



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Efecto citostático de 9 derivados de Argentatina B en células de
cáncer de colon (RKO)”

Trabajo de Fin de Titulación

Autor:

Javier Alejandro Villacís Villalta

Directora:

Dra. Natalia Catalina Bailón Moscoso

LOJA – ECUADOR
2013

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Javier Alejandro Villacís Villalta conoedor 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”.

Javier Alejandro Villacís Villalta

AUTOR

Dra. Natalia Catalina Bailón Moscoso

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN
DE TITULACIÓN**

Dra.

Natalia Catalina Bailón Moscoso

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN
DE TITULACIÓN**

CERTIFICA:

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

Loja, Abril del 2013.

Dra. Natalia Catalina Bailón Moscoso

DIRECTORA

AUTORÍA:

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

Javier Alejandro Villacís Villalta

DEDICATORIA

A María Alcira y Rosa Elvira, que desde el cielo continúan cuidándome y guiándome, siempre recordaré sus palabras y enseñanzas.

A mis padres: Segundo y Nyde; a mis tíos: Gonzalo y Rosario, por guiarme por el camino correcto y motivarme a cumplir mis sueños.

A mi hermana Karina, por tu cariño, confianza y apoyo.

AGRADECIMIENTO.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, Titulación de Bioquímica y Farmacia, por su gran labor en la formación estudiantil y su apoyo a la investigación.

A la Dra. Natalia Bailón, directora de este trabajo de investigación, por sus consejos, por la confianza y el apoyo; por lograr el balance óptimo entre exigencia y libertad de acción, por saber explorar mis virtudes y ayudarme a mejorar mis defectos. Gracias por hacer de mi un mejor profesional y una mejor persona.

Al Ing. Juan Carlos Romero, por su predisposición para resolver mis inquietudes y por la donación de los derivados evaluados en este trabajo.

A todos quienes son o fueron parte del Laboratorio de Genotoxicología, a los B.F. Andrea Vintimilla, Gabriel Astudillo, Ma. Isabel Ramirez, Henry Cabrera, Luis Guamán, Jennifer Ordoñez, con quienes pude colaborar y a quienes debo en parte mi formación dentro del Laboratorio.

A mis compañeros de aula, en especial a Diego, Pamela, Sofía, más que compañeros amigos.

A Gabriela, por permanecer siempre a mi lado, por su ayuda y paciencia durante estos meses.

A todos quienes directa o indirectamente colaboraron en el desarrollo de este proyecto, de verdad mil gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁG.
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
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Artículo Científico	xiii
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Ciclo Celular	2
2.1.1. Fase G1	3
2.1.2. Fase S	4
2.1.3. Fase G2	4
2.1.4. Fase M - Mitosis	5
2.2. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas	6
2.2.1. Regulación de la actividad de los complejos ciclinas/CDK.	9
2.2.1.1. Regulación de fosforilación/desfosforilación	10
2.2.1.2. Regulación por inhibidores de Quinasas dependientes de ciclinas (CKIs)	10
2.3. Puntos de control del ciclo celular	10
2.3.1. Punto de control G1/S	11

2.3.2. Punto de control de la fase S	12
2.3.3. Punto de control G2/	12
2.3.4. Punto de control M	12
2.3.5. Alteraciones en los puntos de control	13
2.4. Cáncer y Ciclo Celular	13
2.4.1. Cáncer de colon	15
2.4.2. Tratamiento contra el cáncer	15
2.5. Antineoplásicos de Origen Natural	16
2.5.1. Antineoplásicos que actúan en el ciclo celular	17
2.5.2. Triterpenos	17
2.5.3. Argentina B	18
2.5.4. Derivados de Argentatina B	19
2.6. Biomarcadores	20
2.6.1. Biomarcadores del ciclo celular	20
2.6.1.1 Determinación del ciclo celular por citometría de flujo	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Compuestos de estudio	23
3.2. Cultivo celular	24
3.2.1. Medio de cultivo y mantenimiento celular	25
3.3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	25
3.3.1. Control negativo	25
3.3.2. Control positivo	25
3.3.3. Técnica	26
3.4. Análisis estadístico	28
4. RESULTADOS	29
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38
8. ANEXOS.	
8.1. Posters publicados	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA.	PÁG.
1. Fases del ciclo celular.	3
2. Sub-fases de la mitosis.	5
3. Momento relativo de expresión y cantidad de las ciclinas durante el ciclo celular.	9
4. Estructura química de Argentatina B (1).	18
5. Representación gráfica del contenido de ADN en el ciclo celular.	22
6. Esquema del ensayo de ciclo celular mediante citometría de flujo.	27
7. Estructura química de Argentatina B (1) y los tres derivados que ocasionan mayor arresto en G0/G1.	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA.	PÁG.
1. Células de cáncer de colon RKO.	25

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA.	PÁG.
1. Proteínas que intervienen en la transición del ciclo celular y sus funciones.	6
2. Ciclinas que regulan la actividad de las CDKs.	8
3. Antineoplásicos con acción inhibitorias de CDKs.	17
4. Argentatina B (1) y los nueve derivados estudiados .	24
5. Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) de los derivados de Argentatina B evaluados sobre células RKO.	26
6. Análisis del ciclo celular de células RKO expuestas a las CI ₅₀ de Argentatina B y nueve derivados.	29

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PÁG.
1. Análisis del ciclo celular de células RKO expuestas a las Cl_{50} de Argentatina B y nueve derivados.	30
2. Ciclo celular de células RKO expuestas a las Cl_{50} Argentatina B, derivados y los controles.	31

ABREVIATURAS: SIGNIFICADO – ESPAÑOL

- **APC:** Anaphase-promoting complex - Complejo promotor de anafase.
- **BrdU:** bromodesoxiuridina o 5-bromo-2-desoxiuridina
- **CAK:** CDK-Activating kinase - Quinasa activadora de CDK.
- **Cdc20:** Cell division cycle 20 - Ciclo de división celular 20.
- **Cdc25:** Cell division cycle 25 - Ciclo de división celular 25.
- **Cdh1:** Calcium-dependent adhesion protein 1 - Proteína de adhesión dependiente de calcio.
- **CDKIs:** Cyclin-dependent kinase inhibitors - Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
- **CDKs:** Cyclin-dependent kinase - Quinasas dependientes de ciclinas.
- **CI₅₀:** Concentración inhibitoria 50.
- **CIP:** CDK- Inhibitor protein – Proteína inhibidora de CDK
- **CRM:** Cyclin Recruitment Motif – Sitio de unión de un gran número de sustratos.
- **DP:** Dimerization partner - Pareja de dimerización.
- **E2F:** Transcription factor-2 - Factor de transcripción 2.
- **EGF:** Epidermic growth factor - Factor de crecimiento epidermico.
- **INK:** Inhibitor of CDK – Inhibidora de CDK.
- **KIP:** CDK inhibitory protein – Proteína inhibidora de CDK.
- **MCM:** Mini-Chromosome Maintenance - Mantenimiento de minicromosoma.
- **MYT1:** Membrane-associated Tyr/Thr kinase – Quinasas de Tirosina y Treonina asociadas a la membrana.
- **PDGF:** Platelet-derived growth factor - Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- **pRb:** Proteína del Retinoblastoma.
- **R:** Restriction point - Punto de restricción.
- **Rb:** Retinoblastoma - Retinoblastoma.
- **SCF:** Skp1-Cullin-F-box *protein* complex - Complejo de proteínas Skp1-Cullin-F-box.
- **SFB:** Suero fetal bovino.
- **VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor – Factor de crecimiento de endotelio vascular.
- **Wee:** Del inglés Wee = pequeño.

RESUMEN

La Argentatina B [(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona] es un triterpeno de tipo cicloartano aislado de la resina de *Partenium argentatum* Gray, que en estudios anteriores ha mostrado tener actividad antiproliferativa en varias líneas celulares tumorales humanas y a partir de la cual se han obtenido algunos derivados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de nueve de estos derivados en la progresión del ciclo celular de la línea tumoral humana de cáncer de colon RKO mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que ocho de los nueve derivados de Argentatina B detienen el ciclo celular en G₀/G₁, luego de que las células fueron expuestas por 24 horas a las CI₅₀. De los nueve derivados, cinco indujeron porcentajes de arresto similares al observado en Argentatina B, mientras que tres derivados inducen un arresto mayor, siendo estos: 2 α -Bromo-(16 β ,24R)-16,24epoxi-25hidroxicicloartan-3-ona, que indujo un aumento cercano al 20% de células en G₁ con respecto al control; 25-O-Acetyl-3-oxima-(16 β ,24R)-16,24epoxi-25hidroxicicloartan-3-ona, un aumento del 22%; y 3-Oxima-(16 β ,24R)-16,24epoxi-25hidroxicicloartan-3-ona, un 21%.

“Argentatin B Derivatives induce G0/G1 Cell Cycle Arrest in Human Colon Cancer Cells”

Villacis J.^{1*}, Bailón N.^{1,2}

¹ Departamento de Ciencias de la Salud, Sección Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica, Universidad Técnica Particular de Loja,

² Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Corresponding autor:

Javier A. Villacis

[*javillacis@utpl.edu.ec](mailto:javillacis@utpl.edu.ec)

Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador, CP 11-01-608.

+593 7 2570275

Abstract:

Triterpenes are a large group of secondary metabolites obtained from natural sources which have been reported to have potent anticancer activity. In a previous study, Argentatin B and several derivatives exhibited anti-proliferative activity against various human cancer cell lines. The aim of this study was to evaluate the effect of nine Argentatin derivatives over the cell cycle progression of a colon cancer cell line (RKO) measured by flow cytometry. These compounds were assessed for their ability to reduce in vitro the viability of RKO cell line. Results showed that in response to Argentatin B derivatives treatment, cells in G0/G1 phase increased until 10% compared with Argentatin B and 22% compared with EtOH control. In conclusion, Argentatin B derivatives have cytostatic effect caused by G0/G1 arrest, being 2 α -Bromo-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one, 25-O-Acetyl-3-oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one and 3-Oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one which presented the higher effect.

Key words: Cell cycle arrest, Argentatin B derivatives, Cycloartanes, RKO cell line.

INTRODUCTION

Cancer is a generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body,¹ characterized by uncontrolled growth and spread of abnormal cells.² Other terms used are malignant tumors and neoplasms.¹ Cell cycle deregulation is a common cause of human cancer.³

The cell cycle is an organized and regulated process that involves multiple checkpoints for evaluate extracellular growth signals, cell size, and DNA integrity. Cyclin dependent kinases (CDKs) and their respective cyclines work as positive regulators of cell cycle progression, while the inhibitors of cyclin dependent kinases (CKI) act as "brakes" to stop the cycle, these being negative regulators. Cancer arises from abnormal

expression or activation of positive regulators and functional suppression of negative regulators.^{4, 5, 6, 7, 8}

Of the different types of cancer, colon cancer has increased in Latin America due to the eating habits of the population.⁹ This cancer lies between the top ten cancers in Ecuador and according to the Tumor Registry of Loja City, ranks sixth in incidence¹⁰ therefore new treatments are still necessary.

Plant secondary metabolites have proved to be an excellent reservoir of new medical compounds.^{11, 12} Also, these molecules can be susceptible to chemical transformations to optimize specific biological activity and/or decrease their toxicity.¹³

Argentatin B is a triterpene isolated from the resin of *Parthenium argentatum* gray, which has an inhibitory effect on tumor growth in several human cancer cell lines.¹⁴ Additionally, is known that in RKO cells (colon cancer) cytostatic effect and at lower doses produces cell cycle arrest in G0/G1 phase (unpublished data). Fourteen Argentatin B analogs were described and their effect on the growth of K562 (leukemia), PC-3 (prostate), U251 (CNS), and HCT-15 (colon) human cancer cell lines was determined using the sulforhodamine B test.¹³ The most active compound in these series was 2-formyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one.¹³

More recently, ten different Argentatine B derivatives were synthesized (Figure 1) by Romero J.C. (2013) (unpublished data) and from these, this paper shows if changes in the chemical structure of the Argentatin B entail a variation in the response of the cell cycle in the used biological model.

MATERIALS AND METHODS

Argentatin B Derivatives

Argentatin B (**1**) and derivatives, 2 α -Bromo-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**2**), (16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-1en-3-one (**3**), 25-O-acetyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**4**), 25-O-acetyl-3-oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**5**), 3-oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**6**), 2-formyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**7**), (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactone (**8**), (16S,17R,20S)-25-nor-cycloartan-3,24 dilactone (**9**), 1a-(2-metoxicarbonileyl)-2-(1-metyl-1-hidroxietyl)- 4b,7a-dimetyl-7-(1-metyl-3-metoxicarbonilpropyl)1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a-dodecahydro-9H-cyclopenta[a]cyclopropa[e]-naftalen-6-ol (**10**), 1a-(2-carboxietyl)-2-(1-metyl-1-

hydroxietyl)-4b,7a-dimetyl-7-(1-metyl-3-carboxyl)-1,1a,2,3,4,4a,4b,5,6,7,7a,8-dodecahydro-9H-cyclopenta[a]ciclopropa[e]-naftalen-6-ol (**11**), were donated by Ing. Juan Carlos Romero of Departamento de Química- Universidad Técnica Particular de Loja. Solutions of the derivatives were prepared by dissolving in ethanol previous to every assay,

Cell Culture

Human tumor cell line RKO was used as biological model. The cells were cultured in RPMI-1640 (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 1% L-glutamine (GIBCO) and were incubated at 37°C, in a 5 % CO₂ atmosphere with 95% humidity for 24 hours. Experiments were performed with cells that were approximately 80% confluent.

Cell viability

RKO Cells were seeded at $2,4 \times 10^4$ cells/well in a 6-well culture plate containing medium RPMI (GIBCO) 1 day before drug treatment. Cells were treated with Argentatin B derivatives at 15, 30, 45, 60 and 100µM for 24 h. Viable cells were quantified through Trypan Blue Exclusion assay.¹⁵

Flow cytometry cell cycle analysis

RKO cells were seeded in 6-well culture plates with a density of $2,4 \times 10^4$ cells/well in a RPMI (GIBCO) medium and incubated for 24h in the same conditions mentioned for the cell viability assay. Later, fresh medium and IC₅₀ of Argentatin B derivatives were aggregated. Also, Ethanol was used as a negative control at 0.1%, v/v. and Doxorubicin (DOX) 1 µM was used as positive controls for cell cycle arrest.

The cells were trypsinized, collected in 1.5 ml tubes and centrifuged for 5 minutes at 3500 rpm. at 4 °C. The pellet was washed with PBS, and a solution of PBS-Ethanol (1:1) and later fixed with Ethanol at 70% during 24h. Finally, after another PBS wash, cellular pellet was resuspended in 200µL of PI staining solution [0.1% (v/v) Triton X-100, 10µg/ml PI y100 µg/ml DNase-free RNase A in PBS] in FACS- tubes. Samples were incubated at room temperature and darkness. Cell cycle phase distributions were analyzed by flow cytometry in BD FACSCanto™ cytometer under the following conditions: Excitation 488nm to 536nm. Emission: Long pass: 600nm to 610 nm. Approximately 20,000 cells from each test compound were then analyzed in the middle flow rate. The distribution of the cell cycle phases was manually gated as SubG1, G1/S, S and G2/M phase.

Statistical analysis

The cell viability data were analyzed to calculate $IC_{50} \pm SEM$ using a non-linear regression between the logarithm of the concentration vs. the viability percent using the software GraphPad Prism 5.

For cell cycle, the mean and standard errors of the mean in each phase of the cell cycle were calculated and these values were compared using ANOVA with Dunnett's post-test in the same software. Statistical significance was accepted at a level of $p < 0.05$.

All experiments were performed in duplicate, in three independent replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

The initial step in the search of molecules as anticancer agents is a primary screening to know their cytotoxic or inhibitory effect in a suitable biological model.¹⁶ After 24 hour of exposure to four doses of Argentatin B derivatives, the cell viability was measured and the IC_{50} of all derivatives was calculated. The IC_{50} values for each derivative (Table1) were higher than Argentatin B ($IC_{50} = 25.04 \pm 0.38 \mu M$) excepting **(2)** 2 α -Bromo-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one ($IC_{50} = 22.04 \pm 0.38 \mu M$) and (16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-1en-3-one **(3)** ($IC_{50} = 23.80 \pm 0.31 \mu M$). All derivatives with an IC_{50} value above of 100uM were discarded.

Preliminary structure–activity relationship observations of the cytotoxicity results showed that a bromine atom substitution at C-2 enhanced the potency of Argentatin B in three cell lines: HCT-15, K562, and PC-3¹⁴ the same modification that our **(2)** derivative, so a reduction of IC_{50} is justified. Likewise, Parra et al. (2006) states that the chemical transformations which enhance cytostatic and/or cytotoxic effect of some triterpene in cancer cell lines, are the opening of A ring or addition of nitrile, formyl, carboxyl and double bonds in said ring, however, of these changes only the double bond in ring A decreased the IC_{50} value, the other modifications mentioned occasioned the opposite effect. Furthermore, other studies have tested various compounds with the same basic structure of Argentatin B and their derivatives, concluding that cycloartanes have a greater effect when have a greater number of -H donors.¹⁷ Our molecules have low number of donors perhaps that is the reason of IC_{50} values obtained. Additionally, hydrophobicity also can be important, in the set of cycloartane derivatives. Probably some optimal hydrophobicity needs to exist and effective response.¹⁷

The proliferation rate and proportions of cells in the different phases of the cell cycle were analyzed at 24 hours of treatment with the Argentatin B derivatives by the incorporation of PI. The flow cytometry results displayed in Table 2 and Figure 2 indicated that Argentatin B derivatives increased the percentage of cells in G0/G1 and decreased the percentage of cells in S and G2/M with respect to negative control. G0/G1 phase arrest presented significant difference compared with control, excepting 2-formyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**7**). DNA histogram analysis (Figure 2) revealed that negative control cells showed a typical pattern of DNA content that reflected G0/G1-, S- and G2/M- phases of cell cycle and this distribution is similar to (**7**), well as doxorubicin induced cell-cycle arrest at the S and G2/M phases, agreeing with previous research.^{18, 19}

After treatment with compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **9**, **10** and **11** was showed a statistically significant increase of G0/G1 cell population after treatment compared with control, while that for the phases S and G2/M was remarkable decrease in cell population. (Table 2 & Figure 2). Treatment with compounds **3**, **4**, **9**, **10** and **11** increased G0/G1 population as was observed in Argentatin B (not statistically significant with ANOVA and Turkey post-test, $P < 0.05$, data not shown), while compounds **2**, **5** and **6** showed a higher arrest in G0/G1 being the compound 25-O-acetyl-3-oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**5**), which causes greater G0/G1 phase arrest, increasing from 50.3% in control to 71.6% in treated cells, is likewise evident decrease in S phase cells and G2 was significantly reduced from 24% in control to 13% in treated cells. Also the derivative 3-oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**6**), increased to 72% cells in G1 phase decreased to 15% and G2 phase and 2 α -Bromo-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**2**) have a similar effect. Not exist significant difference between the three last mentioned derivatives but if to Argentatin B (ANOVA and Turkey post-test, $P < 0.05$, data not shown).

Little is known about the mechanisms by which triterpenes exert their effects. Previous studies showed that Argentatin B can be considered as a cytostatic agent; since it is known that the actein, a triterpene of cycloartane-type similar to Argentatin B, has cytostatic effects associated with 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 in MCF7 cells.²⁰ This same behavior could be applicable in the action mechanism of action of the derivatives evaluated in this research.

Chemoprevention by natural compounds or their synthetic derivatives has been suggested frequently as a method to reduce the occurrence or recurrence of cancer.²¹ In the present study, results showed that the chemical modifications that were realized to obtain derivatives **2**, **5** and **6**, allowed us to obtain *in vitro* three new cytostatic drugs with greater cytostatic effect than the original molecule. By definition, cytostatic drugs do not kill cancer cells but instead stop cancer cells from proliferating.²²

In cancer treatment, cell death is an important factor influencing cell number and susceptibility to neoplastic transformation, as well as sensitivity to chemotherapeutic agents.^{23, 24} Other conventional strategies utilized in cancer chemotherapy is preventing DNA synthesis or mitosis by blocking cell cycle progression in pre-neoplastic or malignant cells.^{25, 26} Most tumors cells retain the ability to sustain permanent growth arrest or undergo non-apoptotic types of cell death, it might therefore be possible to exploit these properties to induce tumors-cell death by non-apoptotic means and to confound the survival of drug-resistant clones.²⁷ Our compounds can be used for this purpose. Additionally, drug combination can be predominantly cytotoxic to cancer cells because these cells are resistant to growth arrest,²⁸ subsequent assays will be needed to determine if the use of our cytostatic Argentatin B derivatives increase the effect of other cytotoxic agents.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We very grateful to Ing. Juan Carlos Romero for donating Argentatina B and derivatives. Additionally, we want to thank to BQF. Luis Cartuche for reviewing the english version.

REFERENCES

1. World Health Organization. (2012). Cancer. Fact sheet N° 297. Retrieved July 2012 from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. American Cancer Society. (2012). Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta. American Cancer Society.
3. Malumbres M. & Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature reviews. Cancer, 9 (3), 153–66.
4. Sherr C. (1996). Cancer cell cycles. Science (New York, N.Y.), 274 (5293), 1672–7.
5. King K. & Cidlowski J. (1998). Cell Cycle Regulation and Apoptosis. Annual review of physiology, 60, 601–617.

6. Kops G., Weaver B. & Cleveland D. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews. Cancer*, 5(10), 773–85.
7. Klug W., Cummings M. & Spencer C. (2006). *Conceptos de Genética* (p. 920). Madrid: Pearson Educación S.A.
8. Foster D., Yellen P., Xu L. & Saqçena M. (2010). Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes & cancer*, 1(11), 1124–31.
9. Panamerican Health Organization. (2008). *Backgrounder: Cancer in Latin America and the Caribbean. PAHO Action Plan for Prevention and Control of Cancer.* Retrieved July 2012 from: <http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/NC/pcc-fact-sheet-LAC.pdf>
10. Garrido H. & Yunga E. (2010). Incidencia del Cáncer en Loja “Estudio de una década”. SOLCA Núcleo de Loja. (p. 284).
11. Cragg G., Grothaus P. & Newman D. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical reviews*, 109(7), 3012–43.
12. Nirmala M., Samundeeswari A. & Sankar P. (2011). “Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review.” *Research in Plant Biology* 1(3): 1–14.
13. Parra H., Compadre C., Ramírez T., Muñoz M., Compadre R., 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(6), 1889–901.
14. Parra H., Ramírez T., & Martínez M. (2005). Synthesis of argentatin A derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(4), 1005–1008.
15. Freshney R. (2010). *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Sixth Edition*, Editorial Wiley-Liss.
16. 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.
17. Molnár J., Gyémánt N., Tanaka M., Hohmann J., Bergmann-Leitner E., Molnár P., Deli J., Didiziapetris R. & Umbelino M. (2006). “Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids.” *Current pharmaceutical design* 12(3): 287–311.
18. Park, E., Kwon, H., Choi, Y., Shin, H., & Choi, S. (2012). Doxorubicin Induces Cytotoxicity through Upregulation of pERK-Dependent ATF3. *PLoS ONE*, 7(9), e44990.

19. Lambert L., Qiao N., Hunt K., Lambert D., Mills G., Meijer L. & Keyomarsi K. (2008). "Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model." *Cancer Research* 68(19): 7966–7974.
20. Eibond L., Shimizu M., Xiao D., Nuntanakorn P., Lim J., Suzui M., Seter C., Pertel T., Kennelly E., 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.
21. Aziz M., Kumar R., Ahmad N. (2003). Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms. *Int. J. Oncol.* 23, 17–28.
22. Rixe O. & Fojo T. (2007). "Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?" *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(24): 7280–7.
23. Li T., Chen G., Su C., Lin J., Yeh C., Cheng K. & Chung J. (2005). Ellagic Acid Induced p53/p21 Expression, G1 Arrest and Apoptosis in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Anticancer research* 25: 971-980.
24. Guamán L. (2012). *Chronicles of a Silent Death: Apoptosis*. *Research in Cell Biology* 2012, 1(1): 1-7.
25. Kim D., Na H., Oh T., Kim W., & Surh Y. (2004). "Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces cell cycle arrest in ras-transformed human mammary epithelial cells." *Biochemical pharmacology* 68(6): 1081–7.
26. Dai X., Zeng X., Peng F., Han Y., Lin H., Xu Y., Zhou T., Xie G., Deng Y., Mao W., Yu L., Yang L. & Zhao Y. (2012). A Novel Anticancer Agent, SKLB70359, Inhibits Human Hepatic Carcinoma Cells proliferation via G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction. *Cell Physiol Biochem* 2012; 29: 281-290.
27. Oka H. & Mak T. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* (4), 592-603.
28. Blagosklonny M. (2004). Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene* 23, 2967–2975.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

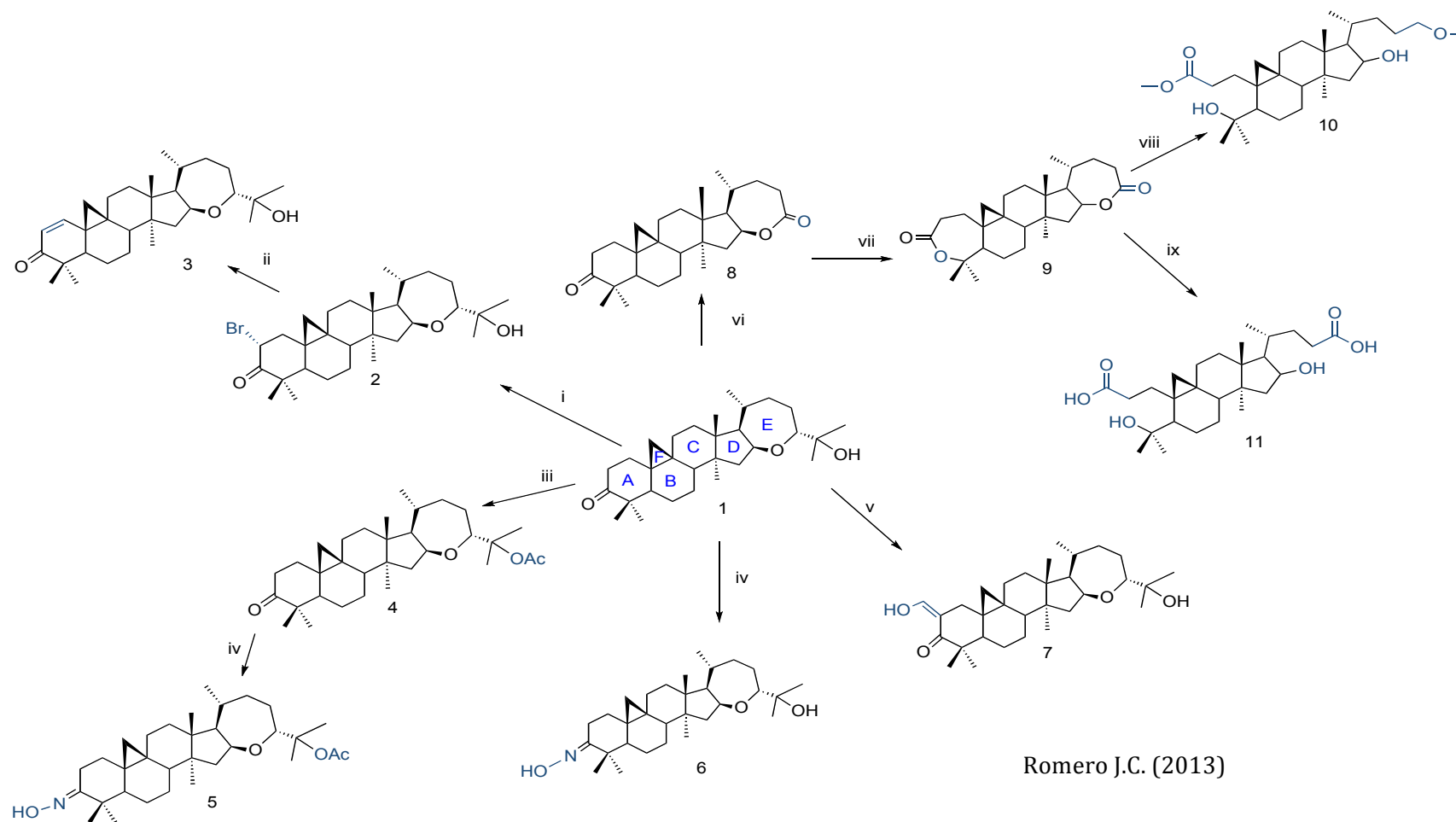


Figure 1. Chemical structure and scheme obtaining of Argentatin B derivatives. Reagents: (i) $\text{Br}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$, 64,3%; (ii) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{NH}/\text{CaCO}_3$, 87,1%; (iii) $\text{AcONa}/(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, 86,1%; (iv) $\text{NH}_2\text{OH}, \text{HCL}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 87,1%; (v) $\text{HCO}_2\text{Et}, \text{Na}/\text{MeOH}$, 77%; (vi) $\text{CrO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$, 62,8%; (vii) $m\text{-CPBA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 92,1%; (viii) MeOH, KOH , 61,2% (ix) $\text{H}_2\text{O}, \text{KOH}$, 52,1%.

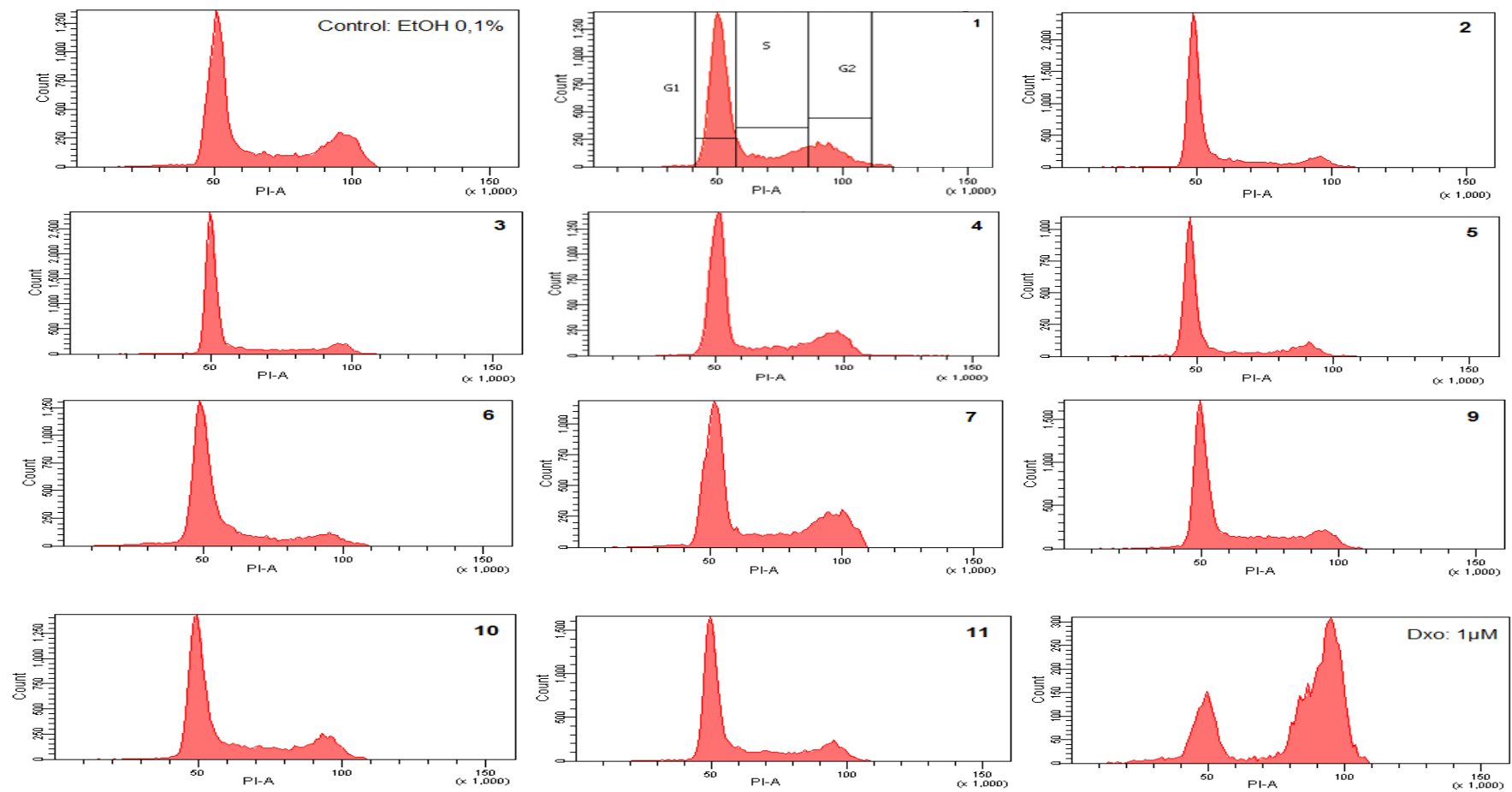


Fig.2. Cell Cycle of RKO cells exposed to Argentatin B and 9 derivatives. The histograms represent the different cell cycle phases.

Table 1. IC₅₀ of Argentatin B and 9 derivatives.

Derivative	IC ₅₀ ± SEM (μM)	Molecule	IC ₅₀ ± SEM (μM)
1	25.04 ± 0.38	7	31.13 ± 0.28
2	22.04 ± 0.38	8	>100
3	23.80 ± 0.31	9	44.95 ± 0.34
4	82.08 ± 0.89	10	84.13 ± 0.02
5	70.52 ± 0.75	11	98.99 ± 0.03
6	49.84 ± 0.57		

Each data is given as the means ± SEM of at least three independent experiments.

Table 2. Cell Cycle distribution of RKO cells exposed for 24 hours to IC₅₀ of Argentatin B derivatives.

Treatment*	G1		S		G2	
	%	P value	%	P value	%	P value
Negative Control						
EtOH	50.30 ± 2.84		26.58 ± 3.67		23.38 ± 2.36	
Positive Control						
Dox 1μM	22.86 ± 3.59	***	13.79 ± 2.72	***	65.35 ± 5.77	***
Argentatin B ‡						
IC ₅₀	62.83 ± 1.45	***	20.43 ± 1.14	**	16.74 ± 0.30	***
Argentatin B Derivatives						
2	70.98 ± 4.31	***	19.44 ± 4.06	***	9.58 ± 0.79	***
3	65.84 ± 3.29	***	20.81 ± 3.68	**	13.35 ± 2.25	***
4	64.08 ± 2.32	***	17.71 ± 3.76	***	18.26 ± 3.12	***
5	72.06 ± 4.26	***	12.88 ± 3.15	***	15.07 ± 1.75	***
6	71.65 ± 2.60	***	15.16 ± 3.53	***	13.19 ± 1.29	***
7	53.86 ± 4.29	ns	20.22 ± 3.67	**	25.93 ± 3.05	ns
9	61.01 ± 2.49	***	23.99 ± 1.63	ns	15.00 ± 1.90	***
10	58.26 ± 1.44	***	23.90 ± 2.14	ns	17.85 ± 1.29	***
11	65.64 ± 1.86	***	19.98 ± 0.64	**	14.39 ± 2.22	***

Values represent mean ± SEM, n=6. The asterisks indicates statistically difference in each cell cycle phase compare to the EtOH Control at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) analyzed whit ANOVA and Dunnett's post-test. ‡ Data of reference.

1. OBJETIVOS

1.1. General

- Establecer si las distintas modificaciones químicas realizadas a la Argentatina B son capaces de interferir con la proliferación de células de cáncer de colon RKO.

1.2. Específicos

- Determinar el efecto citostático sobre células de cáncer de colon RKO expuestas a 24 horas de tratamiento de 9 derivados de Argentatina B mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo.
- Evaluar mediante análisis estadístico si existe diferencia entre el efecto citostático de los derivados con respecto al control y a la Argentatina B.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Ciclo celular

El ciclo celular se define como una serie ordenada de acontecimientos macro-moduladores que conducen a la replicación y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la célula madre (Lodish *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2003). Este proceso puede ser considerado como el mecanismo por el cual una célula recién nacida crece en tamaño, replica su material genético, segrega un conjunto completo de cromosomas a cada uno de dos nuevos núcleos y se divide en dos nuevas células (Tyson & Novak, 2008).

En condiciones normales, las células diferenciadas se mantienen en un estado no proliferativo o quiescente, pero pueden ser activadas para dividirse a partir de estímulos mitogénicos apropiados, lo cual implica la transducción estrictamente regulada de señales mitogénicas a la maquinaria celular que controla la replicación del material genético así como la correcta segregación a las células hijas (Malumbres, 2011). Un factor de crecimiento, por ejemplo, puede desencadenar un programa altamente regulado unidireccional que cuando se ejecuta con éxito resulta en la replicación y división de la célula (Renthal & Lee, 2002). El ciclo celular humano (Figura 1) logra esto en aproximadamente 24 horas a través de cuatro fases principales: G1 (Intervalo 1), S (Síntesis de ADN), G2 (Intervalo 2), llamadas conjuntamente interfase; y M (Mitosis) (Foster, 2008; Golias *et al.*, 2004; Cooper, 2000).

Cada fase tiene una función específica para garantizar la correcta división celular; además, para lograr el orden correcto de los eventos que constituyen el ciclo, existen una serie de puntos de control que aseguran que la célula no entre en la siguiente fase del ciclo sin haber completado adecuadamente la fase anterior (Malumbres, 2011; Collier, 2007).

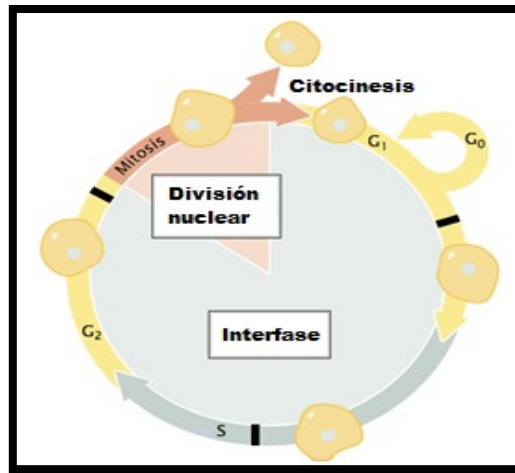


Figura 1. Fases del ciclo celular.

Fuente: Pierce, 2009.

2.1.1. Fase G1

La fase G1 es el periodo del ciclo celular que abarca desde el término de la división (mitosis) anterior hasta el inicio de la síntesis de ADN (fase S). Su duración es de alrededor de 10 horas (Golias *et al.*, 2004; Renthal & Lee, 2002; Cooper, 2000).

Aunque la preparación de la célula para la fase S puede parecer relativamente simple, G1 es en realidad la fase de regulación más importante en el ciclo celular. En esta primera fase de crecimiento, la célula que acaba de dividirse tiene una intensa actividad metabólica, aumentando su tamaño, el número de microtúbulos y generando nuevos orgánulos tales como mitocondrias, ribosomas y estructuras membranosas (Lodish *et al.*, 2005).

Durante G1, la célula decide si replicar su ADN o salir del ciclo celular, pasando a un estado quiescente denominado G0 en el cual permanecen viables y activas metabólicamente sin proliferar (Ren & Rollins, 2004). Esta decisión, llamada “punto de restricción” (R), se realiza en la fase G1 tardía y está dada por la presencia o ausencia de señales de crecimiento externas (Lodish *et al.*, 2005). R es un punto de “no retorno”, es decir, una vez alcanzado, la célula debe concluir su proceso de división (Coller, 2007; Park & Lee, 2003).

Otra característica clave de G1 y que contribuye a la unidireccionalidad de la progresión del ciclo celular, es el cebado de orígenes de replicación con proteínas MCM (*Mini-Chromosome Maintenance*). La unión de estas proteínas a los orígenes de replicación es necesaria para iniciar la síntesis de ADN, pero sólo pueden unirse al ADN en G1 tardía (Revisado en Renthall & Lee 2002). Por lo tanto, la síntesis de ADN sólo se inicia una vez concluida la transición G1/S.

2.1.2. Fase S

Luego de que la célula ha pasado el punto de restricción, las proteínas sintetizadas en G1 tardía activan la maquinaria que induce a la replicación del ADN. Este delicado proceso de copia del genoma de la célula progenitora tarda aproximadamente 9 horas (Golias *et al.*, 2004; Renthall & Lee, 2002; Cooper, 2000) obteniéndose una única célula con dos conjuntos de cada cromosoma (cromátidas hermanas). Además, en esta fase se realiza la síntesis de histonas y se inicia la replicación de los centriolos, la cual no se completará hasta el inicio de la mitosis (Malumbres & Barbacid, 2009).

2.1.3. Fase G2

En la fase G2, o segunda fase de crecimiento, continúa la síntesis de ADN y proteínas necesarias para la mitosis. G2 dura alrededor de 4 horas (Golias *et al.*, 2004; Renthall & Lee, 2002; Cooper, 2000).

En esta fase la célula duplica su tamaño, sintetiza las proteínas necesarias para la descomposición de la envoltura nuclear, la condensación de cromosomas, la formación del huso mitótico, y otros procesos necesarios para la entrada en mitosis. Muchas de estas funciones promotoras de la mitosis no pueden iniciarse hasta que se complete la síntesis de ADN, sirviendo así como una fase de control para prevenir la prematura división celular (Revisado en Renthall & Lee, 2002).

La fase G2 concluye cuando los cromosomas empiezan a condensarse iniciándose así la mitosis.

2.1.4. Fase M – Mitosis

La mitosis constituye el evento final del ciclo celular. Es un proceso elaborado dividido en diferentes sub-fases, durante las cuales se producen eventos específicos para separar los cromosomas hijos duplicados y encerrarlos en dos células hijas genéticamente idénticas (Figura 2) (Chan *et al.*, 2012).

Esta fase toma alrededor de 1 hora (Golias *et al.*, 2004; Renthall & Lee, 2002; Cooper, 2000), que es un tiempo rápido teniendo en cuenta su complejidad.

La primera sub-fase a producirse es la Profase, en el que las proteínas sintetizadas en G2 inician el proceso de división nuclear o cariocinesis, es decir desintegran la envoltura nuclear, condensan la cromatina e inician la formación del huso mitótico. A esto le sigue la Prometáfase, un periodo de transición durante el cual las cromátidas hermanas se mezclan hasta posteriormente alinearse en el ecuador de la célula en la siguiente sub-fase denominada Metafase. Las cromátidas hermanas luego se separan a los polos opuestos de la célula en la Anafase, que es seguida de la Telofase, en donde se realiza la división celular, conocida también como citocinesis. Al culminar esta fase, los cromosomas duplicados han sido distribuidos de manera idéntica en cada una de las células hijas (Orzaez *et al.*, 2009).

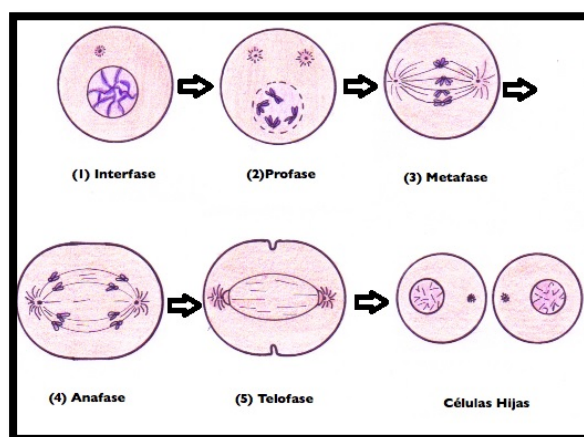


Figura 2. Sub-fases de la mitosis.
Fuente: Realizado por Sandra Cuenca, 2013.

2.2. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

La transición del ciclo celular y el paso de una fase a la siguiente se encuentran estrictamente controlados por la activación sucesiva de diferentes complejos proteicos (Tabla 1), compuestos principalmente por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinase*) (Malumbres & Barbacid, 2009; Vermeulen *et al.*, 2003).

Tabla 1. Proteínas que intervienen en la transición del ciclo celular y sus funciones.

NOMBRE GENERAL	FUNCIONES Y COMENTARIOS
Proteínas quinasas y fosfatasa que modifican las CDK	
CAK (<i>CDK-Activating kinase</i>)	Activa las CDK mediante fosforilación de residuos de treonina.
Quinasa Wee1.	Fosforila sitios inhibitorios en CDK y está principalmente involucrada en el control de la entrada a mitosis.
Fosfatasa Cdc25 (<i>Cell division cycle 25</i>)	Elimina residuos fosforilados de treonina y tirosina de las CDKs. Hay tres miembros de esta familia (A, B, C); Cdc25C es el activador de CDK1 en el inicio de la mitosis.
Proteínas inhibidoras de Cdk (CKI)	
p27	Suprime las CDK en la fase G1/S y CDK-S activadas en G1; ayuda a las células a retirarse del ciclo celular cuando termina; la fosforilación de CDK2 provoca su ubiquitinación por SCF (<i>Skp1-Cullin-F-box protein complex</i>).
p21	Suprime la CDK-G1/S, CDK-S y activa CDK-S después de daños en el ADN en G1; activada transcripcionalmente por p53.
p16	Suprime la actividad de CDK-G1 en G1; este está frecuentemente inactivado en el cáncer.
Ligasas de ubiquitina y sus activadores	
SCF	Cataliza la ubiquitinación de proteínas reguladoras implicadas en el control de G1, incluyendo CKIs (p27).
APC (<i>Anaphase-promoting complex</i>)	Cataliza la ubiquitinación de las proteínas reguladoras implicadas principalmente en la salida de mitosis, (Securin y Ciclinas-M), regulado por la asociación con subunidades de activación.
Cdc20	Activa la subunidad de APC en todas las células; desencadena la activación de APC en la transición

	de metafase a anafase; estimulada por activación de CDK-M.
Cdh1 (<i>Calcium-dependent adhesion protein 1</i>)	Mantiene la actividad de APC después de la anafase y en G1; inhibida por la actividad de CDK.
Proteínas reguladoras de genes	
E2F (<i>Transcription factor-2</i>)	Promueve la transcripción de genes necesarios para la progresión de la fase G1/S, incluyendo genes que codifican ciclinas G1/S, ciclinas-S y proteínas necesarias para la síntesis de ADN; estimulada cuando CDK-G1 fosforila Rb (<i>Retinoblastoma</i>) en respuesta a mitógenos extracelulares.
p53	Promueve la transcripción de genes que inducen la detención del ciclo celular (especialmente p21), apoptosis en respuesta al daño del ADN u otro tipo de estrés de las células; regulada por la asociación con Mdm2 (<i>Mouse double minute 2 homolog</i>), que promueve la degradación de p53.

Fuente: Alberts *et al.*, 2002.

Las CDKs son un grupo de proteínas quinasas que forman complejos activos heterodiméricos después de la unión a sus subunidades reguladoras, las ciclinas (Malumbres & Barbacid, 2009; Ekholm & Reed, 2000). Esta unión se da por fosforilación a través de una quinasa activadora de CDK (CAK) (Malumbres, 2011; Park & Lee, 2003).

En mamíferos hasta el momento se conocen 20 CDKs (CDK1 a -20) pero solamente cuatro (CDK1, -2, -4 y -6) están claramente asociadas con el control del ciclo celular y posiblemente las CDKs -3 y -5 (Malumbres, 2011). A pesar de que los niveles de proteína CDK son constantes durante todo el ciclo celular, estas sólo son funcionales durante distintos intervalos dentro del ciclo (Vermeulen *et al.*, 2003).

En cuanto a las ciclinas que regulan la actividad de las CDKs, se conocen al menos 16 (Tabla 2), pero de estas solamente las de tipo A, B, C, D y E tienen función en la regulación del ciclo celular (Malumbres & Baracid, 2009).

Tabla 2. Ciclinas que regulan la actividad de las CDKs.

Ciclinas	CDK asociada	Función
A	CDK1, CDK2	Entrada y transición de la fase S
B1, B2	CDK1	Salida de la fase G2 y mitosis
C	CDK8	Regulación transcripcional
D1, D2, D3	CDK4, CDK6	Transición de la fase G0 a S
E	CDK2	Transición de la fase G1 a S
F	?	Transición de la fase G2 a M
G1, G2	CDK5	Respuesta al daño del ADN
H	CDK7	Activación CDK Regulación transcripcional Reparación ADN
I	?	?
K	?	Activación CDK
T1, T2	CDK9	Regulación transcripcional Regulación transcripcional

Fuente: Vermeulen *et al.*, 2003.

La estructura primaria de las ciclinas tiene en común la presencia de una o dos regiones conservadas de 150 aminoácidos conocidas como "cyclin box", las cuales están formadas por regiones helicoidales que se encuentran asociadas a hélices adicionales en el extremo N-terminal y en el C-terminal. En la región N-terminal existe un sitio conservado denominado surco de unión del substrato CRM (*Cyclin Recruitment Motif*) (Malumbres & Barbacid, 2005) en donde se produce la unión de un gran número de substratos como los factores de transcripción E2F, pRb (*Proteína del Retinoblastoma*) y p53, previa fosforilación por la CDK correspondiente.

A diferencia de las CDKs, las ciclinas son producidas en cada una de las fases del ciclo celular. Los niveles de estas proteínas varían en las diferentes fases y definen la posición relativa de la célula dentro del ciclo (Vermeulen *et al.*, 2003) (Figura 3). En cuanto a los complejos proteicos ciclina/CDKs, la concentración de estos varía de acuerdo al momento de la fase en que se encuentre la célula, estos niveles determinarán el paso o la progresión de las diferentes fases del ciclo.

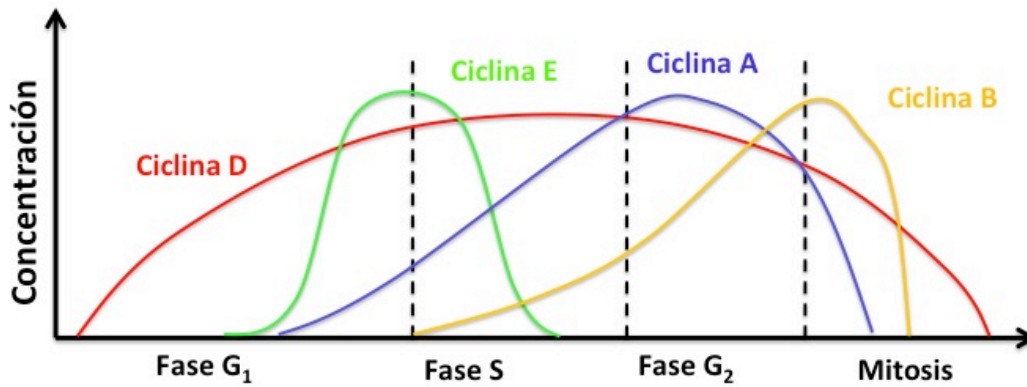


Figura 3. Momento relativo de expresión y cantidad de las ciclinas durante el ciclo celular.
Fuente: Autor, Basado en Klug *et al.*, 2005.

Así, en la fase temprana de G₁, están presentes en mayor concentración las ciclinas D y E, la concentración de la ciclina A se incrementará gradualmente a medida que avance la fase G₁, la unión de esta ciclina con CDK2 determinará la entrada a la fase S. Por otro lado, hacia el final de la fase S aumentará la concentración del complejo ciclinaA/CDK1, lo que servirá de señal para iniciar la fase G₂. La fase M es activada y controlada por el complejo ciclinaB/CDK1 (Alberts *et al.*, 2002; Morgan, 2007; Gavet & Pines, 2010).

Los complejos ciclina/CDK modulan la expresión de los genes encargados del control del ciclo celular y la síntesis de ADN a través de la regulación de la actividad de los factores de transcripción E2F/DP (*Dimerization partner*) y pRb. En células no proliferantes, una actividad baja de los complejos ciclina/CDK permite mantener a pRb en una forma hipo-fosforilada que es capaz de unirse e inactivar el factor E2F/DP. Por el contrario, durante la proliferación celular, donde la actividad ciclina/CDK es alta, se produce la hiper-fosforilación de pRb durante el final de la fase G₁ permitiendo la liberación de E2F/DP y resultando en la activación transcripcional de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Fuster *et al.*, 2010).

2.2.1. Regulación de la actividad de los complejos ciclina/CDK

La actividad de los complejos ciclina/CDK está regulada tanto por procesos de fosforilación/desfosforilación como por su asociación a miembros de las familias de inhibidores de CDKs (CKIs, *Cyclin-dependent kinase inhibitors*) (Malumbres, 2011).

2.2.1.1. Regulación de fosforilación/desfosforilación.

Las CDKs deben ser fosforiladas en un residuo conservado de treonina (Thr172 en CDK4 y Thr160 en CDK2) que provoca la exposición del sitio catalítico (Malumbres & Barbacid, 2005). La actividad de todas las CDKs se regula negativamente por la fosforilación de un residuo en el extremo amino terminal (Thr14 y Tyr15) por las quinasas MYT1 (*Membrane-associated Tyr/Thr kinase*) y WEE1. Estas fosforilaciones no inducen grandes cambios conformacionales en la estructura, pero si reducen la afinidad de la CDK por su sustrato (Niida & Nakanishi, 2006). Otro mecanismo de regulación lo lleva a cabo la familia de fosfatasas CDC25A, -B y -C (Malumbres & Barbacid, 2009; Satyanarayana & Kaldis, 2009) cuya actividad es desfosforilar las CDKs (en los residuos Thr14, Tyr15) para regular las transiciones entre las diferentes etapas del ciclo celular (Aressy & Ducommun, 2008).

2.2.1.2. Regulación por Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs)

Las CKIs sirven como reguladores negativos e impiden que la célula prosiga a la fase siguiente del ciclo. Hay dos familias de inhibidores de las CDKs: las INK4 y Cip/Kip. Los miembros de la familia de inhibidores de proteínas kinasas INK4 incluyen los inhibidores p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c y p19Ink4 mientras que los miembros de la familia Cip/Kip incluyen p21WAF1/Cip1, p27Kip1 y p57Kip2 (Schwartz & Shah, 2005; Park & Lee, 2003).

Las proteínas INK4 bloquean el pasaje a través de G1 al inhibir de manera específica CDK4 y CDK6, mientras que la familia de inhibidores Cip/Kip pueden inhibir cada uno de los complejos ciclina/CDK esenciales para la progresión de la fase G1 y la entrada a la fase S. Estas proteínas también pueden regular la transición G2/M (Senderowicz, 2002).

2.3. Puntos de control del ciclo celular

Los puntos de control del ciclo celular son mecanismos de vigilancia y de control de calidad que se activan en momentos específicos a lo largo del ciclo, cuyo propósito es decidir si la célula puede continuar a la fase siguiente,

siempre y cuando la fase anterior se haya realizado libre de errores (Molinari, 2000; Grafi, 1998). Como resultado de ello, la principal responsabilidad de estos puntos de control es asegurar la correcta replicación del ADN, así como proteger, conservar y mantener la fidelidad del genoma de las células de la progenie (Giordano & Galderisi, 2010; Morgan, 2007).

Los puntos de control del ciclo celular están regulados por la interacción de los genes cuyo fin es promover o suprimir la división celular. Estos dos tipos de genes se denominan proto-oncogenes y genes supresores de tumores que promueven o inhiben respectivamente la progresión de la célula a través del ciclo celular (Ceveira *et al.*, 2012). La activación de estos puntos de control provoca la detención o arresto del ciclo celular mediante la modulación de las CDKs (Besson *et al.*, 2008). Si la reparación no es posible, las células deben ser dirigidas a un proceso de senescencia o muerte celular por apoptosis (Malumbres & Barbacid 2009). De esta forma se evita la replicación de posibles mutaciones del material genético.

Los puntos de control se presentan en cuatro etapas: en la transición G1/S, en S, en la transición G2/M y en la transición metafase/anafase de la mitosis.

2.3.1. Punto de control G1/S

El primer punto de control se establece al final de la fase G1 donde se verifica la presencia de factores de crecimiento y el tamaño celular. El punto G1/S controla la progresión del ciclo de G1 a S mediante la regulación de los complejos CiclinaD/CDK4-6 y CiclinaE/CDK2 (Beck *et al.*, 2010). Normalmente estos complejos fosforilan e inactivan la proteína Rb, lo que libera la proteína E2F induciendo así la transcripción de genes de fase S incluyendo ciclina E y A, pero en condiciones desfavorables, como daño en el ADN, p21 y p27 inhiben la formación de los complejos ciclina/CDKs mencionados anteriormente, lo que mantiene Rb sin fosforilar y unido a E2F, ocasionando un arresto del ciclo en la fase G1 (Lapena & Giordano, 2009).

2.3.2. Punto de control de la fase S

Este punto de control garantiza la correcta replicación del ADN, evitando el avance a la fase G2 del ciclo celular en caso de daño del material genético o de producirse defectos en la replicación cromosómica (Jeggo & Lobrich, 2006).

La replicación del ADN se inicia en múltiples orígenes distribuidos en varios cromosomas. Estos “orígenes de replicación” no se activan sincrónicamente, sino en diferentes momentos a largo de fase S. El control apropiado de esta fase implica la regulación de la activación de los orígenes individuales, así como la prevención de una doble activación de cualquier origen dentro de la misma célula (Tasat & Yakisich, 2010).

Se ha demostrado que cuando se inhibe la actividad de CDK2 durante la fase S, hay una carga inesperada de proteínas MCM en la cromatina que induce a la formación de horquillas de replicación. Además, hay un aumento del número de células con contenido de ADN de más de cuatro pares de cromosomas conjuntamente con la ausencia de p53, lo que sugiere que la sobre-replicación puede ocurrir como resultado de la inhibición de CDK2 (Zhu *et al.*, 2004).

2.3.3. Punto de control G2/M

El punto de control G2/M evita que las células entren en mitosis cuando sufren daños en el ADN durante la fase G2 o cuando llevan el ADN no reparado de G1 o S y han ingresado en la fase G2. Esto lo logran a través de la inhibición del complejo ciclinaB/CDK1 mediada por el secuestro, degradación e inhibición de la fosfatasa Cdc25 (Besson *et al.*, 2008).

2.3.4. Punto de control M

El último punto de control, denominado también punto de control de ensamblaje del huso mitótico, vigila el avance a lo largo de la fase de mitosis al controlar la correcta unión de los microtúbulos al huso mitótico (Musacchio, 2011).

La activación de este punto, provoca el bloqueo del ciclo y retrasa el inicio de

anafase hasta que todos los cinetocoros se unan al huso mitótico de forma bipolar. El complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C) es quien promueve la transición hacia anafase y regula en general la progresión de la mitosis (Musacchio & Salmon, 2007).

2.3.5. Alteraciones en los puntos de control

La división celular y la muerte celular son los dos procesos fisiológicos predominantes que regulan la homeostasis de los tejidos en el organismo adulto. En las células normales la diferenciación debe ser estrictamente regulado por los puntos de control, de otro modo la integridad funcional de los tejidos, órganos y sistemas estaría comprometida por tipos y cantidades inadecuadas de células (Ceveira *et al.*, 2012).

Debido a que la mayoría de células somáticas son quiecentes, el correcto control del re-ingreso, progresión y control del ciclo son fundamentales. (Revisado en Rizzolio *et al.*, 2010). Cuando existen alteraciones en los puntos de control o en la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular, se desencadenan patologías como: infarto de miocardio, apoplejía, aterosclerosis, trastornos neurodegenerativos y cáncer (Liu & Ander, 2012; Zhivotovsky & Orrenius, 2010), siendo éste último de nuestro particular interés.

2.4. Cáncer y ciclo celular

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

A diferencia de las células normales, las células cancerígenas poseen características importantes que incluyen: pérdida de la diferenciación, autosuficiencia en señales de crecimiento, potencial de replicación ilimitado, aumento de la capacidad de invasión y disminución de la sensibilidad a fármacos (Hanahan & Weinberg, 2011; Foster, 2008). Estos cambios son el resultado de mutaciones en el material genético que ocasionan pérdida e

inactivación de genes supresores tumorales o sobreexpresión en proto-oncogenes, así como inactivación o sobreexpresión de proteínas que participan en las vías de transducción de señales, en el ciclo celular y sus puntos de control (Foster 2008; Burgués *et al.*, 2005). Por lo tanto, la alteración de los mecanismos que regulan el ciclo celular es una causa común en el desarrollo de varios tipos de cáncer (Rizzolio *et al.*, 2010; Malumbres & Baracid, 2009).

Diversos análisis moleculares han demostrado que la actividad de los complejos ciclina/CDKs se encuentran alterados en tumores humanos (Revisado en Rizzolio *et al.*, 2010). Uno de los complejos ciclina/CDK más alterados en cáncer es el ciclinaD/CDK4 (Deshpande *et al.*, 2005). La actividad aberrante de este complejo, o la pérdida de pRB, que supone la pérdida del punto de restricción, provoca que la célula pueda proliferar sin necesidad de estímulos mitogénicos, lo que implica la activación de procesos tumorales (Rizzolio *et al.*, 2010; Deshpande *et al.*, 2005). Una mutación en el gen de la ciclina D1 o CDK4 ha sido reportada principalmente en cánceres epiteliales que incluyen: mama, pulmón, páncreas, gastrointestinal, de endometrio, vejiga, médula ósea, cabeza, cuello, linfomas, hígado, próstata, colon, sarcoma y melanoma (Rizzolio *et al.*, 2010). Dichas mutaciones modifican la estructura de la ciclina e impiden la unión al inhibidor INK4 (Deshpande *et al.*, 2005).

Por otro lado, una mutación en el gen de CDK6 se ha reportado en un pequeño grupo de cánceres mesenquimales que incluyen sarcomas y gliomas; además, está frecuentemente alterado en tumores linfoides que a menudo se asocian a traslocaciones cromosómicas (Rizzolio *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2002).

El gen que codifica CDK2 raramente se encuentra mutado, pero existen tipos relacionados con esta proteína, en los cuales los mutados son sus activadores y/o inhibidores.

La sobreexpresión de ciclina E es típica en cáncer de mama, en el cual, los niveles de esta proteína se encuentra aumentados en un 20%. Además, este porcentaje se incrementa según va aumentando el grado y estadio del tumor. En pacientes con cáncer de ovario, la sobreexpresión de ciclina E también se asocia con un mal pronóstico al igual que en linfomas (Revisado en Mazumder *et al.*, 2004). También se ha descrito que la ciclina A1 está sobre expresada en

leucemia y cáncer testicular. (Santamaría *et al.*, 2006).

2.4.1. Cáncer de colon

De los diferentes tipos de cáncer, el de colon, conjuntamente con el de recto, es uno de los más diagnosticados en todo el mundo, manteniendo una alta tasa de mortalidad en los últimos diez años (Jemal *et al.*, 2011). Excluyendo el cáncer de piel, el cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común diagnosticado en hombres y mujeres en los Estados Unidos. El cáncer de colon ha incrementado su incidencia en América Latina debido a los hábitos alimenticios de la población (OPS, 2008). Este tipo de cáncer, se encuentra entre los diez primeros tumores malignos del país y según el Registro de Tumores de Loja, este ocupa el sexto puesto en incidencia (Garrido & Yunga, 2010).

Este cáncer se desarrolla a partir de pólipos adenomatosos que surgen de la pared del intestino. Aproximadamente el 30% de los casos de cáncer de colon ocurren en personas con antecedentes familiares, de los cuales 5% es provocado por poliposis adenomatosa familiar (PAF) o es hereditario no asociado a poliposis (Jasperson *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que una ingesta de alcohol mayor a 30 g/d, está asociada con un riesgo elevado de cáncer de colon. Así mismo, la asociación positiva entre el consumo de alcohol y el cáncer de colon fue mayor entre los que tienen antecedentes familiares de cáncer colorrectal que entre los que no tienen un antecedente familiar (Cho *et al.*, 2012)

2.4.2. Tratamiento contra el cáncer

El tratamiento del cáncer se caracteriza por ser multidisciplinario, ya que utiliza cirugía, radioterapia y quimioterapia (Croke *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2008; Spira *et al.*, 2004). De estos, el más común es la quimioterapia, la cual se basa en la administración intravenosa de fármacos antineoplásicos que producen efectos citotóxicos en las células cancerígenas (Revisado en Guamán, 2012).

Los fármacos antineoplásicos se definen como sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento y/o proliferación de células tumorales (Goodman, 2003).

Uno de los aspectos negativos de estos fármacos, y por ende, de la quimioterapia, es que no son específicos, es decir, que además de actuar sobre células cancerosas actúan también sobre células normales, particularmente sobre aquellas que tienen un recambio rápido tales como células de la médula ósea y las de las mucosas ocasionando efectos adversos en los pacientes (Narang & Desai, 2009). Adicionalmente, después del tratamiento se puede generar resistencia y originar tumores secundarios (Revisado en Guamán, 2012). Es por ello que sigue siendo necesario encontrar nuevas terapias y fármacos contra el cáncer.

Los fármacos antineoplásicos existentes y los compuestos seleccionados para la evaluación como agentes potenciales contra el cáncer pueden ser de origen natural o sintético (Narang & Desai, 2009).

2.5. Antineoplásicos de origen natural

Durante décadas, los compuestos de origen natural han proporcionado estructuras novedosas con actividad anticancerígena, ya sea en su forma natural o modificados sintéticamente. Por ejemplo, los antibióticos antitumorales de origen microbiano incluyen las antraciclinas (doxorrubicina), bleomicina, dactinomicina (actinomicina) y mitomicina C (Mou *et al.*, 2011; Revisado en Narang & Desai, 2009).

También los metabolitos secundarios de plantas han demostrado ser un excelente depósito de nuevos compuestos con propiedades antineoplásicas (Nirmala *et al.*, 2011; Cragg *et al.*, 2009). Cuatro clases de compuestos derivados de plantas se utilizan ampliamente como agentes antitumorales, estos son los alcaloides de la vinca, las camptotecinas, las epipodofilotoxinas y los taxanos (Nirmala *et al.*, 2011; Revisado en Narang & Desai, 2009).

Los agentes anticancerígenos de origen natural usados actualmente, así como aquellos compuestos de este tipo que se encuentran en ensayos clínicos avanzados, presentan una diversidad estructural considerable (Revisado en Kinghorn *et al.*, 2009), así como mecanismos de acción variables.

2.5.1. Antineoplásicos que actúan en el ciclo celular

El proceso de búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer ha experimentado un cambio importante, se ha pasado de buscar antineoplásicos que destruyen las células tumorales hacia los que actúan sobre dianas moleculares que conducen a la transformación celular (Vermeulen *et al.*, 2003). El rol fundamental que desempeñan las CDK y otras quinasas en el control del ciclo celular y sus puntos de control plantean la posibilidad de diseñar estrategias terapéuticas que actúen sobre estas moléculas (Malumbres & Baracid, 2009); así, una de las estrategias más empleadas ha sido la inhibición directa de la actividad de las CDK (Revisado en Vermeulen *et al.*, 2003). Aunque su actividad anti-cáncer es reducida comparada con los quimioterapéuticos tradicionales, los fármacos inhibidores de CDKs son generalmente bien tolerados con perfiles aceptables de toxicidad en tejidos normales y sin los efectos genotóxicos característicos de la quimioterapia (Lapenna & Giordano, 2009).

Existen actualmente varios inhibidores selectivos de las CDKs que se encuentran en ensayos clínicos. En la tabla 3 se enlistan algunos de ellos.

Tabla 3. Antineoplásicos con acción inhibitoria de CDKs.

Inhibidor	CI ₅₀ (µM)	Referencia
Flavopiridol	0,45	Revisado en Lapenna & Giordano 2009; Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003
Dimetilaminopurina	120	Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003
Indirubina	10	Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003
Olomoucina	7	Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003
Suramina	4	Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003
Toyocamicina	0.88	Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003
Butirolactona	0.6	Revisado Vermeulen <i>et al.</i> , 2003

Fuente: Autor.

2.5.2. Triterpenos

Los triterpenos son metabolitos con un esqueleto de 30 átomos de carbono procedentes de la ciclación del 3S-2,3-epóxido-2,3-dihidroescualeno o del escualeno (Bruneton, 2001). Se encuentran ampliamente distribuidos y

formando parte de los órganos vegetales (Martín *et al.*, 2009). Su producción puede deberse también a estímulos como estrés biótico (Salminen *et al.*, 2008). Este tipo de compuestos se han aislado y caracterizado de diferentes fuentes en la naturaleza, especialmente en resinas, como ésteres o glucósidos (Revisado en Lee *et al.*, 2010). Pueden ser pentacíclicos, formados por cinco anillos de seis miembros o tetracíclicos, formados por cuatro anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros (Martín *et al.*, 2009). El grupo incluye un número muy grande de miembros de origen natural que cubren una variedad de grupos funcionales (Parra *et al.*, 2005), en los que se incluyen protostanos, lanostanos, holostanos, dammaranos, euphanos, tirucallanos, tetranortriterpenos, quasinoideos, lupanos, oleananos, friedelanos, ursanos, hopanos, isomalabaricanos, saponinas y cicloartanos (Petronelli *et al.*, 2009); muchos de los cuales presentan actividades antitumorales y propiedades citotóxicas contra varias líneas celulares cancerígenas (Revisado en Martín *et al.*, 2009; Parra *et al.*, 2005).

De los triterpenoides antitumorales descritos en la literatura, algunos parecen ejercer su actividad interfiriendo con la replicación del ADN, típicamente por la inhibición de la ADN polimerasa o la topoisomerasa II (Revisado en Parra *et al.*, 2005).

2.5.3. Argentatina B

La Argentatina B es un triterpeno de tipo cicloartano (Figura 4), aislada de la resina de *Parthenium argentatum* Gray, arbusto nativo del norte de México y del sur de Estados Unidos (Parra *et al.*, 2006).

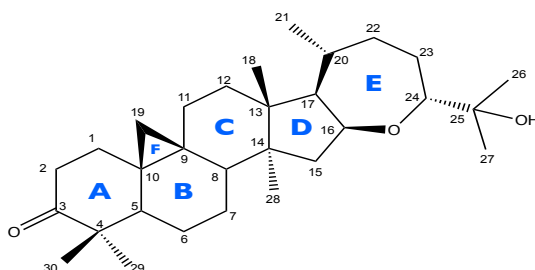


Figura 4. Estructura química de Argentatina B (1).

Fuente: Parra *et al.*, 2006.

Este cicloartano ha demostrado inhibir el crecimiento de varias líneas de cáncer humano, presentando una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) entre 20.22 a 79.38 µM (Ordoñez, 2010; Parra *et al.*, 2005) observando una mayor sensibilidad a la molécula en la líneas celular de cáncer de Colon HCT15 (Parra *et al.*, 2005) y RKO, donde induce muerte celular independiente de apoptosis (Ordoñez, 2010).

En cuanto a genotoxicidad, la Argentatina B mostró ser genotóxica mediante ensayo cometa (Ramírez, 2008) y no genotóxica mediante ensayo de micronúcleos (Parra *et al.*, 2005), en ambos casos sobre linfocitos humanos.

Estudios realizados por Romero *et al.*, 2012, demostraron que la Argentatina B puede ser considerado como un agente citostático, por cuanto induce arresto en la fase G1 del ciclo celular.

2.5.4. Derivados de Argentatina B

Los análogos de compuestos naturales a menudo han sido sintetizados para mejorar su eficacia o sus perfiles de toxicidad. Por ejemplo, el carboplatino fue desarrollado como un análogo del cisplatino con la toxicidad renal reducida, doxorubicina es un análogo de daunorrubicina que reduce su cardiotoxicidad, y el topotecán es un análogo de camptotecina con mejor perfil de toxicidad (Revisado en Narang & Desai, 2009).

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. (Parra *et al.*, 2006). Bajo estos conceptos, se sintetizaron derivados de Argentatina B, algunos de ellos con mayor actividad frente a células tumorales humanas (Parra *et al.*, 2006). Además, estudios de genotoxicidad mediante ensayo cometa de los derivados han reportado que la modificación de la estructura química de Argentatina B influye sobre la actividad biológica de la molécula, en algunos casos disminuyendo el daño genotóxico (Ojeda, 2012; Ramirez, 2011; Bautista, 2010).

Sin embargo el efecto de las modificaciones químicas realizadas a esta molécula sobre el ciclo celular no ha sido estudiado. Es por eso que en el presente trabajo se evaluó el efecto de nueve derivados de Argentatina B en la distribución del ciclo celular, empleando el ensayo de citometría de flujo para cuantificar como biomarcador la cantidad de ADN presente en la célula.

2.6. Biomarcadores

Un biomarcador se define tradicionalmente como una “característica” que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Atkinson *et al.*, 2001). En el campo de la investigación en busca de nuevas terapias contra el cáncer, estas “características” pueden consistir en la determinación de genes y proteínas específicas, productos de procesos celulares (Maiese *et al.*, 2009); así, como la medición de parámetros de carácter anatómicos, fisiológicos y/o morfológicos de las células.

2.6.1. Biomarcadores del ciclo celular

La determinación de la proliferación celular puede ser usada para determinar la respuesta de células a estímulos tóxicos particulares (Freshney, 2010).

Durante las últimas décadas se han descrito varios métodos para analizar la progresión del ciclo celular. Estos métodos se pueden agrupar en tres categorías.

- En la primera, se encuentran los métodos que se basan en la medición de las características celulares una sola vez en el tiempo. Estos análisis puede ser univariados, cuando solamente mide el contenido ADN, o multivariado (multiparamétrico), cuando además del contenido de ADN se mide otro atributo que generalmente suele ser una característica metabólica o molecular que indica si la célula se encuentra en estado quiescente o proliferativo (por ejemplo, EGF (***E**pidermic **g**rowth **f**actor*), PDGF (***P**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor*), VEGF (***V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor*), etc.) (Revisado Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

- En el segundo grupo se encuentran los métodos que se basan en mediciones en lapsos de tiempo a poblaciones de células a las que se ha sincronizado su ciclo celular o cuya progresión a través del ciclo fue detenido por un agente de detención en un punto específico del ciclo. Adicionalmente se realizan mediciones multiparamétricas que principalmente incluyen medición de ciclinas identificadas por técnicas inmunológicas como Inmunoprecipitación, Inmunohistoquímica y Western Blot. Estos métodos revelan la cinética de la progresión de la célula a través del ciclo, permitiendo identificar las rutas de acción (Revisado Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).
- Una tercera categoría agrupa a los métodos que se basan en la incorporación de la timidina analógica 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), a menudo combinada con mediciones del contenido de ADN. En estos métodos se puede realizar una sola medición o realizarlas a intervalos de tiempo. La BrdU incorporada se detecta ya sea citoquímicamente, basado en el uso de los colorantes de ADN, tales como Hoechst, cuya fluorescencia se interrumpe mediante la BrdU, o inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos para BrdU. La medición a intervalos de tiempo de las células marcadas con BrdU permite estimar su tasa proliferación. (Revisado Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

2.6.1.1. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo

El contenido de ADN es una de las características celulares más medidas. Su cuantificación sirve para evaluar el nivel de ploidía, la posición de la célula en el ciclo celular y también permite estimar la frecuencia de células apoptóticas que se caracterizan por un contenido de ADN fraccionado (Darzynkiewicz *et al.*, 2010). Para ello se emplean diversos métodos; de los cuales la citometría de flujo es el más empleado (D'Urso *et al.*, 2010).

Un citómetro de flujo es un instrumento que “ilumina” las células (u otras partículas) a medida que fluyen individualmente delante de una fuente de luz. Posteriormente detecta y correlaciona las señales obtenidas de la iluminación celular. Fundamentado en ese mecanismo, la determinación del ciclo celular

utiliza Ioduro de Propidio (IP) como fluorocromo, el cual tiene la capacidad de unirse estequiométricamente al ADN y requiere luz azul como fuente de excitación (por ejemplo láser de ion argón 488 nm), donde la cantidad de señal fluorescente obtenida es directamente proporcional a la cantidad de ADN (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

Puesto que existen diferencias en el contenido de ADN entre las células pre-replicas (fase G₀/G₁) en comparación con las células en replicación (fase S) y a la células post-replicas mas las que se encuentran en mitosis (G₂/M) se puede discriminar entre cada una de las fases (Figura 5.A) (Darzynkiewicz *et al.*, 2010). Así, la distribución del contenido de ADN de una población de células en crecimiento exponencial típicamente se compone de dos picos (células en G₁/G₀ y las fases G₂/M) y un valle de células en fase S (Figura 5.B).

Debido a que el IP también marca el ARN de doble cadena, este último es degradado mediante la adición de ARNasa (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

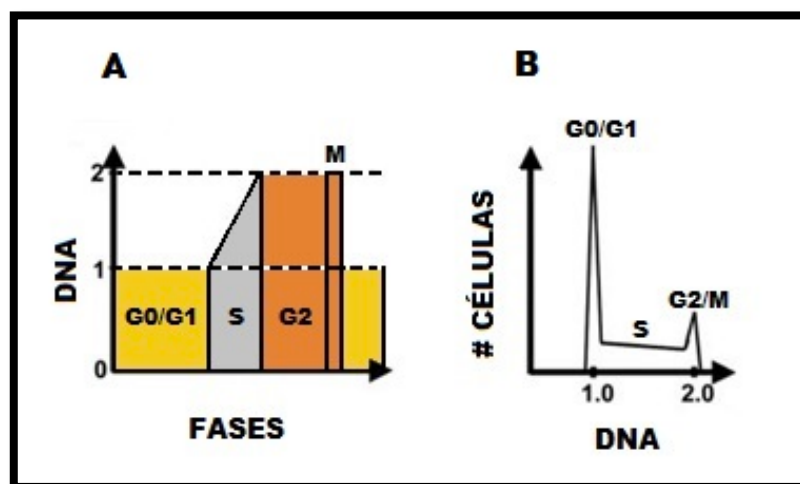


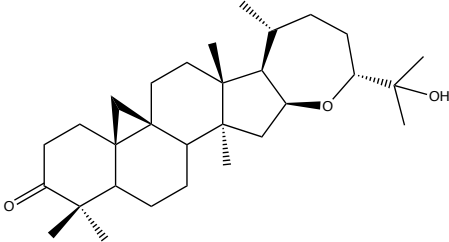
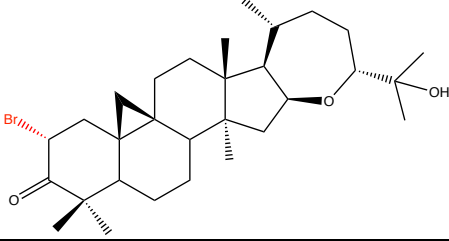
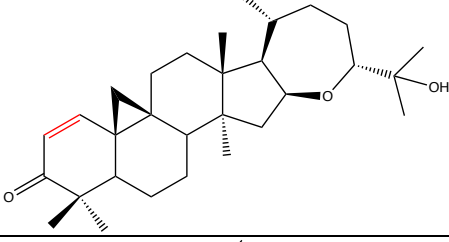
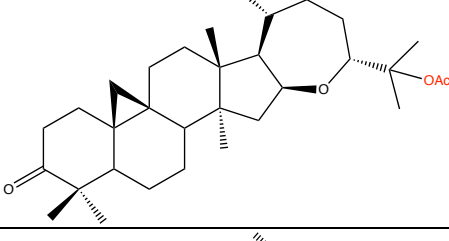
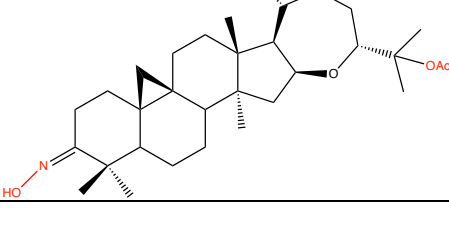
Figura 5. Representación gráfica del contenido de ADN en el ciclo celular. **A)** Las células post-replicas (G₂/M) contienen el doble de ADN que las células pre-replicas (G₀/G₁). **B)** Histograma de frecuencias de la población celular obtenido mediante citometría de flujo, donde las células en fase G₀/G₁ y G₂/M presentan picos según la cantidad de ADN, mientras las células en fase S se distribuyen entre los picos. **Fuente:** Darzynkiewicz *et al.*, 2010.

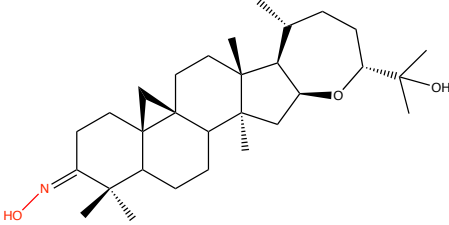
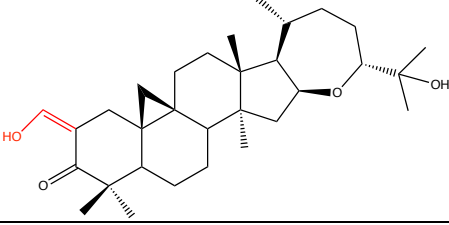
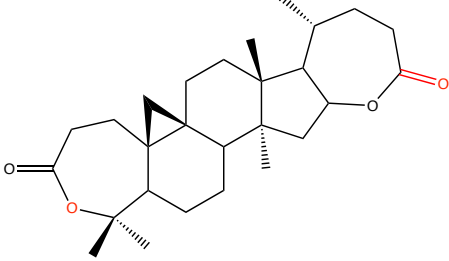
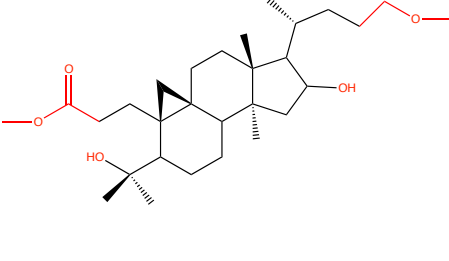
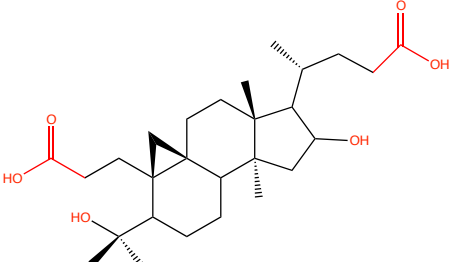
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Compuestos de estudio

Se emplearon nueve derivados de Argentatina B, los cuales se muestran en la Tabla 4 y fueron donados por el Ing. Juan Carlos Romero del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

Tabla 4. Argentatina B (1) y los nueve derivados estudiados.

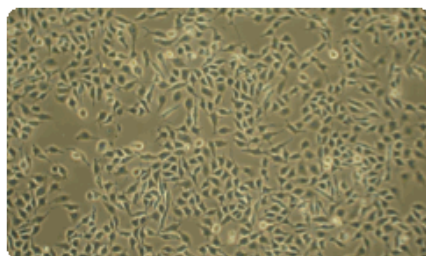
Nº	Nombre trivial	Nombre IUPAC	Estructura
1	Argentatina B	(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	
2	2 α -bromo de Argentatina B	2 α -Bromo-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	
3	α,β insaturado de Argentatina B	(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona	
4	Acetilado de Argentatina B	25-O-acetil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	
5	Oxima acetilada de Argentatina B	25-O-acetil-3-oxima-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	

6	Oxima de Argentatina B	3-oxima-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	
7	Formilado de Argentatina B	2-formil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	
8	Dilactona de Argentatina B	(16S,17R,20S)-25-nor-cicloartan-3,24 dilactona	
9	Dilactona apertura metanol de Argentatina B	1a -(2-metoxicarboniletil) -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.	
10	Dilactona apertura agua de Argentatina B	1a-(2-carboxietil)-2-(1-metil-1-hidroxietil)-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	

Fuente: Autor, modificado de Juan Carlos Romero.

3.2. Cultivo celular

Se empleó como modelo biológico la línea celular tumoral humana de colon RKO (Fotografía 1), donada por la Dra. Patricia Ostrosky, investigadora del Instituto de Biomédica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).



Fotografía 1. Células de cáncer de colon RKO. Microscopio invertido ZEISS (40X).

Fuente: Autor.

3.2.1. Medio de cultivo y mantenimiento celular

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de Antibiótico-Antimicótico (Penicilina G sódica 100UI/mL, estreptomocina sulfato 100µg/mL y Anfotericina B 0,25g/mL) y L-Glutamina 20mM al 1%. Los cultivos fueron incubados y mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

3.3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

En la figura 6 se presenta un esquema general del ensayo. Los aspectos básicos se explican a continuación.

3.3.1. Control negativo

Se empleó como control negativo Etanol al 0,1% por cuanto los derivados de Argentatina B a probar se disolvieron a una concentración máxima de 0,1% (v/v) del mismo.

3.3.2. Control positivo

Se utilizó como control positivo Doxorubicina 1µM, un quimioterapéutico utilizado comúnmente en el tratamiento de muchos tipos de cáncer incluido cáncer de colon (Park *et al.*, 2012). Se ha reportado que se puede emplear este compuesto tanto en estudios citotóxicos como citostáticos a dosis comprendidas entre 0,1µM a 8µM en varias líneas tumorales (Park *et al.*, 2012; Sadeghi-aliabadi *et al.*, 2010; Palacios, 2009) siendo 1µM para las células de cáncer de colon RKO una concentración cercana a la CI₅₀ de la molécula (Ordoñez, 2010; Guamán 2009). Se conoce adicionalmente que la

Doxorubicina ocasiona tanto muerte celular por apoptosis como arresto en la fase G2 del ciclo celular (Park *et al.*, 2012).

3.3.3. Técnica

Células RKO procedentes de cultivos en fase exponencial a una confluencia no mayor al 80% se sembraron multiplatos de 6 pocillos con una densidad de $2,4 \times 10^4$ células/pocillo y se incubaron durante 24. Posteriormente, se colocó medio de cultivo fresco con la CI_{50} de cada uno los derivados de Argentatina B (Tabla 5), así como los controles negativo y positivo. Transcurridas 24 horas se desechó el medio, se colocó tripsina en los pocillos hasta lograr la disgregación completa de las células, se adicionó medio con SFB para inactivar la tripsina y se recogió en tubos de 1.5mL, los mismos que fueron centrifugados durante 5 minutos a 3500 r.p.m. y 4°C. Posteriormente se realizó un lavado con PBS, otro con PBS-etanol (1:1) y se fijó con etanol al 70% durante 24 horas. Por último, después de otro lavado con PBS, se re-suspendió el sedimento celular en 200µL de solución de tinción IP [0.1% (v/v) Triton X-100, 10µg/mL PI y 100µg/mL RNasa A libre de DNasa en PBS] en tubos de citometría. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos.

La distribución de las fases del ciclo celular se analizaron en un citómetro BD FACSCanto™ en las siguientes condiciones: excitación 488nm a 536nm. Emisión: Long pass: 600nm a 610nm.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, en tres repeticiones independientes.

Tabla 5. Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) de los derivados de Argentatina B evaluados sobre células RKO.

Molécula	CI_{50} (µM) ± E.E.	Molécula	CI_{50} (µM) ± E.E.
1	25.04 ± 0.38	6	49.84 ± 0.57
2	22.04 ± 0.38	7	31.13 ± 0.28
3	23.80 ± 0.31	8	44.95 ± 0.34
4	82.08 ± 0.89	9	84.13 ± 0.02
5	70.52 ± 0.75	10	98.99 ± 0.03

Fuente: Bailón *et al.*, 2012.

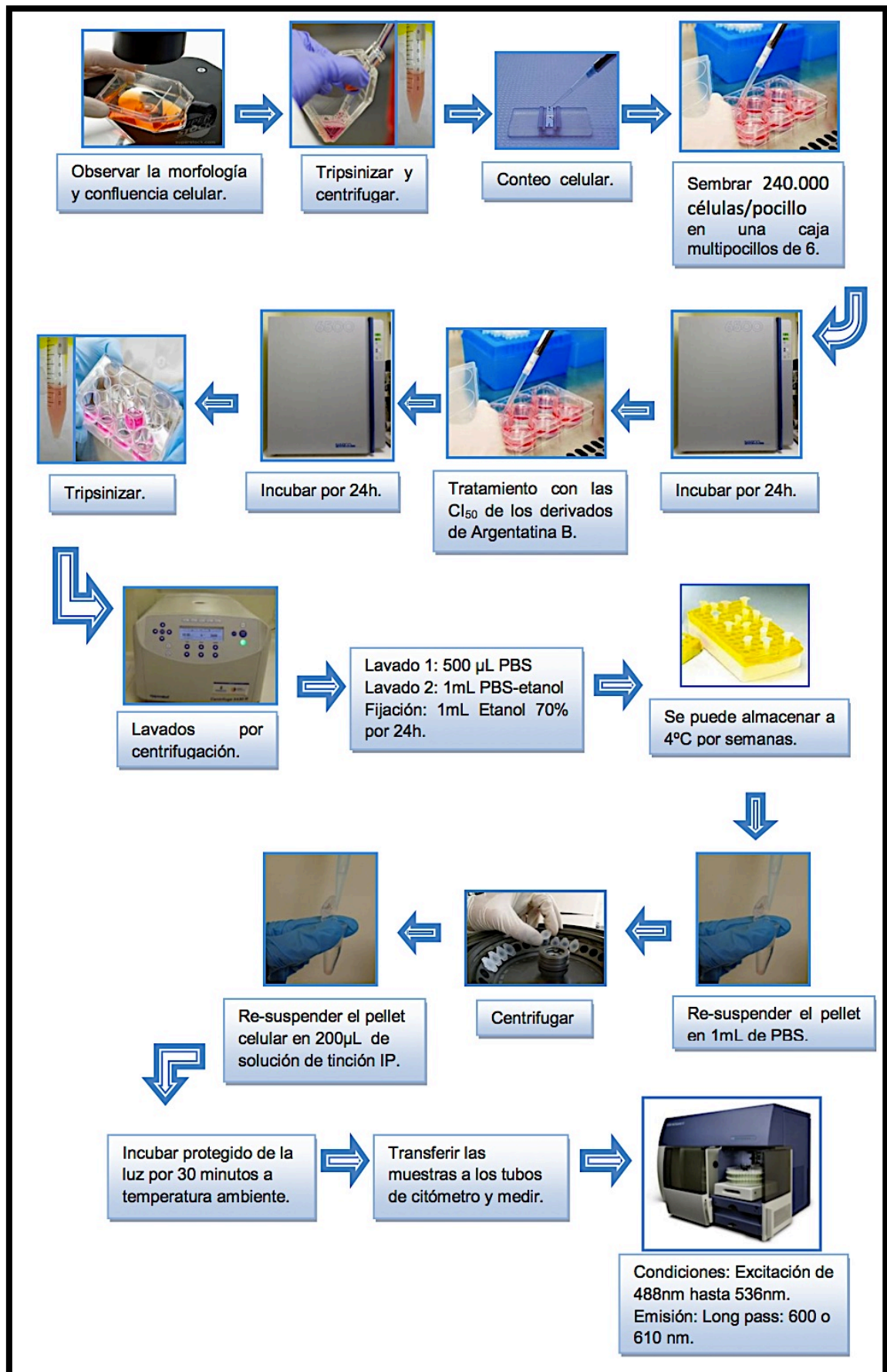


Figura 6. Esquema del ensayo de ciclo celular mediante citometría de flujo. **Fuente:** Autor.

3.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos del citómetro de flujo se calcularon las medias y los errores estándar de la media de cada una de las fases del ciclo celular. Estos valores fueron comparados usando ANOVA con post test de Dunnett y Turkey con el programa estadístico GraphPad Prism 5. Se aceptaron diferencias estadísticas con un nivel de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Luego del análisis mediante citometría de flujo para determinar la distribución de la población total en las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) de células RKO expuestas por 24 horas a las CI_{50} de 9 derivados de Argentatina B, se observaron los siguientes resultados:

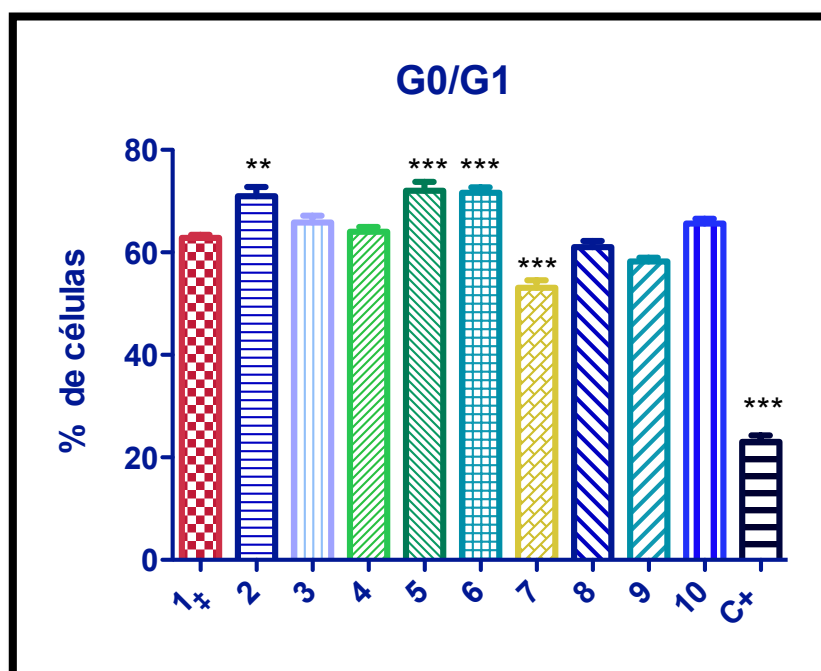
Las células tratadas con EtOH al 0,1% (control negativo) mostraron un ciclo celular normal, siendo los porcentajes de G0/G1= 50.30; S= 26.58 y G2/M= 23.38. Un efecto similar se observó únicamente en las células tratadas con el derivado 7, donde los porcentajes de G0/G1, S y G2/M fueron de 53.86, 20.22 y 25.93 respectivamente. Tras el análisis estadístico se demostró que no existe diferencia significativa entre estos dos tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del ciclo celular de células RKO expuestas a las CI_{50} de Argentatina B y de nueve derivados.

Tratamiento*	G0/G1		S		G2/M	
	%	P value	%	P value	%	P value
Control Negativo						
EtOH	50.30 ± 2.84		26.58 ± 3.67		23.38 ± 2.36	
Control Positivo						
Dox 1µM	22.86 ± 3.59	***	13.79 ± 2.72	***	65.35 ± 5.77	***
Argentatina B ‡						
IC ₅₀	62.83 ± 1.45	***	20.43 ± 1.14	**	16.74 ± 0.30	***
Derivados de Argentatina B						
2	70.98 ± 4.31	***	19.44 ± 4.06	***	9.58 ± 0.79	***
3	65.84 ± 3.29	***	20.81 ± 3.68	**	13.35 ± 2.25	***
4	64.08 ± 2.32	***	17.71 ± 3.76	***	18.26 ± 3.12	***
5	72.06 ± 4.26	***	12.88 ± 3.15	***	15.07 ± 1.75	***
6	71.65 ± 2.60	***	15.16 ± 3.53	***	13.19 ± 1.29	***
7	53.86 ± 4.29	ns	20.22 ± 3.67	**	25.93 ± 3.05	ns
8	61.01 ± 2.49	***	23.99 ± 1.63	Ns	15.00 ± 1.90	***
9	58.26 ± 1.44	***	23.90 ± 2.14	Ns	17.85 ± 1.29	***
10	65.64 ± 1.86	***	19.98 ± 0.64	**	14.39 ± 2.22	***

Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en tres experimentos por duplicado, n=6. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en comparación con el control de EtOH a $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) analizados con ANOVA y post-test de Dunnett. ‡ Datos de referencia. **Fuente:** Autor.

En las células tratadas con los compuestos **2, 3, 4, 5, 6, 8, 9** y **10**, se observó un aumento estadísticamente significativo de las células en fase G0/G1 después del tratamiento en comparación con el control, así como una disminución de las células en S y G2/M (Tabla 6), lo cual indica un efecto citostático por arresto en G0/G1. De éstos, los tratamientos con los derivados **3, 4, 8, 9, y 10**, aumentaron los porcentajes de células en G0/G1 de manera similar a lo observado en Argentina B (**1_‡**) (Gráfica 1).



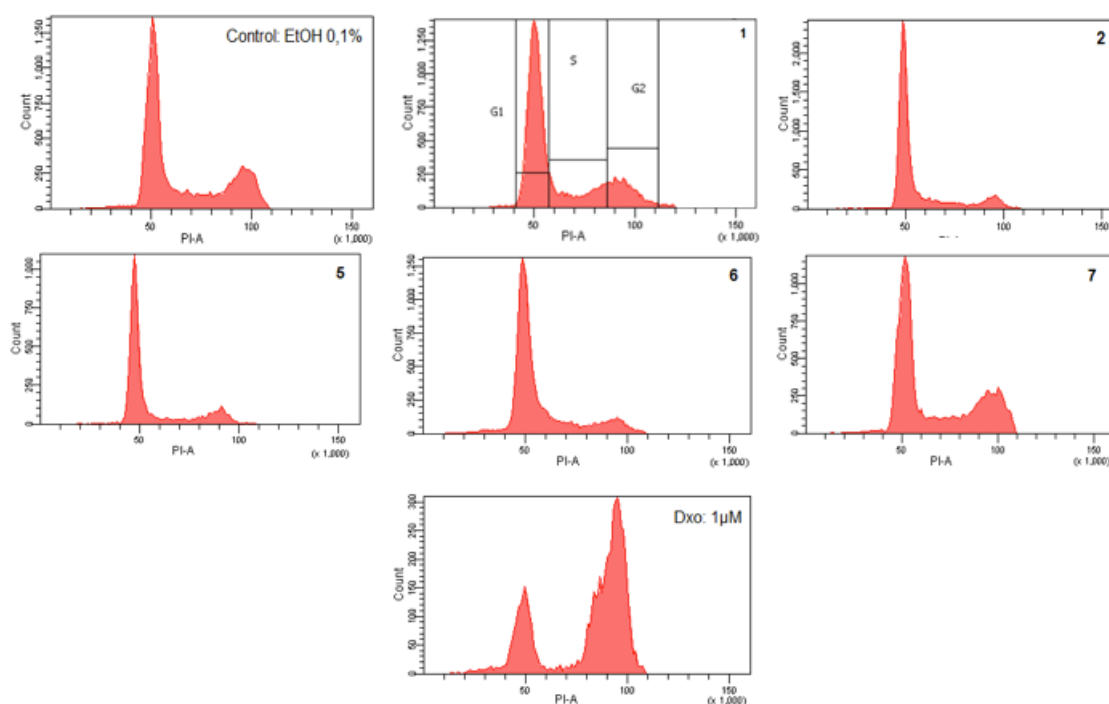
Gráfica 1. Análisis del ciclo celular de células RKO expuestas a las CI_{50} de Argentina B y de nueve derivados. Se representa el porcentaje de células en G0/G1 \pm E.E, n=6. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en comparación con Argentina a $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).
 \ddagger Datos de referencia. **Fuente:** Autor.

Los compuestos que presentaron mayor efecto citostático fueron los derivados **2, 5 y 6**. Los porcentajes de cada fase del ciclo celular para el derivado **2** fueron de 70.98 en G0/G1, 19.44 en S y 9.58 en G2/M, para el derivado **5** 72.06 en G0/G1, 12.88 en S y 15.07 en G2/M, mientras que para el derivado **6** fueron de 71.65 en G0/G1, 15.16 en S y 13.19 en G2/M (Tabla 6). Los tres derivados mostraron arresto en G0/G1 incluso mayor al ocasionado por Argentina B (**1_‡**), presentando diferencia estadísticamente significativa mediante ANOVA con post-test de Turkey (Gráfica 1). El mismo análisis mostró

que no existe diferencia significativa en el efecto de estos tres compuestos comparados entre sí.

En cuanto al control positivo, tras el tratamiento con Doxorubicina 1 μ M, existió un aumento del porcentaje de células en G2/M y una disminución del porcentaje de células en G0/G1 y S (Tabla 6).

En la Gráfica 2 se muestran los histogramas de ADN obtenidos, en donde las células del control negativo tienen un patrón típico de contenido de ADN dividido en las fases del ciclo celular, distribución similar a la del derivado 7. Para los derivados 2, 5 y 6 se observa un aumento en la fase G0/G1 y disminución de las fases S y G2/M más notoria que en Argentatina B (1 μ), mientras que para el control positivo (Doxorubicina 1 μ M) se muestra que induce detención del ciclo celular por arresto en G2/M.



Gráfica 2. Ciclo celular de células RKO expuestas a las CI_{50} de Argentatina B, derivados y los controles. Los histogramas son los más representativos y muestran la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. **Fuente:** Autor.

5. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que mientras las células normales conservan sus puntos de control del ciclo celular funcionales, en las células cancerígenas éstos se encuentran defectuosos (Gabielli *et al.*, 2012; Malumbres, 2011), ocasionando la proliferación celular incontrolada característica del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011); por lo que la inhibición del ciclo celular se ha convertido en uno de los objetivos principales para el manejo y el tratamiento de tumores (Foster, 2008; Schwartz & Shah, 2005).

En la búsqueda de agentes potenciales para el tratamiento de pacientes con cáncer, se ha sugerido el uso de triterpenos debido a su impresionante diversidad estructural y su amplia actividad biológica (Sporn *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2010). Adicionalmente, partiendo de estos triterpenos naturales, es posible obtener derivados con una mayor actividad (Yadav *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2006).

A partir de Argentatina B, triterpeno de tipo cicloartano aislado de *Partenium argentatum* Gray, que ha demostrado inhibir el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer humano (Romero *et al.*, 2012; Parra *et al.*, 2006), se obtuvieron algunos derivados y se determinaron sus CI_{50} (Bailón *et al.*, 2012). De éstos, nueve fueron estudiados en el presente trabajo con el fin de evaluar el efecto de sus CI_{50} en la distribución del ciclo celular de células de cáncer de colon RKO.

Los resultados de este estudio muestran que casi todos los derivados probados tienen la capacidad de interferir en el ciclo de células de cáncer de colon RKO, siendo la excepción el derivado **7**, el cual no presenta efecto citostático ya que los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo fueron similares a los observados en el control negativo. En estudios anteriores con otros triterpenos y Argentatina B, se ha demostrado que la incorporación de un grupo formilo (aldehído) en C2, el cual caracteriza al derivado **7**, aumentan la potencia citotóxica en varias líneas celulares (Sporn *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2006). Sin embargo, si se observa los valores de la CI_{50} reportados para Argentatina B y

los derivados (Tabla 5), la potencia inhibitoria del crecimiento del derivado **7** disminuye con respecto a la de Argentatina B, ya que la CI_{50} del derivado **7** es mayor. Adicionalmente, como se demuestra en este estudio, el efecto inhibitorio en G0/G1 reportado para Argentatina B desaparece en el derivado **7**. Así, a las dosis y tiempos probados, mientras Argentatina B induce arresto en G0/G1, el derivado **7** podría estar induciendo la inhibición del crecimiento por un efecto citotóxico.

Los otros ocho derivados estudiados, disminuyen la proliferación de células RKO por arresto en G0/G1, y la reducción de las fases S y G2/M (Tabla 6; Gráfica 1), efecto similar al ya reportado para Argentatina B en la misma línea celular (Romero *et al.*, 2012), y para varios triterpenos como ácido ursólico (Chen *et al.*, 2010), ácido betulínico (Yadav *et al.*, 2010), ácido maslínico (Reyes-Zurita *et al.*, 2011), lupeol (Petronelli *et al.*, 2009) y triterpenos cicloartanos como α -L-arabinosido del Ácido Mólico (Wong *et al.*, 2012), Acteina (Einbond *et al.*, 2004), 23-epi-26-deoxyacteina (Einbond *et al.*, 2004), cimiracemosida A (Einbond *et al.*, 2004), y varios glucósidos de cicloartanos aislados de *Astragalus eremophilus* (Perrone *et al.*, 2008) en varias líneas celulares tumorales. Sin embargo, existen moléculas que inhiben la proliferación celular y que a pesar de poseer estructuras similares a los derivados de Argentatina B no inducen arresto en G0/G1, sino arresto en G2/M, encontrándose dentro de estas triterpenos como ácido oleánico (Wei *et al.*, 2012), Curcubitacina E (Huang *et al.*, 2012) Curcubitacina II A (Boykin *et al.*, 2011) y varios glucósidos de cicloartanos aislados de *Cimicifuga dahurica* (Yadav *et al.*, 2010), lo que demuestra la variedad de respuesta biológica que se puede obtener de este tipo de moléculas.

De los ocho derivados que inducen arresto en G0/G1, los derivados **3**, **4**, **8**, **9**, y **10** aumentan los porcentajes de células en G0/G1 de manera similar a Argentatina B (Gráfica 2) es decir, el efecto no difiere del mostrado por la molécula precursora.

Estudios de estructura-actividad han propuesto que modificaciones de triterpenos que incluyen la presencia de un doble enlace entre C1-C2 en el anillo A como en el derivado **3**, así como la presencia de un grupo acetilo en la

posición C-25 de ciertos cicloartanos como en el derivado **4**, aumentan significativamente la potencia citotóxica y citostática con respecto a sus precursores. (Sporn *et al.*, 2011; Bishayee *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2010; Einbond *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2006). No obstante, se ha visto que estas modificaciones en Argentatina B aumentaron los valores de CI_{50} , efecto que como se puede ver en la Tabla 5 también se dió en los derivados **8**, **9** y **10**. Sin embargo para el derivado **8** el aumento de las CI_{50} se justifica puesto que se ha visto que presencia del grupo isopropilo en el C25, ausente en **8**, es fundamental para el efecto inhibitorio de Argentatina B (Parra *et al.*, 2006). Así mismo, Sporn *et al.*, 2011 ha demostrado que la apertura del anillo A del ácido oleánico disminuye la actividad de la molécula, efecto similar al observado para los derivados **9** y **10**, en los cuales, adicional a la apertura del anillo A, existe una apertura en el anillo E.

En este estudio se demuestra que aunque los valores de CI_{50} aumenten en los derivados **3**, **4**, **8**, **9**, y **10** con respecto a Argentatina B, el efecto sobre el ciclo celular se mantiene.

Los compuestos **2**, **5** y **6** mostraron un arresto en G0/G1 mayor al de Argentatina B (Gráfica 2), teniendo estos tres compuestos porcentajes de arresto similares (Tabla 6). Si bien las CI_{50} de los derivados **5** y **6** son mayores a Argentatina B, los resultados de este estudio muestran que la adición de un grupo oxima en C3 aumenta la citostaticidad de Argentatina B.

Por su parte, el derivado **2** posee una CI_{50} menor a la Argentatina B, corroborando que la adición de un grupo Bromo en C2, aumenta la potencia citotóxica (Parra *et al.*, 2006) y como se demuestra en nuestros resultados, aumenta la potencia citostática de esta molécula. Así, las modificaciones químicas que se realizaron para obtener derivados **2**, **5** y **6** (Figura 7), han permitido obtener tres nuevos compuestos citostáticos con un efecto mayor al reportado para la molécula original.

Un requisito previo básico de un agente quimiopreventivo debe ser que posee poco o ningún efecto sobre la integridad de células normales y saludables (Sangjun *et al.*, 2009). En trabajos previos de evaluación de genotoxicidad

mediante ensayo cometa, se demostró que Argentatina B induce daño genotóxico en linfocitos humanos (Ramírez, 2008), al igual que el derivado **2** (Ramírez *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto genotóxico de los derivados **5** y **6** es menor, siendo el derivado **6** el menos genotóxico (Bautista, 2010). Esta característica es sin duda beneficiosa para proponer a estos derivados como posibles agentes anticancerígenos. No obstante, no se podría descartar el derivado **2**, a pesar de poseer efecto genotóxico, dado su baja CI_{50} y su efecto sobre el ciclo celular.

La evidencia acumulada sugiere que las combinaciones de dos o más moléculas con potencial antineoplásico ofrecen la posibilidad de reducir sus dosis y/o sus efectos adversos (Bishayee *et al.*, 2011, Cipak *et al.*, 2006), por lo que la combinación de **2** con **5** y/o **6** deberían ser probadas a fin de determinar si se logra reducir la genotoxicidad de **2** así como aumentar la capacidad de arresto en G0/G1 del ciclo celular de éstas tres moléculas.

Los efectos beneficiosos de los “fármacos moduladores” de origen natural se basan generalmente en dos criterios: la potenciación de la actividad del compuesto “principal”, sin efectos secundarios adicionales, o la reducción de los efectos secundarios negativos de compuesto principal sin afectar a su eficacia terapéutica. (Cipak *et al.*, 2006). Debido a que las células cancerígenas son resistentes a la detención del crecimiento, la combinación de agentes antineoplásicos, de carácter citostático con citotóxicos puede desencadenar una citotoxicidad mayor (Blagosklonny, 2004). Por ejemplo, se ha visto que la combinación del triterpeno ácido oleánico (OA) con el quimioterapéutico antitumoral doxorubicina incrementa el efecto citotóxico de ésta molécula (Cipak *et al.*, 2006). Así, es posible que los derivados de Argentatina B, especialmente los derivados **5** y **6** se puedan utilizar en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos o con la terapia de radiación para mejorar su eficacia terapéutica y limitar efectos secundarios no deseados (Bishayee *et al.*, 2011). Ensayos posteriores serán necesarios para determinar si el uso de nuestros derivados de Argentatina B citostáticos aumentan el efecto de otros agentes citotóxicos.

No se conoce el mecanismo de acción por el cual los derivados de Argentatina B inducen el arresto en G0/G1 reportado en esta investigación, sin embargo se

ha observado que este tipo de arresto por triterpenos y triterpenos ciloartanos esta dado por disminución del nivel de la ciclina D1, D2, D3, CDK2, CDK4 y la forma hiperfosforilada de la proteína pRb así como el incremento de p21Cip1 (Revisado en Yadav *et al.*, 2010; Petronelli *et al.*, 2009; Einbond *et al.*, 2004). Este mecanismo podría ser aplicable para Argentatina B y sus derivados, aunque se necesitan estudios adicionales para confirmarlo.

6. CONCLUSIONES

- Ocho de los nueve derivados de Argentatina B estudiados inhiben la proliferación en células de cáncer de colon RKO mediante arresto en G0/G1.
- Las modificaciones químicas realizadas en Argentatina B (1), específicamente los cambios para la obtención de los derivados 2, 5 y 6 aumentaron su potencia citostática (Figura 7).

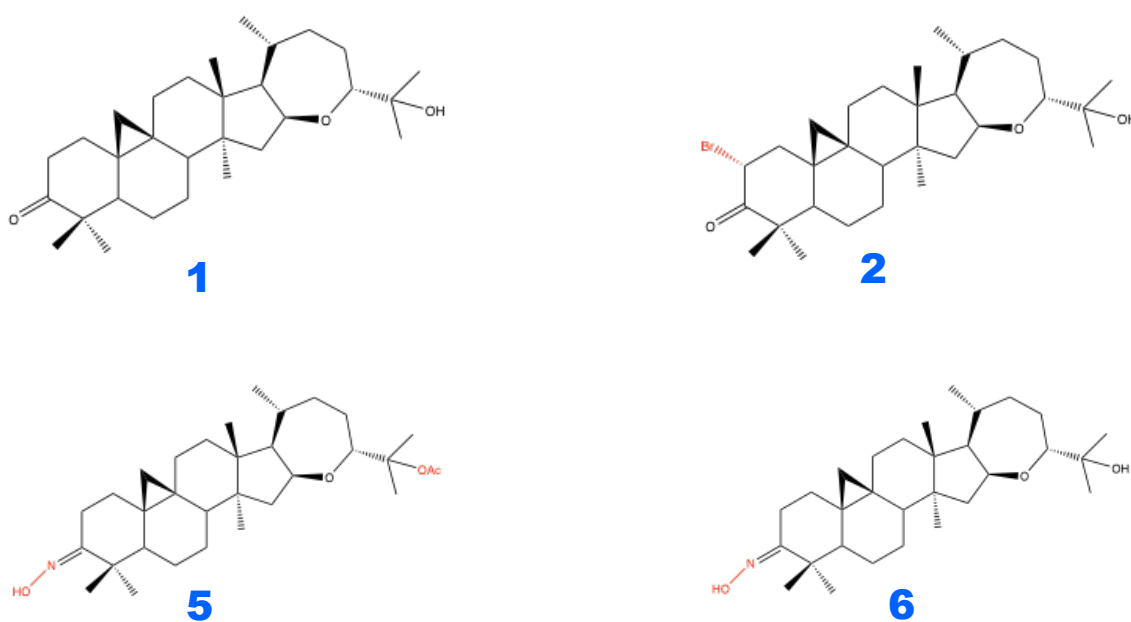


Figura 7. Estructura química de Argentatina B (1) y los tres derivados que ocasionan mayor arresto en G0/G1. Fuente Autor

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (4th edition). New York: Garland Science.
- American Cancer Society. (2013). *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta. American Cancer Society.
- Aressy, B. & Ducommun, B. (2008). Cell Cycle control by CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(8), 818-824.
- Atkinson, A., Colburn, W., DeGruttola, V., DeMets, D., Downing, G., Hoth, D., Oates, J., Peck, C., Schooley, R., Spilker, B., Woodcock, J. & Zeger, S. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Bailón, N., Romero, J., Ramírez, M., Cabrera, H., Villacís, J., Zentella, A., Ostrosky P. & Martínez M. (2012). Argentatine B Derivatives: Comparative analysis of cytotoxic, cytostatic and genotoxic effect. Presentado en "International Symposium on Medicinal Plants and natural products" llevado a cabo del 3 al 5 de Diciembre del 2012 en la Pontificia Universidad Católica de Quito
- Bautista G. (2010). Evaluación del efecto genotóxico mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de los derivados de Argentatina B ((16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 3-oxima, 25-O-acetil, 2 α -ciano, y 2-formil. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- Beck, H., Nähse, V., Yoo, M., Groth, P., Clancy, T., Lees, M., Jørgensen, M., Helleday, T., Syljuåsen, R. & Sørensen, C. (2010). Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *The Journal of Cell Biology*, 188(5), 629-638.
- Besson, A., Dowdy, F. & Roberts, J. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*, 14(2), 159-169.

- Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N. & Perloff, M. (2011). Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 16, 980-996.
- Blagosklonny, M. (2004). Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene*, 23(16), 2967-2975.
- Boykin, C., Zhang, G., Chen, Y., Zhang, R., Fan, X., Yang, W. & Lu, Q. (2011). Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. *British Journal of Cancer*, 104(5), 781-789.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia – Fitoquímica - Plantas Medicinales*. (2da ed.). Editorial Acriba. Zaragoza – España.
- 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.
- Ceveira, N., Bizarro, S., & Texeira, M. (2012). Cancer cell cycle. *Canal BQ*, 9, 40-47.
- Cipak, L., Grausova, L., Miadokova, E., Novotny, L. & Rauko, P. (2006). Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. *Archives of Toxicology*, 80(7), 429-435.
- Coller, A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 667-670.
- Cooper, M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. (2th edition). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cragg, M., Grothaus, G., & Newman, J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, 109(7), 3012-3043.
- Croke, M. & El-Sayed, S. (2012). Multidisciplinary management of cancer patients: chasing a shadow or real value? An overview of the literature. *Current Oncology*, 19(4), e232-e238.

- Chan, K., Koh, C., & Li, H. (2012). Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death & Disease*, 3(10), e411.
- Chen, G., Yao, Z., Zheng, W., Chen, L., Duan, H. & Shen, Y. (2010). Combined Antitumor Effect of Ursolic Acid And 5-Fluorouracil on Human Esophageal Carcinoma Cell Eca-109 In Vitro. *Chinese Journal of Cancer Research*, 22(1), 62-67.
- Cho, E., Lee, J., Rimm, E., Fuchs, C. & Giovannucci, E. (2012). Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(2), 413-419.
- Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. & Zhao, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 676, 137-147.
- Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, P. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915.
- D'Urso, V., Collodoro, A., Mattioli, E., Giordano, A. & Bagella, L. (2010). Cytometry and DNA ploidy: Clinical uses and molecular perspective in gastric and lung cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 532-539.
- Einbond, L., Shimizu, M., Xiao, D., Nuntanakorn, P., Lim, J., Suzui, M., Seter, C., Pertel, T., Kennelly, E., Kronenberg, F. & Weinstein, I. (2004). Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(3), 221–231.
- Einbond, L., Wen-Cai, Y., He, K., Wu, HA., Cruz, E., Roller, M. & Kronenberg, F. (2008). Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 15(6-7), 504–511.
- Ekholm, S., & Reed, S. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current opinion in cell biology*, 12(6), 676–684.
- Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), e144-e149.
- Freshney, R. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. (6th edition). Editorial Wiley-Liss.

- Fuster, J., Fernández, P., González-Navarro, H., Silvestre, C., Nabah, YN. & Andrés, V. (2010). Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovascular Research*, 86(2), 254-264.
- Gabrielli, B., Brooks, K., & Pavey, S. (2012). Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 9.
- Garrido, H. & Yunga, E. (2010). Incidencia del Cáncer en Loja. Estudio de una década. SOLCA núcleo de Loja. Imprenta UTPL.
- Gavet, O. & Pines, J. (2010). Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 189(2), 247-259.
- Giordano, A., & Galderisi, U., (2010). Short Introduction to the Cell Cycle. In *Cell Cycle Regulation and Differentiation in Cardiovascular and Neural Systems*. Springer New York, (pp. 3-14).
- Golias, C., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, 58(12), 1134-1141.
- Goodman, A. (2003). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (10ma edición). McGraw-Hill Interamericana.
- Grafi, G. (1998). Cell Cycle Regulation of DNA Replication: The Endoreduplication Perspective. Minireview. *Experimental Cell Research*, 244(2), 372–378.
- Guamán Ortiz, L. (2012). *Chronicles of a Silent Death: Apoptosis*. *Research in Cell Biology*, 1(1), 1–7.
- Guamán, L. (2009). Implementación de dos Biomarcadores para la determinación de Actividad Apoptótica, en el CBCM. Tesis previa a la obtención del título de bioquímico farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Huang, W., Yang, J., Lin, M., Chen, P., Chiou, S., Chueh, F., Lan, Y., Pai, S., Tsuzuki, M., Ho, W. & Chung, J. (2012). Cucurbitacin E Induces

G(2)/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(2012), 952762.

- Jasperson, K., Tuohy, T., Neklason, D. & Burt, R. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058.
- Jeggo, P. & Lobrich, M. (2006) Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair*, 5(9-10), 1192-1198.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. (2011). Cancer statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 133-134.
- Kinghorn, A., Chin, Y. & Swanson, S. (2009). Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(2), 189-196.
- Lapenna, S. & Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(7), 547-566.
- Lee, S., Eom, S., Kim, Y., Park, N. & Park, S. (2010). Cucurbitane-type triterpenoids from *Momordica charantia*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 76(15), 1758–1761.
- Liu, D. & Ander, B. (2012). Cell Cycle Inhibition without Disruption of Neurogenesis Is a Strategy for Treatment of Aberrant Cell Cycle Diseases. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 491737.
- Lodish, B., Krieger, K. & Ziporsky, S. (2005). *Biología Celular y Molecular*. (5ta edición), Editorial Panamericana.
- Maiese, K., Hou, J., Chong, Z. & Shang, Y. (2009). Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *TheScientificWorldJournal*, 9, 1072-1104.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630-641.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 9(3), 153–166.
- Malumbres, M. (2011). Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiological Reviews*, 91(3), 973–1007.

- Martín, R., Ibeas, E., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M., Ruiz-Gutierrez, V. & Nieto, M. (2009). Natural Triterpenic Diols Promote Apoptosis in Astrocytoma Cells through ROS- Mediated Mitochondrial Depolarization and JNK Activation. *PLoS ONE*, 4(6), e5975.
- Mazumder, S., DuPree, E. & Almasan, A. (2004). A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 4(1), 65-75.
- Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*, 33(5), 261-274.
- Morgan, O. (2007). The Cell Cycle, Principles of Control. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(3), 141–142.
- Mou, X., Kesari, S., Wen, P. & Huan, X. (2011). Crude drugs as anticancer agents. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 4(1): 17–25.
- Musacchio, A. & Salmon, E. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(5), 379–393.
- Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3595–3604.
- Narang, A. & Desai, D. (2009). Anticancer Drug Development. *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, (pp 49-92).
- Niida, H. & Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21(1):3-9.
- Nirmala, M., Samundeeswari, A., & Sankar, P. (2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology*, 1(3), 1–14.
- Ojeda, D. (2012). 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. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

- Ordoñez, J. (2010). Estudio del Tipo de Muerte Inducido por Argentatina β , sobre Células de Cáncer de Colon (RKO). Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Obtenido en enero del 2013 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización Panamericana de la Salud. (2008). Nota descriptiva: El cáncer en América Latina y el Caribe. Plan de acción de la OPS de Prevención y Control del Cáncer. Obtenido en enero del 2013 de: <http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/NC/pcc-fact-sheet-LAC.pdf>
- Ortega, S., Malumbres, M., & Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602(1), 73-87.
- Orzaez, M., Gortat, A., Mondragon, L., Bachs, O. & Perez-Paya, E. (2009). ATP-noncompetitive inhibitors of CDK-cyclin complexes. *ChemMedChem*, 4(1), 19-24.
- Palacios, L. (2009). Evaluación del efecto genotóxico de la Argentatina B, mediante el ensayo CBMN en células MCF-7 (Cáncer de Mama). Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- Park, E., Kwon, H., Choi, Y., Shin, H., & Choi, S. (2012). Doxorubicin Induces Cytotoxicity through Upregulation of pERK-Dependent ATF3. *PLoS ONE*, 7(9), e44990.
- Park, M. & Lee, S. (2003). Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 6(1), 60-65.
- Parra, H., Compadre, C., Ramírez, T., Muñoz, M., Compadre, L., Martínez, M. & Ostrosky, P. (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.
- Parra, H., García, F., Sordo, M., Ramírez, T., Martínez, M. & Ostrosky, P. (2005). Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of

Argentatina A and Argentatina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences*, 77, 2855-2865.

- Perrone, A., Masullo, M., Bassarello, C., Bloise, E., Hamed, A., Nigro, P., Pizza, C. & Piacente S. (2008). Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*. *Tetrahedron* 64 (2008), 5061-5071.
- Petronelli, A., Pannitterib, G., & Testaa, U. (2009). Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs*, 20(10), 880-892.
- Pierce, B. (2009). *Genetics: A conceptual apropeach*. (3th edition). W.H. Freeman and Company. Madrid –España.
- Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 281, 301-311.
- Ramírez, M. (2008). Evaluación 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.
- Ramírez, M., Bailón, N., Romero, J., Cabrera, H., Ojeda, D., Velázquez, G. & Martínez-Vásquez, M. (2011). Evaluation the genotoxicity of Argentatin B and derivatives. Poster Presentado en X Congreso Brasileiro SBMCTA- Sao Pedro-Brasil 2011.
- Ren, S. & Rollins, B. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117(2), 239-251.
- Renthall, W., & Lee, E. (2002). Cancer and the role of cell cycle checkpoints. *Reviews in Undergraduate Research*, 1, 1–7.
- Reyes-Zurita, F., Pachón-Peña, G., Lizárraga, D., Rufino-Palomares, E., Cascante, M., & Lupiáñez, J. (2011). The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC Cancer*, 11, 154.
- Rizzolio, F., Tuccinardi, T., Caligiuri, I., Lucchetti, C. & Giordano, A. (2010). CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Current Drug Targets*, 11(3), 279-290.
- Romero, J., Alcantara, E., Bailón, N., Zentella, A. & Martinez, M. (2012). Evaluation of effect on cell cycle, necrosis and antiproliferative activity in

vivo of argentatin B. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 156.


- Russo, S., Ove, R. & Blackstock, A. (2008). The multidisciplinary treatment of non-metastatic pancreatic cancer: a review. *Cancer Therapy*, 6, 341-354.
- Sadeghi-aliabadi, H., Minaiyan, M. & Dabestan, A. (2010). Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 127-133.
- Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, K., Kaarniranta, K. & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 2979-2999.
- Sangjun, S., De-Jong, E., Nijmeijerb, S., Mutarapatc, T., Ruchirawatc, S., Van den Bergb, M. & Van Duursenb, M. (2009). Induction of cell cycle arrest in human MCF-7 breast cancer cells by cis-stilbene derivatives related to VIOXX®. *Toxicology Letters*, 186 (2009), 115-122.
- Santamaría, D & Ortega, S. (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Frontiers in Bioscience*, 11, 1164-1188.
- Satyanarayana, A. & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925-2939.
- Schwartz, G. & Shah, M. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23(36), 9408-9421.
- Senderowicz, A. (2002). Cyclin-dependent kinases as new targets for the prevention and treatment of cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 16(5), 1229-1253.
- Spira, A. & Ettinger, D. (2004). Multidisciplinary Management of Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350, 379-392.
- Sporn, M., Liby, K., Yore, M., Fu, L., Lopchuk, J. & Gribble, G. (2011). New Synthetic Triterpenoids: Potent Agents for Prevention and

Treatment of Tissue Injury Caused by Inflammatory and Oxidative Stress. *Journal of Natural Products*, 74(3), 537-545.

- Sun, L., Qing, C., Zhang, Y., Jia, S., Li, Z., Pei, S., Qiu, M., Gross, M. & Qiu S. (2007). Cimicifoetisides A and B, two cytotoxic cycloartane triterpenoid glycosides from the rhizomes of *Cimicifuga foetida*, inhibit proliferation of cancer cells. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 3, 3.
- Tasat, D. & Yakisich, J. (2010). Intra s-phase checkpoint. En Thomas, A. (Editor), *DNA Damage Repair, Repair Mechanisms and Aging* (pp. 71-96).
- Tyson, J., & Novak, B. (2008). Temporal organization of the cell cycle. *Current biology*, 18(17), R759-R768.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D., & Berneman, Z. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), 131-149.
- Wei, J., Liu, M., Liu, H., Wang, H., Wang, F., Zhang, Y., Han, L. & Lin, X. (2012). Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*, 10.1002/jat.2725.
- Wong, Y., Abdul Kadir, H., & Ling, S. (2012). Bioassay-Guided Isolation of Cytotoxic Cycloartane Triterpenoid Glycosides from the Traditionally Used Medicinal Plant *Leea indica*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 164689.
- Yadav, V., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R. & Aggarwal, B. (2010). Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins*, 2(10), 2428-2466.
- Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2010). Cell cycle and cell death in disease: past, present and future. *Journal of Internal Medicine*, 268(5), 395-409.
- Zhu, Y., Alvarez, C., Doll, R., Kurata, H., Schebye, X., Parry, D. & Lees, E. (2004). Intra-S-phase checkpoint activation by direct CDK2 inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, 24(14), 6268-6277.

8. ANEXOS

8.1 .Posters publicados



“Argentatina B y sus derivados: Acetilado, Oxima y Oxima Acetilada Inducen Arresto en la Fase G1 del Ciclo Celular en Células de Cáncer de C6lon (RKO)”

Villacis J. ^{1*}, Romero J.^{2A}, Bail6n N.^{1A}

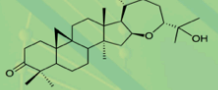
¹Centro de Biologfa Celular y Molecular, Universidad T6cnica Particular de Loja, Ecuador, CP 11-01-608
²Instituto de Qu6mica Aplicada, Universidad T6cnica Particular de Loja, Ecuador, CP 11-01-608
^A Departamento de Medicina Gen6mica y Toxicologia Ambiental, Instituto de Investigaciones Biom6dicas, Universidad Nacional Aut6noma de M6xico.
[*javillacis@utpl.edu.ec](mailto:javillacis@utpl.edu.ec)

INTRODUCCI6N

La Argentatina B es un triterpeno de tipo cicloartano aislado de *Partenium argentatum*, con actividad antiproliferativa en c6lulas tumorales. A partir de este compuesto se obtuvieron derivados con la finalidad de incrementar su potencia. En el presente trabajo establecimos si la Argentatina B y los tres derivados son capaces de inducir apoptosis mediante Caspasa 3 y/o interferir en la proliferaci6n celular mediante el an6lisis del ciclo celular.

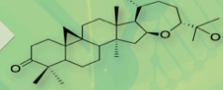
MATERIALES Y M6TODOS

RESINA *Partenium argentatum*



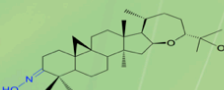
ARGENTATINA B
(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACI6N DE ARGENTATINA B (RMN, IR, EM)



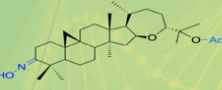
ACETILADO DE ARGENTATINA B
25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona

OBTENCI6N Y CARACTERIZACI6N DE DERIVADOS INHIBIDORES DE CRECIMIENTO CELULAR



OXIMA DE ARGENTATINA B
3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona

CULTIVO DE C6LULAS DE C6NCER DE COLON



OXIMA ACETILADA DE ARGENTATINA B
25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona

C6LCULO IC₅₀

DETERMINACI6N DE CASPASA 3

AN6LISIS CICLO CELULAR

RESULTADOS Y DISCUSI6N

IC₅₀

Tabla 1. IC₅₀ de Argentatina B y tres derivados \pm D.E

MOL6CULA	IC ₅₀ \pm D.E.
ARGENTATINA B	25.18 \pm 1.01
ACETILADO	82.8 \pm 0.89
OXIMA	52.84 \pm 0.57
OXIMA ACETILADA	70.52 \pm 0.75

CICLO CELULAR

Tabla 2. Porcentaje de C6lulas en Cada Fase del Ciclo Celular \pm D.E

	G1	S	G2
C-	50,84 \pm 2,71	25,09 \pm 2,52	24,08 \pm 2,07
Arg. B IC ₅₀	62,83 \pm 1,45	20,43 \pm 1,14	16,74 \pm 0,30
Ac. IC ₅₀	64,04 \pm 2,32	17,71 \pm 3,76	18,26 \pm 3,12
Ox. IC ₅₀	71,65 \pm 2,60	15,16 \pm 3,52	13,19 \pm 1,29
Ox. Ac. IC ₅₀	72,06 \pm 4,26	12,88 \pm 3,14	15,07 \pm 1,75
Dox.	23,01 \pm 3,10	13,19 \pm 2,67	63,81 \pm 5,57

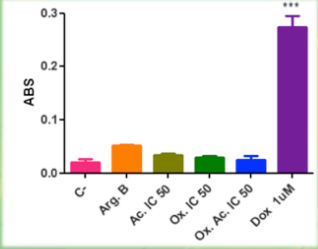
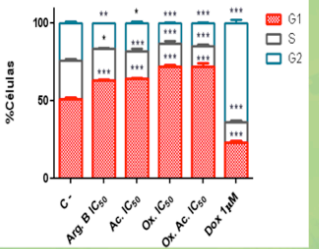



Fig.1. An6lisis de Caspasa 3 en C6lulas RKO expuestas a IC₅₀ de Argentatina B y tres derivados. Las Barras representan la concentraci6n de Caspasa 3 medida en tres experimentos por triplicado. (***) $p < 0,001$ comparado con el Control Negativo.)

Fig.2. An6lisis del Ciclo Celular en C6lulas RKO expuestas a IC₅₀ de Argentatina B y tres derivados. Se representa el porcentaje de c6lulas en Cada Fase del Ciclo Celular en tres experimentos por duplicado. (***) $p < 0,001$ comparado con el Control Negativo)

Con la finalidad de establecer la potencia de los derivados de Argentatina B se obtuvieron las IC₅₀ mediante exclusi6n por Azul Tripano (Tabla 1).

Si la Argentatina B y sus derivados eran capaces de inducir apoptosis debfan incrementar la actividad de Caspasa 3, sin embargo no se observo este efecto (Figura 1).

Dado que no se observaron efectos citot6xicos, se determin6 el efecto que las cuatro mol6culas tienen en el ciclo celular. (Figura 2). Los datos fueron normalizados con respecto al control negativo (Tabla 2).

CONCLUSI6N:

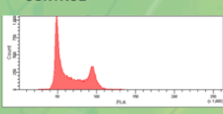
Las cuatro mol6culas analizadas presentan un efecto citost6tico en l6neas celulares de c6ncer de Colon (RKO) por Arresto en la fase G1 del Ciclo Celular, observ6ndose un mayor efecto en los tres derivados estudiados que en la Argentatina B. Asi mismo se descarta que las cuatro mol6culas induzcan muerte por Apopt6sis ya que no hay inducci6n de Caspasa 3.

AGRADECIMIENTOS:

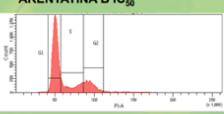
- SENACYT
- MIPRO

Fig.3. An6lisis del Ciclo Celular de C6lulas RKO expuestas a IC₅₀ de Argentatina B y tres derivados. Los histogramas representan las diferentes fases del Ciclo Celular.

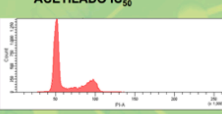
CONTROL



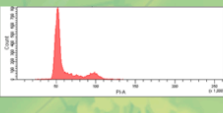
ARGENTATINA B IC₅₀



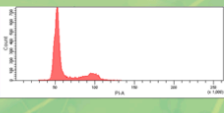
ACETILADO IC₅₀



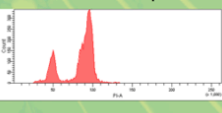
OXIMA IC₅₀



OXIMA ACETILADA IC₅₀



DOXORRUBICINA 1 μ M



48



“Derivados de Argentatina B inducen Arresto en la Fase G1 del Ciclo Celular en Células de Cáncer de Colon (RKO)”

Villacis J.^{1*}, Romero J.^{2,3}, Bailón N.^{1,4} Martínez Vázquez M.³

¹Departamento de Ciencias de la Salud, Sección Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, CP 11-01-608.

² Departamento de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, CP 11-01-608.

³Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,

⁴ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

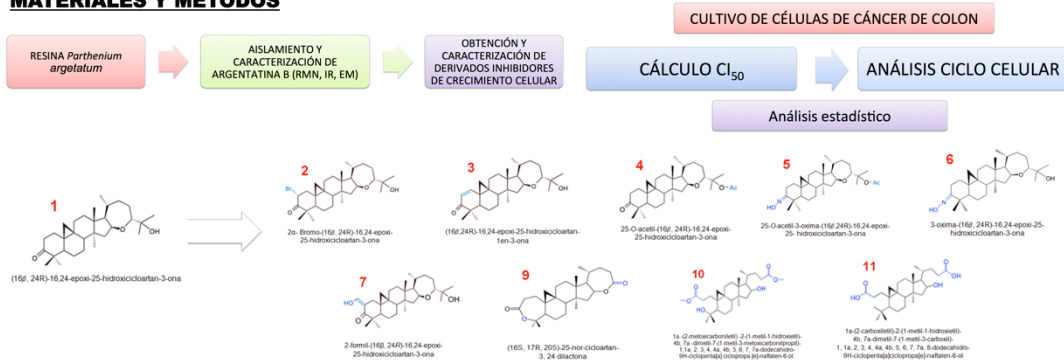
*javillacis@utpl.edu.ec

INTRODUCCIÓN

De los diferentes tipos de cáncer, el de colon ha incrementado su incidencia en América Latina en los últimos años. Este tipo de cáncer se encuentra entre los diez primeros tumores malignos del país y según el Registro de Tumores de Loja, ocupa el sexto puesto en incidencia, por lo que nuevos tratamientos contra el cáncer siguen siendo una necesidad.

Una fuente importante de antineoplásicos son los metabolitos secundarios de origen natural, especialmente vegetal. Argentatina B es un triterpeno de tipo cicloartano aislado de *Partenium argentatum* con actividad antiproliferativa en células tumorales. A partir de este compuesto se obtuvieron derivados con la finalidad de incrementar su potencia. En el presente trabajo establecimos si Argentatina B y los derivados estudiados son capaces de interferir en la proliferación celular de células de cáncer de colon (RKO) mediante el análisis del ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	CI ₅₀ ± E.E.
1	25.04 ± 0.38
2	22.04 ± 0.38
3	23.80 ± 0.31
4	82.08 ± 0.89
5	70.52 ± 0.75
6	49.84 ± 0.57
7	31.13 ± 0.28
9	44.95 ± 0.34
10	84.13 ± 0.02
11	98.99 ± 0.03

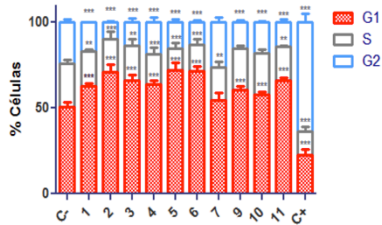


Fig.1. Análisis del Ciclo Celular en Células RKO expuestas a CI₅₀ de Argentatina B y nueve derivados. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en tres experimentos por duplicado. (***)p<0,001 comparado con el Control Negativo).

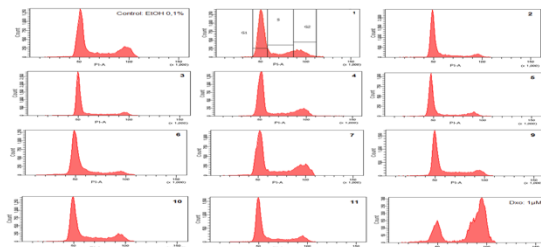


Fig.2. Análisis del ciclo celular de células RKO expuestas a CI₅₀ de Argentatina B y 9 derivados. Los histogramas representan las diferentes fases del ciclo celular.

Tras 24 horas de exposición a las CI₅₀ de Argentatina B y los 9 derivados (Tabla 1) las células RKO se analizaron por citometría de flujo a fin de determinar la distribución de la población total en las diferentes fases del Ciclo Celular (G1, S y G2). Como se puede observar en las Figuras 1 y 2, las células control presentaron una distribución normal de su ciclo celular al igual que las células tratadas con el derivado 7. Tras el tratamiento con los otros compuestos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 y 11) se observó un aumento estadísticamente significativo de la población de células en fase G1 después del tratamiento en comparación con el control, mientras que para las fases S y G2 fue notoria una disminución en la población celular. El tratamiento con los compuestos 3, 4, 9, 10 y 11, aumentaron la población de células en fase G1 de manera similar a lo observado en Argentatina B, mientras que en los compuestos 2, 5 y 6 se observó una detención mayor en G1 siendo el compuesto 5 (70 μM) el que provoca mayor arresto en la fase G1, aumentando de 50,8 % en el control a 71,6% en las células tratadas, así mismo es evidente una disminución de las células en las fases S y G2, reduciendo G2 significativamente de 24% en el control a 13,1% en las células tratadas. También el derivado 6 aumentó a 72% las células en la fase G1 y disminuyó a 15% la fase G2. En síntesis, las modificaciones químicas realizadas a Argentatina B en los derivados 2-5-6 aumentaron su potencia citostática. Estudios posteriores nos ayudarán a determinar los mecanismos por los que las moléculas inducen arresto en la fase G1 del ciclo celular.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos al SENESCYT y MIPRO por el financiamiento parcial de este proyecto.