



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Estudio citotóxico de los extractos de *Eriotheca ruizii*

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Ontaneda Campoverde, Robert Andrés

DIRECTORA: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, PhD.

LOJA- ECUADOR

2019

APROBACION DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Estudio citotóxico de los extractos de *Ortizobrya* realizado por Ontaneda Campoverde Robert Andrés ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre de 2019

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

“Yo Ontaneda Campoverde Robert Andrés declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Estudio citotóxico de los extractos de ~~Órta c@&A' ~ããZ~~ de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo 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. 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: Robert Andrés Ontaneda Campoverde
Cédula. 1105305305

DEDICATORIA

A la memoria de quien hizo de padre, abuelito y amigo, gracias tus consejos y tu valentía para afrontar la vida, gracias por dejarme el recuerdo de un gran hombre, te extraño "Tata".

A mi madre, por cuidar de sus hijos sola y demostrarnos que no hay poder humano tan fuerte como el corazón de una mamá, para ti mi gratitud y mi amor eterno.

A mis hermanas Vanessa, Geovanna, Karen y Adriana, por sus consejos, su apoyo incondicional y esas palabras de aliento que fueron motor para seguir adelante.

Á

AGRADECIMIENTO

Á

A Dios, por darme la dicha de encontrar grandes personas en mi camino.

A mi tía Teresita, a quien recuerdo con mucho cariño, te extraño.

A mi cuñado Diego Quiñones, gracias por confiar en mí y ser ese vehículo para culminar mis estudios.

A mi cuñado Carlos, por su apoyo.

A mis mejores amigos de toda la vida, Diego, Darío, Patricio, Daniela, por estar presentes siempre con un consejo una palabra de aliento y nunca dejarme solo.

A mi mejor amiga Johanna Chamba, por hacer muchas veces de hermana y saber que siempre puedo confiar en ti.

A Karem y Danya, amigos que nunca fallan en momentos difíciles.

A quien me permitió llegar hasta aquí, seguir el camino correcto y hacer de cada palabra, cada consejo una mejor versión de mí, gracias Doc. Natalia Bailón.

Al Ph.D. Luís Guamán y a la Mgtr. María Isabel Ramírez por brindarme sus conocimientos y amistad.

A Daisy y Anita, por brindarme su tiempo, sus consejos, por las risas los buenos y malos momentos.

A Cristina, por su compañía su cariño y su paciencia, gracias a la vida por conocerte.

A mis amigos de laboratorio, por su apoyo, sus consejos y su guía en cada ensayo.Á

Á

Á

Á

Á

Á

%d[^ Á|Á^•~|ca[Á^Á| Á~^Á} aa|a} Á ~ b|Á~ã[Á@&^|Á^Á dE

V@{ ae ÁCaã[} E

Á

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACION DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCCIÓN.	3
CAPITULO I. FIN DEL PROYECTO	5
1.1. Objetivo General.....	6
1.1. Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO II. MARCO TEORICO	7
2.1 Cáncer: definición y origen.	8
2.2 Incidencia.	8
2.3 Cáncer Colorrectal.	9
2.4 Cáncer de Pulmón:.....	10
2.4.1 Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPCNP/ CPNM).11	
2.4.2 Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPCP/ CPM).....	11
2.5 Cáncer de próstata.	12
2.6 Rutas de muerte celular:	14
2.6.1 Apoptosis.....	14
2.6.2 Necrosis:.....	14
2.7 Rol de la mitocondria en la muerte celular.....	19
2.8. Antineoplásicos de origen natural.....	20
2.9. Òñ c&ñ ã ã	21
2.10. Ensayos de citotoxicidad.	22
2.10.1. Ensayo MTS.	23
2.10.2 Azul Tripano.....	23
2.10.3. Lactato deshidrogenasa.....	23

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	25
3.1. Obtención de los extractos.	26
3.2. Cultivo Celular.	26
3.4. Viabilidad celular (MTS).	26
3.5. Concentración inhibitoria mínima. (IC ₅₀).....	27
3.6. Viabilidad celular por Azul Tripano.	27
3.7. Lactato deshidrogenasa.	27
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	29
4.1 Viabilidad celular por MTS.....	30
4.2. Concentración inhibitoria mínima (IC ₅₀).	31
4.3 Viabilidad celular por Azul de Tripano.	31
4.5 Lactato Deshidrogenasa.....	33
4.6 Porcentaje de Inhibición celular por MTS de 12 fracciones del extracto de <i>Eriotheca ruizii</i> (ERACEEP) sobre células PC-3.	34
Capitulo V. Discusión.	35
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES:	40
Bibliografía:.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Necrosis regulada por RIPK.....	17
Figura 2. Necrosis por MPT-RN.	18
Figura 3. Funciones vitales de las mitocondrias.	19
Figura 4. Reacción catalizada por lactato deshidrogenasa (LDH).	24
Figura 5. Porcentaje de viabilidad (IC ₅₀).....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Viabilidad celular por azul tripano.....	32
Figura 7. Efecto anti proliferativo del extracto de <i>Eriotheca ruizii</i> (ERACEEP) sobre células PC-3.	32
Figura 8. Medición de lactato deshidrogenasa en medios de cultivo en linea celular PC-3..	33

Figura 9. Células de cáncer de próstata expuesta a 12 fracciones del extracto de *Oriza coccinea* (ERACEEP)..... 34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones genéticas comunes en el cáncer de próstata..... 12

Tabla 2. Taxonomía de *Oriza coccinea*..... 22

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los extractos de *Oriza coccinea*..... 30

ABREVIATURAS

A-549: Línea celular de cáncer de pulmón.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

BPH: Hiperplasia benigna de próstata.

CCR: Cáncer colon rectal.

ciAP1: Inhibidor celular de la apoptosis proteína-1.

ciAP2: Inhibidor celular de la apoptosis proteína-2.

CIMP: Fenotipo metilador de islotes

CPCNO/CPNM: Cáncer de pulmón de células no pequeñas.

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas.

CYLD: Ubiquitina carboxilo terminal hidrolasa

DD: Dominio de muerte.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

EGFR: Receptores del factor de crecimiento epidérmico

ETC: cadena transportadora de electrones.

FADD: Dominio de activación de muerte

Genes MMR: Mismatch repair.

HOIL-1: Ubiquitina lligasa

IC₅₀: Concentración inhibitoria mínima.

IMS: Inestabilidad de microsatélite.

INC: Inestabilidad cromosómica.

MPTP: Transición de la membrana mitocondrial

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PC-3: Línea celular de adenocarcinoma prostático grado IV.

RGS17: Gen regulador de señalización de la proteína G17.

RIPK1: Receptores de interacción quinasa 1.

RIPK3: Receptores de interacción quinasa 3.

RKO: Línea celular de carcinoma de colon humano

SFB: Suero fetal bovino

SMC: Subtipos moleculares de consenso

TCA: Acido tricarbóxico.

TLR3: Proteína receptor tipo Toll 3

TLR4: Proteína receptor tipo Toll 4

TNF: Factor necrótico tumoral

TNFR1: Factor necrótico tumoral receptor 1

TNF- α : Factor necrótico tumoral alfa

RESUMEN

El cáncer surge de la transformación de células normales a células tumorales originado por alteraciones en el material genético conocidas como mutaciones, éstas le permiten a las células la capacidad de dividirse a una tasa mayor a diferencia de las células sanas. Las alternativas para combatir el cáncer son diversas y dependen del tipo, grado y localización para poder plantear un esquema de tratamiento; el problema de estas terapias radica en su agresividad y en los efectos secundarios que éstas provocan al paciente, es por ello la necesidad de encontrar nuevas opciones en la terapia contra el cáncer. Uno de los grandes recursos radica en la medicina natural, se estima que más del 60% de los medicamentos aprobados, los nuevos desarrollos de medicamentos para el cáncer y enfermedades infecciosas, son de origen natural. *Orbania* es una especie de la familia Bombacaceae, crece generalmente en laderas y colinas de los bosques secos en las provincias de Loja, Guayas y Manabí; en este trabajo se determinó que *Orbania* tiene actividad citotóxica sobre tres líneas celulares tumorales: próstata, colon y pulmón; de ellas, la línea celular de cáncer de próstata presentó mayor sensibilidad al extracto obtenido con acetato de etilo, además que la muerte que induce el extracto no libera LDH al medio de cultivo.

Palabras clave: *Orbania*, necrosis, citotoxicidad.

ABSTRACT

Cancer arises from the transformation of normal cells to tumor cells caused by alterations in the genetic material specified as mutations, to the cells the ability to divide a rate greater than the difference of healthy cells. The alternatives to fight cancer are diverse and dependent on the type, grade and location to be able to propose a treatment scheme; The problem with these therapies lies in their aggressiveness and the side effects that the patient suffers, which is why the need to find new options in cancer therapy. One of the great resources lies in natural medicine, it is estimated that more than 60% of approved drugs, new developments of drugs for cancer and infectious diseases, are of natural origin. *Eriotheca ruizii* is a species of the Bombacaceae family, usually grows on slopes and hills of dry forests in the provinces of Loja, Guayas and Manabí; In this work I know that *E. ruizii* has cytotoxic activity on three tumor cell lines: prostate, colon and lung; of these, the prostate cancer cell line showed greater sensitivity to the extract obtained with ethyl acetate, in addition to the death induced by the unbound LDH extract into the culture medium.

Key words: *Eriotheca ruizii*, necrosis, cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN.

Una célula normal se convierte en células tumoral mediante procesos de múltiples etapas que generalmente progresa de una lesión precancerosa a un tumor maligno llamado cáncer (WHO, 2018). Las células cancerosas se desarrollan a partir de células normales debido al daño en el ADN (Akulapalli Sudhakar, 2009).

Sánchez, C. (2013) manifiesta que la transformación de una célula normal a una célula maligna es originado por alteraciones en el material genético conocidas como mutaciones; las mismas que le confieren a la célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor que el resto de la estirpe celular y generar células hijas que conservan dicha mutación, las mismas que presentaran mayor capacidad de supervivencia, crecimiento y ventajas proliferativas respecto de las células normales. Las células tumorales son eliminadas por un proceso denominado inmunovigilancia tumoral, cuando estos mecanismos de control son evadidos dan lugar al desarrollo de una neoplasia.

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo y fue responsable de un estimado de 9.6 millones de muertes en 2018. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer, siendo los más comunes el cáncer de pulmón, mama, colorrectal, próstata, cáncer de piel (no melanoma) y estómago (WHO, 2018). A nivel mundial los tipos de cáncer con mayor incidencia en hombres son el cáncer de pulmón seguido del cáncer de próstata, colorrectal, estómago, hígado, vejiga, esófago, linfoma no Hodking, leucemia y riñón (GLOBOCAN, 2018b); mientras que en mujeres el cáncer de mama ocupa el primer lugar, seguido del cáncer colorrectal, pulmón, cuello uterino, tiroides, estómago, ovario, hígado y linfoma no Hodking (GLOBOCAN, 2018a).

En Ecuador en promedio existen 165 casos de cáncer en todas sus variedades por cada 100 mil mujeres y 150 casos por cada 100 mil hombres. En este país los tipos de cáncer más comunes en hombres según su incidencia son: próstata, estómago, colorrectal y linfoma; mientras que en mujeres los más comunes según su incidencia son: mama, cuello uterino, tiroides, estómago y colorrectal (MSP, 2018).

Las plantas son una fuente inagotable de productos naturales con actividad biológica útil para la humanidad debido a su gran diversidad de especies y metabolitos, así como a su potencial para sintetizar un sinnúmero de moléculas complejas difíciles de reproducir en el laboratorio (Fiorentino & Urueña, 2018). Se estima que más del 60% de los medicamentos

aprobados y los nuevos desarrollos de medicamentos para el cáncer y las enfermedades infecciosas son de origen natural. El uso de compuestos naturales, como una fuente potencial de agentes antitumorales se ha estudiado en profundidad en muchos modelos biológicos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Herranz-López, Losada-Echeberría, & Barrajon-Catalán, 2018).

Ortizoboa es una especie de la familia *Ortizobiaceae*, crece generalmente en laderas y colinas de los bosques secos ecuatorianos de las provincias de Loja, Guayas y Manabí. Las semillas molidas se usan para curar cataratas y su resina para cicatrizar heridas (Cahuana Palma W, 2016). Existen estudios preliminares de metabolitos secundarios presentes en el tubérculo *Ortizoboa* en cuyos extractos metanólicos se han encontrado alcaloides, metilcetonas glicósidos cardiotónicos, taninos y polifenoles, de estos compuestos los polifenoles y probablemente alcaloides de naturaleza fenólica, serían los responsables de actividad antifúngica y antibacteriana (Santos Díaz, 2018), pero no hay evidencia de actividad citotóxica en líneas celulares tumorales.

Ante los argumentos mencionados, este trabajo de fin de titulación busca identificar el efecto citotóxico que ejerce los extractos de *Ortizoboa* en diferentes líneas celulares tumorales y determinar cuál presenta mayor sensibilidad al extracto.

CAPITULO I. PROPÓSITO Y FIN DEL PROYECTO

CAPÍTULO II. MARCO TEORICO

2.1 Cáncer: definición y origen.

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis (WHO, 2018).

El cáncer surge por un proceso en el cual una población inicial de células anormales, evoluciona a través de ciclos sucesivos de transformaciones, las células adquieren una mutación adicional o un cambio epigenético que le proporciona una ventaja selectiva sobre sus células vecinas, capacitándola para sobrevivir mejor en el entorno; la descendencia de esta célula una vez adaptada, continuara dividiéndose, a menudo formando un tumor y convirtiéndose en el clon dominante en la lesión en desarrollo; mientras las células neoplásicas no se conviertan en invasoras, se dice que el tumor es benigno, un tumor se considera canceroso solo si es maligno; es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante.

Las masas cancerosas presentan un microambiente intersticial ácido y un pH intracelular alcalino, al carecer de nutrientes y oxígeno, la activación de la glucólisis aeróbica produce ácido láctico y reduce el pH extracelular (efecto de Warburg), el crecimiento rápido y desorganizado en neoplasias malignas hace que las células cancerosas no posean una estructura y soporte vascular adecuado (Liberti & Locasale, 2016).

En la patología del cáncer se han descrito diversos factores durante el desarrollo tumoral: mantener la señalización proliferativa, evitar los supresores del crecimiento, resistir a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa induciendo la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis (Moses, Garcia-bloj, Harvey, & Blancafort, 2018).

2.2 Incidencia del cáncer.

De entre las diversas patologías con alta tasa de mortalidad las neoplasias malignas son la segunda causa de muerte en todo el mundo, registrando así alrededor de 9.6 millones de muertes en 2018. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al

cáncer, siendo los más comunes: pulmón, mama, colorrectal, próstata, cáncer de piel (no melanoma) y estómago (WHO, 2018).

Según estadísticas del ministerio de salud pública, en nuestro país por cada 100 mil mujeres existen 165 casos de cáncer y por cada 100 mil hombres se registra 150 casos. Siendo los más frecuentes el cáncer de próstata, estómago, colorrectal y linfoma en hombres y cáncer de mama, cuello uterino, tiroides, estómago y colorrectal en mujeres. (MSP, 2018).

2.3 Cáncer Colorrectal.

Se desarrollan a partir de pólipos adenomatosos que surgen del revestimiento del intestino, y la evidencia sugiere que posiblemente haya adenomas durante varios años antes de que progrese la malignidad; se cree que la cantidad y el tamaño de los adenomas, además de su tipo histológico acompañado por la presencia de displasia epitelial, afectan el riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal CCR (Hodgkinson, Kruger, & Abrahamse, 2017). Los tumores pueden ocurrir esporádicamente, pero hay algunos síndromes de CCR heredados; también se han reconocido varios factores de riesgo (INTRAMED, 2016). Más del 95% de los casos de cáncer de colon son considerados esporádicos atribuyéndolos en su mayoría a factores ambientales entre ellos el estilo de vida sedentario y principalmente la dieta, que en su mayoría consiste en la ingesta de almidón refinado, azúcar, ácidos grasos saturados y poco o nada de frutas, verduras y granos enteros, estos parámetros han demostrado estar estrechamente asociados con un mayor riesgo de cáncer de colon (Reddivari et al., 2016).

Müller, Ibrahim, & Arends (2016) hacen referencia a que el cáncer colorrectal es una inestabilidad genética que surge por dos mecanismos diferentes: el más común comprende alrededor del 84% de CCR esporádicos, se origina por inestabilidad cromosómica (INC) que consiste en cambios en número y estructura de los cromosomas sean estos deleciones, ganancias, translocaciones y demás reordenamientos cromosómicos; se sospecha que la INC tiene estrecha relación con mutaciones inactivadoras o pérdidas en el gen supresor de tumores Adenomatous Polyposis Coli (APC), que ocurren como un evento temprano en el desarrollo de neoplasia del colon-recto.

El segundo grupo comprenden alrededor de 13-16% de CCR esporádico, son hipermutados y muestran la inestabilidad de microsatélite (IMS); esto es el resultado de una reparación defectuosa de ADN, asociada con TP53 de tipo salvaje y un patrón de inestabilidad cromosómica casi diploide. El fenotipo de metilación CpG (CIMP) es una característica que induce inestabilidad epigenética por el promotor de hipermetilación y el silenciamiento de una gama de genes supresores de tumores, incluyendo MLH1, uno de los genes del sistema de reparación de errores de replicación del ADN Mismatch Repair (MMR) (Müller et al., 2016).

El CCR en base a su expresión génica ha sido clasificado de acuerdo a una marcada interconectividad entre seis sistemas de clasificación independiente que se unen en cuatro subtipos moleculares de consenso (SMC) con características distintivas, siendo estos: CMS1 (inestabilidad de microsatélite, 14%), hipermutado, microsatélite inestable y fuerte activación inmune; CMS2 (canónico, 37%), epitelial, marcado WNT y activación de señalización MYC; CMS3 (metabólica, 13%), desregulación metabólica epitelial y evidente; y CMS4 (mesenquimal, 23%), factor de crecimiento transformante prominente: activación, invasión estromal y angiogénesis. Las muestras con características mixtas (13%) posiblemente representan un fenotipo de transición o heterogeneidad intratumoral (Guinney et al., 2015).

2.4 Cáncer de Pulmón.

El cáncer de pulmón se ha convertido en el asesino número uno entre cánceres en todo el mundo (Molina, Yang, Cassivi, Schild, & Adjei, 2008). Los pulmones, al ser órganos de gran tamaño, facilitan a los tumores el crecimiento en ellos durante mucho tiempo, durante este periodo algunos de sus síntomas como tos, fatiga, cansancio son confundidos y atribuidos a otras causas, este es el motivo por el cual el cáncer a etapas tempranas (I y II) no logra ser detectado, siendo diagnosticado en su mayoría en etapas críticas o terminales (III y IV) (Hussain et al., 2015). El cáncer de pulmón es el resultado final de la acción de múltiples factores que lesionan el epitelio bronquial, se desarrolla como consecuencia de la acumulación de múltiples alteraciones moleculares que afectan a secuencias génicas que codifican proteínas relacionadas con el control de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis; todas estas alteraciones hacen que la célula neoplásica adquiera características que la diferencian de la normal.

El cáncer de pulmón durante muchos años fue clasificado por características morfológicas; actualmente es considerado una patología a nivel molecular, diferenciado por un número creciente de mutaciones impulsoras; la identificación de la mutación en el gen *EGFR* y numerosos genes que están implicados en la cascada de señalización de los receptores tirosinas quinasa receptoras en la superficie celular al núcleo se han implicado en la patogénesis del cáncer de pulmón (Kris, Heston, & Giacchino, 2011). Se ha logrado identificar un locus de susceptibilidad al cáncer de pulmón en el cromosoma 6q.55; fumar al parecer aumenta la susceptibilidad a desarrollar esta patología, otros estudios indicaron que el regulador del gen de señalización de la proteína G17 *RET* en esta ubicación es un candidato importante para la susceptibilidad al cáncer de pulmón. La evidencia ha mostrado que existe un mecanismo de resistencia en los inhibidores de la tirosina quinasa en los cánceres de pulmón con mutaciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico *EGFR* dando como resultado la aparición de una segunda activación; mutación, T790M. (Sustitución de metionina en la posición 790 con treonina del dominio quinasa) (Gazdar & Zhou, 2018).

2.4.1 Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcíticas (CPCNP/CPNM).

El CPCNP surge de las células epiteliales pulmonares desde los bronquios principales hasta los alvéolos terminales, el tipo histológico de CPCNP se correlaciona con el sitio de origen y refleja una variación en el epitelio de las vías respiratorias desde los bronquios a los alvéolos, por lo general, el carcinoma de células escamosas empieza cerca de un bronquio principal (NIH, 2019). Su crecimiento es más lento y es la forma más abundante de cáncer de pulmón, derivándose algunas subclases que incluyen adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células grandes.

2.4.2 Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcíticas (CPCP/CPM).

Se caracteriza por estar presente en células neuroendocrinas de aquí su rápido crecimiento y diseminación hacia órganos como hígado, hueso, glándulas adrenales, médula ósea o sistema nervioso central; por lo general este tumor se inicia en los bronquios centrales, infiltrando la mucosa y produciendo estrechamiento de la vía aérea. Así mismo la diseminación ganglionar regional es muy precoz lo que da como resultado masas mediastínicas de gran tamaño con bastante frecuencia; esto deriva en un síndrome

de vena cava superior por compresión de la misma (González, Expósito, Losada, Castillo, & Soto, 2017).

2.5 Cáncer de próstata.

Es el segundo cáncer más frecuente y la quinta causa más común de muerte por cáncer en hombres, con aproximadamente 1.1 millones de casos nuevos (15% de todos los canceres en hombres) y 0,3 millones de muertes por cáncer (7% de todos los casos de muertes por cáncer en hombres) en 2012 (Merchán, 2018). La próstata está dividida en dos zonas, la fibromuscular anterior y otra glandular, la cual se divide en tres zonas: central, de transición y periférica. En la zona de transición es donde se origina la Hiperplasia Benigna de Próstata (BPH), mientras que en la zona periférica, es donde se desarrolla principalmente el cáncer de próstata (Bort, Sánchez-Gómez, Mateos-Gómez, & Castro, 2018).

Esta patología al ser localizada puede ser curable por diferentes formas ya sea mediante cirugía o radiación, al contrario de etapas avanzadas donde se asegura que los genes supresores de tumores, las aberraciones genómicas y los oncogenes se involucran en su desarrollo (Soekmadji, Rockstroh, Ramm, Nelson, & Russell, 2017). En el estudio del genoma humano se han identificado más de 100 variantes de genes que representan el 33% de un cáncer de próstata entre estos genes se destacan *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RB1*, *AR*, *HOXB13*, *MDM2*, *MDM4*, *MDM1*, *MDM3*, *MDM5*, *MDM6*, *MDM7*, *MDM8*, *MDM9*, *MDM10*, *MDM11*, *MDM12*, *MDM13*, *MDM14*, *MDM15*, *MDM16*, *MDM17*, *MDM18*, *MDM19*, *MDM20*, *MDM21*, *MDM22*, *MDM23*, *MDM24*, *MDM25*, *MDM26*, *MDM27*, *MDM28*, *MDM29*, *MDM30*, *MDM31*, *MDM32*, *MDM33*, *MDM34*, *MDM35*, *MDM36*, *MDM37*, *MDM38*, *MDM39*, *MDM40*, *MDM41*, *MDM42*, *MDM43*, *MDM44*, *MDM45*, *MDM46*, *MDM47*, *MDM48*, *MDM49*, *MDM50*, *MDM51*, *MDM52*, *MDM53*, *MDM54*, *MDM55*, *MDM56*, *MDM57*, *MDM58*, *MDM59*, *MDM60*, *MDM61*, *MDM62*, *MDM63*, *MDM64*, *MDM65*, *MDM66*, *MDM67*, *MDM68*, *MDM69*, *MDM70*, *MDM71*, *MDM72*, *MDM73*, *MDM74*, *MDM75*, *MDM76*, *MDM77*, *MDM78*, *MDM79*, *MDM80*, *MDM81*, *MDM82*, *MDM83*, *MDM84*, *MDM85*, *MDM86*, *MDM87*, *MDM88*, *MDM89*, *MDM90*, *MDM91*, *MDM92*, *MDM93*, *MDM94*, *MDM95*, *MDM96*, *MDM97*, *MDM98*, *MDM99*, *MDM100* (Pritchard et al., 2016).

La activación de oncogenes y la inactivación de otros genes supresores de tumores permiten crear un ambiente para que un tumor se desarrolle (L. Romero, 2017), a continuación se enumeran algunas alteraciones genéticas que permiten el crecimiento tumoral en próstata:

Tabla 1. Alteraciones genéticas comunes en el cáncer de próstata.

	Función Normal	Alteración
Gen supresor de tumor		
<i>RB1</i>	Controla fase G1/S del ciclo celular y diferenciación	Mutaciones germinales Mutación/pérdida de ambos alelos
<i>TP53</i>	Factor de transcripción	Mutación/perdida de ambos

	Regula reparación de ADN, ciclo celular y apoptosis	alelos
<i>PTEN</i>	Regula la proliferación celular, apoptosis y senescencia	Mutación/delección
<i>BRCA1</i>	Factor de transcripción Forma parte del complejo proteico para detectar daño al ADN Participa en el proceso de recombinación homóloga	Mutación
Oncogenes		
<i>RAS</i>	Transducción de señales Activa proliferación	Mutación
<i>MYCC</i>	Factor de transcripción Activa proliferación	Amplificación
<i>TERT</i>	Replicación funcional	Amplificación
<i>BCL-2</i>	Alargamiento de telómeros Inhibición de la apoptosis	Sobreexpresión
Proteínas de metabolismo intermediario		
<i>FASH</i>	Síntesis de ácidos grasos	Sobreexpresión
Citocinas		
<i>MIC-1</i>	Citosina	Sobreexpresión

Fuente y Elaboración. Romero, 2017

Desde el punto de vista etiológico, se considera que el cáncer de próstata es una enfermedad multifactorial, en la que participan principalmente factores hormonales, además de los relacionados con la raza, la dieta y una historia familiar de cáncer prostático, se origina por el crecimiento clonal de una célula epitelial alterada en su genoma; no obstante, se han identificado múltiples clones malignas dentro de la misma glándula, como consecuencia de la inestabilidad genética de la próstata (Álvarez-blanco, 2008).

2.6 Rutas de muerte celular.

La muerte celular es un proceso altamente complejo y fisiológicamente necesario para el buen mantenimiento de la homeostasis; la presencia y supervivencia de células o poblaciones de células no solo garantiza la proliferación de las mismas sino que también activa un programa genético de muerte celular (Emanuele et al., 2018). El resultado de estas rutas permite una armonía y un equilibrio en la regeneración celular pero también el fallo durante su proceso generara en muchos casos células malignas que dará lugar a posibles neoplasias o patologías graves e incluso mortales.

2.6.1 Apoptosis.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada bien definido que elimina células defectuosas enfermas, que se han vuelto senescentes o son una amenaza para el organismo. Durante este proceso las células se rompe en fragmentos llamados cuerpos apoptóticos que contiene partes del citoplasma y del núcleo, la membrana plasmática de las células y cuerpos apoptóticos permanece intacta, lo que la convierte en una diana para los fagocitos, los mismos que eliminan rápidamente estos fragmentos antes que los contenidos intracelulares se filtren hacia otras células evitando así una reacción inflamatoria en el huésped. Durante la fase temprana, la célula se reduce de tamaño con la condensación de la cromatina que resulta en pirnosis, produce una extirpación extensa de la membrana plasmática seguida de una cariorrexis y la formación de cuerpos apoptóticos (Preet & Agrawal, 2019). La maquinaria de apoptosis está regulada a nivel genético, es compleja e involucra muchas vías de señalización, este tipo de muerte celular puede activarse a través de las vías extrínseca e intrínseca mediadas por caspasas; cualquier desregulación durante este proceso se asocia con la proliferación celular no controlada, el desarrollo y la progresión del cáncer y la resistencia del cáncer a los tratamientos farmacológicos (Pistritto, Triscioglio, Ceci, Alessia Garufi, & D'Orazi, 2016).

2.6.2 Necrosis:

La Necrosis es el resultado de un proceso accidental fuera de control, provocado por factores externos a la célula, ya sea por infecciones, toxinas calor o traumas; en el proceso de necrosis la ruptura de membrana plasmática, inflamación celular, digestión de

cromatina, hidrolisis del ADN y lisis celular son puntos claves durante su proceso; es conocido que las mitocondrias participan activamente durante este tipo de muerte por lo que el colapso del metabolismo de la energía mitocondrial da como resultado una caída en el nivel de ATP, provocando una sobrecarga intracelular de Ca^{2+} y la estimulación de diversas enzimas catabólicas dependientes de Ca^{2+} , fosfolipasas, proteasas y endonucleasas (Orrenius, Gogvadze, & Zhivotovsky, 2015).

2.6.2.1. Necrosis regulada por RIPK.

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es un programa de muerte independiente de caspasa, estas células moribundas no muestran ninguna de las características morfológicas de la apoptosis más bien muestran inflamación para luego explotar abruptamente (Newton & Manning, 2016).

Chan, Luz, & Moriwaki, (2014) menciona que la necroptosis o muerte regulada por RIPK, puede ser activada por los receptores de la muerte de la súper familia TNF, receptores de tipo TLR3, TLR4 y los receptores del interferón, la vía de señalización para necroptosis empieza por el receptor TNFR1, que es un miembro de la superfamilia de receptores TNF que contiene un dominio de interacción de proteínas esencial llamado dominio de muerte (DD); en sí, a todo el proceso de inducción de necrosis podríamos agruparlos en tres complejos diferentes:

- Complejo I: La unión del trímero de TNFR1 pre montado con TNF provoca un cambio de conformación que promueve la formación de un complejo de señalización de membrana de corta duración que está compuesto por los adaptadores del dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD), el factor asociado al receptor de TNF 2 (TRAF2), RIPK1, el inhibidor celular de la apoptosis 1 (cIAP1), cIAP2 y el complejo de ensamblaje de cadena de ubiquitina lineal (LUBAC), que se compone de las subunidades RanBP tipo HOIL-1, HOIP y proteína de interacción del dominio RH asociada a Shank (SHARPIN). Las ligasas de E3 cIAP1, cIAP2 y HOIL-1 dentro de LUBAC controlan la ubiquitinación de muchos de los adaptadores dentro del Complejo I. Esta red de ubiquitina dentro del Complejo I es esencial para el reclutamiento y activación del inhibidor del complejo de la quinasa κB (IKK). El IKK activado fosforila el $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, lo que lleva a la degradación del $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ por el proteosoma y la translocación nuclear de los dímeros NF- κB , que es un punto clave para muchos genes proinflamatorios y de

supervivencia, una respuesta adecuada de NF- κ B es un factor de transcripción crucial para la supervivencia celular y para contrarrestar los efectos citotóxicos del TNF.

- Complejo II: El NF- κ B está mediado en parte por las dianas transcripcionales cIAP1, cIAP2 y la forma larga de la proteína inhibidora de tipo celular (cFLIPL). La rápida internalización del receptor es importante para el acoplamiento del adaptador FADD y la caspasa iniciadora, caspasa-8, al complejo, la disociación de la TNFR1 ocurre antes del acoplamiento de la FADD y la caspasa-8. El complejo citosólico que contiene FADD y caspasa-8 a menudo se denomina Complejo IIa. Normalmente, la apoptosis se previene mediante la dimerización entre caspasa-8 y cFLIPL, una enzima inactiva homólogo de la caspasa-8. El heterodímero caspasa-8/cFLIPL inhibe la activación completa de la caspasa-8 y la apoptosis, pero retiene la escisión de reguladores de necrosis esenciales como RIPK1, RIPK3 cilindromatosis (CYLD) (26-30). Por lo tanto, la inducción dependiente de NF- κ B de cFLIPL inhibe la apoptosis y la necroptosis. La caspasa-8 activa en el Complejo IIa, no solo inicia la cascada de caspasas y el programa apoptótico, sino que también escinde e inactiva mediadores de necroptosis esenciales como RIPK1, RIPK3 y CYLD. Por lo tanto, la inhibición de la caspasa-8 o su adaptador ascendente FADD prepara a las células para la necroptosis al preservar la integridad de RIPK1 y RIPK3. La estabilización de RIPK1 y el reclutamiento de RIPK3 convierten el Complejo IIa en el Complejo IIb o el necrosoma.
- Complejo III: Los complejos citosólicos que contienen las RIPK también se conocen como el ripoptosoma, aunque este término no hace la distinción entre apoptosis y necroptosis. RIPK1 y RIPK3 interactúan a través del motivo de interacción homotípica de RIP (RHIM) para formar un complejo que es esencial para el reclutamiento y la activación del sustrato de RIPK3 de linaje mixto de tipo quinasa (MLKL). RIPK3 fosforila MLKL en Thr357 y Ser358 para estimular su oligomerización y translocación a membranas intracelulares y plasmáticas.

El mecanismo preciso mediante el cual MLKL induce la rotura de la membrana es controvertido, ya que algunos informes implican la alteración de los canales iónicos de calcio o sodio y otros que muestran una unión directa a los fosfolípidos de la membrana y la alteración de la integridad de la membrana, figura 1.

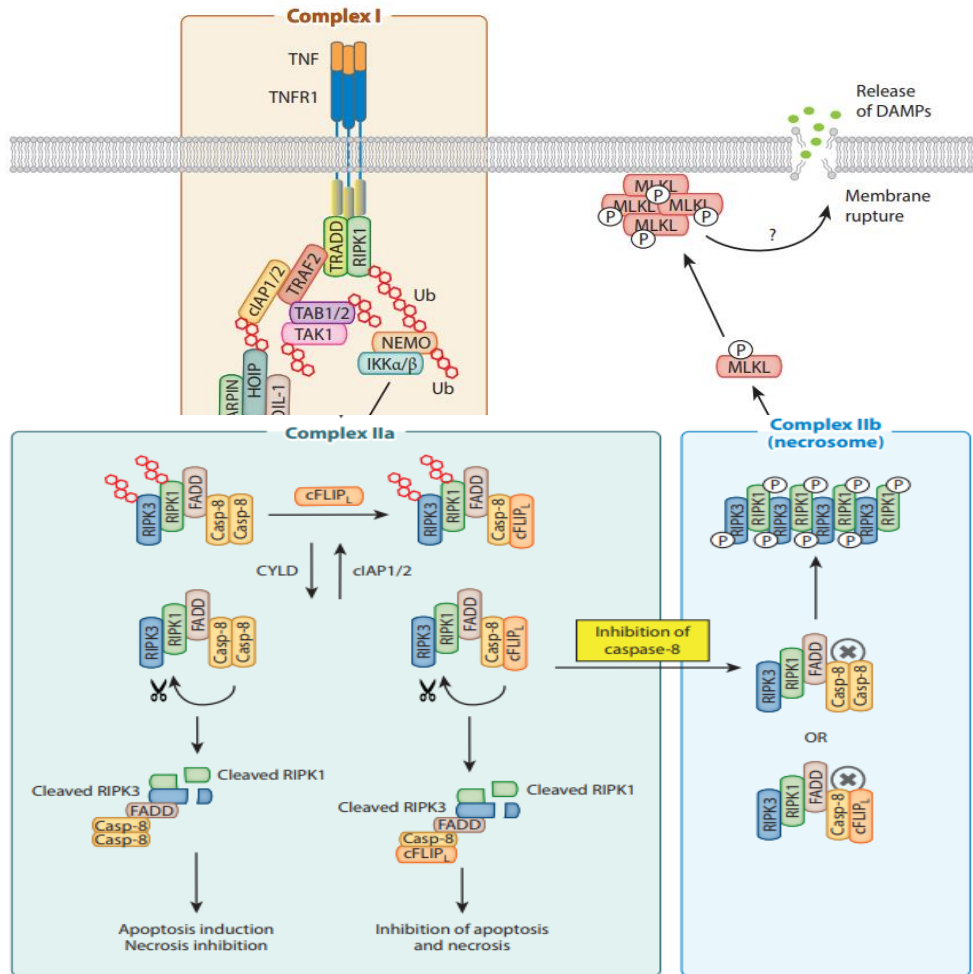


Figura 1. Necrosis regulada por RIPK.
Fuente y Elaboración: Chan et al., 2014

2.6.2.2. Necrosis por MPT-RN.

La necrosis dependiente de la permeabilidad mitocondrial es otro tipo de necrosis regulada que está involucrada especialmente en enfermedades cardiacas, en el proceso de la apoptosis el consumo de ATP se minimiza formando apoptosomas que se unen y activan las caspasas de proteínas específicas dando como resultado la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (OMM); por otra parte, el consumo de ATP persiste durante la necrosis lo que habilita la apertura de una canal de membrana mitocondrial

interna (IMM) denominado MPTP, que en una mitocondria sana se encarga del mantenimiento de un gradiente eléctrico y químico entre el espacio intermembrana y la matriz. Por el contrario, la apertura del MPTP provoca una desorganización aguda de la estructura y función mitocondrial que conduce a la muerte celular necrótica, se cree que el principal regulador de la apertura de MPTP es la sobrecarga de Ca^{2+} . La coincidencia de la captación de Ca^{2+} mitocondrial con el estrés oxidativo puede abrir el MPTP, lo que lleva al agotamiento del ATP y la muerte celular necrótica (Zhu & Sun, 2018).

MPT-RN se define como una forma regulada de muerte celular necrótica que resulta de un aumento repentino y una permeabilidad sostenida de las membranas mitocondriales, proporcionando así un atajo entre la matriz mitocondrial y el citosol. Cuando el Ca^{2+} entra a la matriz mitocondrial, interrumpe el gradiente de protones necesario para la generación de ATP, la presencia de Ca^{2+} resulta en la presencia secundaria de agua que es impulsada osmóticamente provocando hinchazón mitocondrial, ruptura del orgánulo y finalmente la inducción a una célula necrótica (Kers, Leemans, & Linkermann, 2016)

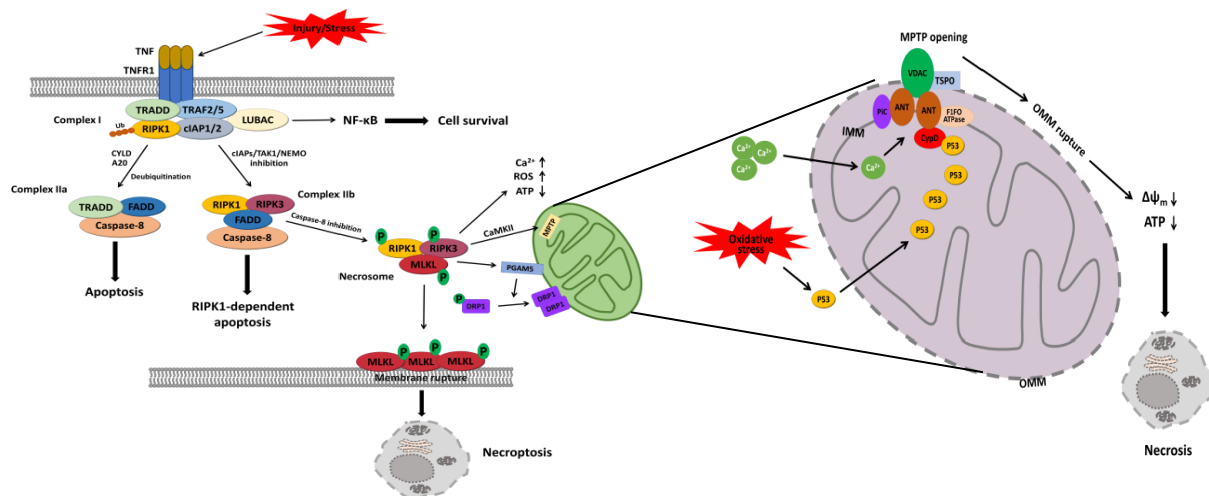


Figura 2. Necrosis por MPT-RN.
Fuente y Elaboración: Zhu & Sun, 2018.

Cuando el Ca^{2+} entra a la matriz mitocondrial, interrumpe el gradiente de protones necesario para la generación de ATP, la presencia de Ca^{2+} resulta en la presencia secundaria de agua que es impulsada osmóticamente provocando hinchazón mitocondrial, seguida de la ruptura del orgánulo y finalmente la inducción a una célula necrótica (Kers et al., 2016).

2.7 Rol de la mitocondria en la muerte celular.

Las mitocondrias podrían ser consideradas como centrales eléctricas de la célula, a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) coordina una serie de reacciones redox que están organizadas en cinco complejos de proteínas integradoras en el IMM, que es conocido como cadena transportadora de electrones (ETC) que es la encargada de transferir electrones al oxígeno; ETC bombardea protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, lo que provoca un gradiente electroquímico conocido como potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que tiene como función principal inducir una fuerza de protones utilizado por el complejo V para generar ATP desde ADP (Figura 3). El transporte de electrones a través de ETC puede filtrar la cadena y reaccionar con el oxígeno para generar ROS; los complejos I y III tienen la responsabilidad de ser generadores de ROS mitocondrial (Ribas, Ruiz, & Checa, 2016). Las mitocondrias participan en la síntesis de grupos de hierro-azufre y controlan la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , además participan en el ciclo de Krebs y en el metabolismo de los ácidos grasos a través de enzimas en la matriz (Dawson & Dawson, 2017).

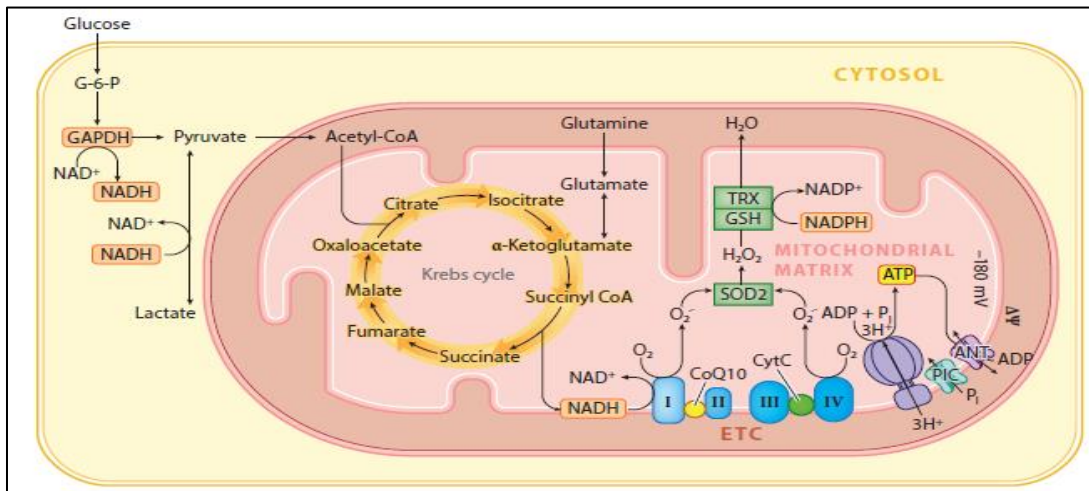


Figura 3. Funciones vitales de las mitocondrias. Fosforilación oxidativa a través del ciclo de Krebs, complejo I, complejo II, complejo III y complejo IV.

Fuente y Elaboración: (Dawson & Dawson, 2017)

Para la producción de ATP se pueden utilizar varias fuentes de carbonos como piruvato generado a partir de glucólisis, glutamina y ácidos grasos, que entrará en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en la matriz mitocondrial para generar equivalentes reductores NADH y FADH₂ transfieren sus electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC)

incrustada en el interior de la membrana mitocondrial, al contrario de la supervivencia celular, las mitocondrias son participantes cruciales en los procesos de muerte celular (Yang et al., 2016).


Para Dawson & Dawson (2017), las mitocondrias tienen a su cargo una larga lista de funciones en las células, entre estas el mantener la bioenergética y diferentes procesos metabólicos para sobrevivir, esto la ha obligado a desarrollar y perfeccionar estrategias de eliminación celular cuando ya no se puede continuar con funciones vitales; con el fin de mantener un equilibrio en la maquinaria celular. Se han identificado varias vías de muerte celular mitocondrial que se pueden resumir en una muerte celular programada que se presenta morfológicamente en apoptosis, siendo su principal finalidad el de preservar la homeostasis fisiológica de las células, en estos dos tipos de muerte las mitocondrias contribuyen a estos procesos mediante la liberación de proteínas que activan los programas de muerte celular intrínseca y finalmente una muerte celular accidental, que se caracteriza por ser incontrolada y que puede ser originada por estímulos físicos, químicos o mecánicos extremos manifestándose morfológicamente con características necróticas, en este tipo de muerte los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan debido a la interrupción completa de la función mitocondrial y al fallo energético activándose enzimas catabólicas dependientes del calcio.

La interferencia entre la muerte celular y el metabolismo celular permite otras formas de muertes; Anoikis podría ser considerada una forma más específica de apoptosis, esta es el resultado de una pérdida de las funciones metabólicas donde se induce al desprendimiento de las células de la matriz extracelular, la célula experimenta dramáticos cambios metabólicos donde existe una deficiencia en la respiración mitocondrial, captación de glucosa y vía de la pentosa fosfato, ATP y NADH se reducen y la producción de ROS aumenta (Vakifahmetoglu-Norberg, Ouchida, & Norberg, 2017).

2.8. Antineoplásicos de origen natural.

Casi el 80% de todos los medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos durante las últimas tres décadas para terapia contra el cáncer son productos naturales en sí mismos o se basan en ellos; se ha demostrado que numerosos compuestos naturales bioactivos son útiles en la prevención y la terapia del cáncer al atacar varias moléculas y vías de señalización (Bishayee & Sethi,

Tabla 2. Taxonomía de *Eriotheca ruizii*

Reino:	Plantae	
Clase:	Equisetopsida C. Agarth	
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht	
Orden:	Malvales Juss	
Familia:	Bombacoideae	
Género:	<i>Eriotheca</i> Schott & Endl	
Especie:	<i>ruizii</i>	

Fuente y Elaboración. Santos Díaz, 2018

En Ecuador están presentes tres tipos de especies, distribuidas geográficamente en laderas y colinas de los bosques secos entre 0-1000 msnm, en provincias como Loja, Guayas y Manabí. *Eriotheca ruizii* es un árbol caducifolio perteneciente a la familia Bombacaceae, es una especie endémica de nuestro país conocida popularmente con el nombre de chirigua, chirigoyo, pasayo, pasallo o jaile, dentro de sus usos medicinales están sus semillas que son molidas y se usan para curar las cataratas además de la resina que se usa para cicatrizar heridas (Aguirre, Z., 2012). Hasta la fecha, doce son las especies consideradas con actividad medicinal tanto humana como veterinaria, entre estas propiedades están las aplicaciones en piel, mal de ojo, úlceras, estreñimiento, dolor de muelas y purgante para animales (Santos Díaz, 2018).

En los estudios realizados por Maldonado Vivanco (2017), indican que *Eriotheca ruizii* genera daño genotóxico o procesos carcinógenos; es decir, *Eriotheca ruizii* interactúa con el material genético, lo que derivaría en posibles aplicaciones terapéuticas.

2.10. Ensayos de citotoxicidad.

Los niveles de viabilidad o tasas de proliferación celular son excelentes indicadores de la “salud celular”, diversos agentes físicos o químicos pueden modificar el metabolismo y provocar algún daño en las células. La citotoxicidad es uno de los más importantes indicadores para la evaluación biológica en estudios *in vitro*, este tipo de ensayos se basan en diversas funciones celulares, como permeabilidad de la membrana celular, producción de ATP, la producción de coenzimas o actividad de captación de nucleótidos,

estas pruebas nos permiten tener resultados cuantificables y fiables a corto plazo de un experimento (Aslantürk, 2018).

2.10.1. Ensayo MTS.

El ensayo MTS es un método colorimétrico que permite una cuantificación en células viables mediante la generación de un colorante de formazán que es soluble en medios de cultivos celular (“MTS Assay Kit (ab197010) | Abcam,” n.d.). Las enzimas deshidrogenasas dependientes de NADPH en células metabólicamente activas reducen el tetrazolio del MTS y generan un producto de formazán coloreado, el ensayo de viabilidad celular por MTS implica cultivar y tratar las células, agregar directamente el MTS a los pocillos e incubar de 1 a 4 horas para luego medir su absorbancia a 490-500 nm (“Ensayo de proliferación celular MTS - Proteómica creativa,” n.d.).

2.10.2 Azul Tripano.

El azul de tripano es un ensayo de viabilidad celular colorimétrico que tiñe las células muertas de color azul, las células vivas al tener la membrana plasmática intacta, pueden excluir la recepción de algunos químicos, incluyendo el azul tripano, las células muertas invariablemente han roto su membrana plasmática, independientemente del mecanismo de muerte celular, por lo tanto ellas no pueden excluir el azul tripano lo que derivará en una coloración azulada como marcaje de las mismas. El procedimiento de tinción es rápido y las células se pueden analizar en minutos, el número de células vivas (no teñidas) y muertas (azules) se puede contar utilizando un hemocitómetro en un microscopio vertical básico (Crowley, Marfell, Christensen, & Waterhouse, 2016).

2.10.3. Lactato deshidrogenasa.

Lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima tetramérica que pertenece a la familia 2-hidroxiácido oxidoreductasa, su función es aumentar la tasa de interconversión simultánea de piruvato a lactato y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)H a NAD^+ , esta reacción consiste en transferir un ion hidruro de NADH al carbono 2 del piruvato, existen cuatro genes de LDH: LDH_1 , LDH_2 , LDH_3 y LDH_4 que son isómeros H_4 y H_3P que es un $\alpha_5\beta_1$, de los cuales los isómeros L usan o producen L-lactato, considerado el principal enantiómero en vertebrados (Valvona, Fillmore, Nunn, & Pilkington, 2016)

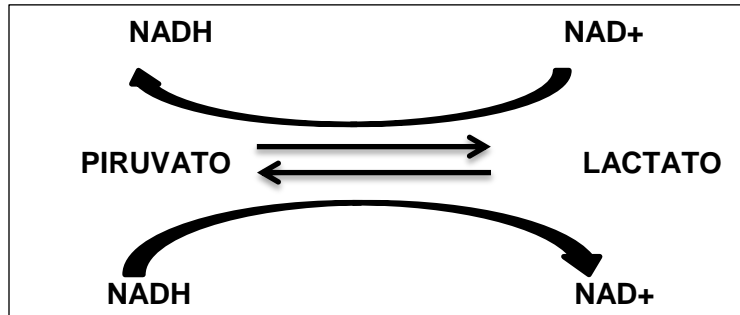


Figura 4. Reacción catalizada por lactato deshidrogenasa (LDH).

Fuente y elaboración. Valvona et al., 2016

La membrana plasmática es impermeable a la LDH a menos que pierda su integridad cuando ocurre una necrosis (Green et al., 2017). Uno de los métodos más usados para determinar algún grado de citotoxicidad es midiendo la actividad de las enzimas citoplasmáticas liberadas por las células dañadas, LDH es una enzima citoplasmática estable que se encuentra en todas las células; cuando existe daño en la membrana plasmática LDH se libera rápidamente en el sobrenadante del cultivo celular, característica importante en células que sufren necrosis y otras formas de daño celular; esta enzima puede ser cuantificada por medio del NADH producido durante la conversión de lactato a piruvato (Kumar, Nagarajan, & Uchil, 2018).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.

3.1. Obtención de los extractos.

Los extractos de *Ortiz et al. 2017* fueron obtenidos en la sección departamental de Química Básica y Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, bajo la dirección de Juan Carlos Romero PhD. Los extractos fueron solubilizados en Dimetilsulfoxido (DMSO) (SIGMA). Se partió de una concentración de 10 mg/mL y las diferentes concentraciones a utilizar fueron preparadas a partir de la concentración madre y disueltas en medio de cultivo RPMI (GIBCO) el día del tratamiento.

3.2. Cultivo Celular.

Como modelos biológicos fueron utilizadas tres líneas celulares cancerígenas: PC-3 (próstata), RKO (colon) y A-549 (pulmón), las mismas que fueron cultivadas en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (SIGMA), 1% de Antibiótico-Antimicótico (100 U/mL de penicilina G, estreptomina 100 µg/mL y Anfotericina B 25 µg/mL) (GIBCO), 100 µg/mL de L-glutamina 2mM y mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

3.4. Viabilidad celular (MTS).

Se sembraron en caja de 96 pocillos alrededor de 2.5×10^3 células PC-3 (Duplicación celular cada 18 horas), 3×10^3 células RKO y A-549 (Duplicación celular cada 24 horas) en un volumen final de 100 µL por pocillo. Las líneas celulares fueron tratadas con los distintos extractos de *Ortiz et al. 2017* (Tabla 3) a una dosis de 50 µg/mL por 48 horas. Dimetilsulfoxido al 0.5% (DMSO) fue utilizado como control negativo mientras que doxorubicina fue el control positivo a una dosis de 0.2 µM, al finalizar el tiempo del tratamiento (48 horas) se añadió 20 µL de MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay; Promega) por dos horas de incubación en oscuridad. Las absorbancias fueron obtenidas mediante un espectrofotómetro (Epoch2), a una longitud de onda de 490 nm. Los resultados fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism 5 versión 5.00

El extracto con mayor actividad biológica y la línea celular con mayor porcentaje de inhibición fueron elegidos para continuar con el desarrollo de ensayos posteriores, siendo estos el extracto Acetato de Etilo epidermis (ERACEEP) y las células PC-3 (próstata).

3.5. Concentración Inhibitoria mínima (CI₅₀).

La Línea celular tumoral PC-3 fue sembrada en caja multipocillo de 96 con un número aproximado de 2.5×10^3 células en un volumen final de 100 μL por pocillo. Las concentraciones del extracto ERACEEP empleadas para este ensayo fueron de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una duración de 48 horas de tratamiento; como control negativo se usó DMSO al 0.5% y doxorrubicina como control positivo a una dosis de 0.2 μM . De la misma forma, finalizado el tratamiento se aplicó 20 μL de MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay; Promega) por dos horas de incubación en oscuridad. Los resultados fueron obtenidos del mismo modo que en el método anterior.

3.6. Viabilidad celular por Azul Tripano.

Se sembró alrededor de 864 mil células PC-3 en cajas de 6 pocillos en un volumen final de 3 mL, las concentraciones del extracto ERACEEP fueron de 15, 30 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$; como control negativo se usó (DMSO) al 0.5% y como control positivo Doxorrubicina (1 μM), con un tiempo 48 horas de tratamiento; se realizó un conteo por medio de la cámara neubauer, diferenciando las células muertas con coloración azul de la vivas que tiene la membrana intacta en cuatro cuadrantes de la cámara.

3.7. Lactato deshidrogenasa.

Mientras fueron realizados los ensayos antes mencionados, el medio en el que se mantenían las células con sus respectivos tratamientos fueron centrifugados y conservados (1mL) como muestra a una temperatura de -80°C . Esto facilitó realizar la medición de LDH por medio de un espectrofotómetro (Epoch2). El reactivo utilizado fue LDH SCE mod., prueba liquiUV, deshidrogenasa láctica (EC 1.1.1.27) (Human código 12214), tomando como protocolo el procedimiento dos de las especificaciones adjuntas al reactivo. Previamente a probar las muestras se realizaron curvas de calibración de acuerdo a las condiciones del laboratorio.

Las muestras de los controles y de las diferentes dosis fueron examinadas tomando 2 μL de las mismas y añadiendo 100 μL del reactivo de trabajo, las absorbancia fueron medidas luego de 1, 2 y 3 minutos, a una longitud de onda de 334 nm. Las lecturas de las absorbancias resultantes fueron calculadas por medio de la media de cambio de

absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min.}$) y el análisis estadístico fue realizado en GraphPad Prism 5 versión 5.00

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Viabilidad celular por MTS.

Los diferentes extractos de *Eriotheca Ruizii* fueron probados en tres líneas celulares: cáncer de próstata (PC3), pulmón (A-549) y colon (RKO). Como se indica en la Tabla 3, el extracto de acetato de etilo epidermis fue el que mayor porcentaje de inhibición presentó en las tres líneas tumorales, por lo que los ensayos posteriores se realizaron con este extracto. (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los extractos de *Eriotheca Ruizii* Sobre tres líneas celulares tumorales a dosis de 50 µg/mL por 48 horas.

Extracto	Código	Porcentaje de inhibición 50 µg/mL		
		Línea Tumoral		
		PULMÓN A-549	PRÓSTATA PC-3	COLON RKO
Acetato de etilo epidermis	ERACEEP	68,59±2,65	89,61±0,08	60,52 ± 1,10
Epidermis Metanol	EP-MET01	S.A	48,25±2,40	4,79
Córtex blanco acetato de etilo	CB-ACT02	S.A	S.A	S.A
Córtex blanco metanol	CB-MET02	1,70±1,70	55,03±3,18	S.A
Córtex marrón acetato de etilo	CM-ACT03	9,94±8,48	S.A	S.A
Córtex marrón metanol	CM-MET04	17,56±8,10	41,22±5,28	S.A
Pulpa blanca acetato de etilo	PB-ACT05	4,09±4,09	28,94±3,19	S.A
Pulpa blanco metanol	PB-MET03	S.A	10,50±3,08	S.A
Pulpa marrón metanol	PM-ACT04	S.A	S.A	S.A
Pulpa marrón metanol	PM-MET05	S.A	19,40±3,86	S.A

Los resultados expuestos representa la media y su error estándar por triplicado de dos experimentos independientes. S.A= Sin Actividad.

Fuente y Elaboración: Autor

4.2. Concentración Inhibitoria Mínima (CI₅₀).

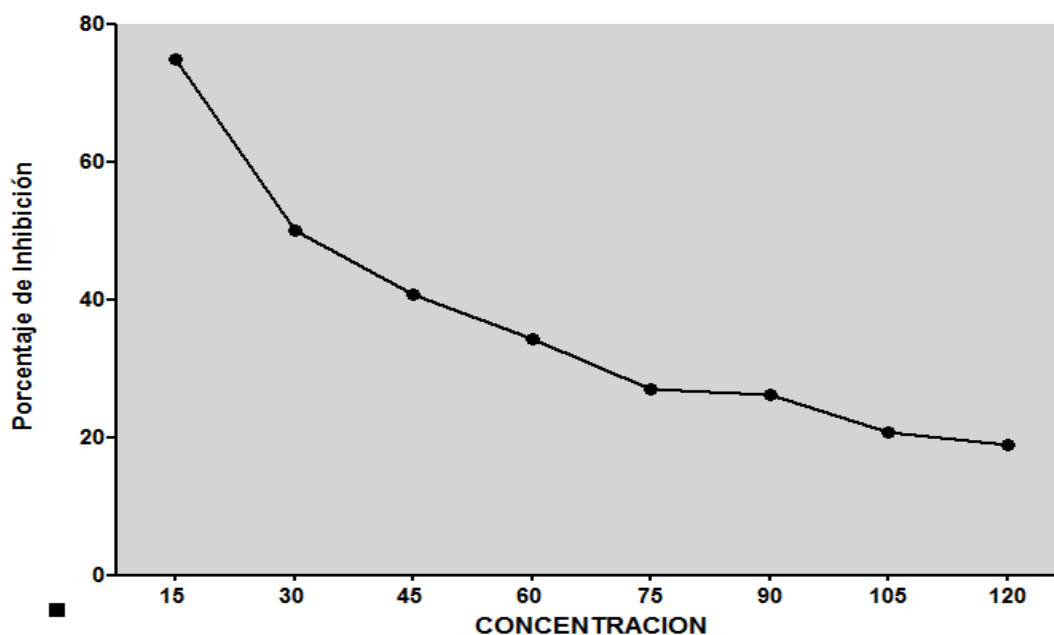


Figura 5. Porcentaje de inhibición (IC₅₀). Células PC-3 expuestas 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 µg/mL del extracto de *Oriza ázula* (ERACEEP) durante 48 horas.

Fuente y Elaboración: Autor

La CI₅₀ fue determinada en la línea celular PC-3 que fue la que tuvo mayor sensibilidad al extracto, a distintas concentraciones (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 µg/mL). Existe una disminución considerable según la dosis aumenta, la concentración inhibitoria del 50% de crecimiento es de 33,16 µg/mL a 48 horas de exposición del extracto (Figura 5).

4.3 Viabilidad celular por Azul de Tripano.

Se escogieron tres dosis cercanas a la IC₅₀ para continuar con el ensayo de exclusión por azul tripano. A las 48 horas de tratamiento se determinó que la disminución del número de células a dosis de 15 µg/mL fue de 4.9×10^5 , a 30 µg/mL fue de 3.6×10^5 y a 45 µg/mL fue de 1.6×10^5 (Figura 6A). En cuanto al porcentaje de viabilidad fue de 88.80%, 79.61% y 69.60% respectivamente (Gráfica 6B).

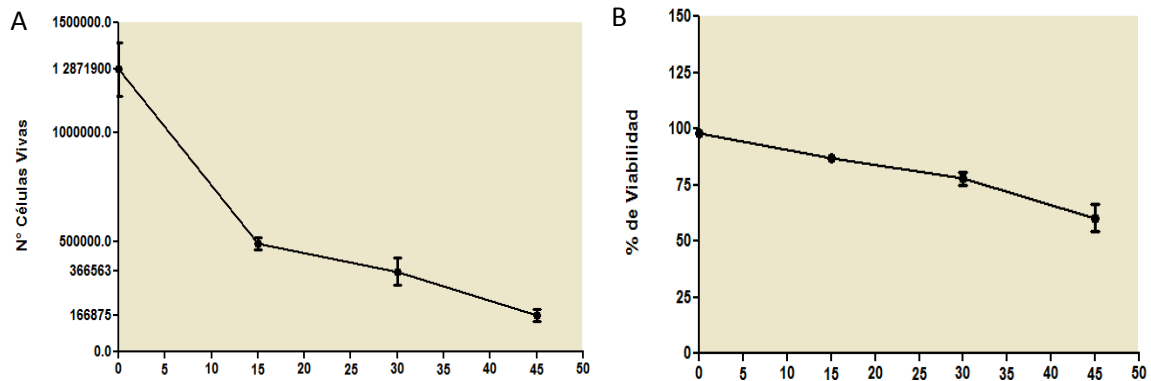


Figura 6. Viabilidad celular por azul tripano. Línea celular PC-3 a 48 horas de exposición, media \pm E.E. A). Número de células vivas. B) Porcentaje de viabilidad.

Fuente y Elaboración: Autor

El aumento de restos celulares es dependiente de la dosis (Figura 6).

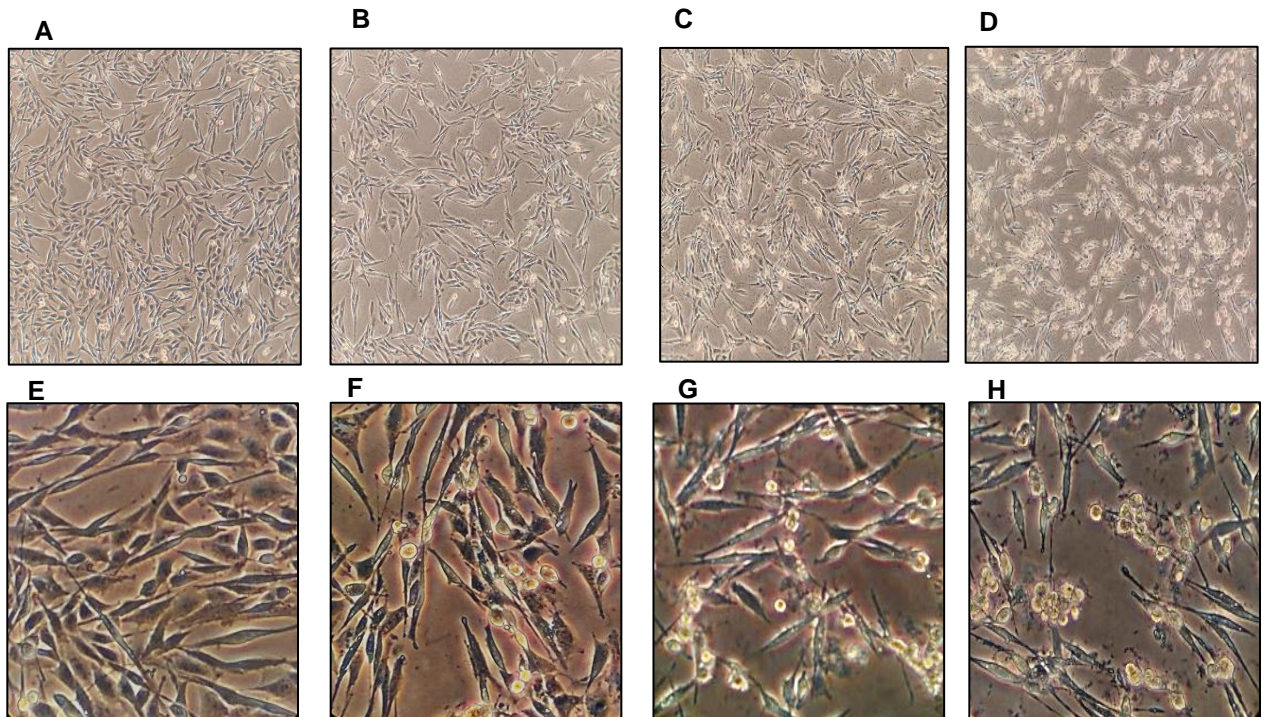


Figura 7. Efecto anti proliferativo del extracto de Eriotheca ruizii (ERACEEP) sobre células PC-3 en tres diferentes dosis durante 48 horas. **A) Control negativo (0.5% DMSO) B) 15 μ g/mL C) 30 μ g/mL D) 45 μ g/mL,** microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Fase Ph2 Aumento: M Objetivo: 40x. **E) Control negativo (0.5% DMSO) F) 15 μ g/mL G) 30 μ g/mL H) 45 μ g/mL visualizadas en microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Fase Ph2 Aumento: M Objetivo: 60x**

Fuente y elaboración: Autor

4.5 Lactato Deshidrogenasa.

Las dosis empleadas en el ensayo de lactato deshidrogenasa fueron de 15, 30 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El control negativo presentó una liberación de LDH de 39.41 U/I, mientras que existió un incremento de 56.7, 65.31 y 71.15 U/I con respecto a las dosis mencionadas; sin embargo, no son estadísticamente significativas. El control positivo para necrosis con un 392 U/I y apoptosis 90.06 U/I, lo que puede indicarnos que el extracto no produce necrosis como tal (Figura 8).

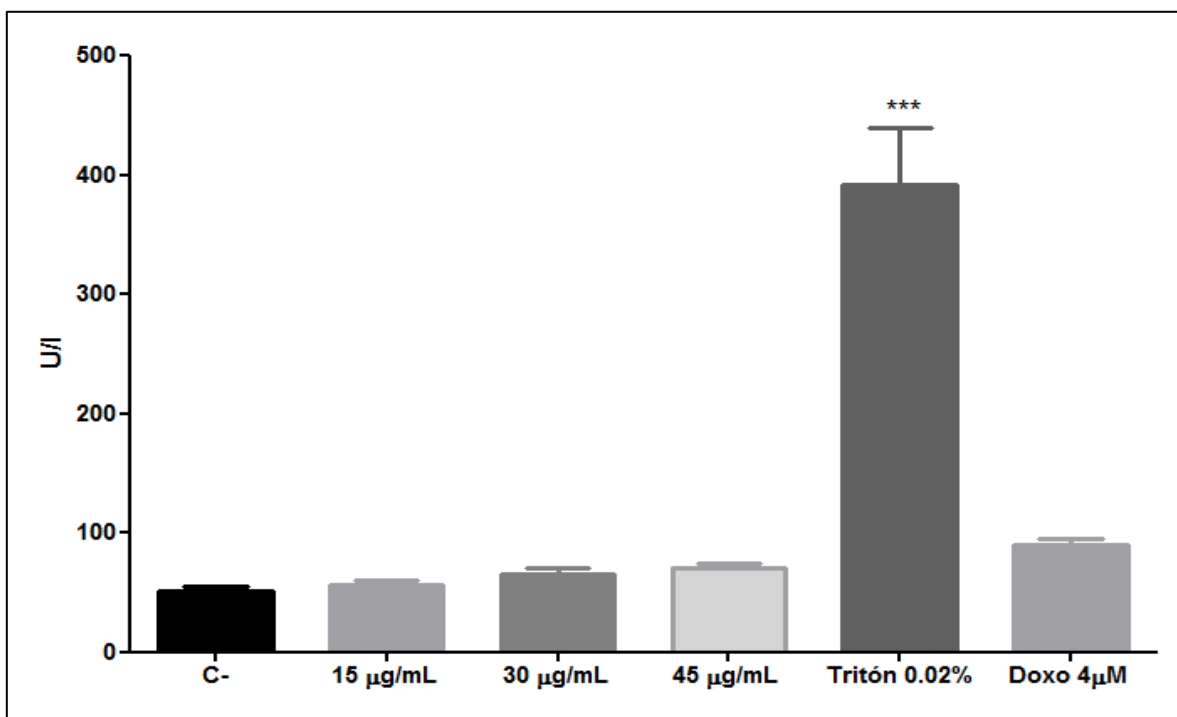


Figura 8. Medición de lactato deshidrogenasa en medios de cultivo en línea celular PC-3. Los barras representan la cantidad de LDH en U/I en comparación con el control negativo, utilizando ANOVA y prueba posterior de Dunnet (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $P < 0.0001$) cada * representa su significancia.

Fuente y Elaboración: Autor

4.6 Porcentaje de Inhibición celular por MTS de 12 fracciones del extracto de *Eriotheca ruizii* acetato de etilo epidermis (ERACEEP).

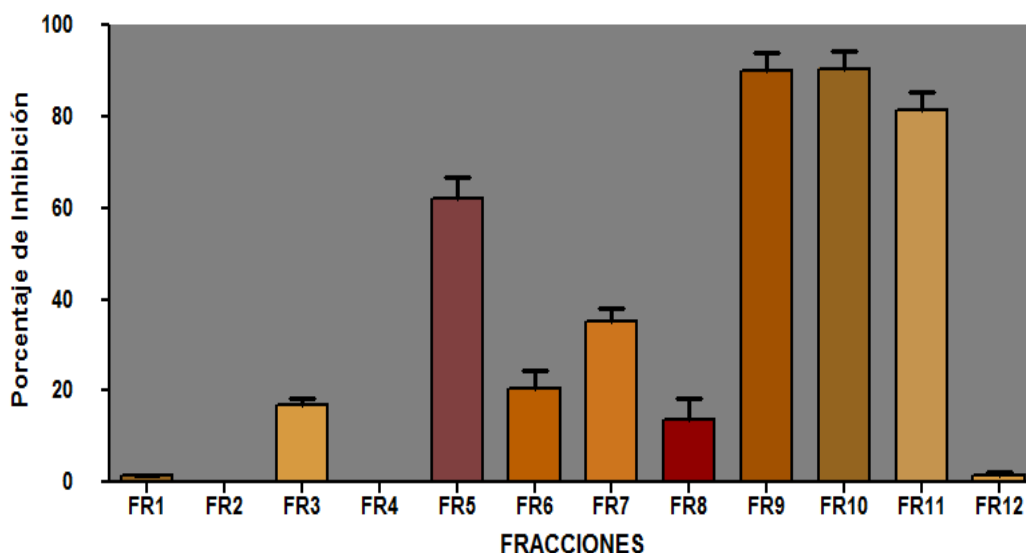


Figura 9. Porcentaje de muerte. Células de cáncer de próstata expuestas a 12 fracciones del extracto de *Eriotheca ruizii* (ERACEEP) a una dosis de 50 µg/mL durante 48 horas. Los datos representan la media y su error estándar de dos experimentos independientes y por triplicado de cada fracción del extracto.

Fuente y Elaboración: Autor.

El extracto activo, ERACCEP, fue separado en 12 fracciones mediante cromatografía en columna abierta utilizando mezclas de disolventes Hexano, Acetato de Etilo y Metanol, las cuales también fueron probadas mediante el ensayo de viabilidad celular por MTS. En la figura 9, se puede destacar que las fracciones 9 (Hex:AcOEt 60:40) 90.02%, 10 (Hex:AcOEt 50:50) 90.51% y 11 (AcOEt 100) 81.54% son las que presentan mayor actividad inhibitoria seguidas de la fracción 5 (Hex:AcOEt 8:2) con 61.92% y la fracción 7 (Hex:AcOEt 7:3) con 35.20%.

Capitulo V. DISCUSIÓN.

Lograr determinar el grado de citotoxicidad que pueden ejercer ciertos compuestos fitoquímicos en líneas celulares tumorales nos permite nuevas posibilidades en terapias antineoplásicas (L. Romero, 2017). El trabajo conjunto con el laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja hacen posible establecer el grado de citotoxicidad que los extractos de *Óñí~ãã* presentan en líneas celulares tumorales.

Los resultados obtenidos en esta investigación determinaron que el extracto de acetato de etilo de epidermis de *Óñí c@&ãã~ãã* (ERACEEP) presenta un porcentaje de inhibición celular considerable en las tres líneas celulares tumorales probadas: PC-3 (próstata), A-549 (pulmón) y RKO (colon) (Tabla 3); sin embargo, afirmar que únicamente este extracto posee actividad citotóxica, sería excluir la posible potencialidad del resto de extractos en otras líneas celulares tumorales no ensayadas. En los estudios realizados por C. Romero, (2017) se comprobó que *Óñí~ãã* logra ejercer diferentes efectos químicos sobre otras plantas, proceso conocido como alelopatía y que esta actividad biológica podía variar dependiendo de las diferentes partes del tubérculo. La capacidad de dominio sobre otras especies vegetales radica en los metabolitos secundarios que esta posee en diferentes partes de la raíz, esto significaría que *Óñí~ãã* podría presentar una importante fuente de compuestos probablemente citotóxicos en algunas líneas celulares tumorales y con diferentes tipos de procesos de muerte.

Los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de viabilidad celular comprobaron que la misma es dependiente de la dosis (Figura 5), si bien estas deducciones nos permiten ver un panorama cuantitativo en cuanto al efecto de ERACEEP; esta no nos permite dilucidar en algún tipo de muerte específico, pero sí establecer un grado de citotoxicidad. Por otro lado, los metabolitos encontrados en las raíces de las plantas del género *Óñí c@&ãã* han presentado actividad diurética, propiedades eméticas, astringente, actividad antifúngica y de citotoxicidad (Weerapreeyakul, Junhom, Barusrux, & Thitimetharoch, 2016), no se han realizados estudios *ññãã* que determinen algún tipo de muerte específico sobre líneas celulares tumorales.

A pesar de presentar un incremento en la presencia de restos celulares (figura 7), ERACEPP no mostró significancia estadística en ensayos de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) contenida en los medios de tratamiento (Figura 9). La prueba más utilizada para establecer un proceso necrótico es la liberación de LDH por rotura de

membrana; en este caso, al no existir la presencia del mismo podríamos excluir este proceso de necrosis clásica, se debe establecer la presencia de otros tipos de muerte.

Estos resultados nos permiten discernir que el extracto de Acetato de Etilo de *Ortiz et al.* podría inducir de alguna forma un tipo de muerte controlada como la necrosis dependiente de la permeabilidad mitocondrial donde la apertura de un canal en la membrana interna (IMM) provocaría un desorden en la estructura y la función mitocondrial debido a una sobrecarga de Ca^{2+} (Zhu & Sun, 2018), interrumpiendo el gradiente de protones necesario para generar ATP, provocando la hinchazón mitocondrial, la ruptura del orgánulo y finalmente la inducción a su muerte (Kers et al., 2016).

Sin embargo, en los estudio realizados por Hernández-Fuentes, *et al.* (2019) al evaluar los parámetros bioenergéticos de las mitocondrias aisladas de hígado de rata (RLM), determinaron que es posible que ciertos productos de origen vegetal puedan interferir en los mecanismos de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias, como en el caso de la Rotenona una sustancia de origen vegetal obtenido de plantas del género *Öllä Állä* catalogada como ligeramente toxica en el ser humano, que actúa sobre el complejo I o NADH deshidrogenasa, inhibiendo la oxidación de todos los sustratos dependientes de NAD, y en cierta forma permitiendo un colapso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) derivando en la muerte de la célula si estos complejos no son restablecidos.

Sin embargo, *Öllä Állä* podría ejercer algún tipo de efecto tóxico a nivel mitocondrial, al igual que Rotenona actuando en el complejo I, lo que inhibiría cualquier sustrato dependiente de NAD, esto justificaría la poca presencia de lactato deshidrogenasa en el medio celular. LDH al ser una oxidoreductasa necesitará de la oxidación de NADH a NAD^+ para poder realizar la reacción, pero si NAD es inhibida por los argumentos anteriormente mencionados, este proceso no se podría dar.

Se ha demostrado la presencia de moléculas bioactivas en diversos organismos marinos como las cianobacterias *Úllä Állä* o algas verdeazuladas que tienen actividad biológica contra células cancerígenas; de estas se han aislado compuestos como las portoamidias que poseen péptidos cíclicos las cuales ejercen efectos alelopáticos en algas *Öllä Állä*. Estos además tienen la capacidad de inducir toxicidad en células cancerosas humanas en líneas celulares de carcinoma de colon (RKO, HCT116), adenocarcinoma colon-rectal (HT-29) y osteosarcoma (MG-63), interfiriendo en la cadena

respiratoria mitocondrial, específicamente en el complejo I NADH deshidrogenasa y en la vía pentosa fosfato (Ribeiro et al., 2017).

Algunos compuestos fenólicos (CF) han sido clasificados como valiosos aleloquímicos presentes en la rizosfera de diferentes especies, a estos se les atribuye el poder atacar a nivel de diferentes parámetros fisiológicos a otras plantas, otorgándole capacidades fitotóxicas, los efectos pueden ser positivos o negativos según la concentración de compuestos fenólicos para la planta que los reciba; estudios de [1] e [2] han demostrado que los CF, especialmente los flavonoides, tienen la capacidad de inducir algún tipo de citotoxicidad en líneas celulares tumorales ya sea “apagando” ROS, induciendo actividades apoptóticas, evitando la proliferación de células cancerosas o bloqueando diferentes ciclos celulares (Rasouli, Farzaei, Mansouri, Mohammadzadeh, & Khodarahmi, 2016).

C. Romero (2017) ha demostrado que existen un sinnúmero de efectores químicos en el tubérculo de esta planta que le permiten a *O. coccinea* tener la capacidad de promover o inhibir la germinación de otra por medio de diferentes aleloquímicos. Sin embargo, su efecto citotóxico podría estar influenciado por uno o por varios metabolitos del mismo y se lo podría comprobar aislando cada uno de ellos.

El éxito de las plantas en el descubrimiento de nuevos medicamentos radica quizá en los metabolitos secundarios (MS) que produce, ya sea como mecanismo de protección, de señalización o comunicación en los diferentes ambientes que tiene que sobrevivir (Wink, 2015). La investigación realizada por Santos Díaz (2018) demostró que en el tubérculo de *O. coccinea* existen diferentes fitoconstituyentes como alcaloides, terpenos, flavonoides, quinonas y taninos, propios de la familia *Óxido de la*. Además Maldonado Vivanco, (2017), en células sanas CHO-K1, demostró que no existe algún tipo de daño a nivel de ADN por parte de los extractos *O. coccinea*. Esto significaría que el extracto ERACEEP induce un grado de citotoxicidad en células cancerígenas sin alterar el ADN.

Está claro que *O. coccinea* tiene una valiosa actividad tóxica frente a células tumorales cancerígenas. A pesar de ello, los estudios para determinar el potencial fitoquímico que tiene son escasos. El no generar un daño genotóxico nos da la pauta para un posible nuevo tratamiento y más si este implica un tipo de muerte celular controlada, esto hace necesario continuar con el proceso investigativo para poder esclarecer la ruta que toma para inhibir las células cancerígenas.

CONCLUSIONES

El extracto de la epidermis de *Oryzias latipes* en acetato de etilo (ERACEEP) tiene actividad citotóxica dependiente de la dosis en líneas celulares tumorales de cáncer de próstata PC-3, cáncer de colon RKO y cáncer de pulmón A-549.

La línea celular más sensible al extracto ERACEEP fue la de cáncer de próstata, al igual que las fracciones 9 10 y 11 del mismo extracto.

El extracto ERACEEP en las diferentes líneas tumorales no libera LDH, uno de los marcadores más relevantes de muerte celular por necrosis.

RECOMENDACIONES

Considerar el uso de nuevas técnicas moleculares para determinar otros tipos de muerte celular y abrir el campo investigativo a más mecanismos de muerte celular existentes.

Evaluar la actividad citotóxica en otras líneas celulares diferentes a las usadas en esta investigación, además de probar nuevos extractos obtenidos de diferentes partes del tubérculo.

- Professor, A. (2015). Lung Cancer Detection Using Artificial Neural Network & Fuzzy Clustering. *Journal of Intelligent and Fuzzy Systems*, 1. <https://doi.org/10.17148/IJARCCCE.2015.4386>
- Kers, J., Leemans, J. C., & Linkermann, A. (2016). An Overview of Pathways of Regulated Necrosis in Acute Kidney Injury. *Journal of Intensive Care Medicine*, 31(3), 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.03.002>
- Kristeleit, H., Enting, D., & Lai, R. (2011). Basic science of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 3(11), S319–S321. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(11\)70186-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(11)70186-1)
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Journal of Cellular Biochemistry*, 143(6), 465–468. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Maldonado Vivanco, V. K. (2017). *Universidad Técnica Particular De Loja*. Retrieved from [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21492/1/Maldonado Vivanco Valeria Katherine.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21492/1/Maldonado%20Valeria%20Katerine.pdf)
- Merchán, L. A. (2018). DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE PRÓSTATA, 1.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Journal of Clinical Oncology*, 26(5), 584–594. <https://doi.org/10.4065/83.5.584>
- Moses, C., Garcia-bloj, B., Harvey, A. R., & Blancafort, P. (2018). ScienceDirect Hallmarks of cancer : The CRISPR generation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 143(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.01.002>
- MTS Assay Kit (ab197010) | Abcam. (n.d.). Retrieved May 7, 2019, from <https://www.abcam.com/mts-assay-kit-cell-proliferation-colorimetric-ab197010.html#top-329>
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 1916–1956-3. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
- Newton, K., & Manning, G. (2016). Necroptosis and Inflammation, (February), 1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014830>
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi, & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 143(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Preet, A., & Agrawal, S. (2019). A REVIEW OF THE MOLECULAR MECHANISM OF APOPTOSIS AND ITS ROLE IN PATHOLOGICAL CONDITIONS. *Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 10(2), 124-131. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2019.10.2.b124-131>

Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., ... Nelson, P. S. (2016). Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(1), 11-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1603144>

Rasouli, H., Farzaei, M. H., Mansouri, K., Mohammadzadeh, S., & Khodarahmi, R. (2016). Plant cell cancer: May natural phenolic compounds prevent onset and development of plant cell malignancy? A literature review. *Trends in Plant Science*, 19(1), 14-21. <https://doi.org/10.3390/molecules21091104>

Reddivari, L., Charepalli, V., Radhakrishnan, S., Vadde, R., Elias, R. J., Lambert, J. D., & Vanamala, J. K. P. (2016). Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1254-2>

Ribas, V., Ruiz, C. G., & Checa, J. C. F. (2016). Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0106-5>

Ribeiro, T., Lemos, F., Preto, M., Azevedo, J., Sousa, M. L., Leão, P. N., ... Urbatzka, R. (2017). Cytotoxicity of portoamides in human cancer cells and analysis of the molecular mechanisms of action. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(1), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188817>

Romero, C. (2017). *Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales en la Universidad Técnica Particular De Loja*.

Romero, L. (2017). *Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales en la Universidad Técnica Particular De Loja*.

Santos Díaz, M. S. (2018). *Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales en la Universidad Técnica Particular de Loja*.

Soekmadji, C., Rockstroh, A., Ramm, G. A., Nelson, C. C., & Russell, P. J. (2017). Extracellular vesicles in the adaptive process of prostate cancer during inhibition of androgen receptor signaling by enzalutamide. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(23-24), 1-24. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600427>

Tiwary, B. K., Bihani, S., Kumar, A., Chakraborty, R., & Ghosh, R. (2015). The in vitro cytotoxic activity of ethno-pharmacological important plants of Darjeeling district of West Bengal against different human cancer cell lines, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0543-5>

Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>

Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016). The Regulation and

Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology*, 26(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/bpa.12299>

Weerapreeyakul, N., Junhom, C., Barusrux, S., & Thitimetharoch, T. (2016). Induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by extracts of *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr. and *Diospyros castanea* (Craib) Fletcher. *Chinese Medicine*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13020-016-0091-z>

Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2, 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>

Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., Haese, J. A. N. G. D., Philippov, P. P., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *Cellular Physiology*, 231(May 2015), 2570–2581. <https://doi.org/10.1002/jcp.25349>

Zhu, H., & Sun, A. (2018). Programmed necrosis in heart disease: Molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 116, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.01.018>