



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

**ÁREA BIOLÓGICA**

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO Y FARMACÉUTICO

**“Determinación del efecto citostático de la Dehidrolucodina en células de  
Astrocitoma Cerebral (D-384)**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

**AUTOR:**

Velásquez Rojas, María Gabriela

**DIRECTORA:**

Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Dra.

**LOJA – ECUADOR**

**2013**

## CERTIFICACIÓN

Doctora.

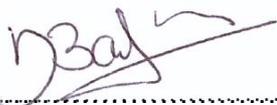
Natalia Catalina Bailón Moscoso

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo, denominado: “Determinación del efecto citostático de la Dehidroleucodina en la línea celular de Astrocitoma Cerebral (D-384)” realizado por la profesional en formación: Velásquez Rojas María Gabriela; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, Octubre del 2013

f)  .....

Dra. Natalia Bailón Moscoso

**Directora del Trabajo de Fin de Titulación**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Velásquez Rojas María Gabriela declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Determinación del efecto citostático de la Dehidroleucodina en la línea celular de Astrocitoma Cerebral (D-384), de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Dra. Natalia Catalina Bailón Moscoso directora del presente trabajo, y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....  
  
Velásquez Rojas María Gabriela  
C.I.: 1104269178

## DEDICATORIA

*El presente trabajo va dedicado a mis padres Rosa y Martin por todo el amor, el apoyo y las enseñanzas que me supieron dar desde pequeña para no rendirme nunca y poder cumplir mis metas y sueños, por toda su paciencia brindada durante mis estudios universitarios.*

*A mis queridas hermanas Andrea y Paola por todo el amor y apoyo brindado por estar a mi lado en todo momento, por saberme comprender y ser mis amigas incondicionales. Así mismo a mis cuñados Edgar y Diego que se convirtieron en mis hermanos gracias por las enseñanzas.*

*A mis pequeños sobrinos Dayana, Katty, Santiago y Emilio que llegaron a nuestro hogar para darnos alegrías.*

*Ma. Gabriela Velásquez Rojas.*

*"Tener un lugar para ir, es un hogar.  
Tener alguien a quien amar, es una familia.  
Tener ambas, es una bendición".*

*Donna Hedges*

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Titulación de Bioquímica y Farmacia, por la formación académica brindada.*

*A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por ser mi Directora de Tesis y brindarme todo su apoyo para la culminación del presente trabajo, por compartir día a día sus conocimientos, por todas sus enseñanzas, muchas gracias por ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente.*

*A todos quienes pertenecieron al Laboratorio de Genotoxicología y supieron compartir sus conocimientos principalmente a la Mgs. María Isabel Ramírez, al BqF. Luis Guamán y al BqF. Henry Cabrera, gracias por su apoyo.*

*A mis queridos padres y mis queridas hermanas quienes estuvieron en todo el transcurso de mi carrera y fueron base fundamental para la culminación de la misma.*

*A Javi por todo el apoyo y cariño que me brinda por estar a mi lado en todo momento, por no dejar que me rinda y saber animarme a seguir adelante, agradezco tanto que nuestros caminos se cruzaran.*

*A mis queridas amigas que siempre están a mi lado apoyándome, muchas gracias por tantas alegrías: Sofi, Ruth, Gaby y Pame.*

*Y finalmente pero no menos importantes a todos mis compañeros de laboratorio, principalmente a Cris gracias por tu colaboración y a todas las personas que participaron directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.*

*Muchas gracias a todos y siempre estarán en mi corazón.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE GRAFICAS</b> .....	viii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO</b>	
1.1. Cáncer.....	6
1.2. Cáncer cerebral.....	9
1.3. Tratamiento.....	10
1.4. Antineoplásicos de origen natural.....	10
1.5. Metabolitos secundarios de plantas.....	11
1.5.1. Lactonas sesquiterpénicas.....	12
1.5.1.1. Dehidroleucodina.....	13
1.6. Citostaticidad y citotoxicidad.....	13
1.6.1. Ciclo celular.....	14
1.7. Biomarcadores.....	15
1.8. Biomarcadores para la determinación de citostaticidad.....	16
1.8.1. Viabilidad Celular.....	16
1.8.2. Índice mitótico e Índice de replicación.....	16
1.8.3. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo.....	17
<b>CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO</b>	
2.1. Objetivo general del proyecto.....	20
2.2. Objetivos específicos del proyecto.....	20

### **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

3.1. Molécula de estudio.....	22
3.2. Cultivo celular.....	22
3.3. Siembra y sincronización celular.....	23
3.4. Determinación de la viabilidad celular.....	23
3.5. Incorporación de la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).....	23
3.5.1. Índice mitótico.....	24
3.5.2. Índice de replicación.....	24
3.6. Determinación del ciclo celular.....	25
3.7. Análisis Estadístico.....	25

### **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Viabilidad celular.....	27
4.2. Índice mitótico e índice de replicación.....	29
4.3. Determinación del Ciclo celular por Citometría de Flujo.....	31

### **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	38

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>
--------------------------	-----------

<b>ANEXOS.....</b>	<b>46</b>
--------------------	-----------

### **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Características de las células cancerígenas.....	7
<b>Figura 2.</b> <i>Gynoxys verrucosa</i> Weed y Dehidroleucodina.....	13
<b>Figura 3.</b> Fases y puntos de control del ciclo celular.....	15
<b>Figura 4.</b> Representación del contenido de DNA en el Ciclo Celular.....	18
<b>Figura 5.</b> Histograma de distribución del contenido de DNA.....	18
<b>Figura 6.</b> Dehidroleucodina.....	22
<b>Figura 7.</b> Astrocitoma Cerebral (D-384).....	22
<b>Figura 8.</b> Células en división y células en interfase.....	24
<b>Figura 9.</b> Clasificación de las células en metafase.....	25

<b>Figura 10. Morfología Celular.....</b>	<b>28</b>
---	-----------

### **LISTA DE TABLAS**

<b>TABLA 1. Tipos de cáncer más frecuentes en hombres y mujeres del Ecuador.....</b>	<b>8</b>
--	----------

### **LISTA DE GRAFICAS**

<b>Grafica 1. Porcentaje de viabilidad celular.....</b>	<b>27</b>
<b>Grafica 2. Índice mitótico.....</b>	<b>29</b>
<b>Grafica 3. Células en mitosis.....</b>	<b>30</b>
<b>Grafica 4. Índice de replicación.....</b>	<b>31</b>
<b>Grafica 5. Análisis del ciclo celular (6 horas).....</b>	<b>32</b>
<b>Grafica 6. Análisis del ciclo celular (12 horas).....</b>	<b>33</b>
<b>Grafica 7. Análisis del ciclo celular (24 horas).....</b>	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

**AA:** Astrocitoma Anaplásico

**BrdU:** 5-bromo-2-desoxiuridina

**D-384:** Línea celular de Astrocitoma Cerebral

**DhL:** Dehidroleucodina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**GBM:** Glioblastoma multiforme

**IM:** Índice Mitótico

**KCl:** Cloruro de Potasio

**LS:** Lactona Sesquiterpenica

**MI:** primera mitosis

**MII:** segunda mitosis

**MIII:** tercera mitosis

**MR:** Índice de Replicación

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**SSC:** Solución Salina Citratada

## RESUMEN

En la actualidad el estudio y la investigación de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de plantas medicinales cumplen con un papel importante para el desarrollo de nuevos antineoplásicos que permitan reducir la ocurrencia o recurrencia de cáncer, entre estas plantas medicinales tenemos a *Gynoxys verrucosa* Wedd, la cual es usada en las provincias de Loja y Zamora-Chinchipec para el tratamiento y curación de heridas, a partir de esta planta se ha aislado la Dehidroleucodina una lactona sesquiterpenica que presenta una actividad antitumoral en diferentes líneas celulares. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la actividad citostatica de la Dehidroleucodina sobre la línea celular de Astrocitoma Cerebral (D-384) mediante citometria de flujo y el ensayo de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). Los resultados obtenidos muestran que la Dehidroleucodina a una concentración de 10 $\mu$ M inhibe la proliferación celular mediante la detención del ciclo celular en la fase G2/M (\*\* $p < 0,0001$  en comparación con el control negativo) y una disminución del índice mitótico e índice de replicación, demostrando que la Dehidroleucodina presenta un efecto citostatico en esta línea celular.

**PALABRAS CLAVES:** *Gynoxys verrucosa* Wedd, Dehidroleucodina, lactona sesquiterpénica, efecto citostático.

## ABSTRACT

At present the study and research of secondary metabolites obtained from medicinal plants comply an important role in the development of new chemotherapeutic agents to reduce the occurrence or recurrence of cancer, among these medicinal plants have to *Gynoxys verrucosa* Wedd, which is used in the provinces of Loja and Zamora-Chinchiipe for the treatment and healing of wounds, from this plant has been isolated Dehydroleucodine a sesquiterpene lactone which antitumor activity in different cell lines. For this reason, in this project was evaluated the cytostatic activity of Dehydroleucodine on Cerebral Astrocytoma cell line (D-384) by flow cytometry assay and incorporation of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). The results show that at a concentration of 10 $\mu$ M Dehydroleucodine inhibits cell proliferation by arresting cell cycle in G2/M (\*\* $p < 0.0001$  compared to the negative control) and diminution mitotic index and replicative index, demonstrating that Dehidroleucodina have a cytostatic effect on this cell line.

**KEYWORDS:** *Gynoxys verrucosa* Wedd, Dehydroleucodine, sesquiterpene lactone, cytostatic effect.

## INTRODUCCIÓN

Pese a los importantes avances científicos y tecnológicos en la química combinatoria, los medicamentos derivados de productos naturales siguen teniendo una enorme contribución en el descubrimiento de fármacos, debido a la complejidad y la diversidad molecular que estos tienen, así como poseer actividades biológicas altamente selectivas y específicas basadas en su mecanismos de acción (Cragg & Newman, 2013).

Las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales se atribuyen generalmente a metabolitos secundarios, tales como las lactonas sesquiterpénicas (LS), un grupo grande y diverso de productos químicos biológicamente activos que se han identificado en varias familias de plantas (Zhang *et al.*, 2005). Sin embargo, se encuentran en mayor número en la familia Asteraceae, con más de 3000 estructuras diferentes reportadas (Modzelewska *et al.*, 2005). Dentro de esta familia, se encuentra *Gynoxys verrucosa* Wedd, planta conocida como "guángalo" o "congona", un arbusto utilizado en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe para el tratamiento de infecciones de la piel y la cicatrización de heridas (Tene *et al.*, 2007). Entre los metabolitos secundarios aislados de esta especie se encuentra la Dehidroleucodina (DhL), una lactona sesquiterpénica, para la que se ha reportado diversas actividades biológicas entre las que se puede destacar el efecto anti-tumoral, anti-inflamatorio y una buena actividad como protector gástrico (Penissi *et al.*, 2006; Costantino *et al.*, 2013). Entre estos efectos el más estudiado es el anti-tumoral, se ha reportado que presenta un efecto inhibitor del crecimiento en la línea celular tumoral MCF-7 (cáncer de mama) y en las células HeLa (cáncer de cérvix) (Costantino *et al.*, 2013).

Estudios recientes han demostrado que la inducción de la detención del ciclo celular es una de las estrategias más prometedoras para el descubrimiento y diseño de nuevos agentes antineoplásicos (Dai *et al.*, 2012). Diferentes métodos basados en los conceptos del ciclo celular se utilizan para evaluar la tasa de proliferación y actualmente son los métodos más usados y estudiados (Sherbet & Patil, 2003). Entre estos métodos están el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR) que se utilizan como indicadores adecuados de la proliferación celular (Öcal & Eroğlu, 2012). El IM mide la proporción de células en la fase M del ciclo celular y su inhibición se podría considerar como la muerte celular o el retraso en la cinética de proliferación celular, y el IR mide la cinética de la división celular mediante el recuento del porcentaje de células en la primera, segunda, tercera o más metafases. Otro de los métodos más utilizados, tanto para la medición del contenido de ADN celular y el análisis del ciclo celular es la citometría de flujo que se basa en añadir un colorante fluorescente que

se une estequiométricamente al ADN, de manera que el material marcado ha incorporado una cantidad proporcional a la cantidad de ADN (Nunez, 2001; Holland *et al*, 2002; Öcal & Eroğlu, 2012).

Por lo mencionado anteriormente el principal objetivo de este trabajo es determinar el efecto citostático de la Dehidroleucodina en la línea celular humana de Astrocitoma Cerebral (D-384) a través de la evaluación de la proliferación celular en ensayos de análisis del ciclo celular por citometría de flujo y mediante el ensayo de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) la determinación del índice mitótico e índice de replicación.

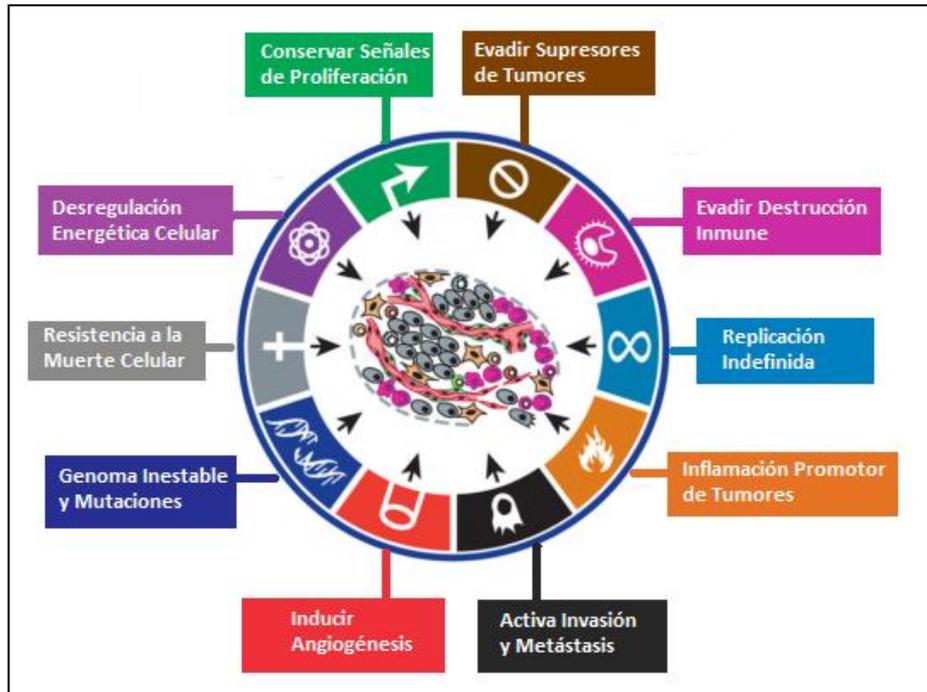
## **CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Cáncer

El cáncer conocido también como tumores malignos o neoplasias malignas, es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales, estas células acumulan mutaciones que resultan en respuestas defectuosas a las señales antimitogénicas lo que contribuyen a la proliferación no programada, pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, mediante el proceso conocido como metástasis (Malumbres & Barbacid, 2009; SACC, 2012; OMS, 2013).

El cáncer puede desarrollarse por diferentes causas como pueden ser; factores externos como el tabaco, organismos infecciosos, productos químicos y radiación, y factores internos como mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunes, y mutaciones que se producen a partir del metabolismo. Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo de cáncer (SACC, 2012), sin embargo este es un proceso complejo de múltiples etapas, requiere la acumulación de mutaciones y como resultado las células adquieren las características esenciales del cáncer las cuales son: (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Conservar señales de proliferación,
- Evadir supresores de crecimiento,
- Resistencia a la muerte celular,
- Inducir Angiogénesis,
- Activa invasión y metástasis,
- Replicación Indefinida,
- Evadir la Destrucción Inmune,
- Inflamación como promotora de tumores,
- Genoma Inestable y Mutaciones, y
- Desregulación Energética Celular.



**Figura 1. Características de las células cancerígenas.**

**Fuente:** Autor. Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Estas mutaciones acumuladas alteran los reguladores del ciclo celular que controlan la entrada y la progresión correcta a través del mismo (Golias *et al.*, 2004), esto debido a mutaciones que se producen principalmente en dos tipos de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Los proto-oncogenes codifican factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes que estimulan la división celular, y reguladores del ciclo celular que ayudan a la célula para que pase a través del mismo, estos son puntos importantes en las funciones celulares normales, pero pueden ser convertidos en oncogenes por mutaciones de ganancia de función (Cerveira *et al.*, 2012), mientras que los genes supresores de tumores detienen el progreso a través del ciclo celular en respuesta al daño del ADN o de señales de supresión del crecimiento desde el entorno extracelular, estos genes supresores de tumores se ven afectados por la pérdida de función dada por mutaciones (Cerveira *et al.*, 2012). Es por esto que los genes que controlan positivamente los puntos de control del ciclo celular pueden ser dianas para la activación oncogénica en el cáncer, mientras que los reguladores negativos, tales como los genes supresores de tumores son objeto de la inactivación (McDonald & El-Deiry, 2001). Debido a esto una de las características principales de las células cancerosas son la incontrolada proliferación; hay estudios en los que se ha determinado que la mayoría, si no todos los cánceres humanos, muestran un control desregulado de la progresión de la fase G1, fase en la cual las células deciden si inician la proliferación o permanecer en estado quiescente (Golias *et al.*, 2004).

A nivel mundial en el año 2008 se estimó que existió un total de 12'662.600 nuevos casos de cáncer con una mortalidad de 7'564.800 para mujeres y hombres (Globocan, 2008). En los Estados Unidos se proyecta un total de 1'660.290 nuevos casos de cáncer y 580350 muertes por cáncer en el año 2013 (SACC, 2012; OMS, 2013).

En el Ecuador en el año 2008 con una población total de 13'481.000 habitantes se detectó un total de 20200 nuevos casos de cáncer y 13300 mil muertes (Globocan, 2008). Siendo los cinco cánceres más comunes tanto para hombres como mujeres los que se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tipos de cáncer más frecuentes en hombres y mujeres del Ecuador.

<b>Cáncer</b>	<b>Incidencia</b>
<b>Estomago</b>	15,0%
<b>Próstata</b>	13,2%
<b>Mama</b>	9,3%
<b>Cérvix Uterino</b>	8,3%
<b>Colorectal</b>	6,1%

**Fuente:** Globocan, 2013.

En el cantón de Loja, el número total de casos de cáncer para el periodo 1997-2006 es de 3067, de ellos 1822 son mujeres (59,4%), y 1245 son hombres (40,6%). Siendo el cáncer de cuello de útero el más frecuente en mujeres y el cáncer de estómago en hombres (Garrido & Yunga, 2010).

Además de estos tipos de cáncer que son los más frecuentes, existen otro tipo que si bien no son frecuentes son más agresivos como es el caso del cáncer cerebral, en nuestro país representan el 2.9% de incidencia y el 3.4% de mortalidad (Globocan 2008, 2013). Y en nuestra ciudad la muerte por cáncer cerebral ocupa el octavo lugar en incidencia siendo más afectados los hombres que las mujeres con una tasa de incidencia del 4.7 y 2.3 respectivamente. Dentro del cáncer cerebral se ha diagnosticado los gliomas con un porcentaje del 0.6% para mujeres y del 2.2% para hombres en el periodo 1997-2006 (Garrido & Yunga, 2010).

## 1.2. Cáncer Cerebral

El término “Glioma” se utiliza de forma general para cualquier tumor que surja en el tejido conjuntivo o “pegajoso” del cerebro. Este tejido, llamado glía, ayuda a mantener en su lugar y en buen funcionamiento a las neuronas (“células que piensan”). Hay tres tipos de células gliales normales de las que se pueden generar tumores como son (ABTA, 2012):

- Astrocito (célula en forma de estrella) generará astrocitomas (incluyendo a los glioblastomas),
- Oligodendrocito (célula con brazos cortos que forma el aislamiento de las neuronas) generará oligodendrogliomas, y;
- Ependimarias (células que conforman el recubrimiento de las cavidades de fluido en el cerebro) generará ependimomas.

Los gliomas, representan el 30% de todos los tumores cerebrales y el 80% de todos los tumores malignos. El astrocitoma maligno es la neoplasia primaria más común del sistema nervioso central. A pesar de las mejoras en el tratamiento, la mayoría de los pacientes mueren a causa de esta enfermedad. La tasa de supervivencia es de aproximadamente 3 años para los pacientes con astrocitoma anaplásico (AA) y 1 año para las personas con glioblastoma multiforme (GBM) (Gomes & Colquhoun, 2012; Liu *et al.*, 2010).

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tipo más común y más letal de neoplasia del sistema nervioso central. Históricamente, los GBM son clasificados como glioblastomas primarios y secundarios, el desarrollo de estos últimos a partir de los tumores astrocíticos preexistente de grado más bajo (Shchors *et al.*, 2013).

Los astrocitomas pueden aparecer en varias partes del cerebro y del sistema nervioso, incluyendo el cerebelo, el cerebro, las áreas centrales del cerebro, el tronco cerebral, y la médula espinal (ABTA, 2012).

Las terapias actuales para los astrocitomas, incluyendo cirugía, radiación y quimioterapia, los cuales no han tenido éxito debido al rápido crecimiento del tumor invasivo, la heterogeneidad genética y una mala comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la manifestación de la enfermedad y la progresión (Shu *et al.*, 2011; Sarica *et al.*, 2012).

En la actualidad existe una lista finita de agentes farmacológicos que se han reportado como potenciales agentes terapéuticos contra astrocitoma y GBM, sin embargo la tasa de curación

es todavía muy baja, lo que demuestra una necesidad urgente del desarrollo e identificación de agentes antitumorales con mayor eficacia para este tipo de cáncer.

### **1.3. Tratamiento**

El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas, como cirugía, radioterapia o quimioterapia. El objetivo consiste en curar la enfermedad o prolongar considerablemente la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente (OMS, 2013).

Mientras que la quimioterapia es uno de los métodos más ampliamente estudiado en terapias contra el cáncer, su eficacia y seguridad siguen siendo una preocupación primaria como la toxicidad y otros efectos secundarios graves (Tan *et al.*, 2011), por lo cual se busca un antineoplásico ideal el cual ejerza efectos adversos mínimos en los tejidos normales con una capacidad máxima para eliminar las células tumorales y/o inhibir el crecimiento del tumor (Morley *et al.*, 2007).

En la actualidad existen avanzadas terapias contra el cáncer como son la terapia hormonal y la terapia molecular conocida también como terapia dirigida (SACC, 2012), sin embargo estas terapias son de un costo elevado y no todos los pacientes pueden someterse a ellas. Es por esto que la quimioterapia sigue siendo una terapia convencional de la cual se obtiene resultados favorables, pero en la actualidad es una prioridad el estudio, investigación y desarrollo de nuevos antineoplásicos, en la búsqueda de estos nuevos fármacos se analiza la regulación y diferenciación de una célula normal para poder distinguir las células tumorales y de esta forma sean antineoplásicos que actúen a un nivel más específico (Corn & El-Deiry, 2002).

### **1.4. Antineoplásicos de Origen Natural**

Pese a los importantes avances científicos y tecnológicos en la química combinatoria, los medicamentos derivados de productos naturales siguen teniendo una enorme contribución al descubrimiento de fármacos, debido a la complejidad y la diversidad molecular que estos tienen, además presentan la característica de que a menudo poseen actividades biológicas altamente selectivas y específicas basadas en su mecanismos de acción (Cragg & Newman, 2013).

Actualmente, hay más de 200 fármacos derivados de productos naturales que ya están en fase de desarrollo preclínico/clínico o en fase clínica. (Saikali *et al.*, 2012), estos fármacos pueden partir de principios activos, análogos semi-sintéticos y sintéticos de plantas, animales o microorganismos (Patel *et al.*, 2010).

Los productos naturales derivados principalmente de las plantas tienen un larga historia en cuanto a su uso para el tratamiento del cáncer, entre algunos de los antineoplásicos más conocidos se encuentran paclitaxel, campotensina, los llamados alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina), así como también etopósido y tenipósido (Akao *et al.*, 2008; Cragg & Newman, 2013).

En la actualidad se busca un adelanto en cuanto a la terapia contra el cáncer comprendiendo mejor los mecanismos que conducen a la transformación y la proliferación celular así como también combinando los conocimientos de cómo actúan los productos naturales directamente con la comprensión del ciclo celular y los mecanismos de apoptosis, lo que ha permitido identificar dianas contra las que se están desarrollando nuevos antineoplásicos (Golias *et al.*, 2004; Rixe & Fojo, 2007).

Aparte de lo mencionado anteriormente hay que tomar en cuenta que los productos naturales se adaptan perfectamente a la aproximación molecular actual de desarrollo de fármacos, ya que individualmente inhiben múltiples aspectos de la proliferación de células cancerosas y como grupo muestran afinidad para la interacción sinérgica (Geetha *et al.*, 2012).

### **1.5. Metabolitos Secundarios de Plantas**

Dentro de los productos naturales se encuentran los metabolitos secundarios de las plantas, estos se han utilizado durante siglos en la medicina tradicional y hoy en día corresponden a compuestos valiosos, tales como productos farmacéuticos, cosméticos, productos químicos, o también en nutracéuticos (Bourgaud *et al.*, 2001).

Los metabolitos secundarios de las plantas se suelen clasificar en función de sus rutas biosintéticas, existen tres grandes familias de moléculas que se consideran en general como son (Bourgaud *et al.*, 2001):

- Compuestos fenólicos,
- Terpenos y esteroides, y
- Alcaloides.

### 1.5.1. Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas (LS) constituyen un grupo grande y diverso de productos naturales biológicamente activos, representan la clase más abundante y estable de terpenoides y se pueden obtener de muchas especies de plantas medicinales (Zhang *et al.*, 2005), sin embargo se ha reportado que se encuentran en mayor número en la familia *Asteraceae* con más de 3000 diferentes estructuras (Chaturvedi, 2011, Göpfert *et al.*, 2009).

Las lactonas sesquiterpénicas a menudo son incoloras y con un sabor amargo, son compuestos de 15 carbonos (C-15), con un éster cíclico o lactona (Ghantous *et al.*, 2010). Con relación a su esqueleto carbono-cíclico se pueden clasificar en cuatro grupos: germacranolides, eudesmanolides, guaianolides y pseudoguaianolides (Chaturvedi, 2011; Saikali *et al.*, 2012).

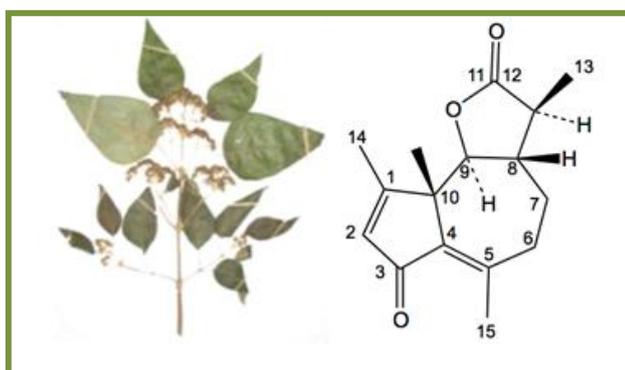
Es conocido que presentan una amplia actividad biológica entre las que podemos citar efecto anti-inflamatorio, anti-viral, anti-bacteriano, anti-fúngico, anti-malarico, anti-tumoral (Chaturvedi, 2011; Ichikawa *et al.*, 2006; Tabopda, 2008), estas diversas actividades farmacológicas se basan en que las lactonas sesquiterpénicas se unen covalentemente con los grupos sulfhídricos libres en las proteínas, lo que interrumpe las funciones de varias macromoléculas, por lo cual pueden interferir con algunos procesos biológicos claves como: la señalización celular, la proliferación celular, la muerte celular/apoptosis y la respiración mitocondrial (Zhang *et al.*, 2005).

En la actualidad la actividad biológica más estudiada de las lactonas sesquiterpénicas es la anti-tumoral, estudios apoyan la opinión de que las lactonas sesquiterpénicas inhiben el crecimiento del tumor mediante alquilación selectiva, controlan la división celular e inhiben de este modo una variedad de funciones celulares, lo que dirige a las células a morir por apoptosis (Chaturvedi, 2011). Existen algunos fármacos derivados de lactonas sesquiterpénicas como la Tapsigargina, la Artemisinina y Partenolida, que se encuentran en ensayos clínicos para tratar el cáncer (Zhang *et al.*, 2005; Ghantous *et al.*, 2010; Chaturvedi, 2011).

Todo lo mencionado anteriormente hace de las lactonas sesquiterpénicas productos químicos de gran interés en la investigación y en el descubrimiento de nuevos fármacos.

### 1.5.1.1. Dehidroleucodina.

La Dehidroleucodina (DhL) es una lactona sesquiterpenica obtenida de las partes aéreas de *Gynoxys verrucosa* Weed, un arbusto perteneciente a la familia *Asteracea* (Figura 2), la cual es comúnmente conocida como guangalo o congona que se utiliza en la medicina tradicional al sur de Ecuador para el tratamiento de infecciones de la piel y la cicatrización de heridas por la aplicación directa a la piel (Tene, 2007; Ordóñez *et al.*, 2011).



**Figura 2. *Gynoxys verrucosa* Weed y Dehidroleucodina.**

Fuente: Autor.

Se conoce que la dehidroleucodina tiene un efecto anti-inflamatorio, antimicrobiano en *Staphylococcus* spp. (Ordóñez *et al.*, 2011), un efecto inhibidor del crecimiento en la línea celular tumoral humana D-384 (Astrocitoma Cerebral) determinado mediante el ensayo de cristal violeta, en el que además se determinó que la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) es mucho menor al de algunos medicamentos que se utilizan actualmente en la quimioterapia del cáncer (Ojeda, 2012), así como un efecto anti-proliferativo, anti-inflamatorio y una buena actividad como protector gástrico (Penissi *et al.*, 2006; Costantino *et al.*, 2013).

Es por esto que la actividad biológica reportada hasta ahora de la dehidroleucodina, aumenta el interés en el estudio e investigación del efecto citostático y así permitir proponer a esta lactona sesquiterpenica como un potencial agente antineoplásico.

## 1.6. Citostaticidad y citotoxicidad

La citostaticidad es la capacidad que presentan los compuestos para impedir que las células proliferen y cuando un compuesto produce daño o es tóxico para las células llevándolas a la muerte se habla de citotoxicidad (Morley *et al.*, 2007).

Se puede determinar la citostaticidad mediante ensayos *in vitro* con el único propósito de determinar el potencial de citotoxicidad de los compuestos en estudio, ya sea porque estos se utilizan como productos farmacéuticos o cosméticos y se debe conocer si son tóxicos o porque están diseñados como agentes contra el cáncer y la citotoxicidad puede ser crucial para su acción (Freshney, 2010). Como también se puede estudiar los mecanismos de citotoxicidad para obtener una mejor comprensión de los procesos biológicos normales y anormales que controlan el crecimiento celular, la división y la muerte.

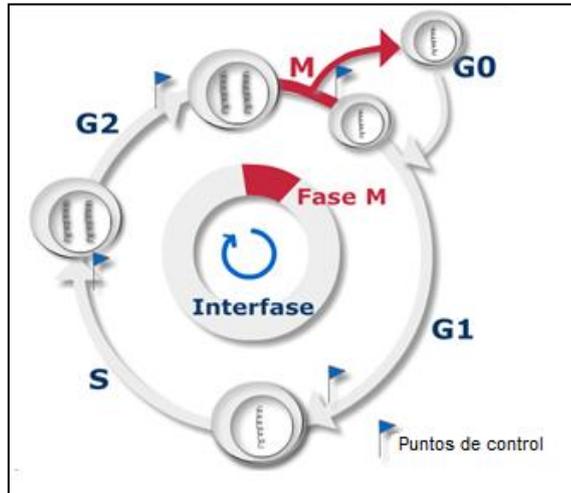
Dado a que la citostaticidad se basa en la proliferación celular se habla a continuación del ciclo celular.

### **1.6.1. Ciclo celular.**

El ciclo celular consiste en dos períodos consecutivos, principalmente caracterizados por la replicación del DNA y la segregación de los cromosomas replicados en dos células hijas separadas. Este se puede dividir en cinco fases: G0, G1, S, G2 y M. Distribuidas en dos períodos principales: interfase y mitosis. Durante la interfase la célula crece, duplica su DNA (Fase S) y acumula nutrientes y productos de genes necesarios para la mitosis. Hay que tomar en cuenta que las fases G1 y G2 representan periodos de espacios intermedios durante el cual las células se preparan para la finalización con éxito de las fases S y M, respectivamente (Cerveira *et al.*, 2012). Durante la mitosis, la célula se divide a sí mismo y divide el DNA genómico entre las dos células hijas. La mitosis se puede subdividir en varias fases: profase, metafase, anafase y telofase (Du *et al.*, 2011). Por último, está la quinta fase o más conocida como estado G0 (estado quiescente), estado del que la célula puede salir de forma reversible a G1, si se le priva de las apropiadas señales promotoras del crecimiento (Garrett, 2001; Liu *et al.*, 2010).

Las células normales en respuesta al daño del DNA, activan una compleja red de señalización para prevenir la replicación del DNA dañado y la transmisión de los daños relacionados con alteraciones en las secuencias del DNA a la siguiente generación de células (Sakaue-Sawano *et al.*, 2012). Estas vías de regulación se denominan comúnmente como puntos de control del ciclo celular que se encuentran en la fase G1 donde impide la replicación del DNA dañado mediante el bloqueo de la entrada en la fase S, si el daño ocurre durante la fase S o ha evadido el punto de control G1, el puesto de control dentro de la fase S se activa bloqueando la replicación, el siguiente punto de control está en la fase G2 donde se evita que las células entren en mitosis y finalmente un punto de control en la fase

de mitosis donde se evalúa el tamaño de la célula, las señales de crecimiento extracelulares, y la integridad del DNA (Figura 3) (Park & Lee, 2003; Malumbre, 2011; Chen *et al.*, 2013).



**Figura 3. Fases y puntos de control del Ciclo Celular.**

**Fuente:** Medicina Molecular FIBAO.

Estos puntos de control de señalización también pueden resultar en la activación de las vías que conducen a la muerte celular programada si el daño celular no puede ser adecuadamente reparado. Los defectos en los puntos de control del ciclo celular pueden dar lugar a mutaciones genéticas, daños cromosomales, y la aneuploidia, todos los cuales pueden contribuir a la tumorigénesis (Pietenpol & Stewart, 2002).

Las divisiones celulares y su regulación desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, es por esto que se mide la duración de las fases individuales del ciclo celular bajo diferentes condiciones de tratamiento lo que puede corregir la comprensión de los mecanismos biológicos en enfermedades oncológicas y mejorar la eficacia de descubrimiento y desarrollo de fármacos (Chen *et al.*, 2013).

### **1.7. Biomarcadores**

La definición de un biomarcador es amplia, se los puede definir como sustancias que muestran un estado biológico. Pueden ser medidos y evaluados como indicadores de procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas. Se los puede utilizar para la determinación de genes específicos, proteínas, productos de procesos celulares, así como para determinar la respuesta de las células o tejidos a las estrategias terapéuticas (Maiese *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2010). Los biomarcadores también incluyen

herramientas y tecnologías que pueden ayudar en la comprensión de la predicción, causa, diagnóstico, progresión, regresión, o el resultado del tratamiento a una enfermedad (Mayeux, 2004).

Existen diversas técnicas que nos permiten determinar los biomarcadores pero esto dependerá de los procesos que se analicen, a continuación se describe los biomarcadores usados para determinar el efecto citostático, objetivo planteado en el presente trabajo.

## **1.8. Biomarcadores para la determinación de citostaticidad.**

### **1.8.1. Viabilidad Celular.**

La viabilidad celular se puede definir como el número de células sanas en una muestra, la mayoría de las pruebas de viabilidad se basan en la ruptura de la integridad de membrana medida por la absorción de un colorante al que la célula es normalmente impermeable. El método más sencillo para determinar el número de células viables es un recuento directo de las células en un hemocitómetro luego de ser teñidas con azul tripan el cual dará una coloración azul a las células que tengan ruptura de membrana (Freshney, 2010).

### **1.8.2. Índice mitótico e índice de replicación.**

Estimaciones del recuento mitótico se utilizan ampliamente como una simple medida de la proliferación celular. La progresión de las células a través de la fase M del ciclo celular se puede observar utilizando el índice mitótico (IM) y sirve para identificar compuestos que inhiben o inducen la progresión mitótica (Holland *et al.*, 2002). La evaluación del IM se puede realizar ya sea microscópicamente mediante la determinación de la frecuencia de las células mitóticas o mediante la automatización del proceso con citometría de flujo (Golias *et al.*, 2004).

Por otra parte el índice de replicación (IR) mide la cinética de la división celular mediante el recuento del porcentaje de células en la primera, segunda, y tercera o más metafases (Holland *et al.*, 2002), este se puede establecer mediante la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) que es un análogo de la timidina, que requiere de dos ciclos de replicación debido a la naturaleza semi-conservadora de la replicación del DNA. Después de una única división celular, la absorción de BrdU (que sustituye la timidina) da como resultado la tinción homogénea de ambas cromátidas, después de la segunda división celular en

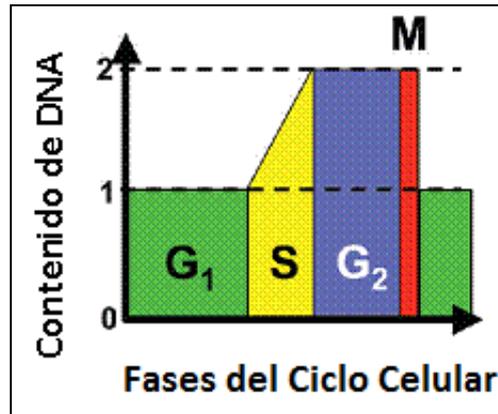
presencia de BrdU se observa una tinción diferencial de las dos cromátidas, en este caso, la cadena original del DNA de los padres (sin incorporación BrdU) se mantiene en una cromátida y esta se empareja con una cromátida que tiene incorporada BrdU y luego de una tercera división celular se observa la incorporación de la BrdU en ambas cromátidas (Moore *et al.*, 2001).

### **1.8.3. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo.**

Dos de las aplicaciones de citometría de flujo más populares son la medición del contenido de DNA y el análisis del ciclo celular (Nunez, 2001). El contenido de DNA nuclear de una célula puede medirse cuantitativamente a alta velocidad por citometría de flujo, al añadir un colorante fluorescente que se une estequiométricamente al DNA, como es el Ioduro de Propidio (IP) el cual requiere de luz azul como fuente de excitación (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004; Darzynkiewicz *et al.*, 2010).

El principio es que las células marcadas han incorporado una cantidad de colorante proporcional a la cantidad de DNA. Las células marcadas se miden a continuación en el citómetro de flujo y la señal fluorescente emitida produce un pulso electrónico con una altura (amplitud) proporcional a la emisión de fluorescencia total de la célula. A partir de entonces, dichos datos de fluorescencia se consideran una medición del contenido de DNA celular (Nunez, 2001; Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

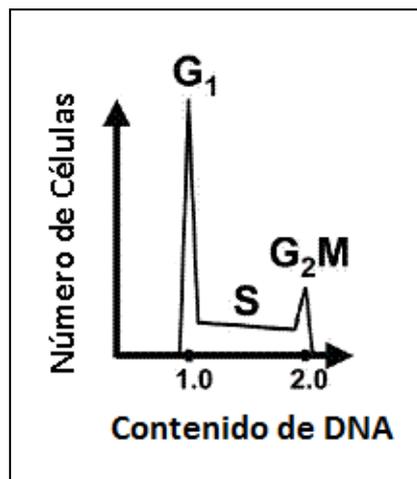
Además de la determinación relativa del contenido de DNA celular, la citometría de flujo permite la identificación de la distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular, esta distribución de las células se basa en las diferencias en el contenido de DNA ya que las células en la fase G1 tiene un contenido de DNA uniforme, las células en la fase G2/M tienen el doble de DNA y las células en la fase S se encuentran replicando el DNA (Figura 4) (Darzynkiewicz *et al.*, 2010).



**Figura 4. Representación del contenido de DNA en el ciclo celular.**

Fuente: Modificado de Darzynkiewicz *et al.*, 2010.

En la figura 5 se puede observar la distribución del contenido de DNA representada mediante un histogramas el cual se componen de dos picos (células en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> y las fases G<sub>2</sub>/M) y un valle de células en fase S.



**Figura 5. Histograma de distribución del contenido de DNA.**

Fuente: Modificado de Darzynkiewicz *et al.*, 2010.

## **CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO**

## **2.1. Objetivo general del Proyecto**

- Determinar el efecto citostático de la Dehidroleucodina en la línea celular de Astrocitoma Cerebral (D-384).

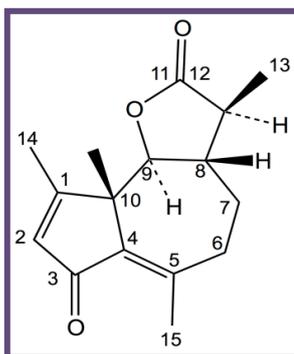
## **2.2. Objetivos específicos del Proyecto**

- Determinar la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul tripan de las células de Astrocitoma Cerebral (D-384), luego de ser expuestas a la Dehidroleucodina.
- Determinar el porcentaje de células de Astrocitoma Cerebral (D-384) en síntesis, luego de ser tratadas con Dehidroleucodina mediante la técnica de marcaje con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).
- Determinar mediante citometría de flujo el efecto de la Dehidroleucodina sobre el ciclo celular de las células de Astrocitoma Cerebral (D-384).

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

### 3.1. Molécula de Estudio

Se utilizó como molécula de estudio la Dehidroleucodina (DhL) (Figura 6) que fue extraída y donada por el Ph.D. Omar Malagón de la Sección Departamental de Química Básica y Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja. La concentración madre de Dehidroleucodina se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las concentraciones de trabajo se realizaron el momento de usarlas.

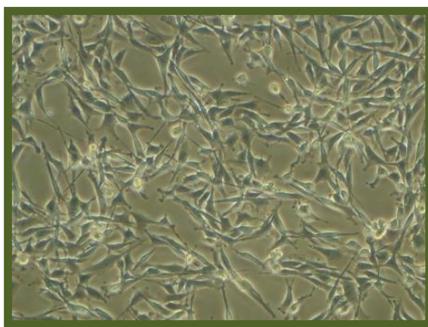


**Figura 6. Dehidroleucodina.** Lactona sesquiterpénica

Fuente: Autor.

### 3.2. Cultivo Celular

Se utilizó como material biológico la línea celular humana de Astrocitoma Cerebral (D-384) (Figura 7) que fue cultivada en medio de cultivo RPMI (GIBCO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2 mM) (GIBCO), y 1% Antibiótico-Antimicótico (100 Unidades/ml de Penicilina G, 100  $\mu\text{g/ml}$  de Estreptomina y 25  $\mu\text{g/ml}$  de Amphotericina B) (GIBCO). El cultivo celular fue mantenido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera húmeda con el 5% de  $\text{CO}_2$ , el tiempo de duplicación de las células es de 16 horas, tiempo que se tomó en cuenta para los ensayos.



**Figura 7. Astrocitoma Cerebral (D-384).** Cultivo celular mantenido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera húmeda con el 5% de  $\text{CO}_2$ . Vista en microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Magnificación 40X.

Fuente: Autor.

### **3.3. Siembra y sincronización celular**

Para realizar los ensayos se partió de un cultivo celular con una confluencia del 80%, se sembró 480.000 células/pocillo en una caja multipocillo de 6, en medio de cultivo RPMI (GIBCO) libre de SFB, con el fin de sincronizar las células, se mantuvo a las mismas condiciones de incubación durante 16 horas. Pasado este tiempo se realizó un cambio de medio de cultivo con medio que contenía SFB para liberar a las células (Anexo 1).

### **3.4. Determinación de la viabilidad celular**

Al cultivo celular sincronizado se le aplicó tratamiento con Dehidroleucodina en concentraciones de 5, 7.5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  y doxorubicina (1  $\mu\text{M}$ ) como control positivo, se dejó incubar por 32 horas, pasado este tiempo se procedió a analizar la viabilidad celular mediante exclusión de azul tripan (Anexo 1).

### **3.5. Incorporación de la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)**

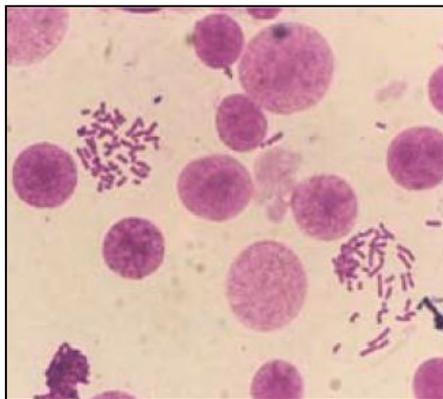
Al multipocillo de 6 sembrado y sincronizado anteriormente se le aplicó tratamiento con la Dehidroleucodina a concentraciones de 5, 7.5 y 10  $\mu\text{M}$  al mismo tiempo se adicionó BrdU (10  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ), se dejó incubar por 32 horas y se agregó colcemida al cultivo a una concentración final de 0.0  $\mu\text{g}$ , 4 horas antes de realizar la cosecha. Las células fueron despegadas con 1 mL de tripsina, se adicionó medio con SFB para inactivar la tripsina, se recogió en tubos de 1.5 mL y se centrifugó por 8 minutos a 3000 r.p.m. a 4 °C, al sedimento celular obtenido se le agregó 1 mL de KCl 0,075 M y se dejó en baño maría a 37 °C por 10 min., pasado este tiempo se centrifugó a las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de Solución de Fijador de Carnoy (1 PBS: 1 Fijador de Carnoy) al precipitado celular, re-suspendiendo suavemente, se centrifugó y se agregó 1 mL de Fijador de Carnoy (3 Metanol: 1 ácido acético), se realizó un último centrifugado y se fijó las células con 200  $\mu\text{L}$  de Fijador de Carnoy, repartiendo el precipitado celular en 2 portaobjetos. Se dejó secar al aire libre los portaobjetos y se procedió a realizar la tinción, para esto se sumergieron los portaobjetos en solución de Hoescht (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 10 min protegido de la luz e incubados en solución salina citratada (2X SSC) durante 2 horas bajo exposición a luz ultravioleta de longitud de onda corta, pasado este tiempo se realizó lavados con agua destilada y se tiñeron con solución de Giemsa por 10 min., se lavaron con buffer de fosfato (pH 6,8) y se procedió a observar al microscopio (Anexo 2).

La incorporación de la BrdU en los cultivos celulares fue utilizada para analizar el índice mitótico y el índice de replicación (Freshney, 2010).

### 3.5.1. Índice mitótico.

La determinación del índice mitótico se realizó analizando el porcentaje de células en división con respecto al número de células en interfase (Figura 8), se contó mil células por placa. El resultado se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ Metafases}}{N^{\circ} \text{ Total de Células}}$$

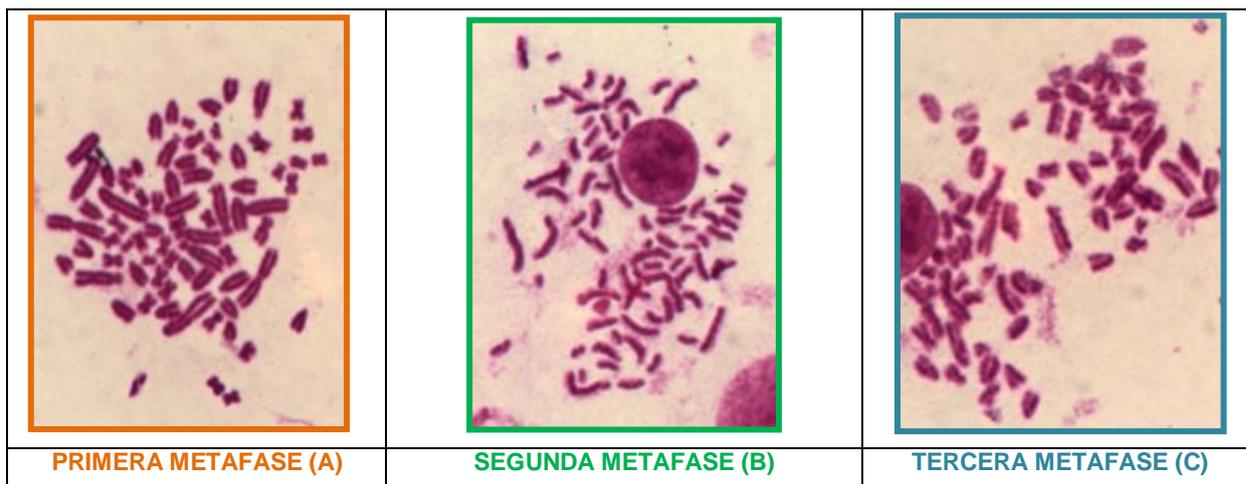


**Figura 8. Células en división y células en interfase.** Vistas en microscopio óptico (Zeizz). (Magnificación 100X).  
**Fuente:** Autor.

### 3.5.2. Índice de replicación.

Para determinar el índice de replicación (IR) se tomo en cuenta las mitosis que se observan en la figura 9, las mismas que representan células en primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) metafase, se contó un total de 100 metafases y se aplicó la siguiente fórmula:

$$IR = \frac{((1 * N^{\circ} \text{ cel. M1}) + (2 * N^{\circ} \text{ cel. M2}) + (3N^{\circ} \text{ cel. M3}))}{100}$$



**Figura 9. Clasificación de las células en metafase.** (A) Primera división celular, los cromosomas presentan la misma coloración en las dos cromátidas, (B) Segunda división celular, los cromosomas presentan en una cromátida la incorporación de la BrdU y (C) Tercera división celular, los cromosomas presentan la incorporación de la BrdU en las dos cromátidas. Vistas en microscopio óptico (Zeiss). (Magnificación 100X).

**Fuente:** Autor.

### 3.6. Determinación del ciclo celular.

Al multipocillo de 6 sembrado y sincronizado anteriormente se le aplicó tratamiento con la DhL (5, 7.5, 10  $\mu$ M) dejando incubar por 6, 12 y 24 horas, pasado este tiempo se despegaron las células usando tripsina, se adicionó medio suplementado con SFB para inactivar la tripsina, las muestras fueron recolectadas en tubos de 1,5 mL y centrifugadas durante 5 minutos a 3500 rpm. a 4 °C, al sedimento celular obtenido se le realizó lavados con 1 mL de PBS, 1 mL de PBS:Etanol (1:1) y finalmente fueron fijadas con etanol al 70%, estos pueden ser almacenados a 4°C. Para analizar las muestras se las centrifugó a las condiciones anteriores y se realizó un lavado con 1mL de PBS, el sedimento celular obtenido se re-suspendió en 200  $\mu$ L de solución de tinción IP e incubado protegido de la luz a temperatura ambiente por 30 minutos, luego de este tiempo se transfirió las muestras a tubos de citómetro para su medición bajo las siguientes condiciones: Excitación de 488 nm hasta 536 nm. Emisión: Long pass: 600 ó 610 nm (Anexo 3).

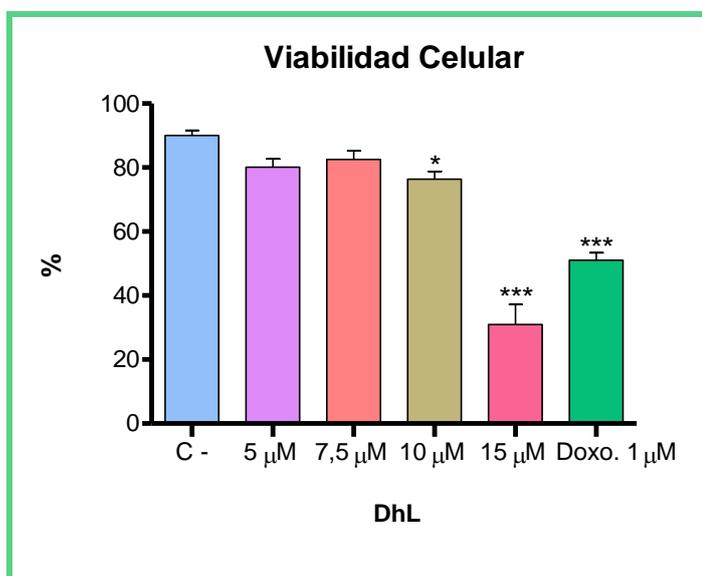
### 3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA con post-test de Dunnett para analizar la diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados usando el software GraphPad Prisma® 5.0. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Viabilidad celular

Independientemente del tipo de ensayo que se vaya a realizar, es importante saber cuántas células viables permanecen al final del experimento (Riss, 2013), esto es importante ya que para ensayos de citostaticidad es necesario trabajar con una viabilidad celular mayor al 50 por ciento. Es por esto que lo primero que se determinó fue el porcentaje de viabilidad celular mediante exclusión de azul tripan, como se puede observar en la gráfica 1 nuestros resultados muestran que el porcentaje de viabilidad para las concentraciones de DhL de 5, 7.5 y 10  $\mu\text{M}$  fue mayor del 70%, mientras que para la concentración de 15  $\mu\text{M}$  la viabilidad de las células disminuyó a menos del 40%, razón por la cual esta concentración se omitió para los siguientes ensayos de citostaticidad. En esta gráfica también se muestra un 95% de viabilidad para el control negativo y una reducción de la viabilidad cerca al 50% en las células tratadas con Doxorubicina 1  $\mu\text{M}$  (control positivo), estos resultados son importantes ya que se ha reportado que se puede emplear Doxorubicina ya sea para estudios citotóxicos como citostáticos a concentraciones entre 0,1  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$  en varias líneas tumorales lo que valida nuestros resultados (Revisado en Villacís, 2013).

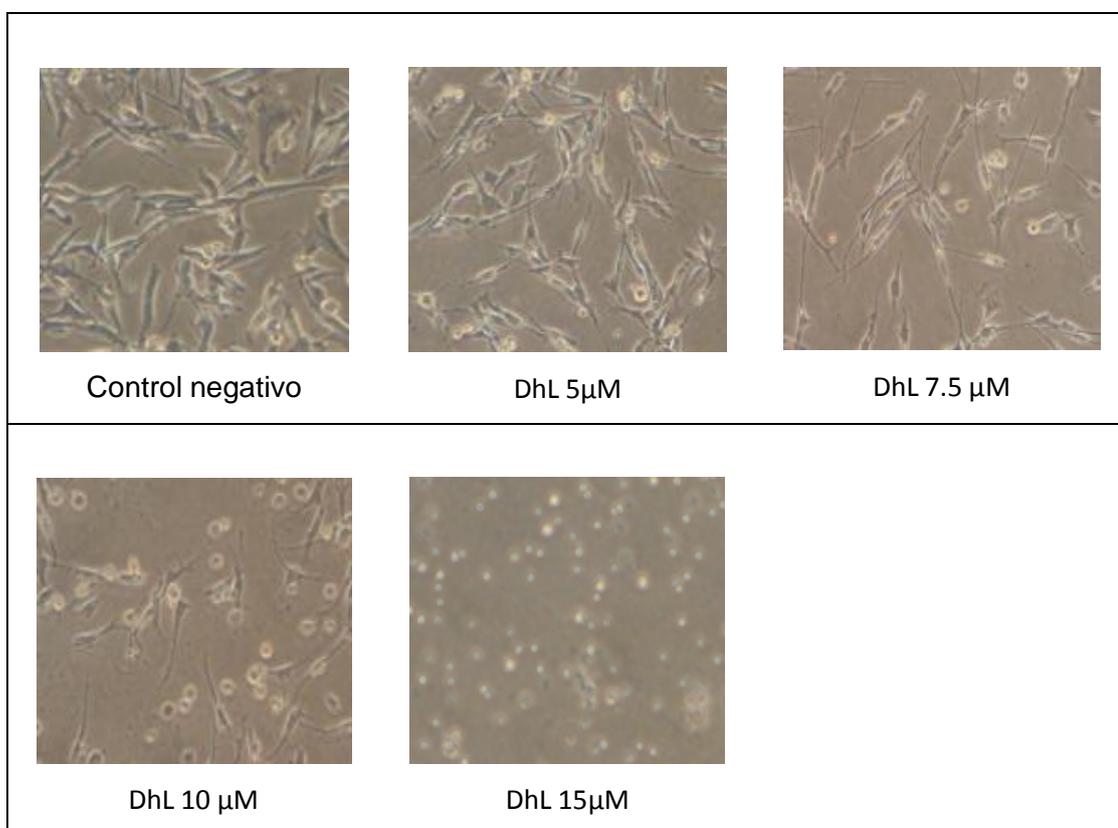


**Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad celular.** D-384 expuestas a diferentes concentraciones de Dehidroleucodina (5, 7.5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) por 32 horas, con los respectivos controles. Se uso para el análisis estadístico ANOVA-post test Dunnet (\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

**Fuente:** Autor.

En la figura 10 se puede observar los cambios que presentaron las células D-384 al ser expuestas durante 32 horas a diferentes concentraciones de DhL (5, 7.5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ). En el control negativo la población de células presenta la morfológica característica de la esta línea celular y una confluencia cerca al 80%, no así en las concentraciones de 5 y 7.5  $\mu\text{M}$

donde se observa una morfología igual al control pero con una disminución de la confluencia, en la concentración 10  $\mu\text{M}$  estos cambios se hacen más evidentes, las células empiezan a cambiar la morfología, se vuelven redondas, y se puede observar una disminución de las mismas, para la concentración de 15  $\mu\text{M}$  las células presentaron una morfología totalmente distinta a la presentada en el control negativo y una total disminución de la confluencia. Estos cambios junto con los porcentajes de viabilidad obtenidos nos permiten suponer que existe un posible efecto citostático a las concentraciones de 5, 7.5 y 10  $\mu\text{M}$  y un probable efecto citotóxico a la concentración de 15  $\mu\text{M}$  ya que es evidente que las células entran en un proceso de muerte celular.



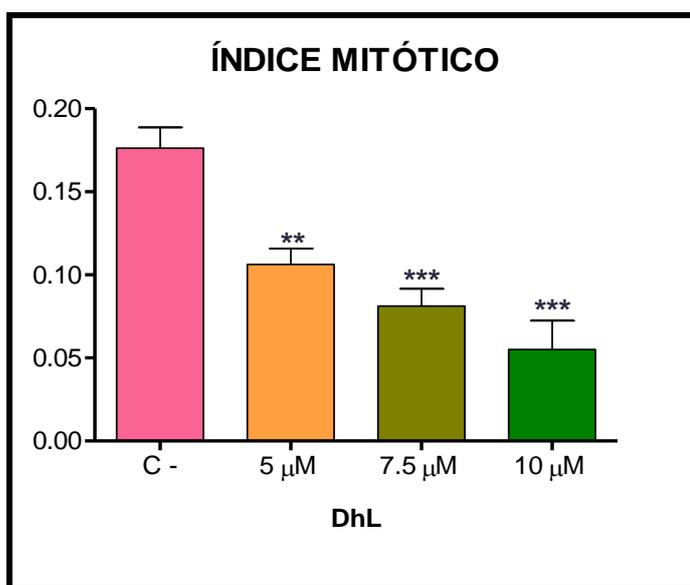
**Figura 10. Morfología Celular.** Cambios morfológicos de las células D-384 luego de 32 horas de exposición a concentraciones de 5, 7.5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  de Dehidroleucodina. Vistas en microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). (Magnificación 100X).

**Fuente:** Autor.

Los resultados de viabilidad celular y los cambios morfológicos observados para la línea celular D-384 concuerdan con reportes en que se ha determinado que la DhL a dosis bajas pueden causar disminución de la proliferación celular y a dosis más altas erradica las células tumorales por apoptosis, estudios realizados en las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer de cervix) (Costantino *et al.*, 2013).

## 4.2. Índice mitótico e índice de replicación

Dado a los cambios morfológicos y a los resultados obtenidos para la viabilidad celular se procedió a determinar el índice mitótico, como se puede observar en la gráfica 2 el índice disminuye en todas las concentraciones de manera dosis-respuesta, es decir que a medida que aumenta la concentración el índice mitótico disminuye, para nuestro control negativo se determinó un índice de 0.176 el cual disminuyó significativamente a 0.055 en la concentración más alta probada que fue de 10  $\mu\text{M}$  ( $***p<0.0001$ ), estos resultados nos indican que la DhL a las concentraciones probadas presentan un efecto citostático sobre las células D-384 ya que una reducción de más del 50 por ciento en el valor del índice mitótico en comparación con el control nos indica la naturaleza citostática del compuesto en estudio (Kannan *et al.*, 2006). Este efecto concuerda con el efecto anti-proliferativo reportado para la DhL y el derivado 11,13-dihidro-dehidroleucodina sobre las células vasculares del músculo liso (Polo *et al.*, 2007) y la DhL y el derivado Dehidroparishin-B que bloquean la proliferación en células de melanoma B16 (Priestap *et al.*, 2012).

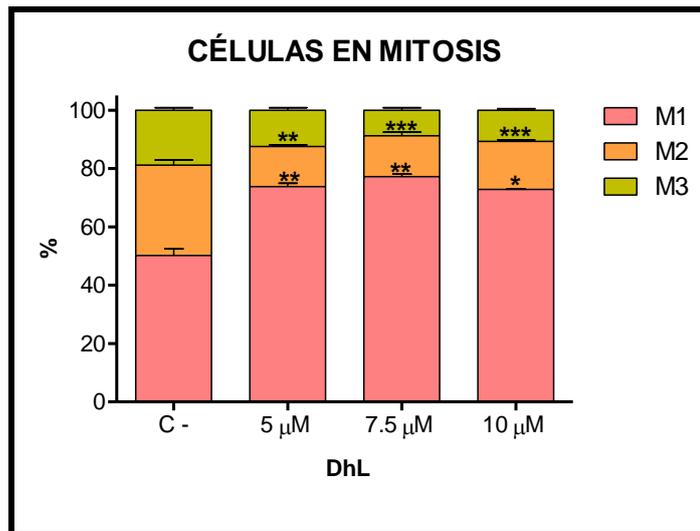


**Gráfica 2. Índice mitótico.** Representación gráfica del IM de células D-384 tratadas con diferentes concentraciones de DhL por 32 horas de exposición. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por duplicado ( $**p<0.001$ ,  $***p<0.0001$ ).

Fuente: Autor.

Con la incorporación de la BrdU se pudo determinar el porcentaje de células en metafase lo cual nos permitió observar que la disminución del índice mitótico esta dado por una acumulación o detención de las células luego de la primera división ya que como se puede observar en la gráfica 3, la DhL a las concentraciones probadas produce una disminución de

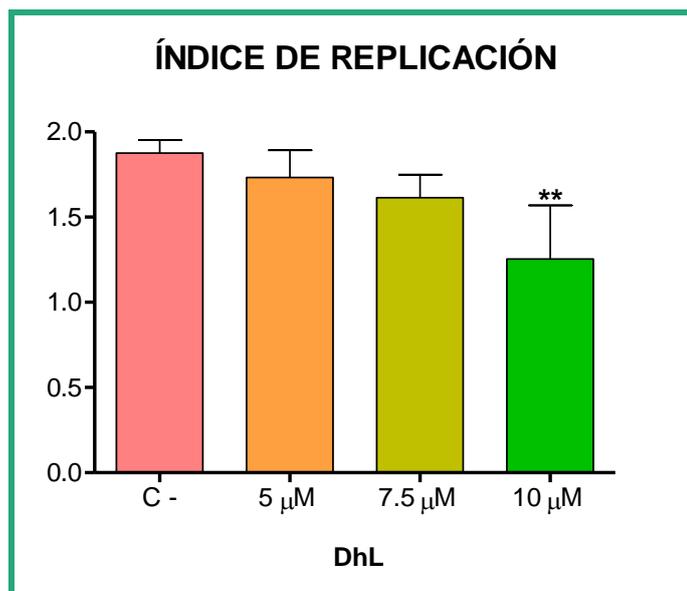
las células en la segunda y tercera mitosis, y un aumento de las células en la primera mitosis con respecto al control negativo ( $*p<0.05$ ,  $**p<0.001$ ,  $***p<0.0001$ ). Con estos resultados podemos decir que la DhL a las concentraciones probadas presenta un efecto citostático al detener la proliferación celular, esta es una respuesta buena e importante ya que la proliferación incontrolada es una característica de las células cancerosas y el objetivo principal de la terapia contra el cáncer es reducir el número de células tumorales y de esta manera prevenir la acumulación de las mismas (Andreeff *et al.*, 2000).



**Gráfica 3. Células en mitosis.** Porcentaje de células en metafase M1, M2 y M3 de las células D-384 diferentes concentraciones de la DhL expuestas a 32 horas, los resultados se muestran como la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado. ( $*p<0.05$ ,  $**p<0.001$ ,  $***p<0.0001$ ).

**Fuente:** Autor.

Luego de conocer el porcentaje de células en metafase se determinó el índice de replicación, en la gráfica 4 se puede observar que existe una disminución del índice en todas las concentraciones probadas de la DhL, siendo esto más representativo a la concentración de 10 µM con un índice de 1.255 el cual disminuyo en comparación con él índice obtenido para el control negativo que fue de 1.875 ( $**p<0.001$ ). Estos resultados confirman el efecto citostático que presenta la DhL a las concentraciones probadas ya que el índice de replicación se ve afectado sin que llegue a producir muerte celular y es conocido que los compuestos citostáticos son aquellos que no matan a las células cancerosas, sino que impiden que estas células proliferen (Rixe & Fojo, 2007).



**Gráfica 4. Índice de replicación.** Representación gráfica del IR de células D-384 tratadas con diferentes concentraciones de DhL, luego de 32 horas de exposición. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por duplicado (\*\* $p < 0.001$ ).

**Fuente:** Autor.

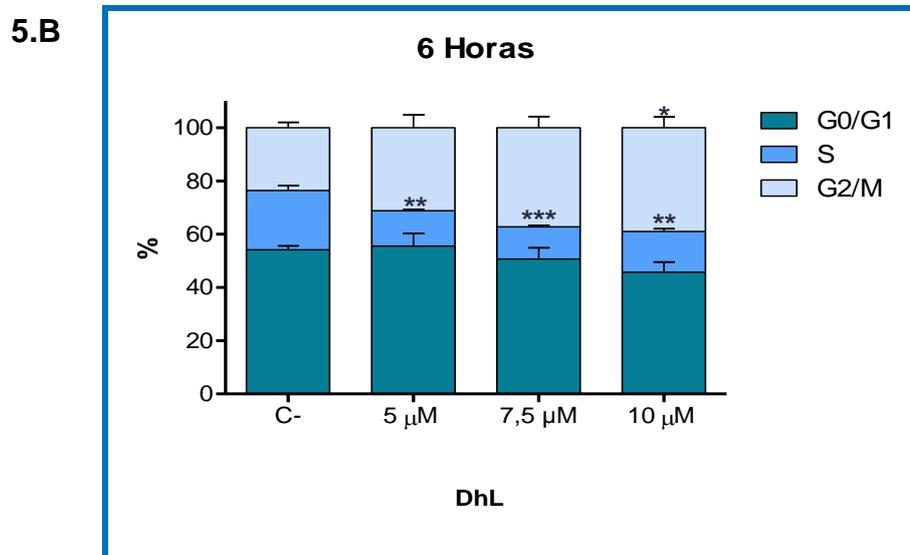
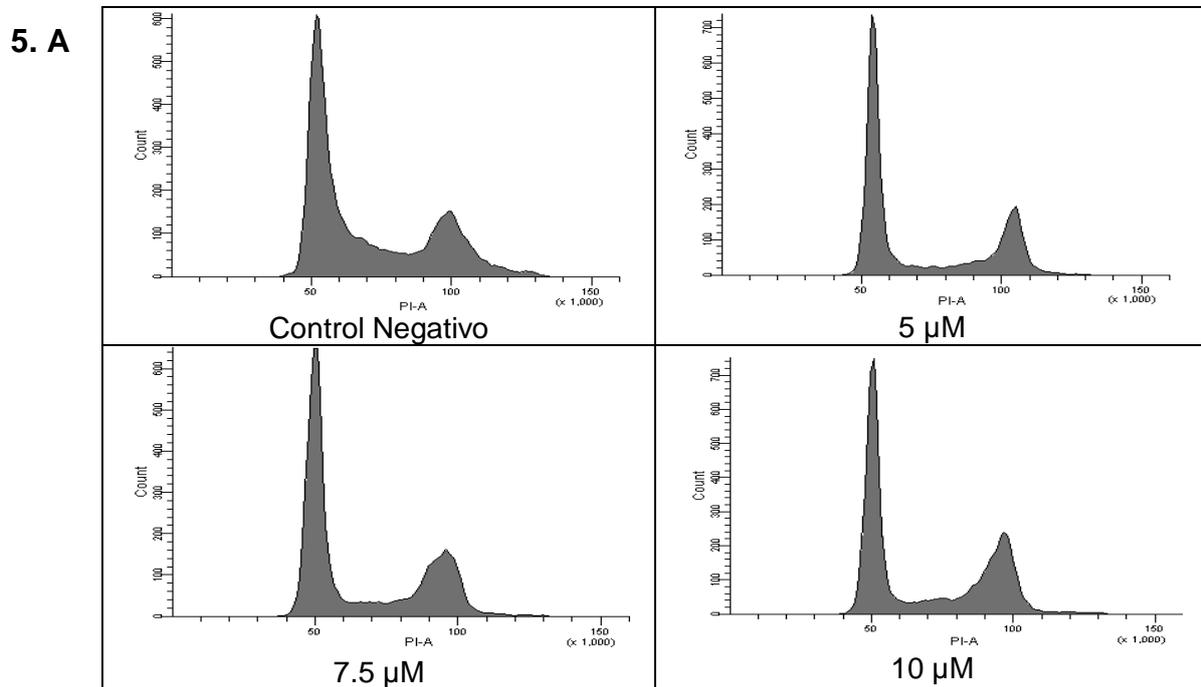
Este efecto citostático presentado por la DhL en las células D-384 es similar al efecto reportado para la DhL en las líneas celulares de MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer de cérvix) (Costantino *et al.*, 2013). Así mismo para algunas lactonas sesquiterpénicas como Partenolida (Weng *et al.*, 2009), Deoxielefantopina (Farha *et al.*, 2013), Isodeoxielefantopina (Farha *et al.*, 2013) y Costunolida (Rasul *et al.*, 2012) a las cuales se les atribuye un efecto citostático en diferentes líneas celulares.

#### 4.3. Determinación del Ciclo Celular por Citometría de flujo

Luego de haber determinado que la DhL presenta un efecto citostático a las concentraciones probadas se procedió a confirmar este efecto mediante el análisis de la distribución del ciclo celular a las mismas concentraciones (5, 7.5 y 10  $\mu$ M) y dado a los cambios morfológicos presentados por las células a las pocas horas de ser tratadas con la DhL se analizó el ciclo celular en varios tiempos de exposición, esto con el fin de conocer si se producen retrasos transitorios o permanentes en cualquier fase del ciclo celular y determinar en qué fase del ciclo celular se produce la detención del mismo.

En la gráfica 5 (A y B), se muestran los resultados obtenidos después de 6 horas de exposición, se puede observar que el porcentaje de células en la fase S disminuyó significativamente con respecto al control negativo (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ) acompañado de un incremento del porcentaje de células en la fase G2/M en todas las concentraciones siendo

esto más evidente en la concentración de 10µM (\* $p < 0,05$  en comparación con el control negativo).

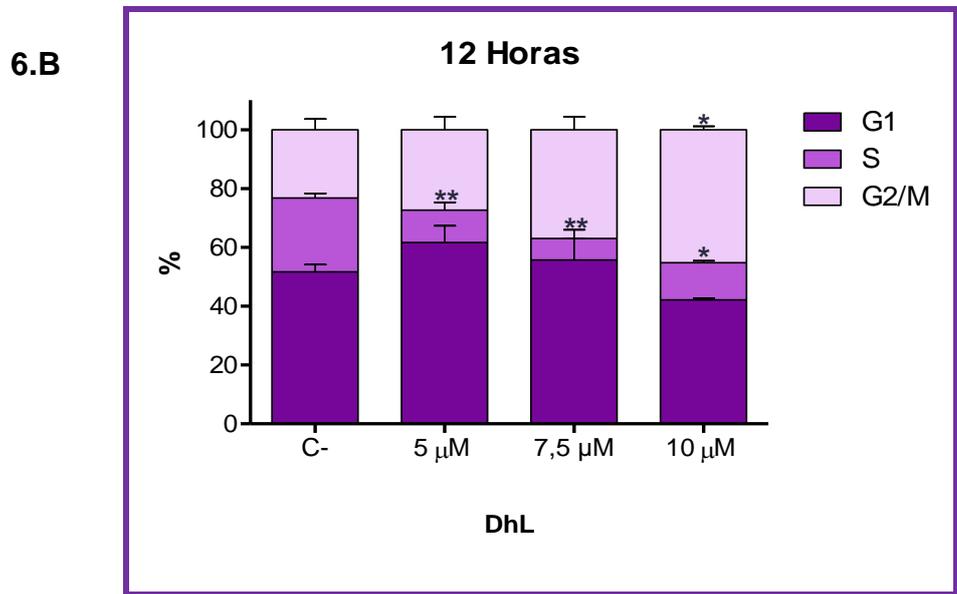
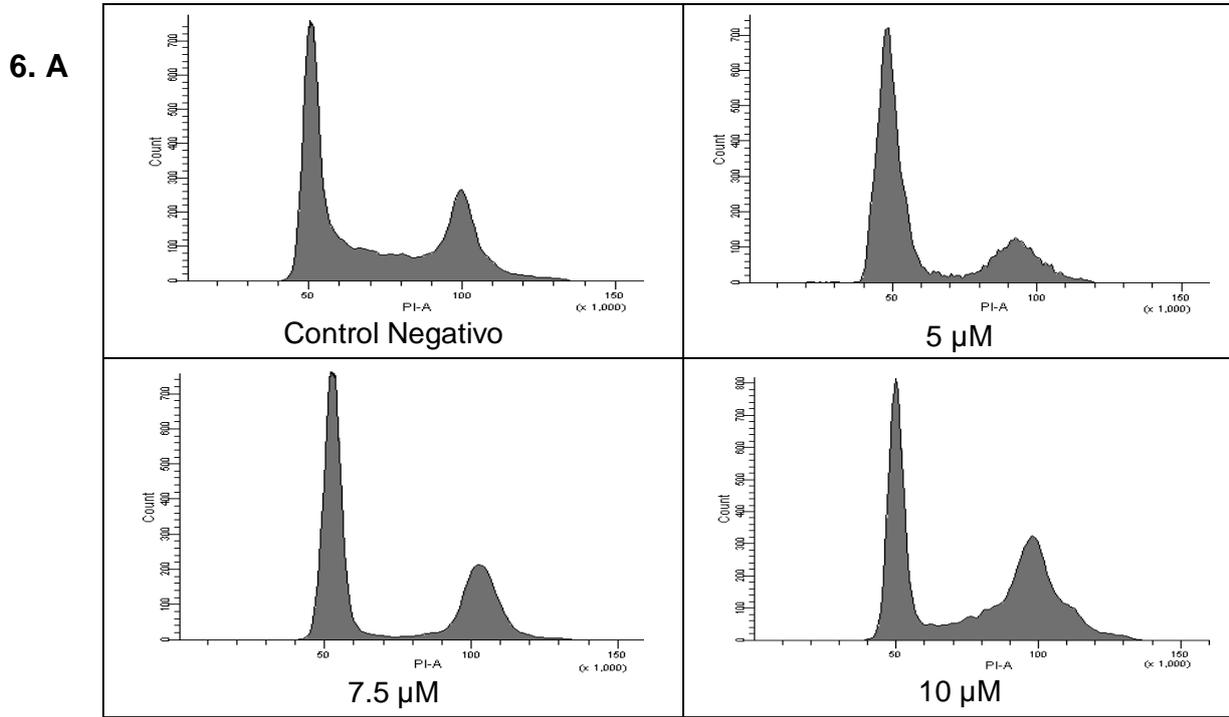


**Gráfica 5. Análisis del ciclo celular.** Ciclo celular de las células D-384 expuestas a 6 horas a las distintas concentraciones de Dehidroleucodina (5, 7.5 y 10 µM) y el control negativo. **A.** Los histogramas son los más representativos y muestran la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. **B.** Las barras representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en tres experimentos por duplicado en comparación con el control negativo, utilizando ANOVA, después de la prueba de ensayo de Dunnet (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

**Fuente:** Autor.

De igual manera a las 12 horas de exposición se observó una disminución evidente del porcentaje de células en la fase S de manera dosis-dependiente, así como un aumento de las células en la fase G2/M lo cual es más evidente en la concentración de 10 µM que

presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $*p<0,05$ ) con respecto al control como se puede observar en la gráfica 6 (A y B).

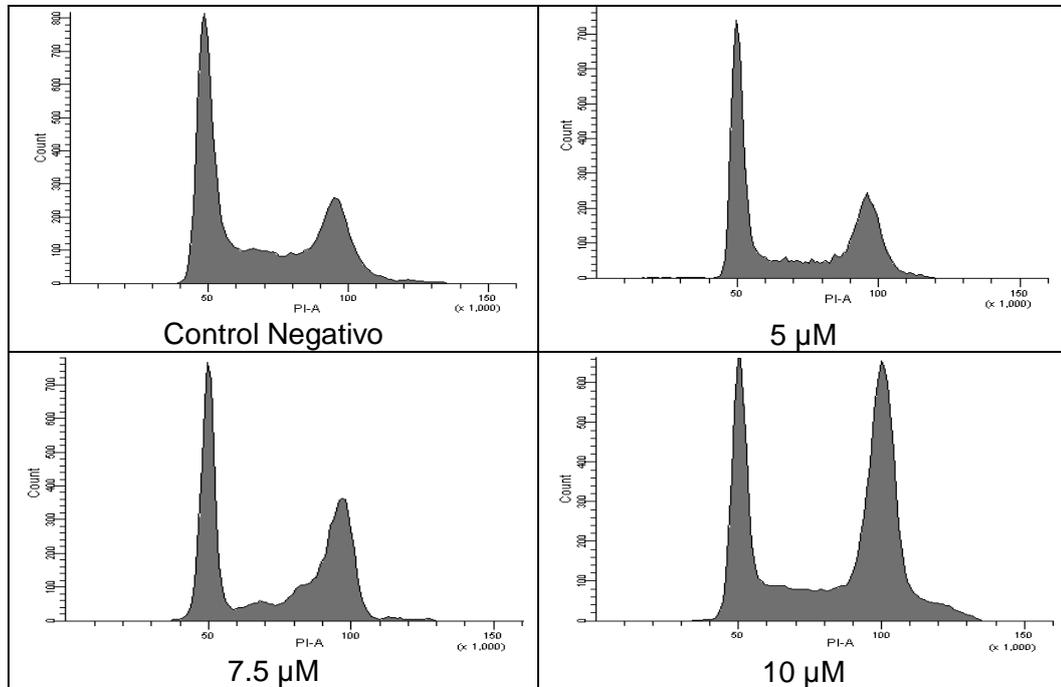


**Gráfica 6. Análisis del ciclo celular.** Ciclo celular de las células D-384 expuestas a 12 horas a las distintas concentraciones de Dehidroleucodina (5, 7.5 y 10 µM) y el control negativo. **A.** Los histogramas son los más representativos y muestran la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. **B.** Las barras representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en tres experimentos por duplicado en comparación con el control negativo, utilizando ANOVA, después de la prueba de ensayo de Dunnet ( $*p<0,05$ ,  $**p<0,001$ ,  $***p<0,0001$ ).  
**Fuente:** Autor.

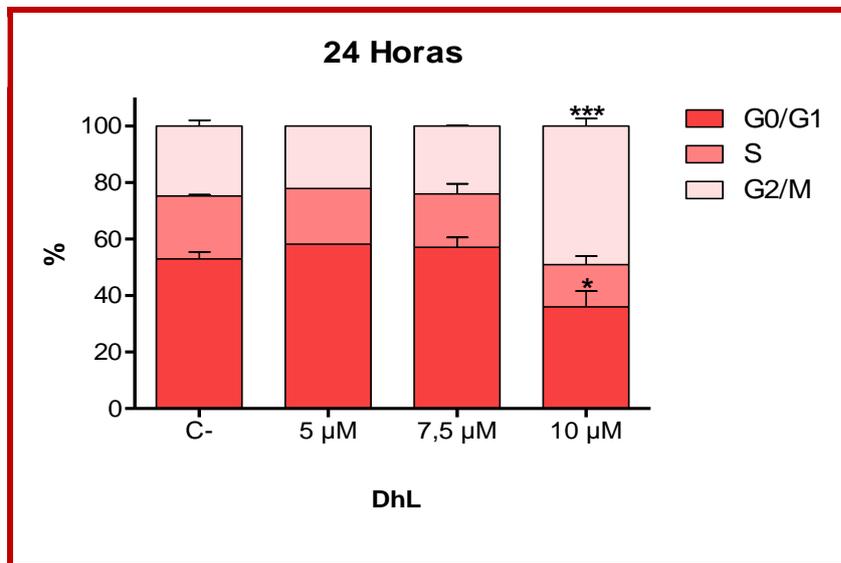
En la gráfica 7 (A y B), se muestra que después de 24 horas de exposición a las concentraciones 5 y 7.5 µM el efecto observado es diferente al visto s 6 y 12 horas ya que

no se observan cambios con respecto al control, sin embargo a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  se mantiene el efecto observado a las 6 y 12 horas, presentando una disminución de la fase G0/G1 acompañado de un aumento en la fase G2/M (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al control).

7. A



7.B



**Gráfica 7. Análisis del ciclo celular.** Ciclo celular de las células D-384 expuestas a 24 horas a las distintas concentraciones de Dehidroleucodina (5, 7.5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y el control negativo. **A.** Los histogramas son los más representativos y muestran la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. **B.** Las barras representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en tres experimentos por duplicado en comparación con el control negativo, utilizando ANOVA, después de la prueba de ensayo de Dunnet (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

Fuente: Autor.

Se conoce que el mecanismo por el cual las lactonas sesquiterpénicas alteran la proliferación celular es variado, algunas afectan la progresión del ciclo celular y conducen a la apoptosis mediante el bloqueo de las células en la fase G2/M y otras producen un bloqueo de la célula en la fase G0/G1 (Revisado en Kreuger *et al.*, 2012).

Para la Dehidroleucodina se ha reportado que tiene un efecto anti-proliferativo en las líneas celulares MCF-7 y HeLa mediante una detención transitoria en la fase G2/M seguido de la acumulación de células en la fase G1 del siguiente ciclo (Costantino *et al.*, 2013). A más de esto se conoce que la DhL produce una detención permanente en la fase G1 activada no sólo por bajas concentraciones, sino también por la exposición transitoria (Costantino *et al.*, 2013).

Sin embargo en nuestro estudio se pudo determinar que en las células D-384 las alteraciones en las transiciones de las fases del ciclo celular producidas por la DhL son permanentes a la concentración de 10 $\mu$ M produciéndose una detención en la fase G2/M del ciclo celular, efecto similar al reportado para algunas lactonas sesquiterpénicas tales como: Costunolida (Rasul *et al.*, 2012), Dehidrocostus lactona (Lohberger *et al.*, 2013), Deoxielefantopina (Kabeer *et al.*, 2013), Tomentosin e Inuviscolida (Rozenblat *et al.*, 2008) en diversas células cancerígenas.

Las lactonas sesquiterpénicas inhiben el crecimiento tumoral mediante la alquilación selectiva de macromoléculas biológicas que intervienen en el crecimiento celular como pueden ser enzimas reguladoras clave que controlan la división celular produciendo de este modo una inhibición de una variedad de funciones celulares, lo que dirige a la célula a la muerte celular (Chaturvedi, 2011). Sin embargo esta diversa actividad biológica presentada por las LS pueden ser afectada por tres importantes propiedades químicas (Ghantous *et al.*, 2010):

1. La reactividad del centro de alquilación,
2. La cadena lateral y la lipofilidad y
3. La geometría molecular y características electrónicas.

El conocimiento de la diversidad estructural de las lactonas sesquiterpénicas y su relación con la actividad biológica especialmente su actividad anti-cancerígena, hace que estos compuestos naturales tengan un buen potencial en la aplicación clínica.

El efecto citostático de la Dehidroleucodina dado por un arresto en la fase G2/M del ciclo celular en la línea celular D-384 demostrada en el presente estudio, es de gran importancia ya que en la actualidad las alteraciones del ciclo celular son consideradas como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos antineoplásicos y con estos resultados se puede considerar a la Dehidroleucodina como un compuesto prometedor para el desarrollo de fármacos contra el cáncer.

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

- La DhL a las concentraciones de 5, 7.5 y 10  $\mu\text{M}$  presenta una disminución de la proliferación celular dada por un efecto citostático, mientras que a la concentración de 15  $\mu\text{M}$  podría presentar un efecto citotóxico dado por inducción a la muerte en la línea celular de Astrocitoma Cerebral (D-384).
- La DhL a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  presenta un efecto citostático en la línea celular Astrocitoma Cerebral (D-384) dado por el arresto de las células en la fase G2/M del ciclo celular y una disminución del índice mitótico e índice de replicación.

## RECOMENDACIONES

- Dado a que el efecto anti-proliferativo de las lactonas sesquiterpénicas está dado por la inhibición de la síntesis de ADN, la detención del ciclo celular y seguido de una activación de la apoptosis, se recomienda estudiar el mecanismo por el cual la Dehidroleucodina presenta este efecto citostático con arresto en la fase G2/M del ciclo celular.

## Bibliografía:

1. ABTA. American Brain Tumor Association. Sobre tumores cerebrales. Manual para pacientes y cuidadores. Datos publicados en el 2002. <http://www.abta.org/understanding-brain-tumors/>
2. Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M. & Nozawa Y. (2008). Anti-Cancer Effects of Xanthenes from Pericarps of Mangosteen. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(3): 355–70.
3. Andreeff M., Goodrich D. & Pardee A. (2000). Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. En Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, et al. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5th edition.
4. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. & Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5): 839–851.
5. Bröker L., Kruyt F. & Giaccone G. (2005). Cell Death Independent of Caspases: A Review Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*, 3155–62.
6. Cerveira N., Bizarro S. & Teixeira M. (2012). Cancer cell cycle. *Canal BQ*, 9: 40–7.
7. Corn B. & El-Deiry W. (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*, 24(1): 83–90.
8. Costantino V., Mansilla S., Speroni J., Amaya C., Cuello-Carrión D., Ciocca D., Priestap H., Barbieri M., Gottifredi V. & Lopez L. (2013). The sesquiterpene lactone dehydroleucodine triggers senescence and apoptosis in association with accumulation of DNA damage markers. *PloS one*, 8(1):e53168.
9. Cotter T. (2009). Apoptosis and cáncer: the génesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, (9): 501-507.
10. Cragg G. & Newman D. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6):3670–95.
11. Chaturvedi D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 661(2):313–34.
12. Chen T., Stephens P., Middleton F. & Curtin N. (2011) Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug discovery today* 17(5-6):194–202.
13. Cho J., Kim A., Jung J., Cgun T. & Rhee M. (2004). Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 294(2-3):85-94.
14. Dai X., Zeng X., Peng F., Han Y., Lin H., Xu Y., Zhou T., Xie G., Deng Y., Mao Y., 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. *Cellular Physiology Biochemistry*, (29):281–90.
15. Demain A. & Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69: 1-39.
  16. Du T., Pua W. & Wasser M. (2011). Cell cycle phase classification in 3D in vivo microscopy of Drosophila embryogenesis. *BMC Bioinformatics*, 12(Suppl 13):S18.
  17. Farha A., Geetha B., Mangalam S., Dhanya S., Latha P. & Remani P. (2013). Apoptosis mediated cytotoxicity induced by isodeoxyelephantopin on nasopharyngeal carcinoma cells. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2): 2–7.
  18. Farha A., Sreedevi G., Nair M., Rajalekshmi D., Gopalakrishnan L., Kunjuraman S. & Prathapan R. (2013). Antineoplastic effects of deoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*, on lung adenocarcinoma (A549) cells. *Journal of integrative medicine*, 11(4): 269-277.
  19. Freshney R. Cytotoxicity. *Culture of Animal Cells*. (2010). A Manual of Basic Technique. 6th edition. Edited by Wiley-Liss 359-373.
  20. Garrett M. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81(5): 515-522.
  21. Garrido H. & Yunga E. (2010). Incidencia del Cáncer en Loja. Estudio de una década. SOLCA núcleo de Loja. Imprenta UTPL.
  22. Geetha B., Nair M., Latha P. & Remani P. (2012). Sesquiterpene lactones isolated from *Elephantopus scaber* L. inhibits human lymphocyte proliferation and the growth of tumour cell lines and induces apoptosis in vitro. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012: 1-8.
  23. Ghantous A., Gali-Muhtasib H., Vuorela H., Saliba N. & Darwiche N. (2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. *Drug discovery today*, 15(15-16):668–78.
  24. Globocan 2008. Ecuador. Datos publicados en el 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
  25. 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.
  26. Gomes R. & Colquhoun A. (2012). E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids in Health and Disease*, 11(1): 171.
  27. Göpfert J., MacNevin G., Ro D. & Spring O. (2009) Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitata glandular trichomes. *BMC Plant Biology*, 9(1):86.

28. Hanahan D. & Weinberg R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–74.
29. Holland N., Duramad P., Rothman N., Figgs L., Blair A., Hubbard A. & Smith M. (2002). Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation Research*, 521: 165-78.
30. Ichikawa H., Nair M., Takada Y., Sheeja D., Kumar M., Oommen O. & Aggarwal B. (2006). Isodeoxyelephantopin, a novel sesquiterpene lactone, potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor-kappaB (nf-kappaB) activation and nf-kappaB-regulated gene expression. *Clinical Cancer Research*, 12(19):5910-8.
31. Kabeer F., Sreedevi G., Nair M., Rajalekshmi D., Gopalakrishnan L., Kunjuraman S. & Prathapan R. (2013). Antineoplastic effects of deoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*, on lung adenocarcinoma (A549) cells. *Journal of integrative medicine*, 11(4):269–77.
32. Kanduc D., Mittelman A., Serpico R., Sinigaglia E., Sinha A, Natale Santacroce R., Grazia Di Corcia M., Lucchese A., Dini L., Pani P., Santacroce S., Simone S., Bucci R. & Farber E. (2002). Cell death : Apoptosis versus necrosis (Review). *International journal of oncology*.
33. Kannan T., Quah B., Azlina A. & Samsudin A. (2006). Mitotic Index and Chromosomal Analyses for Hydroxyapatite Implantation in Rabbits. *Orofacial Sciences*, 07:15–20.
34. Kroemer G., Galluzzi L, Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E., Baehrecke E., Blagosklonny M., El-Deiry W., Golstein P., Green D., Hengartner M., Knight R., Kumar S., Lipton S., Malorni W., Nuñez Ñ., Peter M., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. & Melino G. (2009). Classification of cell death. *Cell Death and Differentiation*, 16(1):3–11.
35. Liu D., Ander B. & Sharp F. (2010). Cell cycle inhibition as a strategy for treatment of central nervous system diseases which must not block normal neurogenesis. *Neurobiology of disease*, 37(3):549–57.
36. Liu X., Yang J., Zhang S., Liu X. & Liu D. (2010) Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide. *BioMed Central*, 10(1): 684.
37. Lohberger B., Rinner B., Stuendl N., Kaltenecker H., Steinecker B., Bernhart E., Rad E., Weinberg A., Leithner A. & Bauer R. (2013). Sesquiterpene Lactones

- Downregulate G2/M Cell Cycle Regulator Proteins and Affect the Invasive Potential of Human Soft Tissue Sarcoma Cells. *PLoS ONE*, 8(6):1–9.
38. Maiese K., Hou J., Chong Z. & Shang Y. (2009). Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *ScientificWorldJournal*. 9:1072-1104.
  39. Malumbres M. & Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 9(3):153–66.
  40. Malumbres M. (2011). Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiological reviews*, 91(3):973–1007.
  41. Mayeux R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. *The journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(2):182–8.
  42. McDonald E. & El-Deiry W. (2001). Checkpoint genes in cancer. *Annals of Internal Medicine*, 33(2): 113–22.
  43. Modzelewska A., Sur S., Kumar S. & Khan S. (2005). Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry -Anti-Cancer Agents*, 5(5):477-99.
  44. Moore C. & Best R. (2001). Chromosome Preparation and Banding. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1–7.
  45. Morley K., Ferguson P. & Koropatnick J. (2007). Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer letters*, 251(1):168–78.
  46. Nunez R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3):67–70.
  47. Öcal A. & Eroğlu H. (2012). In vitro cytogenetic effects of Hypericum heterophyllum in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 7(1):36–41.
  48. Ojeda C. (2012). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares tumorales humanas, para la valoración citotóxica in vitro de extractos vegetales y metabolitos secundarios, mediante el ensayo de tinción con violeta cristal. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
  49. OMS. Organización mundial de la salud. Cáncer: Nota descriptiva N° 297. Datos publicados en el 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
  50. Ordóñez P., Quave C., Reynolds W., Varughese K., Berry B., Breena P., Malagón O., Smeltzerb M. & Compadre C. (2011). Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *Journal of ethnopharmacology*, 137(2):1055-9.

51. Park M. & Lee S. (2003). Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1):60–5.
52. Patel B., Das S., Prakash R. & Yasir M. (2010). Natural Bioactive Compound with Anticancer Potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(1): 32–41.
53. Penissi A., Giordano O., Guzman J. & Rudolph M. (2006). Chemical and Pharmacological Properties of Dehydroleucodine, A Lactone isolated from *Artemisia douglasiana* Besser. *Molecular Medicinal Chemistry*, 1(11)
54. Pietenpol J. & Stewart Z. (2002). Cell cycle checkpoint signaling : Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 182:475–81.
55. Polo L., Castro C., Cruzado M., Collino C., Cuello-Carrión F., Ciocca D., Giordano O., Ferrari M. & López L. (2007). 11,13-dihydro-dehydroleucodine, a derivative of dehydroleucodine with an inactivated alkylating function conserves the anti-proliferative activity in G2 but does not cause cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, 556(1-3):19-26.
56. Priestap H., Galvis A., Rivero N., Constantino V., Lopez L. & Barbieri A. (2012). Dehydroleucodine and dehydroparishin-B inhibit proliferation and motility of B16 melanoma cells. *Phytochemistry Letters*, 5(3):581-585.
57. Rasul A., Yu B., Yang L., Arshad M., Khan M., Ma T. & Yang H. (2012). Costunolide, a sesquiterpene lactone induces G2/M phase arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7):1191–200.
58. Riss T., Moravec R., Niles A., Benink H., Worzella T. & Minor L. (2004). Cell Viability Assay. En Sittampalam G., Gal-Edd N., Arkin M., et al., Editors. Assay Guidance Manual [Internet].
59. Rixe O. & Fojo T. (2007). Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?. *Clinical cancer research*, 13(24): 7280–7.
60. Roze L., Chanda A. & Linz J. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 35-48.
61. Rozenblat S., Grossman S., Bergmann S., Gottlieb H., Cohen Y. & Dovrat S. (2008). Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 75(2):369-382.
62. Rozier A., Clifford M. & Ashihara H. (2006). Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Recuperado de:

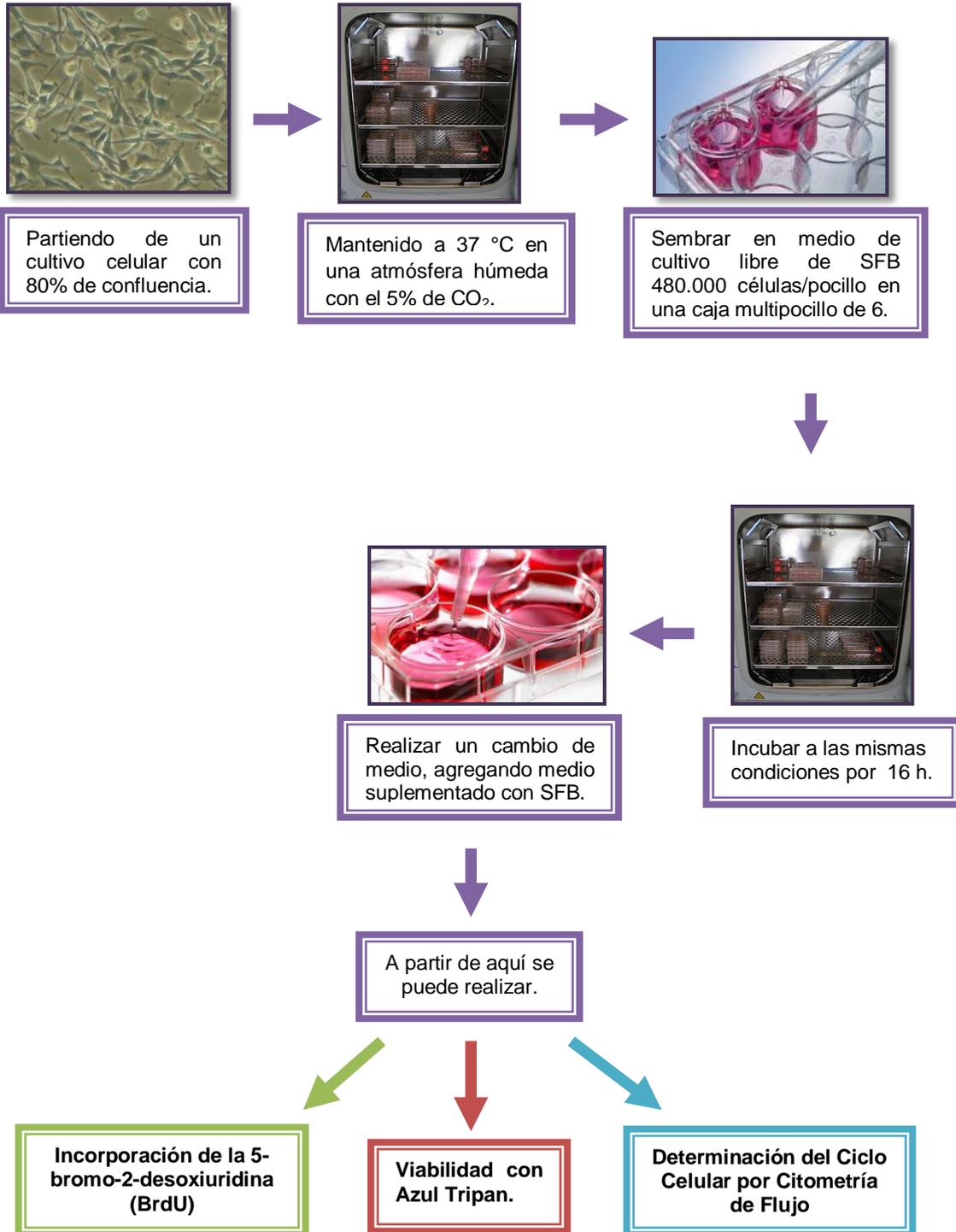
<http://carlasabandar.files.wordpress.com/2012/10/plant-secodnary-metabolites-by-alan-crozier.pdf>

63. SACC. Sociedad Americana contra el Cáncer. Datos publicados en el 2012. <http://www.cancer.org/espanol/cancer/aspectosbasicossobreelcancer/que-es-el-cancer>
64. Saikali M., Ghantous A., Halawi R., Talhouk S., Saliba N. & Darwiche N. (2012) Sesquiterpene lactones isolated from indigenous Middle Eastern plants inhibit tumor promoter-induced transformation of JB6 cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1): 89.
65. Sakaue-Sawano A., Kobayashi T., Ohtawa K. & Miyawaki A. (2011). Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biology*, 12(1):2.
66. Sarica F., Cekinmez M., Tufan K., Sen O., Onal H., Mertsoylu H., Topkan E., Pehlivan B., Erdogan B. & Altinors M. (2012). Five-year follow-up results for patients diagnosed with anaplastic astrocytoma and effectiveness of concomitant therapy with temozolomide for recurrent anaplastic astrocytoma. *Asian journal of neurosurgery*, 7(4): 181–90.
67. Shchors K., Persson A., Rostker F., Tihan T., Lyubynska N., Li N., Swigarta L., Bergere M., Hanahanc D., Weissa W. & Evana G. (2013). Using a preclinical mouse model of high-grade astrocytoma to optimize p53 restoration therapy. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16): E1480–9.
68. Sherbet G. & Patil D. (2003). Genetic abnormalities of cell proliferation, invasion and metastasis, with special reference to gynaecological cancers. *Anticancer Research*, 23:1357-71.
69. Shu M., Zheng X., Wu S., Lu H., Leng T., Zhu W., Zhou Y., Ou Y., Lin X., Lin Y., Xu D., Zhou Y. & Yan G. (2011). Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells. *Molecular Cancer*, 10(1): 59.
70. Tabopda T., Ngoupayo J., Liu J., Shaiq A., Khan S., Ngadjui B. & Luu B. (2008). Further cytotoxic sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* Kunth. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(2): 231– 233, 2008.
71. Tan W., Lu J., Huang M., Li Y., Chen M., Wu G., Gong J., Zhong Z., Xu Z., Dang Y., Guo J., Chen X. & Wang Y. (2011). Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese medicine* 6(1): 27.
72. Tanaka T., Tanaka M., Tanaka T. & Ishigamori R. (2010). Biomarkers for Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9):3209–25.

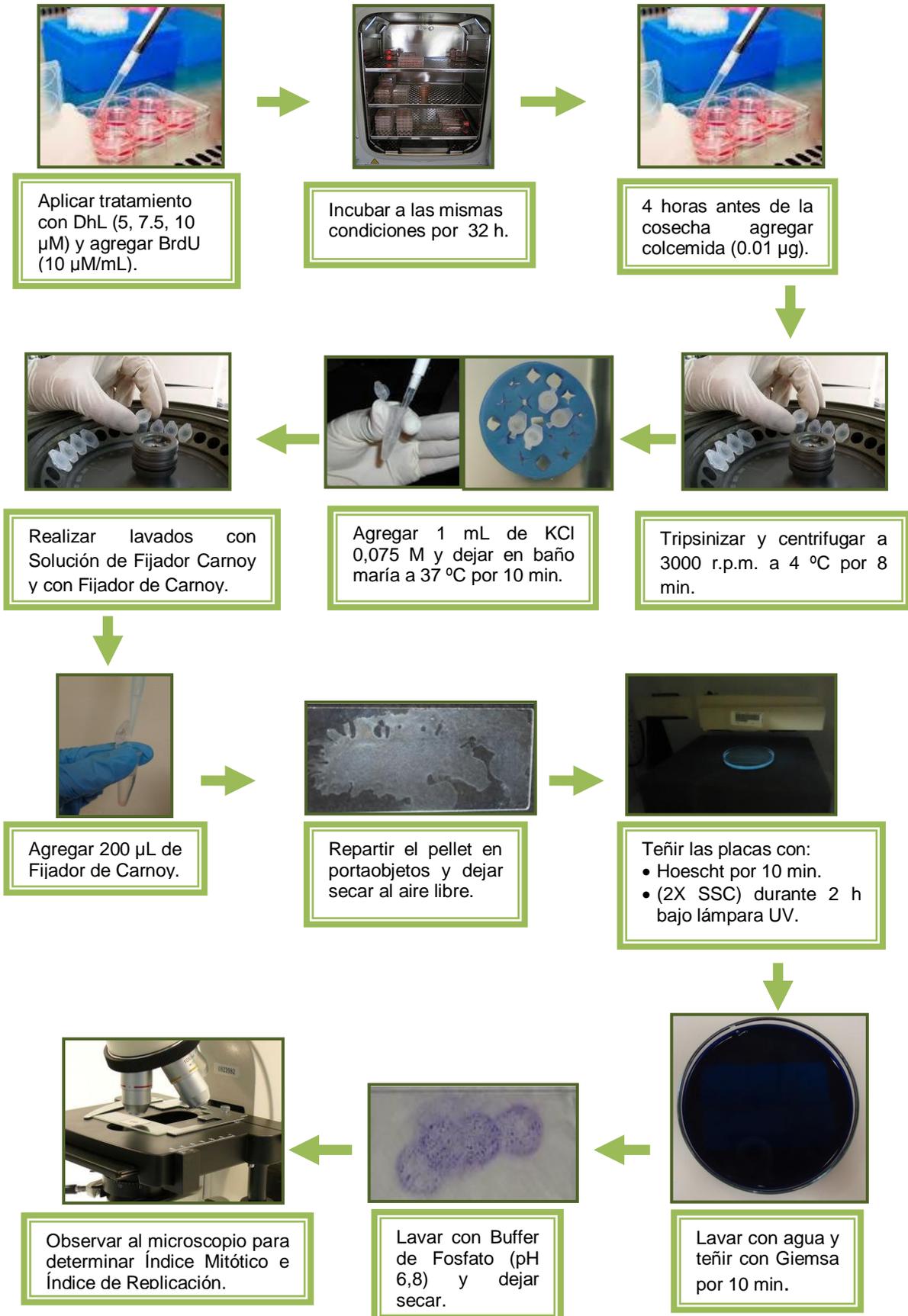
73. Taylor R., Cullen S. & Martin S. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*, (9): 231-241.
74. Tene V., Malagón O., Vita., Finzi P., Vidari G., Armijos C. & Zaragoza T. (2007) An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal Ethnopharmacol*, 111:63–81.
75. Villacís J. (2013). Efecto citostático de 9 derivados de Argentatina B en células de cáncer de colon (RKO). Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
76. Weng S., Sui M., Chen S., Wang J., Xu G., Ma J., Shan J. & Fang L. (2009). Parthenolide inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of G0/G1 phase cell cycle arrest. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(7):528–35.
77. Zhang S., Won Y., Ong C. & Shen H. (2005). Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry -Anti-Cancer Agents*, 5(3):239-49.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. Siembra y Sincronización Celular.



## ANEXO 2. Incorporación de la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)



### ANEXO 3. Determinación del Ciclo Celular por Citometría de Flujo

