



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Efecto Citotóxico de seco-ent-kauranos de *Croton micans*
en células PC-3 (cáncer de próstata) y HeLa (cáncer de
útero): Combinación con compuestos seco-ent-kauranos y
fármacos antitumorales**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central
de Venezuela, por la Br. Jennire P. Vivas R.
Como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología Tutor: Dr. Francisco
Arvelo

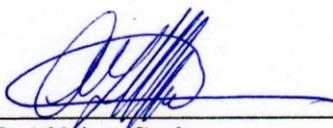
CARACAS, VENEZUELA

JUNIO 2010

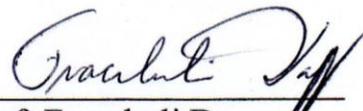
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br. JENNIRE VIVAS**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Jennire Vivas, C.I: 18009110, titulado “**Efecto citotóxico de seco-ent-kauranos de *Croton micans* en células PC3 (cáncer de próstata) y HeLa (cáncer de útero): Combinación con compuestos seco-ent-kauranos y fármacos antitumorales**”, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

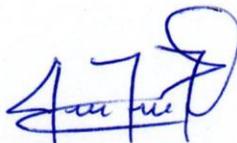
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dieciocho (18) días del mes de Junio del año 2010, dejando constar que el Prof. Francisco Arvelo actuó como coordinador del jurado examinador.



Prof. Alírica Suárez



Prof. Fracehuli Dagget



Prof. Francisco Arvelo
(Tutor)

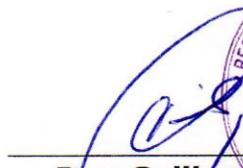


Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 07/07/2010, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller **Vivas R., Jennire P.**, titular de la cédula de identidad No. 18.009.110; titulado: "Efecto citotóxico de Seco-ent- Kauranos de Croton micans en células PC-3 (cáncer de próstata) y HeLa (cáncer de útero) Combinación con compuestos seco-ent-Kauranos y fármacos antitumorales."; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los veintidós días del mes de septiembre del año dos mil diez.



Dra. Guillermina Alonso
Presidenta del

Consejo de la Escuela de Biología

GA/br.-

Índice General

<i>Índice de Figuras</i>	IV
<i>Índice de Tablas</i>	VII
<i>Resumen</i>	IX
<i>1. Introducción</i>	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Cáncer a nivel mundial.....	3
1.3 Cáncer en Venezuela	6
1.4 Cáncer de Próstata	8
1.4.1 Cáncer de próstata en Venezuela	10
1.5 Cáncer de cérvix	12
1.5.1 Cáncer de cérvix a nivel mundial	16
1.5.2 Cáncer de cérvix en Venezuela	17
1.6 Terapias contra el cáncer	18
1.7 Estudios farmacológicos	25
<i>2 Antecedentes</i>	27
2.1 Grupo Kaurano en la Terapia contra el Cáncer	28

3	<i>Objetivos</i>	32
	3.1 Objetivo General	32
	3.2 Objetivos Específicos	32
4	<i>Materiales y Métodos</i>	33
	4.1 Material Biológico	33
	4.1.1 Líneas celulares	33
	4.1.2 Productos naturales	34
	4.2 Metodología.....	34
	4.2.1 Mantenimiento del cultivo celular.....	34
	4.2.2 Ensayo de citotoxicidad	36
	4.2.3 Curvas de crecimiento	38
	4.2.4 Combinación (productos naturales+ fármacos antitumorales).....	39
5	<i>Resultados</i>	41
	5.1 Determinación de la actividad citotóxica de los seco-ent-kauranos sobre las líneas tumorales y células control.....	41
	5.2 Viabilidad Celular frente a los productos naturales.....	45
	5.3 Curvas de Proliferación celular.....	55
	5.4 Ensayo de adherencia celular. Reversibilidad de la viabilidad celular involucrada.....	58

5.5	Índices de Selectividad.....	64
5.6	Combinaciones de compuestos seco- ent-kauranos y fármacos antitumorales. Determinación de Índices de Combinación (IC).....	66
5.6.1	Combinaciones sobre células PC3.....	66
5.6.2	Combinaciones sobre células HeLa.....	71
5.6.3	Combinaciones sobre células Fibroblastos.....	75
6	<i>Discusión</i>	79
6.1	Viabilidad celular frente a los productos naturales.....	81
6.2	Proliferación celular.....	83
6.3	Adherencia celular. Reversibilidad de la viabilidad celular involucrada.....	85
6.4	Selectividad de los kauranos evaluados.....	87
6.5	Relación estructura- actividad de los kauranos.....	88
6.6	Combinaciones de compuestos seco-ent-kauranos y fármacos antitumorales.....	92
6.6.1	Combinaciones sobre células PC3.....	94
6.6.2	Combinaciones sobre células HeLa.....	96
6.6.3	Combinaciones sobre las células fibroblastos.....	97
7	<i>Conclusiones</i>	98
8	<i>Recomendaciones</i>	102
9	<i>Bibliografía</i>	103

Índice de Figuras

Fig. 1. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo en el año 2006-2007.....	4
Fig. 2 Estructura del Aparato reproductor masculino. Comparación de la próstata normal y crecida.....	8
Fig. 3. Tasa de mortalidad promedio del quinquenio 2001-2005. Cáncer de Próstata, por entidades federales de Venezuela.....	11
Fig. 4. Estructura del aparato reproductor femenino en el cual se muestra la región donde se desarrolla el cáncer de cérvix.....	12
Fig. 5. Estructura interna de la cérvix y vagina.....	13
Fig. 6. Diferentes etapas del desarrollo de cáncer de cérvix.....	15
Fig. 7. Tasa de incidencia promedio del quinquenio 2001-2005. Cáncer de cuello uterino, por entidades federales de Venezuela.....	17
Fig. 8. Estructura química de Doxorubicina.....	20
Fig. 9. Estructura química de Mitomicina C.....	21
Fig. 10. Primer mecanismos de acción de un agente alquilante.....	22
Fig. 11. Segundo mecanismo de acción de un agente alquilante.....	23
Fig. 12. Tercer mecanismo de acción de un agente alquilante.....	23
Fig. 13. Esqueleto de un diterpeno ent- kaurano.....	29
Fig. 14 Ruta biosintética del ent- kaurano.....	30
Fig. 15. Ruta biosintética de las giberelinas a partir del ent- kaurano.....	31

Fig. 16. Esquema de la obtención de las concentraciones a utilizar de los fármacos con los productos naturales.....	39
Fig. 17. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 125.....	48
Fig. 18. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 128.....	49
Fig. 19. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 141.....	50
Fig. 20. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 145.....	51
Fig. 21. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 147.....	52
Fig. 22. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 150.....	53
Fig. 23. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente a los fármacos antitumorales.....	54
Fig. 24. Efecto del EMCM 125 y el EMCM 128 en la proliferación celular.....	57
Fig. 25. Desarrollo de las células PC3 con y sin exposición de los compuestos a su CI_{50}	61
Fig. 26. Desarrollo de las células HeLa con y sin exposición de los compuestos a su CI_{50}	62
Fig. 27. Desarrollo de las células Fibroblastos con y sin exposición de los compuestos a su CI_{50}	63

Fig. 28. Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los productos naturales y con el fármaco antitumoral Adriamicina sobre la línea celular PC3.....	69
Fig. 29. Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre la línea tumoral PC3.....-	70
Fig. 30. Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los productos naturales y con el fármaco antitumoral Mitomicina C sobre la línea celular HeLa.....	73
Fig. 31. Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre la línea HeLa.....	74
Fig. 32. Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los productos naturales y con los fármacos antitumorales sobre los fibroblastos dérmicos humanos.....	77
Fig. 33. Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre los fibroblastos.....	78

Índice de tablas

Tabla 1. Cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela para ambos géneros en el año 2005.....	6
Tabla 2. Diez primeras causas de mortalidad por cáncer en Venezuela para el año 2005. Fuente: Registro Central de Cáncer Min Salud. 2006.....	7
Tabla 3. Estructuras químicas y Pesos moleculares de los compuestos seco-ent-kauranos.....	35
Tabla 4. Rangos de IC referidos para la selección de los patrones de combinación.....	40
Tabla 5. Valores de concentraciones inhibitorias 50% (CI ₅₀) obtenidos para cada línea tumoral utilizada y para células control.	44
Tabla 6. Valores de concentraciones inhibitorias (CI ₅₀) de los controles utilizados específicos para cada línea tumoral y para las células control.....	44
Tabla 7. Valores de Índices de selectividad obtenidos por el grupo de seco-ent-kauranos sobre las líneas tumorales PC3 y HeLa.....	65
Tabla 8. Valores de Índices de selectividad obtenidos por fármacos antitumorales en las líneas tumorales PC3 y HeLa.....	65
Tabla 9. Índices de combinación (IC) entre los compuestos seco-ent-kauranos y el fármaco antitumoral Adriamicina obtenidos para la línea tumoral PC3.....	68

Tabla 10. Índices de combinación (IC) entre los compuestos seco-ent-kauranos y el fármaco antitumoral Mitomicina C obtenidos para la línea tumoral HeLa.....72

Tabla 11. Índices de combinación (IC) entre los compuestos seco-ent-kauranos y los fármacos antitumorales obtenidos para las células control (fibroblastos).....76

Resumen

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo, al igual que el cáncer de cérvix. Los tratamientos clásicos para el cáncer se enmarcan en el campo de la cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo se ha observado que algunos tumores no responden a los fármacos, mientras que otros pueden desarrollar resistencia a medida que el tratamiento es aplicado al paciente. Por esta razón se ha mostrado un gran interés por el uso de plantas como agentes antitumorales.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la actividad citotóxica de productos naturales aislados de la especie *Croton micans*, pertenecientes al grupo seco-ent- kauranos, en células de cáncer de próstata y cáncer de útero, así como la combinación de estos productos, y con fármacos antitumorales que son utilizados en los tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad con líneas tumorales PC3 (próstata), HeLa (útero) y fibroblastos dérmicos. El ensayo empleado, MTT, (Mosmann, 1983), luego de las 72 horas de incubación permite calcular los valores de concentración inhibitoria (CI₅₀) específica para cada uno de los productos naturales sobre las líneas celulares. Además se obtuvieron los índices de selectividad, así como las relaciones dosis- respuesta y las combinaciones entre los productos naturales y los fármacos antitumorales Adriamicina y Mitomicina C.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan que el grupo de seco-ent-kauranos evaluados presenta una marcada citotoxicidad sobre las líneas tumorales PC3 y HeLa con respecto a las células control, siendo el EMCM 125 en PC3 y HeLa, y el EMCM 128 y EMCM 145 los que poseen mayor efecto sobre las PC3. En relación a las combinaciones, los resultados reflejan un sinergismo en los compuestos evaluados cuando son combinados entre sí, contrario a esto, cuando los kauranos son combinados con los fármacos antitumorales, se observa un antagonismo fuerte en los diferentes tipos celulares. En base a los resultados de este trabajo se puede inferir que los compuestos pertenecientes al grupo seco-ent- kauranos aislados de *Croton micans* muestran una inhibición sobre la viabilidad celular en las líneas tumorales PC-3 y HeLa, a medida que aumenta la dosis administrada de los compuestos, del mismo modo el efecto citotóxico de las combinaciones entre los compuestos es más potente sobre las células en comparación con la acción de cada uno individualmente.

1. Introducción

El cuerpo está compuesto de muchos tipos de células, las cuales normalmente, crecen y se dividen para originar otras que sean necesarias para mantener la homeostasia. Algunas veces, este proceso ordenado, se descontrola y nuevas células se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita.

1.1 Cáncer

En una publicación de la Sociedad Americana del Cáncer, realizada por Mackay, al conjunto de células formadas en exceso por el organismo formando una masa de tejido se define como *tumor*. Los tumores se pueden originar en cada uno de los distintos tipos de tejidos y pueden ser benignos o malignos. Los primeros generalmente pueden removerse, y en la mayoría de los casos no reaparecen. Lo más importante, las células de tumores benignos no se extienden a otras partes del cuerpo, y son rodeadas por un tejido que impide que las células se dispersen. (Mackay y col., 2001)

En los tumores malignos las células se dividen sin control y pueden originar tumores a distancia, conociéndose esto como *cáncer*. Los tumores malignos se pueden clasificar en dos categorías, los llamados carcinomas cuyo origen son las células del epitelio, que recubre los órganos y constituyen el tipo más común de cáncer. Ejemplos de éstos tenemos la piel, la cavidad bucal, el pulmón, los senos, el estómago, el colon y el

útero. El segundo tipo de tumor maligno es el sarcoma, cuyo origen son las células que forman parte del tejido conjuntivo. (Lodish y col., 2004)

La célula cancerosa se origina a partir de la célula normal, en un proceso que se denomina transformación. El primer paso es la iniciación en donde la célula se transforma en cancerosa como consecuencia de daños que ocurren a nivel del ADN, molécula que contiene la información genética de las células. Por otra parte, en los casos en que el ADN sufre daño, la célula normal puede repararlo, o bien, morir, mientras que las células cancerosas, presentan la característica de una reparación deficiente del ADN. Algunas veces, el ADN se altera por factores en el entorno, como la exposición a sustancias químicas, virus, humo del tabaco, exceso de exposición al sol, etc. Asimismo, el cáncer se puede desarrollar cuando el sistema inmune no funciona apropiadamente.

El siguiente paso es la promoción, donde una célula que ha iniciado el cambio se transforma en cancerosa. La promoción no tiene efecto sobre las células que no han sido sometidas al proceso de iniciación. (National Cancer Institute, 2003)

El tumor maligno posee la habilidad de invadir localmente o migrar a sitios distantes para originar tumores secundarios, esto ocurre por un mecanismo denominado *metástasis*, con el cual las células cancerosas pueden separarse y entrar al sistema linfático o sistema sanguíneo, alcanzando otros lugares del organismo. (Khanna y Hunter, 2005)

El aspecto característico del cáncer es la capacidad de la célula de crecer rápidamente, de manera descontrolada e independiente del tejido donde se originó. (Luque, 2000). Aún cuando la enfermedad se ha propagado a una parte distinta del cuerpo, el cáncer seguirá considerándose como de la parte del cuerpo en donde emergió. Por ejemplo, el cáncer del seno que se propaga al hígado es referido como cáncer del seno metastásico, y no cáncer de hígado. De igual manera, el cáncer de la próstata que se ha propagado a los huesos es referido como cáncer de la próstata metastásico, y no cáncer de hueso. (Langley y Fidler, 2007).

1.2 Cáncer a nivel mundial.

En un Informe de la *Organización Mundial de la Salud* se destaca el hecho de que el impacto de las enfermedades crónicas está creciendo de forma sostenida en numerosos países, sobre todo en aquellos de ingresos bajos y medios. Siendo la principal causa de mortalidad a nivel mundial las cardiopatías, seguidas por los accidentes cerebro vasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. (Vita-Finzi y McCarey)

En relación al cáncer específicamente, el Informe Mundial del Cáncer 2008 presentado por la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer, muestra una tendencia creciente de dicha enfermedad, con unas estadísticas de mortalidad de aproximadamente 17 millones de personas para el año 2030, mientras que a los diferentes tipos de cáncer se le atribuyen 7.9 millones de defunciones (o aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en 2007.

Algunos tipos de cáncer se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia. La Organización Mundial de la Salud indica los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante el año 2007 en las mujeres: el cáncer de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%). Es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por estos tipos de cáncer en comparación con 2006, se continúan manteniendo en los primeros lugares (figura 1). En los hombres, el cáncer de próstata (15.7%), de tráquea, bronquios y pulmón (14%) y de estómago (9%) fueron las principales causas de muerte por neoplasias malignas durante 2007. Al igual que en las mujeres, estas causas son similares a las de 2006, aunque el porcentaje de muertes que se les atribuyen ha disminuido. (Base de datos del Sistema nacional de Estadística y Geográfica).

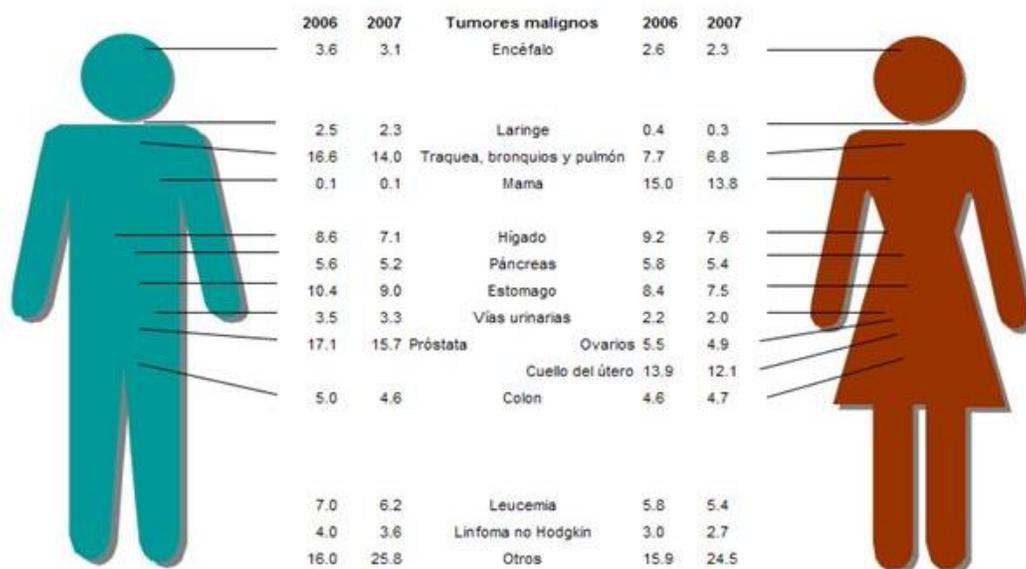


Figura 1. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo en el año 2006-2007. (Tomado de Base de datos del Sistema nacional de Estadística y Geográfica. Serie Estadísticas Vitales. Edición 2007).

Los cánceres con peor pronóstico (en todos los países) con menos del 20% de supervivencia a los 5 años, son los de pulmón, esófago, estómago e hígado. Mientras que los cánceres con mejor pronóstico (en países desarrollados), con más del 70 % de supervivencia a los 5 años, son los de próstata, mama y cérvix.

En el informe mundial sobre el cáncer del 2003, presentado por la Organización Mundial de la Salud, se muestra el análisis mundial de la morbilidad más completo realizado hasta la fecha, indicando que la incidencia del cáncer podría aumentar en un 50% hasta el año 2020, en el que habría 15 millones de nuevos casos. En el año 2000, los tumores malignos fueron la causa del 12% de los casi 56 millones de muertes que se produjeron en el mundo por todas las causas. En este mismo año, 5,3 millones de hombres y 4,7 millones de mujeres presentaron tumores malignos y, en conjunto, 6,2 millones murieron por esa causa. Dicho informe refleja la incidencia del cáncer en aumento de forma alarmante en todo el mundo del número de nuevos casos previstos, de 10 millones en el año 2000 a 15 millones en el 2020, esto podría deberse sobre todo al continuo envejecimiento de la población, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo.

1.3 Cáncer en Venezuela

En Venezuela el cáncer constituye una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad, hasta tanto, que una de cada cuatro personas si alcanza la edad de 74 años, puede padecer alguna de sus variedades, y una de cada siete tiene el riesgo de morir a consecuencia de esta patología.(Capote, 2006)

En la tabla 1 se observan las primeras cinco causas de mortalidad en ambos géneros en el país para el año 2005, de acuerdo al Anuario de Mortalidad publicado por el Ministerio del poder popular para la Salud (Min Salud). Como puede observarse el cáncer ocupa el segundo lugar entre las diversas causas de muerte, posición, que ha mantenido en los últimos 25 años, siendo sólo superado por enfermedades del corazón y representando el 15 % de la mortalidad diagnosticada en el país. (Capote, 2006)

Tabla 1. Cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela para ambos géneros en el año 2005.

Causas de muerte	Mortalidad	%
1 Enfermedades del corazón.	24 353	20,71
2 Cáncer.	18 155	14,93
3 Enferm. cerebrovasculares.	8 695	7,40
4 Suicidios y Homicidios.	8 614	7,31
5 Accidentes de todo tipo.	8 471	7,19
Otras causas	49 543	42,05
Total	117 831	100,00

La tabla 2 presenta las diez primeras causas de mortalidad por localizaciones del tipo de cáncer en cifras absolutas, para varones, mujeres y ambos géneros. Tal como puede observarse es el cáncer de pulmón el que domina la mortalidad; sin embargo, la causa líder en varones es próstata y en mujeres es el cuello uterino.

Tabla 2. Diez primeras causas de mortalidad por cáncer en Venezuela para el año 2005. Fuente: Registro Central de Cáncer Min Salud. 2006.

Varones		Mujeres		Ambos géneros	
Próstata	1 766	Cuello uterino y ut. N.E.	1 612	Bronquios y pulmones	2 668
Bronquios y pulmones	1 647	Glándula mamaria	1 425	Próstata	1 766
Estómago	1 076	Bronquios y pulmones	1 021	Estomago	1 744
Colon, recto y ano	578	Estómago	668	Cuello uterino y ut. N.E	1 612
Leucemias	422	Colon, recto y ano	592	Glándula mamaria	1 425
Hígado	356	Ovario	362	Colon, recto y ano	1 170
Páncreas	335	Leucemias	352	Leucemias	774
Linfomas no Hodgkin	299	Páncreas	351	Hígado	705
Laringe	274	Hígado	349	Páncreas	686
Encéfalo y otros (S.N.C.)	208	Linfomas no Hodgkin	237	Linfomas no Hodgkin	530
Total	9 085	Total	9 070	Total	18 155

En ambos géneros se muestra que el cáncer de pulmón con 2 668 defunciones, es la neoplasia maligna que lidera la mortalidad en el país, ya que es una patología correspondiente a un órgano común a ambos géneros. La próstata y cuello uterino están en segunda y cuarta posición a pesar de estar en órganos específicos a uno de los géneros respectivamente, mientras que glándula mamaria que en un 99 % corresponde a mujeres está en quinta posición. Estas cifras señalan con claridad las patologías en las que se deben reforzar las actividades preventivas y de diagnóstico precoz, ya que representan el 41 % de la mortalidad por cáncer en Venezuela. (Capote, 2006)

1.4 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata constituye la neoplasia más frecuente diagnosticada en la población masculina, y con mayor prevalencia en hombres mayores, desarrollándose en uno de los órganos glandulares del sistema reproductor masculino llamado próstata. (Figura 2). La próstata continúa creciendo durante la mayor parte de la vida de un hombre, de forma que es muy frecuente presentar a partir de los 60 años una condición inocua llamada hipertrofia prostática benigna (HPB), mucho más común que el cáncer de próstata. Muchos de los signos y síntomas de la HPB son los mismos que los del cáncer de próstata. (Lastra y col., 2008)

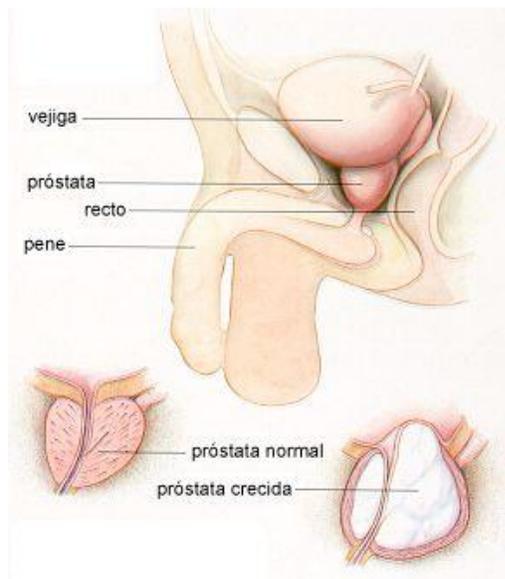


Figura 2. Estructura del Aparato reproductor masculino. Comparación de la próstata normal y crecida.

(Tomado de Conn, 1986)

El cáncer de próstata se puede determinar a través de diferentes pruebas, basadas en la cantidad producida de una proteína, la cual causa un aumento del antígeno prostático específico (PSA), asimismo, se puede realizar un tacto prostático, una ecografía, o una biopsia de la glándula prostática para su diagnóstico. (Prabhakaran, 1996)

Una vez que se ha desarrollado el cáncer, éste puede diseminarse por 3 vías, las cuales son:

1. Infiltración local.
2. A través de los vasos linfáticos
3. Vía hematogena, afectando principalmente a los huesos. (Lastra y col., 2008)

Por otra parte, este tipo de cáncer sigue un curso natural extraordinariamente variable e impredecible. En algunos hombres, la enfermedad evoluciona con gran lentitud y su estado clínico es satisfactorio durante 10 años sin tratamiento. En otros, muestra diseminación metastásica rápida que culmina en la muerte temprana. El cáncer de próstata se puede presentar como enfermedad temprana confinada sólo al órgano, localmente avanzada o con extensión a distancia. (Lastra y col., 2008)

El cáncer de próstata es extremadamente frecuente, aun cuando su causa exacta sea desconocida. Cuando se examina al microscopio el tejido prostático obtenido tras una intervención quirúrgica o en una autopsia, se encuentra cáncer en el 50 por ciento de los hombres mayores de 70 años y prácticamente en todos los mayores de 90. Sobre la base de las observaciones epidemiológicas se han sugerido cuatro causas principales del cáncer prostático las cuales se encuentran entre los factores genéticos, hormonales, ambientales e infecciosos. (Johansson y col., 2004)

El tratamiento del cáncer de próstata, como la gran mayoría de los tratamientos para el cáncer, incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, también incluye bloqueo hormonal androgénico y criocirugía. En el tratamiento del cáncer de próstata debe considerarse una variedad de factores, entre ellos, la edad y la expectativa de vida, el estadio y el grado del cáncer, y la probabilidad de que cada tipo de tratamiento sea curativo.(Piantino y col., 2009)

El cáncer de próstata es muy distinto a otros tipos de cáncer, ya que por lo menos en el 70% de los casos no se necesita tratamiento. Aún sin tratamiento inicial, sólo una pequeña proporción de todos los pacientes con cáncer diagnosticado en un estadio clínico precoz de cáncer de próstata mueren dentro de los 10 y los 15 años siguientes a dicho diagnóstico. (Johansson y col., 2004). Los pacientes con Cáncer de próstata avanzado se tratan con anti-andrógenos, pero después de 2 a 3 años de terapia, a menudo se convierte en una neoplasia hormono-resistente y por lo general ya no es sensible a la quimioterapia convencional. Como consecuencia, muchos pacientes con cáncer de próstata son atraídos hacia las terapias alternativas. (Piantino y col., 2009)

1.4.1 Cáncer de próstata en Venezuela

En el I Simposio de AstraZeneca Oncología se divulgaron las cifras oficiales actualizadas del 2006 por el Ministerio del Poder Popular de la Salud (Min Salud) sobre el cáncer en Venezuela, se confirmó que el cáncer de próstata es el que más se diagnostica en

Venezuela, después del cáncer de piel, manteniendo desde 1960 hasta 1980 un ascenso moderado. (Aponte y col., 2006).

A partir de 1990 ha mostrado un crecimiento extraordinariamente rápido, lo que lo ha llevado a la primera posición como causa de muerte por cáncer en hombres, superando ampliamente a pulmón, en el último quinquenio en Venezuela. (Capote, 2006)

La figura 3 presenta la situación comparativa de cáncer de próstata visto a través de las tasas de mortalidad, en la cual se presenta las variaciones de tasas de mortalidad por cáncer de próstata por Entidades Federales.

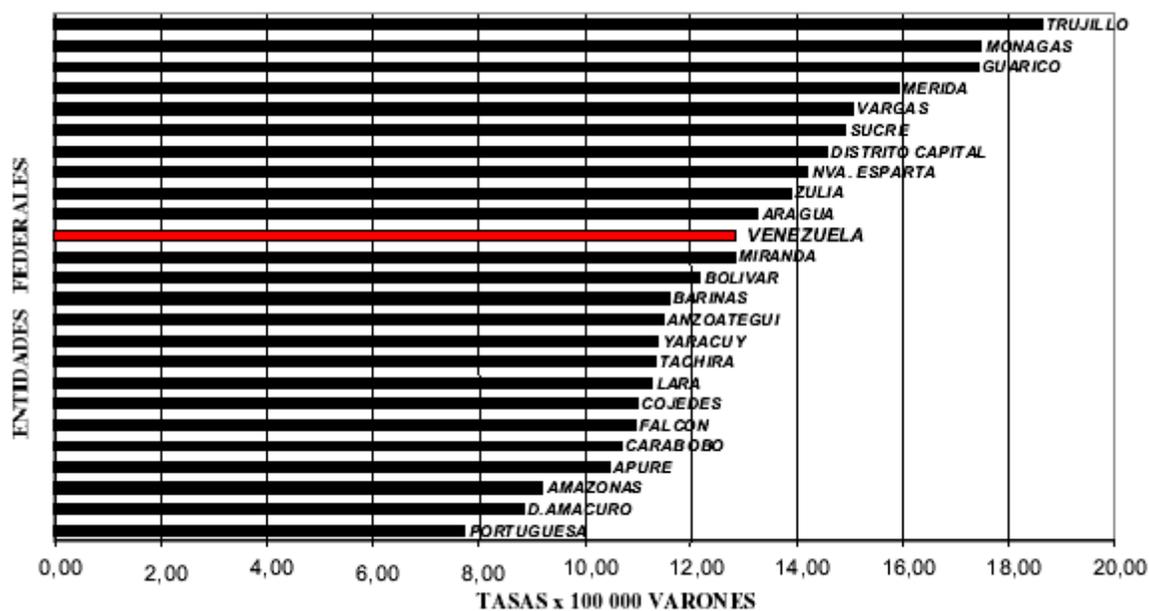


Figura 3. Tasa de mortalidad promedio del quinquenio 2001-2005. Cáncer de próstata, por entidades federales de Venezuela. (Tomado de Capote, 2006).

1.5 Cáncer de cérvix

Aproximadamente un 95% de las neoplasias intraepiteliales cervicales se originan dentro de esta zona de transición en la cérvix, que constituye el límite entre la vagina y el útero. (Kierszenbaum, 2008) (Figura 4).

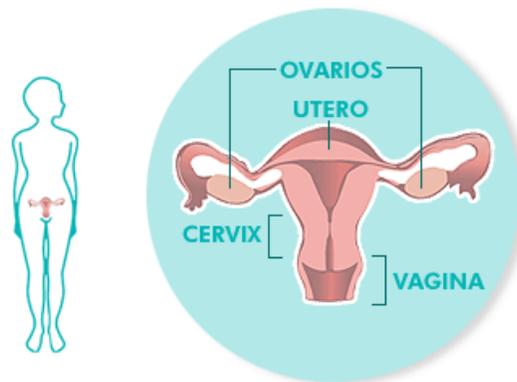


Figura 4. Estructura del aparato reproductor femenino en el cual se muestra la región donde se desarrolla el cáncer de cérvix. (Tomado de www.labec.net/microsite/ilustracion_cervix.png).

La cérvix comprende dos componentes: 1. El conducto endocervical y 2. El ectocérvix. El conducto endocervical se reviste de un epitelio cilíndrico simple mucosecretor, que se extiende hacia el interior de la lámina propia en forma de criptas glandulares. El ectocérvix se reviste de epitelio escamoso estratificado, que se continúa del revestimiento epitelial vaginal. (Figura 5). (Kierszenbaum, 2008).

Típicamente el desarrollo del cáncer cervical es lento, y ocurre durante un período de años. Si no es tratado, el cáncer invade más profundamente dentro del cérvix. (Adaora, 1999)

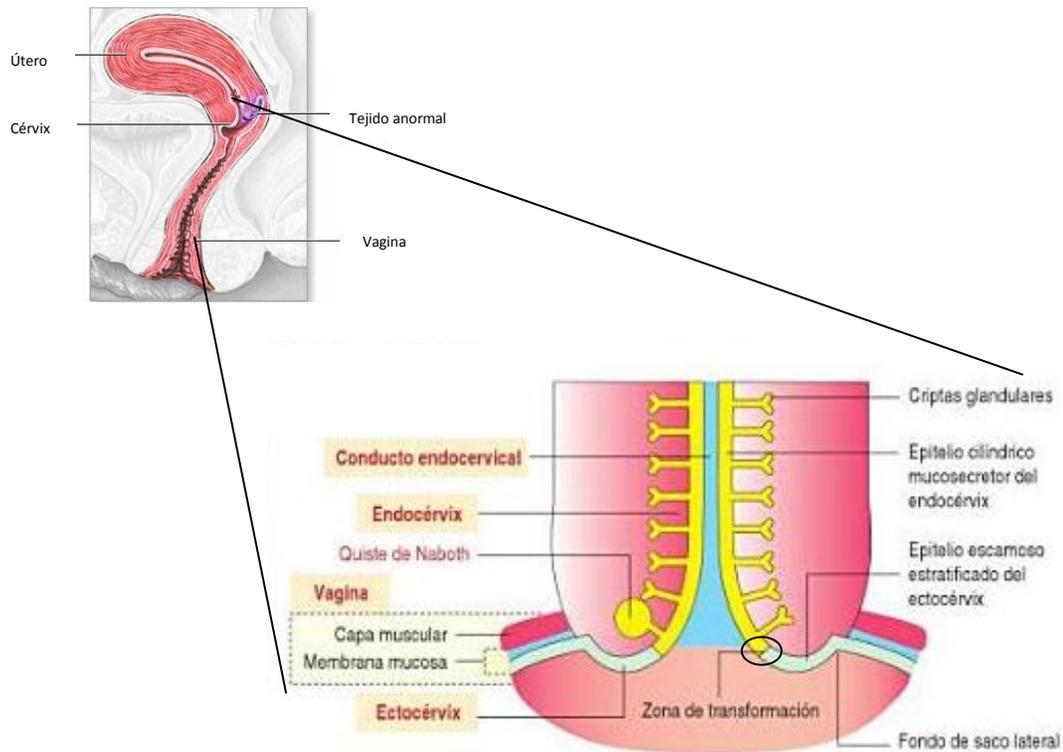


Figura 5. Estructura interna de la cervix y vagina. (Tomado y modificado de Kierszenbaum, 2008).

Los principales factores de riesgo de aparición del cáncer cervical son:

- Edad. La edad promedio en la que la enfermedad es diagnosticada es alrededor de 47 años.
- Relaciones sexuales a temprana edad. Las mujeres que mantuvieron relaciones sexuales a una edad temprana tienen mayor riesgo de tener cáncer cervical.

Posiblemente una de las razones es que el Virus del Papiloma Humano (VPH) infecta más fácilmente el cérvix o cuello del útero de las mujeres jóvenes.

- Número de parejas sexuales. Las mujeres que limitan el número de sus parejas sexuales tienen un riesgo menor de cáncer cervical. Menos parejas hace que tenga menos posibilidades de contagiarse el Virus del Papiloma Humano (VPH).

Una de las causas del cáncer de cérvix es la infección con el virus del papiloma humano (VPH). Estos virus, o papilomavirus, constituyen un grupo de más de 100 tipos diferentes de virus. (Adaora, 1999). Los estudios de investigadores del Centro Hutchinson, mostraron que el material genético del VPH se encuentra de forma consistente en los tumores del cérvix, y verificaron la relación entre la infección de VPH y el desarrollo de cáncer. Más recientemente, encontraron que una versión específica del Virus, llamada VPH 18, y que se encuentra en un 30 por ciento de mujeres con cáncer del cérvix, parece estar asociado con una mortalidad del doble de otros cánceres del cérvix. (Rodríguez, 1998).

El desarrollo del cáncer de cérvix ocurre en varias etapas. (Figura 6).

1. La Displasia, que puede ser leve, moderada o severa, en la que se nota la presencia de células con anomalías en la diferenciación.
2. El Carcinoma in situ, una lesión más avanzada que la displasia pero todavía sin capacidad de invadir las zonas normales adyacentes debido a que no hay rotura de la membrana basal.

3. Cáncer cervical invasivo, que constituye la tercera etapa, donde se observa rotura de la membrana basal con la consecuente invasión a zonas vecinas.

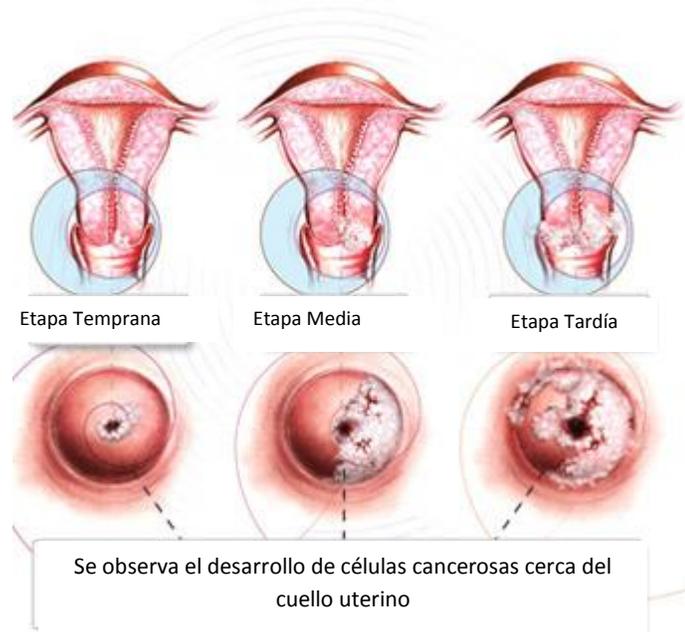


Figura 6. Diferentes etapas del desarrollo de cáncer de cérvix. (Tomado y modificado de www.ansci.wisc.edu/.../tues/HPV/Causes.html)

Como etapa preventiva las lesiones pueden ser observadas mediante el examen especializado del cuello del útero. Este es el fundamento de la detección precoz del cáncer del cuello uterino. Para proceder a esta detección se utilizan dos técnicas que identifican las lesiones sin necesidad de biopsia: la citología (Papanicolaou) y la colposcopia. Mediante la citología se observan las células que se desprenden de las zonas afectadas del epitelio mucoso, las que pueden observar anomalías en su forma y tamaño. La colposcopia es el examen del cuello del útero con un instrumento óptico que puede ampliar las zonas

observadas más de 40 veces, con lo que se pueden detectar alteraciones en el tejido epitelial.(Vidal y col, 2009).

Existen tres tipos de tratamientos para el cáncer cervical:

- **Cirugía** (extirpación del tejido tumoral por medio de la cirugía)
- **Radioterapia** (radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas).
- **Quimioterapia** (medicamentos para eliminar las células cancerosas).

1.5.1 Cáncer de cérvix a nivel mundial

A nivel mundial el cáncer del cuello uterino es el segundo en frecuencia en mujeres, después del cáncer de mama. Mundialmente, el cáncer cervicouterino provoca la muerte de 231.000 mujeres por año, y más de 80% de estas defunciones ocurren en los países en vías de desarrollo. (Ferlay y col., 2002).

En el continente Americano se pronosticaron 92.136 casos y 37.640 defunciones por cáncer cervicouterino, de los cuales 83,9 y 81,2 por ciento corresponderían a América Latina y el Caribe respectivamente. Siendo éstas las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino más altas del mundo, sólo superadas por las de África Oriental y Malasia. (Ferlay y col., 2002).

1.5.2. Cáncer de cérvix en Venezuela

El cáncer del cuello uterino en Venezuela, es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer venezolana desde hace más de cuatro décadas produciendo anualmente 2.500 muertes. (Caderaro y col, 2004) La Figura 7 compara las tasas de incidencia por Entidades Federales para cáncer de cuello uterino, entre las localizaciones de neoplasias malignas más diagnosticadas.

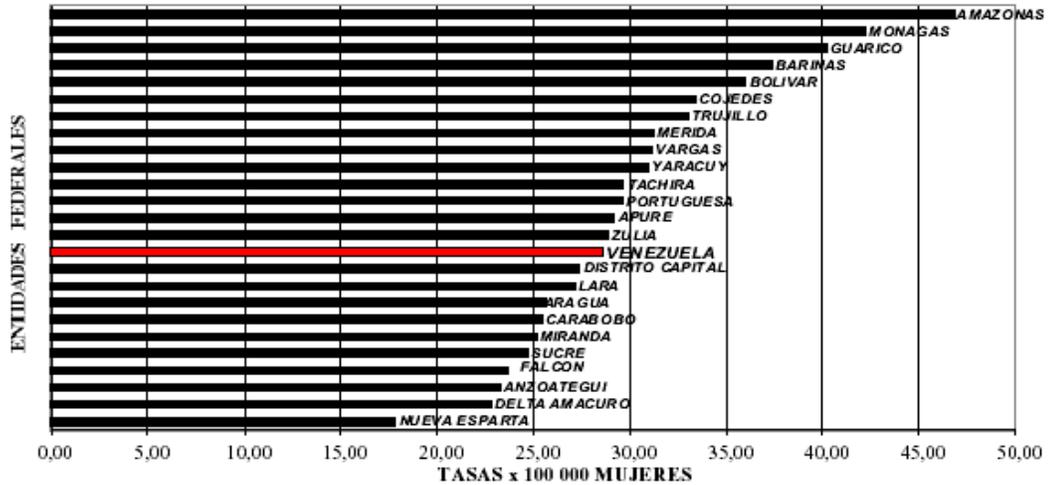


Figura 7. Tasa de incidencia promedio del quinquenio 2001-2005. Cáncer de cuello uterino, por entidades federales de Venezuela. (Tomado de Capote, 2006).

1.6 Terapias contra el cáncer

El cáncer ha sido una de las enfermedades más estudiadas, con mayor intensidad y desde diversos puntos de vista en los últimos años, pasando por los mecanismos que la generan y su posible cura efectiva.

Los tratamientos antineoplásicos ejercen un efecto citotóxico sobre las células malignas a diferencia de la cirugía, la cual permite la resección del tumor. La aplicación de un tratamiento por un período de tiempo prolongado puede conducir a que las células de un tumor adquieran resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción diferentes. Este fenómeno fue descrito experimentalmente, y se identificó como resistencia a múltiples drogas o MDR (“Multidrug resistance”). (Alberts y col, 1994).

Durante la quimioterapia la célula tumoral puede defenderse de sus efectos incluso después de que el medicamento haya alcanzado su objetivo, y ocasione un daño importante. Alteraciones celulares destacan a este nivel, un aumento en la capacidad de reparación del DNA y la inhibición de la muerte celular programada o apoptosis. (Sánchez y Benítez, 2006).

Dentro del tratamiento antineoplásico aplicado en la quimioterapia (con citostáticos) se encuentran diversos fármacos que actúan sobre las células tumorales de forma

característica, sobre una ó varias fases del ciclo celular, y sobre los mecanismos de control de la proliferación celular.

Las enfermedades neoplásicas se deben tratar con la máxima dosis tolerable para producir el mayor porcentaje de muerte celular posible, de forma secuencial, con el fin de optimizar el resultado y permitir la recuperación de los tejidos sanos. Además se deben administrar al menos dos fármacos que actúen sobre diferentes dianas terapéuticas y sin toxicidad cruzada, de este modo se reduce la toxicidad, se aumenta la eficacia sobre el tumor y disminuyen las posibilidades de que aparezcan resistencias. (Benedí y Gómez, 2006).

Existe un grupo de antineoplásicos conocidos como antibióticos citotóxicos, sustancias naturales producidas fundamentalmente por hongos, capaces de alterar el crecimiento de otras células vivas. Las antraciclinas pertenecientes a este grupo, son sustancias producidas por el hongo *streptomyces*, capaz de producir alteraciones en la replicación y transcripción proteica al intercalarse entre las bases del ADN. Estos compuestos pueden provocar también inhibición de la topoisomerasa tipo II, lo que conlleva a la rotura del ADN y la alteración de los procesos de reparación (muerte celular). (Benedí y Gómez, 2006).

Además, las antraciclinas forman radicales libres semiquinónicos por reducción enzimática; estos radicales pueden afectar el ADN por procesos de alquilación ó pueden provocar la peroxidación de lípidos celulares no saturados, que represente la lesión de la

célula. Esta acción, posiblemente contribuya más a la acción cardiotóxica de las antraciclinas que a la acción antineoplásica. Las antraciclinas también pueden alterar la membrana, inhibir la fosforilación oxidativa de las mitocondrias e inhibir diversas enzimas relacionadas con el ADN y el ARN: polimerasas, helicasas y enzimas reparadoras. (Flórez,2008)

Dentro de este grupo de antibióticos encontramos la doxorubicina o adriamicina, obtenido a partir de un mutante de *Streptomyces peucetius*; siendo éste fármaco el más utilizado en leucemias agudas; carcinoma de mama, vejiga, ovario y tiroides; neuroblastoma, tumor de Wilm, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, sarcomas de tejidos blandos y osteosarcoma. (Benedí y Gómez, 2006)

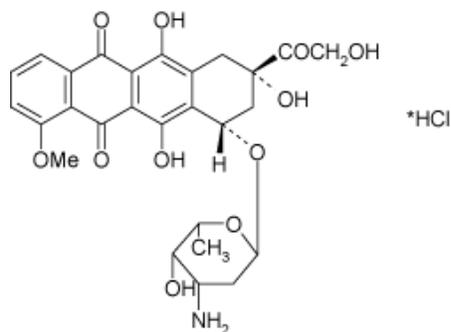


Figura 8. Estructura química de Doxorubicina. Tomado de www.cancerquest.org

La doxorubicina o adriamicina posee en su estructura un anillo tetraciclínico con un azúcar asociado, y los grupos quinona e hidroquinona presentes en la molécula, que actúan como dadores ó receptores de H^+ y O^+ . Esta molécula adopta una conformación específica que le permite ubicar los sitios funcionales en la doble hélice del ADN para obtener una

óptima afinidad y especificidad, lo que le permite desarrollar su actividad antineoplásica, la cual consiste en intercalarse entre los pares de bases, produciendo entrecruzamientos de cromátides, inhibiendo la síntesis de RNA y la duplicación de ADN. Además, la doxorubicina reacciona originando peróxidos altamente citotóxicos, con los cuales; separa las cadenas de ADN e interactúa con la topoisomerasa II; ambos mecanismos terminan con la muerte celular. (Patiño y col., 2003)

El objetivo del tratamiento tumoral con agentes antineoplásicos se basa en la destrucción de las células cancerosas; ya que, debido a las características de las mismas se puede considerar que una sola célula puede producir una recidiva del mismo (micrometástasis). Para lograr esto hay que tener en cuenta que una dosis de un fármaco antineoplásico citotóxico destruye una fracción constante de células malignas, por lo que, en dosis moderadas, el fármaco evidencia máxima actividad durante la fase S del ciclo celular y conduce a la acumulación de células en fase S o G₂ y la inhibición de todos los estadios del ciclo celular cuando se utilizan altas concentraciones. (Prieto y col., 1997).

Por otra parte, otro fármaco utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los cuales es de nuestro interés el cáncer de cérvix; es la Mitomicina C. Este fármaco es producido por el *Streptomyces caespitosus*, agente que posee en su estructura un grupo quinónico unido a un grupo indólico y dos grupos laterales muy lábiles, un metoxiformamido y un anillo de aziridina (figura 9). En el organismo es activado, por reducción de la quinona ó por la transformación en productos reactivos intermedios con capacidad alquilante. En consecuencia, puede actuar a través de los radicales libres

formados ó a través de su capacidad alquilante sobre moléculas de ADN, donde forma puentes cruzados por asociación. La actividad de este fármaco es máxima durante la replicación celular, cuando parte del ADN no está apareado y es más susceptible a la alquilación. (Flórez y col, 2008)

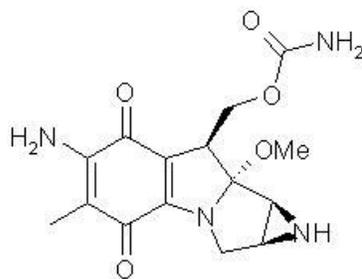


Figura 9. Estructura química de Mitomicina C. Tomado de ww.cancerquest.org

Debido a estas características la Mitomicina C, también es considerada un agente alquilante, que actúa sobre el ADN, atacándolo directamente a través de tres mecanismos diferentes.

- En el primer mecanismo un agente alquilante (representado en la figura debajo como una estrella rosada) adhiere grupos alquilo (compuestos pequeños de carbono mostrados como triángulos rosados) a las bases del ADN. Esta alteración resulta en que el ADN sea fragmentado por las enzimas de reparación cuando éstas tratan de reemplazar las bases alquiladas (figura 3 del diagrama). Las bases alquiladas previenen la síntesis del ADN y la transcripción del ARN del ADN afectado.

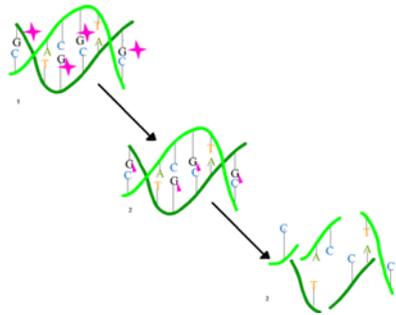


Figura 10. Primer mecanismo de acción de un agente alquilante.
Tomado de www.cancerquest.org

- Un segundo mecanismo es la formación de puentes cruzados, uniones entre átomos en el ADN (las cadenas rosadas). En este proceso, dos bases son unidas por medio de un agente alquilante que tiene dos sitios de unión con el ADN. Este enlace previene que el ADN se separe para la síntesis ó la transcripción.

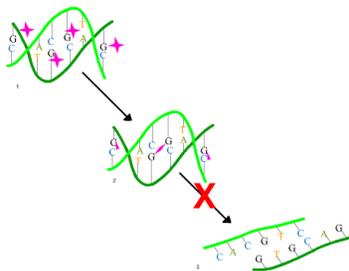


Figura 11. Segundo mecanismo de acción de un agente alquilante.
Tomado de www.cancerquest.org

- Un tercer mecanismo de acción de los agentes alquilantes es la inducción de nucleótidos dispares lo que ocasiona mutaciones. Las bases alquiladas pueden ser emparejadas erróneamente con una diferente a la correspondiente. Si esta alteración sucede y no es corregida, esto puede resultar en una mutación permanente.

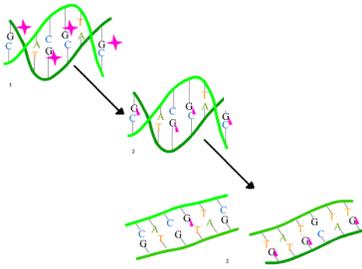


Figura 12. Tercer mecanismo de acción de un agente alquilante.
Tomado de www.cancerquest.org

Aunque las investigaciones científicas relacionadas con el cáncer avanzan cada día, no permiten definir una cura efectiva, por lo que muchos de los pacientes con enfermedad avanzada; requieren terapia complementaria, y resulta necesario disponer de nuevos parámetros capaces de predecir la respuesta a tratamientos. Por otra parte, la toxicidad de esta terapia impide su aplicación indistinta, lo que requiere disponer de nuevos criterios para su selección adecuada. (Sánchez y Benítez, 2006).

Es evidente que el problema de la quimioresistencia involucra diversos factores y por ello su complejidad. Resulta claro que las células neoplásicas, cuando se encuentran con las moléculas tóxicas son capaces de desarrollar mecanismos biomoleculares que las hacen resistentes a los efectos lesivos de la mayoría de los oncofármacos. (Sánchez y Benítez, 2006).

Por ello, actualmente se busca el uso de tratamientos específicos para cada tipo de cáncer, diseñando cócteles de fármacos (poliquimioterapia) a la medida de la caracterización genética de cada tumor, para que de esta forma dichos cocteles eliminen la mayor proporción de células cancerosas. (Salazar y col., 2008).

1.7 Estudios farmacológicos.

El uso de plantas como recurso terapéutico natural se remonta a tiempos muy remotos. Hoy en día la ciencia confirma la presencia en ellas de compuestos químicos con acciones farmacológicas, que constituyen muchas veces los elementos primarios utilizados por laboratorios farmacéuticos como punto de partida en el desarrollo de formas comerciales que serán patentadas para su uso terapéutico.

La fitoterapia, ciencia encargada del estudio terapéutico de las plantas, se basa en la prevención, atenuación o curación de un estado patológico. Empleando para esto, extractos obtenidos mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de las plantas, con el uso de solventes (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. (Domínguez, 1973).

Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente, y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios, satisfaciendo las necesidades crecientes del uso de productos naturales. (Polanco, 2003).

Por lo que; nos referiremos a los productos naturales como metabolitos secundarios, que comprende moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero que cumplen roles muy importantes en el reino vegetal. A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad y

existen registros de cuatro clases de ellos significativos para el ser humano, entre los que podemos encontrar, los terpenoides, alcaloides y compuestos nitrogenados relacionados, fenilpropanoides y compuestos fenólicos relacionados y los flavonoides. (Oscanoa, 2005)

La investigación de nuevos productos naturales ó sintéticos se ha convertido progresivamente en un campo interdisciplinario que comprende áreas tan diversas como la botánica, química, bioquímica, medicina, farmacología entre otras. (Arvelo y col., 2008). Por lo que, se ha hecho necesario enfocar, los diversos estudios a las nuevas necesidades planteadas en la integridad de éstas áreas de investigación que involucran a los productos que nos ofrece la naturaleza. Basándonos en esta premisa, se evalúan los efectos citotóxicos de nuevos compuestos naturales ó sintéticos en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*. (Malone, 1978).

Uno de los medios utilizados para estudiar la actividad farmacológica de algún compuesto son las curvas dosis- respuesta, las cuales permiten cuantificar ó estimar el efecto de una dosis aplicada a las células, y proporciona la medida de la magnitud de la actividad del compuesto en una dosis determinada. (Goodman y Gilman, 2001).

2. Antecedentes

Quizás los dos males que más preocupan al hombre de Ciencia en este siglo XXI sean el cáncer y el Sida. Miles de investigadores han intentado conseguir fármacos que consigan reducir las muertes que, año tras año, sacude a la sociedad.

Aunque un buen número de fármacos contra el cáncer han sido desarrollados a partir de plantas o sus derivados hemi-agentes sintéticos, el desarrollo de un fármaco con bajos efectos secundarios y sitio-específico sigue siendo un reto. El principal problema con estos agentes es la toxicidad asociada a ellos, debido a su baja especificidad, ya que estos agentes también eliminan las células sanas. (Kouznetsov y col, 2010).

El potencial terapéutico de los fármacos antitumorales derivados de las plantas puede deberse a una variedad de mecanismos, por ejemplo: inducción de muerte celular, como molécula antiangiogénica, inhibidor de proteasas, anti-inflamatorios entre otros. (Hidalgo y Eckhart, 2001).

En varios países se reporta el uso de numerosas plantas de la familia Euphorbiaceae, para tratar el cáncer. *Croton palanostigma*, un miembro de la familia Euphorbiaceae, es una de las plantas medicinales más utilizadas de los trópicos de América del Sur. El género incluye varias especies de *Croton*, los cuales contienen una amplia gama de acciones farmacológicas y fisiológicas. (Sandoval y col., 2002).

Una serie de estudios sobre plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana ha llevado a que algunas de ellas puedan ser consideradas como útiles en las enfermedades que le han sido atribuidas por la cultura popular. (Arvelo y col., 2008).

Una de las plantas que ha sido importante en éste ámbito son las referentes al género *Croton*, las cuales contiene alrededor de 1300 especies, siendo uno de los grupos más grandes de la familia Euphorbiaceae. Se encuentran dentro de la subfamilia Crotonoidae, cuyas especies se caracterizan por la presencia de diterpenos. De este género, un gran número de especies han sido investigadas y los clerodanos son el tipo de diterpeno más comúnmente aislados, aunque también se han obtenido otros diterpenos relacionados biogenéticamente a los clerodanos, como los labdanos. El género *Croton* ha sido motivo de estudios fitoquímicos debido principalmente a las posibilidades terapéuticas que han podido ser identificadas en estas plantas. (Fuentes y col., 2004)

2.1. Grupo Kaurano en la Terapia contra el Cáncer

En el curso de la búsqueda de complejos bioactivos en especies de *Croton* en Venezuela, compuestos pertenecientes al grupo seco-ent-kauranos; han sido aislados de diferentes especies, evaluando *in vitro* su efecto sobre la viabilidad celular en líneas de células humanas de cáncer de diferentes orígenes. (Suárez y col, 2009)

Los diterpenos constituyen una amplia clase de isopropenoides naturales. Este grupo de compuestos se dividen de acuerdo con el número y patrones de ciclación

mostrados por su esqueleto en: 1) acíclicos (fitanos), bicíclicos (labdanos, clerodanos), 2) tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, podocarpanos, vouacapanos), 3) tetracíclicos (trachylobanos, kauranos, afidicolanos, stemodanos, stemaranos, beyeranos, atisanos, giberelanos), y compuestos mixtos. (García y col., 2007)

El esqueleto de los diterpenos aparece en el fitol, el cual se presenta abundantemente en las plantas conformando la parte lipofílica de la clorofila. En las diferentes etapas de ciclación pueden ocurrir reordenamientos que conducen a la contracción y a la expansión de anillos, rearreglos de intermediarios, movimientos de carbono e hidrógeno, oxidaciones, oxigenaciones y otros. (Marcano y Hasegawa, 2002)

La contracción y expansión del sistema anular del kaurano, diterpenos tetracíclicos cuyas estructuras están constituidas por una unidad de perhidrofenantreno fusionada con una unidad de ciclopentano formado por un puente de dos átomos de carbono entre los C-8 y C-13 (figura 13), origina los esqueletos de grayano, gibbano y aconano. (García y col., 2007)

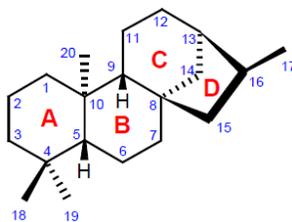


Figura13. Esqueleto de un diterpeno ent- kaurano. (Tomado de García y col., 2007)

Diversos estudios demuestran la función fisiológica que poseen los ent-kauranos como precursores de los reguladores de la proliferación celular de los vegetales, por lo que

resulta interesante que puedan afectar de igual modo la proliferación celular en animales. (Ruiz y col., 2008). Esta regulación está dirigida por este grupo de ent-kauranos que actúan como intermediarios en la ruta de biosíntesis de los ácido giberélicos (GAs); siendo las giberelinas un grupo de abeo- kauranos con el esqueleto de gibbano. Conservándose los primeros pasos de la síntesis de los ent-kauranos al camino biosintético de los poliisoprenoides; a partir de la Acetil CoA y por la vía del acetato mevalonato formando el isopentenil pirofosfato, que representa la unidad básica de los ent-kauranos para así alcanzar la formación de geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato y geranil geranil pirofosfato (compuesto de 20 carbonos, dador de todos los carbonos de las giberelinas). Formándose el ent-kaurano por ciclización de estos intermediarios. (Marcano y Hasegawa, 2002)

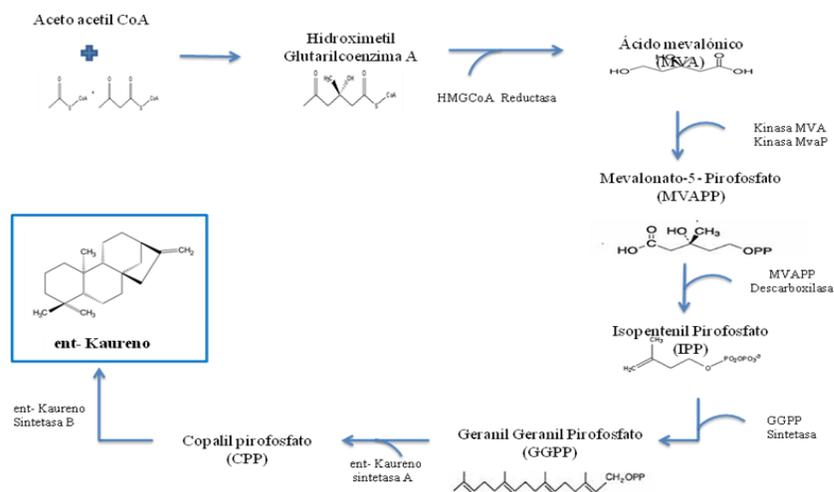


Figura14. Ruta biosintética del ent- kaurano

Por acción de monooxigenasas (del tipo citocromo P450) el C19 de este compuesto es oxidado a alcohol (ent-Kaurenol), aldehído (ent-Kaurenal) y ácido ent-Kaurenoico, a nivel de la membrana del retículo endoplásmico. En un paso posterior, el anillo B se

contrae por expulsión del C7 pasando de un anillo de 6 carbonos a otro de 5, formando el gibbano, luego por oxidación en C7 se forma el GA₁₂ aldehído. (Soberón y col., 2008).

El aldehído GA₁₂ se transforma en giberelinas tipo C₁₉ mediante dos rutas, una que involucra la 13 hidroxilación temprana y otra donde no se hidroxila esa posición. En ambas vías hay descarboxilación y reacciones catalizadas por oxidasas de membrana y citosólicas. (Soberón y col., 2008)

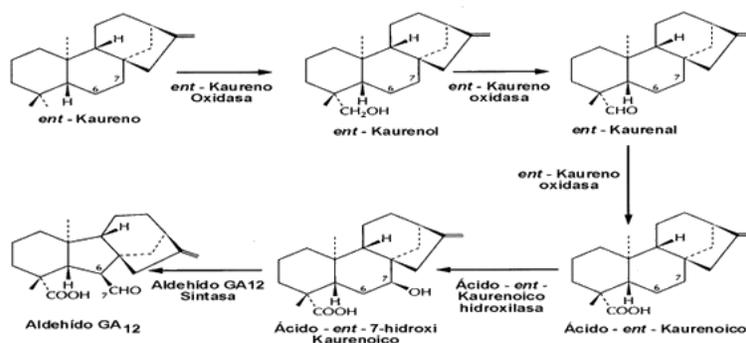


Figura 15. Ruta biosintética de las giberelinas a partir del ent- kaurano

La actividad biológica presentada por los diterpenos de los Kauranos, ha motivado a estudiar las modificaciones estructurales del esqueleto de Kaurano con el objetivo de obtener nuevas sustancias potencialmente bioactivas. Por lo que; recientemente se ha reportado el uso de éste grupo de compuestos para la síntesis de nuevos antimicrobianos, citotóxicos y tripanocidas. Éste enfoque, aún está lejos de ser aprovechado plenamente por el interés actual en la química de productos naturales, por lo que estudios para determinar la correlación entre la composición química y actividad farmacológica están en marcha. (Suárez y col, 2003)

3. Objetivos.

3.1 Objetivo General:

Evaluar el posible efecto citotóxico de un grupo de seco-ent-kauranos sobre las líneas celulares tumorales PC-3, (próstata), y HeLa, (útero); y su respuesta en combinación con compuestos seco-kauranos y fármacos antitumorales.

3.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto citotóxico de un grupo de seco-ent-kaurano en las líneas celulares PC-3 y HeLa.
- Evaluar el efecto citotóxico de un grupo de seco-ent-kaurano en cultivos primarios de fibroblastos humanos células no tumorales (células control).
- Determinar el efecto citotóxico de fármacos antitumorales específicos, utilizados para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata y cáncer de útero en las líneas celulares PC-3 y HeLa.
- Evaluar el efecto citotóxico de la combinación de compuestos de un grupo de seco-ent-kauranos y los fármacos antitumorales en las líneas de cáncer PC-3 y HeLa.
- Evaluar las combinaciones de compuestos seco-ent-kauranos y fármacos antitumorales sobre cultivos primarios de fibroblastos humanos.

4. Materiales y Métodos

4.1 Material Biológico

4.1.1 Líneas celulares.

- PC-3:

Donada por la Dr. Marie France Poupon, Instituto Curie, París-Francia. La línea celular PC3 es una línea tumoral de próstata humana obtenida de una metástasis ósea. Esta línea celular es andrógeno- independiente y no responde a los glucocorticoides, factores de crecimiento epidérmico (EGF) y fibroblásticos (FGF), no expresa PSA (antígeno prostático) y presenta baja actividad de la testosterona 5- alfa- reductasa. (Belinchón y col., 2005).

- HeLa:

Donada por la Dr. Marie France Poupon, Instituto Curie, París-Francia. La línea celular HeLa es una línea tumoral obtenida de un carcinoma de cérvix humano. Su resistencia a la apoptosis se debe posiblemente a la presencia del virus del papiloma 18 en éstas células, el cual produce una proteína que degrada a la p53 sin mutarla y además induce alteraciones en los cromosomas 1, 3, 5,6. (Xin-Rong y col., 2004)

Cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos:

Obtenidos en el laboratorio como cultivo primario a partir de fragmentos de tejidos humanos. El fibroblasto es la célula más común y menos especializada del tejido

conjuntivo, cuya función esencial consiste en construir el entramado estructural donde descansa el resto de los tejidos del organismo.

4.1.2 Productos naturales

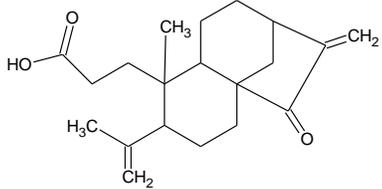
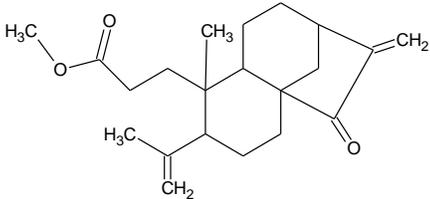
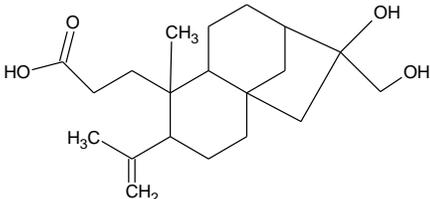
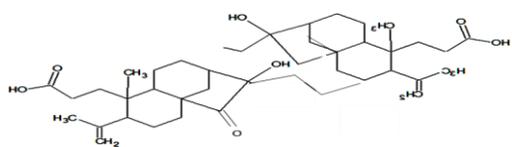
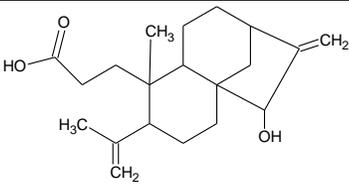
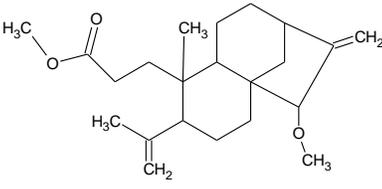
El grupo de productos naturales a utilizar se obtuvieron a partir de la planta *Croton micans* aislados en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela cedidos gentilmente por la Prof. Alírica Suárez para la realización de este trabajo. Este grupo estuvo conformado por 6 productos naturales, cuya estructura patrón será un ent- kaurano, el cual a través de modificaciones naturales de tipo adición, sustitución y eliminación de grupos químicos en su estructura, dará origen al resto de productos naturales utilizados en los ensayos de citotoxicidad.

4.2 Metodología

4.2.1 Mantenimiento del cultivo celular

Las líneas celulares fueron descongeladas y sembradas en medio de cultivo RPMI (GIBCO 1640), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de glutamina, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina, mantenidas en una estufa a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana hasta observar la formación de una monocapa confluyente de las células. Una vez alcanzado el número suficiente de células se realizaron los diferentes ensayos de citotoxicidad.

Tabla 3. Estructuras químicas y Pesos moleculares de los compuestos seco-ent-kauranos.

Compuesto	Peso Molecular (g/mol)	Fórmula	Estructura
EMCM 125 (Ácido de caracatine)	316,438	$C_{20}H_{28}O_3$	
EMCM 128 (Caracatine)	330,465	$C_{21}H_{30}O_3$	
EMCM 141	336,469	$C_{20}H_{32}O_4$	
EMCM 145	> 456,706	$C_{30}H_{48}O_3$	
EMCM 147	318,454	$C_{20}H_{30}O_3$	
EMCM 150	346,508	$C_{22}H_{34}O_3$	

4.2.2 Ensayo de citotoxicidad sobre las líneas celulares y cultivo primario de fibroblastos

Los ensayos del efecto citotóxico de los productos naturales pertenecientes al grupo seco-ent-Kauranos fueron realizados mediante la construcción de las curvas CI_{50} que determinaron la concentración del producto que elimina la mitad de la población celular. La citotoxicidad in vitro de las diferentes líneas celulares tratadas con los productos se determinó mediante el ensayo de MTT, cuyo principio se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1)-2,5-difeniltetrazol, llevada a cabo por la acción de las enzimas succinato-deshidrogenasas mitocondriales, con la formación de un compuesto coloreado azul-violeta llamado formazán. La presencia de este colorante es proporcional al número de células metabólicamente activas. (Mosmann, 1983)

Una vez contadas las células, tanto de las líneas tumorales como del cultivo de fibroblastos, se sembraron aproximadamente 5000 células por pozo de una placa de 96 pozos en un volumen de 50 μ l de medio de cultivo RPMI suplementado. En cada placa se colocó una columna de 8 pozos con medio de cultivo, mas las células sin el producto natural, constituyendo el control de viabilidad. Además se contó con un control con el cual se demostró que el efecto obtenido es propio del producto aplicado sobre las células y no del solvente, DMSO, utilizado (Rowley y Anderson, 1993; Goldman y col., 1987), y finalmente un control positivo, como la Adriamicina, producto con actividad antitumoral conocida.

Las placas se incubaron durante 24 horas en una temperatura de 37°C y una atmosfera húmeda de 5% CO₂, luego de finalizado éste período se le agregó a cada placa 50 µL correspondientes al volumen de cada concentración creciente de los productos naturales, comprendidas entre 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 15; 25; 100 µg/mL respectivamente. Las placas, se incubaron durante 72 horas bajo las mismas condiciones de cultivo, 37°C, 5% CO₂.

Transcurrido este tiempo, se descartó el medio con el producto presente en cada pozo y seguidamente se le agregó 100 µL del compuesto MTT a una concentración de 0,4 mg/mL. Las placas se incubaron por 3 horas en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. Se desechó el MTT y se le agregó 100 µL de DMSO a cada pozo con la finalidad de disolver los cristales de formazán. Finalmente, se leyó la densidad óptica de los pozos de las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm (DO 570).

Cada ensayo se realizó por triplicado, y la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se calculó con los valores de absorbancia obtenidos usando un software específico, Origin 6, el cual establece dicho valor mediante una regresión no lineal y permite realizar las curvas correspondientes a éstos ensayos.

4.2.3 Curvas de crecimiento

Una vez obtenidos los CI_{50} para cada producto natural, 6 en total, se procedió a escoger 3 de ellos para evaluar el desarrollo de los diferentes tipos celulares frente a estos. Se tomaron las dos líneas celulares y el cultivo primario de fibroblasto, las células fueron disociadas con tripsina y centrifugadas aproximadamente 5 min a 3g; resuspendidas en medio de cultivo fresco, y aproximadamente sembradas $6,5 \times 10^4$ células en placa. Se incubaron por 24 h para permitir su adhesión a la superficie, para luego exponerlas a los compuestos seleccionados a una concentración ($\mu\text{g/mL}$) equivalente al CI_{50} de cada producto seleccionado. Cada placa de células tratadas tenía su control, el cual solo contenía las células y el medio de cultivo.

Al transcurrir períodos de 24h, se desprendieron las células con Tripsina, para realizar posteriormente el conteo de las células, utilizando para ello el ensayo de exclusión de azul tripano. Al finalizar el ensayo se obtuvo 5 puntos para las curvas de viabilidad correspondientes a los períodos de tiempo de 24, 48, 72, 96, y 120 horas. Las curvas de crecimiento se representaron mediante un gráfico XY, el eje X representa el tiempo de incubación (horas), y el eje Y el número de células viables.

4.2.4 Combinación (productos naturales + Fármacos Antitumorales)

Una vez determinados los valores de CI_{50} para cada uno de los productos naturales evaluados en cada una de las líneas utilizadas, se procederá a realizar las combinaciones de compuestos y fármacos antitumorales.

El protocolo a seguir será el propuesto por Chou y colaboradores (1984) y Chou (1991) el cual, es definido como Método de Índice de Combinación (M.I.C.). El esquema propuesto para este experimento se describe en la figura 16, el cual se realizará utilizando diluciones seriadas de la mezcla (producto natural + fármaco antitumoral).

Concentraciones a utilizar en la
evaluación de las combinaciones

- ✘ (0,25) $\mu\text{g/mL}$
- ✘ (0,5) $\mu\text{g/mL}$
- ✘ (1) $\mu\text{g/mL}$
- ✘ (2) $\mu\text{g/mL}$
- ✘ (4) $\mu\text{g/mL}$

		Producto 1				
		0,25 x CI_{50}	0,5 x CI_{50}	1 x CI_{50}	2 x CI_{50}	4 x CI_{50}
Producto 2	0,25 x CI_{50}	X				
	0,5 x CI_{50}		X			
	1 x CI_{50}			X		
	2 x CI_{50}				X	
	4 x CI_{50}					X

Figura 16. Esquema de la obtención de las concentraciones a utilizar para la evaluación de las combinaciones de los fármacos con los productos naturales, basado en el diseño experimental propuesto por Chou en 1991.

Los efectos citotóxicos aportados por cada compuesto fueron iguales, ya que de acuerdo a la tabla propuesta de las combinaciones a utilizar, éstas se realizaron con una proporción 1:1. Los ensayos de combinación se realizarán con la misma metodología aplicada para los ensayos de citotoxicidad

Los análisis correspondientes a estos ensayos se realizaron utilizando softwares estadísticos con los cuales se pudo calcular los Índices de Combinación (IC) para establecer el grado de sinergismo, antagonismo o aditividad de las combinaciones. Se trabajó específicamente con el software Calcsyn, el cual al proporcionarnos los valores de Índices de Combinación se podía establecer la relación entre los compuestos de acuerdo a la siguiente tabla, propuesta por Chou y Martin, 2005.

Tabla 4. Rangos de IC referidos para la selección de los patrones de combinación. Tomado y modificado de Chou y Martin, 2005.

Rango del Índice de Combinación	Descripción
<0,1	Sinergismo muy fuerte
0,1 - 0,3	Sinergismo fuerte
0,3 - 0,7	Sinergismo
0,7 - 0,9	Sinergismo débil a moderado
0,9 - 1,1	Cercano a la aditividad
1,1 - 1,45	Antagonismo débil a moderado
1,45 - 3,3	Antagonismo
>3,3	Antagonismo fuerte a muy fuerte

5. Resultados

- *5.1 Determinación de la actividad citotóxica de los seco-ent-kauranos sobre las líneas tumorales y células control.*

En los resultados obtenidos se muestra claramente que los productos en estudio presentan una actividad característica sobre cada línea tumoral, lo que se refleja en los diferentes valores de CI_{50} (tabla 5), derivados luego de una exposición de las células a concentraciones crecientes de los compuestos. La concentración para la cual las líneas celulares muestran una inhibición de crecimiento del 50% fue calculada a través de un software específico que nos arrojaba el valor directamente. Además, por medio de las curvas de viabilidad celular de las células a la exposición de cada kaurano se puede evidenciar una disminución progresiva de la viabilidad frente a las concentraciones crecientes evaluadas.

En la tabla 5, se muestra una actividad citotóxica mayor para el EMCM 125, cuyos valores de CI_{50} son 2,82 $\mu\text{g/mL}$ y 8,76 $\mu\text{g/mL}$ para las líneas tumorales PC3 y HeLa respectivamente. Estos valores son prácticamente similares a los obtenidos en estudios anteriores para estos compuestos, reportados por Suárez y col, 2009.

Así mismo, en este estudio se reportan los valores para el producto EMCM 128 sobre PC3, HeLa y fibroblastos, los cuales están dentro del rango de 12 a 25 $\mu\text{g/mL}$, lo que, de igual forma corresponden a nuestros valores experimentales con el mismo producto

sobre estos tipos celulares. Por otra parte, el compuesto que presentó menor actividad citotóxica, fue el seco-ent-kaurano 141, con valores de CI_{50} mayores a $20\mu\text{g/mL}$ tanto para las dos líneas tumorales como para los fibroblastos dérmicos.

El producto 145 exhibe una actividad citotóxica similar al kaurano 128 cuando comparamos los valores de CI_{50} obtenidos para los diferentes tipos celulares, incluso este kaurano presenta valores menores a los reportados en estudios anteriores con los mismos tipos celulares para otro tipos de compuestos con estructura relacionadas a este grupo.(Sylvestre y col. 2005). Cuando observamos la actividad expresada por el kaurano 147, encontramos valores de CI_{50} son $13,36\ \mu\text{g/mL}$; $14,59\ \mu\text{g/mL}$ y $21,18\ \mu\text{g/mL}$, respectivamente para las células en estudio, los cuales se encuentran por debajo de los presentado por el compuesto 141, de menor actividad citotóxica, generando así una mayor toxicidad por parte del kaurano 147 hacia los diferentes tipos celulares, haciéndose notar el hecho de que la actividad sigue siendo mayor en las líneas tumorales en comparación con las células fibroblastos.

Paralelamente al estudio de la actividad citotóxica del grupo de compuestos sobre las líneas tumorales, también fue evaluado el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos. Los valores de CI_{50} fueron mucho mayores en comparación con los de las líneas tumorales. Estos resultados reflejan una disminución en la actividad citotóxica en una proporción entre 2 y 5 veces, corroborando la acción selectiva de los compuestos y afectando lo menos posible a las células control (normales). Por otra parte, solo el producto seco- ent- kaurano 150, mostró una actividad mayor hacia los fibroblastos, con un valor de

CI₅₀ de 7,78 µg/mL, el cual es 2 veces menor al presentado sobre las líneas PC3 y HeLa frente a este kaurano.

También se utilizaron dos fármacos antitumorales de uso actual en la quimioterapia como control positivo que garantizara la presencia de una actividad citotóxica tanto en las líneas PC3 y HeLa, y en los fibroblastos. Para la línea PC3 se utilizó Adriamicina, mientras que para HeLa, mitomicina C. Los valores de CI₅₀ (tabla 6) obtenidos fueron por debajo de 1 µg/mL para las células evaluadas, representando una mayor actividad citotóxica en comparación con nuestros productos en estudio.

Al comparar los valores de CI₅₀ de los fármacos antitumorales, Adriamicina y Mitomicina C, con los señalados en la tabla 4, nos damos cuenta que los primeros son mucho menores, lo que indica una actividad citotóxica elevada en comparación con nuestros compuestos de estudio, sobre las líneas tumorales, esta actividad también se hace presente en los fibroblastos, donde es significativa con valores de CI₅₀ de 0,24 µg/mL y 0,39 µg/mL, (tabla 5).

Tabla 5. Valores de concentraciones inhibitorias 50% (CI₅₀) obtenidos para cada línea tumoral utilizada y para células control. Los valores de CI₅₀ son expresados en unidades de µg/mL

Producto	Líneas Tumorales Celulares		
	PC3	HeLa	Fibroblastos Dérmicos
EMCM 125 (Ácido de Caracaine)	2,82 ± 1,07	8,76 ± 1,01	15,2 ± 1,02
EMCM 128 (Caracaine)	7,13 ± 1,02	11,04 ± 1,02	17,62 ± 1,02
EMCM 141	27,28 ± 1,07	28,38 ± 1,05	38,19 ± 1,07
EMCM 145	6,68 ± 1,05	13,96 ± 1,02	18,03 ± 1,01
EMCM 147	13,36 ± 1,03	14,59 ± 1,01	21,18 ± 1,08
EMCM 150	16,22 ± 1,04	16,9 ± 1,01	7,78 ± 1,3

Tabla 6. Valores de concentraciones inhibitorias (CI₅₀) de los controles utilizados específicos para cada línea tumoral y para las células control. Los valores de CI₅₀ son expresados en unidades de µg/mL.

Fármaco antitumoral	Líneas celulares tumorales		Fibroblastos
	PC3	HeLa	Dérmicos
Adriamicina	0,07 ± 1,9	-	0,24 ± 1,1
Mitomicina C	-	0,14 ± 1,1	0,39 ± 1,1

- *5.2 Viabilidad Celular frente a los productos naturales*

Además de obtener los valores de CI_{50} , con la ayuda de las curvas de viabilidad se puede observar el comportamiento del cultivo celular frente a las diferentes concentraciones crecientes de los productos a las cuales son expuestas las células. Éstas curvas representan una función exponencial decreciente, donde nuestros valores de las concentraciones administradas son el eje X, en aumento progresivo, mientras que el porcentaje de células vivas disminuye notablemente representada en el eje Y. En estos gráficos la pendiente de la curva indica que variaciones en las concentraciones empleadas, pueden generar respuestas citotóxicas grandes.

Los análisis para determinar la citotoxicidad mostraron un efecto de disminución en la viabilidad celular, mayor en las líneas celulares, PC3 y HeLa que en los Fibroblastos, cuando se expusieron a las mismas concentraciones de los productos.

Partiendo de esto, el EMCM 125 (figura 17a) y el EMCM 128 (figura 17b) presentan la mayor pendiente, lo que corresponde con los valores de CI_{50} más bajos, indicando la efectividad del producto a bajas concentraciones, ya que a dosis menores a 5 $\mu\text{g/mL}$ se aprecia una disminución abrupta en el porcentaje de células vivas.

Evidentemente el efecto es menor en los fibroblastos dérmicos humanos frente al 128 en comparación con el compuesto 125, figura 18c, donde la curva presenta una disminución más progresiva en relación con las otras de las líneas celulares. Sin embargo,

la disminución en el porcentaje de viabilidad permite arrojar un valor de CI_{50} menor a 15 $\mu\text{g/mL}$.

En relación al kaurano 141, en sus curvas de viabilidad, figuras 19a y 19b, para ambas líneas celulares, observamos una disminución muy lenta del porcentaje, lo que implica que se requiere una mayor cantidad de este producto para alcanzar el mismo efecto que se observaba marcadamente con los productos anteriores, lo que se traduce en un CI_{50} mayor.

A concentraciones menores a $1\mu\text{g/mL}$ la disminución del porcentaje de viabilidad es menor al 10% en las células tratadas con el kaurano 141, lo que señala que dentro de estas concentraciones evaluadas se encuentra la dosis umbral, aquella dosis mínima que produce el efecto de nuestro interés en este estudio. (Furones, 2002) A medida que las concentraciones administradas aumentan y se sobrepasa esta dosis umbral, la viabilidad celular se ve fuertemente afectada, alcanzando el 50% de ésta, a concentraciones mayores de $20\mu\text{g/mL}$ en las células de estudio.

El comportamiento observado en las curvas de los kauranos 145 y 147, en las figuras 20 y 21, es muy similar al presentado por el EMCM 125 para las dos líneas celulares, mostrando solo una leve diferencia en la concentración del producto a la cual se alcanza el 50% de la viabilidad, lo que nos da la variabilidad en los valores de CI_{50} . Cuando observamos las figuras 20c y 21c de los fibroblastos expuestos a estos productos,

notamos una disminución menos marcada en el porcentaje de inhibición, lo que está estrechamente relacionado a las características fisiológicas propias de las células.

Por otra parte, el comportamiento de la curva de fibroblastos frente al kaurano 150 (figura 22c), presenta la misma tendencia de disminución, alcanzando el 50% de la población a concentraciones menores del compuesto en comparación con las líneas tumorales PC3 y HeLa para el mismo kaurano. Lo que indica que el cultivo primario de estas células control es más sensible a este producto en particular.

No obstante, ninguno de los compuestos evaluados mostró una curva con una pendiente tan fuerte como la observada con los compuestos de referencia Adriamicina y Mitomicina C. En estas curvas (figura 23), la viabilidad celular disminuye rápidamente correspondiendo con los valores de CI_{50} obtenidos, lo que implica una mayor actividad citotóxica por parte de estos frente a los diferentes tipos celulares en estudio.

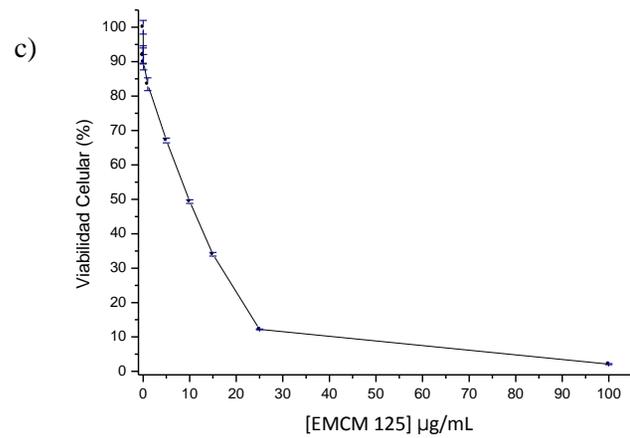
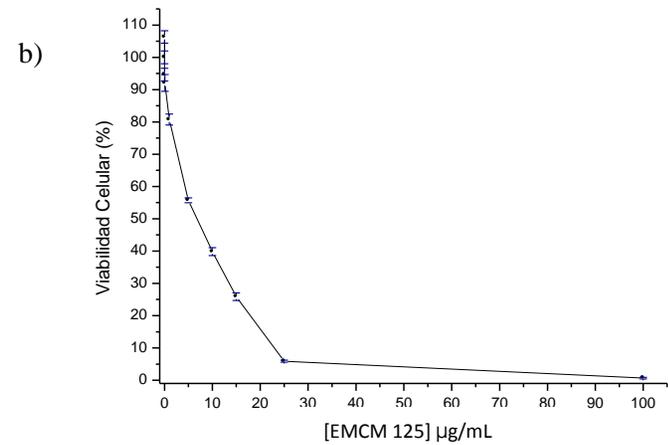
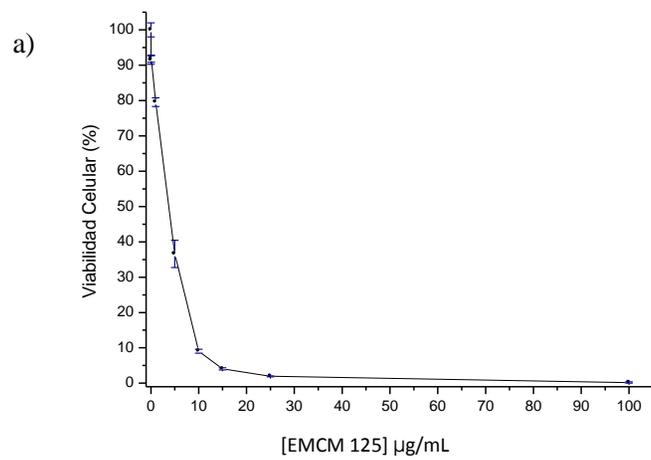


Figura 17. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 125.

a) Línea PC3. b) Línea tumoral HeLa. c) Fibroblastos dérmicos humanos.

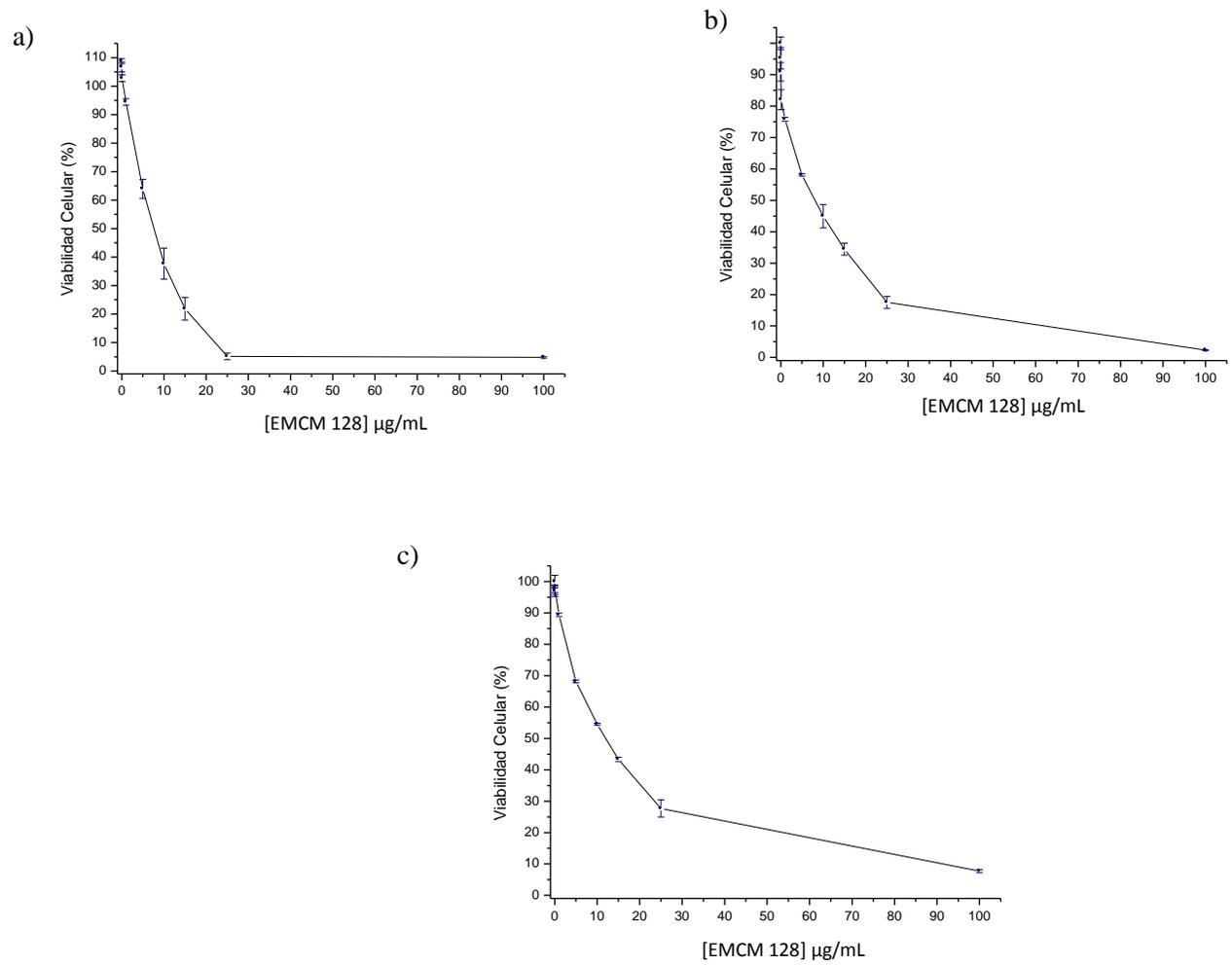


Figura 18. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMC128.

a) Línea PC3. b) Línea tumoral HeLa. c) Fibroblastos dérmicos humanos.

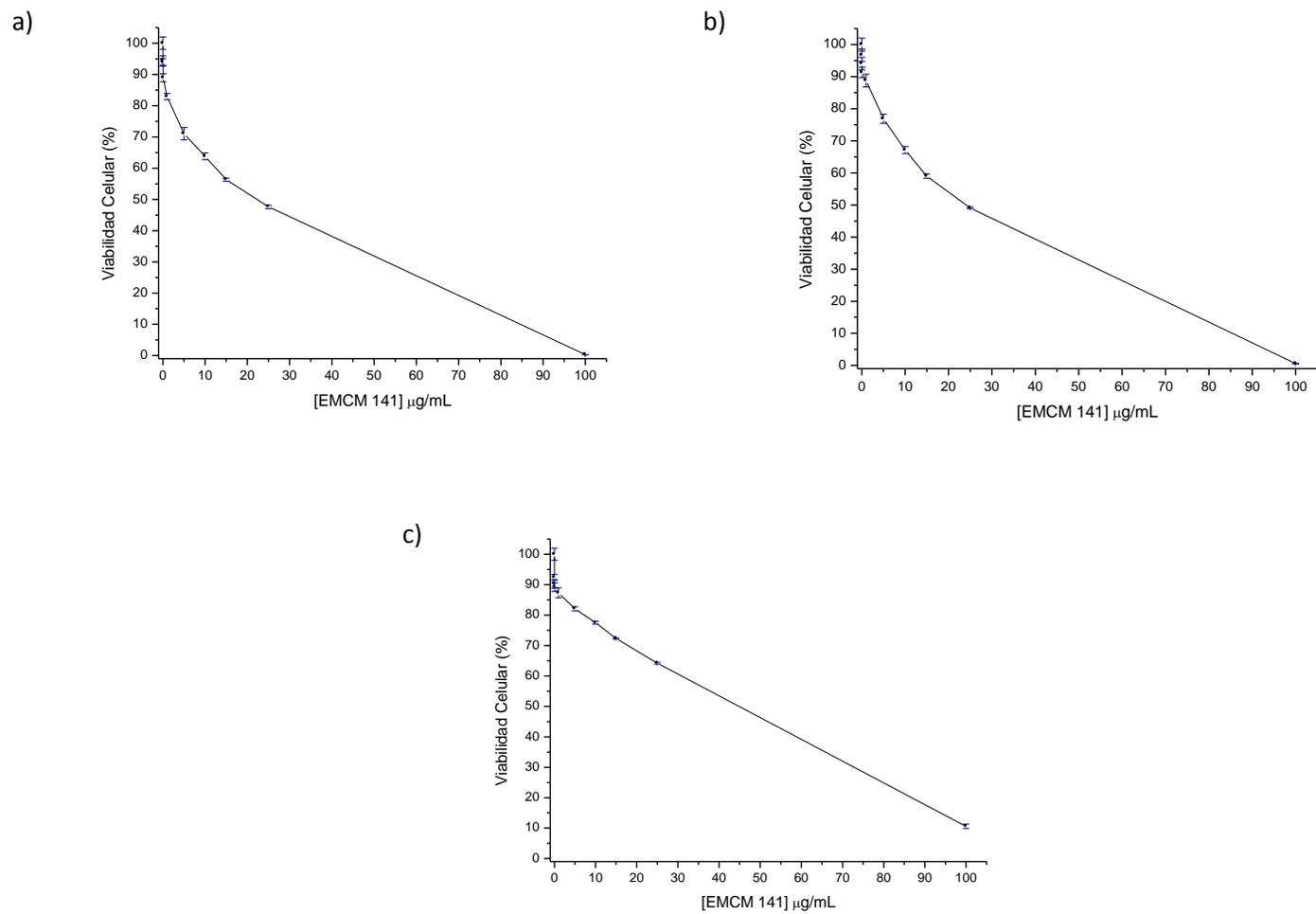


Figura 19. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMC141.

a) Línea PC3. b) Línea tumoral HeLa. c) Fibroblastos dérmicos humanos.

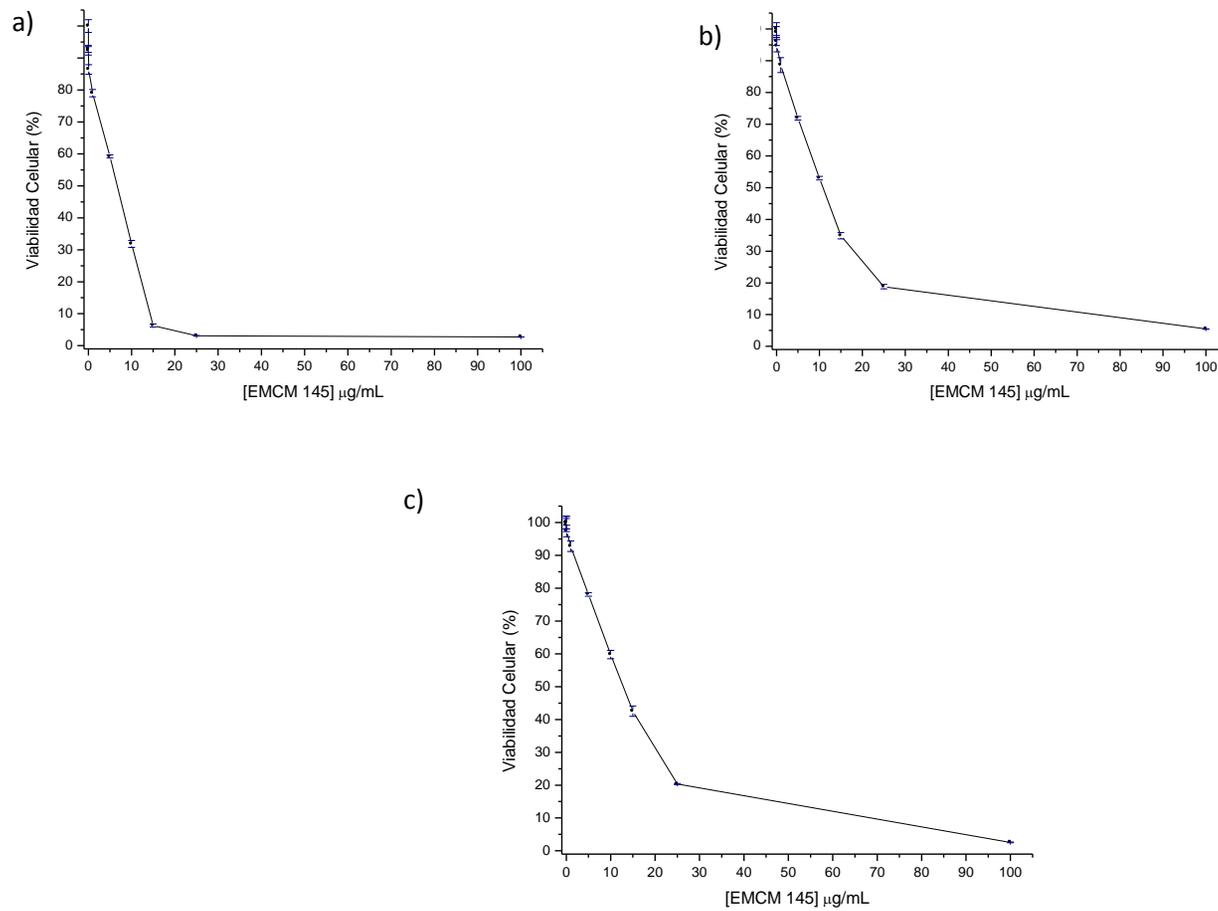


Figura 20. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMC145.

a) Línea PC3. b) Línea tumoral HeLa. c) Fibroblastos dérmicos humanos.

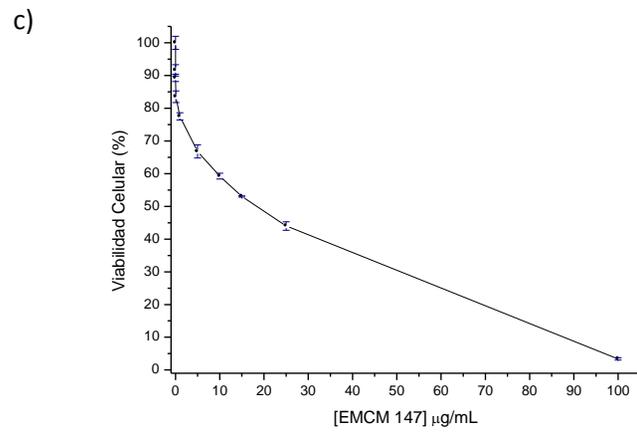
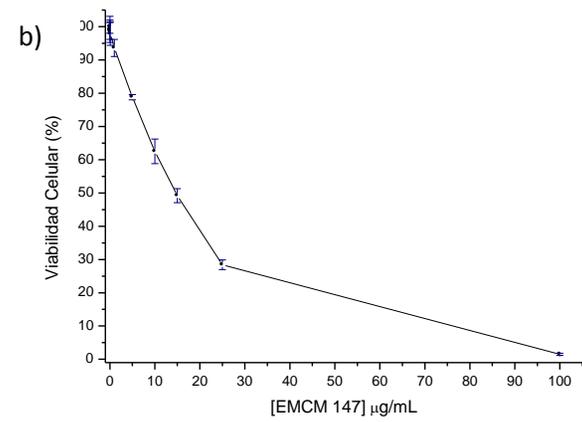
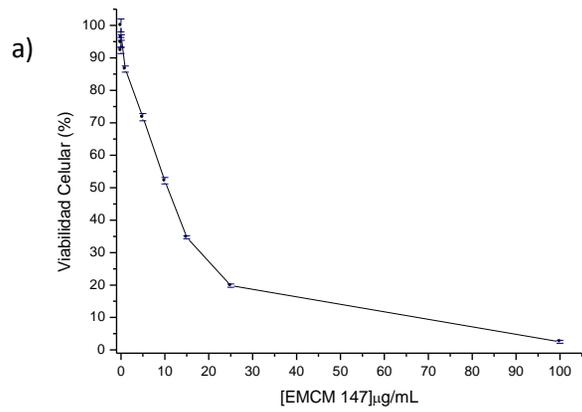


Figura 21. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMCM 147.

a) Línea PC3. b) Línea tumoral HeLa. c) Fibroblastos dérmicos humanos.

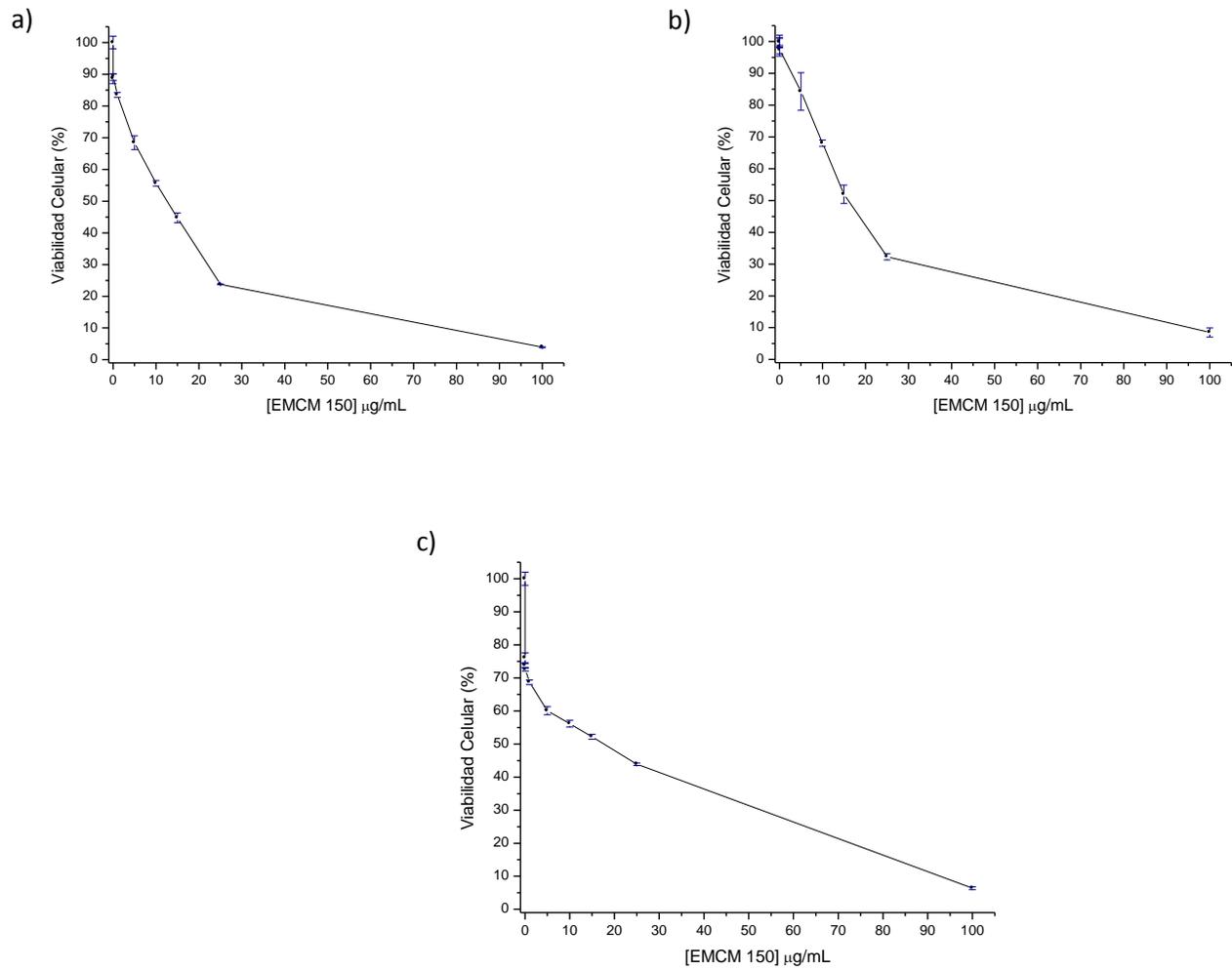


Figura 22. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente al EMC150.

a) Línea PC3. b) Línea tumoral HeLa. c) Fibroblastos dérmicos humanos.

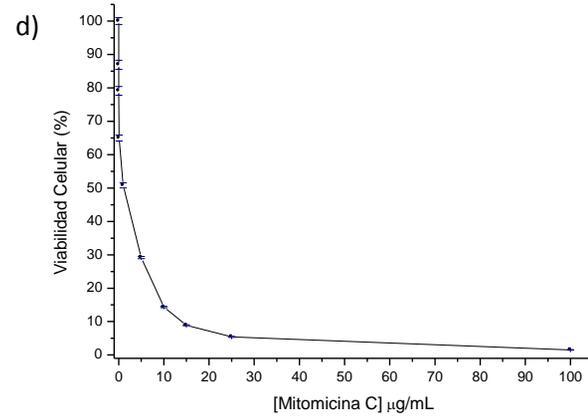
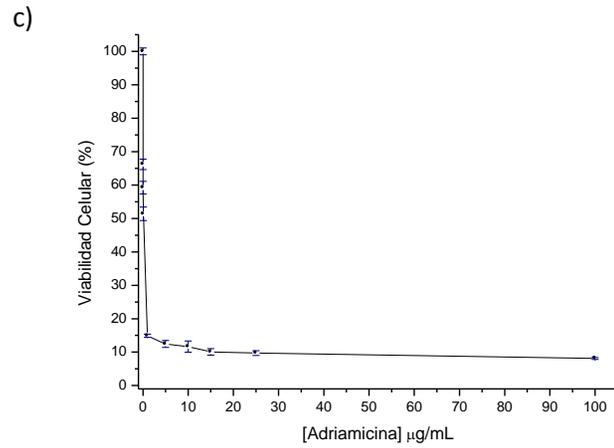
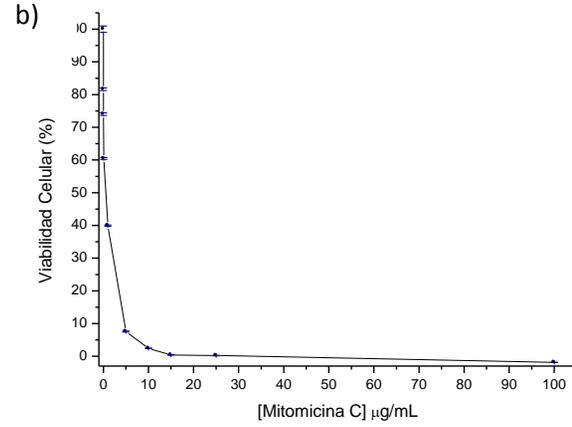
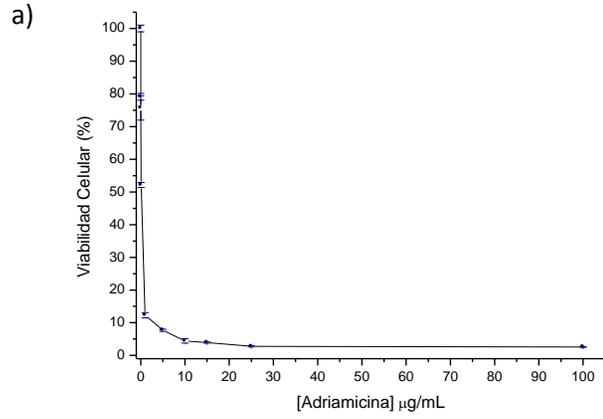


Figura 23. Curvas de viabilidad celular de las líneas tumorales y fibroblastos dérmicos frente a los fármacos antitumorales. a) Línea PC3 frente a Adriamicina. b) Línea tumoral HeLa frente a Mitomicina C. c) Fibroblastos dérmicos humanos frente a Adriamicina. d) Fibroblastos dérmicos humanos frente a Mitomicina C

- *5.3 Curvas de Proliferación celular*

Para realizar este ensayo se seleccionaron los dos compuestos que presentaron mayor citotoxicidad sobre las líneas celulares, con la finalidad de observar la tasa de proliferación de las células frente al EMCM 125 y al EMCM 128. De igual forma se realizó la evaluación de los mismos productos sobre los fibroblastos dérmicos humanos.

Esta evaluación se determinó mediante una curva de crecimiento por conteo de las células en cámara de Neubauer, empleando el método de tinción con el colorante azul tripano, tomando las células viables como aquellas sin absorción del colorante y que se encontraban adheridas a la placa. Por otra parte, las células muertas fueron tomadas del sobrenadante, aquellas que presentaban una coloración azul, debida a la penetración del colorante por daños en la membrana. Inicialmente se sembraron 65×10^3 células por placa, para luego aplicar la dosis del producto escogido a la concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) obtenida en el ensayo de determinación de la citotoxicidad para cada tipo celular.

En general en la figura 24a, podemos observar un patrón similar en las curvas de las células que no fueron tratadas con el compuesto, donde podemos observar que el número de células viables aumenta progresivamente. Donde la tasa de proliferación de las líneas tumorales es evidentemente mayor en comparación con la de los fibroblastos. Observándose esto, con un rápido incremento del número de células viables PC3 y HeLa que alcanza alrededor de los 2×10^6 de células al cabo de las 120h, mientras que los fibroblastos solo 295×10^3 células al finalizar el ensayo.

Luego de administrar el EMCM 125 a las células, en función del tiempo las células PC3 (figura 24b), presentan una disminución rápida del número de células viables, alcanzando un valor de 1.5×10^3 células viables al final del tratamiento, mientras que las HeLa (figura 24b) finalizan la exposición con una población viable de 3.5×10^3 células. Estos son valores por debajo del obtenido con los fibroblastos frente a la acción del mismo compuesto, el cual presentó un valor de 15.5×10^3 células.

Cuando las células fueron expuestas al EMCM 128, figura 24c, el comportamiento de las curvas es similar, sin embargo se aprecia una disminución más lenta de la población celular, lo que indica que el producto posee un efecto débil y prolongado sobre las células en comparación con el EMCM 125.

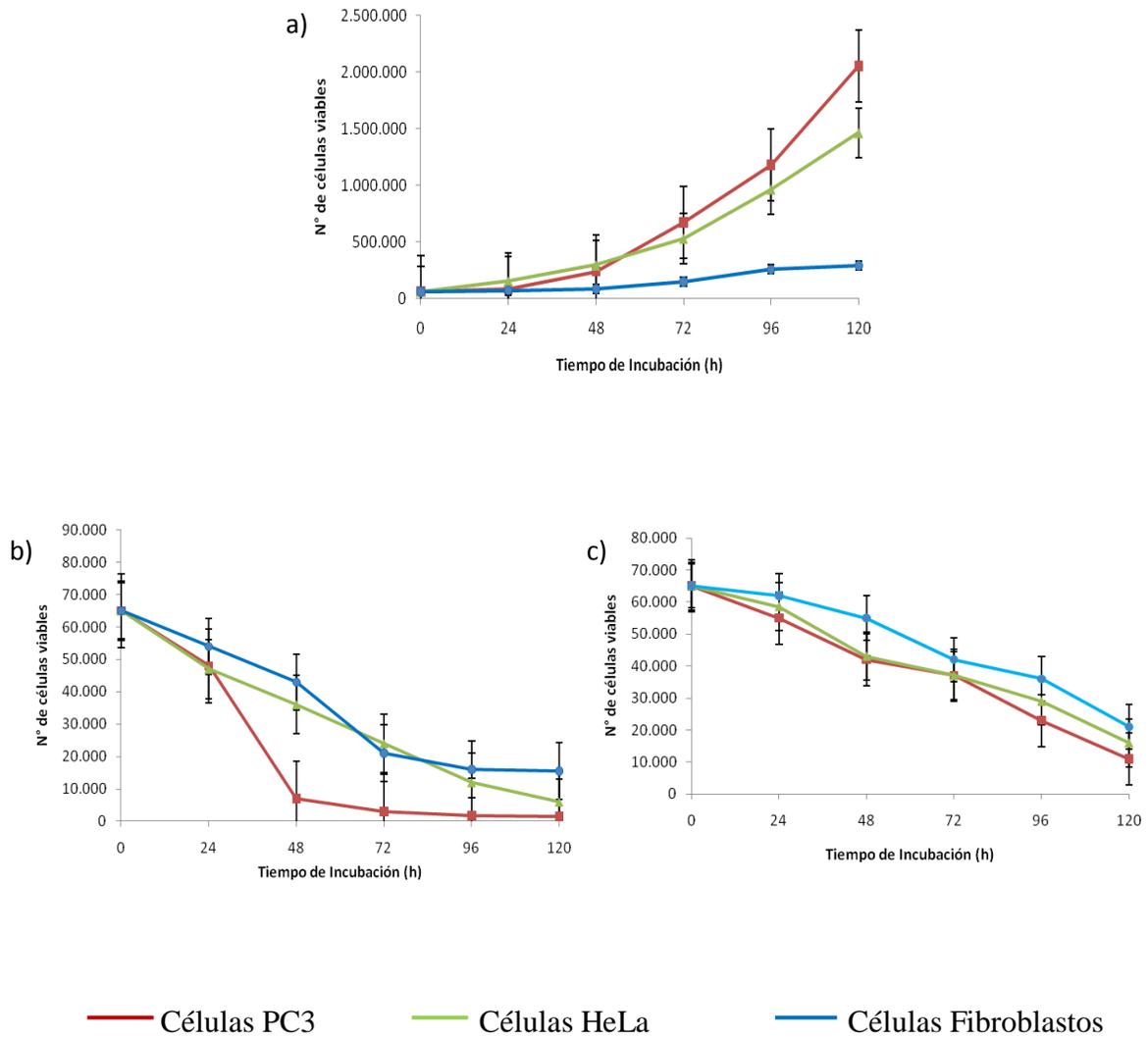


Figura 24. Efecto del EMCM 125 y el EMCM 128 en la proliferación celular. a) Diferentes tipos celulares sin administrar el producto. b) EMCM 125 sobre los tipos celulares. c) EMCM 128 sobre las células.

- *5.4 Ensayo de adherencia celular. Reversibilidad de la viabilidad celular involucrada.*

Ahora bien, cuando observamos la figura 25, apreciamos el desarrollo del cultivo celular de PC3. Donde las células control, sin exposición a los productos, presentan una proliferación a medida que transcurre el tiempo, observándose la formación de la monocapa, llegando a un estado de confluencia a partir de las 72h. A las 120h se observa un apilamiento de las células debido a la cobertura total de la superficie, por lo que las células al continuar su división crecerán unas sobre otras, característica de las células tumorales.

Las PC3 al ser expuestas a los compuestos EMCM 125 y EMCM 128, figura 25- 2 y 25-3, comienzan un proceso degenerativo, el cual concluye con la muerte celular. Este proceso se evidencia desde las 24h de tratamiento para ambos compuestos, incrementando el número de células muertas a medida que transcurre el tiempo del ensayo. Las células al estar en suspensión presentan una morfología circular con bordes corrugados y dentados, lo que sugiere daño en la membrana celular, por lo que observando la figura 25- 2 y 25- 3 podemos inferir que las células presentes están en proceso de apoptosis o muerte.

Al tomar células en suspensión del sobrenadante de cada placa de las células tratadas, se sembraron en medio fresco para observar si existía un efecto reversible de la viabilidad en las células luego de la exposición al compuesto. Se sembraron las células en

suspensión, figura 25- 3a, y luego de 120h en medio fresco, no se observa una recuperación en las células, figura 25- 3e.

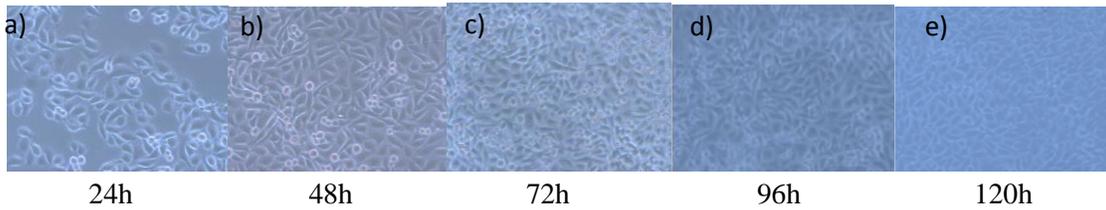
Del mismo modo se llevo a cabo el cultivo de HeLa, donde se observó el mismo comportamiento que en las células PC3, en las células control, figura 26- 1, se observa la monocapa a partir de las 96h, la diferencia de tiempo es debido a la tasa de crecimiento propia de cada tipo celular. Cuando se le agregó la concentración del producto EMCM 125 igual al CI_{50} obtenido para esta línea, a las células, figura 26- 2, éstas comenzaron a desprenderse del sustrato a partir de la 24h, lo que indica un efecto tóxico sobre esta línea celular a corto tiempo de exposición. Observando el máximo efecto a las 120h, figura 26- 2e, donde no se aprecia ninguna célula adherida a la superficie de la placa. Cuando las células HeLa fueron expuestas a EMCM 128, de igual modo se aprecia una progresiva muerte celular, figura 26- 3, donde el producto hace su mayor efecto entre las 48 y 96 h, ya que a las 24 h todavía se encontraron pocas células adheridas a la placa, y a las 120 h evidentemente toda la población celular había muerto. De igual modo cuando las células del sobrenadante fueron sembradas en medio fresco no se observó recuperación de la viabilidad de estas al cabo de 120h.

Este ensayo también se realizó para nuestras células control, los fibroblastos, en donde se apreció el desarrollo normal de estas células cuando no fueron expuestas a los compuestos. En la figura 27-1, se observan los fibroblastos, con una morfología fusiforme y una tasa de proliferación celular menor a las líneas tumorales, por lo que los fibroblastos alcanzaron confluencia cercana a las 96h de cultivo. Al agregarles el CI_{50} correspondiente

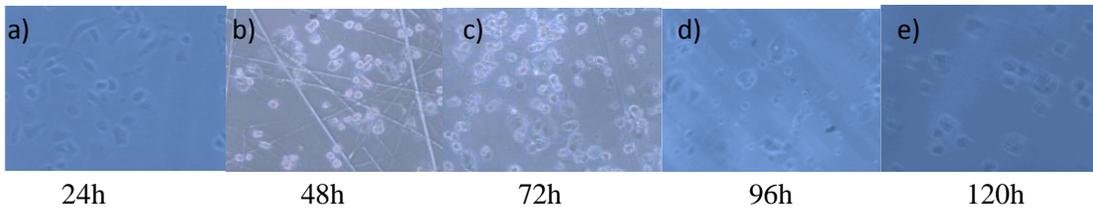
para EMCM 125 y EMCM 128, observamos que las células se ven afectadas por estos compuestos, en menor medida que las líneas tumorales, pero de igual forma se observa la muerte celular al transcurrir el tiempo de exposición a los compuestos. (Figura 27-2 y 3). Cuando observamos la figura 27 -3, notamos que el efecto del EMCM 128 sobre los fibroblastos al igual que sobre las líneas tumorales es menos intenso en las primeras horas de exposición, aumentando su efecto a medida que transcurre el tiempo, llegando a la muerte de la totalidad de la población celular luego de las 96h. Contrario a esto, el EMCM 125 en todas las células en estudio, ejerce su acción tóxica en las primeras horas de contacto con ellas, por lo que observamos la muerte de la mayor parte de la población antes de las 96 h del ensayo.

- Células PC3

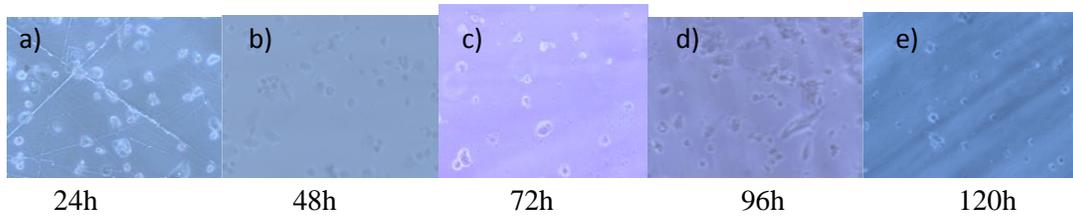
1.- Células no tratadas



2.- Células Tratadas con EMCM 125



3.- Células Tratadas con EMCM 128



3.- Sobrenadante sembrado en medio fresco

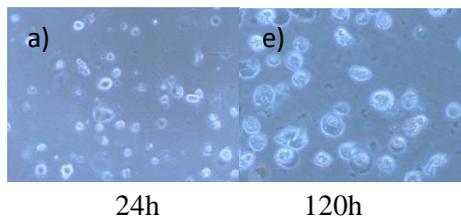
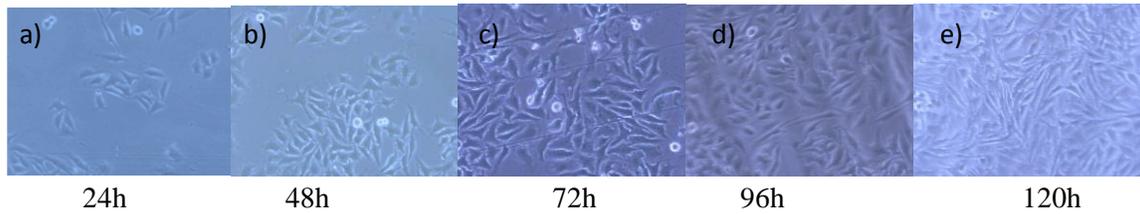


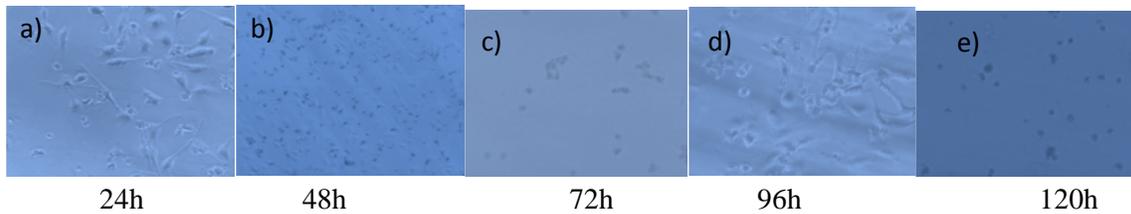
Figura 25. Desarrollo de las células PC3 con y sin exposición de los compuestos a su CI_{50} . 1.- Células control sin exposición al compuesto. 2.- Células tratadas con el compuesto EMCM 125. 3.- Células tratadas con el compuesto EMCM 128. 4.- Sobrenadante tomado de las células tratadas y sembrado en medio fresco. Las letras corresponden al tiempo del cultivo: a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h, e) 120 h.

- Células HeLa

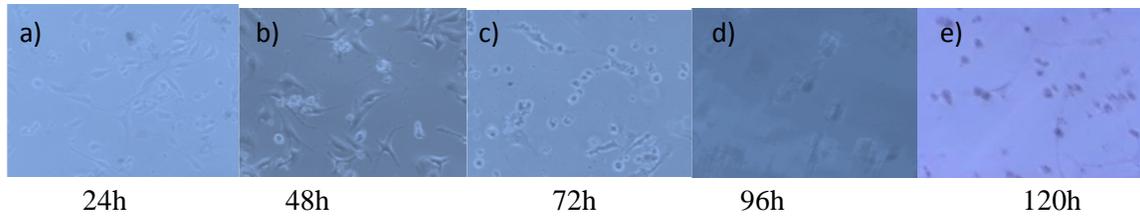
1.- Células no tratadas



2.- Células Tratadas con EMCM 125



3.- Células Tratadas con EMCM 128



4.- Sobrenadante sembrado en medio fresco

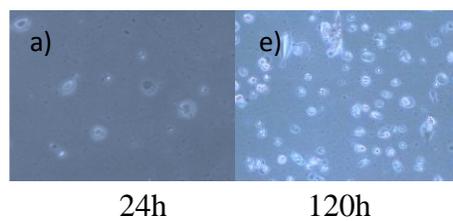
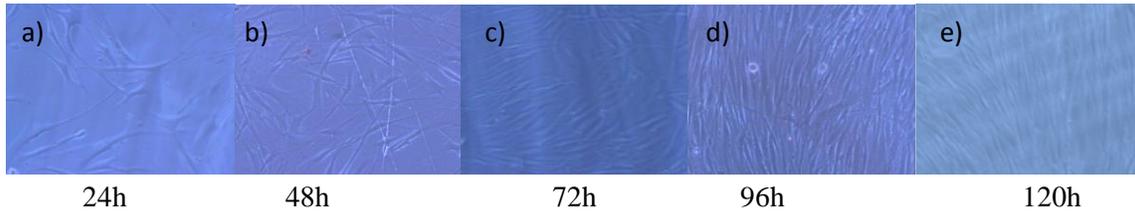


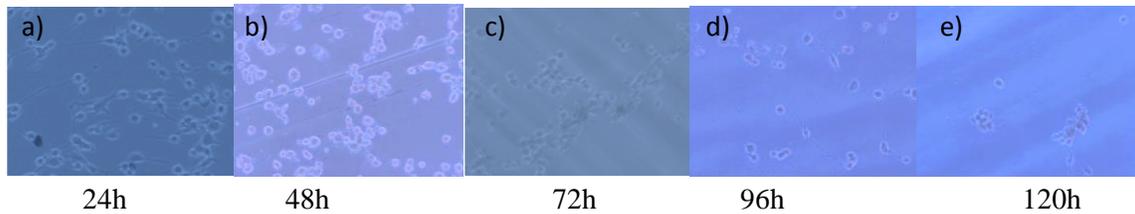
Figura 26. Desarrollo de las células HeLa con y sin exposición de los compuestos a su CI_{50} . 1.- Células control sin exposición al compuesto. 2.- Células tratadas con el compuesto EMCM 125. 3.- Células tratadas con el compuesto EMCM 128. 4.- Sobrenadante tomado de las células tratadas y sembrado en medio fresco. Las letras corresponden al tiempo del cultivo: a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h, e) 120 h.

- Células Fibroblastos

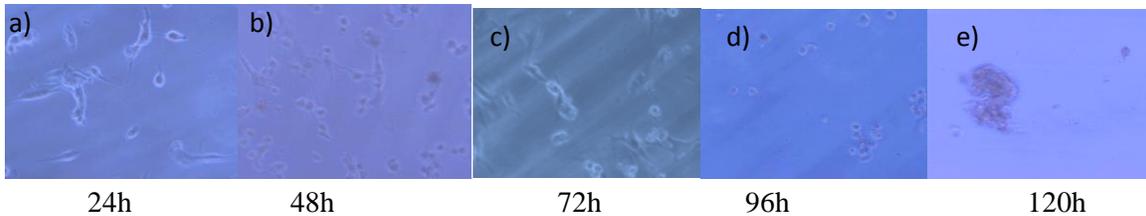
1.- Células no tratadas



2.- Células Tratadas con EMCM 125



3.- Células Tratadas con EMCM 128



4.- Sobrenadante sembrado en medio fresco

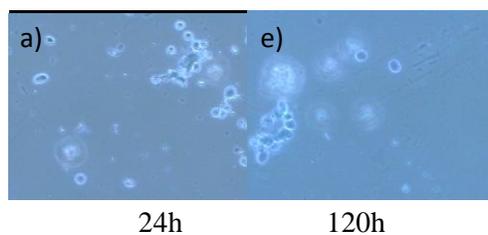


Figura 27. Desarrollo de las células Fibroblastos con y sin exposición de los compuestos a su CI_{50} . 1.- Células control sin exposición al compuesto. 2.- Células tratadas con el compuesto EMCM 125. 3.- Células tratadas con el compuesto EMCM 128. 4.- Sobrenadante tomado de las células tratadas y sembrado en medio fresco. Las letras corresponden al tiempo del cultivo: a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h, e) 120 h.

- *5.5 Índices de Selectividad*

Cuando se evaluó la selectividad del grupo de seco-ent- kauranos mediante la relación de citotoxicidad entre células control y células cancerosas: CI_{50} (Fibroblastos Dérmicos)/ CI_{50} (Línea tumoral). (Callacondo y col., 2008), se obtuvieron los valores mostrados en la tabla 7. Se puede observar que las líneas tumorales presentan una alta selectividad para 5 de los 6 productos evaluados, dado que sus índices son mayores a 1. El EMCM 125 presenta mayor actividad, con un valor de citotoxicidad de 5,4 veces sobre la línea PC3 con respecto a las células control y de 1,7 veces más actividad sobre la línea HeLa en relación a los fibroblastos (control).

Sin embargo, cuando observamos la selectividad del kaurano 150, nos damos cuenta que presenta un valor menor a 1, lo que sugiere una mayor actividad citotóxica sobre las células control en comparación con las células tumorales. Es bueno resaltar que el compuesto 147 a pesar de no presentar la mayor citotoxicidad, refleja unos de los índices de selectividad más demostrativos para las líneas tumorales.

Por otra parte, al evaluar los índices de los fármacos antitumorales, podemos observar en la tabla 8, que presentan valores mayores a 1 lo que indica que son altamente selectivos para la línea tumoral en la que se probó. Sin embargo cuando comparamos estos valores con los obtenidos de los compuestos seco-ent-kauranos, apreciamos que son menores a algunos de los índices obtenidos con nuestros productos, por lo que presentan una mayor selectividad de estos kauranos en relación a los de referencia.

Tabla 7. Valores de Índices de selectividad obtenidos por el grupo de seco-ent-kauranos sobre las líneas tumorales PC3 y HeLa.

Producto	Índice de Selectividad	
	PC3	HeLa
EMCM 125 (Ácido de Caracatine)	5,39	1,73
EMCM 128 (Caracatine)	2,47	1,59
EMCM 141	1,4	1,34
EMCM 145	2,7	1,29
EMCM 147	1,58	1,45
EMCM 150	0,48	0,46

Tabla 8. Valores de Índices de selectividad obtenidos por fármacos antitumorales en las líneas tumorales PC3 y HeLa

Fármaco antitumoral	Índice de Selectividad	
	PC3	HeLa
Adriamicina	1,22	-
Mitomicina C	-	2,79

- *5.6 Combinaciones de compuestos seco- ent-kauranos y fármacos antitumorales. Determinación de Índices de Combinación (IC).*

Una vez evaluada cuantitativamente la actividad citotóxica de los 6 kauranos, se seleccionaron aquellos que mostraron mayor actividad frente a las líneas tumorales, y los cuales se combinarán entre ellos y con los fármacos adriamicina para PC3 y Mitomicina C para HeLa. A partir de los CI_{50} se procedió a calcular los IC de nuestras combinaciones a través del software CalcuSyn, un programa que al emplear los algoritmos adecuados y estandarizados permite la determinación de parámetros específicos de la combinación, así como la simulación de sinergismo o antagonismo en los diferentes valores de dosis y efecto de nuestros datos. (Chou, 2006)

- 5.6.1 Combinaciones sobre células PC3

Los IC obtenidos para la línea tumoral PC3 se muestran en la tabla 9 donde podemos observar que son mayores a 1, excepto para la combinación de EMCM 128/ EMCM 145. Según lo descrito por Chou y Martin (2005), la combinación EMCM 125/ EMCM 128 presentaría un antagonismo débil o moderado, al exhibir un $IC = 1,43$, la combinación EMCM 125/ EMCM 145, presentó un valor igual a 2,21, lo que estaría reflejando un estado de antagonismo entre los compuestos. A diferencia de estas combinaciones, la conformada por EMCM 128/ EMCM 145 presenta un valor menor a 1, lo que expresaría un sinergismo, este valor del efecto observado es mayor que el que se

presenta cuando son evaluados individualmente. En cuanto a los IC de las combinaciones en donde se involucra al fármaco antitumoral Adrimicina, todos los valores son mayores a 15, lo que sugiere que se presenta un efecto antagónico fuerte de estos compuestos cuando son combinados con Adriamicina.

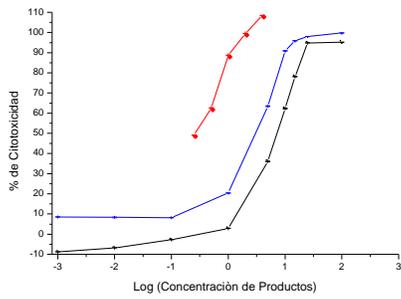
Con los valores del efecto de las dosis administradas de los productos por separados así como de las combinaciones, se realizaron las curvas dosis- respuesta, en donde podemos observar en la figura 28 un comportamiento similar en todas las curvas, las cuales describen una sigmoide. Observamos que en las figuras 28 a, b y c la curva correspondiente a las combinaciones se encuentra desplazada hacia la izquierda, alejándose de las curvas de los productos evaluados individualmente. Contrario a esto, en las curvas donde se utiliza el fármaco Adriamicina en las combinaciones, figuras 28 d, e y f, apreciamos que las tres curvas están muy cerca entre sí, incluso interceptándose entre ellas como es el caso de las combinaciones EMCM 128/Adriamicina y EMCM 145/Adriamicina.

En la figura 29 se hace referencia gráficamente, mediante isobogramas, a los valores de IC obtenidos para todas las combinaciones sobre PC3. Donde en el gráfico C, se presenta un valor por debajo de la línea recta que refleja el carácter sinérgico de la combinación de EMCM 128 y el kaurano 145, descrito anteriormente. Aquellos valores por encima de esta línea (figura 29 a, b, d, e y f) indican el antagonismo de la combinación utilizada, lo que corrobora los valores de índices de combinación mayores a 1 mostrados en la tabla 9.

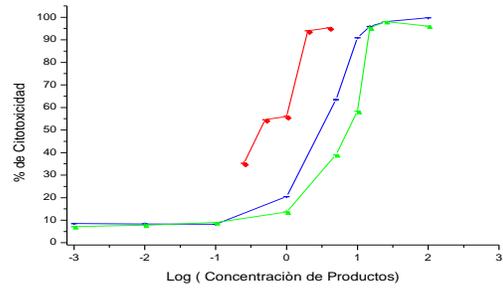
Tabla 9. Índices de combinación (IC) entre los compuestos seco-ent-kauranos y el fármaco antitumoral Adriamicina obtenidos para la línea tumoral PC3

	Compuesto seco-ent-kaurano		Fármaco Antitumoral
	EMCM 128 (Caracasine)	EMCM 145	Adriamicina
EMCM 125 (Ácido de Caracasine)	1,43	1,21	27,67
EMCM 128 (Caracasine)	-	0,44	15,34
EMCM 145	-	-	31,58

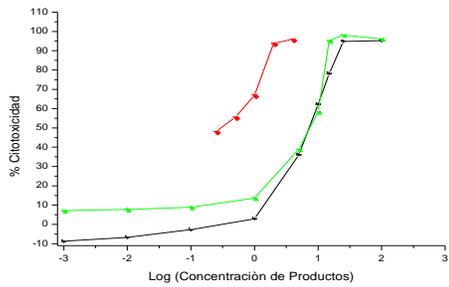
a)



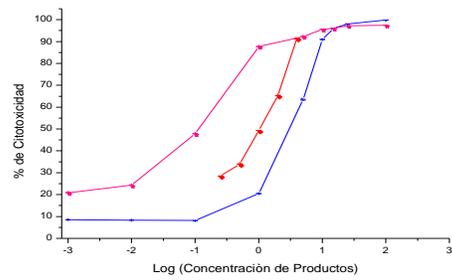
b)



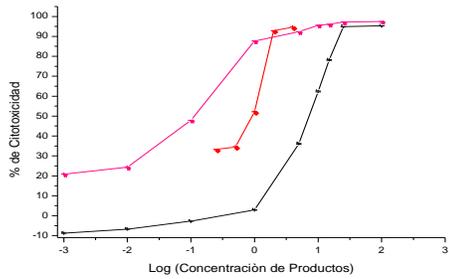
c)



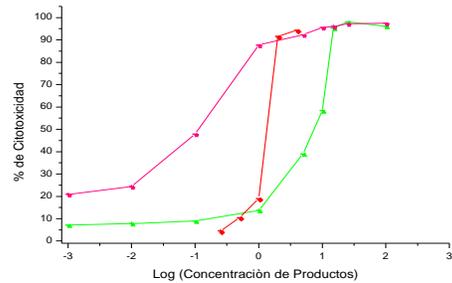
d)



e)



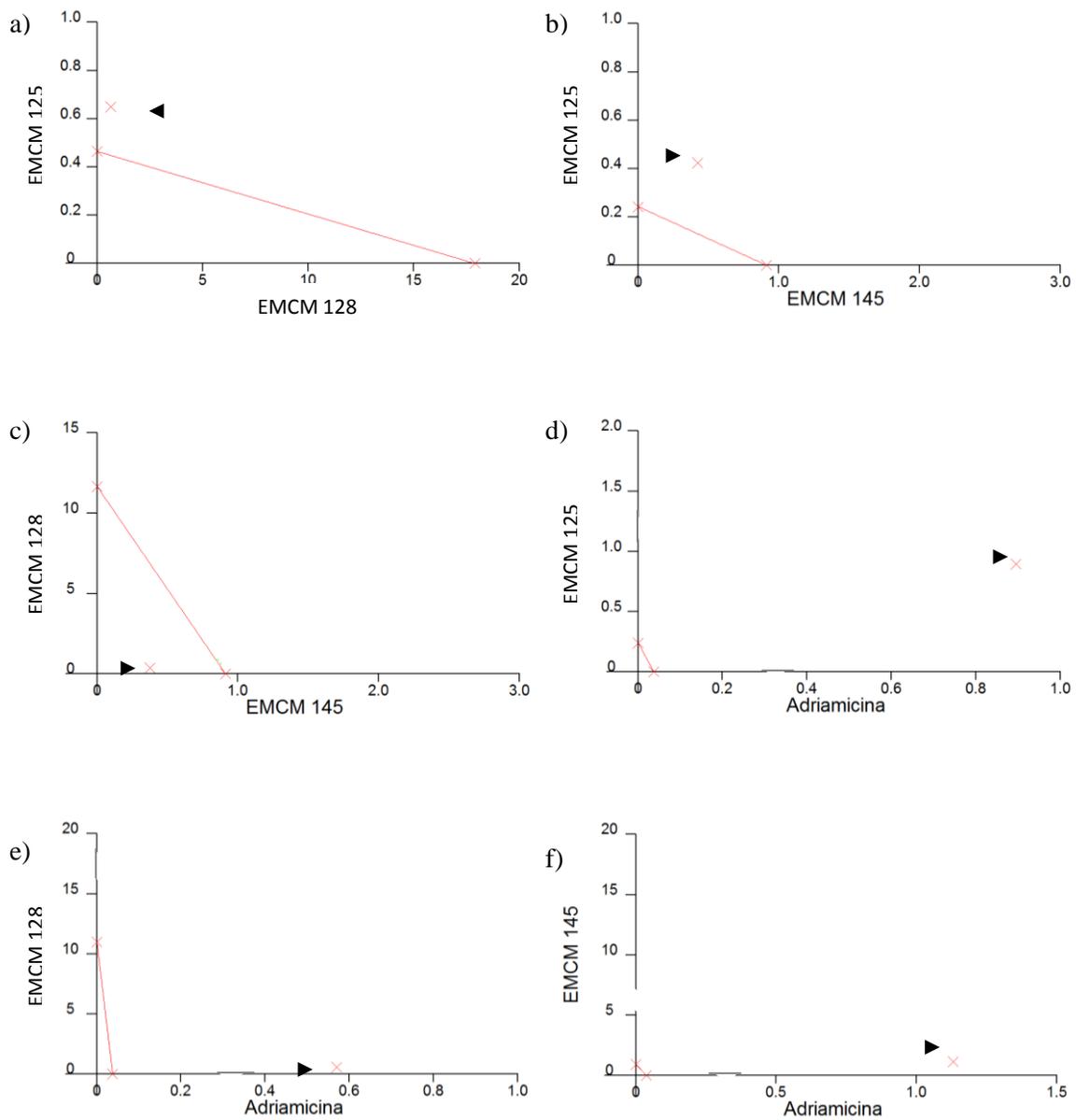
f)



— EMCM 125 (Ácido de Caracaine)
— EMCM 128 (Caracaine)
— EMCM 145
— Adriamicina

— Combinación en cada caso

Figura 28. Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los productos naturales y con el fármaco antitumoral Adriamicina sobre la línea celular PC3. a) Combinación EMCM 125: EMCM 128. b) Combinación EMCM 125: EMCM 145. c) Combinación EMCM 128: EMCM 145. d) Combinación EMCM 125: Adriamicina. e) Combinación EMCM 128: Adriamicina. f) Combinación EMCM 145: Adriamicina



► Valor de IC₅₀ obtenido representado en los isobogramas

Figura 29. Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre la línea tumoral PC3. a) EMCM 125/ EMCM 128; b) EMCM 125/ EMCM 145; c) EMCM 128/ EMCM 145; d) EMCM 125/ Adriamicina; e) EMCM 128/ Adriamicina; f) EMCM 145/ Adriamicina

- 5.6.2 Combinaciones sobre células HeLa

Por otra parte, al evaluar las combinaciones sobre la línea tumoral HeLa, se evidenció una tendencia contraria a la observada con la línea PC3, obteniéndose valores de índices de combinación menores a 1 para las combinaciones entre los productos naturales, EMCM 125, EMCM 128 y EMCM 145; y mayores a 1 para las combinaciones de éstos con el fármaco antitumoral, Mitomicina C, (tabla 10). De acuerdo a los valores de IC podemos inferir que se observa un sinergismo entre el EMCM 125 y el EMCM 128, así como también para la combinación de EMCM 125 y EMCM 128 con el kaurano 145. Por el contrario al presentarse IC mayores a 3,3, valor de referencia tomado de la tabla de Chou y Martín, en las combinaciones de los productos naturales y Mitomicina C, la mezcla tendría una interacción de fuerte antagonismo.

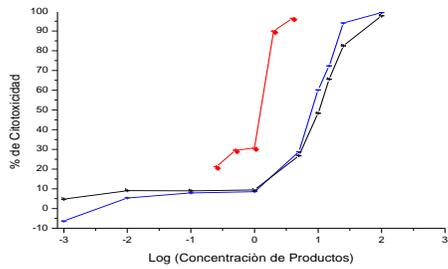
En la figura 30, se aprecian las curvas sigmoides correspondientes a las combinaciones sobre esta línea celular, pudiéndose destacar el hecho de que presentan el mismo comportamiento que las curvas de la figura 28, donde las combinaciones entre los productos naturales están representados por una curva alejada del efecto de los productos por sí solos, lo que sugiere una interacción entre ellos cuando son administrados en proporción 1:1 para el ensayo de combinación. Este resultado de la interacción se ve reflejado en los valores reportados en la tabla de índices de combinación para HeLa, los cuales al ser graficados mediante isobogramas, figura 31, se observan como puntos por debajo de la línea recta, excepto cuando es utilizado el fármaco Mitomicina C, cuyo índice

de combinación con los demás kauranos evaluados se observa como un punto por encima de la línea del isoblograma.

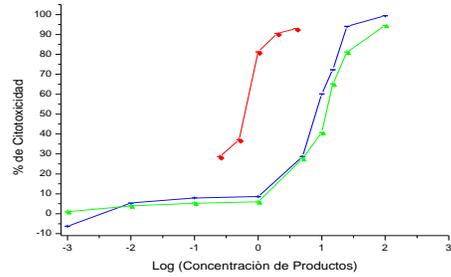
Tabla 10. Índices de combinación (IC) entre los compuestos seco-ent-kauranos y el fármaco antitumoral Mitomicina C obtenidos para la línea tumoral HeLa

	Compuesto seco-ent-kaurano		Fármaco Antitumoral
	EMCM 128 (Caracasine)	EMCM 145	Mitomicina C
EMCM 125 (Ácido de Caracasine)	0,39	0,2	4,49
EMCM 128 (Caracasine)	-	0,19	8,07
EMCM 145	-	-	14,83

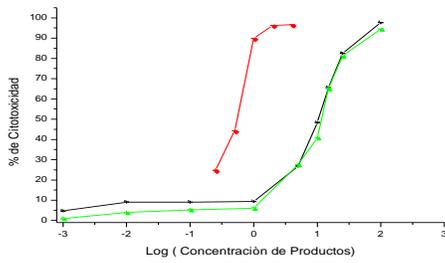
a)



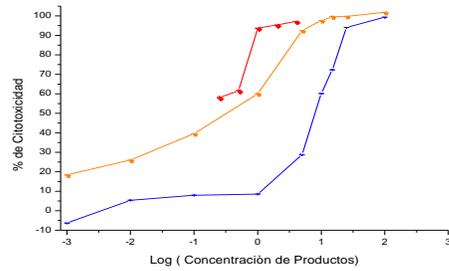
b)



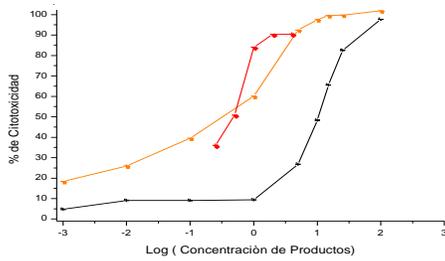
c)



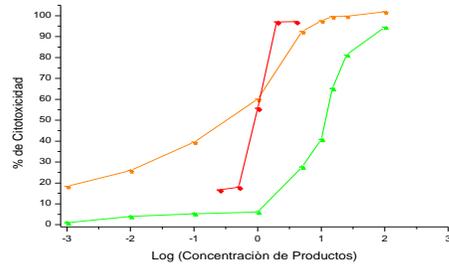
d)



e)



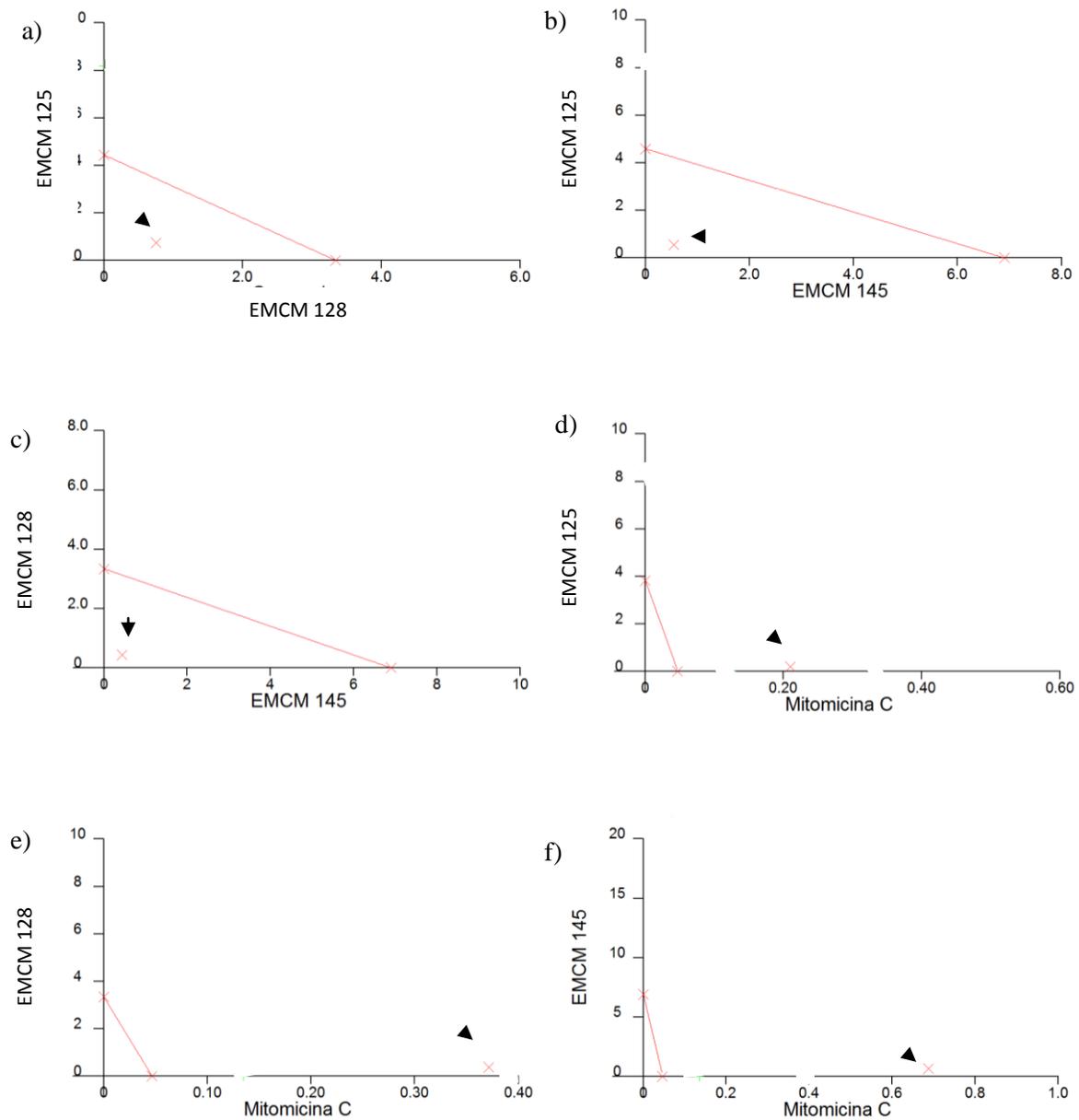
f)



— EMCM 125 (Ácido de Caracasine)
 — EMCM 128 (Caracasine)
 — EMCM 145
 — Mitomicina C

— Combinación en cada caso

Figura 30. Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los productos naturales y con el fármaco antitumoral Mitomicina C sobre la línea celular HeLa. a) Combinación EMCM 125: EMCM 128. b) Combinación EMCM 125: EMCM 145. c) Combinación EMCM 128: EMCM 145. d) Combinación EMCM 125: Mitomicina C. e) Combinación EMCM 128: Mitomicina C. f) Combinación EMCM 145: Mitomicina C



► Valor de IC_{50} obtenido y representado en los isobogramas

Figura 31. Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre la línea HeLa. a) Ácido de caracaine/ Caracaine; b) Ácido de caracaine/ EMCM 145; c) Caracaine/ EMCM 145; d) Ácido de caracaine/ Mitomicina C; e) Caracaine/ Mitomicina C; f) EMCM 145/ Mitomicina C.

- 5.6.3 Combinaciones sobre células Fibroblastos

Por otra parte, se evaluaron los efectos de las combinaciones en los fibroblastos dérmicos humanos, donde se obtuvo un amplio rango de valores de IC, que comprende valores menores a 1 para las combinaciones de los productos naturales entre ellos mismos y valores mayores a 1 para las combinaciones que implicaban los fármacos antitumorales. (tabla 11)

Con estos valores es evidente que los productos naturales presentaron un efecto de sinergismo en la mezcla con ellos mismos, contrario a esto, cualquier combinación de éstos con Adriamicina o Mitomicina C indican un antagonismo fuerte como efecto principal en la acción de estas combinaciones. Esto se hace evidente en la figura 32, donde se pueden observar los efectos de cada producto por separado, así como el de su combinación, reflejando una interacción entre los productos con una curva desplazada hacia la izquierda, figura 32 a y b, lo que señala un mayor efecto citotóxico por parte de dicha combinación, contrario a esto, se observa una curva sigmoide interceptando las otras en el caso donde están involucrados los fármacos antitumorales, figura 32 d,e,f,g,h,i; sugiriendo el efecto antagónico reflejado como una disminución en la actividad de la combinación.

Los valores expresados en la tabla 11 se encuentran reflejados en los isobogramas correspondientes a las combinaciones de los kauranos sobre los fibroblastos, figura 33. Donde los puntos por debajo de la recta indican el sinergismo presente en las combinaciones entre kauranos, y aquellos puntos por encima de la línea recta

correspondientes a las combinaciones de los kauranos con los fármacos antitumorales indicando el antagonismo en diferentes grados de acuerdo a los valores de índices de combinación.

Tabla 11. Índices de combinación (IC) entre los compuestos seco-ent-kauranos y los fármacos antitumorales obtenidos para las células control (fibroblastos)

Compuesto seco-ent-kaurano	Fármaco Antitumoral			
	EMCM 128 (Caracasine)	EMCM 145	Adriamicina	Mitomicina C
EMCM 125 (Ácido de Caracasine)	0,23	0,19	33,78	4,24
EMCM 128 (Caracasine)	-	0,33	43,22	4,06
EMCM 145		-	43,26	4,1

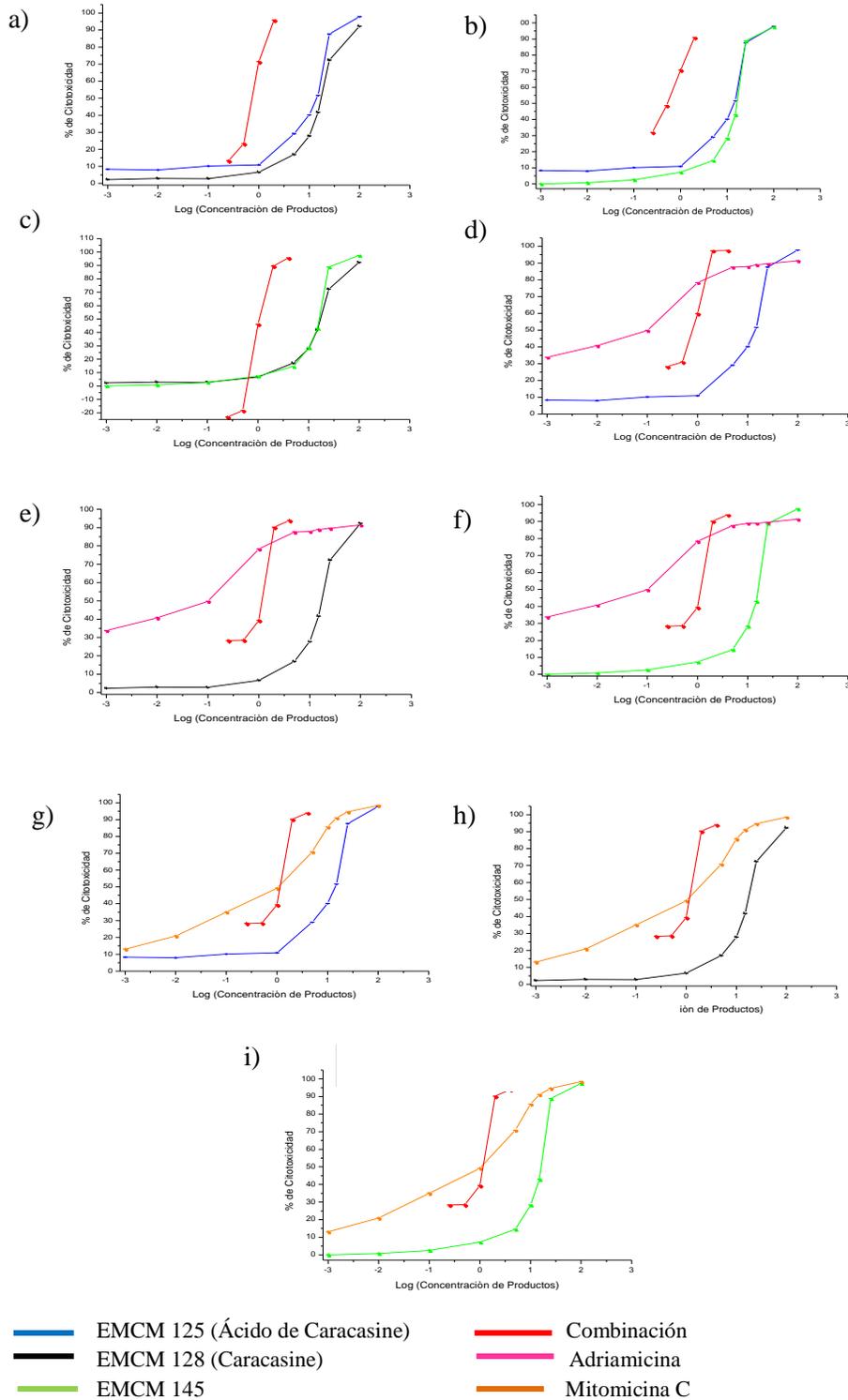


Figura 32. Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los productos naturales y con los fármacos antitumorales sobre los fibroblastos dérmicos humanos. a) Combinación EMCM 125: EMCM 128. b) Combinación EMCM 125: EMCM 145. c) Combinación EMCM 128: EMCM 145. d) Combinación EMCM 125: Adriamicina. e) Combinación EMCM 128: Adriamicina. f) Combinación EMCM 145: Adriamicina. g) Combinación EMCM 125: Mitomicina C. h) Combinación EMCM 128: Mitomicina C. i) Combinación EMCM 145: Mitomicina C

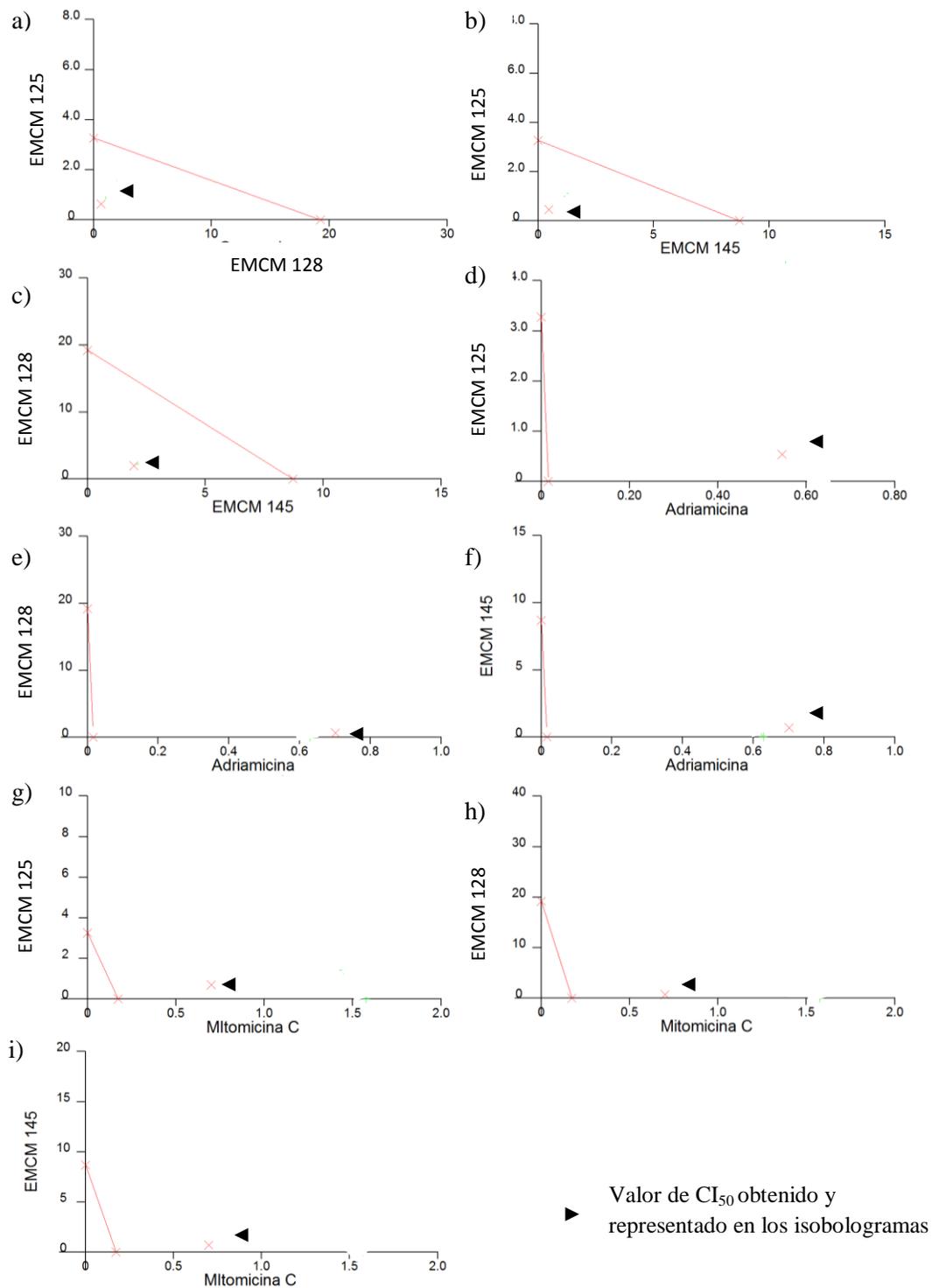


Figura 33. Isobologramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre los fibroblastos. a) EMCM 125/ EMCM 128; b) EMCM 125/ EMCM 145; c) EMCM 128/ EMCM 145; d) EMCM 125/ Adriamicina e) EMCM 128/ Adriamicina; f) EMCM 145/ Adriamicina; g) EMCM 125/ Mitomicina C; h) EMCM 128/ Mitomicina C; i) EMCM 145/ Mitomicina C.

6. Discusión

Los fármacos son moléculas químicas capaces de inducir un efecto en un sistema biológico. (Velazco y col., 1996). Esto es debido a la interacción con componentes macromoleculares del organismo, por otra parte, la actividad que posea un fármaco bien sea natural o sintético estará determinada por la afinidad por su receptor y el grado de actividad intrínseca dependerá de su estructura química.

En el aislamiento e identificación de los componentes químicos de origen natural o sintético complementados con ensayos *in vitro*, se ha encontrado que los kauranos, una serie de diterpenos con estructuras muy singulares en las especies de la familia Euphorbiaceae, exhiben un amplio rango de actividades biológicas: incluyendo citotoxicidad en cáncer y actividad antiinflamatoria. (Suárez y col., 2009)

Propiedades anticancerígenas, de esta familia se evaluaron en el presente trabajo, tomando para ello compuestos aislados de la especie *Crotón micans*, cuyas estructuras químicas son mostradas en materiales y métodos. Estos presentan una unidad básica de seco-ent-kaurano con pequeñas modificaciones de grupos específicos, que determinarán la actividad sobre las líneas tumorales PC3 (próstata) y HeLa (útero) y sobre Fibroblastos dérmicos humanos (células control).

Recientemente se aislaron 2 nuevos seco-ent- kauranos a partir de las flores y hojas de la especie, *Croton caracasana*. (Suárez y col., 2008), estos compuestos corresponden de

acuerdo a su estructura química a dos de los usados por nosotros en el presente trabajo, EMCM 125 y EMCM 128, identificados como ácido de caracaine y caracaine, respectivamente.

La actividad citotóxica de estos compuestos fue evaluada y se encontró valores de CI_{50} muy bajos, como los encontrados en estudios anteriores realizados por Kuo y col. en el 2007, donde se reportan CI_{50} menores a $10 \mu\text{g/mL}$ para la actividad antiinflamatoria de este grupo de metabolitos secundarios aislados de esta familia de plantas, haciendo de estas una potencial fuente para la investigación de nuevos componentes.

Los valores referidos en la tabla 5 sugieren que se requiere de muy poca cantidad de cada producto natural para alcanzar el efecto tóxico sobre las células tratadas con dichos compuestos. Estos resultados sugieren la presencia de la acción del fármaco evaluado, la cual se puede definir como la interacción de éste con receptores celulares, actuando sobre una función determinada, por el contrario el efecto de un fármaco, tomado como la manifestación externa de la acción farmacológica no es apreciado en este ensayo.

(Goodman y Gilman, 2001)

- *6.1 Viabilidad celular frente a los productos naturales*

Nuestra siguiente medición relaciona el efecto del producto estudiado frente a las líneas celulares tumorales y fibroblastos, mediante curvas de viabilidad celular donde a partir de una concentración específica del kaurano se observa su efecto, hasta el punto en que este es máximo. Ésta viabilidad celular determina la cantidad de células vivas a partir de la muestra total inicial, a través de la actividad metabólica de las células viables, en nuestro caso empleando el ensayo de MTT.

Además de la calidad del producto administrado a las células, es importante destacar que en la supervivencia celular influye decisivamente la tasa o distribución temporal de la dosis absorbida. Prácticamente todos los agentes quimioterapéuticos entran en la célula por difusión pasiva, por lo que de manera general, cuanto menor sea la tasa de dosis, menor será la posibilidad de actuación de los productos. (Cordell y col., 1993). Para que uno de estos productos naturales realice la acción farmacológica es necesario que alcance los receptores adecuados y no solo esto, sino que los alcance en concentración adecuada. Así, para un determinado tipo de células, la curva de supervivencia construida con dosis administradas a concentraciones elevadas presentará una disminución mayor que en el caso en el que las dosis administradas sean menores a la dosis letal media, valor que representa el porcentaje de destrucción celular por unidad de dosis empleada.

Esta característica la podemos observar en la tendencia de nuestras curvas de viabilidad celular, donde a medida que aumenta la concentración del producto administrado

se aprecia una disminución progresiva del % de viabilidad, lo que garantiza que a valores pequeños de concentración del producto se encuentra la concentración de la dosis letal media para todos los productos sin embargo, es en las concentraciones superiores a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde todas las curvas presentan el mínimo de viabilidad, estando en presencia de la dosis máxima para estos tipos celulares, lo que ocasiona la muerte de toda la población.

Por otra parte, es necesario considerar la potencia, ya que relaciona la cantidad o dosis administrada y la acción que produce, de esta forma diríamos que un compuesto es tanto más potente que otro, cuanto menor sea la dosis administrada en comparación con otro para conseguir la misma acción. (Furones, 2002)

Tomando el concepto de potencia, nuestras curvas de viabilidad, de los productos EMCM 125 y EMCM 128 presentan mayor potencia con respecto al resto de kauranos evaluados en las dos líneas celulares, así como en los fibroblastos. La diferencia de concentraciones para obtener los mismos valores de inhibición permite decir que el compuesto 141 presenta menor potencia, lo que puede estar relacionado probablemente con la afinidad de estos productos por los receptores involucrados. (Sánchez y Benítez, 2006).

- *6.2 Proliferación celular*

En base a los dos kauranos que presentaron mayor actividad se realizaron las curvas de proliferación (figura 24) en donde se observó un incremento en la tasa celular de las células no tratadas con los compuestos con respecto a las células tratadas, tanto en las líneas tumorales como en las células control. Pudiéndose deber a factores intrínsecos propios de las líneas celulares, referidos a la expresión o no de la oncoproteína p53, un supresor de tumores en los seres humanos, codificada por el gen TP53, cuya función principal es regular el ciclo celular. Ésta proteína al encontrarse mutada no se une de manera eficaz al ADN, y como consecuencia, la proteína p21, no estará disponible para actuar como señal de "stop", para la división celular. (Fridman y Lowe, 2003).

En nuestros resultados cuando las células fueron tratadas con el EMCM 125, a la dosis igual a su CI_{50} obtenido en el ensayo de determinación de la actividad citotóxica, se observó un efecto apreciable, evidenciado con la disminución de células viables en monocapa a cada intervalo de tiempo en que se realizaron los contajes. Esta disminución puede estar relacionada a la pérdida de la capacidad de adhesión de las células al sustrato y su posterior muerte. Este proceso involucra a las moléculas de adhesión celular, generalmente receptores transmembranas, los cuales al encontrarse en la superficie celular presentan una afinidad específica para cada compuesto, el cual al estar en contacto con la célula activa un conjunto de señales intracelulares que afectaran las uniones homofílicas y heterofílicas. (Brackenbury, 1981). Con la pérdida de estas interacciones las células se liberan del sustrato, así como entre ellas, lo que puede ocasionar muerte por apoptosis, en

un proceso llamado anoikis, inducida por insuficientes o inadecuadas interacciones célula-matriz, implicando los procesos de desarrollo homeostático tisular y oncogénico. Este proceso apoptótico es un mecanismo básico de regulación fisiológica del desarrollo en diferentes sistemas celulares y puede desencadenarse por la acción de mediadores fisiológicos o farmacológico. (Sood y col., 2010).

En nuestros resultados observamos diferentes efectos cuando se aplica un mismo compuesto sobre los tipos celulares en estudio, figura 24b y 24c, esto se encuentra reflejado en el estudio realizado por Ruíz y col., 2008, donde señalan que esta variabilidad en la sensibilidad frente a varios compuestos de un mismo grupo, en nuestro caso los kauranos, puede estar relacionado al hecho de que las células poseen dianas moleculares diferentes, a pesar de que los compuestos tienen la misma capacidad de inducir apoptosis en las diferentes líneas celulares, pudiendo ser esto la diferencia entre PC3 y HeLa en cuanto a la sensibilidad observada a la exposición de nuestros compuestos.

Es importante destacar el hecho de que los fibroblastos a pesar de ser nuestras células control, se ven menos afectados por la acción de los compuestos, con una disminución en número de células viables al transcurrir el tiempo, evidenciado en la figura 24b y 24c, mostrando su sensibilidad tanto al EMCM 125 como al EMCM 128. Sin embargo, en ambos casos la disminución de la viabilidad es menor a la de las líneas tumorales, lo que puede deberse a la presencia de la proteína p53, la cual le permite a los fibroblastos reparar los daños que sufre el ADN, inducidos por diversos factores, pudiendo

ser uno de ellos la administración del producto natural, para finalmente proteger así a las células contra la apoptosis. (Ford y col., 2003).

- *6.3 Adherencia celular. Reversibilidad de la viabilidad celular involucrada.*

Con los resultados de las curvas descritas anteriormente, surgió el interés en demostrar el estado de reversibilidad de los efectos presentes en las células tratadas con los productos, para poder establecer si una vez que se retira su exposición a los compuestos, las células volvían a su estado viable original.

Esta reversibilidad implica que la acción de los productos en un momento determinado no es permanente. Sugiriendo que éstos forman el complejo compuesto-receptor, se liberan después de dar la acción, se metabolizan y se excretan. (Soriano y Poveda, 2008)

Sin embargo, el hecho de ser reversible hace que acabe la acción farmacológica, por lo que, en general los fármacos antitumorales como agentes quelantes, se unen de forma casi irreversible y forman un enlace covalente, en donde el ADN, no se puede duplicar, evitando así, que esta célula sea viable y por lo tanto muere. (Goodman y Gilman., 2001)

Luego de tomar las células del sobrenadante, de cada intervalo de tiempo, tanto de PC3, HeLa y fibroblastos, expuestas a nuestros productos, se volvieron a sembrar en medio fresco, (figuras 25-4, 26-4, 27-4). Se hicieron observaciones cualitativas al transcurrir los

días, con la idea de apreciar algún cambio en su morfología, que indicase que se estaba llevando a cabo un proceso reversible por parte de las células al no encontrarse en contacto con el compuesto.

Sin embargo, recientemente se ha descrito la habilidad de un ent- kaurano específico para prolongar la detención mitótica de forma irreversible sobre líneas de células epiteliales tumorales, un efecto característico que a veces precede a la apoptosis (Ruiz y col., 2008). Por lo que no es extraño observar un proceso de total deterioro por parte de las células, sin importar el tiempo en el cual fueron sometidas a la acción del kaurano.

El comportamiento de las nuevas células, fue igual para todos cultivos, las células que estaban muertas (por estar en suspensión en la primera etapa de exposición) no se recuperaron. Con esto podemos decir que la acción del EMCM 125 así como el EMCM 128 se trata de un efecto irreversible sobre las líneas tumorales y los fibroblastos.

Esto sugiere la presencia del efecto proapoptótico por parte de estos compuestos, que de acuerdo a estudios anteriores referentes a un ácido ent- kaurenoico similar, podrían promover la activación de la caspasa 3 y la división específica de PARP , induciendo la fragmentación del ADN nucleosomal así como la reducción en los niveles de proteína Bcl-2, reguladora de los procesos de permeabilización mitocondrial, constituyendo un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular.(Danial y Korsmeyer, 2004)

- *6.4 Selectividad de los kauranos evaluados*

Estudios anteriores sobre las actividades biológicas de grupos de kauranos ha sido centrada en su actividad citotóxica, en donde algunos ensayos han implicado la comprensión del mecanismo molecular subyacente contra el cáncer. Este estudio de los mecanismos de acción sobre las células comienza conociendo la selectividad del compuesto, la cual se define de acuerdo con la afinidad de un compuesto determinado por su sitio de unión. Este parámetro permite predecir su efecto terapéutico y sus efectos adversos potenciales. Es por ello que afirmamos que la selectividad está en función de los receptores celulares, agrupaciones químicas en la membrana celular. (Giang y col., 2003)

Todos los compuestos incluyendo fármacos y productos naturales terapéuticos deben ser selectivos, actuando únicamente sobre aquellos receptores celulares específicos para ellos, por lo que podemos observar diferentes valores de selectividad de un mismo compuesto frente a diferentes tipos celulares.(Flórez y col., 2008). Con esto podemos decir que 5 de los 6 kauranos evaluados son selectivos hacia las líneas tumorales, ya que sus índices son mayores a 1, lo que garantiza que el efecto sobre las células control es menor en comparación con las tumorales, generando un riesgo menor contra las células normales.

Ahora bien, cuando observamos los índices de selectividad de la adriamicina frente a las células PC3 y los comparamos con los obtenidos con los resultados de nuestros productos, se evidencia que el fármaco presenta menos selectividad, propiedad que puede estar asociada a su mecanismo de acción, ya que éste induce apoptosis a través de

diferentes sitios activos, que pueden estar presentes tanto en las células tumorales como en las células normales. (Müller y col., 1997)

- *6.5 Relación estructura- actividad de los kauranos*

Cuando se quiere entender los procesos involucrados en la actividad observada por parte de los kauranos se les atribuye el efecto sobre las células específicamente a su estructura química. Lo que se demuestra al comparar nuestros resultados, evidenciándose que el aumento o disminución en la actividad citotóxica se debe en gran medida a los cambios de grupos funcionales en las estructuras de los compuestos. (Sylvestre y col., 2006).

Para poder evaluar los cambios de los diferentes compuestos nos referimos a sus estructuras químicas en esta parte del estudio, para identificar la acción de los grupos funcionales presentes, así como su posible relación con el efecto que generan. El compuesto EMCM 125 presenta un grupo carboxilo, formado por un grupo cetónico y un grupo hidroxilo, lo que le otorga a la molécula una alta solubilidad en medio acuoso, permitiéndole esto actuar directamente sobre las células que son expuestas a diferentes concentraciones del compuesto. (Chang y College, 2002) Éste presenta el mayor efecto tóxico sobre nuestras células en estudio, por lo que será tomado como molécula patrón, a partir de la cual se realizarán comparaciones en las estructuras de los siguientes compuestos.

En el compuesto EMCM 128, la modificación estructural que se observa, ocurre en el grupo hidroxilo del grupo carboxilo de la molécula patrón, cuyo hidrógeno es reemplazado por un metilo, formándose así un éster como grupo funcional de este compuesto. La presencia de este grupo disminuye su solubilidad, en comparación con el EMCM 125, la presencia de este grupo funcional disminuye la actividad citotóxica de la molécula, ya que al estar en contacto con el medio acuoso, puede ocurrir una hidrólisis, descomponiéndose la molécula en un alcohol y el ácido carboxílico, formándose el compuesto EMCM 125 a partir del EMCM 128. Este cambio del EMCM 128 lo observamos en nuestros resultados, donde se evidencian valores de CI_{50} bajos, debido a la modificación estructural a la cual está sometido el compuesto, previo a la acción sobre las células, siendo esta actividad menor en comparación con el ácido. (Carey, 2006)

Es importante destacar el comportamiento del efecto por parte de estos compuestos, reportado anteriormente en el ensayo de proliferación celular, en donde se observa una disminución de la viabilidad a corto tiempo de exposición de las células frente al EMCM 125, es decir, el efecto máximo observado por acción de éste producto ocurre a las pocas horas. Por el contrario, cuando se evalúa la acción del EMCM 128 se hace notar la presencia de una citotoxicidad menor en los primeros días, en comparación con el ácido, pero su actividad continua en el resto del ensayo, lo que indica que alcanza su efecto máximo en un tiempo mayor comparado con el primero, a pesar de que los efectos sobre el número de células viables sea similar. Esto puede estar relacionado al proceso de hidrólisis mencionado anteriormente, ya que el medio de cultivo en el que se encuentran las células contiene el agua necesaria para que ocurra, con esto podemos decir, que la segunda parte de

la actividad observada al utilizar al EMCM 128 como producto a evaluar, corresponde a la actividad de un ácido carboxílico formado a partir de este.

El kaurano 141 presenta la citotoxicidad más baja de este grupo de compuestos evaluados. En lo referente a su estructura química, esto puede estar relacionado con la presencia de dos grupos hidroxilo. En los alcoholes hay un átomo de hidrógeno unido a uno de los elementos más electronegativos, el oxígeno, los electrones que intervienen en el enlace están más atraídos por el oxígeno que por el hidrógeno. Esto da como resultado la formación de una ligera carga negativa sobre el oxígeno y una ligera carga positiva sobre el hidrógeno, esta diferencia hace que en los alcoholes se presenten puentes o enlaces de hidrógeno entre las moléculas. Lo que genera una alta solubilidad en agua, pudiéndose explicar si se tiene en cuenta que un compuesto que forma puentes de hidrógeno consigo mismo también puede formarlos con el agua. (Carey, 2006).

También podemos inferir que si este producto (EMCM 141), se solubiliza fácilmente en medio acuoso, al contacto con el medio de cultivo, antes de ingresar a las células, una parte del producto se podría solubilizar en el medio y la cantidad que queda disponible en su forma original es el que ingresa al interior celular, generando el efecto que observamos.

Un compuesto interesante, es el kaurano 145, el cual presenta el mayor peso molecular, y un grupo biciclo en el carbono donde se encuentra el etilo del EMCM 125. Este compuesto es el más lipofílico de todos, característica que condiciona su potencia y

duración de la acción. En nuestros resultados se observó el efecto dosis dependiente de este compuesto, el cual es cercano a los valores obtenidos con el EMCM 125 y el EMCM 128. Efectos similares son reportados para diversos extractos lipofílicos sobre diferentes tipos de cáncer, utilizando semillas de una planta diferente, *Cucurbita pepo L.* (Menéndez y col., 2006)

Por otra parte, el peso molecular del kaurano 145 hace posible que su ingreso a la célula pueda llevarse a cabo por pinocitosis, proceso mediante el cual un compuesto de elevado peso molecular, atraviesa la membrana celular englobándose en ella y formando pequeñas vesículas en el interior de las células, para luego liberarse al citoplasma. Al tratarse el compuesto EMCM 145 un dímero del EMCM 125, el producto accede al lugar de acción de la célula a una concentración mayor, a pesar de agregar la misma cantidad de ambos compuestos, lo que podría explicar el elevado efecto citotóxico que desarrolla el EMCM 145 sobre las líneas tumorales así como sobre las células control. (Campbell y Reece, 2007).

El compuesto 147 presenta una modificación en el carbono del grupo carbonilo de la molécula patrón, el cual se encuentra reemplazado por un alcohol (OH), cuyas propiedades químicas están relacionadas con la formación de puentes de hidrógenos entre moléculas similares. Este compuesto presenta valores similares para las dos líneas tumorales.

Por otra parte, en cuanto al compuesto 150, se puede apreciar una modificación más compleja de su estructura, presentándose un grupo éter y un éster. El primero se encuentra en el carbono donde existe el grupo carbonilo del EMCM 125, y el segundo reemplaza el hidrógeno del hidroxilo del ácido carboxílico. Por sus propiedades químicas este grupo funcional presenta mayor facilidad a hidrolizarse, por lo que al encontrarse la molécula en contacto con el agua se van a formar diferentes estructuras a partir de la molécula del kaurano 150. Entre ellas se encontrarán al mismo tiempo una porción de la molécula inicial, una parte hidrolizada el éster, y moléculas con ambos grupos funcionales hidrolizados. Por lo que el efecto citotóxico observado puede ser el resultado de la acción de todas estas moléculas en conjunto.

- *6.6 Combinaciones de compuestos seco-ent-kauranos y fármacos antitumorales*

El uso de múltiples fármacos con diferentes estructuras moleculares, mecanismos o modos de acción puede establecer el efecto contra una patología en particular de manera eficaz. Por lo que resulta de interés que en la actualidad se lleven a cabo estudios referentes a la combinación de grupos de fármacos, así como de productos naturales, para poder observar su efecto final. En base a esto se busca aumentar la eficacia del efecto terapéutico de fármacos, disminuir la dosis, pero a su vez aumentar o mantener la misma eficacia para evitar la toxicidad, y finalmente minimizar o detener el desarrollo de resistencia a los medicamentos.

Para esta parte del trabajo se utilizaron los kauranos con mayor actividad citotóxica, realizando combinaciones entre ellos y con los fármacos antitumorales en proporción 1:1 según lo descrito en la metodología. Esto permitió calcular el Índice de Combinación (IC), un concepto que fue planteado por Chou y Talalay en 1983, el cual mediante el desarrollo de una ecuación general de dosis- efecto y su teorema, permite cuantificar la relación de sinergismo o antagonismo de los compuestos combinados. Partiendo del principio físico de la ley de acción de masas y utilizando métodos de inducción y deducción se estableció la siguiente correlación: si el IC < 1 , indica sinergismo, $= 1$ efecto aditivo y > 1 indica antagonismo. (Chou y Talalay, 1983, 1984, Chou 1991).

En estudios anteriores realizados con compuestos sintéticos, se llevó a cabo la misma metodología aplicada en este trabajo, con lo que al momento de realizar las combinaciones de dichos compuestos sintéticos con fármacos antitumorales se obtuvo un amplio rango de índices de combinación correspondientes al efecto de estos compuestos sobre las células evaluadas, expresando sinergismo o antagonismo en los diferentes casos. (Muñoz, 2008)

Cuando se desea determinar la actividad farmacológica de un compuesto determinado se pueden emplear las curvas dosis-respuesta, las cuales permiten estimar el efecto de una dosis administrada, y nos proporcionan a la vez, una medida de la magnitud de la actividad del compuesto a esa dosis dada. Éstas curvas presentan una forma sigmoidal, expresando en el eje X el logaritmo de las concentraciones de los productos empleados, y en el eje Y la respuesta de las células frente a estas dosis. En estas curvas

podemos observar claramente la potencia y la eficacia de los compuestos, por lo que al emplearlas para determinar la variación en el efecto de los kauranos utilizados en nuestras combinaciones, además de saber la relación sinérgica o antagonista entre ellos podremos apreciar si existe alguna variación en la potencia de la combinación con respecto a la acción de los productos individuales.

- 6.6.1 Combinaciones sobre células PC3

El antagonismo observado en la combinación EMCM 125/ EMCM 128 en la línea tumoral PC3, puede observarse como una disminución o inhibición de los efectos de los agonistas, ya que los productos pudiesen actuar a través de receptores diferentes con acciones opuestas o modificándose la absorción y distribución de cada uno de ellos. A pesar de que se conoce la contribución de la combinación en el efecto observado, no se conoce cuantitativamente las proporciones de las contribuciones de los mecanismos de cada producto por separado.

Cuando observamos la figura 28, apreciamos que en nuestras combinaciones donde se encuentran involucrados solo los kauranos, (a,b y c); en la línea celular PC3, notamos un leve incremento en la potencia, representado por el desplazamiento de la curva sigmoide de la combinación hacia la izquierda. Lo que a pesar de indicar un antagonismo leve reflejado en los índices de combinación, sugiere que la interacción entre los compuestos presenta mayores efectos sobre las células que cuando fueron evaluados individualmente. Refiriéndonos a las mismas curvas, la eficacia de las combinaciones presenta un ligero

incremento respecto a los productos por separado. Este aumento se evidencia en el final de la curva sigmoide de la combinación, la cual termina por encima de los valores finales de las curvas de los compuestos individuales. Esta eficacia determina la capacidad del compuesto de producir el efecto máximo, por lo que podemos decir que nuestras combinaciones entre los kauranos presentan una magnitud mayor del efecto que producen, por lo que efectivamente son más eficaces que los productos suministrados separadamente.

Por el contrario, en las combinaciones de los kauranos con el fármaco Adriamicina sobre PC3, figura 28 d, e y f, se aprecia una disminución en la potencia de la combinación respecto a los productos solos, ya que se observa con el desplazamiento de ésta curva hacia la derecha, quedando entre las otras sigmoides. Ésta disminución se corresponde con el alto índice de combinación, indicando un fuerte antagonismo por parte de estos compuestos, reflejando así una disminución del efecto citotóxico. El efecto máximo observado en estas tres combinaciones es el mismo, a pesar de requerirse diferentes concentraciones para alcanzarlo, por lo que podemos decir que la eficacia de los kauranos en presencia de Adriamicina es similar a la presentada por cada uno de ellos por separado.

Los isobogramas, figura 29, fueron construidos con la determinación de la dosis letal media de los dos compuestos de mayor efecto administrados individualmente sobre las células, una vez realizada la combinación de estos, se obtuvo la fracción de células muertas reflejada en el índice de combinación, el cual si se encuentra cerca o en la línea recta del isobograma representa una interacción aditiva entre los compuestos, mientras que combinaciones donde este valor se encuentra por debajo o por encima de esta línea representan sinergismo o antagonismo, respectivamente. (Flis y Splawinski, 2009)

- 6.6.2 Combinaciones sobre células HeLa

Ahora bien, en las combinaciones sobre HeLa observamos el mismo comportamiento entre los kauranos, donde se destaca en la figura 30 un incremento en la potencia, observado de igual forma con el desplazamiento de la curva de combinación hacia la izquierda, esta potenciación va a depender de la afinidad de los receptores por unirse al compuesto, de la eficacia de la interacción compuesto- receptor, y de la capacidad para alcanzar el sitio receptor, por lo que este incremento puede ser el resultado de la combinación de estos procesos farmacocinéticos. Sin embargo, contrario a la de las combinaciones sobre PC3, la eficacia se mantiene igual a la observada por cada kaurano, sugiriendo que los efectos producidos por la combinación al final del ensayo, son los mismos cuando los compuestos son administrados individualmente. Al emplear el fármaco de referencia en este caso, Mitomicina C, se observa en la combinación con EMC125 una potenciación muy leve, lo que no se aprecia en las combinaciones de éste fármaco con los otros kauranos, donde la sigmoide se encuentra entre las curvas de los compuestos por separado. La variación de los índices de combinación, reflejan diferentes grados de antagonismo en nuestras combinaciones de los kauranos con el fármaco, lo que se podría explicar por la cercanía o similitud de las curvas sigmoides obtenidas para las combinaciones, comparado con la curva de Mitomicina C sola. Al comparar el comportamiento de éstas curvas se puede inferir que la actividad de los kauranos es muy baja, por lo que su actividad citotóxica es aportada solamente por el fármaco antitumoral.

- 6.6.3 Combinaciones sobre las células fibroblastos

Con respecto a las combinaciones sobre los fibroblastos, podemos apreciar en la figura 32, que las curvas sigmoideas de las combinaciones entre los kauranos presentan una potenciación, evidenciándose la contribución de ambos compuestos en un proceso sinérgico con valores de índices de combinación menores a 1. De forma general las combinaciones de los kauranos con los fármacos antitumorales, presentan la misma tendencia, en donde se observa la curva de la combinación con igual eficacia, siendo la interacción de los fármacos el que determinará el efecto final observado. Por otra parte, este comportamiento antagónico de estas combinaciones podría estar relacionado a las características propias de estas células normales, las cuales como se mencionó anteriormente, presentan toda la maquinaria necesaria para su reparación celular, por lo que podrían ser menos quimiosensibles que las líneas tumorales cuando fueron sometidas a la acción de las mismas combinaciones de productos y fármacos antitumorales.

7. Conclusiones

- El grupo de compuestos seco-ent-kauranos evaluados presentan una marcada citotoxicidad sobre las líneas tumorales PC3 y HeLa, siendo EMCM 125 en PC3 y HeLa, y EMCM 128 y EMCM 145 sobre las PC3, los compuestos que poseen mayor efecto.
- La citotoxicidad obtenida por el grupo de compuestos seco-ent-kauranos evaluados sobre el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos, es menor a la observada sobre las líneas tumorales.
- La inhibición celular obtenida tanto para las líneas tumorales (PC3 y HeLa) como para las células control (fibroblastos), aumenta conforme se administra la dosis de los compuestos, lo que representa una tendencia dosis- respuesta característica de la acción de estos compuestos sobre estos tipos celulares
- Los compuestos EMCM 125 (Ácido de caracaine) y EMCM 128 (Caracaine) son los que presentan mayor potencia del grupo de compuestos evaluados, expresando los menores valores de CI_{50} , así como las curvas de viabilidad celular con mayor pendiente, indicando grandes descensos en la viabilidad con pequeños incrementos en la concentración de producto agregado.
- Las características intrínsecas de las células determinará su tasa de proliferación, por lo que se observó una mayor tasa en las líneas tumorales en comparación con los fibroblastos, las cuales se comportan como células normales sin alteración en su ciclo celular.

- Los compuestos EMCM 125 y EMCM 128 actúan sobre diferentes mecanismos en las células ocasionando la muerte celular, lo que puede estar relacionado a un proceso proapoptótico por parte de estos compuestos sobre los tipos celulares evaluados.
- La acción de los compuestos de mayor citotoxicidad, EMCM 125 y EMCM 128, se lleva a cabo en un proceso irreversible, donde una vez las células se encuentran en contacto con los productos, inician un proceso de deterioro de su integridad, viéndose afectadas tanto las líneas tumorales como las células control.
- Para las células PC3 y HeLa, 5 de los 6 compuestos seco-ent-kauranos evaluados presentaron un índice de selectividad mayor al de fármaco antitumoral Adrimicina, lo que se traduce en un mayor margen de seguridad en cuanto a la actividad citotóxica sobre células normales.
- El compuesto EMCM 150 presentó un índice de selectividad menor a 1, lo que indica que este compuesto tiene una acción tóxica mayor sobre las células control (fibroblastos) que sobre las líneas tumorales, por lo que, no podría ser considerado como un potencial agente terapéutico.
- Se puede inferir que las diferencias encontradas en los valores de CI_{50} para cada uno de los compuestos evaluados, se deben a varios aspectos, entre los que se pueden mencionar: estructura y peso molecular de cada uno de las moléculas químicas estudiadas, capacidad de difusión a través de la membrana celular y diferencia de afinidad de los compuestos por las moléculas que estén actuando

como blancos de acción, en cada una de las líneas celulares tumorales y células control utilizadas en este estudio.

- Cuando los compuestos EMCM 125, EMCM 128 y EMCM 145 son combinados entre sí, para observar su efecto sobre las células PC3, observamos un antagonismo leve por parte de ellos, lo que puede estar relacionado con los diferentes blancos en estas células sobre los que actúan.
- Las combinaciones realizadas sobre las células HeLa y Fibroblastos, empleando los kauranos EMCM 125, EMCM 128 y EMCM 145, reflejan una interacción de tipo sinérgica por parte de ellos.
- Los fármacos antitumorales Adriamicina y Mitomicina C combinados con los kauranos, presentaron una interacción antagónica fuerte sobre las dos líneas celulares y los fibroblastos, viéndose afectada la potencia de la combinación en relación a la de los compuestos individuales.
- Todas aquellas combinaciones que presentaron un sinérgismo, específicamente las realizadas entre los compuestos seco- ent- kauranos, presentan una mayor efectividad, y pueden ser consideradas como una alternativa en el momento de escoger entre ellas y las combinaciones que involucren los fármacos antitumorales.

8. Recomendaciones y Perspectivas

- Desarrollar metodologías complementarias con las cuales se pueda cuantificar los efectos de los productos naturales a nivel molecular, ya que permitirán la selección de la adecuada dosis de los compuestos evaluados sobre los diferentes tipos celulares.
- Al obtener el efecto citotóxico de los productos aislados de *Crotón micans*, se inicia el desarrollo de un nuevo medicamento potencial, por lo que, al seguir esta línea de investigación, es conveniente realizar evaluaciones sobre los mecanismos de acción de los productos sobre las células evaluadas en este estudio, para así poder completar el desarrollo y utilización de estos en la terapia contra el cáncer .
- Las características de los bioensayos empleados al momento de evaluar el efecto de los productos naturales sobre un tipo celular determina los resultados observados, por lo que el conocimiento previo de los compuestos (estructura, propiedades físicas y químicas, entre otras), así como la interacción con las células es imprescindible en el desarrollo de las metodologías aplicadas.

9. Bibliografía

- Adaora A. 1999. Prevention of Genital HPV Infection and Sequelae: Report of an External Consultants Meeting. Department Of Health And Human Services Centers for Disease Control and Prevention National Center for HIV, STD, and TB Prevention. Atlanta, Georgia.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Robert K. y Watson J. 1994. Molecular Biology of the cell. 3° edition, Garland Publishing Inc., New Cork, London.
- Aponte H., Secin F., Jonar W., Amabile C., 2006. Cáncer de próstata el más común en los varones mayores de 50 años. *Urología Colombiana*. 125-132
- Arvelo F., Suárez A., Galindo I., Compagnone R., Usubillaga A. 2008. Productos Naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. 5: 69-72
- Belinchón M. Bethencourt F., García I., Fraile B. y col. 2005. Potencial anti-apoptótico de p38 en cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*. ISSN 0210-4806. 29 (8).
- Benedí J., Gómez M. 2006. Fármacos antineoplásicos I. *Farmacia Espacio de Salud*. 20: 2
- Brackenbury R., Rutishauser U. y Edelman G. 1981. Distinct calcium-independent and calcium-dependent adhesion systems of chicken embryo cells (cell aggregation/retinal cells/hepatocytes/morphogenesis). *Proc. Natl Acad. Sci.* 78: 387-391.

- Caderaro F. Luis Rodrigo. Medina F. 2004. Cáncer De Cuello Uterino: Problema Nacional. *Revista Venezolana Oncológica*; **16** (1): 28-33.
- Callacondo D., Quispe A., Lindo S.y Vaisberg A: 2008. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* “Keto Keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev.Perú Med Exp Salud Pública*. **25**: 380-385.
- Campbell N. y Reece J.2007. Biología. Ed. Médica Panamericana 7ª Ed.
- Capote L. 2006. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. Venez. Oncol.* **18** (4): 269-281.
- Carey F. 2006. Química Orgánica. Ed. McGraw-Hill. 6ª Edición.
- Chang R. y College W. 2002. Química. Ed. McGraw- Hill. 7ª Edición
- Chou JC., Chou TC. Y Talalay P. 1984. Conservation of laboratory animals by improved experimental design, generalized equations and computer analysis. *Fed Proc.* **43**: 576
- Chou JC. 1991. Quantitation of synergism and antagonism of two or more drug by computerized analysis, in synergism and antagonism in chemotherapy. (Chou TC and Rideout DC eds) pp 223-244. Academic Press, New York.
- Chou JH., Chang TT. Y Chou TC. 2006. Models for drug development and drug resistance, in Cancer Handbook. (Alison MR ed) John Wiley y Sons, Ltd, West Sussex, UK.
- Chou T. y Martin N. 2005. Compusyn of drug combinations: PC software and user’s guide: A computer program from quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀. Combosyn. Paramus NJ.

- Chou, T., y Talalay P. 1983. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol. Sci.* **4**:450-454.
- Conn E. 1986. Bioquímica fundamental. Ed.Limusa. México.
- Cordell G., Kingorn A.y Pezzuto J. 1993. Separation, structure elucidation, and bioassay of citotoxic natural products. In S. Colegate and R. Moleynaux (ecls.), Bioactive Natural products: Detection, Isolation, and Structural determination, CRC press, Florida. Pp 198-201
- Danial, N. y Korsmeyer, S. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Domínguez X. 1973. Métodos de Investigación: Fitoquímica. 1° edición. Editorial Limusa. México.
- Ferlay J., Bray F., Pisan P. y Parkin D. 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *IARC Cancer Base*. No. 5.
- Flis S. y Splawinshi J. 2009. Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Research* **29**: 435-442.
- Florez J., Armijo J. y Mediavilla A. 2008. Farmacología Humana. 5ta. Edición. Ed. Masson.
- Ford, O., Gregory, C. , Kim, D., Smitherman, A., y Mohler, J. 2003. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol*, **170(5)**: 1817–1821.
- Fridman J., lowe S. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**: 9030-9040.

- Fuentes J., Castro V., Jakupovic J., Murrillo R. 2004. . Diterpenos y otros constituyentes de *Croton hirtus* (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* **52(1)**: 269-285
- Furones, J. 2002. Bases científicas para el desarrollo y la utilización de los medicamentos. Farmacología General. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- García P., Braga A., Batista R. 2007. Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane Diterpenes and their Glycosides. *Molecules*, **12**: 455-483.
- Giang P., Jin H., Son P., Lee J., Hong Y. y Lee J. 2003. Ent- kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS- Induced NF-kB Activation and NO production. *J. Nat. Prod.* **66**: 1217- 1220
- Goldman, J., Tháng, K., Park, D., Spiers, A., Lowenthal, R. y Ruutu, T. 1987. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast-cell transformation. *Br J Haematol.* **40**: 185-195.
- Goodman L. y Gilman A. 2001. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Mcgraw-hill.
- Hidalgo M. & Eckhart S. 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 178–93.
- Johansson J, Andrén O, Andersson SO, Dickman P, Holmberg L, Magnuson A, et al. 2004. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA.* **22**:2713-2719.
- Khanna C., Hunter K. 2005. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis.* **26(3)**:513-23.

- Kierszanbaum A., 2008. *Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica.* ELSEVIER. 2° edic. España.
- Kouznetsov V., Merchan D., Arvelo F., Bello J., Sojo F., Muñoz A. 2010. New 4-hydroxy-3-metoxyphenyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives as potential antitumoral agents obtained through imino Diels-Alder reactions. *Letter in drug design & discovery.* (Aceptado).
- Kuo P., Shen Y., Yang M., Wang S., Thang T., Dung N., Chiang P., Lee E., y Wu T. 2007. Crotonkinins A and B Related diterpenoids from *Croton tonkinensis* as Anti-inflammatory and antitumor agents. *J. Nat. Prod.* **70**: 1906- 1909.
- Langley R. y Fidler I. 2007. Tumor Cell- Organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev.* **28**: 297-321.
- Lastra, J., Moreno, E., Mena, J. *et al.* 2008. Cáncer de Próstata metastático al Hígado. Presentación Clínica infrecuente: Reporte de un Caso. *Rev. Venez. Oncol.* **20**:29-33.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scout M., Zipursky L. y col. 2004 *Molecular Biology.* Freeman and Company.
- Luque J. 2000. *Biología Molecular e Ingeniería Genética.* Elsevier Science.
- Mackay J., Jemal A., Lee N., Parkin M. 2001. *The Cancer Atlas.* American Cancer Society
- Malone H. 1978. *Pharmacological Approaches to natural Product Screening and Evaluation* In: *New Natural Product and Plant Drug with Pharmacology.* *Wagner and Wolf Eds.,* New York.

- Marcano D, Hasegawa M. 2002. Fitoquímica orgánica. *Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Universidad Central de Venezuela*. Caracas, Venezuela.
- Menéndez A., Tillán J., Menéndez R., González O., Domínguez C. y González M. 2006. Evaluación del extracto lipofílico de *Cucurbita pepo* L. sobre la hiperplasia prostática inducida por andrógenos. *Rev Cubana Plant Med* **11**: 2
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Method.* **65**: 55-63.
- Müller I., Jenner A., Bruchelt G., Niethammer D. y Halliwell B. 1997. Effect of Concentration on the cytotoxic mechanism of Doxorubicin- Apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research*; **230**: 254- 257
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S., et al. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*; **111**:278–285.
- Muñoz A. 2008. Efecto citotòxico del grupo 2,4-diaril-tetrahidroquinolinas sustituidas y su respuesta en combinación con fármacos antitumorales sobre cèlulas de càncer de mama humano. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología. UCV.
- Oscanoa T. y Lira G. 2005. Calidad de prescripción de medicamentos en pacientes geriátricos. Universidad nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. *Anales de la Facultad de Medicina.* **66**: 3.
- Patiño A., Colmenares M., Díaz L., Grassi H., Andrades E. 2003. Estandarización Del Método Para Medir El Efecto Diferencial De Los Antibióticos Antraciclínicos (ATC) Doxorubicina Y 4'epi Doxorubicina Sobre Plásmido Y/O Cromosoma

Bacteriano In Vivo. Instituto De Investigaciones De La Facultad De Farmacia y Bioanálisis. Universidad De Los Andes. Mérida. Venezuela. Revista de la Facultad de Farmacia **45**: 1

- Piantino C., Salvadori F., Ayres P., Kato R., Srougi V., Leite K., Srougi M. 2009. An Evaluation of the Anti-Neoplastic activity of Curcumin in prostate Cancer Cell Lines. *International Braz J Uro; l* **35**: 354-361.
- Polanco, X. 2003. Calidad en la producción y elaboración de plantas medicinales (II). *Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas* **8**.
- Prabhakaran, V. 1996. Early detection of prostate cancer Role of prostate-specific antigen. *Canadian Family Physician; 42*:709-712.
- Prieto G. Errecalde C. Trotti N. 1997. Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monografías de Medicina Veterinaria. 19*: 1- 2
- Rodríguez M. 1998. Avances Recientes En El Cáncer De Cérvix. *MEDSPAIN*
- Rowley S., Anderson G. 1993. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant. 11*: 389-393
- Ruiz Y., Rodríguez J., Arvelo F., et al. 2008. Cytotoxic and apoptosis- inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry. 69*: 432-438
- Sánchez P., Benítez L. 2006. Procesos Biomoleculares de la resistencia a drogas. *Cancerología 1*: 187-199

- Sandoval M., Okuhama N., Clark M., et al. 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, **80**: 121-129.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez A, Wacholder S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*; **370**:890–907.
- Soriano V. y Poveda E. 2008. Pharmacokinetics, interactions and mechanism of action of maraviroc. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **11**:12-6.
- Sood A., Armaiz-Pena G., Halder J., Nick A., Stone R., Hu W., Carroll A., Spannuth W., Deavers M., Allen J., Han L., Kamat A., Shahzad M., McIntyre B., Diaz-Montero C., Jennings N., Lin Y., Merritt W., DeGeest K, Vivas-Mejia P., Lopez-Berestein G., Schaller M., Cole S., Lutgendorf S. 2010 . Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J Clin Invest* **120(5)**:1515-23.
- Soberón J., Quiroga E., Sampietro A., Vattuone M. 2008. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina.
- Suárez A., Chavez K., Mateu E., Compagnone R., Muñoz A., Sojo F., Arvelo F., Mijares M., De Sanctis J. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Natural product communications*. **4(11)**:1547-50.

- Suárez A. ; Compagnone, R., Salazar M. , Tillet S. , Delle F. , Di Giulio C., Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract . *Journal of Ethnopharmacology*. **88 (1)**: 11-14.
- Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F. y Legault J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L . from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology* **103**: 99-102.
- Vassallo J., Barrios E. 2003. Actualización Ponderada de los Factores de Riesgo del Cáncer. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. *Rev. Papeña Med Fam* **4**: 105-112
- Velazco A., Lorenzo P., Serrano J., Fernando A. 1996. Farmacología. Capítulo 4. McGraw-Hill- Interamericana de España.
- Vidal R., Pardo I., Vázquez M., Ouviaña O., López A. 2009. Clínica e Investigación En Ginecología Y Obstetricia. **36**: 35-37
- Vita-Finzi L., McCarey P. Prevención de las enfermedades crónicas: una inversión vital. Organización Mundial de la Salud.
- Xin-Rong L., Rou-Li Z., Qing-Yun Z., Ye Z., Yue-Ying J., Ming L., Jing-An R., Da-Xiong Y. 2004. Structure analysis and expressions of a novel tetratransmembrane protein, lysosome-associated protein transmembrane 4 B associated with hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. **10(11)**:1555-1559.

Consultas en Línea:

- American Cancer Society. *Cancer Facts And Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2007. Consultado El 03 De Octubre 2009 En [Http://Www.Cancer.Org/Docroot/PRO/Content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2008_Presentation.Asp](http://www.cancer.org/docroot/PRO/Content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2008_Presentation.Asp)
- Alianza Nacional para la salud Hispana. Consultado el 03 de octubre 2009 en [w.w.hispanichealth.org](http://www.hispanichealth.org)
- National Cancer Institute. 2003. *Cancer And The Environment, What You Need To Know What You Can Do*. U.S. Department Of Health Nih Publication No. 03–2039. Consultado el 03 de octubre 2009 en <http://www.cancer.gov/images/Documents/5d17e03e-b39f-4b40-a214-e9e9099c4220/Cancer%20and%20the%20Environment.pdf>
- Organización Mundial De La Salud (2009). *Cáncer*. Nota Descriptiva N°297, Julio De 2008. Consultado El 03 De Octubre 2009 En: [Http://Www.Who.Int/Mediacentre/Factsheets/Fs297/Es/Index.Html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html).