup> células/pocillo, a partir de cultivos en 80-90% de confluencia y se incubó durante 24 h, transcurrido este tiempo, se colocó nuevo medio con las concentraciones de derivados de Arg. B a probar (15, 25, 50, 75 y 100 µM), además se utilizó como control negativo etanol al 1% (EtOH 1%) y como control positivo Doxorubicina (DXO) 1 µM. Las células se incubaron por 48 h más. Pasado este tiempo se desechó el medio y sin despegar las células se realizó un lavado con Buffer fosfato salino (PBS) para eliminar restos celulares. Posteriormente se adicionó 100 µL de la solución FDA: PBS (0,8µL:120µL). Se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó en un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation) a una λ<sub>ex</sub>: 485 nm y λ<sub>em</sub>: 538 nm.

La viabilidad se cuantificó en función a la intensidad de fluorescencia relativa proporcional a la cantidad de células que sobreviven al tratamiento. Los valores



se normalizaron con las unidades de fluorescencia relativa de las condiciones control (100% de viabilidad) y a partir de este valor se obtuvo el porcentaje de células vivas en condiciones experimentales.

### **3.3. Ensayo de Viabilidad Celular y Ensayo Cometa**

#### **3.3.1. Modelo Biológico y Donantes**

Se usaron linfocitos extraídos a partir de sangre completa ya que tienen la ventaja de que, al conservar componentes del plasma, reflejan más fielmente la situación *in vivo*. Esto se debe a que los eritrocitos y demás componentes del plasma tienen un papel muy importante en la activación metabólica de los promutágenos y también en la degradación de potenciales agentes genotóxicos (Martínez, 2005).

Para la realización del ensayo de Viabilidad y Cometa se trabajó con sangre periférica heparinizada proveniente de tres donantes aparentemente sanos de edad comprendida entre 21 y 27 años, de sexo masculino, los mismos que cumplieron las siguientes condiciones: no se encontraban recibiendo tratamiento farmacológico alguno, ni cursando por algún cuadro sintomático durante el muestreo.

#### **3.3.2. Controles**

##### **3.3.2.1. Control positivo**

Se trabajó con etil metanosulfonato (EMS) a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$ , ya que es un poderoso agente alquilante monofuncional, el mismo que tiene afinidad por el ADN, cuyo mecanismo comienza con la donación de un grupo etilo que reacciona con los sitios nucleofílicos dentro del ADN. Su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad se ha observado en varios estudios toxicológicos y genotóxicos, y es por consiguiente un compuesto válido para usar en los estudios de esta naturaleza debido a sus efectos conocidos "*in vitro*" (Wyatt *et al.*, 2007).

### 3.3.2.2. Control negativo

Los compuestos a probar se disolvieron en etanol, a una concentración máxima de 0,1 % (v/v), la misma que fue utilizada como control negativo.

### 3.3.3. Protocolo del Ensayo de Viabilidad (FDA-EtBr)

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

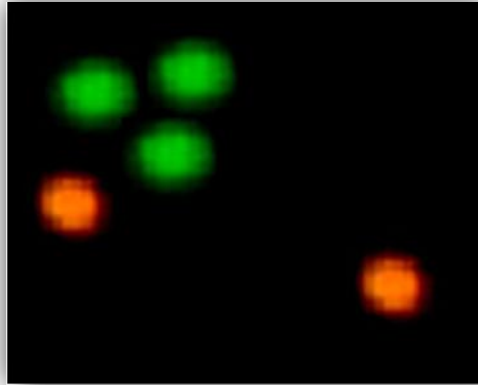
La siembra se realizó en microtubos eppendorf de 1,5 mL, donde se colocaron 930µL de medio RPMI (GIBCO) suplementado con antibiótico y antimicótico (GIBCO), L- glutamina (GIBCO) y aminoácidos no esenciales (GIBCO) al 1%; 71,4 µL de sangre heparinizada y el respectivo tratamiento (Ver tabla # 5), seguidamente se ajustaron los derivados de arg. B a una concentración de 0,1% de etanol y finalmente se incubó a una temperatura de 37°C y humedad atmosférica del 5 % de CO<sub>2</sub> durante 3 horas.

**Tabla 5.** Diseño de Tratamiento para Viabilidad y Ensayo Cometa. **Fuente:** Autor.

	Sustancias	Concentraciones
<b>Control Negativo</b>	Etanol	0.1 %
<b>Sustancias a Probar (Derivados de Arg. B)</b>	<i>(16S,17R,20S)-dilactona</i>	5, 15, 25 y 50 µM
	<i>1a-(carboxietil)</i>	
	<i>1a-(metoxicarboniletil)</i>	
<b>Control Positivo</b>	EMS (Etil metano sulfonato)	0.1 µM

Luego de las 3 horas de incubación se homogenizaron los tubos y fueron centrifugados dos veces durante 2 min. a 10000 rpm. Del pellet obtenido se tomó 20 µL y se los mezcló con 20µL de solución FDA-EtBr (FDA 5mg/mL; EtBr 1mg/5mL), se colocó la mezcla en una placa portaobjetos y se la observó en un microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con el fin de

determinar el porcentaje de células viables. Se contaron un total de 200 células entre vivas y muertas (vivas de color verde y muertas de color rojo), (Fotografía 5).



**Fotografía 5.** Fotografía del ensayo de viabilidad. Microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) (40X). **Fuente.** Autor

#### **3.3.4. Protocolo del Ensayo Cometa**

La parte de siembra y aplicación del tratamiento es similar a la descrita para el protocolo de viabilidad (3.3.3). Pasadas las 3 horas de incubación se homogenizaron los tubos y fueron centrifugados dos veces durante 2 min a 10000 rpm. El pellet obtenido se mezcló con 150  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP 1%) y se colocó 75  $\mu$ L de esta mezcla en cada laminilla que contenían previamente agarosa de normal punto de fusión (NMP 1%), se las cubrió inmediatamente con cubre objetos. Se preparó 2 laminillas por cada microtubo de siembra. Después de preparar todas las laminillas se llevaron a refrigeración durante 5 min para fijar la agarosa. Luego se retiró el cubreobjetos de cada laminilla y se colocó 130  $\mu$ L de agarosa LMP, se cubrieron nuevamente y se refrigeró por 5 min adicionales.

Seguidamente se introdujo las laminillas en solución de lisis: 10% de DMSO (SIGMA); 1% de tritón X-100 (SIGMA); 2,5 M NaCl (MERCK); 100 mM EDTA (INVITROGEN); 10 mM Tris (INVITROGEN) y pH 10, por un tiempo mínimo de 1 hora y máximo de 15 días.

Antes de realizar la corrida electroforética se dejó reposar las laminillas por 20 min en el buffer de electroforesis pH >13 que contiene: 300 mM de Hidróxido

de Sodio (MERCK) y 1 mM EDTA (INVITROGEN), se tuvo precaución de que el buffer cubra completamente las laminillas.

Terminado este tiempo se realizó la corrida electroforética en forma horizontal, las condiciones usadas fueron: 25 V, 300 mA y 20 min.

Una vez terminada la corrida electroforética las laminillas fueron lavadas sucesivamente con el buffer de neutralización pH 7,5 (0,4 M Tris) para neutralizar los álcalis presentes. Se deshidrataron con metanol frío para su posterior análisis.

Para observar el daño al ADN producido por los compuestos probados, las laminillas fueron hidratadas con agua desionizada fría y teñidas con 60 µL de Bromuro de etidio (1,5 mg/ml). El parámetro analizado fue la migración del ADN (longitud de cola del cometa), se contabilizaron 25 cometas por cada laminilla en un microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con un ocular micrométrico y el objetivo 40x.

### **3.4. Análisis estadístico**

#### **3.4.1. Ensayo Citotoxicidad Celular por Fluorimetría (FMCA)**

Se realizaron tres ensayos por cuadruplicado por cada línea celular a las mismas condiciones. Los datos crudos resultantes de la lectura en el fluorómetro fueron transformados a porcentajes de viabilidad. Consecutivamente se analizaron estos valores utilizando el software estadístico GraphPad Prism 5, para obtener la  $IC_{50}$  mediante una regresión no lineal, entre el logaritmo de la concentración versus el porcentaje de viabilidad.

#### **3.4.2. Viabilidad Celular (FDA)**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de viabilidad se utilizó la prueba de comparación múltiple ANOVA y una prueba posterior de Dunnett, usando el software estadístico GraphPad Prisma 5.

### **3.4.3. Ensayo Cometa**

Se realizaron tres repeticiones por cada donante y cada una por duplicado. El análisis estadístico se lo realizó con el software GraphPad Prism 5. Utilizando el test de Kruskal-Wallis y post test de Dunns para evaluar el largo de cola de los cometas. Para realizar la comparación cualitativa de los derivados de argentatina B, estos se normalizaron con respecto al control de etanol, se estableció las regresiones lineales y se comparó las pendientes con el test de ANOVA de dos vías.

### 3.5. Esquema del Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría

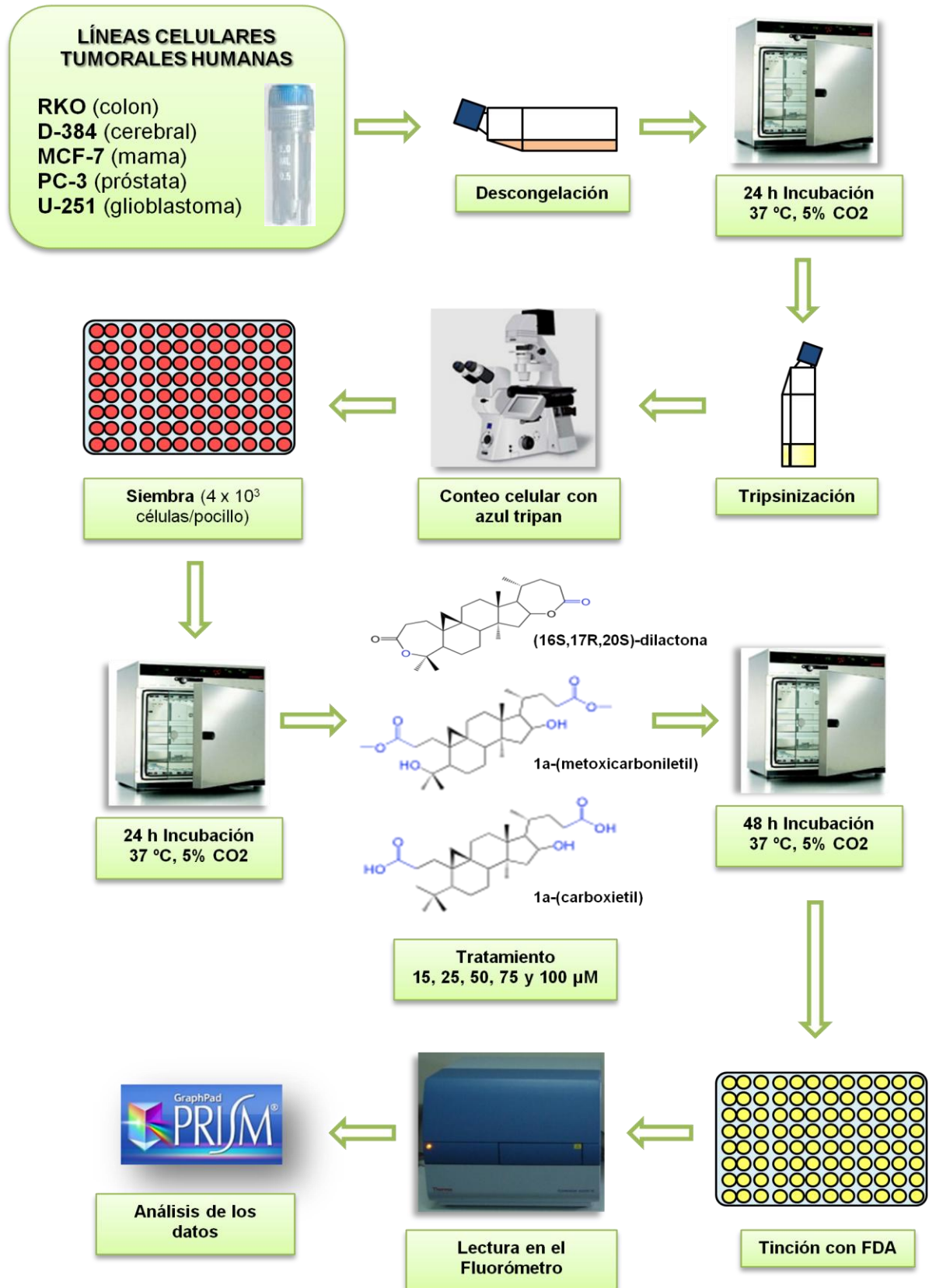


Figura 4. Esquema del FMCA. Fuente: Autor

### 3.6. Esquema del Ensayo Cometa y Viabilidad

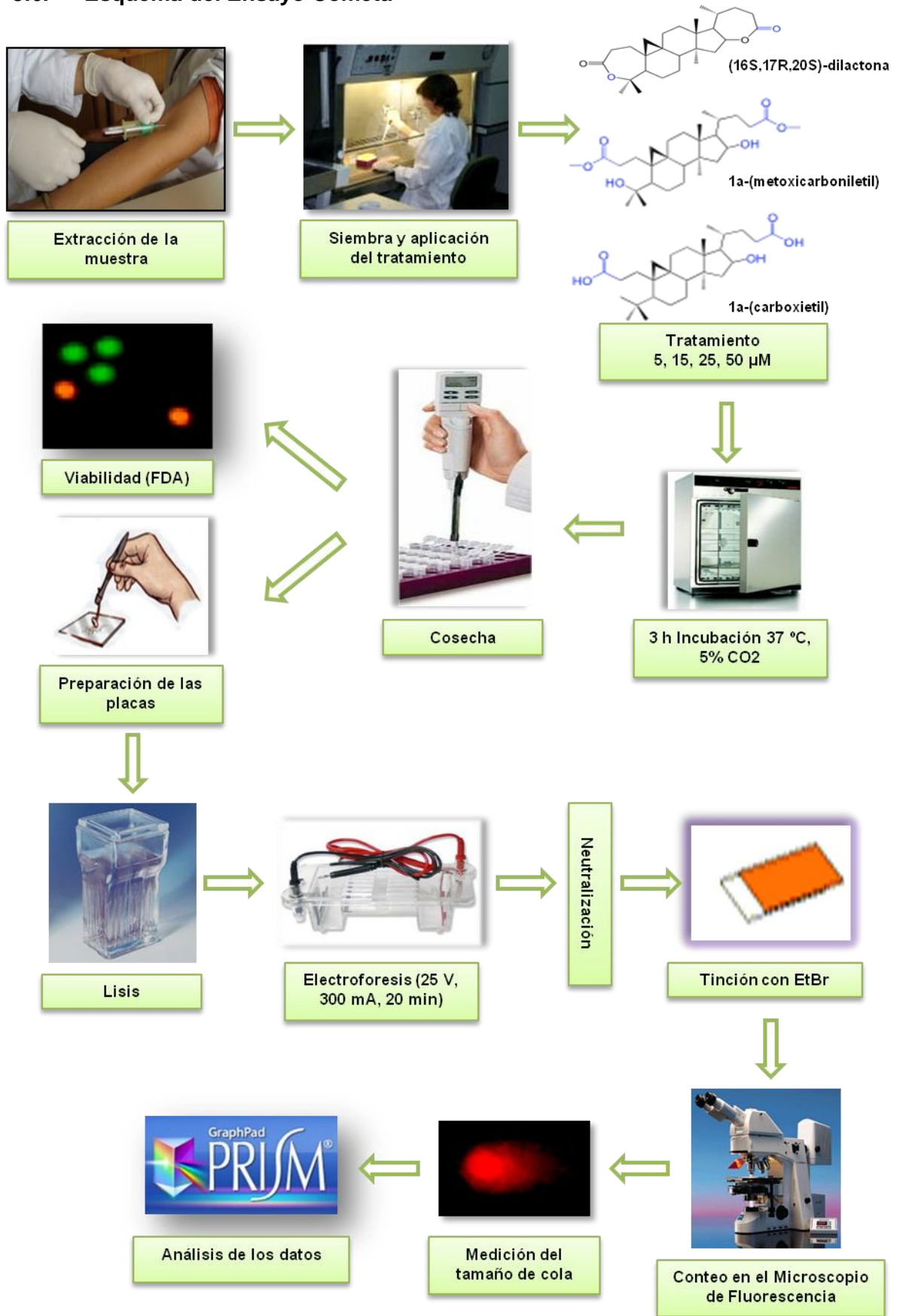


Figura 5. Esquema del Ensayo Cometa y Viabilidad. Fuente: Autor

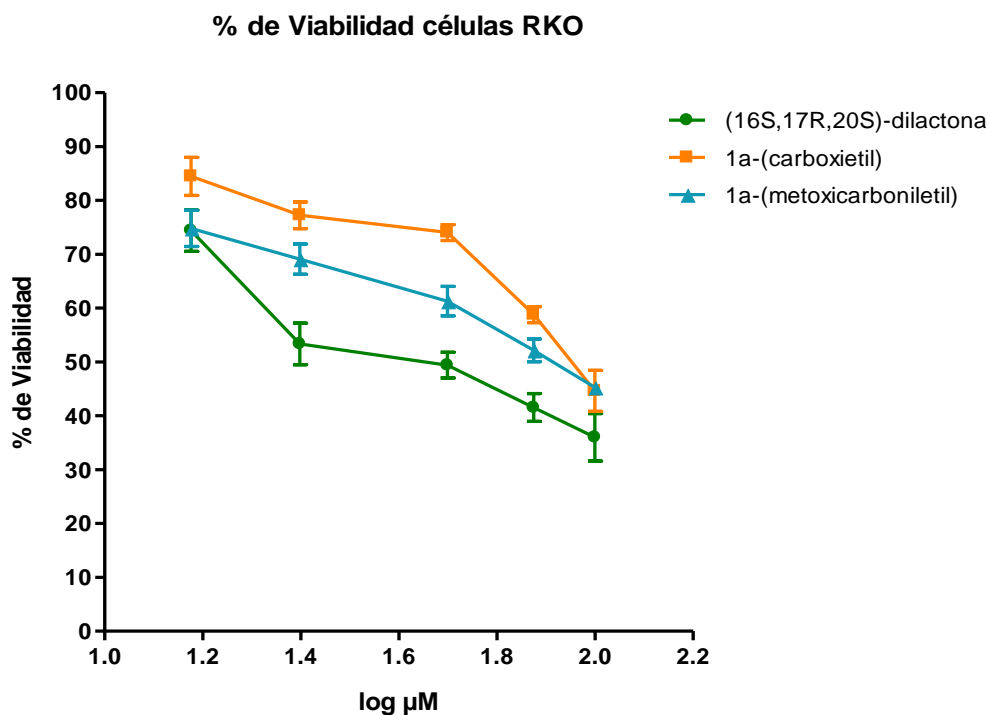
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Actividad citotóxica de (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil), en líneas celulares tumorales (RKO, D-384, MCF-7, PC-3 y U-251)

El tamizaje primario aplicado en las líneas celulares tumorales, fue cuantificado mediante el porcentaje de viabilidad resultante de la exposición por 48 h de los tres derivados de argentatina B: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil). Para ello se utilizó el ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría (FMCA).

#### 4.1.1. Determinación de la IC<sub>50</sub>

Para conocer la IC<sub>50</sub>, se expusieron las líneas tumorales a cinco concentraciones diferentes de: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ ); como ejemplo podemos observar en la gráfica 1 la curva de inhibición del crecimiento en la línea celular de carcinoma de colon (RKO).



**Gráfica 1.** Porcentaje de células vivas de RKO (cáncer de colon), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ ); en el eje de las X se muestra el logaritmo de la dosis en  $\mu\text{M}$ . Prueba de regresión no lineal.  $P < 0,0001$ .



El efecto que demostraron los tres derivados fue una actividad citotóxica dependiente de la concentración. La respuesta fue similar para todas las líneas celulares, cuyas curvas se muestran en el Anexo 1.

En la tabla 6 se muestra la actividad citotóxica de los tres derivados de argentatina B, para ello se calculó la IC<sub>50</sub> por cada experimento, el promedio de las tres repeticiones se muestran en la siguiente tabla. Los resultados demuestran que las moléculas presentan diferentes respuestas sobre las líneas celulares utilizadas.

**Tabla 6.** Actividad citotóxica de los derivados de argentatina B, expresada en función de la concentración Inhibitoria media.

Líneas celulares de cáncer humano	IC <sub>50</sub> (μM) ± EE		
	Compuestos de prueba		
	(16S,17R,20S)-dilactona	1a-(carboxietil)	1a - (metoxicarboniletil)
<b>RKO (Colon)</b>	44,95 ± 0,04	98,99 ± 0,04	84,13 ± 0,03
<b>D-384 (Cerebro)</b>	23,42 ± 0,05	>100	>100
<b>U-251 (Glía)</b>	82,38 ± 0,04	> 100	> 100
<b>MCF-7 (Mama)</b>	44,04 ± 0,07	> 100	90,00 ± 0,05
<b>PC-3 (Próstata)</b>	80,01 ± 0,02	> 100	> 100

Los resultados se muestran como la media ± EE de tres experimentos independientes por triplicado.

El compuesto más activo fue (16S,17R,20S)-dilactona, el cual presentó una IC<sub>50</sub> que oscilaba entre 23,42 y 82,38 μM, teniendo mayor efecto en la línea celular de astrocitoma cerebral D-384 y menor potencia en la línea U-251. Por otro lado, los compuestos 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) no presentaron mayor efecto sobre el modelo biológico utilizado, siendo su actividad similar en todas las líneas celulares, donde su IC<sub>50</sub> en la mayoría de los casos fue mayor a 100 μM.

#### **4.2. Actividad genotóxica de (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil), derivados de argentatina B.**

Previo a la ejecución del test de genotoxicidad es indispensable establecer el porcentaje de células viables, en nuestro estudio se utilizó el test de viabilidad

mediante el ensayo de doble tinción FDA-BrEt, la demostración de que el potencial citotóxico no está interviniendo en el efecto genotóxico es fundamental para cualquier estudio.

#### 4.2.1. Viabilidad de: (16S,17R,20S)-dilactona, 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil)

En la Tabla 7 se se detalla el porcentaje de viabilidad de los linfocitos expuestos por 3 horas a las dosis de 5, 15, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de los tres derivados de Arg. B, podemos observar que la viabilidad de todas las dosis probadas es mayor al 70% en todos los casos y no existen diferencias significativas entre los derivados. El análisis estadístico demuestra que a dosis de 15, 25 y 50  $\mu\text{M}$  existe diferencia significativa entre los derivados con respecto al control negativo con etanol. Así mismo se puede observar que conforme aumenta la dosis de las sustancias analizadas, la viabilidad disminuye paulatinamente.

**Tabla 7.** Porcentaje de viabilidad de los linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de los derivados de Arg B.

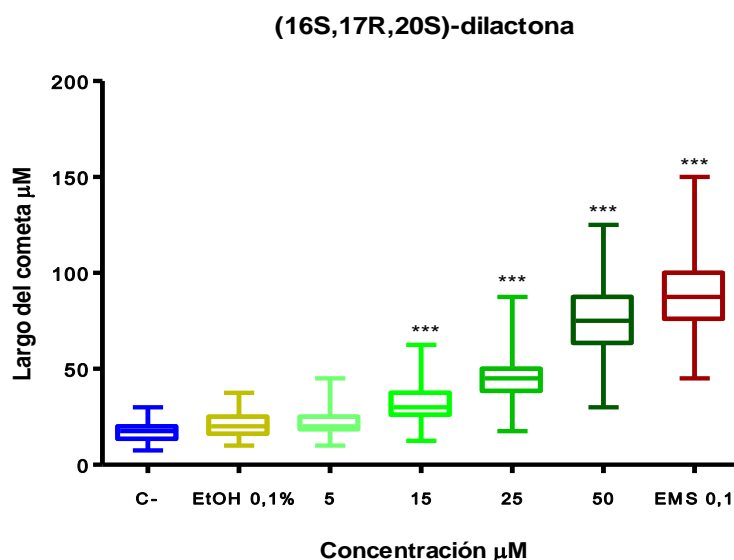
Compuesto	% de Viabilidad $\pm$ EE		
	(16S,17R,20S)-dilactona	1a-(carboxietil)	1a - (metoxicarboniletil)
C <sup>-</sup>	95,72 $\pm$ 1,01	95,72 $\pm$ 1,01	95,72 $\pm$ 1,01
C <sup>-</sup> (Etanol 0,1%)	95,03 $\pm$ 0,98	95,03 $\pm$ 0,98	95,03 $\pm$ 0,98
5 $\mu\text{M}$	94,86 $\pm$ 0,82	95,42 $\pm$ 0,50	95,25 $\pm$ 0,78
15 $\mu\text{M}$	92,94 $\pm$ 1,27 **	93,28 $\pm$ 1,18 ***	93,19 $\pm$ 0,73 **
25 $\mu\text{M}$	91,36 $\pm$ 1,36 ***	91,89 $\pm$ 1,35 ***	91,50 $\pm$ 0,83 ***
50 $\mu\text{M}$	88,97 $\pm$ 1,84 ***	90,36 $\pm$ 0,99 ***	90,11 $\pm$ 1,77 ***
EMS 0,1 $\mu\text{M}$	88,72 $\pm$ 1,36 ***	88,72 $\pm$ 1,36 ***	88,72 $\pm$ 1,36 ***

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes de tres donantes distintos, utilizando el test paramétrico ANOVA y post test de Dunnett. (\*\* P<0,001, \*\*\* P<0,0001) con respecto al control negativo con etanol.

#### 4.2.2. Largo de cola con (16S,17R,20S)-dilactona

En la gráfica 2 se observa que el derivado (16S,17R,20S)-dilactona presenta un efecto genotóxico, ya que a medida que aumentan las dosis analizadas se

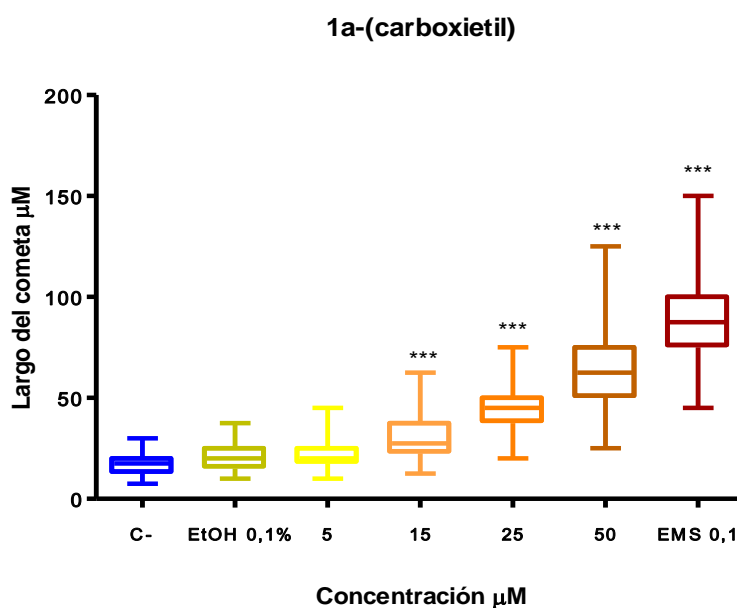
observa un incremento del largo de cola del cometa. El análisis estadístico mediante la Prueba de Kuskal-Wallis demuestra que a dosis de 15, 25 y 50  $\mu\text{M}$  existe diferencia significativa con respecto al control negativo con etanol.



**Gráfica 2.** Efecto genotóxico en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del derivado (16S, 17R, 20S)-dilactona. Prueba Kruskal-Wallis (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2.3. Largo de cola con 1a-(carboxietil)

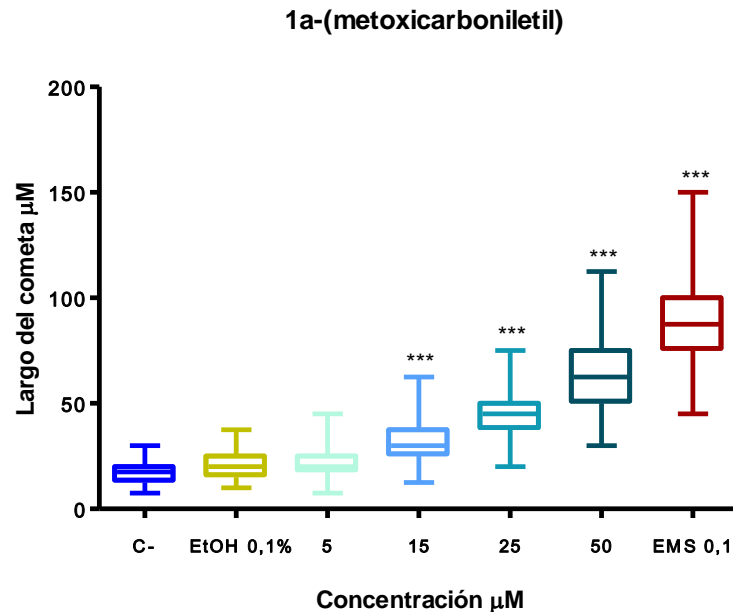
Las concentraciones probadas de 1a-(carboxietil) inducen daño genotóxico en linfocitos humanos como se indica la gráfica 3, ello expresado por el largo de cola de los cometas. El análisis estadístico demuestra que a dosis de 15, 25 y 50  $\mu\text{M}$  existe diferencia significativa con respecto al control negativo con etanol.



**Gráfica 3.** Efecto genotóxico en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del derivado 1a-(carboxietil). Prueba Kruskal-Wallis (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2.4. Largo de cola con 1a-(metoxicarboniletil)

La gráfica 4 indica la migración del ADN mostrándose una relación dosis – dependiente de la concentración del derivado 1a-(metoxicarboniletil). El análisis estadístico mediante la Prueba de Kuskal-Wallis demuestra que a partir de la dosis de 15  $\mu\text{M}$  existe diferencia significativa con respecto al control negativo con etanol.



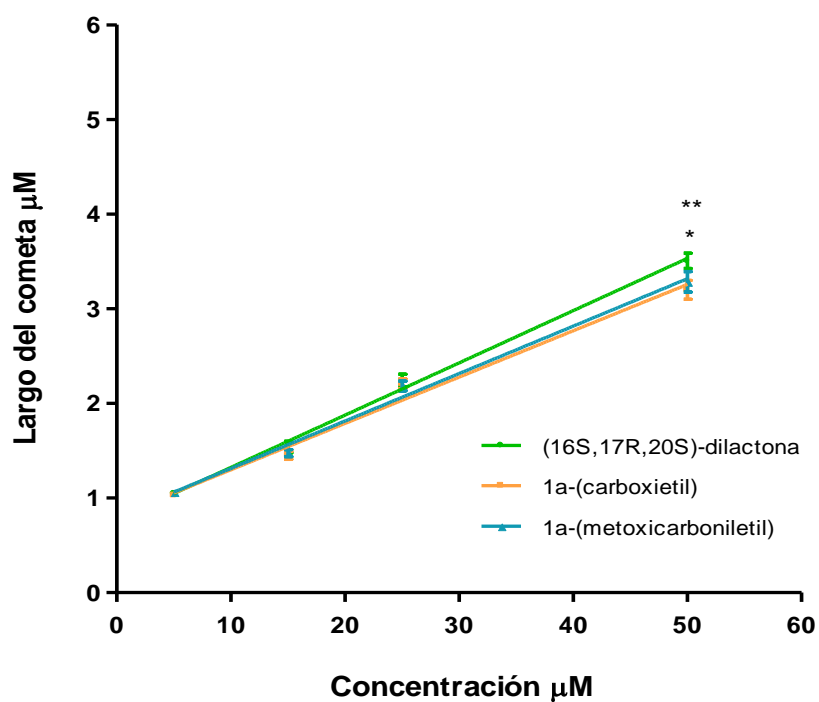
**Gráfica 4.** Efecto genotóxico en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del derivado 1a-(2-metoxicarboniletil). Prueba Kruskal-Wallis (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2.5. Comparación cualitativa de:(16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil), derivados de argentatina B.

En la gráfica 5 podemos observar la comparación de las pendientes de los tres derivados donde (16S,17R,20S)-dilactona es el más genotóxico. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo cometa, los 3 derivados de argentatina B producen daño genotóxico, sin embargo existen diferencias entre ellos, siendo de mayor a menor de la siguiente manera: (16S,17R,20S)-dilactona > 1a-(metoxicarboniletil) > 1a-(carboxietil).

A través del análisis estadístico ANOVA de dos vías, se observó que existen diferencias significativas en la dosis de 50  $\mu\text{M}$  entre (16S,17R,20S)-dilactona vs

1a-(metoxicarboniletil) \*P<0.05 y entre (16S,17R,20S)-dilactona vs 1a-(carboxietil) \*\*P<0,01.



**Gráfica 5.** Representación de pendientes de los derivados de argentinina B. ANOVA de dos vías. ((16S,17R,20S)-dilactona vs 1a-(carboxietil) \*\*P<0.01; (16S,17R,20S)-dilactona vs 1a-(metoxicarboniletil) \*P<0,05)

## 5. DISCUSIÓN

Hoy en día la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticancerígena es indispensable, es así que la mayoría de investigaciones sobre nuevos fármacos con potencial antineoplásico tienen como materia prima a la flora. En el reino vegetal han sido identificadas cerca de 250000 especies de plantas, de las cuales un 10% se consideran como medicinales (Abruzzo, 2000); en 2005, Cragg informó que cerca de 10000 especies de plantas usadas en etnomedicina se han comprobado que tienen propiedades anticancerígenas (Cragg *et al.*, 2005).

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 compuesto a probar, para conocer su potencial citotóxico o inhibidor en un modelo biológico. Seguidamente se deben implementar pruebas de genotoxicidad que permitan dilucidar si el compuesto en estudio tiene capacidad para interactuar con el ADN y pueda causar daño en esta molécula (Piloto *et al.*, 2000).

Uno de los principales problemas que presentan los fármacos obtenidos a partir de metabolitos secundarios extraídos de plantas es su toxicidad, en especial cuando son fármacos antineoplásicos en estos casos es necesario evaluar el daño que causan al ADN. Sin embargo una manera de mejorar la actividad biológica y de reducir la genotoxicidad es realizar cambios estructurales por medios químicos a las moléculas de interés. Es así como en investigaciones anteriores se obtuvieron varios derivados de la Argentatina B, un triterpeno aislado de la resina de *Parthenium argentatum* que demostró una alta actividad anti-proliferativa en varias líneas celulares tumorales humanas (Parra *et al.*, 2006); se sabe que las transformaciones químicas que parecen mejorar la actividad citostática y/o citotóxica de algunos núcleos triterpénicos en las líneas celulares de cáncer, son la apertura del anillo A o la incorporación de grupos nitrilo, formilo, carboxilo; así como dobles ligaduras en dicho anillo y; carbonilos  $\alpha\beta$  insaturados en los anillos A y C (Parra *et al.*, 2006).

Este estudio se enfocó en estudiar la actividad citotóxica y genotóxica que presentan tres derivados de argentatina B: (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletal), en líneas celulares tumorales (RKO, D-384, MCF-7, PC-3 y U-251) y linfocitos humanos.

En nuestro caso los tres derivados sufrieron transformaciones químicas a partir de su precursor (argentatina B), estas modificaciones fueron la adición de dos grupos lactona en los anillos A y E en el caso de (16S,17R,20S)-dilactona, la apertura de los anillos A y E con la incorporación de dos esteres de ácido carboxílico para 1a-(metoxicarboniletil) y la adición de dos grupos carboxilo por medio de aperturas de los anillos A y E en el caso de 1a-(carboxietil).

Por medio del Ensayo de Citotoxicidad Celular por Fluorometría se logro determinar la actividad citotóxica y la  $IC_{50}$  de los tres derivados de argentatina B (Tabla 6). El FMCA es una técnica rápida y de alta sensibilidad farmacológica para ensayos "in vitro". Además de ser una herramienta muy útil para el desarrollo de nuevas sustancias con actividad citotóxica (Larsson *et al.*, 1993; Nygren, 1994). Como se observa en la tabla 6 la mayoría de líneas celulares utilizadas fueron sensibles al tratamiento de 48 h con (16S,17R,20S)-dilactona, cabe mencionar que el derivado tuvo alta sensibilidad por la línea celular D-384 (astrocitoma cerebral) presentando una  $IC_{50}$  de 23.4  $\mu M$ . Por otro lado, el tratamiento con 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) no mostró ningún efecto considerable comparándolo con el derivado (16S,17R,20S)-dilactona.

La actividad citotóxica de los tres derivados fue similar a la de otros derivados de argentatina B estudiados por Parra (2006), quien evaluó la citotoxicidad de 14 derivados a través del modelo de SRB en 4 líneas celulares de cáncer humano HCT-15 (colon), K562 (leucemia), PC-3 (próstata) y U251 (SNC), se sabe que los derivados con mayor potencial fueron 2-Formil y 2 $\alpha$ -Ciano, los cuales presentaron valores promedio de  $IC_{50}$  de 1  $\mu M$  y 10  $\mu M$  respectivamente. Sin embargo también hubieron moléculas cuya  $IC_{50}$  fue mayor a 100  $\mu M$  tales como 2,3-d-Isoxazole-(16b,24R), (16S,17R,20S)-lactona y 25-O-Acetil-3-oxima que comparándolas con los derivados 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) presentaron una respuesta similar.

Poco se conoce acerca de los mecanismos de acción por los que los triterpenos ejercen sus efectos (Salminen *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios farmacológicos se limitan a informar el parámetro de potencia  $IC_{50}$  (concentración que inhibe el 50% de la proliferación celular) y a la comparación de los datos con aquellos previamente informados. Sin embargo podemos suponer que los derivados de Arg. B pueden ser considerados como agentes citostáticos, ya que si bien los resultados muestran un decremento de la viabilidad celular (gráfica 1), no se trata de una muerte celular debido a que al observar al microscopio las células con tratamiento no existían restos

celulares ni células flotando en el medio. Más bien la respuesta fue un efecto citostático similar a lo que ocurre con la molécula precursora (Parra *et al.*, 2006).

Por otro lado, es muy importante conocer los efectos que pueden producir los posibles fármacos antineoplásicos en estudio, y más aun si se trata de metabolitos secundarios extraídos de plantas o compuestos semisintéticos; ya que pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, dañándolo y provocando mutaciones que pueden dar origen a diferentes tipos de cáncer, alteraciones genéticas en la descendencia y efectos teratogénicos (Monroy *et al.*, 2005). Por esta razón los estudios genotóxicos de los antineoplásicos son importantes para evaluar el riesgo-beneficio de este tipo de fármacos (Vizoso *et al.*, 2000).

El enfoque de nuestro estudio a más de evaluar el potencial citotóxico de las tres moléculas, fue conocer su acción sobre el material genético, para ello se utilizó el ensayo cometa alcalino que se caracteriza por ser sensible, confiable, económico y rápido para detectar diversos daños en el ADN como: rupturas de cadena sencilla, rupturas de cadena doble, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN/proteína, bases dañadas por oxidación, sitios alcalino lábiles y sitios de reparación de ADN retardada o incompleta (Singh, 2000, Hartman *et al.*, 2001, Rundell *et al.*, 2003, Speit *et al.*, 2008, Collins *et al.*, 2008).

Sin embargo cabe mencionar que previo a realizar cualquier estudio de genotoxicidad se debe descartar cualquier alteración en la viabilidad del modelo biológico a utilizar, en nuestro caso se utilizó el test de viabilidad celular de doble tinción FDA-BrEt. Los resultados se describen en la tabla 7 y permitieron concluir que los compuestos en prueba no alteraron la viabilidad de los linfocitos humanos, de esta manera podemos estar seguros que el daño causado al ADN sea por un efecto inducido por los derivados de argentatina B, mas no por una muerte celular.

Los datos de las gráficas 2, 3 y 4 nos evidencian una respuesta genotóxica de los tres derivados de Arg B. con respecto al control negativo (etanol 0,1%), el control positivo con etil metano sulfonato (EMS) (0,1  $\mu$ M) nos permitió corroborar dicha respuesta ya que el EMS es un poderoso agente alquilante que tiene afinidad por el ADN. Además que su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad han sido observados en varios estudios toxicológicos y genotóxicos (Wyatt *et al.*, 2007).



Comparando la respuesta de cada uno de los derivados mediante un análisis de varianza de dos vías (gráfica 5) se pudo deducir que el efecto genotóxico que producían era diferente entre sí, llegando a la conclusión que el derivado (16S,17R,20S)-dilactona fue el de mayor genotoxicidad, seguido del derivado 1a-(metoxicarboniletil) y 1a-(carboxietil) como el que menos daño causó al ADN de los linfocitos humanos, cabe mencionar que entre estos dos últimos derivados no existió diferencia significativa. En estudios previos, la argentatina B mostró un efecto genotóxico a través del ensayo cometa (Ramírez, 2008). Investigaciones recientes han demostrado la genotoxicidad de cuatro derivados de argentatina B, resultando los derivados 2-formil y 2 $\alpha$ -ciano los que presentaron mayor efecto genotóxico, mientras que los derivados 25-O-Acetil y 3-oxima no presentaron un efecto considerable (Bautista 2010). Además se sabe que los derivados 2 $\alpha$ -Bromo y (16S,17R,20S)-lactona presentaron un efecto genotóxico en linfocitos humanos (Ramírez *et al.*, 2011).

Nuestros resultados van de la mano con los obtenidos por los autores anteriormente citados ya que los tres derivados estudiados presentaron efecto genotóxico, además se pueden comparar los resultados debido a que las tres investigaciones tienen mucho en común como el tipo de ensayo utilizado, el modelo biológico, las horas de exposición y los controles positivo y negativo.

Es muy importante conocer el mecanismo por el cual los derivados (16S,17R,20S)-dilactona, 1a-(metoxicarboniletil) y 1a-(carboxietil) producen daño al ADN, sin embargo es muy difícil evidenciar el mecanismo de acción cuando se utiliza un solo tipo de ensayo, lo que se puede elucidar son las posibles causas por las que se produjo el daño; si se compara la relación estructura–actividad biológica podemos decir que una de las causas puede ser que todos los derivados presentan una estructura similar con respecto a su precursor (argentatina B). En el caso de los tres derivados nuestros, las modificaciones químicas fueron hechas en los anillos A y E, que se encuentran en los extremos de la molécula (figura 3).

El hecho de que el derivado (16S,17R,20S)-dilactona cause mayor daño al DNA pudo deberse a que en su estructura química tiene dos grupos lactona que de acuerdo a la literatura estos presentan una mayor estabilidad energética comparándolos con los grupos carboxilo presentes en el derivado 1a-(carboxietil), y con los ésteres de ácido carboxílico que se añadieron al derivado 1a-(metoxicarboniletil). Cabe mencionar que el derivado (16S,17R,20S)-dilactona presenta una estructura cerrada de la molécula en tanto que 1a-(metoxicarboniletil) y 1a-(carboxietil) presentan aperturas en los anillos

A y E lo que puede hacer que las moléculas sean más inestables y menos reactivas sobre el blanco molecular.

En la literatura se han reportado varios estudios de triterpenos y sus derivados como posibles agentes anticancerígenos, sin embargo pocos son los que determinan el mecanismo de acción por el cual los compuestos causan daño al ADN, en nuestro caso no se puede afirmar con certeza el mecanismo de acción pero podemos suponer que el daño causado al ADN por los derivados (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil) pudo ser el mismo que tuvo la argentatina B, que usando como modelo biológico a linfocitos humanos ésta pudo inducir daño indirecto al ADN, posiblemente causado por estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hail *et al.*, 2004).

Este trabajo es el primero en informar la actividad citotóxica y genotóxica de estos 3 derivados de argentatina B. Los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden comparar entre sí, ya que el derivado (16S,17R,20S)-dilactona presentó un mayor efecto citotóxico y genotóxico con respecto a los derivados 1a-(metoxicarbonietil) y 1a-(carboxietil), que presentaron respuestas similares en su actividad.

Finalmente es importante destacar que la producción de nuevos agentes antineoplásicos es una necesidad; es indispensable la generación de compuestos con capacidad antiproliferativa en las células de cáncer, pero con menos efectos tóxicos a las células normales; para lo cual se necesita seguir investigando acerca de los derivados de argentatina B y como siguiente paso sería importante ampliar la batería de ensayos que nos ayude a elucidar como el cambio estructural de la molécula influye sobre el material genético.

## 6. CONCLUSIONES

- ☑ El derivado de argentatina B: (16S,17R,20S)-dilactona inhibe el crecimiento “*in vitro*” de las líneas celulares RKO, D-384, U-251, MCF-7 y PC-3. Presentando una IC<sub>50</sub> entre 23,42 y 82,38 μM.
- ☑ Los derivados 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) no presentaron mayor efecto citotóxico ya que su IC<sub>50</sub> en la mayoría de líneas celulares estuvo por encima de 100 μM.
- ☑ Las concentraciones probadas de los tres derivados de argentatina B (5, 15, 25 y 50 μM) no afectan la viabilidad de los linfocitos humanos, ya que presentaron una supervivencia mayor al 70%.
- ☑ Los tres derivados de argentatina B inducen daño genotóxico medido en función del tamaño de cola en linfocitos humanos, resultando el derivado (16S,17R,20S)-dilactona como el más genotóxico seguido de 1a-(metoxicarboniletil) y 1a-(carboxietil) que causa menos daño al ADN.
- ☑ Los derivados de argentatina B tienen distinto efecto citotóxico y genotóxico sobre líneas tumorales y linfocitos humanos respectivamente, siendo el (16S,17R,20S)-dilactona el que presentó mayor potencial citotóxico y genotóxico.
- ☑ La estructura química de los tres derivados influyen directamente sobre la respuesta biológica que producen, resultando más activa la adición de dos grupos lactona en (16S,17R,20S)-dilactona, sobre la apertura de los anillos A y E con esteres y grupos carboxilos en 1a-(metoxicarboniletil) y 1a-(carboxietil) respectivamente.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abruzzo J. 2000. The Natural History of Medicinal Plants. Eukaryon. Vol. 1, 10.
2. Albertini R., Anderson D., Douglas G., Hagman L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A., Norppa H., Shuker D., Tice R., Waters M., Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463, 111-172.
3. Angelis K., Dusinská M., Collins A. 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20, 2133-2138.
4. Arencibia D., Rosario I. 2003. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Retel revista de toxicología en línea*. pag: 24-41.
5. Ashby J., Tinwell H., Lefevre P., Browne M. 1995. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10, 85-90.
6. Avishai N., Rabinowitz C., Rinkevich B. 2003. Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity. Comparisons between visual and image analyses. *Environ. Mol. Mutagen.* 42, 155-165.
7. Ayala M., Hernández Y., Piñeiro J., González E. 2004. Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (3): 277-84.
8. Balunas M, Kinghorn D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78, 431-441.
9. Bautista G. 2010. Evaluación del efecto genotóxico mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de los derivados de Argemone B ((16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 3-oxima, 25-O-acetil, 2 $\alpha$ -ciano, y 2-formil. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
10. Brunneton J, 2001. Farmacognosia – Fitoquímica - Plantas Medicinales. Segunda ed. Editorial Acriba. Zaragoza – España.
11. Burgués J., Pontones J., Vera C., Jimenez J., Ozonas M. 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en la resistencia a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas.* 29(9): 846 – 859.
12. Castro R., Ramírez V., Cuenca P. 2004. Análisis de micronúcleos y otras anomalías nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev. Biol. Trop.* 52: 207-217.
13. Collins A., Duthie S., Dobson V. 1993. Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.
14. Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), 2005. Anticancer Agents from Natural Products. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.

15. Csoka K., Larsson R., Tholander B., Gerdin E., de la Torre M., Nygren P. Cytotoxic Drug Sensitivity Testing of Tumor Cells from Patients with Ovarian Carcinoma Using the Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA). *Gynecologic Oncology*. 54: 163-170.
16. Domínguez L. 2004. Principios generales de Carcinogénesis: Carcinogénesis química y hormonal. *Biocáncer* 1, 1-9.
17. Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R., Mann M., Mersch-Sundermann V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 566, 209-229.
18. Freshney R. 2000. *Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique*. Cuarte Edition, Editorial Wiley-Liss Cap. 20 – 21 p. 319-343.
19. Foye O., Sengupta K. 1996. *Principles of Medicinal Chemistry*, in: Foye O., Lemke L., Williams A., eds., Williams & Wilkins: Baltimore, pp: 822-845.
20. García F, 2000. Evaluación de los efectos citotóxicos, citostáticos 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. García F. 2009. Participación de CYP1A1 en la Biotransformación in vitro del metronidazol. Tesis previa a la obtención del grado académico de Maestra en Ciencias Bioquímicas. UNAM. México.
22. Garte S. y Bonassi S. 2005. Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-special issue overview. *Mutat. Res.* 592, 3-5.
23. Gibbs J. B. 2000. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287, 1969-1973.
24. Gillet L. y Schärer O. 2006. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 106, 253-276.
25. Goodman A. 2003. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill Interamericana. Decima edición.
26. Grover P., Danadevi K., Mahboob M., Rozati R., Salena B., Rahman M. 2003. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. *Mutagenesis* 18, 201-205.
27. Hail N, Konopleva M, Sporn M, Lotan R, and 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.*, Vol. 279, Issue 12, 11179-11187.
28. Hartmann A., Kiskinis E., Fjällman A., Suter W. 2001. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 497, 199-212.
29. Heuser V., Erdtmann B., Kvitko K., Rohr P., Da Silva J. 2007. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect and susceptibility. *Toxicology* 232, 235-247.

30. Hjertvik M., Erixon K., Ahnström G. 1998. Repair of DNA damage in mammalian cells after treatment with UV and dimethyl sulphate: discrimination between nucleotide and base excision repair by their temperature dependence. *Mutat. Res.* 407: 87-96.
31. Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. 2007. [www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov). (con acceso en Octubre 2008).
32. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J. 2009. Cancer Statistics, 2009. *Cancer Journal for Clinicians* 59, 225-249.
33. Kinghorn A, Farnsworth N, Soejarto D, Cordell G, Swanson S, Pezzuto J, Wani M, Wall M, Oberlies N, Kroll 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*. Vol. 41, Supplement, pp. 53–67.
34. Klaassen C, Watkins J, 2005. Casarett y Dooll Fundamentos de Toxicología, edición en español. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A.U., Aravaca (Madrid).
35. Larsson R., Fridborg H., Kristensen J., Sundström C., Nygren P. 1993. *In vitro* testing of chemotherapeutic drug combinations in acute myelocytic leukaemia using the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Br. J. Cancer* 67, 969-974.
36. Larsson R., Kristensen J., Sandberg C., Nygren P. 1992. Laboratory determination of chemotherapeutic drug resistance in tumor cells from patients with leukemia using a fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Int. J. Cancer*, 50, 177-185.
37. Larsson R y Nygren P. 1990. Pharmacological modification of multi-drug resistance (MDR) *in vitro* detected by a novel fluorometric microculture cytotoxicity assay. Reversal of resistance and selective cytotoxic actions of cyclosporin A and verapamil on MDR leukemia T-cells. *Int. J. Cancer*, 46, 67-72.
38. 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.
39. León C., Gómez s., Morantes J., Cordero C., Ancízar F. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*, Grupo de Farmacogenética del cáncer, Bogotá- Colombia, *Biomédica*, Vol. 26, págs: 161-168.
40. Lindhagen E., Nygren P., Larsson R. 2008. The fluorometric microculture cytotoxicity assay, *Nature Protocols* VOL.3, NO.8. 2008.
41. 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*.
42. Lodish B, Krieger K, Ziporsky S. 2005. *Biología Celular y Molecular*. Quinta ed, Editorial Panamericana.
43. Machado D. 2000. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer dna-interactive agents: an introduction. *Quim. Nova* 23, 237-245.
44. Mañas T., González C., García O. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoría*. 15, 53-60.

45. Martín R., Ibeas E., Carvalho-Tavares J., Hernández M., Ruiz-Gutierrez V., Nieto M. L. (2009) Natural Triterpenic Diols Promote Apoptosis in Astrocytoma Cells through ROS-Mediated Mitochondrial Depolarization and JNK Activation. PLoS ONE. Volume 4.
46. Martínez V, 2005. Biomonitorización genotóxica de poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología, Grupo de Mutagénesis.
47. McKelvey-Martin V., Ho E., McKeown S., Jonston S., McCarthy P., Rajab N., Downes C. 1998. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutagenesis* 13, 1-8.
48. Ministerio de Salud Pública (MSP), 2009. Indicadores Básicos de Salud. Ecuador 2008.
49. Moller P. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98, 336-345.
50. Monroy C., Cortés A., Sicard D., Groot de Restrepo H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25:335-45.
51. Moore, M. J y Goldenberg, G. J. Capítulo 60, Fármacos antineoplásicos En Kalant, H y Roshlau, W. H. E. 1998. *Principios de Farmacología clínica.* Oxford University press Mexico, sexta edición.
52. 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.
53. Mudry M, Carballo M. 2006. *Genética Toxicológica.* Editorial de los cuatro vientos Argentina.
54. Newman J., Cragg M., Kingston I. 2003. Natural Products as pharmaceuticals and sources for lead structures. En Wermuth C.G. *The practice of medicinal chemistry.* Elsevier. Pp 91-109.
55. Nygren P. 1994. Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity in vitro using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor cells from patients. *International journal of cancer* 56. 715-720.
56. Olive P. y Banáth J. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Protocol. Nat. Prot.* 1, 23 – 29.
57. Ordoñez J. 2010. Estudio del tipo de muerte inducido por argentatina B, sobre células de cáncer de colon (RKO) y células de glioblastoma (U-251). Tesis previa a la obtención del título de bioquímico farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
58. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011. Cáncer, Nota descriptiva N° 297. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Consultada en julio del 2011.
59. Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2008. Situación de la Salud en las Americas: Indicadores Básicos, 2008. Plan de acción propuesto por la OPS para la prevención y el Control del Cáncer, 2008-2015.

60. Parra H., Compadre C., Ramírez T., Muñoz M., Compadre L., Ostrosky P., Martínez M. 2006. Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal Chemistry* 14, 1889-1901.
61. Parra H., Garcia F., Sordo M., Ramírez T., Martínez M., Ostrosky P. 2005. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatina A and Argentatina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences*, 77, 2855-2865.
62. Pauwels B., Korst A., Pooter C., Pattyn G., Lambrechts H., Baay M., Lardon F., Vermorken J. 2003. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for *in vitro*, *Cancer Chemother Pharmacol*, Vol. 5, págs: 221-226.
63. Persidsky M., Baillie G. 1977. Fluorometric Test of Cell Membrane Integrity. *Cryobiology*. Vol. 14, págs: 322-331.
64. Piloto J, Vizoso A, Ramos A, García A, Remigio A, Vega Y, Lidia M, Rodríguez C, Carballo C, 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (5), 428 – 434.
65. Pradillo P, 2002. *Farmacología Antineoplásica*. [www.um.es/global](http://www.um.es/global). Febrero 2007.
66. Ramírez M., Bailón N., Romero J., Cabrera H., Ojeda D., Velázquez G., Martínez-Vásquez M. 2011. "Evaluation the genotoxicity of argentatin B and derivatives".
67. Ramírez M. 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.
68. Riva M., López D. 1994. Citotoxicidad de suavizantes cationicos sobre una línea celular establecida de mamífero. *Boletín Intexter*. N° 105.
69. Rojas E., López M., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Review. J. Chromat.* 722, 225-254.
70. Rundell M., Wagner D., Plewa M. 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation. *Environ. Mol. Mutagen.* 42, 61-67.
71. Salminen A., Lehtonen M., Suuronen K., Kaarniranta K., Huuskonen J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2979 – 2999.
72. Salmon E. 1998. *Farmacología Básica & Clínica*, in: Katzung G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, pp: 629-655.
73. Sancar A., Lindsey-Boltz L., Ünsal-Kacmaz K., Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *An. Rev. Biochem.* 73, 39-85.
74. Sanjeev N., Madhu K., Srikanta K. 2006. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in vitro* 20: 1168-1172.
75. Saxe L., Shimizu M., Xiao D., Nuntanakorn P., Lim E., Suzui M., Seter C., Pertel T., Kennelly J., Kronenberg F., Weinstein B. 2004. Growth inhibitory activity of extracts and

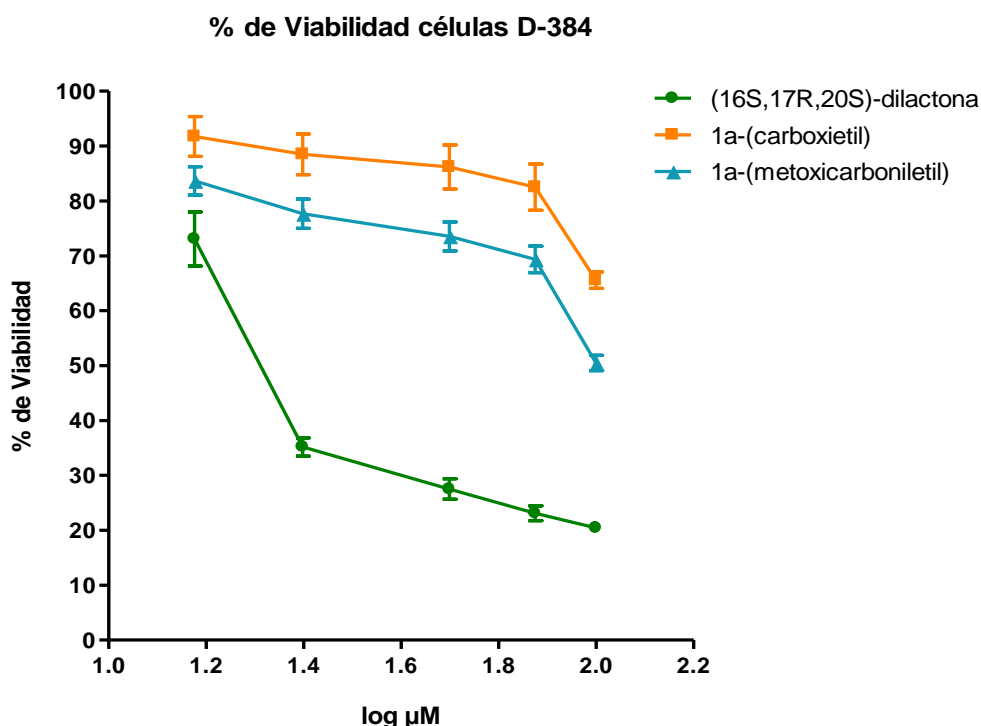


- purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 83: 221-231.
76. Setzer W.N. y Setzer M.C. 2003. Plant derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* 3: 540-556.
  77. Setzer W.N., Setzer M.C., Bates R.B., Jackes B.J. 2000. Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, North Queensland, Australia. *Planta Medica* 66: 176-177.
  78. Singh N. 2000. Microgel for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.* 455, 111-127.
  79. Skeel R, Ruppert R. *Quimioterapia del Cáncer*. Quinta ed. Editorial Marban. 2000.
  80. Speit G., Vasquez M., Hartmann A. 2008. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat. Res.* DOI 10.1016.
  81. Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Roja E, Ryu J, Sasaki Y, 2000 *Single Cell Gel /Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In vivo Genetic Toxicology Testing*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol 35, 206 – 221.
  82. Vizoso A., García A., Ramos A., Piloto J., Pavón V., Penichet M. 2000. Evaluación mutagénica de un extracto fluido con un menstruó etanólico al 70 % de teloxys ambrosioides I.weber (apasote). *Revista Cubana Plant Med* 5:102-105.
  83. Wasson G., McKelvey-Martin V., Downes C. 2008. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* DOI 10.1093/mutage/gen003.
  84. Wyatt P., Falque-Gonzalez C., Farrari D., Tuffnell D., Whitelaw D., Knudsen E., Anderson D. 2007. In vitro susceptibilities in lymphocytes from mothers and cord blood to the monofunctional alkylating agent EMS. *Mutagenesis* vol. 22 no. 2 pp. 123–127.
  85. Yanagisawa T., Urade M., Takahashi Y., Kishimoto H., Sakurai K. 1998. Isolation and characterization of radioresistant human KB carcinoma cells in vitro. *Elsevier Science, Oral Oncology* 34, Vol. 22, págs: 30-38.
  86. Yunga E., Garrido H. 2006. *Incidencia de cáncer en Loja. Registro de tumores Loja*. Primera edición. Editorial UTPL. Loja-Ecuador.
  87. Zeljezik D. y Garaj-Vrhovac V. 2001. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 16, 359-363.
  88. Zomeño M. 2002. *Glosario de radioterapia*. *Panacea*. 3: 9-10.

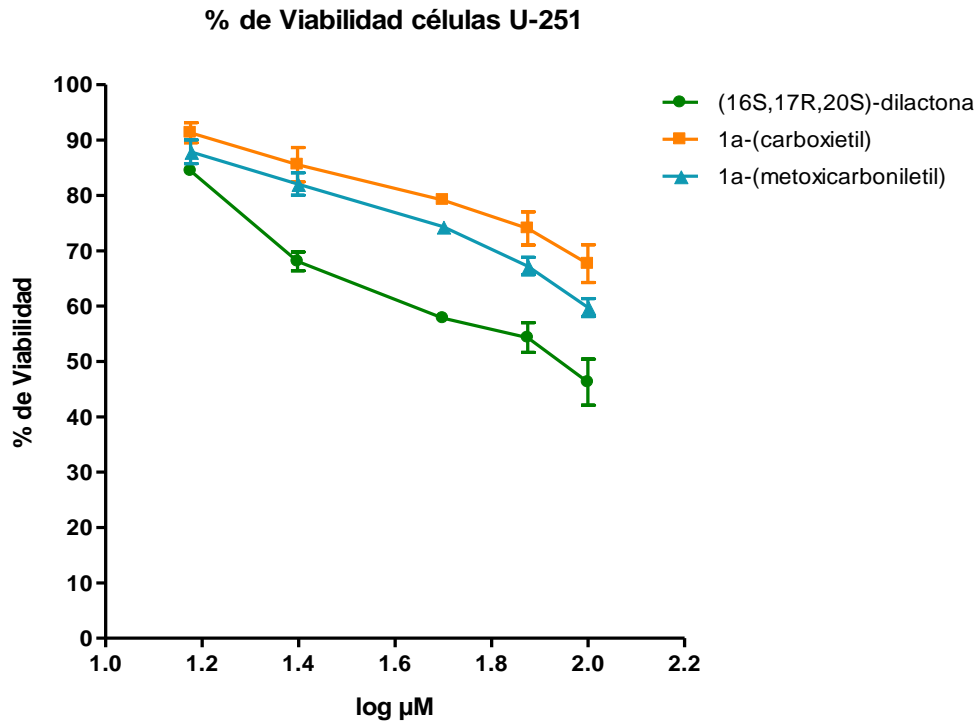
## 8. ANEXOS

### 8.1. Actividad citotóxica de (16S,17R,20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil), en líneas celulares tumorales (D-384, MCF-7, PC-3 y U-251)

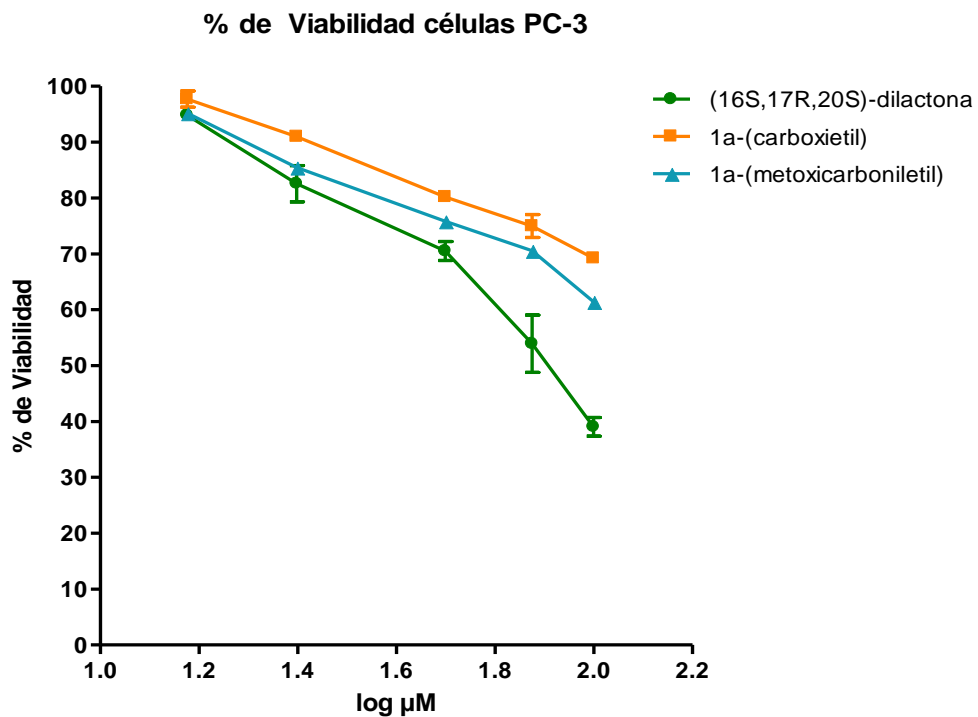
En las gráficas 9, 10, 11 y 12, se observan las diferentes curvas que presentaron las líneas celulares D-384 (astrocitoma cerebral), U-251 (glioblastoma), PC-3 (cáncer de próstata) y MCF-7 (cáncer de mama) respectivamente. El efecto que presentaron los tres derivados fue una actividad citotóxica dependiente de la concentración. La respuesta observada es similar en todas las líneas celulares, siendo el derivado (16S,17R,20S)-dilactona el que más efecto citotóxico causó. Por otro lado podemos observar que hubo una afinidad de este derivado por las líneas celulares, siendo las líneas celulares D-384 y MCF-7 las más sensibles para el tratamiento.



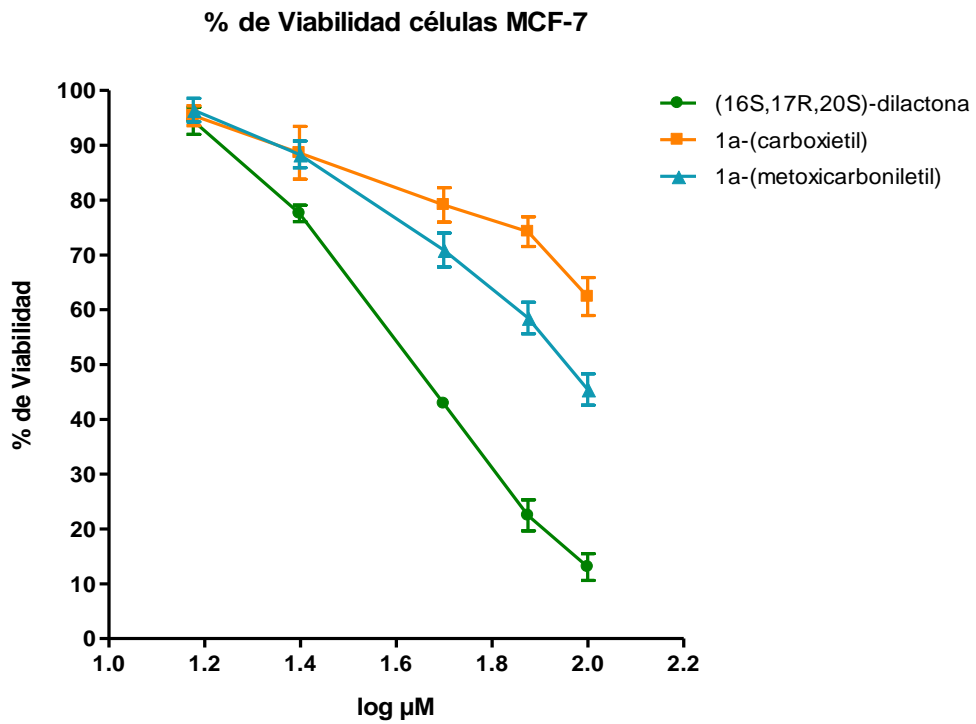
**Gráfica 6.** Porcentaje de células vivas de D-384 (astrocitoma cerebral), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarbonietil) (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ ); en el eje de las X se muestra el logaritmo de la dosis en  $\mu\text{M}$ . Prueba de regresión no lineal.  $P < 0,0001$ .



**Gráfica 7.** Porcentaje de células vivas de U-251 (glioblastoma), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletíl) (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ ); en el eje de las X se muestra el logaritmo de la dosis en  $\mu\text{M}$ . Prueba de regresión no lineal.  $P < 0,0001$ .



**Gráfica 8.** Porcentaje de células vivas de PC-3 (cáncer de próstata), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletíl) (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ ); en el eje de las X se muestra el logaritmo de la dosis en  $\mu\text{M}$ . Prueba de regresión no lineal.  $P < 0,0001$ .



**Gráfica 9.** Porcentaje de células vivas de MCF-7 (cáncer de mama), expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de (16S, 17R, 20S)-dilactona; 1a-(carboxietil) y 1a-(metoxicarboniletil) (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ ); en el eje de las X se muestra el logaritmo de la dosis en  $\mu\text{M}$ . Prueba de regresión no lineal.  $P < 0,0001$ .

## 8.2. Publicación del Poster



# EVALUATION THE GENOTOXICITY OF ARGENTATIN B AND DERIVATIVES

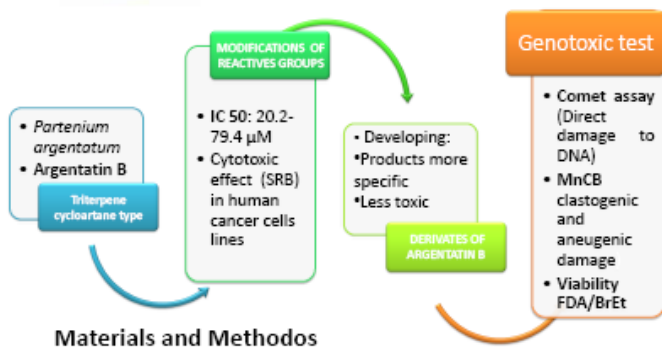
Ramírez MI<sup>1</sup>, Bailón NC<sup>1,2</sup>, Romero JC<sup>1,2</sup>, Cabrera HF<sup>1</sup>, Ojeda D<sup>1</sup>, Velázquez G<sup>1</sup>, and Martínez - Vásquez M<sup>1,2</sup>

1 Centro de Biología Celular y Molecular, UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA- ECUADOR, 2 UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO DF

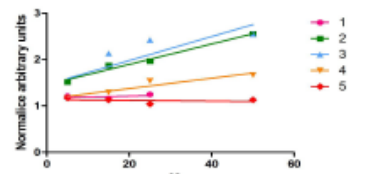
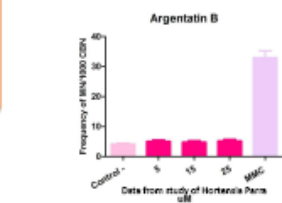
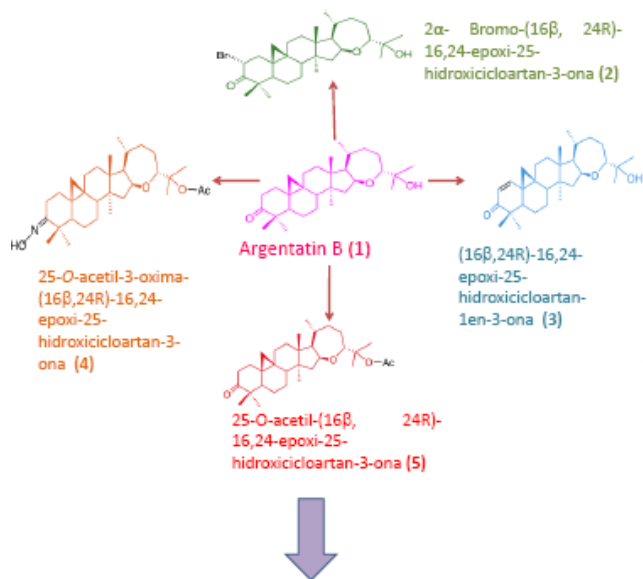
E-mail: miramirez@utpl.edu.ec



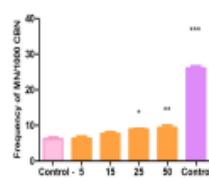
MnCB



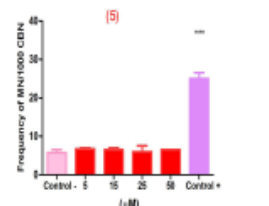
## Materials and Methods



25-O-acetyl-3-oxima-(16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (4)

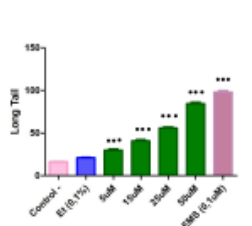


25-O-acetil-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (5)

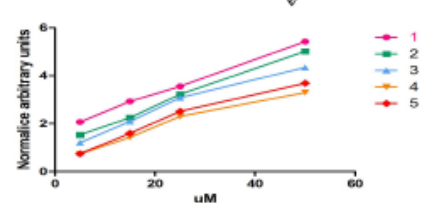
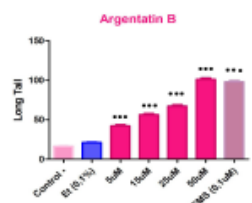
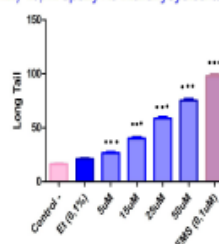


## Comet Assay

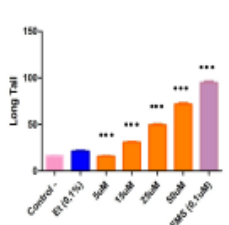
2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona



(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona



25-O-Acetyl-3-oxima-(16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona



25-O-acetil-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona

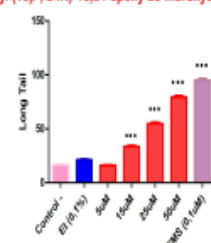


Fig. Each bars represents the mean ± SEM of three independent experiments of three healthy donors and each in duplicate. (\*\*\*) p < 0.0001

## DISCUSSION:

The Argentatin B is a triterpene with potential pharmaceutical use that demonstrated cytotoxic effects. In our study the main objective was to assess the damage to DNA by means of two genotoxic tests to four derivatives of Argentatin B. In our result the doses that worked were subtoxic (FDA/BrEt). The results in Comet Assay demonstrated a dose-dependent effect, the Argentatin B was the most genotoxic, while in the MnCB test Argentatin B had no genotoxic effect. On the other hand in both assays we showed that derivatives (2) y (3) were the most genotoxic, and the derivatives (4) y (5) were less genotoxic, in MnCB test the derivative (5) no showed dose-dependent effect. The difference in results can occur because both tests measure different types of damage, likewise to the various changes in the structure of the Argentatin B, and we used different exposure times.

## Acknowledgement:

We wish to thank the Ministerio de Industria y Productividad de Ecuador (MIPRO) and Universidad Técnica Particular de Loja.

## PERCENTAJE VIABILIDAD

	(2)	(3)	(4)	(5)
5 μM	90 ± 3,85	90 ± 2,92	90 ± 3,13	94 ± 1,64
15 μM	89 ± 2,61	90 ± 2,61	88 ± 3,84	93 ± 2,67
25 μM	87 ± 3,09	89 ± 3,09	89 ± 3,27	92 ± 2,80
50 μM	89 ± 2,55	87 ± 2,55	86 ± 4,16	92 ± 2,45

MnCB (24H)

	(2)	(3)	(4)	(5)
5μM	95 ± 0,73	94 ± 1,73	94 ± 1,36	94 ± 1,45
15μM	94 ± 2,08	91 ± 2,60	92 ± 1,72	93 ± 2,61
25μM	93 ± 3,60	91 ± 3,80	90 ± 2,81	91 ± 3,52
50μM	89 ± 4,63	87 ± 5,02	86 ± 3,38	88 ± 3,22

COMET ASSAY (3h)

Table 1. Percentage of living cells, each value represents the mean ± SD obtained from three independent experiments in duplicate from three donors

## REFERENCES:

- \* Fenech M, Crott J, Turner J, Brown (1989). Necrosis, apoptosis, cytotoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured and DNA within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of method and results for hydrogen peroxide, Mutsagenes vol 141
- \* Hall N, Kozopolska M, Sporn M, Lohan R, Andrew M. (2004). Evidence Supporting a Role for Calcium in Apoptosis Induction by the Synthetic Triterpenoid 2-Cyano-3,12-dioxocycloartane-3-one-20-O-Acetic Acid (CDOA). *Biol.Chem* 279:11179-11187.
- \*Vera R, Corpuz C, Ramirez T, Muñoz M, Compañero L, Orosco B, Martínez M. (2005). Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Biorganic and Medicinal Chemistry* 13:883-891
- \*Tice R, Agnew E, Anderson D, Barltan B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyama Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y (2000). Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environment and Molecular Mutagenesis* 35:206-221