



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Análisis del efecto clonogénico y ciclo celular del extracto metanólico de
Grias neuberthii sobre líneas celulares tumorales humanas.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Ortiz Diaz, Kevin Osmar

DIRECTOR: Guamán Ortiz, Luis Miguel, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2019



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2019

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Luis Miguel Guamán Ortiz

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Análisis del efecto clonogénico y ciclo celular del extracto metanólico de *Grias neuberthii* sobre líneas celulares tumorales humanas, realizado por Ortiz Diaz Kevin Osmar, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2019

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Ortiz Diaz, Kevin Osmar, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Análisis del efecto clonogénico y ciclo celular del extracto metanólico de *Grias neuberthii* sobre líneas celulares tumorales humanas, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Miguel Guamán Ortiz director 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 investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.

Autor: Ortiz Diaz, Kevin Osmar

Cédula: 1103784821

DEDICATORIA

A mis padres: Hernan y Amparo quienes han sido el pilar fundamental de mi vida, por siempre creer en mí y por ser siempre mí apoyo incondicional.

A mis tíos: Betty y Jhon, a mi abuelita María por guiarme por el camino correcto y motivarme a cumplir mis sueños.

A mi hermano Javier, 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.

Al Ph.D. Luis Guamán Ortiz, director 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.

A la Ph.D. Natalia Bailón por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mi tesis, por sus consejos, enseñanzas a lo largo de este proceso, por su apoyo incondicional para lograr la culminación de este proyecto como también por ayudarme a formarme en valores y virtudes.

A la Mgtr. Ma. Isabel Ramírez con quien pude colaborar y a quien debo en parte mi formación dentro del Laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, Andrés Paucar, Andrés Quito, Daisy Vega, Stephania torres, Yeraldine Vivanco, que fueron partícipes de alegrías, tristezas, frustraciones y éxitos, un estupendo equipo de trabajo.

A Gabriela González gran amiga, por su ética profesional, gran capacidad de trabajo y motivación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Cáncer.....	5
1.2. Causas del Cáncer.....	6
1.3. Incidencia.....	6
1.4. Cáncer colorrectal.....	7
1.5. Tratamiento.....	8
1.6. Medicina Tradicional.....	8
1.6.1. Antineoplásicos de origen vegetal.....	9
1.6.2. <i>Grias neuberthii</i> Macbr.....	10
1.7. Ciclo Celular.....	11
1.8. Mecanismos moleculares del ciclo celular, ciclinas y kinasas.....	12
1.9. Puntos de control del ciclo celular y p53.....	14
1.9.1. Punto de control G ₁ /S.....	15
1.9.2. Punto de control S.....	15
1.9.3. Punto de control G ₂ /M.....	15
1.10. p53 y muerte celular.....	17
1.11. Biomarcadores.....	18
1.11.1. Ensayo Clonogénico.....	18
1.11.2. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo.....	19
CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO	20
2.1. Objetivo General.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	22
3.1. Obtención extracto <i>Grias neuberthii</i>	23
3.2. Cultivo celular.....	23
3.3. Viabilidad por Azul de Tripano.....	23
3.4. Determinación del ciclo celular mediante Citometría de Flujo.....	24

3.5.	Ensayo Clonogénico.....	24
3.6.	Análisis Estadístico.....	25
CAPÍTULO IV. RESULTADOS		26
4.1.	Viabilidad por el método de exclusión de Azul Tripano.....	27
4.2.	Ciclo Celular mediante Citometría de Flujo.....	28
4.3.	Ensayo Clonogénico.....	30
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....		32
CONCLUSIONES		35
RECOMENDACIONES.....		36
BIBLIOGRAFÍA.....		37
ANEXOS.....		42
ANEXO 1.....		43
ANEXO 2.....		43
ANEXO 3.....		43
ANEXO 4.....		44

Lista de Figuras

Figura 1. Características de las células cancerígenas	5
Figura 2. Línea Celular RKO y SW613-B3	7
Figura 3. Mapa de distribución de <i>Grias neuberthii</i> en Ecuador	11
Figura 4. Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas	13
Figura 5. Punto de control G ₁ /S	16
Figura 6. Autofagia	18
Figura 7. Total de células de las líneas celulares RKO y SW613-B3	27
Figura 8. Células muertas en la línea celular RKO	27
Figura 9. Células muertas en la línea celular SW613-B3.....	28
Figura 10. Análisis del ciclo celular de la línea celular RKO expuesta a GNTM.....	29
Figura 11. Análisis del ciclo celular de la línea celular SW613-B3 expuesta a GNTM.....	29
Figura 12. Fotos del ensayo clonogénico de la línea celular RKO	30
Figura 13. Análisis clonogénico de la línea celular RKO	31
Figura 15. Fotos del ensayo clonogénico de la línea celular SW613-B3	31
Figura 16. Análisis clonogénico de la línea celular SW613-B3	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- APC:** complejo promotor de anafase.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ATM:** Ataxia telangiectasia mutado.
- ATR:** ATM relacionado con Rad3.
- Cdc25:** Ciclo de división celular 25.
- CDK:** Ciclinas dependientes de quinasas.
- CKIs:** Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
- CHK:** Serina/treonina quinasa.
- Cip:** Proteína inhibidora de CDK.
- CpG:** Pares de citosina y guanina enlazados por fosfato.
- Dxo:** Doxorrubicina
- E2F:** Factor de transcripción 2.
- FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos.
- gadd45:** Los genes Growth Arrest y DNA Daño.
- GNTM:** extracto metanólico de tallos de *Grias Neuberthii*.
- h-TRbeta1:** receptor tiroideo humano.
- INK4:** Inhibidor de CDK 4.
- IP:** Ioduro de propidio.
- Kip:** Proteína inhibidora de CDK.
- MT:** Medicina tradicional.
- MPF:** Promotor de la fase M.
- MYT:** Quinasas de tirosina y treonina asociadas a la membrana.
- PAF:** Poliposis adenomatosa familiar.
- Rb:** Retinoblastoma.
- u-PAR:** Receptor uroquinasa.
- WEE:** Del inglés Wee = pequeño.

RESUMEN

EL cáncer es el proceso en que las células se replican de una manera descontrolada y se diseminan mediante metástasis. Para contrarrestar el cáncer, millones de personas en el mundo recurren a la medicina tradicional. En el Ecuador podemos encontrar la especie *Grias neuberthii* Macbr, cuyo uso medicinal es considerado en la región sur del país. El presente trabajo se desarrolla con la finalidad de identificar la capacidad citotóxica y citostática que el extracto metanólico de *Grias neuberthii* induce sobre células tumorales RKO con p53 normal y SW613-B3 con p53 mutado mediante el ensayo clonogénico y el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Los resultados demuestran que el extracto no detiene el ciclo celular en ninguna de las dos líneas celulares; mientras que, en el ensayo clonogénico al utilizar la CI_{50} , la línea celular RKO reduce su capacidad de formar colonias, mientras que SW613-B3 ha demostrado tener una mayor resistencia a los tratamientos con extractos antiproliferativos en virtud al estado que presenta p53.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de colon; RKO; SW613-B3; citostático; clonogénico

ABSTRACT

Cancer is the process in which cells replicate in an uncontrolled manner and get spread by metastasis. To counteract cancer, millions of people in the world turn to traditional medicine. In Ecuador, we can find the species *Grias neuberthii* Macbr, whose medicinal use is considered in the southern region of the country. The present work is developed with the purpose of identifying the cytotoxic and cytostatic capacity that the methanolic extract of *Grias neuberthii* induces on tumor cells RKO with normal p53 and SW613-B3 with p53 mutated through the clonogenic assay and the analysis of the cell cycle by cytometry of flow. The results show that the extract does not stop the cell cycle in any of the two cell lines; whereas, in the clonogenic assay when using the CI_{50} , the RKO cell line reduces its ability to form colonies, whereas SW613-B3 has been shown to have greater resistance to treatments with antiproliferative extracts by virtue of the p53 state.

KEY WORDS: Colon cancer; RKO; SW613-B3; cytostatic; clonogenic

INTRODUCCIÓN

El cáncer empieza cuando las células se dividen de una manera descontrolada, sobrepasando el nivel de proliferación normal. Estas células generan tumores malignos ya que, al aumentar el tamaño de éstos, las células que los conforman pueden trasladarse a diferentes lugares del cuerpo mediante el torrente sanguíneo y sistema linfático, creando de este modo tumores secundarios (NIH, 2012).

Dentro de los métodos que se usan para evitar la proliferación descontrolada de células anormales o eliminarlas se encuentran la radioterapia y principalmente la quimioterapia. Esta última emplea una alta variedad de compuestos antineoplásicos que inhiben el desarrollo tumoral. Dado que el cáncer exhibe características clave que otorgan la capacidad a las células anormales para estimular su propia proliferación y resistir a las señales que inhiben su crecimiento, la búsqueda de compuestos químicos a base de extractos vegetales que puedan reprimir el desarrollo de tumores es un proceso necesario y multidisciplinario (Bailon-Moscoso et al., 2017).

De acuerdo a ello, la medicina tradicional MT a base de plantas ha sido por décadas recurso importante para la obtención de múltiples compuestos fitoquímicos naturales con efectos terapéuticos, entre los que se destacan aquellos con propiedades antitumorales (Guamán-Ortiz, 2014).

El Ecuador se considera la región con la tercera densidad más alta de especies de plantas endémicas en el mundo (Bailon-Moscoso et al., 2015; Joppa et al., 2013), encontrándose aquí a la familia Lecythidaceae. Dentro de esta familia tenemos a la especie *G. neuberthii* Macbr; la cual, en MT es utilizada para tratar trastornos gastrointestinales, para el paludismo, para la malaria y como antitumoral (Aguilar y Aguirre, 2017; Lozano, 2013).

Por lo detallado anteriormente, el presente trabajo se desarrolla en torno a la capacidad citotóxica que, en estudios previos, ha demostrado poseer el extracto metanólico de *Grias Neuberthii* (GNTM) sobre células tumorales, independientemente del estatus de p53 (Samaniego, 2017). Motivo por el cual, en esta ocasión, se estudió la capacidad clonogénica y la distribución del ciclo celular en líneas celulares tumorales humanas con p53 normal y p53 no funcional.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Cáncer.

El cáncer es producido por un conjunto de enfermedades de origen multifactorial donde se relacionan estrechamente factores genéticos con factores ambientales (Redondo-Blanco, 2014). Las células tumorales se caracterizan por dividirse de una forma descontrolada hasta formar tumores. La proliferación sin control se produce al alterarse el proceso ordenado de crecimiento, división, envejecimiento y muerte celular, creando poco a poco masas de tejido o neoplasias, exceptuando las leucemias, las cuales no forman tumores sólidos (OMS, 2017). Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos no se dispersan a otros tejidos, aunque presentan tamaños grandes pueden ser extraídos oportunamente por procedimientos quirúrgicos evitando el riesgo de que crezcan de nuevo. Por el contrario, los tumores malignos pueden difundirse al aumentar el tamaño de éstos, ya que algunas células tumorales tienen la capacidad de desligarse, trasladarse a diferentes lugares del cuerpo mediante la sangre y el sistema linfático, y crear tumores secundarios, proceso conocido como metástasis (NIH, 2012).

Durante el desarrollo tumoral, las células cancerosas adquieren varias características para su proliferación y supervivencia. Así, las células pueden: replicarse desmedidamente, producir metástasis, reprogramar el metabolismo energético, preservar la señalización proliferativa (oncogenes activos), evitar a los supresores de crecimiento (genes supresores del crecimiento inactivos), generar inestabilidad del genoma para la acumulación de mutaciones, estimular la angiogénesis y desarrollar resistencia a fármacos quimioterapéuticos (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 1. Características de las células cancerígenas.

Fuente: Hanahan y Weinberg, 2011.

Elaboración: Hanahan y Weinberg, 2011.

Las células normales se diferencian de las cancerosas de diversas formas; por ejemplo, las células cancerosas son menos especializadas que las normales, así mismo son capaces de influir sobre las células normales. Las células tumorales, con frecuencia, pueden evadir el sistema inmunitario y también pueden usar el sistema inmunitario para seguir vivas y crecer (Guamán-Ortiz, 2018; NIH, 2012).

1.2. Causas del Cáncer.

Las mutaciones generadas en las células normales pueden resultar letal para la misma o pueden producir cáncer, este proceso está conformado por varias etapas donde existe una progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre tres categorías de agentes externos (carcinógenos físicos, químicos y biológicos) y los factores genéticos del paciente. La edad es otro factor de riesgo muy importante, ya que con la edad se acumulan los factores de riesgo y la pérdida de efectividad de los mecanismos de reparación celular (López-Otín et al., 2013; OMS, 2017). Además, los factores relacionados con la conducta (beber alcohol, fumar, exponerse a la radiación ultravioleta, usar camas de bronceado, tener exceso de peso, comer alimentos poco saludables, estrés y sedentarismo) también pueden ser responsables del desarrollo del cáncer ya que, los cánceres de mayor prevalencia a nivel internacional están asociados a factores ambientales y estilo de vida (Fernandez et al., 2016).

1.3. Incidencia.

La principal causa de muerte en el mundo es el cáncer, en el año 2018 se presentaron más de 18 millones de casos nuevos de cáncer alrededor del mundo, generando la muerte de más de 9 millones de personas, siendo los cánceres pulmonar (11,6%), colorrectal (10,2%), prostático (7,1%) y estómago (5,7%) los que más decesos causaron. En lo que se refiere a América Latina y el Caribe, se presentó una incidencia de más de 1 millón de casos y una mortalidad de más de 6 mil personas. En el Ecuador, en el año 2018, con una población de 16 millones habitantes, se dieron más de 28 mil casos nuevos de cáncer y más de 14 mil muertes. De los cánceres reportados, los más frecuentes son: próstata (26%), estómago (10,7%), colorrectal (7,1%) y linfoma no Hodgkin (6%) (Globocan, 2018).

En el cantón Loja, se dieron más de 3 mil casos de cáncer en el periodo de 1997 – 2006, de los cuales, el 40,6% se produjo en hombres y el 59,4% en mujeres. Siendo el cáncer más frecuente en mujeres el de cuello uterino (23%) y en hombres el gástrico (20,4%) (Cueva, 2014).

1.4. Cáncer colorrectal.

Ya que el cáncer colorrectal representa uno de los principales factores de muerte tanto en hombres como en mujeres dentro del territorio ecuatoriano, en el presente trabajo se utilizó como modelo biológico dos líneas celulares tumorales humanas de origen colorrectal (Figura 2). Este cáncer es un adenocarcinoma que empieza con un pólipo ubicado en la pared interna del colon o recto, los cuales pueden tornarse cancerosos a medida que pasa el tiempo (NIH, 2014). Existen antecedentes familiares en el 30% de los casos reportados; de éstos, el 5% es hereditario o producido por poliposis adenomatosa familiar (PAF). Además, el consumo de alcohol y el tabaquismo aumentan el riesgo de padecer cáncer de colon (Hernández et al., 2017; Romero-Benavides et al., 2018).

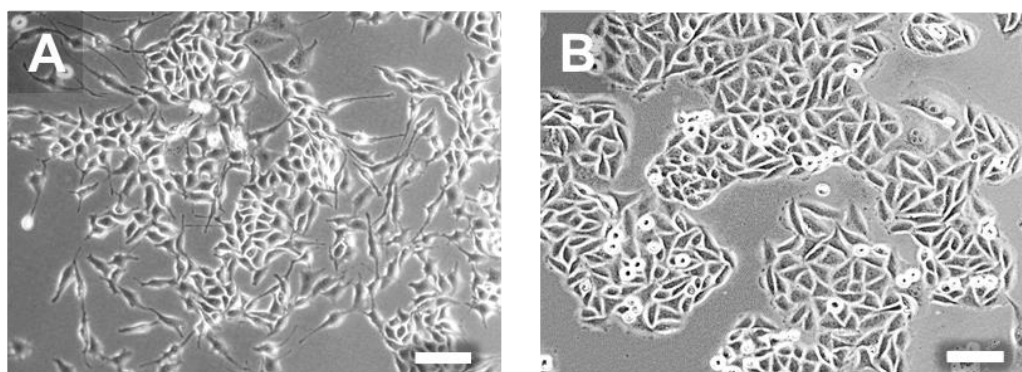


Figura 2: A) Línea celular RKO con p53 normal B) Línea celular SW613-B3 con p53 mutado, en cultivo, observadas en aumento 40x microscopio Axioskop 2 plus (ZEISS). Barra de escala 50 μ m.

Fuente: Samaniego, 2017.

Elaboración: Samaniego, 2017.

Este padecimiento es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado, en el año 2018 tuvo una incidencia del 10,2% a nivel mundial con una tasa mortalidad del 9,2% (Globocan, 2018). Se espera que el cáncer colorrectal aumente en un 60% para el 2030, más de 2,2 millones de casos nuevos y 1,1 millones de muertes a nivel mundial. Este incremento en la incidencia se debe principalmente a los hábitos alimenticios de la población (OMS, 2017; Romero-Benavides et al., 2017). En la región de las Américas, es el cuarto cáncer más común, produciéndose por año alrededor de 240 mil nuevos casos y 112 mil muertes (OPS, 2017). Para que un pólipo se torne canceroso es imprescindible una gran cantidad de mutaciones genéticas, estas mutaciones pueden ser reparables o irreparables. El cáncer de colon puede estar inducido por tres vías carcinogénicas: por inestabilidad cromosómica (la más frecuente), inestabilidad de microsatélites y por metilación de las islas CpG (pares de citosina y guanina enlazados por fosfato) (Merino, 2017). Las características que presenta la línea celular RKO (Figura 2A) para el presente estudio son: morfología epitelial, contiene p53 normal, expresa el receptor uroquinasa (u-PAR), carece de receptor nuclear endógeno del receptor tiroideo

humano (h-TRbeta1) y crece en monocapa (ATCC, 2018). Mientras que la segunda línea celular SW613-B3 (Figura 2B) presenta: morfología epitelial, posee p53 no funcional debido a la mutación por transición de CGT a CAT en el codón 273 del gen de p53, bloqueando la transcripción de dicho gen (Guamán-Ortiz et al., 2014).

1.5. Tratamiento.

Dentro de los métodos que se usan para evitar la proliferación descontrolada de células tumorales, eliminar las ya existentes y evitar su diseminación se encuentran los procesos quirúrgicos, la radioterapia y principalmente la quimioterapia, siendo esta última la más utilizada, aunque las tres se pueden combinarse de acuerdo al tipo y a la gravedad con la que se presenta el cáncer (Amin et al., 2016; Bailon-Moscoso et al., 2017; Bailon-Moscoso et al., 2015).

La cirugía es el proceso más antiguo que existe para la extracción de tumores sólidos o la mayor cantidad de tejido canceroso, evitando alterar lo menos posible la funcionalidad del órgano del cual se extrae. Se suele utilizar en conjunto con la radioterapia y quimioterapia (Cueva, 2014; Rodríguez, 2015). En la radioterapia se usa ciertos tipos de energía para eliminar células malignas o reducir tumores, produciendo daño en el ADN de las células anormales lo que imposibilita su reproducción. (Cueva, 2014; Pérez et al., 2018).

Por otro lado, la quimioterapia es un método en el que se administra una serie de compuestos químicos antineoplásicos que hacen más lento el crecimiento tumoral o destruyen las células cancerosas (NIH, 2015). La quimioterapia puede disminuir la velocidad de expansión del cáncer, detenerlo, reducir la posibilidad de que recidiva o curarlo dependiendo de la correcta administración farmacológica y del tipo de cáncer. Se acostumbra a administrar diversos quimioterapéuticos en secuencia con el objetivo de eliminar la resistencia de las células tumorales a los fármacos aislados, esta resistencia se ha visto en el 50% de los tumores debido a diferentes factores, como por ejemplo la mutación del gen *MDR1* (Bailon-Moscoso et al., 2015; Guamán et al., 2017). La eficacia terapéutica de combinaciones de algunos compuestos naturales con quimioterapia clásica ha demostrado que, los compuestos naturales pueden modular el metabolismo de las células y quimiosensibilizarlas, lo que sugiere que algunos compuestos naturales podrían ser adyuvantes útiles en la terapia contra el cáncer (Cruz et al., 2014; Guamán-Ortiz, 2014).

1.6. Medicina Tradicional.

La medicina tradicional (MT) hace referencia a las creencias y experiencias de los indígenas de diferentes culturas, usadas para la prevención y tratamiento de enfermedades físicas y mentales. La MT es muy diversa, ya que existen una amplia variedad de terapias y prácticas que varían de un lugar a otro, aludiendo por ende a una amplia gama de opiniones y acciones

terapéuticas no definidas en la sociedad médica moderna. En esta práctica se usan muchos productos vegetales: plantas completas, partes de plantas, extractos o compuestos activos aislados. La relación que existe entre las personas y las plantas se define científicamente como etnobotánica, este conocimiento de las plantas es el legado de nuestros antepasados, transmitido de generación en generación en poblaciones de todo el mundo (Guamán-Ortiz, 2014).

Alrededor del mundo, gran parte de la población usa normalmente los recursos naturales para aliviar dolores y curar enfermedades. Esto se magnifica en los países en desarrollo, donde las plantas son los recursos medicinales de mayor accesibilidad. La diversidad química y biológica de las plantas es interminable, siendo un gran recurso para el descubrimiento de nuevos compuestos farmacéuticos que pueden usarse en la medicina de hoy en día. Muchas plantas son efectivas como: analgésicas, antimicrobianas, antiespasmódicas, antidiabéticas, antivirales e incluso antitumorales (Guamán-Ortiz, 2014).

Se estima que el 80% de la población mundial usa hierbas medicinales. Su uso está generalizado principalmente en países de Asia, África y América Latina, donde la situación económica es muy crítica para obtener medicamentos potentes y efectivos; además, es una buena alternativa para evitar el uso de drogas sintéticas, que en su mayoría tienen efectos secundarios no deseados. La MT china es la más popular en todo el mundo. En África también se usa mucho la MT gracias a su diverso paisaje floral, que otorga una gran riqueza medicinal, garantizando la atención médica a millones de africanos, principalmente contra la malaria (Guamán-Ortiz, 2014).

Existen alrededor de 20 mil especies de plantas diferentes, de las cuales el 20% son endémicas y se encuentran en Ecuador, siendo éste el país con la tercera densidad más alta de especies de plantas endémicas en el mundo (Bailon-Moscoso et al., 2015; Joppa et al., 2013), entre las que se pueden encontrar especies con gran actividad citotóxica contra células tumorales humanas, en comparación con otros países con diversidad biológica similar (República Dominicana, Indonesia, Tailandia y Perú). Otra característica de gran importancia en Ecuador es el conocimiento etnomédico de muchas comunidades indígenas (Bailon-Moscoso et al., 2015).

1.6.1. Antineoplásicos de origen vegetal.

Los compuestos naturales son fundamentales en el descubrimiento de nuevos componentes que se pueden utilizar con éxito en numerosas aplicaciones biomédicas, incluyendo la terapia contra el cáncer (Bailon-Moscoso et al., 2017). Actualmente, existen más de 200 medicamentos producidos de forma natural ya en desarrollo preclínico/clínico o en la clínica (Bailon-Moscoso et al., 2017). Se estima que el 66% de los fármacos aprobados por la FDA para el cáncer son metabolitos secundarios, análogos sintéticos o sintéticos basados en

farmacóforos obtenidos a partir de metabolitos secundarios (Bailon-Moscoso et al., 2015; Cragg y Newman, 2013).

El descubrimiento de alcaloides específicos a partir de vegetales empezó en 1950 con la búsqueda de metabolitos antitumorales; sin embargo, a pesar de la gran diversidad de plantas, una gran proporción de las especies de plantas medicinales superiores disponibles aún no se han estudiado para compuestos biológicamente activos. De este modo, existen dos familias principales de origen vegetal usadas con fines antineoplásicos: los alcaloides de la vinca (la vinblastina y la vincristina), que tienen efectos citotóxicos; y los taxanos (paclitaxel y docetaxel) que tienen propiedad citostática. Así pues, los fármacos más utilizados en quimioterapia son de origen vegetal, por esto es importante estudiar distintas especies utilizadas en MT, ya que se puede aprovechar más las propiedades fitofarmacológicas que éstas representan, principalmente como agentes antitumorales (Guamán-Ortiz, 2014).

1.6.2. *Grias neuberthii* Macbr.

Dentro de la familia Lecythidaceae podemos encontrar al género *Grias*, este grupo de plantas consta de 12 especies diferentes. Este género es originario de América Central, el noroeste de América del Sur y Jamaica. La especie *G. neuberthii* Macbr es nativa del sur de Colombia, Ecuador y del norte del Perú, distribuidas ampliamente en estos países (Figura 3) (Lozano, 2013). En MT es usada de diversas formas: la corteza del fruto con un 9,52% para el dolor estomacal, la semilla con un 28,7% como hemético, el fruto con un 4,76% para la diarrea, la corteza del tallo con un 4,76% para el paludismo y la semilla con un 9,52% para la malaria y como antitumoral (Aguilar y Aguirre, 2017). El mesocarpio, cuando es rallado y mezclado junto con agua, es purgativo, la semilla se usa como antidisentérico y cocida se utiliza como enema, cuando se instila el jugo de la semilla en las fosas nasales combate la sinusitis, la infusión de la corteza se utiliza para detener la hemorragia uterina, además de ello la pulpa cocida en agua es usada como bebida laxante e incluso posee propiedades desinfectantes y antibacterianas (Lozano, 2013).



Figura 3: Mapa de distribución de *Grias neuberthii* en Ecuador

Fuente: USDSG, 2013.

Elaboración: USDSG, 2013.

Más concretamente, en estudios previos realizados en el Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja con el extracto metanólico de tallo de *Grias neuberthii* Macbr (GNTM) se observó una apariencia física sólida amarillenta, con un rendimiento del 9,39%, en el cual se hizo un tamizaje fitoquímico presentando en su composición carbohidratos, proteínas, taninos y saponinas (Aguilar y Aguirre, 2017).

Los compuestos naturales que pueden inhibir la proliferación de células tumorales, controlar la mitosis y, principalmente el ciclo celular, son excelentes candidatos para posibles tratamientos contra el cáncer. Así pues, el entendimiento de los diferentes mecanismos moleculares y la forma en que actúan los distintos compuestos anticancerígenos de origen natural es vital para la aplicación exitosa de estos compuestos en la investigación (Bailon-Moscoso et al., 2017).

1.7. Ciclo Celular.

El ciclo celular es producido por acontecimientos que llevan a la replicación celular, teniendo así dos células hijas con cromosomas idénticos a los de la célula madre. Aunque el crecimiento celular es un proceso continuo, el ADN se sintetiza solo durante la fase S del ciclo celular y los cromosomas replicados se distribuyen a los núcleos hijos. La progresión a través de estas etapas del ciclo celular está controlada mediante un sistema regulador conservado, que coordina los diferentes procesos del ciclo, y además los acopla a señales extracelulares que controlan la proliferación celular (Lozano et al., 2017).

Las células se activan por estímulos mitogénicos para dividirse, esto implica la transducción regulada de señales mitogénicas a la maquinaria celular que controla la replicación y la segregación correcta a las células hijas. El ciclo celular tiene 2 fases principales: G₁ (intervalo

1), S (Síntesis del ADN), G₂ (Intervalo 2), que en conjunto forman la interfase; y la M (mitosis o meiosis) o de división celular. Estas fases tienen una función específica que produce una correcta división celular; así mismo, existen puntos de control en cada fase, lo que nos garantiza que la célula no entre en la siguiente fase del ciclo sin haber finalizado la fase previa (Romero-Benavides et al., 2018).

1.8. Mecanismos moleculares del ciclo celular, ciclinas y kinasas.

La célula crece a un ritmo continuo durante la interfase y, la mayoría de las células, duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente. En cambio, el ADN solo se sintetiza durante una parte de la interfase. Así, la duración de la síntesis del ADN divide a la interfase de las células eucariotas en tres fases diferenciadas (Lozano et al., 2017). La progresión del ciclo celular está altamente regulado, esto es primordial para la supervivencia celular en un microambiente de constante cambio (Bertoli et al., 2013). Este proceso regulador sirve para detectar y reparar el ADN dañado y evitar la división celular descontrolada (Bailon-Moscoso et al., 2017). Durante la progresión del ciclo celular, la actividad de las CDK (Ciclina Dependiente de Kinasas) se regula mediante diversos mecanismos que abarcan: la localización intracelular, la activación por ciclinas, la fosforilación y la inhibición por los inhibidores de CDK (Hernández-Ortega et al., 2013; Menoyo et al., 2013).

Las células de mamífero contienen nueve CDK (CDK1-9) y 12 ciclinas (Bertoli et al., 2013), pero en la regulación del ciclo celular solo intervienen las A, B, C, D y E. La estructura primaria de las ciclinas tiene una o dos regiones conservadas de 150 aminoácidos “cyclin box” estas están conformadas por regiones helicoidales asociadas a hélices en el extremo C-terminal, aquí se produce la unión a un gran número de substratos como los factores de transcripción E2F, pRb y p53, previa fosforilación de la proteína correspondiente (Figura 4) (Lagunas et al., 2014).

Para controlar el ciclo celular, las ciclinas y CDK se unen entre sí creando heterodímeros activados. Luego de unirse a las ciclinas, las CDK fosforilan las proteínas diana que llevan a su inactivación o activación para entrar en la siguiente fase. Las proteínas CDK se expresan continuamente en las células; por otro lado, las ciclinas se sintetizan en etapas específicas del ciclo celular, al igual que los complejos proteicos ciclina/CDKs, esto delimita el avance del mismo, en respuesta a varias señales moleculares (Villacis, 2013). La primera etapa del ciclo celular es conocida como la Fase G₁, aquí se localizan en mayor cantidad las ciclinas D y E, así mismo la ciclina A aumenta conforme se avance en esta fase. El inicio de esta comprende desde el final de la mitosis previa, donde la célula empieza a ser metabólicamente activa, en otras palabras, está creciendo hasta que alcanza el tamaño adecuado y recibe las señales necesarias para dar inicio a la síntesis de ADN, en este punto se da por finalizada la fase G₁,

dura alrededor de 10 horas. Durante G_1 , según el tipo de célula y en función de las señales externas, una célula puede abandonar el ciclo celular durante G_1 y entrar en G_0 . En esta fase las células están vivas y metabólicamente activas, pero no replican su ADN ni se dividen. Aquí se encuentran la mayoría de las células diferenciadas del organismo como las células del miocardio, las neuronas, los hepatocitos, entre otras (Schafer, 1998).

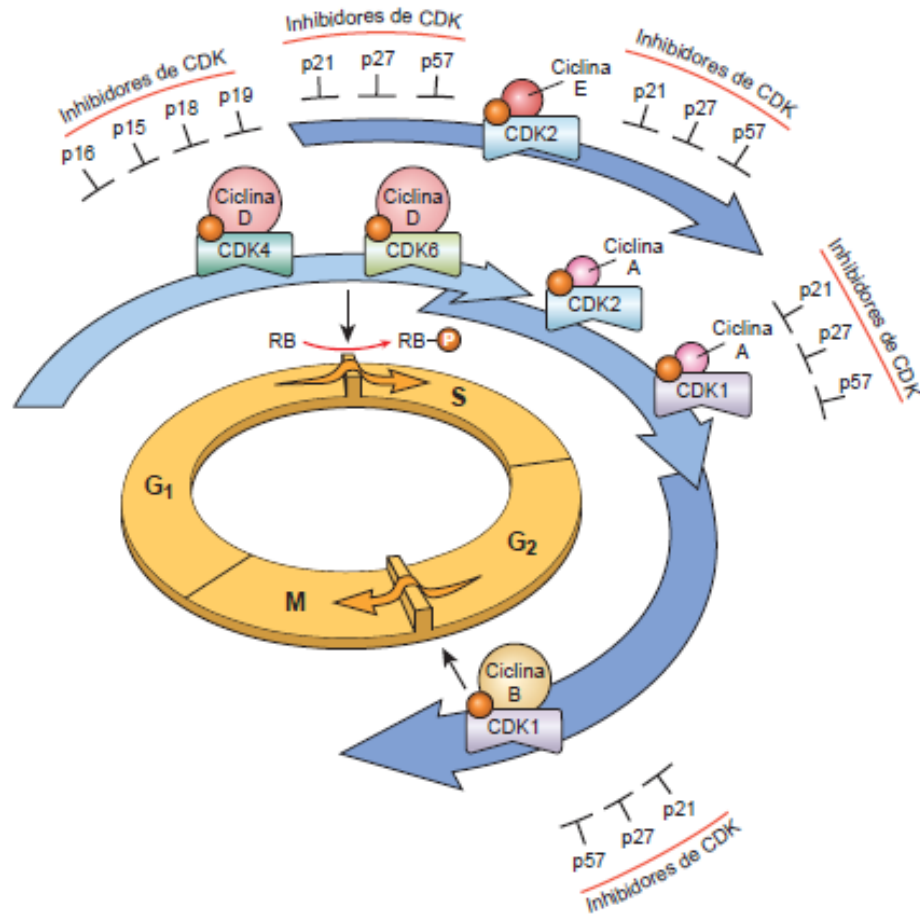


Figura 4: Ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

Fuente: Bertoli et al., 2013.

Elaboración: Bertoli et al., 2013.

Por otra parte, si las proteínas sintetizadas en G_1 tardía activan la maquinaria que induce la replicación del ADN. Al darse una señal extracelular, los complejos de ciclina-CDK de la fase G_1 se activan para preparar a la célula para la fase S. Esto impulsa la expresión de factores de transcripción que llevan a la expresión de ciclinas específicas de fase S y de enzimas requeridas para la replicación de ADN, para poder pasar a la fase S tiene que ligarse la ciclina A con CDK2. Los complejos ciclina/CDK específicos de fase G_1 promueven también la degeneración de las moléculas que funcionan como inhibidores de la fase S. La fase S es un proceso delicado en el que se copia el genoma de la célula progenitora y tarda 9 horas en

hacerlo. Así se obtiene una célula con dos conjuntos de cromosomas, también se da la replicación de los centriolos y la síntesis de histonas (Lagunas et al., 2014). Seguidamente al finalizar la fase S aumentará la concentración del complejo ciclinaA/CDK1, lo que permitirá empezar la fase G₂. Posteriormente se produce la fase G₂ durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis, esta fase dura alrededor de 4 horas (Bailon-Moscoso et al., 2017; Lagunas et al., 2014).

Al finalizar esta fase la célula duplica su tamaño y los complejos mitóticos de ciclina-CDK, que se sintetizan durante las fases S y G₂, sintetiza las proteínas (ciclinaB/CDK1) para la descomposición de la envoltura nuclear, la condensación de cromosomas, la formación del huso mitótico y demás procesos para la mitosis, esta fase concluye cuando los cromosomas empiezan a condensarse para entrar en mitosis (Lozano et al., 2017).

La mitosis es el evento final en las células somáticas, que da lugar a dos células hijas con una dotación genética idéntica a la parental. Este proceso dura una hora y es muy complejo. La división celular mitótica tiene dos partes principales: la mitosis (división nuclear) y la citocinesis (división citoplasmática) La mitosis produce dos núcleos, cada uno con una copia de todos los cromosomas que estaban presentes en el núcleo original. Durante la mitosis los cromosomas duplicados se condensan y son visibles en forma de hilos. En la mayoría de los casos la célula se divide por mitosis para formar dos células hijas cada una con un núcleo y aproximadamente la mitad del citoplasma. Este proceso de división citoplasmática se llama citocinesis, y proporciona a las dos células hijas todas las organelas, nutrientes, enzimas y demás moléculas que necesitan para continuar vivas. Aunque por lo general la mitosis y la citocinesis están acopladas, también pueden llevarse a cabo de forma independiente. Ciertas células pueden experimentar mitosis sin citocinesis, entre ellas células tumorales, produciendo células individuales con muchos núcleos (Lagunas et al., 2014).

1.9. Puntos de control del ciclo celular y p53.

La regulación de la proliferación celular, crecimiento y síntesis de ADN, están controlados por la maquinaria del ciclo celular. Este proceso tiene una duración variada entre distintos organismos. Principalmente está regulado por p53 que es considerado el guardián del genoma, esta proteína inhibe ciertos genes cuando existe una mutación o daño en el ADN, esto lo hace para evitar que la célula crezca y transmita estos errores a las células hijas. Además, participan los complejos ciclina/CDK como reguladores de cada fase del ciclo celular y esto lo hacen por procesos de fosforilación/desfosforilación como por su asociación a miembros de las familias de inhibidores de CDKs (CKIS: Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas). Las CDKs deben ser fosforiladas en un residuo de treonina (Thr172 en CDK4 y Thr160 en CDK2) que induce la exposición del sitio catalítico. La inhibición de las

CDKs se produce por la fosforilación de un residuo en el extremo amino terminal (Thr14 y Tyr15) por las quinasas MYT1 y WEE1, provocando así una reducción de la afinidad de la CDK por su sustrato. Otro mecanismo de regulación lo producen la familia de fosfatasas CDC25A, -B y -C que se ocupan de desfosforilar las CDKs para regular las transiciones entre las diferentes etapas del ciclo celular (Wu et al., 2014).

Los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son reguladores negativos que impiden que la célula prosiga a la siguiente fase del ciclo. Hay dos familias de inhibidores de las CDKs: los INK4 y Cip/Kip. Las INK impiden el paso a través de G₁ reprimiendo a CDK4 y CDK6, mientras que Cip/Kip suprime los complejos ciclina/CDK para el paso de G₁ a la fase S, además pueden regular el paso de G₂/M (Lagunas et al., 2014).

1.9.1. Punto de control G₁/S.

La fase G₁ es la primera fase en la que hay crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Los puntos de control, a través de p53, impiden la continuación del ciclo celular ante el daño al ADN, dando tiempo para que la maquinaria de reparación corrija dichos daños y prevenga alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones celulares posteriores (Klermund et al., 2014). p53 transactiva a p21, el cual a su vez activa al complejo ciclina E-CDK2, y desfosforila a la proteína del retinoblastoma (Rb) un supresor de tumor cuyo papel es el de controlar negativamente a E2F, el cual favorece a la progresión del ciclo celular (Bailon-Moscoso et al., 2017; Bertoli et al., 2013). De este modo, en las células de mamíferos, el paso de la fase G₁ a S está regulada por Rb, cuya función es inhibir la expresión de los genes necesarios que conducen a la fase S (Wu et al., 2014). Por otra parte, los factores E2F4–8 actúan como represores transcripcionales (Figura 5) (Cho y Park, 2013).

1.9.2. Punto de control S.

Este punto de control garantiza la correcta replicación del ADN, evitando el paso a G₂ si hay daño en el material genético o defectos en la replicación cromosómica. La replicación del ADN se inicia en múltiples orígenes distribuidos a lo largo del material genético, este punto de control evita la doble síntesis de ADN en cualquier punto de origen dentro de la célula (Lagunas et al., 2014).

1.9.3. Punto de control G₂/M.

El punto G₂/M ocurre antes de la mitosis o meiosis. En este punto se debe evitar la división celular cuando el ADN ha sido dañado durante G₁, S o en G₂; el estrés genotóxico activa a los sistemas ATM/ATR, llevando a la fosforilación y activación de las cinasas CHK1 y CHK2, seguido de la fosforilación de Cdc25C, posteriormente la fosfatasa Cdc25c es detenida en el

citoplasma por la proteína 14-3-3, que imposibilita su acción en el complejo fosforilado Ciclina B/(CDC2) CDK1 y así no se permite la mitosis. El sistema ATM/ATR también activa el sistema de señales de p53 que ayuda a mantener a las células en G₂, al retener en el citoplasma a la cinasa CDK1 (CDC2) mediante la proteína 14-3-3. Por otra parte, se observa el efecto de p21, que reduce la fosforilación de Rb y evita que E2F se libere para mediar la expresión de Ciclina B y CDC2. p21 también se une al complejo Ciclina B/CDC2 (CDK1) para bloquear la entrada a la mitosis. GADD45, otra proteína de la vía de p53, también se puede unir al complejo Ciclina B/CDC2 (CDK1) para inhibirlo (Hansakul et al., 2014). En esta fase actúa el complejo ciclina B/CDK1 o MPF (promotor de la fase M), éste es activado por la cinasa Polo y translocado al núcleo en prometafase coincidiendo con la desintegración de la membrana nuclear. La citocinesis es mediada por la ciclina B y es la fase en que se lleva a cabo la separación de las células hijas. Ocurre solo después del término de la mitosis, pues ambos procesos están vinculados espacial y molecularmente de una manera altamente precisa y no menos compleja. La ciclina B, cuando no es degradada por carecer de la secuencia de reconocimiento por el complejo APC, arresta a las células en anafase y no se procede a la citocinesis, marcando el final del ciclo celular (Bailon-Moscoso et al., 2017; Lagunas et al., 2014).

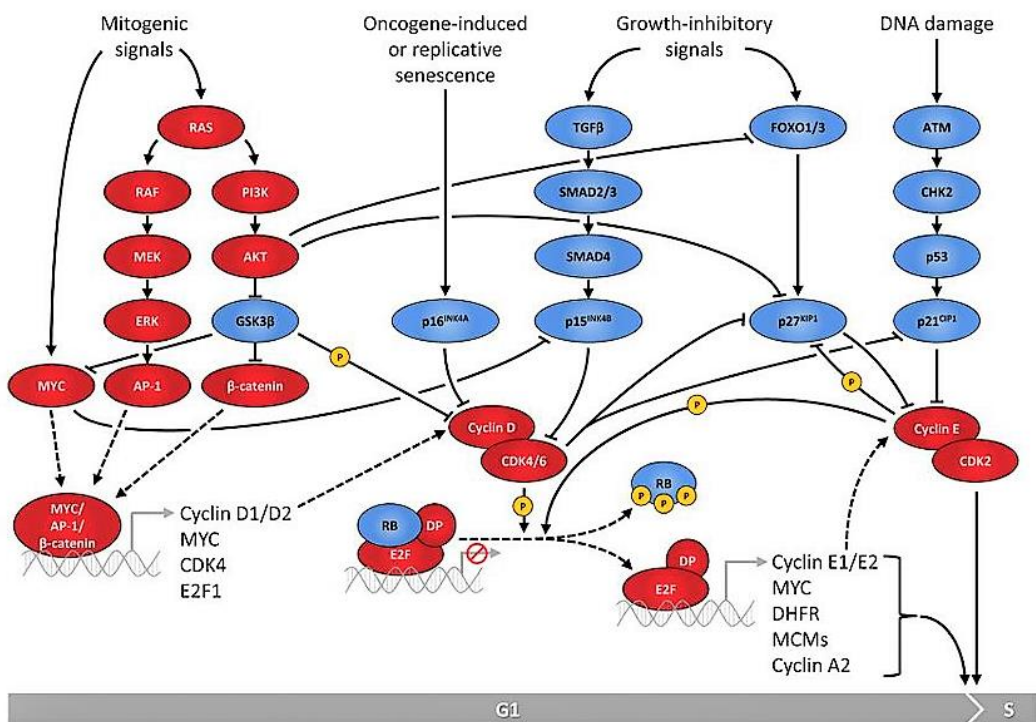


Figura 5: Punto de control G₁/S.
Fuente: Duronio y Xiong, 2013.
Elaboración: Duronio y Xiong, 2013.

1.10. p53 y muerte celular.

Al no existir un correcto funcionamiento o control de todas las proteínas que participan en la progresión del ciclo celular, p53 activa los mecanismos de defensa en los que incluye la muerte de la célula para evitar la generación de tumores. Por lo tanto, en los organismos multicelulares se mantiene la homeostasis celular por un equilibrio entre la proliferación y la muerte (Cueva, 2014). Existen diferentes tipos de muerte celular, entre las que destacan: La apoptosis, o muerte celular programada de tipo I (PCDI) una ruta de muerte celular programada, puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente, siendo receptores de muerte localizados en la membrana citoplasmática y p53 sus principales mediadores (Sakitani et al., 2015). La activación de la apoptosis se produce mediante dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Galluzzi et al., 2018). Un segundo tipo de muerte celular es la autofagia, o muerte celular programada de tipo II (PCDII), un proceso celular catabólico y controlado en el que las proteínas desnaturalizadas y las organelas dañadas se envuelven en vesículas autofágicas y posteriormente se administran a los lisosomas para su degradación (Figura 6) (Guamán et al., 2017). Así mismo, p53 es capaz de controlar positivamente la autofagia cumpliendo un doble rol. Cuando p53 se localiza en el núcleo es proautofágico, mientras que cuando se encuentra en el citoplasma bloquea el proceso autofágico, permitiendo la supervivencia de la célula (Paiva, 2017). El tercer tipo importante de muerte celular es la necroptosis, o muerte celular programada de tipo III (PCDIII), la cual se inicia por cambios del microentorno extracelular o intracelular. La necroptosis participa en programas de salvaguardias del desarrollo, media las funciones adaptativas ante las respuestas fallidas al estrés y mantiene la homeostasis de las células T adultas (Galluzzi et al., 2018).

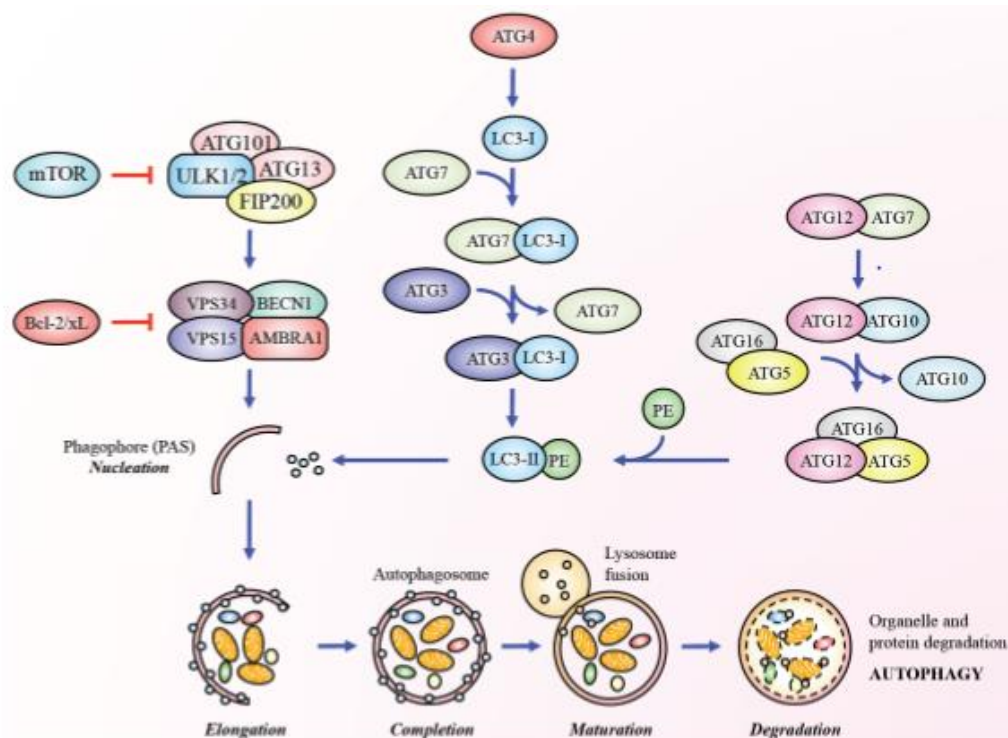


Figura 6: Autofagia
Fuente: Guamán, Ramirez, y Ratovitski, 2017.
Elaboración: Guamán, Ramirez, y Ratovitski, 2017.

1.11. Biomarcadores.

Para identificar el efecto citotóxico y citostático inducido por extractos vegetales, compuestos naturales y compuestos sintéticos, se utiliza una variedad de biomarcadores o marcadores biológicos, que representan una característica objetivamente medida y evaluada de los cambios morfológicos, bioquímicos o fisiológicos medibles, que causa la exposición a un agente tóxico en un sistema biológico (Cueva, 2014). La determinación de la proliferación celular puede ser usada para determinar la respuesta de las células a estímulos tóxicos particulares (Chávez-Ocaña et al., 2015). A continuación, se expondrán los biomarcadores de interés para el presente trabajo, con el fin de evaluar el efecto citotóxico y citostático que el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* (GNTM) genera en las líneas celulares RKO y SW613-B3, detalladas previamente.

1.11.1. Ensayo Clonogénico.

Esta prueba permite medir la capacidad de recuperación y proliferación, también se la conoce como toxicidad de clones supervivientes o supervivencia de clones. Este ensayo se fundamenta en la formación de colonias a una baja confluencia celular, siendo el método por excelencia para el análisis de supervivencia y proliferación celular (Martínez-Torres et al., 2016). Cuando las células se siembran a bajas densidades, cada una forma una colonia

discreta, para que una colonia sea aceptada como tal tiene que tener como mínimo 50 células. El porcentaje de células que conforman una colonia es la medida de supervivencia, por otro lado, el tamaño de la colonia nos indica la tasa de crecimiento de la misma (Freshney, 2010). El porcentaje de las colonias formadas se puede expresar como eficiencia en placa con esta fórmula:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{N^{\circ} \text{ Colonias formadas}}{N^{\circ} \text{ de Colonias Sembradas}} \times 100$$

1.11.2. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo.

El contenido de ADN es una de las características celulares más medidas, para ello el método más empleado es la citometría de flujo. Un citómetro de flujo es un instrumento que ilumina las células a medida que fluyen individualmente delante de una fuente de luz. Fundamento de este mecanismo, la determinación del ciclo celular utiliza el yoduro de propidio (PI) como fluorocromo, este es un colorante vital fluorescente que tiñe el ADN y el ARN. PI se une estequiométricamente tanto al ADN como al ARN, por lo que este último debe eliminarse por digestión con ribonucleasas y requiere de luz azul como fuente de excitación, donde la cantidad de señal fluorescente obtenida es directamente proporcional a la cantidad de ADN. Las células en las fases G₂ y M del ciclo tienen el doble del contenido de ADN de las fases G₀ y G₁. Las células en fase S tienen un contenido de ADN que se encuentra entre estos extremos. El PI se detecta en el rango naranja del espectro utilizando un filtro de paso de banda de 562-588 nm (Chávez-Ocaña et al., 2015).

CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO

2.1. Objetivo General.

Evaluar la capacidad citotóxica y citostática del extracto metanólico de tallo de *Grías neuberthii* sobre las líneas celulares tumorales humanas: RKO con p53 normal y SW113-B3 con p53 mutado.

2.2. Objetivos Específicos.

Evaluar la capacidad clonogénica del extracto en las líneas celulares antes descritas, expuestas durante un periodo de 48 horas a diferentes dosis.

Evaluar la capacidad citostática del extracto en las líneas celulares antes descritas, expuestas durante un periodo de 48 horas a diferentes dosis.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Obtención extracto *Grias neuberthii*.

El extracto de tallo metanólico de *Grias neuberthii* (GNTM), fue otorgado por el Ph.D. Juan Carlos Romero, docente investigador del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja. La solución stock fue preparada en DMSO (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40 mg/mL y fue almacenada a -20° C hasta su uso. Partiendo de la solución stock se realizaron las diluciones de trabajo en medio RPMI (GIBCO) suplementado.

3.2. Cultivo celular.

Como modelo biológico se utilizaron las líneas celulares de cáncer de colon: RKO y SW613-B3; las cuales fueron cultivadas en medio RPMI (GIBCO) suplementado con: 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1% Antibiótico-Antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 μ g/mL y anfotericina B 25 μ g/mL) (GIBCO–Invitrogen), 1% L-Glutamina (2 mM) (GIBCO – Thermo Fisher Scientific) y mantenidas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37° C.

3.3. Viabilidad por Azul de Tripano.

Para comprobar que el extracto GNTM tiene un efecto citotóxico y más no citostático se realizó un único ensayo de exclusión por Azul de Tripano por duplicado: cada línea celular fue sembrada a una densidad de 3×10^4 células/2 mL/pocillo en cajas de 12 multipocillos, después de 24 horas de incubación ambas líneas celulares fueron expuestas a GNTM en concentraciones crecientes: 20, 30, 40, 50, 60 μ g/mL durante 48 horas. Luego se recuperó el medio en tubos de ensayo de manera individual, cada pocillo fue lavado con 1 mL de PBS, se aplicó 500 μ L de tripsina (GIBCO) y se incubó a 37° C hasta que se despeguen, seguidamente se inhibió la tripsina con medio RPMI suplementado para luego centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet restante fue resuspendido en 1 mL de medio, se tomó una muestra de 100 μ L de suspensión celular y fue mezclado con 100 μ L de azul tripano (Thermo Fisher Scientific) al 0,4%. Posteriormente se observó bajo el microscopio haciendo uso de una cámara de Neubauer colocando 20 μ L de la suspensión. Las células teñidas de azul se consideraron como muertas y las que no presentaban coloración como células vivas. El total de células fue calculado considerando el volumen de la suspensión y el factor de dilución.

3.4. Determinación del ciclo celular mediante Citometría de Flujo.

La distribución de las fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo luego de que las células fueran expuestas a GNTM. Para ello, cada línea celular se sembró a una densidad de 1×10^5 células/2 mL/pocillo en cajas de 6 multipocillos, después de 24 horas de incubación las células fueron expuestas a GNTM en las siguientes concentraciones: RKO (15, 30, 45 $\mu\text{g/mL}$), SW613-B3 (20, 30, 50 $\mu\text{g/mL}$). Como control positivo se utilizó Doxorubicina (Dxo) a una concentración de 0,5 μM . El medio fue recuperado en tubos de 15 mL, se lavaron las células con 1 mL de PBS, se recuperó el PBS, se aplicó 400 μL de tripsina, la tripsina fue inhibida con 1 mL de medio, se pasó todo a los tubos, fue centrifugado por 10 minutos a 4° C, se retiró el sobrenadante, fue traspasado el sedimento celular a un tubo de 1,5 mL, se lavó el pellet con 1 mL de PBS y se resuspendió, fue centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante, fue homogenizado el sedimento con 1 mL de PBS-Etanol 1:1. Se dió ligeros golpes hasta que no haya agregados celulares, fue centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante, se fijaron las células 1mL de Etanol al 70% frío y se incubó por 24 horas.

Posteriormente fueron centrifugadas las células suspendidas en Etanol al 70%, se desechó el etanol, se resuspendió el pellet con 1 mL de PBS, fue centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante, se homogenizó el sedimento con 200 μL de IP (BD Pharmingen), se incubó protegido de la luz a temperatura ambiente por 30 minutos y se pasó a tubos de citómetro.

La distribución de las fases del ciclo celular fue analizada en un citometro BD FACSCanto en las siguientes condiciones: Excitación 488 nm a 536 nm. Emisión: Long pass: 600 nm a 610 nm.

3.5. Ensayo Clonogénico.

Para analizar la capacidad clonogénica y de recuperación celular luego de la exposición a GNTM cada línea celular se sembró a una densidad de 3×10^2 células/2 mL/caja en 10 cajas Petri, después de 24 horas las células fueron expuestas a GNTM y Dxo a las mismas concentraciones que en el análisis del ciclo celular, seguidamente se incubó por 48 horas, posteriormente se dejó crecer las colonias por 7 días solo con medio RPMI suplementado. Después el medio fue descartado, se lavó con 1 mL de PBS, se fijó en frío con Metanol (Sigma Aldrich) 100% durante 10 minutos, se tiñó con Violeta Cristal (Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos a temperatura ambiente, fue lavado el excedente de tinción con agua y se contó en un estereoscopio (Olympus), se contabilizó las colonias con más de 50 células.

3.6. Análisis Estadístico.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes, con los datos obtenidos se calcularon las medias y las desviaciones estándar, las cuales fueron calculadas empleando el software estadístico GraphPad Prism® 5.0, a través del análisis estadístico ANOVA, utilizando la prueba de rango múltiple de Dunnet para comparar los resultados entre el control negativo y las diferentes dosis.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Viabilidad por el método de exclusión de Azul Tripano.

Después del análisis de viabilidad mediante azul de tripano, se observó que existe una disminución en el número de células de modo dosis-dependiente tanto en la línea celular RKO como SW613-B3, luego de ser expuestas por 48 horas a las dosis de 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GNTM (Figura 7).

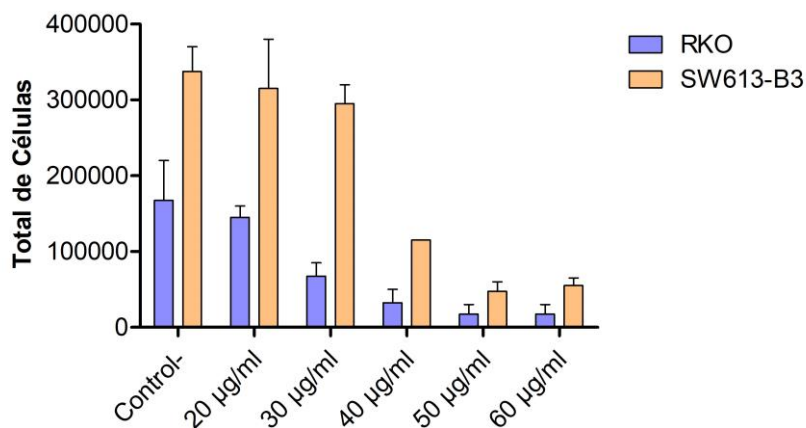


Figura 7. Total de células de las líneas celulares RKO y SW613-B3, expuestas a las dosis 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GNTM por 48 horas.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

En la viabilidad de la línea celular RKO se observó que, a medida que aumenta la dosis van disminuyendo la cantidad de células vivas y aumentando la cantidad de células muertas (Figura 8).

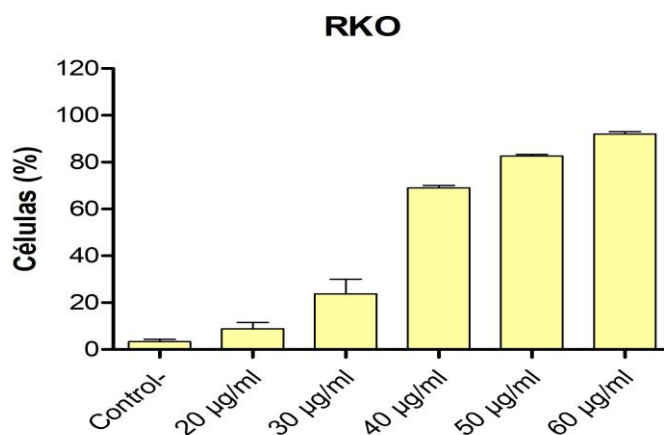


Figura 8. Células muertas en la línea celular RKO, expuesta a dosis crecientes de GNTM.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Asimismo, en la viabilidad de la línea celular SW613-B3 se observó que a medida que aumenta la dosis van disminuyendo la cantidad de células vivas (Figura 9).

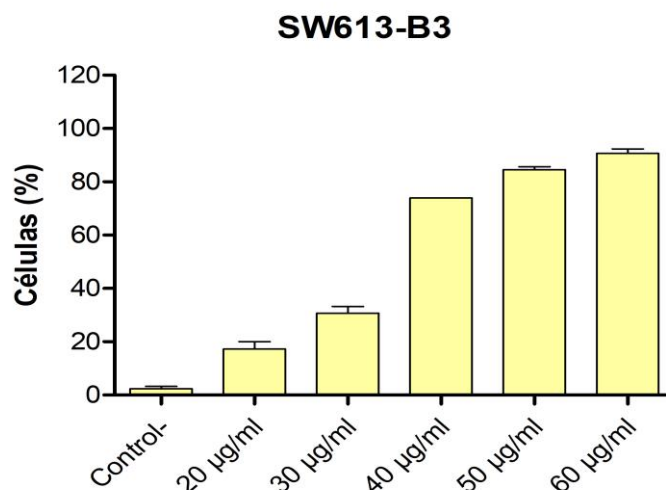


Figura 9. Células muertas en la línea celular SW613-B3, expuesta a dosis crecientes de GNTM.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

4.2. Ciclo Celular mediante Citometría de Flujo.

Después del análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo, para determinar la distribución de la población total de células existentes en las diferentes fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M). Tanto en la línea celular RKO, al exponerse a 15, 30, 45 µg/mL, como en la línea celular SW613-B3, expuestas a 20, 30, 50 µg/mL de GNTM por 48 horas se observó que no hay un cambio en la distribución del ciclo; tal como ocurre en el control negativo. Los resultados obtenidos de cada fase del ciclo celular se detallan en las figuras 10 y 11. De este modo, tras el análisis estadístico se demostró que no existe diferencia significativa entre el control y los diferentes tratamientos aplicados, datos indicados en los ANEXOS 1 y 2.

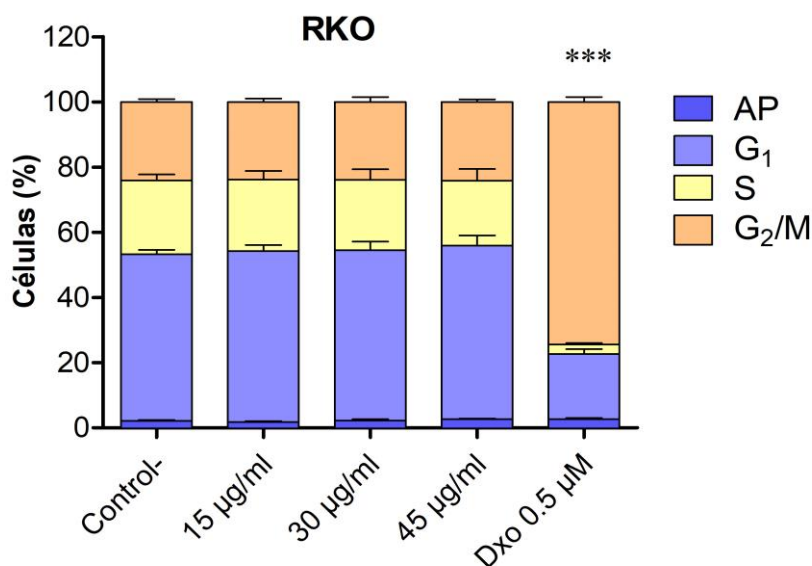


Figura 10. Análisis del ciclo celular de la línea celular RKO. Ciclo celular de las células RKO expuestas a tres dosis crecientes de GNTM correspondientes a 15, 30, 45 µg/mL. Los histogramas son los más representativos y muestran la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. 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, posterior a la prueba Dunnet, *** $p < 0.0001$ Dxo 0,5 µM (G₁, S y G₂/M) vs. Control.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

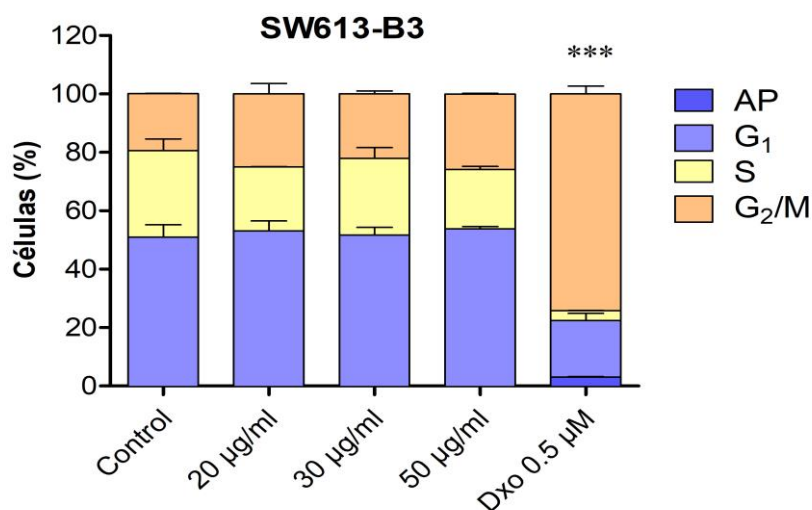


Figura 11. Análisis del ciclo celular de la línea celular SW613-B3. Ciclo celular de las células SW613-B3 expuestas a tres dosis crecientes de GNTM correspondientes a 20, 30, 50 µg/mL. Los histogramas son los más representativos y muestran la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. 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, posterior a la prueba Dunnet, *** $p < 0.0001$ Dxo 0,5 µM (G₁, S y G₂/M) vs. Control.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

4.3. Ensayo Clonogénico.

En las figuras 12 y 14 se realizó el ensayo clonogénico para observar la capacidad de las dos líneas celulares para formar colonias después de ser tratadas con diferentes dosis de GNTM. En ambos casos se realizó aplicando tres dosis crecientes para cada línea celular: RKO 15, 30, 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y SW613-B3 20, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 7 días de incubación, luego de 48 horas de tratamiento, las colonias se tiñeron y fueron contabilizadas.

En la figura 13 se observa que a medida que aumenta la concentración del extracto disminuye el porcentaje de supervivencia. La capacidad clonogénica del extracto sobre la línea celular RKO representó el 84.6% a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62.6% a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7.3% a 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$, además de un 1,6% para el control positivo. Tras el análisis estadístico se demostró que no existe una gran diferencia significativa entre el control y los diferentes tratamientos aplicados en los ANEXOS 3 y 4.

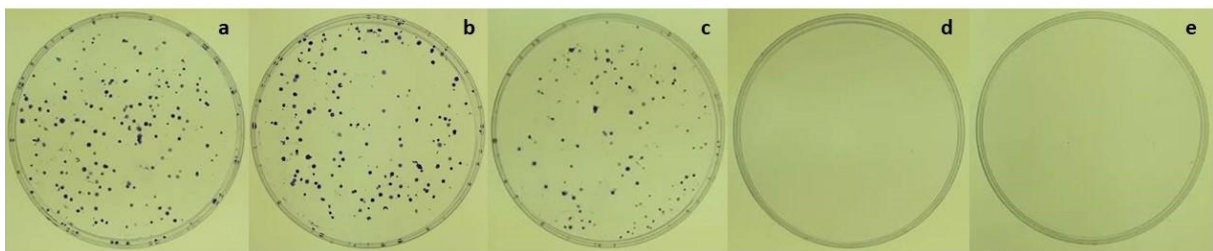


Figura 12. Fotos del ensayo clonogénico de la línea celular RKO. Se tomaron fotos de las cajas con control negativo, las distintas dosis de GNTM y la Dxo a 0,5 μM , se puede observar una disminución de las colonias con respecto al aumento de dosis: **a)** control; **b)** 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **c)** 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **d)** 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **e)** Dxo 0.5 μM).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

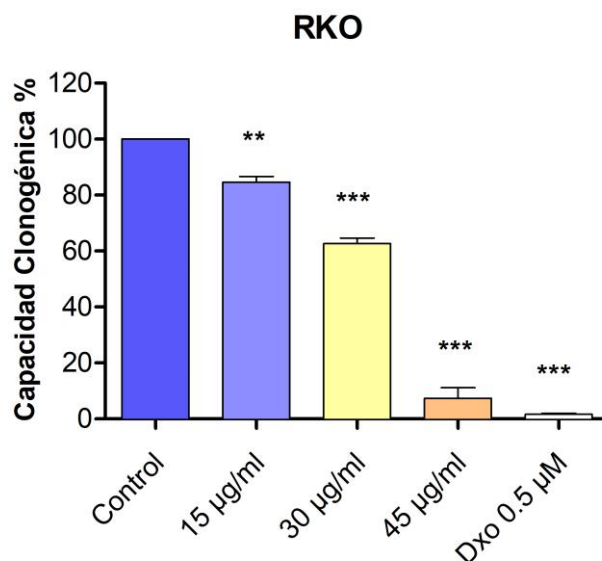


Figura 13. Análisis clonogénico de la línea celular RKO. Análisis clonogénico de las células RKO expuestas a tres dosis crecientes de GNTM correspondientes a 15, 30, 45 µg/mL. Las barras representan el porcentaje de células en tres experimentos por duplicado en comparación con el control negativo, utilizando ANOVA, posterior a la prueba Dunnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Por el contrario, la línea celular SW613-B3 mostro ser más resistentes al tratamiento (Figura 15). La capacidad clonogénica del extracto con respecto al control negativo representó el 90% a 20 µg/mL, 83% a 30 µg/mL, 2% a 50 µg/mL y un 0% para el control positivo (Tabla 4).

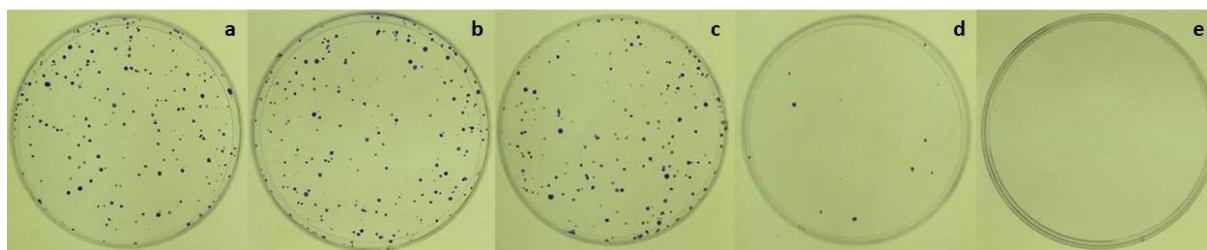


Figura 14. Fotos del ensayo clonogénico de la línea celular SW613-B3. Se tomaron fotos de las cajas con control negativo, las distintas dosis de GNTM y la Dxo a 0,5 µM, no se observa una disminución significativa de las colonias con respecto al aumento de dosis, excepto en la dosis más alta (a control; b 20 µg/mL; c 30 µg/mL; d 50 µg/mL; e Dxo 0.5µM).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

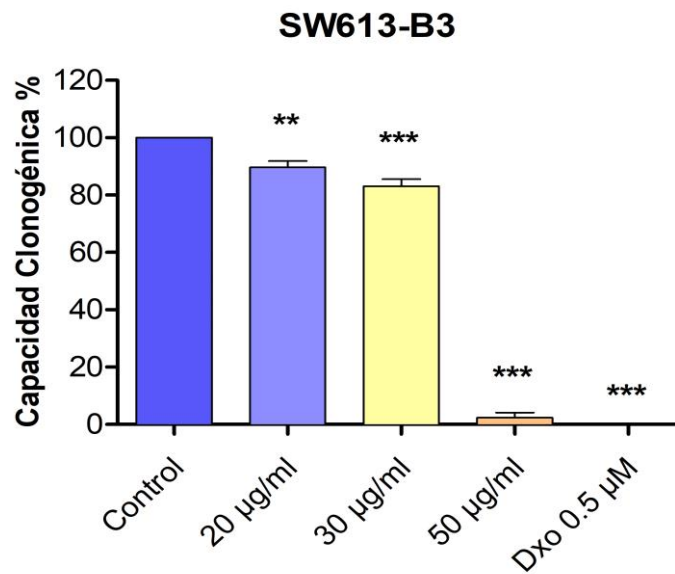


Figura 15. Análisis clonogénico de la línea celular SW613-B3. Análisis clonogénico de las células SW613-B3 expuestas a tres dosis crecientes de GNTM correspondientes a 20, 30, 50 µg/mL. Las barras representan el porcentaje de células en tres experimentos por duplicado en comparación con el control negativo, utilizando ANOVA, posterior a la prueba Dunnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Ya que previamente se determinó que el GNTM presenta gran efecto citotóxico en líneas celulares tumorales como son RKO, SW613-B3, U-251, MCF-7, D-384, PC3 y A549 (Samaniego, 2017), nuestro objetivo actual fue el de evaluar la capacidad citostática y clonogénica de este extracto, para la cual se escogió dos líneas celulares tumorales humanas de origen colorrectal: RKO y SW613-B3, las cuales presenta p53 normal y p53 mutado, respectivamente. La importancia de p53 en este estudio es su participación en el ciclo celular como regulador negativo, y en los procesos de muerte celular (Bertoli et al., 2013).

Primeramente, se realizó un ensayo de exclusión con azul de tripano, donde se observó una disminución del número de células (Figura 7) y de la viabilidad celular a medida que la dosis aumenta tanto en la línea celular RKO como en SW613-B3, este ensayo se realizó con el fin de corroborar que efectivamente GNTM es capaz de inducir la muerte celular luego de su exposición; dato que se confirma al observar un incremento de células muertas de un modo dosis dependiente (Figura 8 y 9). Estos resultados por lo tanto determinan que el efecto generado por GNTM es de tipo citotóxico, induciendo por ende la activación de alguno de los tipos de muerte celular estudiados.

De acuerdo a esto, en el estudio para determinar si el extracto presenta un efecto citostático se evaluó la distribución de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo y resulto interesante observar que GNTM no produce detención del ciclo celular ni en la línea celular RKO con p53 normal (Figura 10, Tabla 1), ni en SW613-B3 con p53 mutado (Figura 11, Tabla 2), incluso sabiendo que p53 tiene un papel fundamental en la detención del ciclo celular, lo que nos indica claramente que este extracto expuesto a 48 horas no es citostático (Cho y Park, 2013). Asimismo, previamente se estudió la expresión de p53 en la línea celular RKO luego de ser expuesta a GNTM (Torres, 2018), donde se observa un aumento significativo; no obstante, nuestros resultados indican que esta expresión no está generando la detención del ciclo celular y más bien p53 participa la activación de la autofagia.

En el ensayo clonogénico los resultados obtenidos en la línea celular RKO evidencian que a medida que aumentan las dosis de GNTM (15, 30 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disminuye la formación de colonias. Interesantemente, en la línea celular SW613-B3 se evidencia que en las primeras dosis de GNTM, incluyendo la CI_{50} , existe una menor diferencia significativa con respecto al control negativo (20 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la dosis más alta (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) es la única que presenta una diferencia marcada. Estos datos son comparable con los resultados obtenidos Torres, 2018 donde se observo que las células activan el mecanismo de muerte autofágico ya que, al aplicar GNTM a las mismas dosis en estas dos líneas celulares, hubo un aumento de la forma activa de la proteína LC3 II y una disminución de p61, los cuales son biomarcadores de autofagia; sin embargo, contrastando nuestros resultados con los obtenidos con Torres. 2018, al aplicar la CI_{50} , la autofagia en la línea RKO se activa como mecanismo de muerte celular, mientras

que en la línea celular SW613-B3 se activa como mecanismo de defensa. Todo esto posiblemente debido al estatus de p53 que presenta cada línea celular.

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo clonogénico, se confirman los resultados obtenidos con azul tripano, donde se observó que hay un aumento en la muerte celular de tipo dosis-dependiente.

En el estudio fitoquímico, GNTM presentó taninos y saponinas en su composición (Aguilar y Aguirre, 2017), este extracto también presentó actividad citotóxica en varias líneas celulares tumorales humanas (Samaniego, 2017), asimismo Liu et al., 2016 nos dice que, cada vez hay más estudios con extractos que presentan una actividad citotóxica en diferentes tipos de tumores como es el de colon, próstata, mama, oral, entre otros; esto se cree que puede ser por la presencia de taninos y saponinas en los mismos. Más concretamente en cáncer de colon se ha estudiado *Sanguisorba officinalis* L. radix que presenta altas concentraciones tanto de taninos como de saponinas que han demostrado tener la capacidad de inhibir el ciclo celular, en este estudio se concluyó que a dosis bajas de *Sanguisorba officinalis* L. radix ($CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) inhibe la proliferación de células de cáncer colorrectal RKO y HCT116, así mismo se observó que en células normales solo ejerce una ligera citotoxicidad, en lo que se refiere a ciclo celular produjo un arresto en la fase G₁. Estos resultados son interesantes, ya que se contraponen a los resultados obtenidos en este estudio, así mismo podría ser que en una fracción del extracto de GNTM que tenga taninos y saponinas en mayor cantidad si tenga un efecto citostático.

En resumen, queda comprobado que GNTM no ejerce un efecto citostático en la línea celular RKO con p53 normal ni en SW613-B3 con p53 mutado, aunque en su composición se identifican saponinas y taninos, compuestos capaces de detener el ciclo celular. Sin embargo, en el ensayo clonogénico existe una marcada disminución en las colonias formadas en RKO a medida que aumenta la dosis, por otra parte, en SW613-B3 en las dos primeras dosis no disminuye tanto la cantidad de colonias como en la última dosis, esto se puede deber a p53 no funcional, que ha demostrado dar una mayor resistencia a los tratamientos. (Parks et al., 2011).

CONCLUSIONES

Mediante el ensayo de azul tripano se concluyó que a medida que se aumenta la dosis existe mayor citotoxicidad y por tanto muerte celular. La evaluación de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares RKO y SW613-B3 tratadas con GNTM no produjo una variación en las fases del ciclo con respecto a su control negativo. Por lo tanto, se concluye que no hay arresto celular en ninguna de las fases del ciclo celular.

En el ensayo clonogénico al tratar a la línea celular RKO con el extracto se produjo una disminución de la formación de colonias en todas sus dosis (el 84.6% a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62.6% a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7.3% a 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por otro lado en la línea celular SW613-B3 en las primeras dosis (el 90% a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 83% a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no produjo una disminución significativa, sin embargo en su última dosis (2% a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) si hubo una disminución de la capacidad de supervivencia de las colonias, este se debe a que SW613-B3 ha demostrado tener una mayor resistencia a los tratamientos. Así se concluye que en la línea celular RKO hay una menor capacidad de supervivencia en las colonias, que en la línea celular SW613-B3.

RECOMENDACIONES

Debido a que GNTM ha demostrado tener una gran capacidad antiproliferativa en la línea celular RKO y que asimismo activa el mecanismo de muerte autofágico, se recomendaría realizar ensayos de inmunofluorescencia, para corroborar *in situ* dichos resultados y determinar la localización de p53, ya que de ello depende el rol que cumple esta proteína al activar esta ruta de muerte celular. Asimismo, se podría bloquear la expresión de p53 mediante ARN de interferencia para observar si p53 es fundamental en esta línea celular.

Sería interesante además bloquear la activación de la autofagia, con el fin de observar si las células, luego de ser tratadas con GNTM, son capaces de sobrevivir.

Estos mismos análisis se recomienda aplicar a otras líneas celulares cancerígenas, ya que han demostrado tener un efecto antiproliferativo aun mayor, así se puede conocer si siguen la misma ruta de muerte celular y si existe genotoxicidad.

Dado que el estudio se realizó en células de cáncer colorrectal, se recomienda realizar ensayos de citotoxicidad en una línea celular normal, a fin de dar a conocer si el efecto inhibitor se da exclusivamente en las células cancerígenas.

Se recomienda también realizar ensayos de aberraciones cromosómicas o cometa, con el propósito de dar a conocer si existe algún daño a nivel de ADN y así saber si produce genotoxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, G., y Aguirre, A. (2017). Etnomedicina y fitoquímica de dos especies de *Lecythidaceae*: *Grias neuberthii* J.F.Macbr. y *Grias peruviana* Miers. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Amin, A. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, J.T., Kucuk, O., Khan, G.N., Huang, G.S., Lee, H.Y., Reichrath, J., Honoki, K.; Georgakilas, A.G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C.S., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bhakta, D., Halicka, D., Niccolai, E., Fujii, H., Aquilano, K., Ashraf, S.S., Nowsheen, S., Yang, X., Bilsland, A. y Shin, D.M. (2016). Evasion of anti-growth signaling: a key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *El Sevier*, (Vol. 179). <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00168>.Long-chain.
- ATCC. (2018). RKO. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2577.aspx>.
- Bailon-Moscoso, N., Cevallos-Solorzano, G., Romero-Benavides, J., y Ramirez Orellana, M. (2017). Natural compounds as modulators of cell cycle arrest: application for anticancer chemotherapies. *Current genomics*, 18(2), 106–131. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160808125645>.
- Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., y Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, 24(6), 2283–2296. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7>.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., y Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>.Control.
- Cho, H. J., y Park, J. H. (2013). Kaempferol induces cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Cancer Prevention*, 18(3), 1–7.
- Cragg, G. M., y Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.
- Cruz, U. H., Dueñas, D. M., Martínez, K. Y., Sánchez, L. A., y Perdomo, A. Y. (2014). Adherencia al tratamiento de quimioterapia y radioterapia en pacientes con cáncer gástrico y colorrectal en las unidades oncológicas. *Revista Facultad de Salud - RFS*, 6(1), 14–19. Retrieved from <http://journalusco.edu.co/index.php/RFS/article/view/607/1141>.
- Cueva, R. M. (2014). Estudio del tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina en la células de Astrocitoma Cerebral (D-384). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Duronio, R. J., y Xiong, Y. (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008904>.
- Fernandez, M., Regueira, S., y Torres, M. (2016). Factores de riesgo modificables en algunos tipos de cáncer. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 41(11).

Freshney, R. I. (2010). A manual of basic technique and specialized applications. Hoboken, New Jersey. Wiley & Sons (Sixth Edit).

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, Alexey V., Arama, E., Baehrecke, E., Barlev, N., Bazan, N., Bernassola, F., Bertrand, M., Bianchi, K., Blagosklonny, M., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F., Chandel, N., Cheng, E., Chipuk, J., Cidlowski, J., Ciechanover, A., Cohen, G., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J., Czabotar, P., D'Angiolella, V., Dawson, T., Dawson, V., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K., Deberardinis, R., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V., Dixon, S., Duckett, C., Dynlacht, B., El-Deiry, W., Elrod, J., Fimia, G., Fulda, S., García-Sáez, A., Garg, A., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D., Greene, L., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J., Harris, I., Hengartner, M., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P., Juin, P., Kaiser, W., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R., Klionsky, D., Knight, R., Kumar, S., Lee, S., Lemasters, J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S., Lockshin, R., López-Otín, C., Lowe, S., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J., Martin, S., Martinou, J., Medema, J., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E., Molkentin, J., Moll, U., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J., Pereira, D., Pervaiz, S., Peter, M., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J., Puthalakath, H., Rabinovich, G., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C., Rubinsztein, D., Rudel, T., Ryan, K., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H., Sistigu, A., Stockwell, B., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden B., Vandenabeele, P., Vander, H., Villunger, A., Virgin, H., Vousden, K., Vucic, D., Wagner, E., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G. y Kroemer. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.

Globocan. (2018). Ecuador. Globocan 2018: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. *International Agency for Research on Cancer*.

Guamán-Ortiz, L. M. (2014). Screening of novel Berberine derivatives on colon cancer cell lines : identification of new potent cytotoxic drugs. Universidad de Pavia.

Guamán-Ortiz, L. M., Tillhon, M., Parks, M., Dutto, I., Prosperi, E., Savio, M., Arcamone, A., Buzzetti, F., Lombardi, P. y Scovassi, A. I. (2014). Multiple effects of Berberine derivatives on colon cancer cells. *BioMed Research International*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/924585>.

Guamán-Ortiz, L. M., Ramirez, M. I., y Ratovitski, E. A. (2017). Natural compounds as modulators

- of non-apoptotic cell death in cancer cells. *Current Genomics*, 18, 132–155. <https://doi.org/10.2174/138920291766616080315>.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hansakul, P., Aree, K., Tanuchit, S., y Itharat, A. (2014). Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non-small-cell lung cancer A549 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-413>.
- Hernández-Ortega, S., Bru, S., Ricco, N., Ramírez, S., Casals, N., Jiménez, J., Isasa, M., Crosas, B. y Clotet, J. (2013). Defective in mitotic arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G 1 cyclin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 4704–4714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426593>.
- Hernández, C., Saavedra, P., Ramírez, J., Bohn, U., y Ruiz, S. (2017). Factores predictivos de supervivencia a largo plazo del cáncer colorrectal tras la ablación de metástasis hepáticas con control ultrasonográfico. *Dialnet*, 148(8), 345–350.
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2012). ¿Qué es el cáncer?. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2014). Cáncer colorrectal. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/prevencion-colorrectal-pdq>.
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2015). Quimioterapia. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>.
- Joppa, L. N., Visconti, P., Jenkins, C. N., y Pimm, S. L. (2013). Achieving the convention on biological diversity's goals for plant conservation. *Science*, 341(1), 1100–1103. <https://doi.org/10.1126/science.1241706>.
- Klermund, J., Bender, K., y Luke, B. (2014). High nutrient levels and torc1 activity reduce cell viability following prolonged telomere dysfunction and cell cycle arrest. *Cell Reports*, 9(1), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.053>.
- Lagunas, M., Valle A., y Soto I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Laboratorio de Oncología Molecular. Unidad de Investigación*, 2, 98–107.
- Liu, M. P., Liao, M., Dai, C., Chen, J. F., Yang, C. J., Liu, M., ... Yao, M. C. (2016). Sanguisorba officinalis L synergistically enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells by promoting a reactive oxygen species-mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway. *Scientific Reports*, 6(34245), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep34245>.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Lozano, G., Garcia, Y., Garcia, S., y Ortiz, C. (2017). *Fundamentos de biología*. Universidad De Antioquia Medellín.

- Lozano, P. (2013). Germinación de semillas de *Grias neuberthii* JF Macbride sachamango, sometidos a diferentes tratamientos pre-germinativos. UNAP. Iquitos.
- Martínez-Torres, A., Uscanga-Palomeque, A., y Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. *Omnia Science Monographs*, (9), 269–312. <https://doi.org/10.3926/oms.318>.
- Menoyo, S., Ricco, N., Bru, S., Hernandez-Ortega, S., Escote, X., Aldea, M., y Clotet, J. (2013). Phosphate-activated cyclin-dependent kinase stabilizes g1 cyclin to trigger cell cycle entry. *Molecular and Cellular Biology*, 33(7), 1273–1284. <https://doi.org/10.1128/MCB.01556-12>.
- Merino, L. A. (2017). *Análisis de los factores asociados a la presencia de carcinoma invasivo en pacientes con adenomas avanzados o lesiones serradas: el camino hacia una vigilancia personalizada*. Universidad Complutense de Madrid.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Cáncer*. Recuperado de: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2017). *Cáncer colorrectal*. Recuperado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11761:colorectal-cancer&Itemid=41765&lang=es.
- Paiva, A. (2017). Efeito da proteína p53 nas respostas celulares à terapia fotodinâmica com 1,9-dimetil azul de metileno. Sao Paulo.
- Parks, M., Tillhon, M., Donà, F., Prospero, E., y Scovassi, A. I. (2011). 2-Methoxyestradiol: new perspectives in colon carcinoma treatment. *Molecular and cellular endocrinology*, 331(1), 119–128.
- Pérez, J. A., Salem, C., Henning, E., Uherek, F., y Schultz, C. (2018). Linfedema de miembro superior secundario al tratamiento de cáncer de mama. *Cuadernos de Cirujía*, 15(1), 107–115. <https://doi.org/10.4206/cuad.cir.2001.v15n1-18>.
- Puleston, D. J., y Simon, A. K. (2014). Autophagy in the immune system. *Immunology*, 141(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/imm.12165>.
- Redondo-Blanco, S. (2014). *Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mediante compuestos bioactivos*. Universidad De Oviedo.
- Rodríguez, J. (2015). *Cáncer colorrectal estadio IV: diferencias en el pronóstico y la supervivencia entre carcinomatosis peritoneal y diseminación sistémica*. Universidad Complutense De Madrid.
- Romero-Benavides, J. C., Bailon-Moscoso, N., Parra-Delgado, H., Ramirez, M. I., Villacis, J., Cabrera, H., ... Martínez-Vázquez, M. (2018). Argentatin B derivatives induce cell cycle arrest and DNA damage in human colon cancer cells through p73/p53 regulation. *Medicinal Chemistry Research*, 27(3), 834–843. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2106-4>.
- Sakitani, K., Hirata, Y., Hikiba, Y., Hayakawa, Y., Ihara, S., Suzuki, H., Suzuki, N., Serizawa, T., Kinoshita, H., Sakamoto, K., Nakagawa, H., Tateishi, K., Maeda, S., Ikenoue, T., Kawazu, S.

- y Koike, K. (2015). Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. *BMC Cancer*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1789-5>.
- Samaniego, J. (2017). Citotoxicidad de los extractos de *Grias neuberthii* y *Grias peruviana* sobre líneas celulares tumorales. Universidad Técnica Particular De Loja.
- Schafer, K. (1998). The Cell Cycle: A Review, 35(6), 461–478.
- Torres, S. (2018). Mecanismo de muerte inducido por el extracto metanólico de *Grias neuberthii* en líneas celulares tumorales con TP53 normal y TP53 mutado. Universidad Técnica Particular de Loja.
- USDSG. (2013). Distribution map of *Griass neuberthii* in Ecuador in Google earth, data SIO, NOA, U.S, NGA, GEBCO.
- Villacis, J. (2013). Efecto citostático de 9 derivados de Argentatina B en células de cáncer de colon (RKO). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Wu, J., Lv, Q., He, J., Zhang, H., Mei, X., Cui, K., Huang, N., Xie, W., Xu, N. y Zhang, Y. (2014). MicroRNA-188 suppresses G1/S transition by targeting multiple cyclin/CDK complexes. *Cell Communication and Signaling*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12964-014-0066-6>.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Análisis del ciclo celular de la línea celular RKO expuesta a GNTM.

NS = No significativo.

RKO

<i>Dosis</i>	G₀/G₁		S		G₂/M	
	%	P value	%	P value	%	P value
Control	53.34	Ns	22.56	Ns	24.1	Ns
15 µg/mL	54.27	Ns	21.93	Ns	23.8	Ns
30 µg/mL	54.51	Ns	21.53	Ns	23.96	Ns
45 µg/mL	55.97	Ns	19.83	Ns	24.2	Ns
Dxo 0.5 µM	22.67	***	2.9	***	74.43	***

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

ANEXO 2

Tabla 2. Análisis del ciclo celular de la línea celular SW613-B3 expuestas a GNTM.

NS = No significativo.

SW613-B3

<i>Dosis</i>	G₀/G₁		S		G₂/M	
	%	P value	%	P value	%	P value
Control	52	Ns	29.6	Ns	18.4	Ns
20 µg/mL	53.05	Ns	22	Ns	24.95	Ns
30 µg/mL	51.65	Ns	26.3	Ns	22.05	Ns
50 µg/mL	53.8	Ns	20.35	Ns	25.85	Ns

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

ANEXO 3

Tabla 3. Número de colonias clonogénicas de la línea celular RKO.

RKO

<i>Dosis</i>	N.º Colonias formadas	Porcentaje de Supervivencia (%)	P value
Control-	264	100	
15 µg/mL	224	84,6	**
30 µg/mL	166	62,6	***
45 µg/mL	19,6	7,3	***
Dxo 0.5 µM	5	1,6	***

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

ANEXO 4

Tabla 4. Número de colonias clonogénicas de la línea celular SW613-B3.
SW613-B3

<i>Dosis</i>	N.º Colonias formadas	Porcentaje de Supervivencia (%)	P value
Control-	171,3	100	
20 µg/mL	154,3	90	**
30 µg/mL	142	83	***
50 µg/mL	4,6	2.3	***
Dxo 0.5 µM	0	0	***

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.