



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA
DE UNA FAMILIA DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS
EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA K562**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO OMAÑA FOSADO

ASESORES:

Dr. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO

Dra. MARYCARMEN GODÍNEZ VICTORIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

*Una Cultura nace cuando un alma grande despierta de su estado primario
y se desprende del eterno infantilismo humano, cuando una forma surge de lo informe,
cuando algo limitado y efimero emerge de lo ilimitado y perdurable,
florece entonces sobre el suelo de una comarca, a la cual permanece adherida como una planta.*
O. Spengler.

Agradezco principalmente a Dios por bendecirme con vida y salud para terminar esta tarea.
“Los que siembran con lagrimas cosecharán con gritos de alegría. Aunque lloren mientras
llevan el saco de semilla, volverán cantando de alegría, con manojos de trigo entre los brazos”.
Salmo 126: 5,6

*A mis padres Dulce y Marcos por ser los cimientos de mi existencia,
gracias por su ejemplo de lucha.*

A mis hermanos Yas, Beto, Ari y Monse, por su amor, paciencia y aliento.

*A mis sobrinos Betito, Lari, Aranzis, Max y Moti por su chispa de alegría
que me regalan día con día.*

A Benja, porque más que ser mi maestro, ha sido un gran amigo y la base de este trabajo.

A Mary por su amistad, apoyo y conocimientos desinteresados.

A la Dra. Luvia y el Dr. René por permitirme integrarme en su espacio de trabajo.

*A mis tíos Güera, Goyo, Ciprian y Edgar por saber
que puedo contar con ellos en todo momento.*

A mis primos Jessi, Day, Karen y Goyo por su ánimo constante.

*A mis amigos Azu, Deya, Edgar, Riky y Héctor por brindarme
su inapreciable amistad, confianza y cariño.*

*A mis amigos y hermanos de la Facultad Memo, Isma, Ulises, Adán, Galán, Erick, Cacho,
Chava, Daniel Jeovanni, Chente, Angel y Luis por las inolvidables experiencias compartidas.*

A todos los maestros y compañeros que conocí a lo largo de mi formación.

A mi Alma Mater.

Al amor que me espera...

Índice

• ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS y ESQUEMAS.....	8
• ABREVIATURAS.....	11
• RESUMEN.....	14
• INTRODUCCIÓN.....	17
Productos Naturales.....	18
El Género <i>Vernonia</i>	21
Lactonas Sesquiterpénicas.....	22
Actividad Biológica de las Lactonas Sesquiterpénicas.....	28
Reacción de Adición de Tipo Michael.....	36
Cáncer.....	39
Apoptosis.....	42
Estrés Oxidativo y su Relación con la Apoptosis.....	43
• HIPÓTESIS.....	48
• OBJETIVOS.....	50
Objetivo General.....	51
Objetivos Particulares.....	51

• PARTE EXPERIMENTAL.....	52
Reactivos.....	53
Equipos.....	53
Compuestos.....	54
Línea Celular.....	55
Cultivo Celular.....	55
Determinación del Efecto Citotóxico.....	56
Determinación del Tipo de Muerte Celular y Externalización de Fosfatidilserina.....	57
Determinación de la Disminución del Potencial de Membrana Mitocondrial.....	58
• RESULTADOS.....	60
• DISCUSIÓN.....	80
• CONCLUSIONES.....	84
• REFERENCIAS	86

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS y ESQUEMAS

Índice de Cuadros

<i>Cuadro 1.</i>	Distribución de estructuras de las lactonas sesquiterpénicas en <i>Astereaceae</i>	24
<i>Cuadro 2.</i>	Efectos de las lactonas sesquiterpénicas.....	28

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i>	Estructuras del ácido mevalónico y del isopreno.....	19
<i>Figura 2.</i>	Ejemplos de tipos de esqueletos derivados de estructuras de lactonas sesquiterpénicas.....	23
<i>Figura 3.</i>	Diferentes tipos de anillos lactónicos presentes en las lactonas sesquiterpénicas.....	28
<i>Figura 4.</i>	Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>Vernonia pachyclada</i>	29
<i>Figura 5.</i>	Partenólida, aislada de <i>Tanacetum parthenium</i>	29
<i>Figura 6.</i>	Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> y <i>Tanacetum parthenium</i>	30
<i>Figura 7.</i>	Eupatoriopicrina, aislada de <i>Eupatorium cannabinum</i>	31
<i>Figura 8.</i>	Psilostachyina y Peruvina, aisladas de <i>Ambrosia tenuifolia</i>	31
<i>Figura 9.</i>	Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>Ainsliaea fragans</i>	32
<i>Figura 10.</i>	Salograviólida A, aislada de <i>Centaurea ainetensis</i>	33
<i>Figura 11.</i>	Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>Saussurea lappa</i>	33
<i>Figura 12.</i>	Sesquiterpenos aislados de <i>Dittrichia graveolens</i>	34
<i>Figura 13.</i>	Millerenólido, aislado de <i>Viguiera sylvatica</i>	35
<i>Figura 14.</i>	Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>Ellephantopus mollis</i>	35
<i>Figura 15.</i>	Células de leucemia mieloide crónica humana K562.....	39

<i>Figura 16.</i>	Compuestos de origen natural utilizados en la terapia contra el cáncer.....	41
<i>Figura 17.</i>	Estructuras de los compuestos utilizados durante el presente estudio.....	54
<i>Figura 18.</i>	Efecto citotóxico de GE en células K562.....	61
<i>Figura 19.</i>	Efecto citotóxico de GE-H en células K562.....	62
<i>Figura 20.</i>	Efecto citotóxico de GA en células K562.....	63
<i>Figura 21.</i>	Efecto citotóxico de GD en células K562.....	64
<i>Figura 22.</i>	Efecto citotóxico de GE-C en células K562.....	65
<i>Figura 23.</i>	Efecto citotóxico de GE-OH en células K562.....	66
<i>Figura 24.</i>	Células Anexina-V positivas en presencia de GE.....	67
<i>Figura 25.</i>	Evaluación del tamaño de células expuestas a diferentes concentraciones de GE.....	68
<i>Figura 26.</i>	Tipo de muerte celular presente en las células K562 tratadas con GE.....	69
<i>Figura 27.</i>	Células Anexina-V positivas en presencia de GE-H.....	70
<i>Figura 28.</i>	Evaluación del tamaño de células expuestas a diferentes concentraciones de GE-H.....	71
<i>Figura 29.</i>	Tipo de muerte celular presente en las células K562 tratadas con GE-H..	72
<i>Figura 30.</i>	Células con bajo potencial de membrana mitocondrial en presencia de GE.....	74
<i>Figura 31.</i>	Efecto de GE sobre el potencial de membrana mitocondrial en células K562.....	75
<i>Figura 32.</i>	Células con bajo potencial de membrana mitocondrial en presencia de GE-H.....	77
<i>Figura 33.</i>	Efecto de GE-H sobre el potencial de membrana mitocondrial en células K562.....	78

Índice de Esquemas

<i>Esquema 1.</i>	Ruta biogénica sugerida para los sesquiterpenos.....	20
<i>Esquema 2.</i>	Transformación del PPF a Germacrano A.....	25
<i>Esquema 3.</i>	Biogénesis de anillo lactónico.....	26
<i>Esquema 4.</i>	Relación estructural entre una germacranólida y otros sesquiterpenos.....	27
<i>Esquema 5.</i>	Mecanismo de reacción entre un anillo lactónico y GSH bajo condiciones ácidas y bajo condiciones básicas.....	37
<i>Esquema 6.</i>	Reacción tipo Michael entre la Helenanólida y Glutación.....	38
<i>Esquema 7.</i>	Equilibrio entre GSH y GSSG en condiciones fisiológicas normales.....	40
<i>Esquema 8.</i>	Mecanismos de muerte celular mediada por radicales libres de oxígeno..	43
<i>Esquema 9.</i>	Mecanismo de daño celular inducido por depleción de glutación.....	46

Abreviaturas

(3R)-AMV	Ácido (3R)-mevalónico
acetilCoA	Ácetilcoenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CoA	Coenzima A
CoQ	Coenzima Q
DMSO	Dimetilsulfoxido
DSMZ	German Resource Centre for Biological
ECACC	European Collection of Cell Culture
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GA	Glaucólida A
GD	Glaucólida D
GE	Glaucólida E
GE-C	Glaucólida E ciclizada
GE-H	Glaucólida E hidrogenada
GE-OH	Glaucólida E alcohol
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSHi	Glutación intracelular
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
GSR	Glutación reductasa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
ICLC	Interlab Cell Line Collection
IZSBS	Istituto Zooprofilattico Sperimentale
LS	Lactonas sesquiterpénicas
NPSH	Tioles no proteicos
NADPH	Dinucleotido de nicotinamida-adenina fosfato
PBS	Buffer salino de fosfatos
PI	Yoduro de propidio
PPDMA	Pirofosfato de dimetilalilo

PPF	Pirofosfato de farnesilo
PPI	Pirofosfato de isopentenilo
PS	Fosfatidilserina
Rho-123	Rodamina-123
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TPM	Transición de permeabilidad mitocondrial

Resumen

Introducción: Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios, de éstas se conocen más de 4000 estructuras con alrededor de 30 diferentes tipos de esqueleto. Un gran número de éstas ha sido obtenido de plantas del género *Asteraceae (Compositae)*. Las características comunes de estos compuestos es que tienen una γ -lactona que puede presentar una insaturación α , β tanto endo como exo-cíclica. Actualmente se conoce una amplia gama de actividades biológicas de este tipo de compuestos, algunas de las cuales son: analgésica, antibacterial, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral, antiulcerosa, antiviral, citotóxica, etc. Particularmente, la actividad apoptótica de estas moléculas se explica por la disminución del potencial de membrana mitocondrial, así como por la supresión de la proteína proapoptótica Bcl-2 y la expresión y activación de la caspasa 3, resultando en el arresto del ciclo celular además de la correspondiente fragmentación del ADN. La citotoxicidad de estos compuestos se ha atribuido a que son capaces de establecer enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilo de proteínas funcionales (generalmente enzimas). Sus sistemas electrofílicos α,β -insaturados, pueden producir reacciones de adición tipo Michael, por lo que se sugiere tienen características alquilantes.

Objetivo: Determinar la actividad inductora de apoptosis de una familia de lactonas sesquiterpénicas naturales y semisintéticas sobre células de leucemia mieloide crónica K562.

Materiales y Método: Las Glaucolidas A y E se aislaron de la planta *Critoniopsis uniflora*, la Glaucolida D se generó a partir de la Glaucolida E así como los productos de hidrogenación (Glaucolida E-H), ciclación (Glaucolida E-C) y reducción (Glaucolida E-OH). Por otro lado, 1×10^6 células viables K562 fueron resuspendidas en 20 mL de medio de cultivo y se colocaron en una estufa a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5 % por 72 h. Posteriormente las células se recolectaron por centrifugación (1500 rpm/3 min) y se lavaron con PBS 1x estéril. La cantidad de células viables se determinó empleando la técnica de exclusión con azul tripano. La determinación de la citotoxicidad, así como las técnicas citométricas de Anexina-V y Rodamina-123 fueron realizadas empleando los protocolos establecidos previamente en la literatura especializada. Las concentraciones estudiadas fueron de 25, 50, 75 y 100 μ M a un tiempo de 24 horas de incubación.

Resultados y Discusión: La Glaucólida E y la Glaucólida E-H presentaron una IC_{50} de 52.51 y 62.52 μM respectivamente, estos dos compuestos fueron aquellos que tuvieron efecto citotóxico importante en células K562. Los compuestos Glaucólida A y Glaucólida D a pesar de que presentaron efecto citotóxico, no se considera importante, pues está por encima de del valor máximo considerado para productos naturales (100 μM), la Glaucólida E-C y la Glaucólida E-OH no presentaron efecto citotóxico alguno a la concentración más alta probada (100 μM), por tal motivo el estudio de la actividad biológica de la Glaucólida A, la Glaucólida D, la Glaucólida E-C y la Glaucólida E-OH se finalizó una vez obtenidos los resultados de esta prueba. De igual manera la Glaucólida E y la Glaucólida E-H mostraron un efecto concentración dependiente sobre las células K562 cuando se realizaron las pruebas de Anexina-V y Rodamina-123, estos compuestos también indujeron cambios morfológicos en las células, puesto que indujeron disminución del tamaño y aumento de la granularidad celular.

Conclusiones. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que los compuestos Glaucólida E y Glaucólida E-H muestran una importante actividad citotóxica sobre células K562 induciendo la muerte celular por la vía intrínseca de apoptosis ya que tienen la capacidad de disminuir el tamaño y aumentar la granularidad celular (características morfológicas), inducir la externalización de fosfatidilserina (característica estructural) y disminuir el potencial de membrana mitocondrial (característica bioquímica de la vía intrínseca).

Introducción

Productos Naturales

Desde hace años, los productos naturales han sido una fuente rica en compuestos bioactivos, de los que incluso algunos han sido empleados como prototipos para el diseño de fármacos con gran potencia y baja toxicidad.

Existe una gran cantidad de compuestos químicos de origen vegetal, que han ofrecido respuesta a problemas de salud por ejemplo: la quinina (obtenida del árbol de quina), que es utilizada contra la malaria; la salicina, base del ácido acetilsalicílico, aislada de sauces europeos; o bien el taxol, un alcaloide extraído de una especie de *Taxus* al noreste de Estados Unidos, el cual ha sido exitosamente empleado en el tratamiento de fases avanzadas de cáncer ovárico.¹

Los productos de origen natural pueden ser renovables o no renovables, siendo los primeros todos aquellos que se obtienen del metabolismo de las plantas, los microorganismos y los organismos marinos. El estudio químico de los productos naturales renovables provenientes de un metabolismo primario general, ampliamente distribuido, que produce compuestos importantes como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, son objeto de estudio en la bioquímica. Por otro lado, el estudio de las sustancias provenientes de un metabolismo especializado que transforma los metabolitos primarios, es el correspondiente a lo que se ha llamado química de los metabolitos secundarios y es lo que hace referencia cuando se habla de química de los productos naturales; esto se debe a que desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como medicinas en sus distintas formas de preparación tales como infusión, decocción, tinturas, jarabes, zumos, cataplasmas, vahos, etc.²

En general de las plantas se emplean los extractos, sin embargo, estos presentan algunos inconvenientes, dado que, se trata de mezclas de muchos compuestos, como: terpenoides, flavonoides y alcaloides; y cada uno puede actuar por separado y en forma distinta.

Los sesquiterpenos son derivados de sustancias biogénicas de la segunda y tercera unidad del isopreno, dichos compuestos son metabolitos secundarios que contienen 15 átomos de carbono, con lo cual la regla del isopreno aplica para la unión de tres unidades del sistema base. Al

respecto, se sabe que el isopreno es una entidad hipotética en la naturaleza debido a que no se ha encontrado en forma libre, por lo anterior se ha propuesto que la unidad biogénica equivalente a la del isopreno es la del ácido (3R)-mevalónico (*Figura 1*).

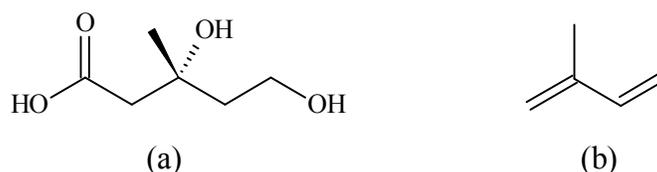
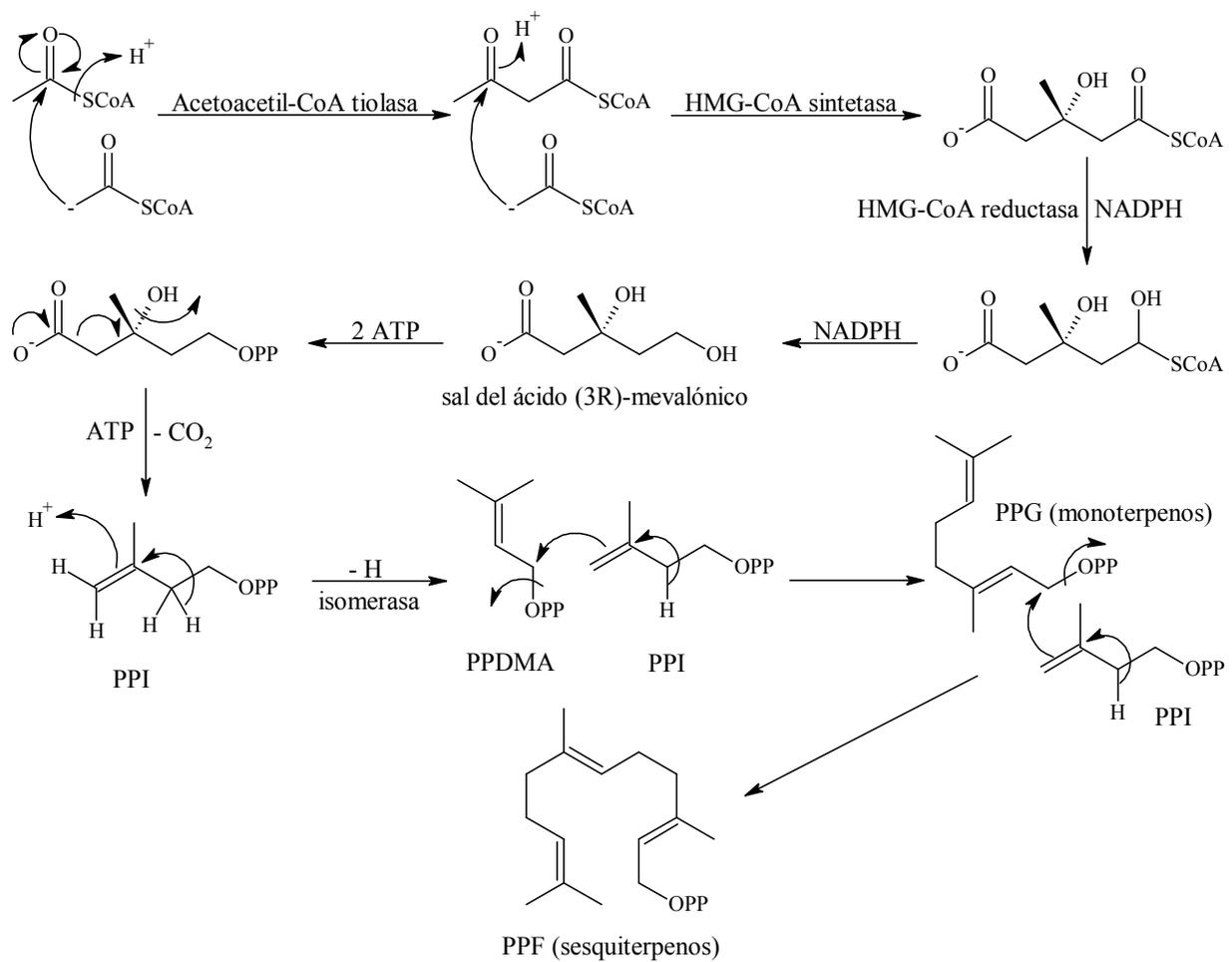


Figura 1. Estructuras del ácido mevalónico (a) y del isopreno (b).

La biogénesis de las estructuras terpenoides se ha sugerido que procede por la vía del ácido mevalónico, en donde se condensan dos moléculas de acetilcoenzima A (acetilCoA) en la que se involucra la enzima acetilCoA tiasa, resultando una estructura con cuatro átomos de carbono; posteriormente, esta estructura reacciona con una molécula más de acetilCoA, interviniendo la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) sintetasa, generando una molécula con seis átomos de carbono, que posteriormente, se reduce vía tioacetal dando origen a la sal del ácido (3R)-mevalónico, [(3R)-AMV]. Cabe señalar que solamente el estereoisómero R del ácido mevalónico es el implicado en la biogénesis de los terpenoides. El (3R)-AMV es fosforilado, descarboxilado y, finalmente deshidratado generando el pirofosfato de isopentenilo (PPI). Este compuesto se isomeriza por medio de la adición y eliminación de un protón del medio enzimático, generando el pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA). Ambas moléculas coexisten en equilibrio en una relación 7:93 PPI:PPDMA y se conocen como isopreno activo. Al respecto de lo anterior, en el *Esquema 1* se presenta de forma esquemática la ruta biogénica sugerida para los sesquiterpenos.²⁻⁴



Esquema 1. Ruta biogénica sugerida para los sesquiterpenos.

El Genero *Vernonia*

La familia *Asteraceae*, también denominada como *Compositae*, es una de las familias más grandes de angiospermas y con mayor diversidad biológica, puesto que comprende alrededor de 1300 géneros y 25,000 especies distribuidas en tres subfamilias y 17 tribus. Dentro de esta familia tenemos a la tribu *Vernoneae*, la cual fue reconocida por Cassini y delimitada por Leissing, que consta de cerca de 70 géneros y 1450 especies, es dominada por el género *Vernonia* que contiene cerca de 1000 especies y cuya distribución aproximada es de 16 especies en los Estados Unidos de América, por lo menos 300 en México y no más de 500 en África y Asia.⁵

El género *Vernonia* presenta una gran variedad morfológica de hojas y tallos, lo que demuestra la gran diversificación que desarrollo este género durante su evolución. Existen tanto especies anuales como perennes; algunos autores sugieren que es importante para su mejor caracterización, considerar el tipo de inflorescencia, la morfología del polen, el número de cromosomas, así como las metabolitos secundarios.⁶⁻⁹

Al respecto de las especies americanas se ha informado del aislamiento de metabolitos como germacranólidas e hirsutinólidas, en contraste con las especies del Viejo Mundo de donde se han aislado eudesmanólidas, guayanólidas y elemanólidas.¹⁰⁻¹⁴ Con base en estas consideraciones, el género *Vernonia* se dividió en dos subgéneros, uno de ellos, el *Orbivestus* comprende a las especies del Viejo Mundo, mientras que las especies americanas quedaron incluidas en el subgénero *Vernonia*.¹⁵

Esta clasificación se confirmó por la morfología del polen, estudios quimiosistemáticos y citotaxonómicos. Se sabe además que las especies del Nuevo Mundo tienen siete cromosomas y las del Viejo Mundo entre nueve y diez.

Mabry¹⁶ propuso que las lactonas sesquiterpénicas (LS) tienen un valor taxonómico especial dentro del género *Vernonia*. Tomando esta consideración Robinson delimitó la tribu *Vernoneae* por la distribución de LS.

La capacidad del género *Vernonia* para producir una gran variedad de metabolitos secundarios se evidenció mediante los resultados de un amplio número de estudios fitoquímicos realizados. De esta manera, se ha postulado que las glaucólidas e hirsutinólidas son quimiomarcadores por excelencia de este género; pero en estudios recientes se ha demostrado que esta propuesta no es adecuada ni cierta. Básicamente las especies de *Asteraceae* biosintetizan poliacetilenos, flavonoides y terpenoides, no obstante las LS son la clase de metabolitos secundarios más estudiados, que se utilizan como marcadores taxonómicos.^{5, 17}

Las moléculas orgánicas que se emplearon en este trabajo de tesis son productos naturales obtenidos de una planta de la familia de las Compuestas (*Asteracea*), estos compuestos son conocidos de forma general como sesquiterpenos, particularmente LS.

Lactonas Sesquiterpénicas

Las LS constituyen un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios, incoloros, generalmente con un sabor amargo, relativamente estables e hidrofóbicos; de estos se conocen aproximadamente 4000 estructuras con alrededor de 30 diferentes tipos de esqueleto, que han sido aisladas de alrededor de catorce familias de angiospermas y en menor grado de gimnospermas y de algunos representantes del reino fungi. Sin embargo, un gran número de éstas ha sido obtenido de plantas superiores e inferiores de *Astereceae* (*Compositae*) con más de 3000 representantes (*Figura 2*). Debido a su quimiodiversidad las LS son la clase de productos naturales más adecuados para los estudios quimiosistemáticos dentro de su familia.¹⁷⁻²¹

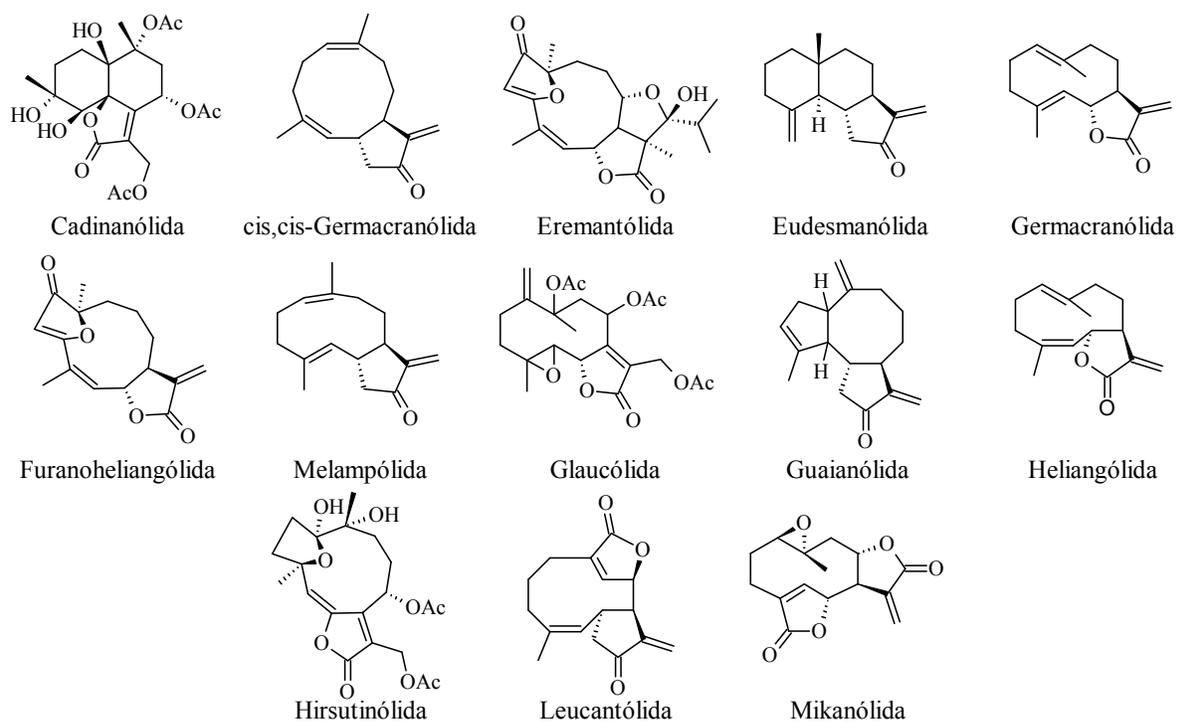


Figura 2. Ejemplos de tipos de esqueletos derivados de estructuras de lactonas sesquiterpénicas.¹⁷

Las LS son los metabolitos secundarios más útiles en la clasificación de la familia de las compuestas. Las características comunes de este tipo de compuestos es que tienen una parte de esqueleto de 15 carbonos y otra de una γ -lactona, otros elementos pueden variar considerablemente de los esqueletos básicos de sus subgrupos. En general, una planta de una especie particular, sólo contiene un único tipo de esqueleto, con algunas variaciones (*Cuadro 1*). Las lactonas se encuentran regularmente en las hojas y flores, y no en tallo o raíces, aunque se ha reportado la presencia de algunas de ellas en la raíz de *Liriodendro tulipifera* y en la corteza de ciertas especies brasileñas.^{18, 22}

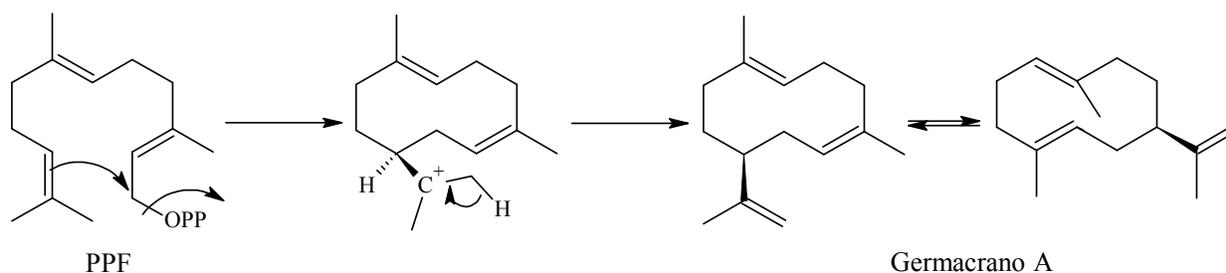
Cuadro 1. Distribución de estructuras de las lactonas sesquiterpénicas en *Astereaceae*.^{7, 10-14, 23-44}

Tribu (No. de Géneros)	Géneros con Lactonas Sesquiterpénicas	Tipo de Lactona Presente
Anthemideae (50)	10	Cadinanólidas, Crimoranólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas y Helenanólidas
Arctoteae – Calendulae (50)	1	Guaianólidas
Astereae (100)	1	Guaianólidas
Cichoreae (75)	6	Eudesmanólidas, Germacranólidas y Guaianólidas
Cinareae (50)	8	Elemanólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas y Guaianólidas
Eupatorieae (50)	4	Ambrosanólidas, Elemanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas y <i>Seco</i> – Ambrosanólidas
Eleniae (60)	11	Elemanólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas, y Helenanólidas
Heliantheae, que incluye la subtribu Ambrosinae (250)	24	Ambrosanólidas, Elemanólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas, Helenanólidas, <i>Seco</i> – Ambrosanólidas, <i>Seco</i> – Eudesmanólidas, <i>Seco</i> – Helenanólidas y Xantanólidas
Inuleae (300)	5	Ambrosanólidas, Elemanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas, Helenanólidas, <i>Seco</i> – Ambrosanólidas, <i>Seco</i> – Eudesmanólidas y Xantanólidas
Mustiseae (5)	1	Eudesmanólidas

Cuadro 1. Distribución de estructuras de las lactonas sesquiterpénicas en *Astereaceae* (continuación).

Tribu (No. de Géneros)	Géneros con Lactonas Sesquiterpénicas	Tipo de Lactona Presente
Senecionae (50)	4	Baquenólidas, Eremofilanólidas, Germacranólidas, Helenanólidas, y Xantanólidas
Tageteae (15)	0	Ninguno
Vernoniae (50)	4	Elemanólidas, Germacranólidas y Guaianólidas

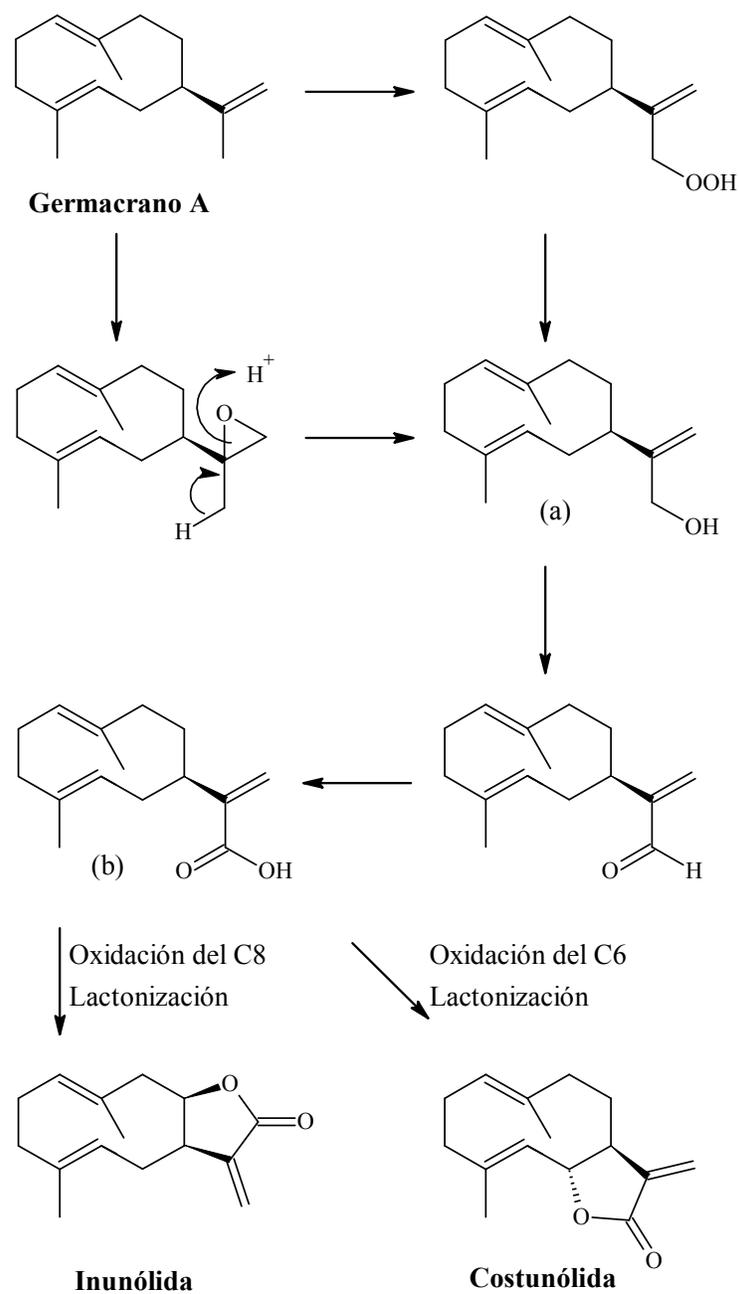
Las LS, proceden de la reacciones de ciclación del pirofosfato de farnesilo (PPF), en particular sobre la molécula del *trans-trans*-pirofosfato de farnesilo, de la cual se generan los germacranos (*Esquema 2*).^{23, 45-47}



Esquema 2. Transformación del PPF a Germacranol A.

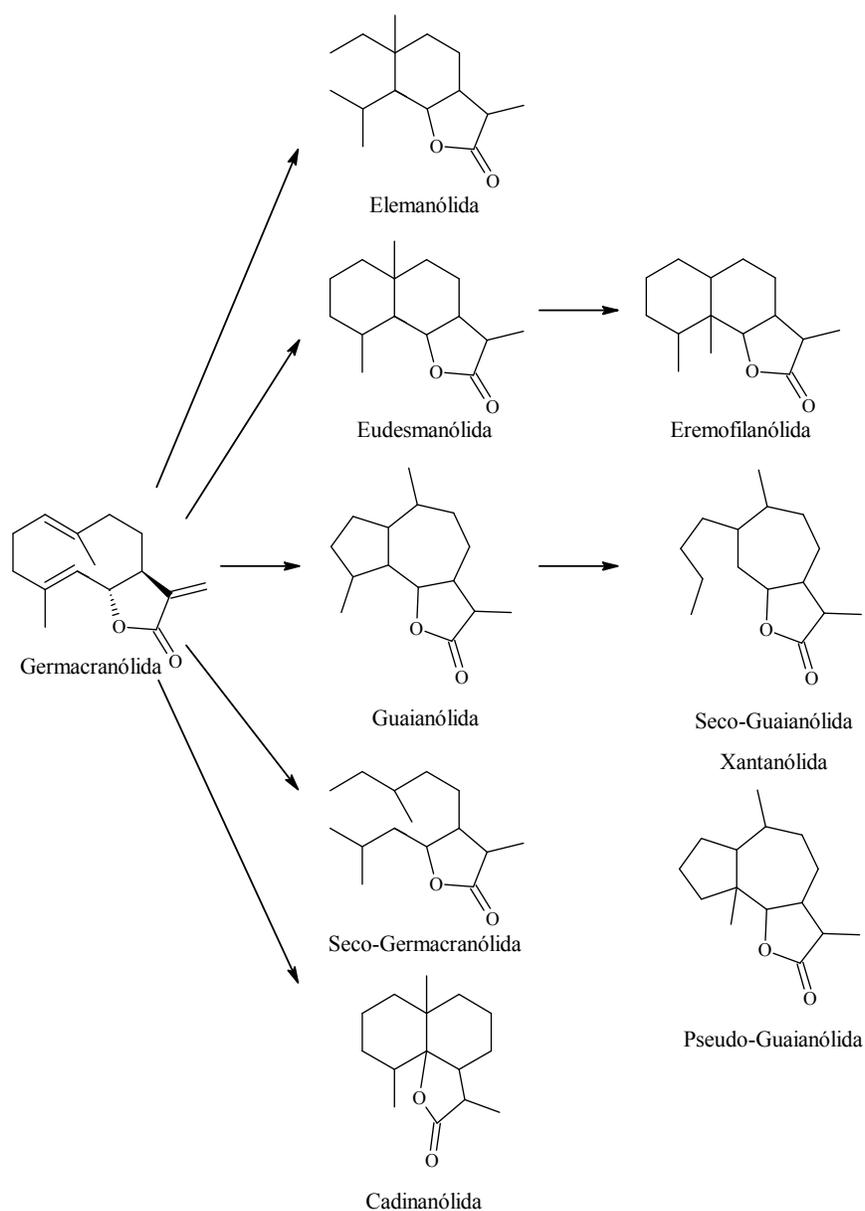
En el *Esquema 3* se muestran las dos posibles vías biogénicas para la formación de anillo lactónico, a partir del germacranol A, la biogénesis de la inunólida y de la costunólida, en éstas el sistema del germacranol constituye un intermediario hipotético entre el PPF y los anillos de las costunólidas e inunólidas; a su vez la introducción de un oxígeno en el C-12 del germacranol A, da como resultado un alcohol (a en *Esquema 3*), el cual, puede provenir de la apertura de un

epóxido, o bien, por una reacción mediada enzimáticamente. Se sugiere que esta nueva estructura se oxida en etapas posteriores hasta la formación del ácido carboxílico (b en *Esquema 3*) que puede generar una lactona 12,6 ó 12,8.



Esquema 3. Biogénesis de anillo lactónico.

Se han propuesto a través de reacciones biomiméticas que algunos terpenoides ya formados pueden presentar posteriores reacciones de ciclación intramoleculares y generar una nueva serie de estructuras, tal es el caso del esqueleto de la germacranólida. Al respecto se ha demostrado que ésta, da origen a una serie de estructuras sesquiterpénicas tales como elemanólida, pseudoguayanólida, eudesmanólida, guayanólida, xantanólida, pseudoesmanólida, cadinanólida y *seco*-germacranólida (*Esquema 4*).⁴⁶



Esquema 4. Relación estructural entre una germacranólida y otros sesquiterpenos.

Cabe mencionar que existen tres tipos de LS, que pueden ser endocíclicas α,β -insaturadas (a en *Figura 3*), exocíclicas α,β -insaturadas (b en *Figura 3*) o bien ciclopentanonas (c en *Figura 3*).

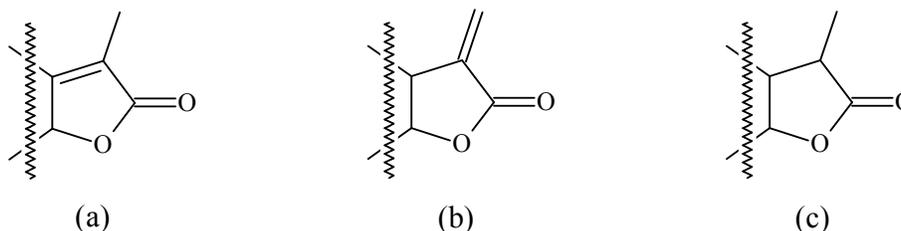


Figura 3. Diferentes tipos de anillos lactónicos presentes en las lactonas sesquiterpénicas.

Actividad Biológica de las Lactonas Sesquiterpénicas

Algunas LS que presentan importante actividad biológica se encuentran en un gran número de plantas de la familia *Asteracea*, dichas plantas a menudo utilizadas en la medicina tradicional. Actualmente se conoce una gama muy grande de actividades biológicas atribuidas a este tipo de compuestos, algunas de las cuales se enumeran en el *Cuadro 2*.^{1, 19, 23-44, 48-55}

Cuadro 2. Efectos de las lactonas sesquiterpénicas.

Alelopático	Antiprotozoarios	Esquistosomicida
Alergeno	Antitumoral	Estimulante de SNC
Analgésico	Antiulceroso	Genotóxico
Antiartrítico	Antiviral	Hipoglicémico
Antiasmático	Anorexigénico	Hipotensivo
Antibacterial	Cardiotónico	Insecticida
Anticolinérgico	Cardiotóxico	Inmunosupresivos
Antifúngico	Citotóxico	Moluscocida
Antihelmíntico	Clastogénico	Mutagénico
Antihiperlipidémico	Colinérgico	Regulador genético
Antiinflamatorio	Diurético	Sedante

Al respecto se ha estudiado y reportado una gran cantidad de LS con diferente actividad biológica.

Figura 4. Las Glaucólidas K (1), L (2) y M (3) obtenidas de las hojas de la planta *Vernonia pachyclada* del bosque de Madagascar presentan efecto citotóxico frente a células de cáncer de ovario humano A2780, esta planta es conocida localmente como Tsaboraty, y es usada en medicinal tradicional para el tratamiento de heridas.³²

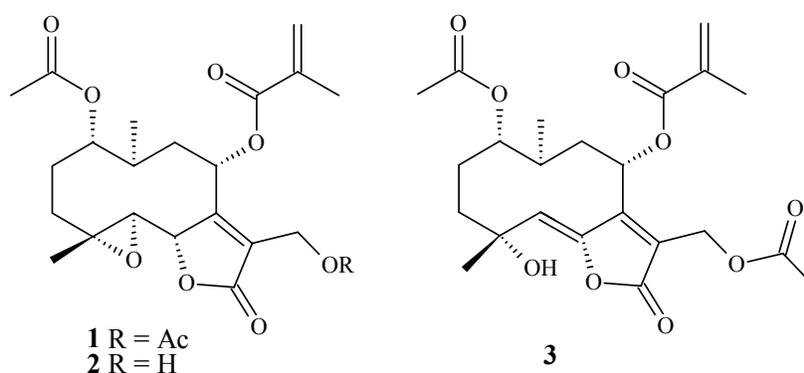


Figura 4. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Vernonia pachyclada*.

Tanacetum parthenium es una planta de la familia *Asteraceae*, cuyo nombre común en inglés es Feverfew y que se usa en medicina tradicional para el tratamiento de migraña, tinnitus, vértigo, artritis, fiebre, dificultad durante el parto, dolor de estomago, dolor de muelas y picaduras de insectos. De esta planta se aisló la Partenólida (*Figura 5*), y se estudió su actividad contra *Leishmania amazonensis*.³³

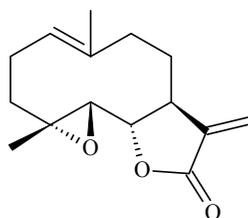


Figura 5. Partenólida, aislada de *Tanacetum parthenium*.

La *Calea urticifolia* es una planta que pertenece a la familia de las compuestas (*Asteraceae*), y ha sido usada en la medicina tradicional de El Salvador durante muchos años para el tratamiento de la gastritis, infecciones y cáncer, también es conocida por contener abundantes LS que presentan esqueletos germacranólicos. Recientemente mostró tener actividades biológicas interesantes como inducción de apoptosis, efecto antioxidante y actividad supresora en la diferenciación de adipocitos.

De igual manera, *Tanacetum parthenium* (Feverfew) pertenece a la familia de las compuestas y está distribuida por Europa, América del Norte y Australia. La Partenólida es una LS que fue aislada de esta planta, y tiene actividad inductora de apoptosis e inhibición del factor nuclear (NF)- κ B.³⁴

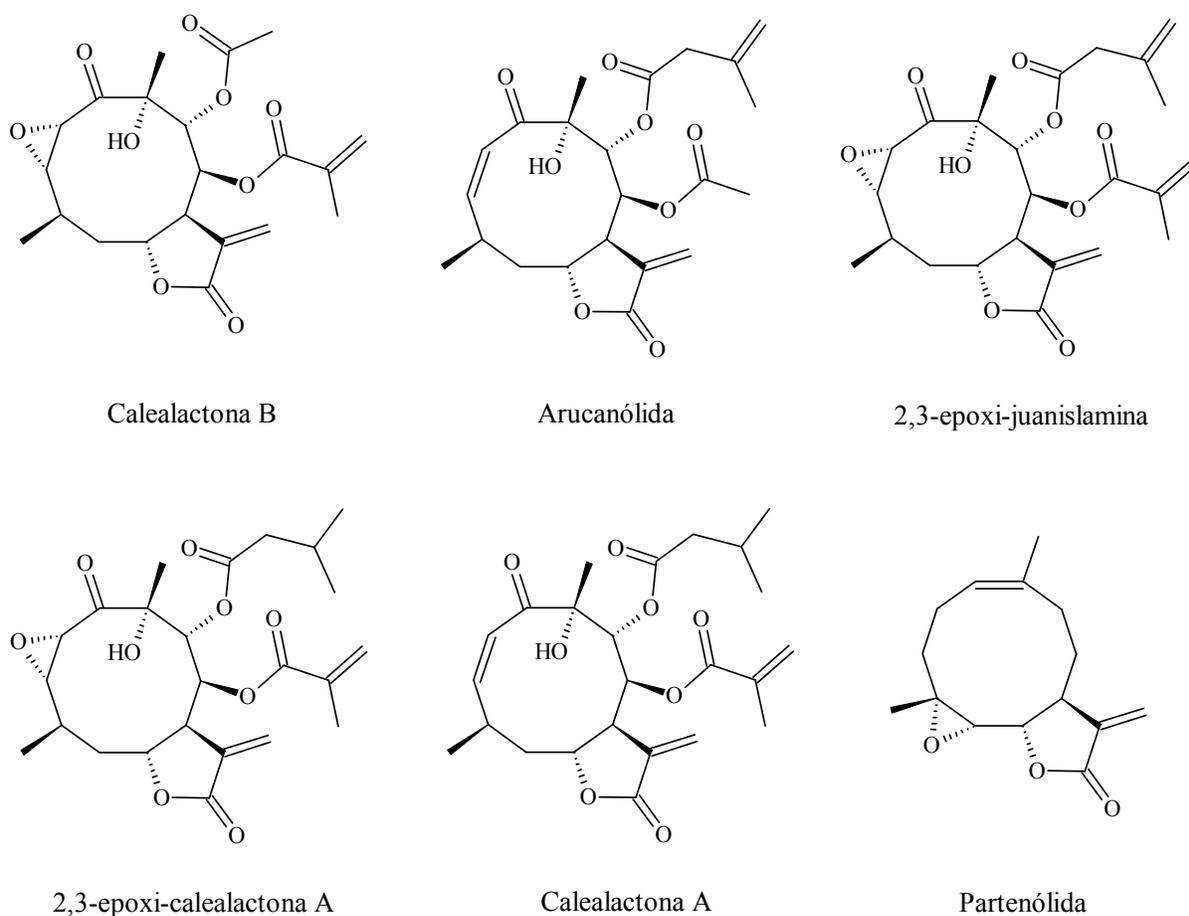


Figura 6. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Calea urticifolia* y *Tanacetum parthenium*.

La Eupatoriopicrina, mostrada en la *Figura 7*, es una LS obtenida de *Eupatorium cannabinum*, esta planta es nativa de Europa y contiene LS, entre las que se encuentra la Eupatoriopicrina, este compuesto ha demostrado tener propiedades citotóxicas.³⁵

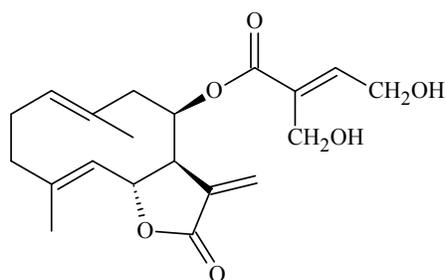


Figura 7. Eupatoriopicrina, aislada de *Eupatorium cannabinum*.

La *Ambrosia tenuifolia* es una planta de la familia *Asteraceae*, se conoce comúnmente bajo los nombres Ajenjo del Campo, Altamisa, Saltamisa o Artemisia, ésta se encuentra en las regiones norte y centro de Argentina, sureste de Brazil, Paraguay y Uruguay. El producto de la decocción de las partes aéreas de la planta es usado en medicina alternativa como carminativo, antihelmíntico, antipirético, y la decocción de hojas y semillas pulverizadas es administrada para eliminar gusanos o lombrices intestinales. La Psilostachyina y Peruvina (Figura 8), LS aisladas de esta planta presentan actividad contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*³⁶

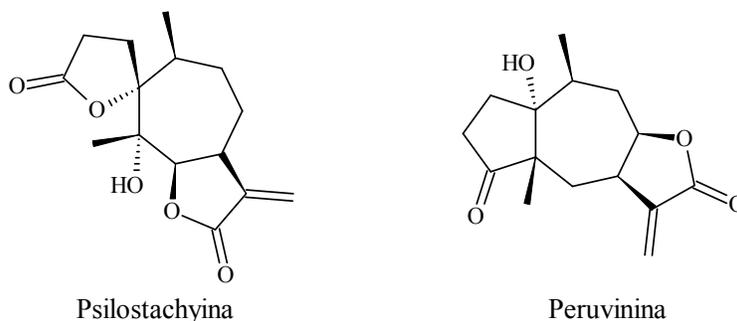


Figura 8. Psilostachyina y Peruvina, aisladas de *Ambrosia tenuifolia*.

La planta *Ainsliaea fragans* pertenece a la familia de las compuestas (*Asteraceae*) y crece en el sureste de China. Esta planta es extensamente usada en la medicina tradicional china para el tratamiento de la expectoración sanguinolenta, ictericia, edema e infecciones superficiales. Actualmente el extracto acuoso de *Ainsliaea fragans* es usado para la cervicitis, endometritis e inflamación pélvica. De las partes aéreas de esta planta se han aislado LS, flavonoides y lignanos.³⁷

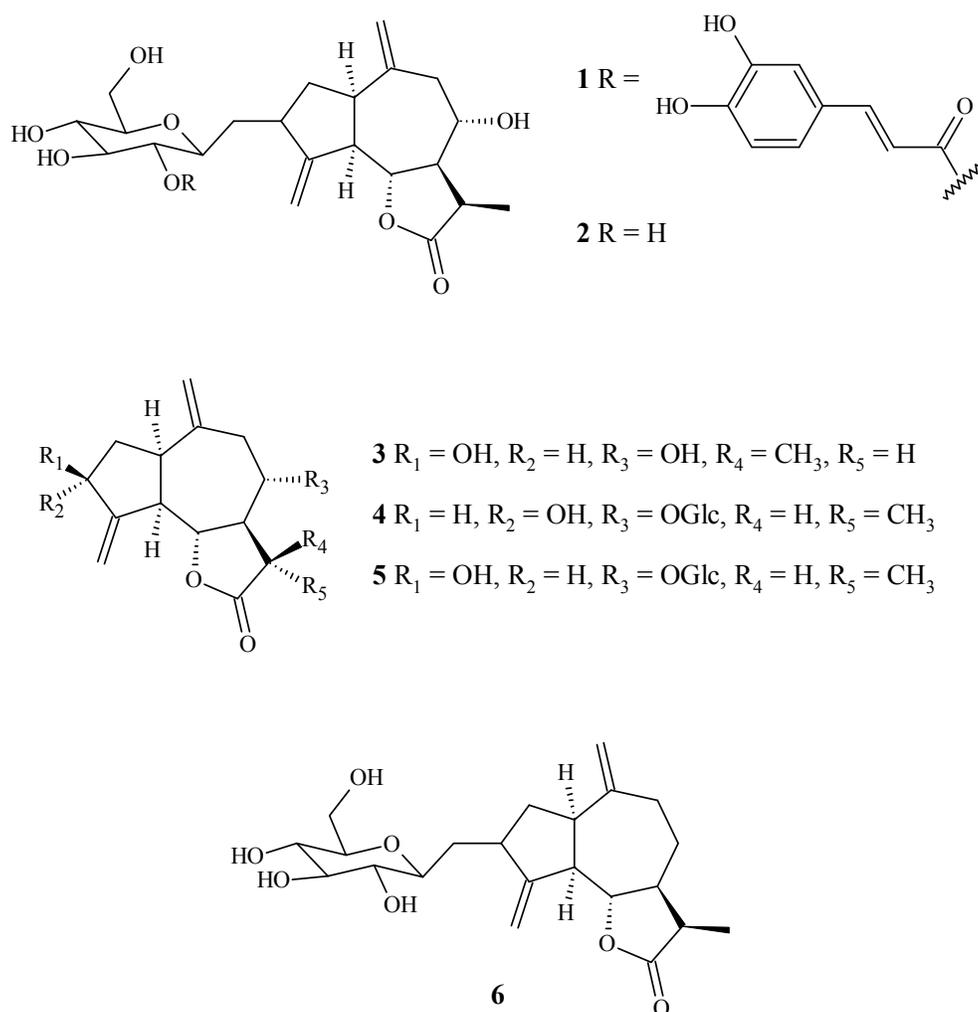


Figura 9. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Ainsliaea fragans*.

En la *Figura 10* se muestra la estructura de la Salograviólida A, la cual es una LS que presenta actividad antiinflamatoria, dicho compuesto fue aislado de una planta endémica libanesa que crece en lugares rocosos estériles cuyo nombre científico es *Centaurea ainetensis*, esta planta pertenece al genero *Centaurea* el cual se encuentra en la familia de las compuestas (*Asteraceae*). La Salograviólida A también ha sido aislada de las partes aéreas de otra especie de *Centaurea* (*Centaurea nicolai*), y en dicho estudio mostró tener actividad antifúngica.³⁸

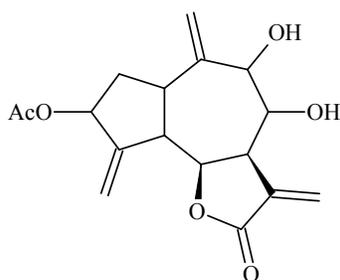


Figura 10. Salograviólida A, aislada de *Centaurea ainetensis*.

La *Saussurea lappa* es una planta que ha sido usada en la medicina tradicional china y como especia desde tiempos antiguos, en tal país se conoce por el nombre de Yun Mu Xiang. Las raíces de esta planta se usan para el tratamiento de distensión y dolor abdominal, indigestión y náuseas. Los principales componentes químicos bioactivos que contiene esta planta son varios tipos de sesquiterpenoides que incluyen tres eudesmanos de los cuales dos son sulfonados, la Sulfocostunólida A (1) y la Sulfocostunólida B (2) (*Figura 11*).³⁹

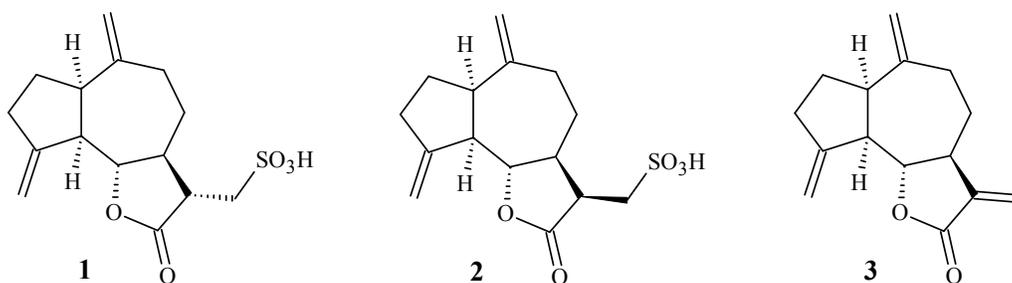


Figura 11. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Saussurea lappa*.

El genero *Inula* (familia *Asteraceae*, tribu *Inuleae*, subtribu *Inulinae*) comprende cerca de 100 especies y están distribuidas a lo largo de Europa y Asia, pero se han encontrado algunas especies en África. Muchas especies de *Inula* son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades como la cardiopatía isquémica, angina de pecho, hipoglicemia, afecciones del hígado, úlceras, padecimientos gastroduodenales, bronquiales y reumáticos, migraña, infecciones en la piel, tónico pulmonar, analgésico, antimicrobiano, antiinflamatorio, antipirético, analgésico y antiproliferativo. La *Dittrichia graveolens* es una planta de aproximadamente 80 centímetros de alto que crece en el área del Mediterráneo, principalmente en el noroeste de Egipto.⁴⁰

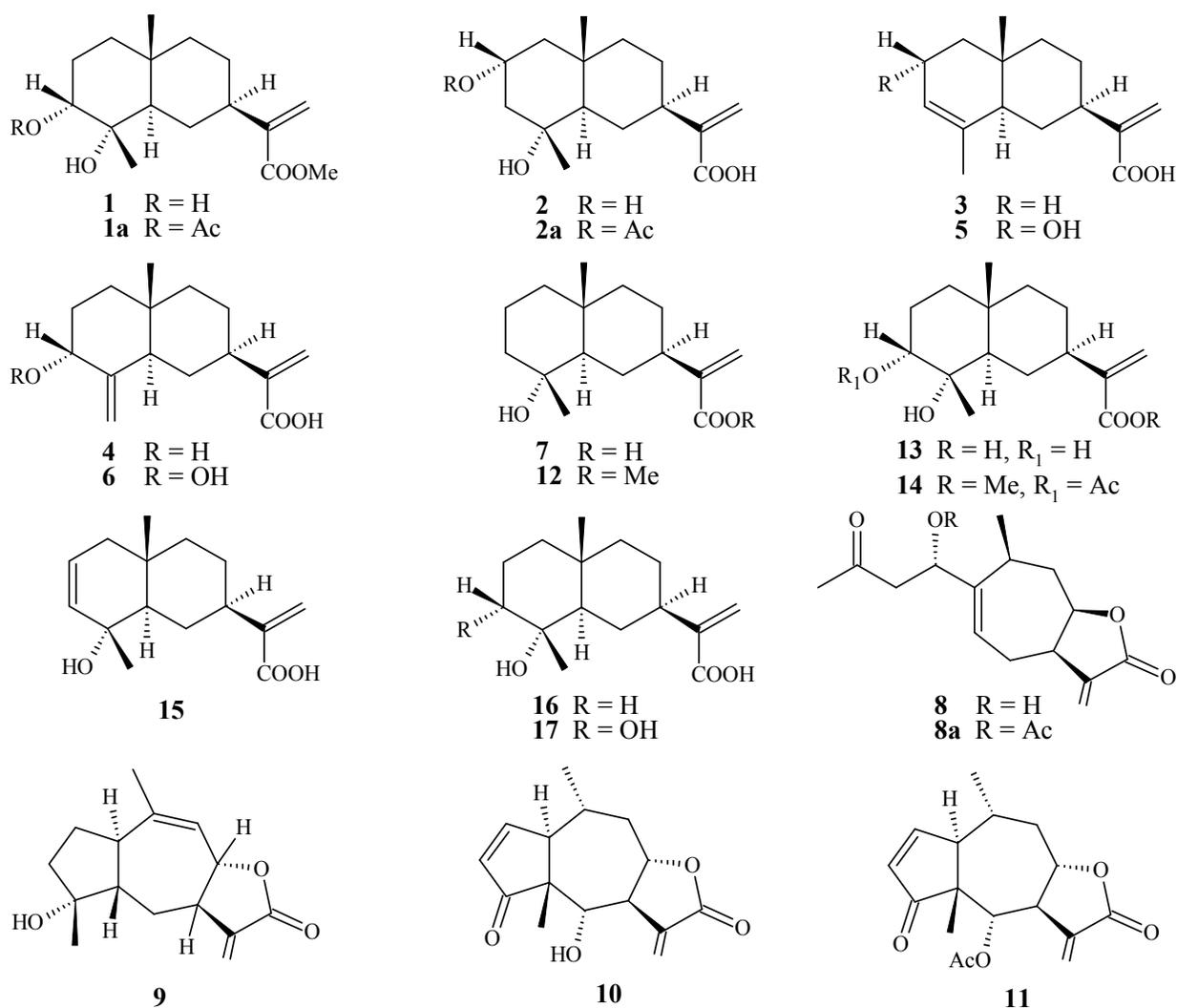


Figura 12. Sesquiterpenos aislados de *Dittrichia graveolens*.

Las estructuras 9, 10 y 11 son lactonas sesquiterpénicas.

Figura 13. El millerenólido es una LS del grupo de las germacranólidas aislado y purificado de *Viguiera sylvatica*, el cual puede inducir una fuerte actividad antiinflamatoria.⁴¹

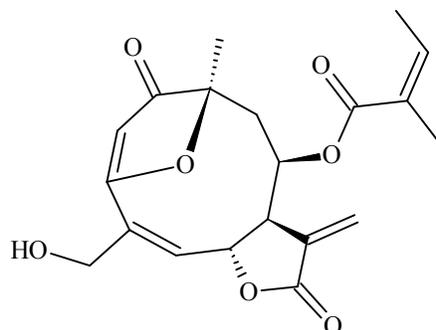


Figura 13. Millerenólido, aislado de *Viguiera sylvatica*.

Ellephantopus mollis es una planta usada en la medicina tradicional en Camerún para el tratamiento del cáncer, fracturas, dolores abdominales y mordeduras de serpiente, del tallo y raíz de esta planta se aislaron cinco LS (Figura 14) que mostraron efecto citotóxico significativo frente a células de neuroblastoma de ratón B104.⁴²

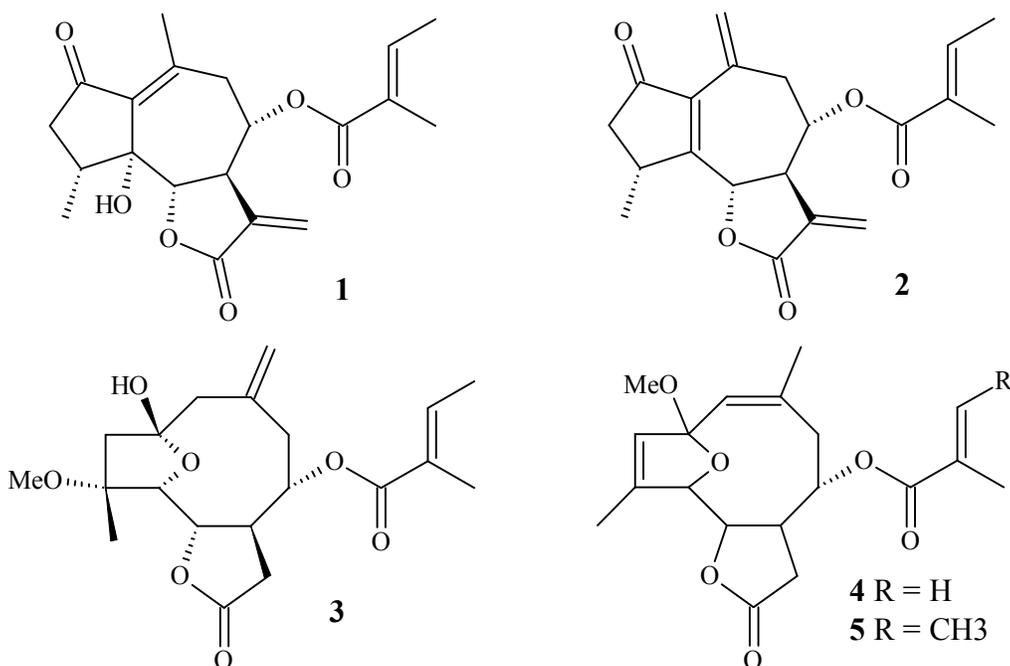


Figura 14. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Ellephantopus mollis*.

La citotoxicidad de las LS y una amplia variedad de efectos biológicos de importancia, por ejemplo su actividad antiinflamatoria, se ha atribuido a que estos compuestos son capaces de establecer enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilo de proteínas funcionales (generalmente enzimas). Sus sistemas electrofílicos α,β -insaturados, pueden producir reacciones de adición tipo Michael, por lo que se sugiere tienen características alquilantes. Al respecto, se sabe que los restos de cisteína en los polipéptidos, son un blanco para la reacción antes mencionada, ya que este aminoácido, posee azufre en su estructura.

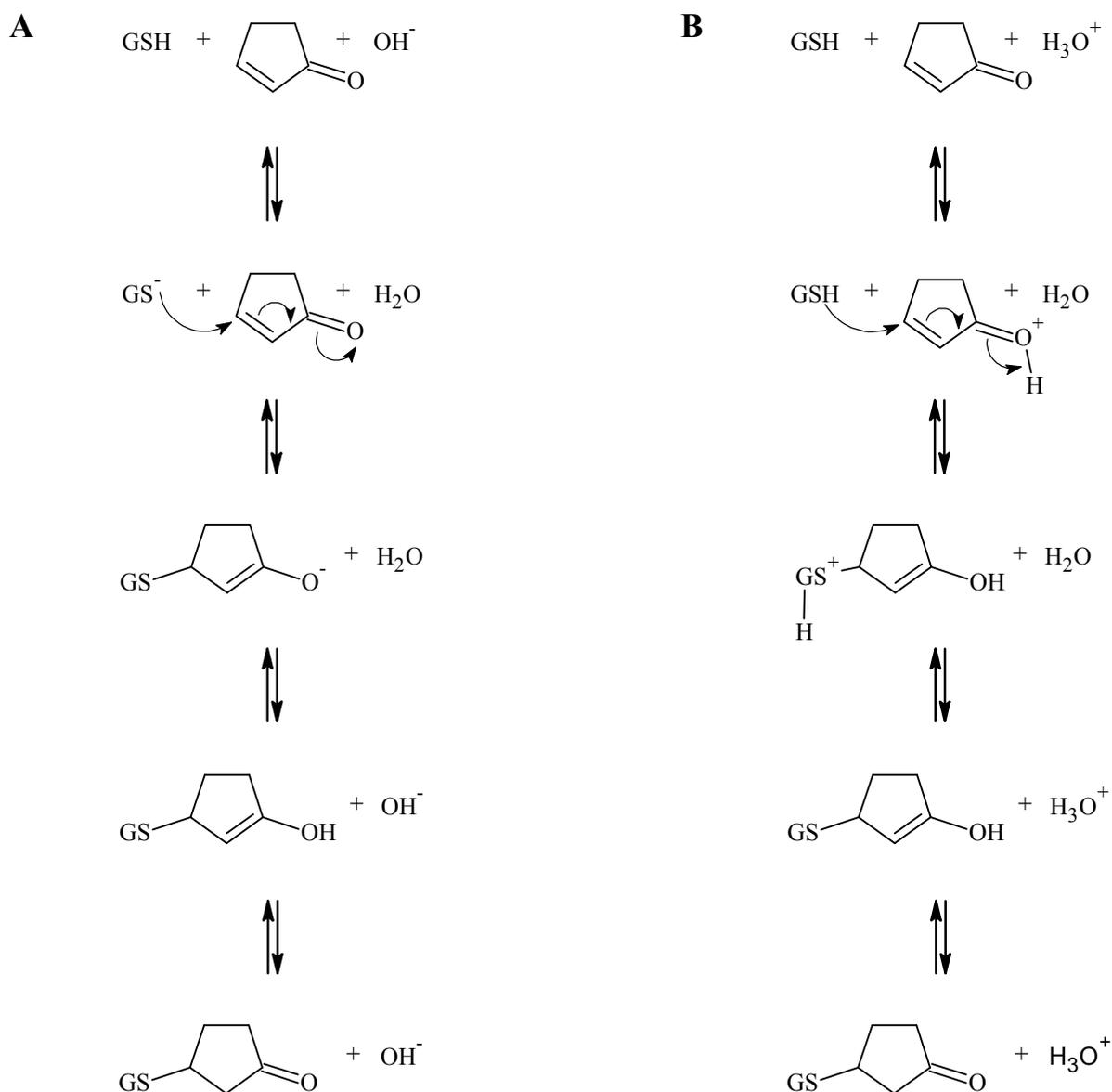
Su actividad citotóxica se ha relacionado con la inducción de apoptosis o muerte celular programada a través de su interacción con el proceso energético de las mitocondrias lo que lleva a una disminución del potencial de membrana mitocondrial, la supresión de la proteína proapoptótica Bcl-2 y la activación de caspasa 3, dando como resultado la fragmentación del ADN y por último la muerte celular. Otra característica muy importante de estas moléculas es su actividad citostática ya que tienen la capacidad de inducir arresto en el ciclo celular.^{23, 27-30, 58-61}

Reacción de Adición Tipo Michael

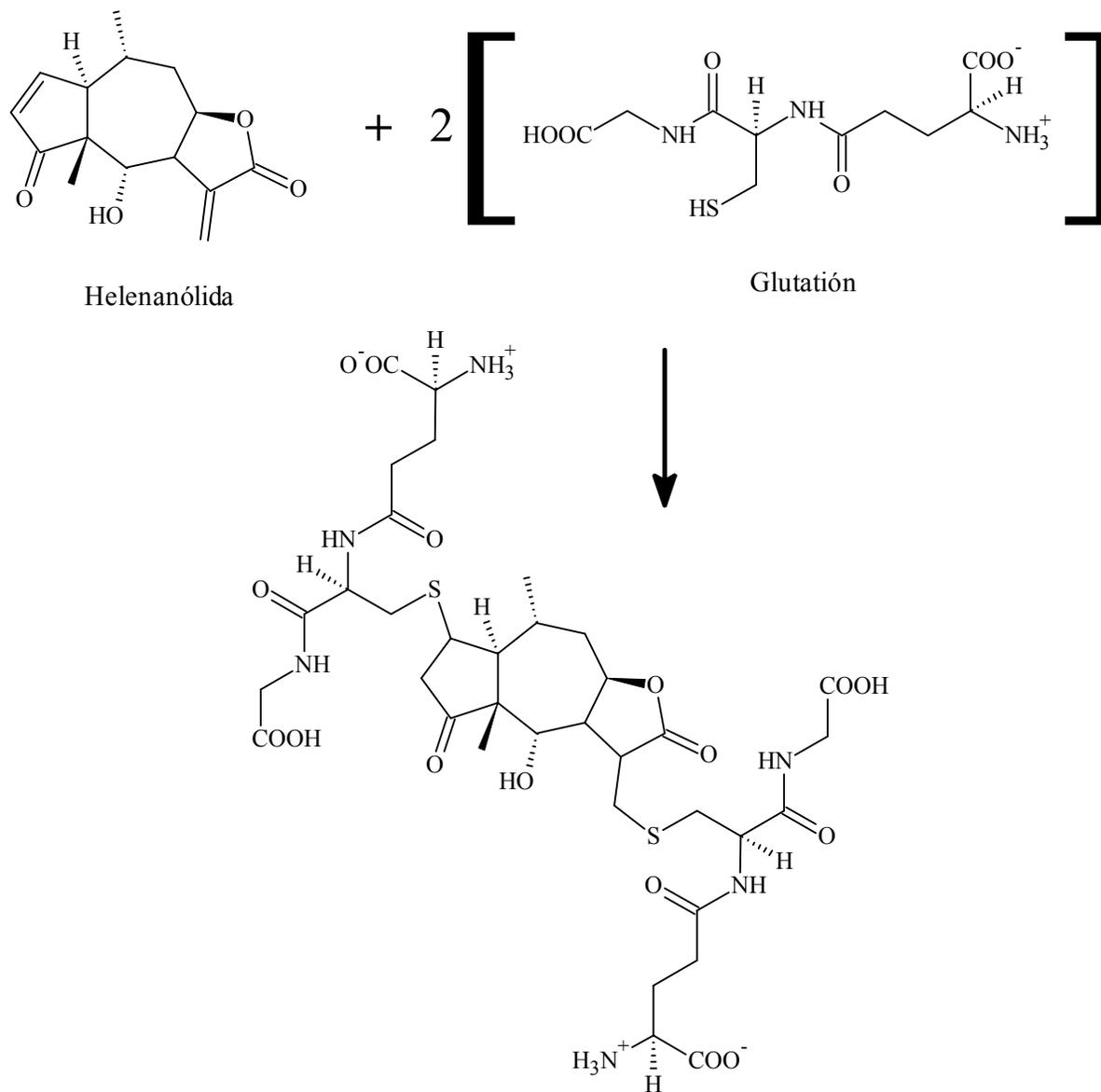
Las moléculas nucleofílicas pueden reaccionar con aldehídos y cetonas α,β -insaturados para dar productos conjugados de adición. Es posible tener la misma clase de adición conjugada si un ion enolato nucleofílico reacciona con un compuesto carbonílico α,β -insaturado, proceso que se conoce como reacción de Michael.

La reacción de Michael se efectúa con una amplia variedad de compuestos carbonílicos α,β -insaturados, no sólo con enonas conjugadas. Los aldehídos insaturados, ésteres, nitrilos y compuestos nitro pueden reaccionar como el componente receptor electrofílico en las reacciones de Michael. En forma similar, se pueden usar una variedad de donadores, que incluyen β -dicetonas, β -cetoésteres, ésteres malónicos, β -ceto nitrilos y compuestos nitro.⁶²

Schmidt⁶³ propuso el mecanismo de reacción de tipo Michael ilustrado en el *Esquema 5* por medio del cual las lactonas sesquiterpénicas reaccionan con tioles, principalmente glutatión (GSH) (*Esquema 6*).



Esquema 5. Mecanismo de reacción entre un anillo lactónico y GSH bajo condiciones ácidas (A) y bajo condiciones básicas (B).



Esquema 6. Reacci6n tipo Michael entre la Helenan6lida y Glutati6n.⁶³

Cáncer.

El cáncer se puede definir como una patología celular en la que una o varias células sufren cambios en sus características histológicas, morfológicas y funcionales, entre ellas la pérdida de la regulación de ciclo celular, causando una proliferación descontrolada de las células de los tejidos y, en algunos casos, afectando también a tejidos sanos distantes, como consecuencia de un proceso de metástasis. El resultado es una masa de tejido anormal, dañina para el huésped y prácticamente autónoma.^{64, 65}

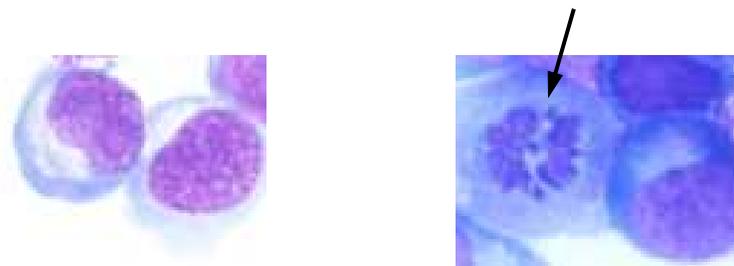
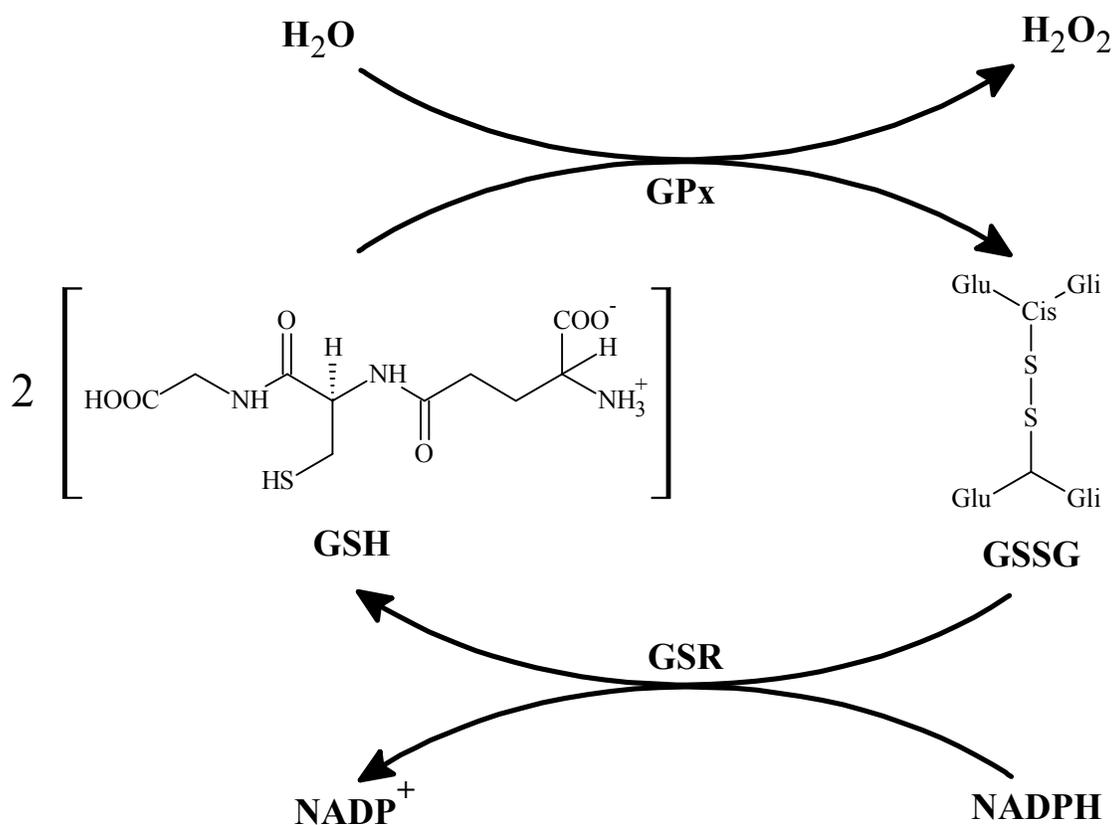


Figura 15. Células de leucemia mieloide crónica humana K562. A la izquierda se muestra una célula tumoral íntegra y a la derecha una célula en apoptosis inducida por un fármaco, la flecha señala la fragmentación del núcleo.

Al glutatión se le ha implicado en un mecanismo de resistencia de las células tumorales a agentes antitumorales electrofílicos tales como los agentes alquilantes, los cuales son susceptibles de ataque nucleofílico por grupos sulfhidrilos encontrándose una correlación significativamente estrecha entre niveles altos de glutatión y/o tioles no proteicos (GSH / NPSH) y la actividad aumentada de la glutatión transferasa (GST) en la resistencia a agentes alquilantes en varias líneas de células tumorales como células linfoblásticas L5178 Y-mostaza nitrogenada, células leucémicas L1210-melfalan, altos niveles de NPSH-mecloretamina, y células de ovario de hámster chino.⁶⁶

En condiciones fisiológicas, el glutatión oxidado (GSSG) se encuentra en equilibrio con el glutatión reducido (GSH) siendo una reacción catalizada por las enzimas glutatión reductasa (GSR) y glutatión peroxidasa (GPx) (*Esquema 7*).



Esquema 7. Equilibrio entre GSH y GSSG en condiciones fisiológicas normales.

Es importante mencionar que la mayoría de los antineoplásicos que se utilizan en la práctica clínica actúan sobre el ciclo celular como mecanismo de acción, si embargo se observa una elevada tasa de fracaso al tratamiento debido a la sobreexpresión de p53 y Bcl-2, las cuales son proteínas con actividad antiapoptótica. De tal forma que los tumores se vuelven resistentes a los antineoplásicos. Actualmente las investigaciones para el diseño de nuevos fármacos están dirigidas a compuestos que utilicen a la mitocondria como diana terapéutica, y de igual manera compuestos que presentan sistemas carbonílicos α,β -insaturados, puesto que por medio del mecanismo de reacción de Michael regulan los niveles intracelulares de glutatión.⁶⁷

Existen medicamentos antineoplásicos actualmente utilizados que se producen a partir de productos naturales, entre los cuales destacan la vinblastina, vinorelbina, vincristina y el taxol. Estas moléculas presentan una importante actividad en el tratamiento de leucemia, linfoma, cáncer de testículo, mama y pulmón, y actúan específicamente sobre ciclo celular.⁶⁸

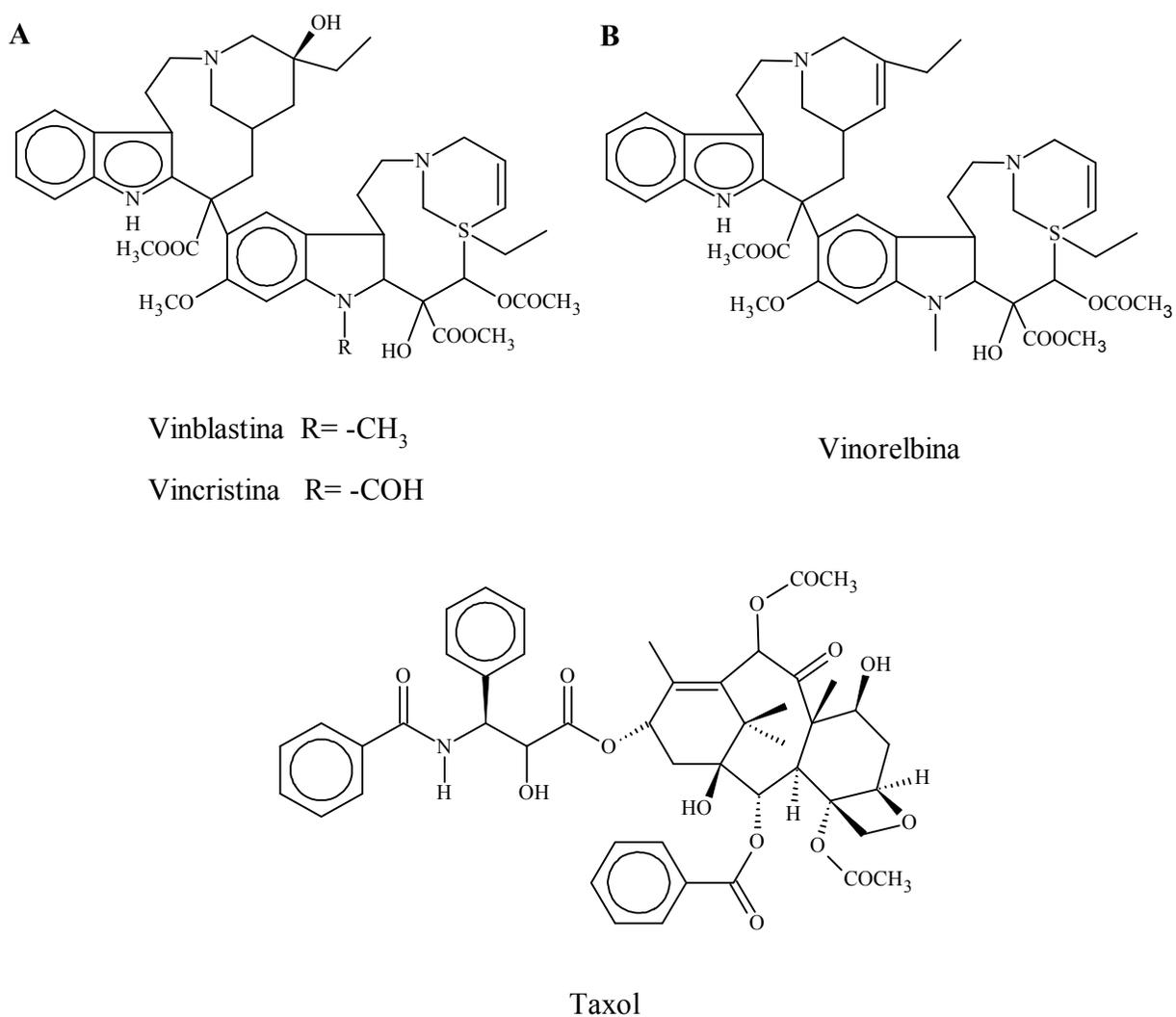


Figura 16. Compuestos de origen natural utilizados en la terapia contra el cáncer.

Apoptosis.

El crecimiento y la división celular están altamente regulados, aunque una excepción es proporcionada por las células cancerígenas, la cual surge como una variante que ha perdido el sendero usual de proliferación. Consecuentemente, hay un creciente interés en la búsqueda de sustancias anticancerígenas que tengan una alta eficacia, baja toxicidad y mínimos efectos secundarios.

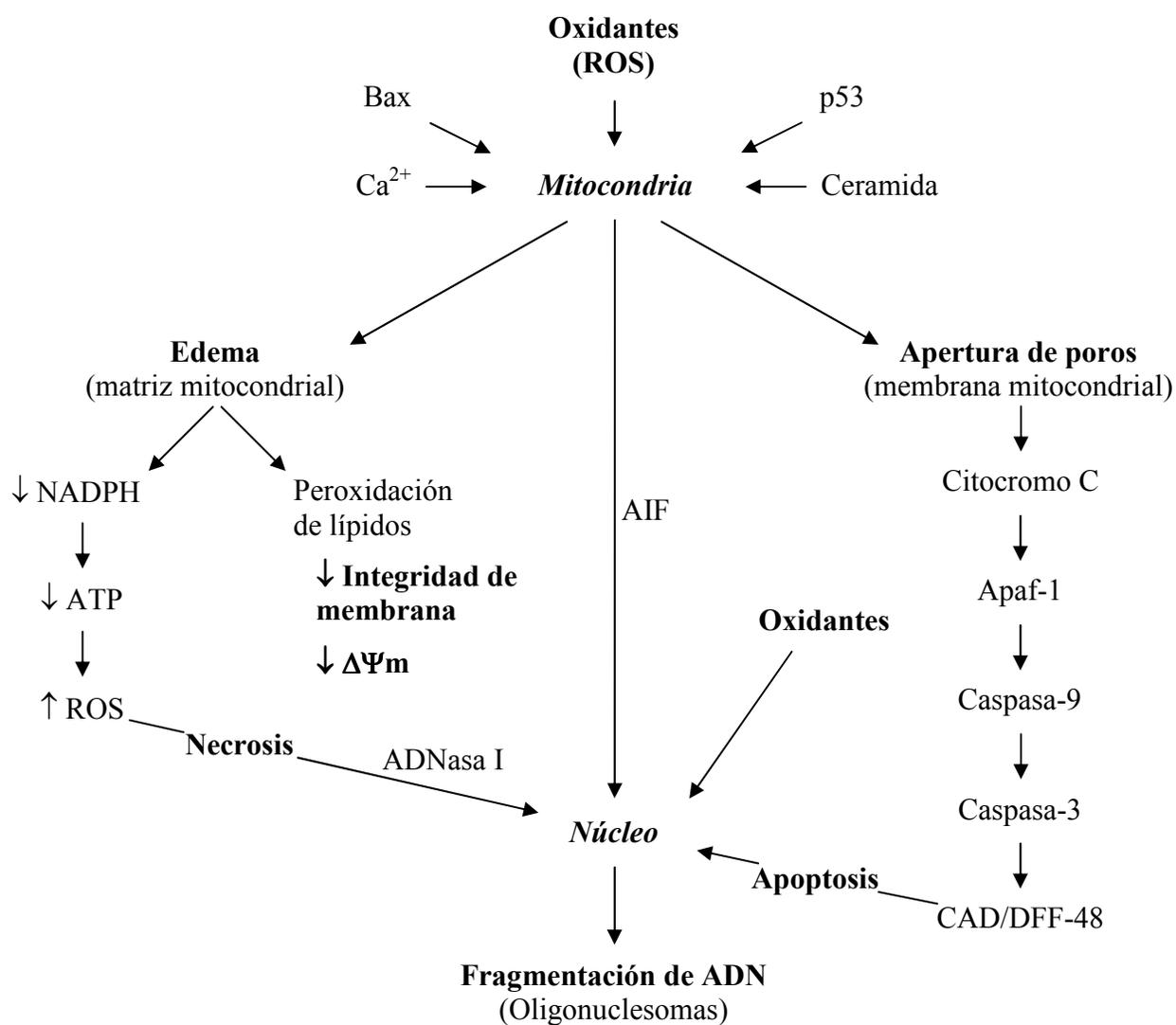
La apoptosis es resultado de la activación de los genes de las células, que a su vez activan rutas bioquímicas preprogramadas que conducen a la muerte de la célula. Estas rutas están estrechamente relacionadas con la alteración mitocondrial, la cual induce cambios en el transporte de electrones y pérdida del potencial mitocondrial transmembranal. Después de tal alteración, se presenta una redistribución de la fosfatidilserina (PS) en la membrana extracelular el cual es un fenómeno temprano y común en el proceso de apoptosis.

Las células apoptóticas también están caracterizadas por el encogimiento celular, deformaciones en el citoesqueleto, permeabilización de la membrana, condensación de la cromatina, y fragmentación de ADN. Otro evento importante es el arresto de ciclo celular G_0/G_1 , que es un punto crucial de control de daño de ADN y actúa como un salvaguarda importante en la estabilidad genómica. Las rutas apoptóticas deben estar significativamente alteradas en las células cancerígenas con respecto a las células sanas, y estas diferencias pueden representar una alternativa terapéutica que puede ser explorada durante el desarrollo de nuevas drogas antineoplásicas.^{67, 69}

Las mitocondrias son la mayor fuente de producción de radicales libres. Se ha estimado que durante la transferencia de electrones al oxígeno molecular en la cadena respiratoria, entre 1 y 5% se pierden, la mayoría de estos electrones participan en la formación de $O^{\cdot-}$. Todo factor que disminuya la eficiencia en el acoplamiento de la cadena de transporte de electrones, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Tanto los superóxidos como la peroxidación de lípidos se ven notablemente incrementados durante la apoptosis inducida por un gran número de estímulos.^{70, 71}

Estrés Oxidativo y su Relación con la Apoptosis.

Una fuente importante de ROS mitocondrial es la ubisemiquinona generada en el complejo citocromo bc₁ por la coenzima Q (CoQ). Considerando que la oxidación de NADH es seguida de generación de ROS, se ha planteado la hipótesis de que la oxidación de NADH mitocondrial en hepatocitos intactos contribuye al establecimiento de la transición de permeabilidad mitocondrial (TPM) después del estrés oxidativo. Un mecanismo de la apertura de los poros de transición de permeabilidad pudiera ser la oxidación mediada por ROS de los ditioles vecinales en las membranas.⁷¹



Esquema 8. Mecanismos de muerte celular mediada por radicales libres de oxígeno.

En muchos modelos de estrés oxidativo se ha demostrado la correlación entre el grado y extensión de muerte celular con la magnitud de la depleción de glutatión. Así mismo, se ha demostrado que la oxidación del glutatión puede predisponer a la aparición de la TPM, debido a que reacciona rápidamente con los radicales libres, impidiendo que despolaricen la membrana mitocondrial. Así, el glutatión mitocondrial puede ser importante para mantener los poros de transición de permeabilidad en su estado cerrado.

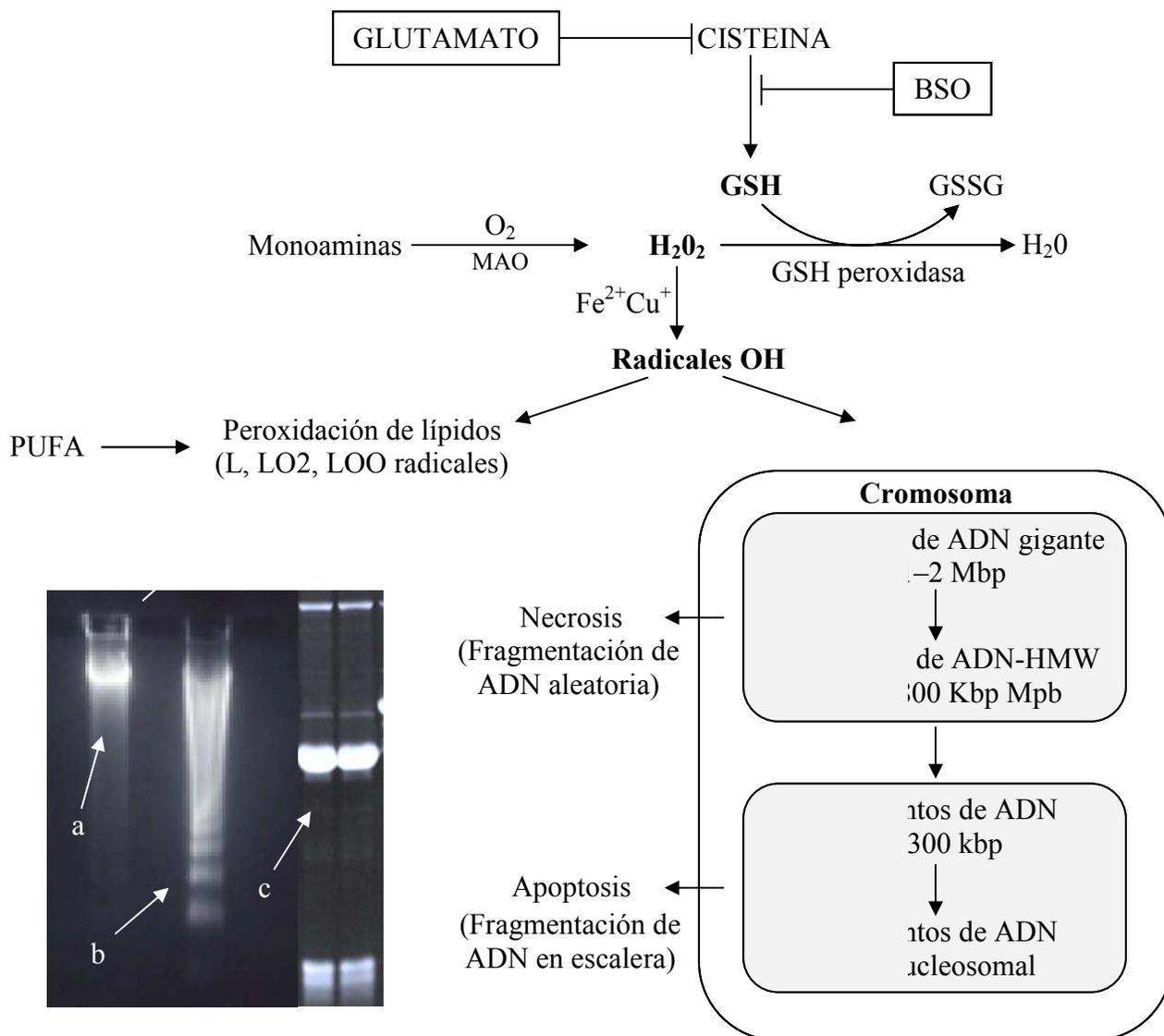
Se ha observado que la apoptosis inducida en células tumorales es acompañada de una disminución de los niveles de GSH mientras que cuando hay sobreexpresión de Bcl-2 puede prevenirse la apoptosis por un incremento del total del glutatión celular. Esto ha llevado a realizar numerosos estudios que puedan confirmar el papel que juega el glutatión en la inducción de apoptosis.

El GSH es el mayor tiol no proteínico de las células de los mamíferos y está implicado en muchas funciones celulares. Este tripéptido (γ -glutamil-L-cistenil-glicina) juega un papel central en la protección de las células frente a los radicales libres, frente a intermediarios reactivos del oxígeno y frente a electrófilos, y por lo tanto, también en la determinación de la sensibilidad de las células a la radiación y a la citotoxicidad inducida por fármacos. El glutatión existe en equilibrio en dos formas, reducido y oxidado. Como el GSH es fácilmente oxidado, la acetilación del grupo tiol estabiliza la molécula aumentando su biodisponibilidad *in vivo*. Así, el punto de interés radica en investigar el efecto del GSH en la proliferación de células tumorales.^{66, 67, 72}

Hasta ahora, han sido publicados muchos resultados contradictorios en relación al papel que juega el GSH en la apoptosis, diseminación del cáncer y en la carcinogénesis. Kroemer y Martínez⁷³ postulan que ha quedado demostrado que el glutatión, además, de la N-acetil-cisteína (un "limpiador" de radicales libres) inhiben la muerte celular programada debido a que se relacionaron altas proporciones en la proliferación de células tumorales con altos niveles de GSH. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la concentración total de GSH se relaciona positivamente con la resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia.^{66, 73}

Otros autores han publicado los efectos protectores del GSH y enzimas relacionadas bajo condiciones fisiológicas y su papel beneficioso en la carcinogénesis y otras enfermedades. También ha sido publicado que el GSH puede servir como un pro-oxidante además de antioxidante. En lo que respecta al daño del ADN, la conversión de H_2O_2 en un reactivo más oxidante $\bullet OH$ está facilitada por los iones metálicos (específicamente hierro o cobre “reacción de Fenton”). Bajo condiciones fisiológicas parece que el GSH presente en el núcleo celular tiende más a limitar que a promover los daños sobre el ADN por causa de los radicales libres relacionados con el cobre. Es evidente que la propiedad pro-oxidante cobre (II)-reductor del GSH está en equilibrio con su propiedad anti-oxidante cobre (I)-estabilizador. Como anti-oxidante, el GSH protege a las células frente a los radicales libres, a los electrófilos y al estrés oxidativo. Se han realizado pruebas clínicas con el propósito de evaluar los efectos terapéuticos de los derivados de la cisteína, tales como la N-acetil-cisteína. En algunos casos las estrategias de tratamiento se asociaron con beneficios clínicos, sin embargo, el mecanismo de la posible actividad antitumoral de la cisteína, el GSH o el GSSG no ha podido ser dilucidado.

Varios mecanismos pueden estar implicados en lo que respecta a los sistemas de transporte de la membrana para el GSH, este es liberado por el hígado al plasma sanguíneo y a la bilis, la parte liberada en el plasma es usada por muchos tejidos (p.ej. riñón, pulmón, cerebro), sin embargo, el GSH en sí mismo no es significativamente transportado a la mayoría de las células de estos tejidos, sino que es transformado por la catálisis de γ -glutamyl transpeptidasa y dipeptidasa localizadas en la membrana y los productos de la descomposición son transportados y utilizados nuevamente para la síntesis de GSH. Los niveles de GSH intracelular pueden ser incrementados mediante la administración de ésteres de GSH, los cuales (en contraste) son bien transportados al interior de muchos tipos de células y separados del grupo éster, para formar GSH.^{66, 67, 71-73}



Esquema 9. Mecanismo de daño celular inducido por depleción de glutatión. Las flechas en color blanco indican (a) ADN integro, (b) fragmentación en escalera de ADN y (c) fragmentación aleatoria de ADN.⁷¹

En la actualidad, se considera que en condiciones no patológicas, cuando las células se sienten dañadas se comportan en forma altruista, es decir, inducen su propia muerte (suicidio celular o apoptosis), para dejar lugar a las células nuevas que realicen su función. Sin embargo, no cualquier daño es capaz de inducir la maquinaria apoptótica, de hecho la mayor parte de las agresiones a las células son amortiguadas por los diferentes blindajes de ésta. Entre estos blindajes, el que mayor aceptación tiene es el asociado a los tioles. Los tioles de las proteínas en general y, en particular, los tioles asociados al glutatión. La reacción puede ocurrir espontánea o enzimáticamente por vía de la GST con una amplia variedad de sustancias electrofílicas, incluyendo agentes antineoplásicos clínicamente útiles.

En células tumorales, como las de una línea de tumor ascítico de Ehrlich, aproximadamente el 35-40% de incremento de NPSH es debido a un aumento de GSHi, hecho que resulta relevante ya que también se informa que un número de diferentes tioles, disulfuros y agentes de reducción inorgánica, que contienen azufre, son capaces de promover el crecimiento celular aún en un medio deficiente de cisteína.^{67, 69, 70, 73}

Hipótesis

La búsqueda de potenciales sustancias antineoplásicas obtenidas de fuentes naturales se ha intensificado en los últimos años, al respecto existen informes de que las lactonas sesquiterpénicas que presentan en su estructura sistemas cíclicos con carbonilos α,β -insaturados han mostrado tener actividad anticancerígena. Por lo que, si se evalúa el efecto inductor de apoptosis de una familia de germacranólidas que presentan dichos sistemas como lo son las glaucólidas A, D, E y sus derivados, se podrá inducir la muerte celular programada sobre las células de leucemia mieloide crónica humana K562, y ser propuestas como sustancias antineoplásicas.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la actividad inductora de apoptosis de una familia de las lactonas sesquiterpénicas, naturales y semisintéticas sobre células de leucemia mieloide crónica humana K562.

Objetivos Particulares

- Evaluar la citotoxicidad de las lactonas sesquiterpénicas en la línea celular K562.
- Determinar la concentración a la cual los compuestos tienen efecto sobre la viabilidad de la línea celular K562.
- Determinar el tipo de muerte celular inducida por los compuestos mencionados, mediante las técnicas de: Anexina-V y Rodamina 123.
- Proponer la vía de señalización por la cual se induce apoptosis en las células K562

Parte Experimental

Reactivos

- Dimetilsulfoxido (DMSO) grado biología molecular (SIGMA-ALDRICH)
- Medio de cultivo RPMI 1640 r8758 (SIGMA, Cell Culture Reagents).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen).
- Antibiótico/Antimicótico (AB/AM) (10.000 mg/mL penicilina, estreptomina 25 mg/mL y anfotericina B; GIBCO, Invitrogen Corporation).
- Azul tripano (SIGMA, Cell Culture Reagents).
- Anexina-V – FITC (Kit Recombinant Human Annexin – FITC conjugated, CALTAG, Spec. ANNEXIN Vo. 1-3)
- Rhodamina – 123 (SIGMA, Cell Culture Reagents).

Equipos

- Para el análisis de las muestras por citometría de flujo, se utilizo el citómetro Beckton Dickinson FACScalibur 4C y el software CellQuestPRO.
- Campana de flujo laminar VECO Mod. CIVAC 39
- Estufa para cultivos celulares QUEUE Systems Mod. QWj2710A
- Centrifuga EPPENDORF Mod. 5471R

Compuestos

En este estudio se utilizaron 3 compuestos de origen natural: Glaucólida A (GA), Glaucólida D (GD) y Glaucólida E (GE) obtenidos de la planta *Critoniopsis uniflora*, y tres compuestos semi-sintéticos obtenidos a partir de diversas reacciones de GE: Glaucólida E Ciclizada (GE-C), Glaucólida E Hidrogenada (GE-H) y Glaucólida E OH (GE-OH). Estos compuestos fueron aislados y caracterizados conjuntamente con el Dr. Benjamín Velasco Bejarano y el Q.I. Rodrigo Vian Carrión en el Laboratorio L-122 de la Sección de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

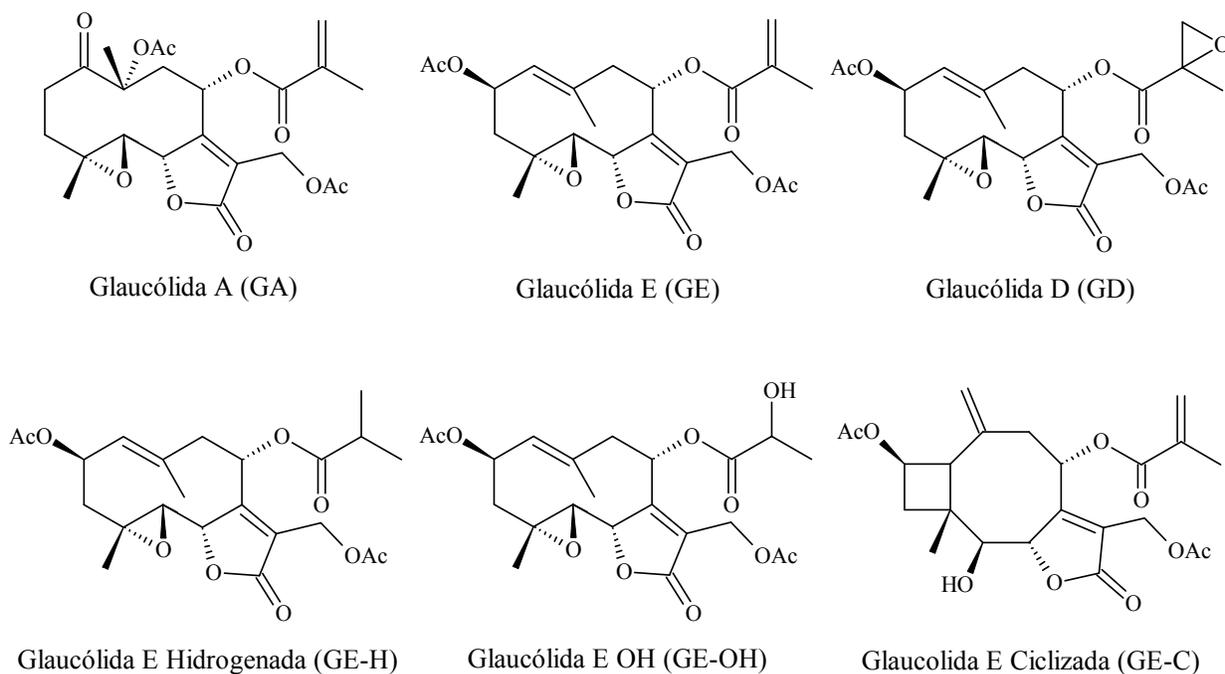


Figura 17. Estructuras de los compuestos utilizados durante el presente estudio.

Línea celular

Las células K562 derivan de una leucemia mieloide crónica de la especie humana y del sexo femenino. Esta línea celular se ha considerado un buen modelo para pruebas antitumorales, tumorigenicidad, diferenciación y farmacodinámicas entre otras.

La línea celular fue gentilmente donada por la M. en C. Teresa Ramírez Apan del Instituto de Química de la UNAM, y se encuentra disponible en el catálogo ATCC como CCL 243; ECACC 89121407; IZSBS BS TCL33; DSMZ ACC 10 e ICLC HTL94001.

Cultivo celular

El ensayo se llevo a cabo en placas para cultivo de 24 pozos. Una concentración de 2.5×10^5 células/mL en un volumen final de 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen California) enriquecido al 10 % con suero fetal bovino descomplementado (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen California) y antibiótico/antimicótico (10.000 mg/mL penicilina, estreptomycin 25 mg/mL y anfotericina B; GIBCO Invitrogen Corporation NY)/pozo en atmosfera húmeda a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Las células fueron incubadas con 1 mL de las soluciones problema durante 24. Se utilizó medio RPMI 1640 como testigo y DMSO como control negativo. Las soluciones fueron preparadas a concentraciones de 1×10^4 μM, para obtener una soluciones finales de 12.5, 25, 50, 75 y 100 μM.

Observaciones:

- La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se realizaron bajo condiciones de esterilidad, trabajando en una campana de flujo laminar.

Determinación del Efecto Citotóxico.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.⁷⁴

La IC₅₀ es una medida de la eficacia de un compuesto sustancia para inhibir la función biológica o bioquímica. A menudo, el compuesto en cuestión es un candidato a fármaco. Esta medida cuantitativa indica la concentración del compuesto o sustancia necesaria inhibir un proceso biológico, como la inhibición enzimática, crecimiento celular, receptor celular, etc., por mitad

Diferentes autores han desarrollado pruebas *in vitro* para conocer los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).⁷⁵

En el caso particular de este trabajo, se utilizó la técnica de exclusión con azul tripano; el azul tripano es un colorante supravital, es decir, solamente tiñe a las células muertas puesto que las células vivas al mantener la membrana íntegra impide la entrada de dicho colorante. Todos los compuestos fueron probados a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 μM , a 24 h de cultivo.

Los ensayos se realizaron en placas para ELISA fondo plano (Costar 3696, Cambridge MA), con 5×10^4 células/pozo resuspendidas en 100 μL de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con SFB descomplementado al 10 %.

Cada compuesto fue probado por triplicado a las concentraciones ya mencionadas, durante 24 horas, utilizando como controles negativos RPMI y DMSO. Concluido el tiempo de incubación las células fueron resuspendidas, se tomó una alícuota de 50 μL , se tiñeron con 50 μL de una

solución de azul tripano al 5 % en PBS 1x, inmediatamente después, se colocó la muestra en la cámara de Neubauer.

Se contaron 4 campos de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ diferenciando las células muertas de las células vivas, con lo cual se determinó la citotoxicidad (utilizando la fórmula: células vivas/células totales $\times 100$) y la cantidad total de células tanto vivas como muertas por pozo.

Determinación del Tipo de Muerte Celular y Externalización de Fosfatidilserina

Para determinar si la muerte celular inducida por las lactonas en el ensayo de citotoxicidad, fue causada por apoptosis o por necrosis, se determinó la externalización de PS como un evento que ocurre durante la apoptosis.

Para determinar la externalización de PS, las células fueron teñidas con Anexina-V – FITC y yoduro de propidio (PI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La tinción con Anexina-V – FITC / PI nos permite, mediante citometría de flujo, cuantificar y diferenciar entre células vivas (Anexina-V- / PI-), necróticas (Anexina-V- / PI+), apoptóticas tempranas (Anexina-V+ / PI-) y apoptóticas tardías (Anexina-V+ / PI+).

Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular. Uno de éstos es la alteración de la membrana plasmática, donde se produce una translocación de la PS de la cara interna a la cara externa de la membrana.

La Anexina-V es una proteína dependiente de Ca^{2+} que une fosfolípidos cargados negativamente, con alta afinidad a la PS. La PS también se encuentra en la cara externa de la membrana de las células necróticas. La Anexina-V se utiliza para diferenciar las células apoptóticas (durante las fases iniciales del proceso) y necróticas, de las células viables donde la PS se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática.

La integridad de la membrana plasmática se ve comprometida en las células necróticas, de manera que al teñirlas con PI, este puede acceder al núcleo celular y unirse al ADN. La tinción

simultánea con Anexina-V y PI permite discriminar las células apoptóticas de las necróticas, y de las células viables.

Las células viables no presentan translocación de la PS ni ruptura de la membrana plasmática y son dobles negativas para la tinción. Las células en fases iniciales de la apoptosis son positivas para la Anexina-V y negativas para el yoduro de propidio, ya que tienen translocada la PS pero mantienen la membrana íntegra, las células apoptóticas tardías al igual que las apoptóticas tempranas presentan la PS translocada, pero al perder la integridad de su membrana el PI puede acceder al interior de la misma y alojarse en el núcleo mostrando un patrón de Anexina-V⁺ / PI⁺ en la citometría de flujo.

Las células necróticas, sólo presentan un patrón de tinción Anexina-V⁻ / PI⁺ dado que al ser sufrir una muerte rápida sólo se pierde la integridad de la membrana, hecho que permite que el PI ingrese dentro de la célula y unirse al ADN contenido en el núcleo.

Las células K562, después de 24 h de cultivo, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, el botón celular fue resuspendido en 100 µl de buffer de unión de Anexina-V y 3 µl de Anexina-V – FITC. Las células se incubaron nuevamente a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad. Por último se les agregaron 300 µl del mismo buffer de unión y 3 µl de PI. Las muestras se adquirieron y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur 4C (Beckton Dickinson) utilizando el programa CellQuestPRO. En el diagrama de puntos de tamaño vs. granularidad se delimitó la región y se adquirieron 20,000 eventos en dicha región por muestra. Los resultados se expresan como el porcentaje de células apoptóticas (Anexina-V⁺ / PI⁻).

Determinación de la Disminución del Potencial de Membrana Mitocondrial.

Igualmente, las células en apoptosis, presentan reducción del potencial de membrana mitocondrial, principalmente cuando esta muerte es activada por la vía intrínseca, esto provoca que las células en presencia del fluorocromo Rho-123 se tiñan con menor intensidad que las células vivas, ya que el fluorocromo no puede ser retenido en el interior de la mitocondria, como

ocurre con las células vivas, las cuales se tiñen fuertemente. Este procedimiento es posible gracias a que el colorante puede difundir libremente por las membranas celular y mitocondrial.

Para evaluar si la muerte celular inducida en células K562 altero el potencial de membrana mitocondrial, las células fueron tratadas con los diferentes compuestos a la concentraciones indicadas por 24 horas. Después del cultivo, las células K562 se lavaron con PBS y se incubaron con 20 $\mu\text{g/mL}$ de Rodamina 123 (Rho 123, Sigma) a temperatura ambiente por 20 minutos. Después de lavar las células dos veces, la fluorescencia de Rho 123 fue analizada usando un citómetro FACScalibur (Beckton Dickinson). Las células viables retuvieron la Rho 123 y las células apoptóticas liberaron el colorante y son detectadas por el equipo como células con baja fluorescencia.

Resultados

Determinación del Efecto Citotóxico.

En la *Figura 18* se presentan los resultados de citotoxicidad obtenidos para GE en células K562 después de 24 horas de cultivo. Como se puede observar, la GE presentó un efecto citotóxico dependiente de la concentración mostrando un efecto significativo desde la concentración más baja probada (25 μM). A partir de estos valores se calculó la IC_{50} por medio de una regresión lineal dando como resultado $\text{IC}_{50} = 52.51 \mu\text{M}$, siendo este valor inferior al sugerido en el *Journal of Natural Products*, donde se recomienda una $\text{IC}_{50} \leq 100 \mu\text{M}$.

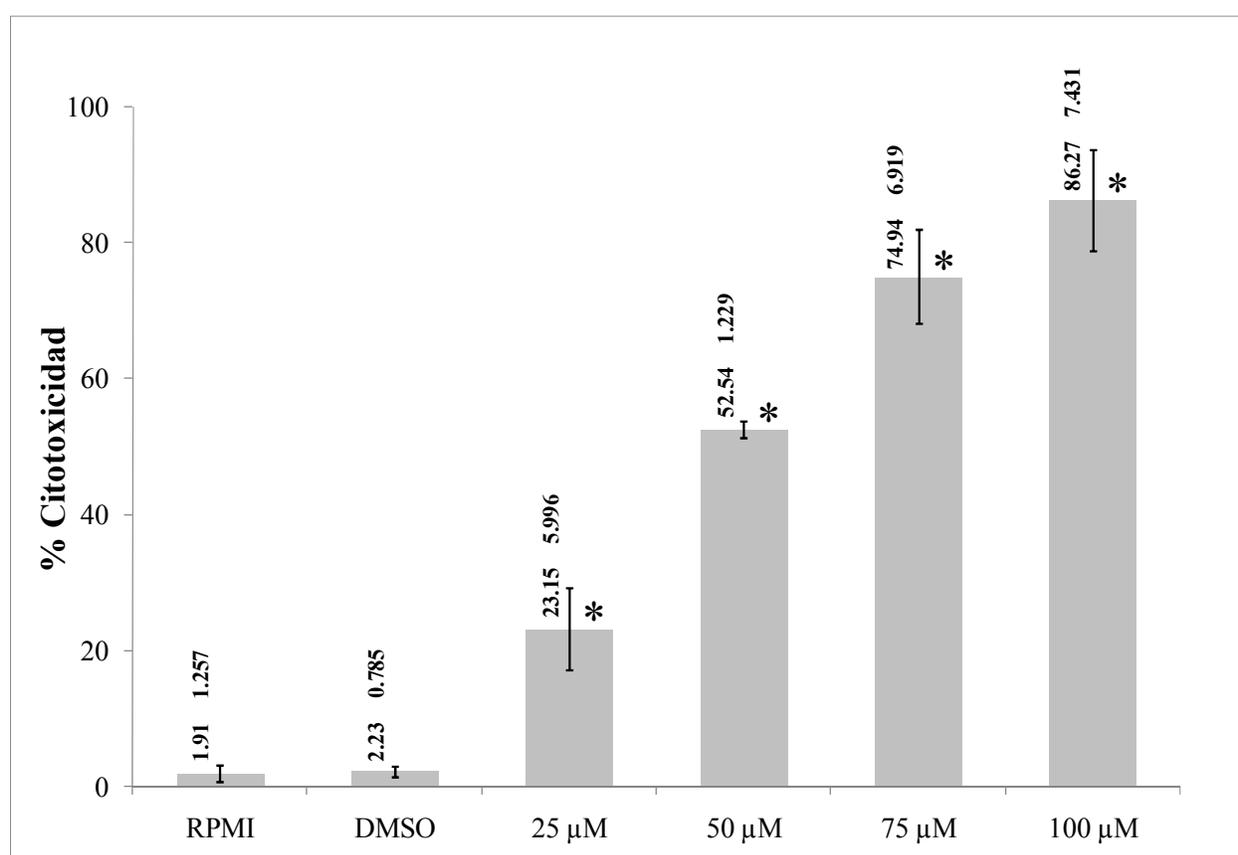


Figura 18. Efecto citotóxico de GE en células K562. Los resultados corresponden a $\bar{x} \pm \text{D.S.}$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (* $p \leq 0.0001$).

En la *Figura 19* se presentan los resultados de citotoxicidad obtenidos para GE-H en células K562 después de 24 horas de cultivo. Con base al *Journal of Natural Products*, GE-H presenta una actividad biológica relevante ($IC_{50} = 62.52 \mu M$), los resultados del análisis estadístico mostraron que sólo a partir de la concentración de $50 \mu M$ este compuesto presentó un efecto citotóxico significativo. Es importante mencionar que debido a la diferencia entre los resultados obtenidos en esta prueba entre las concentraciones de 50 y $75 \mu M$, se decidió analizar una concentración intermedia entre éstas, es decir, $62.5 \mu M$, a la cual también hubo actividad citotóxica.

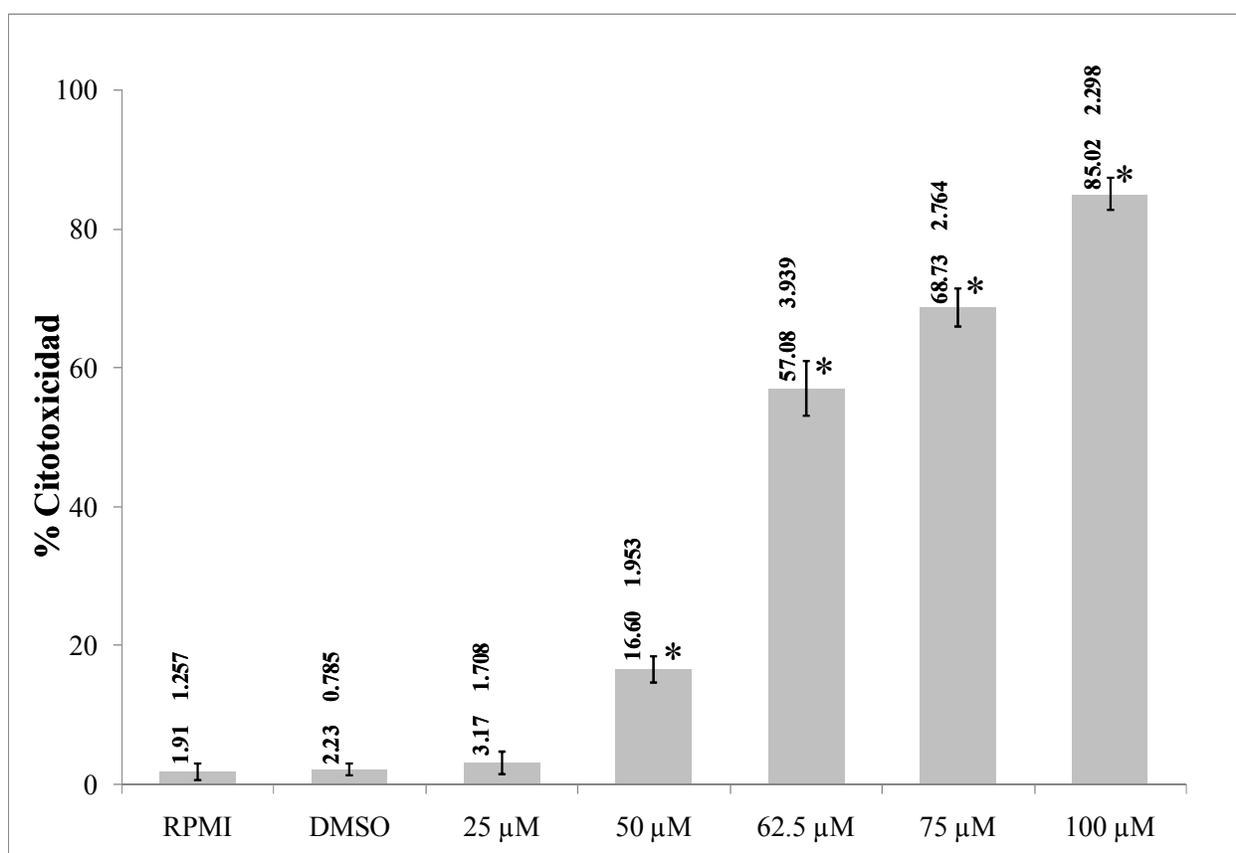


Figura 19. Efecto citotóxico de GE-H en células K562. Los resultados corresponden a $\chi \pm D.S.$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI ($*p \leq 0.0001$).

En la *Figura 20* se presentan los resultados de citotoxicidad obtenidos para GA en células K562 después de 24 horas de cultivo.

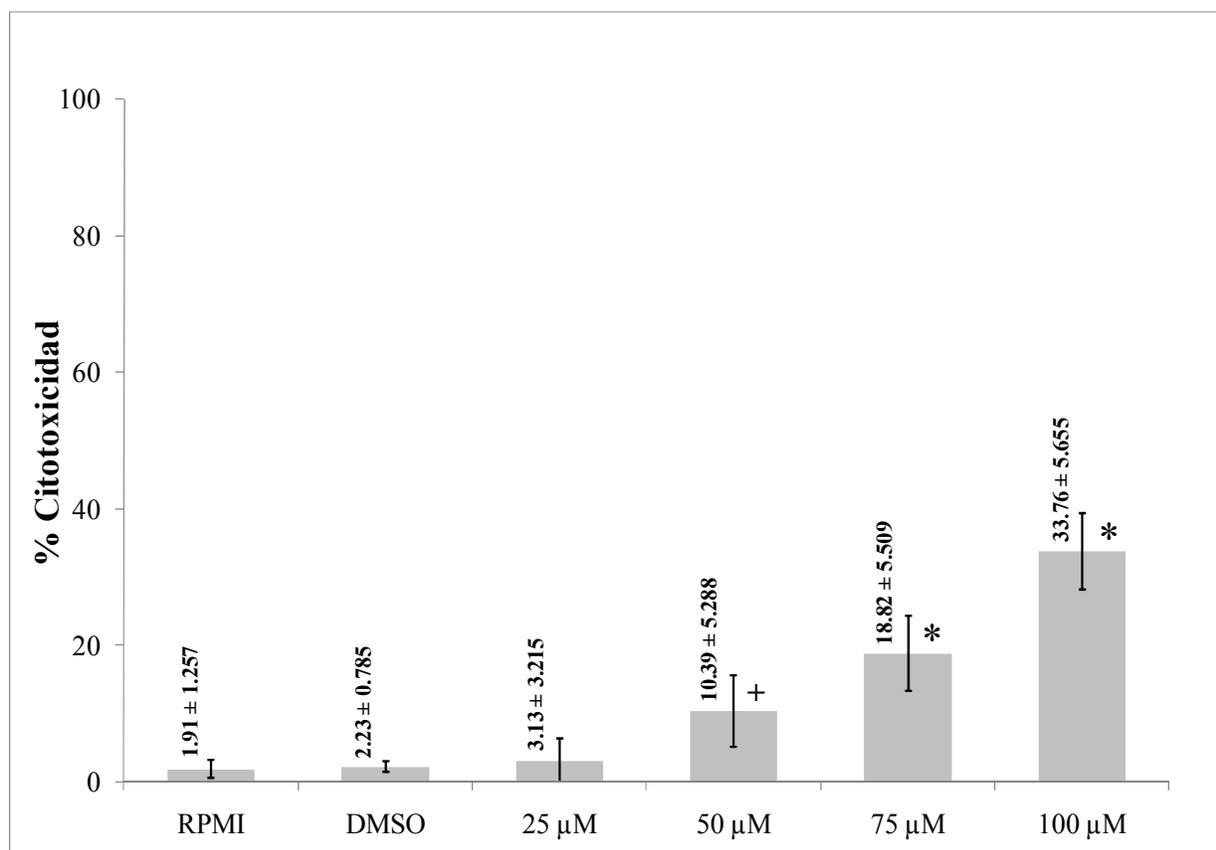


Figura 20. Efecto citotóxico de GA en células K562. Los resultados corresponden a la $\bar{x} \pm D.S.$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (+ $p=0.0018$ y * $p \leq 0.0001$).

En la *Figura 21* se presentan los resultados de citotoxicidad obtenidos para GD en células K562 después de 24 horas de cultivo.

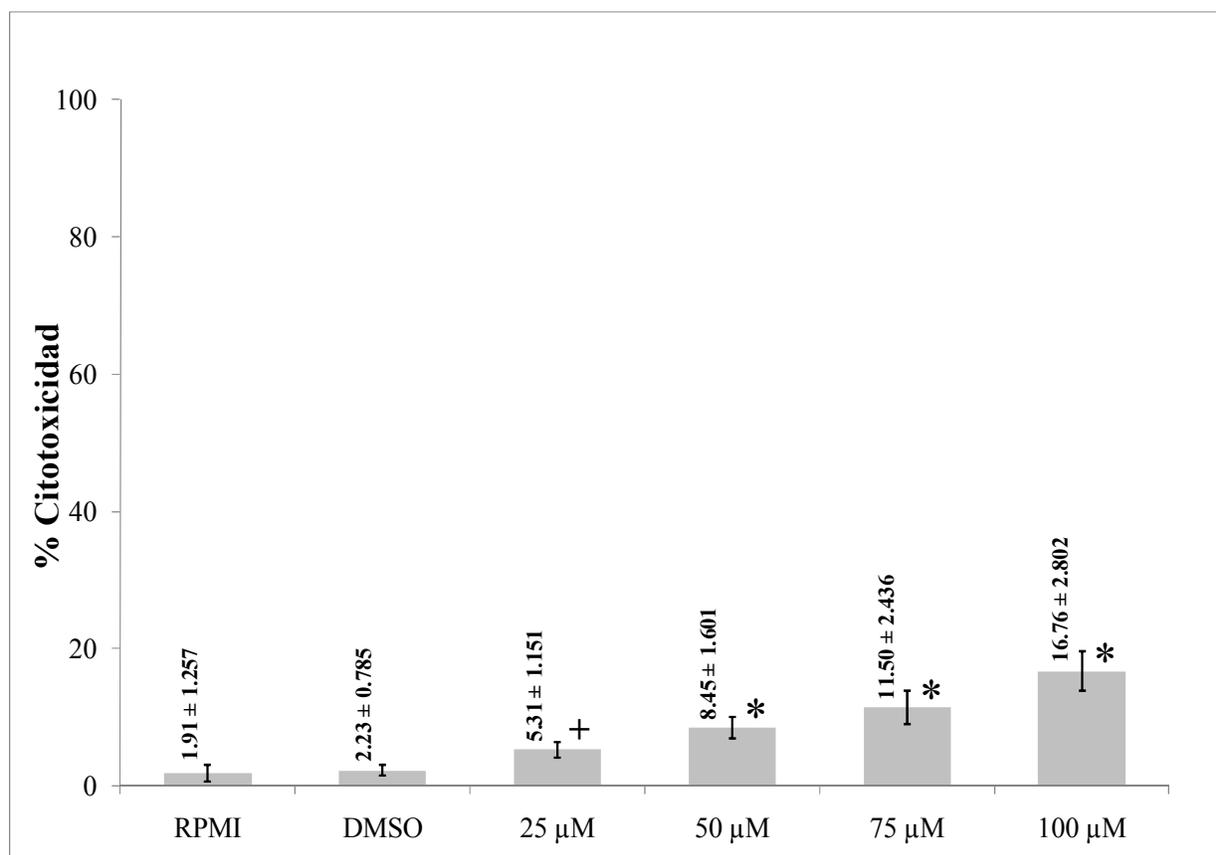


Figura 21. Efecto citotóxico de GD en células K562. Los resultados corresponden a la $\bar{x} \pm D.S.$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (+ $p=0.0166$ y * $p \leq 0.0001$).

Las glaucólidas GA y GD, como se muestra en las *Figuras 20* y *21* respectivamente, presentaron un efecto citotóxico significativo a partir de la concentración de 50 μM para GA y 25 μM para GD, pero de acuerdo al *Journal of Natural Products* ninguno de estos dos compuestos tienen actividad biológica relevante sobre células de leucemia K562, pues el IC_{50} calculado para estos dos compuestos (IC_{50} GA = 154.64 μM e IC_{50} GD = 354.29 μM) está por encima del valor máximo considerado en dicha revista, debido a esto, se decidió concluir el estudio de la actividad biológica de estos compuestos hasta esta prueba.

En las *Figuras 22 y 23* se presentan los resultados de citotoxicidad obtenidos para GE-C y GE-OH respectivamente en células K562 después de 24 horas de cultivo.

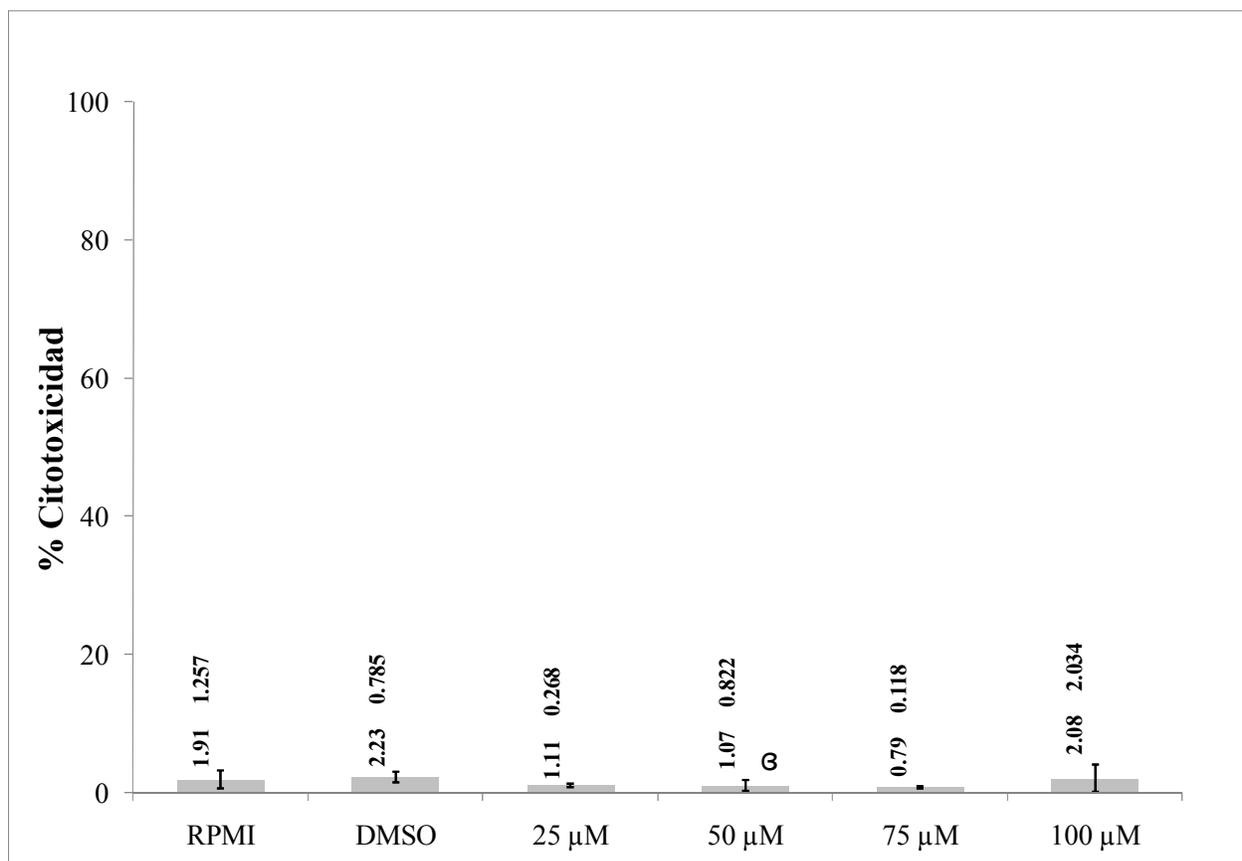


Figura 22. Efecto citotóxico de GE-C en células K562. Los resultados corresponden a la $\bar{x} \pm$ D.S. de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI.

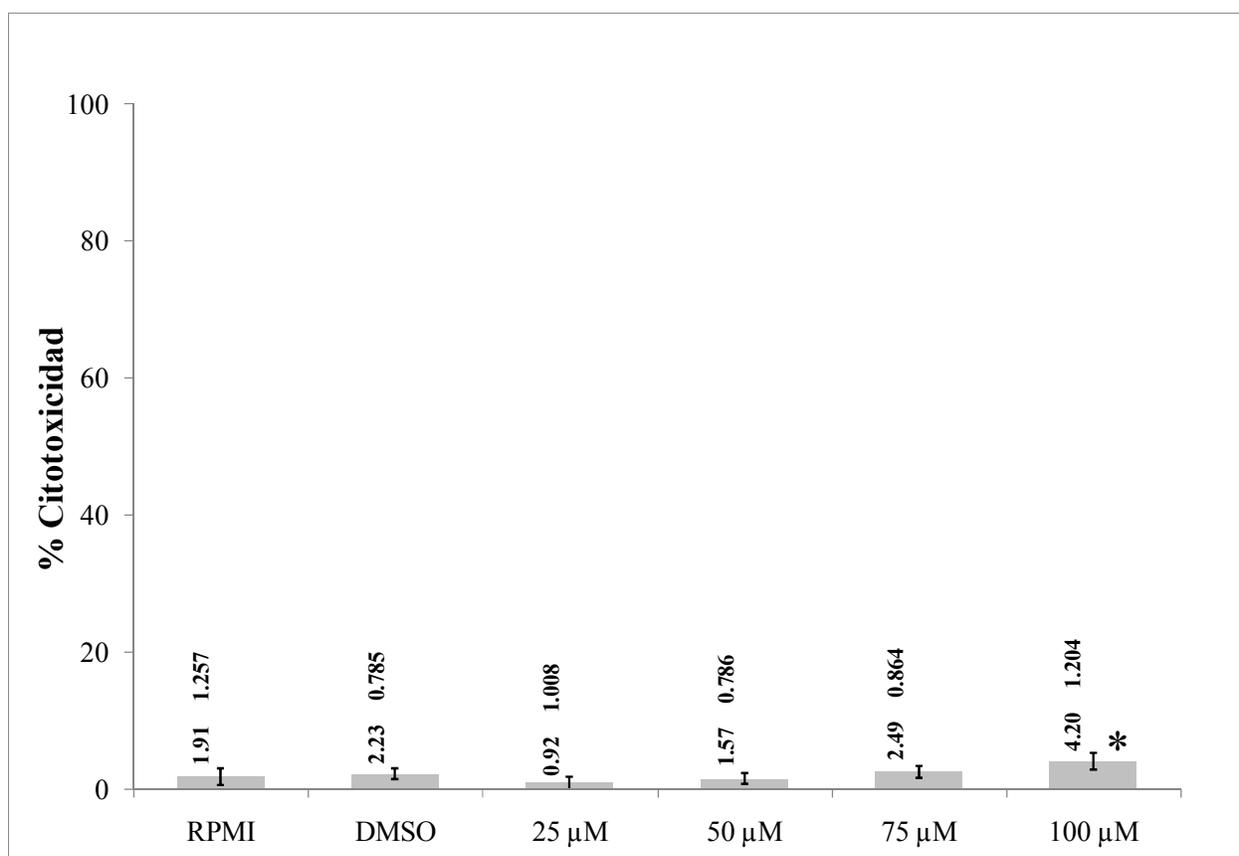


Figura 23. Efecto citotóxico de GE-OH en células K562. Los resultados corresponden a la $\bar{x} \pm$ D.S. de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (* $p \leq 0.0026$).

De acuerdo a las Figuras 22 y 23 respectivamente, los compuestos GE-C y GE-OH, no muestran actividad biológica relevante frente a células de leucemia K562 ni diferencia significativa en el análisis estadístico (salvo GE-OH a 100 μ M cuando en el análisis ANOVA es comparado frente a RPMI), por tal motivo estos compuestos no fueron evaluados en los ensayos de determinación del tipo de muerte celular.

Determinación del Tipo de Muerte Celular y Externalización de Fosfatidilserina

En la *Figura 24* se presentan los resultados de la prueba de externalización de PS para GE en células K562 después de 24 horas de cultivo. Como se puede observar, las células tratadas con GE son positivas para la tinción con Anexina-V, mostrando un efecto significativo dependiente de la concentración, puesto que al verse aumentada la GE en el medio, aumenta la proporción de células positivas para esta prueba. Cabe mencionar que se omitieron los resultados de los ensayos en esta prueba de GE a 100 μM , dado que las células, al ser tratadas a esta concentración se mostraban demasiado dañadas para poder realizar un correcto análisis citométrico.

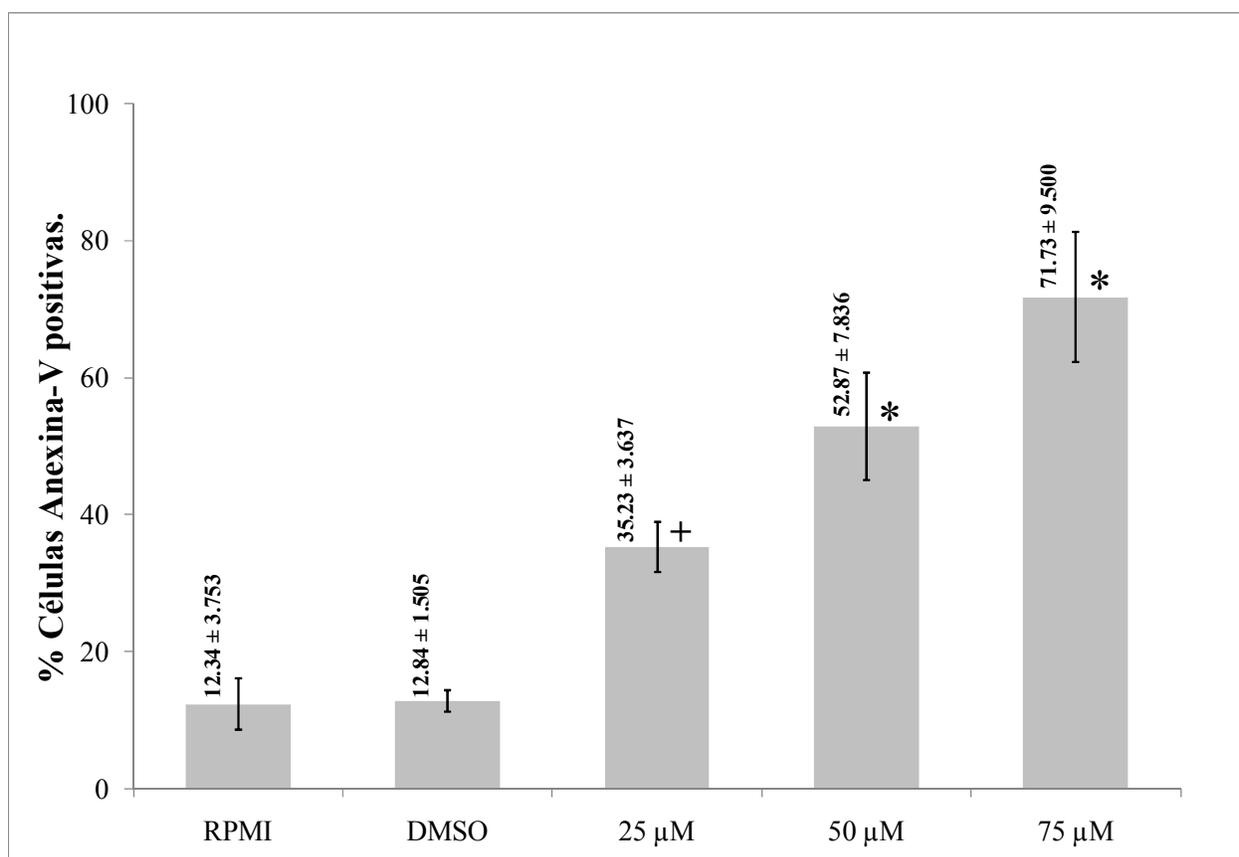


Figura 24. Células Anexina-V positivas en presencia de GE. Los resultados son la $\bar{x} \pm \text{D.S.}$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (+ $p=0.0010$ y * $p \leq 0.0001$).

En la *Figura 25* se observa que mientras se aumenta la concentración de GE, aumenta la alteración de la morfología de las células K562, pues presentan reducción del tamaño y mayor complejidad intracelular, también es posible observar que la población de células no tratadas es mas homogénea en comparación de aquellas que fueron tratadas.

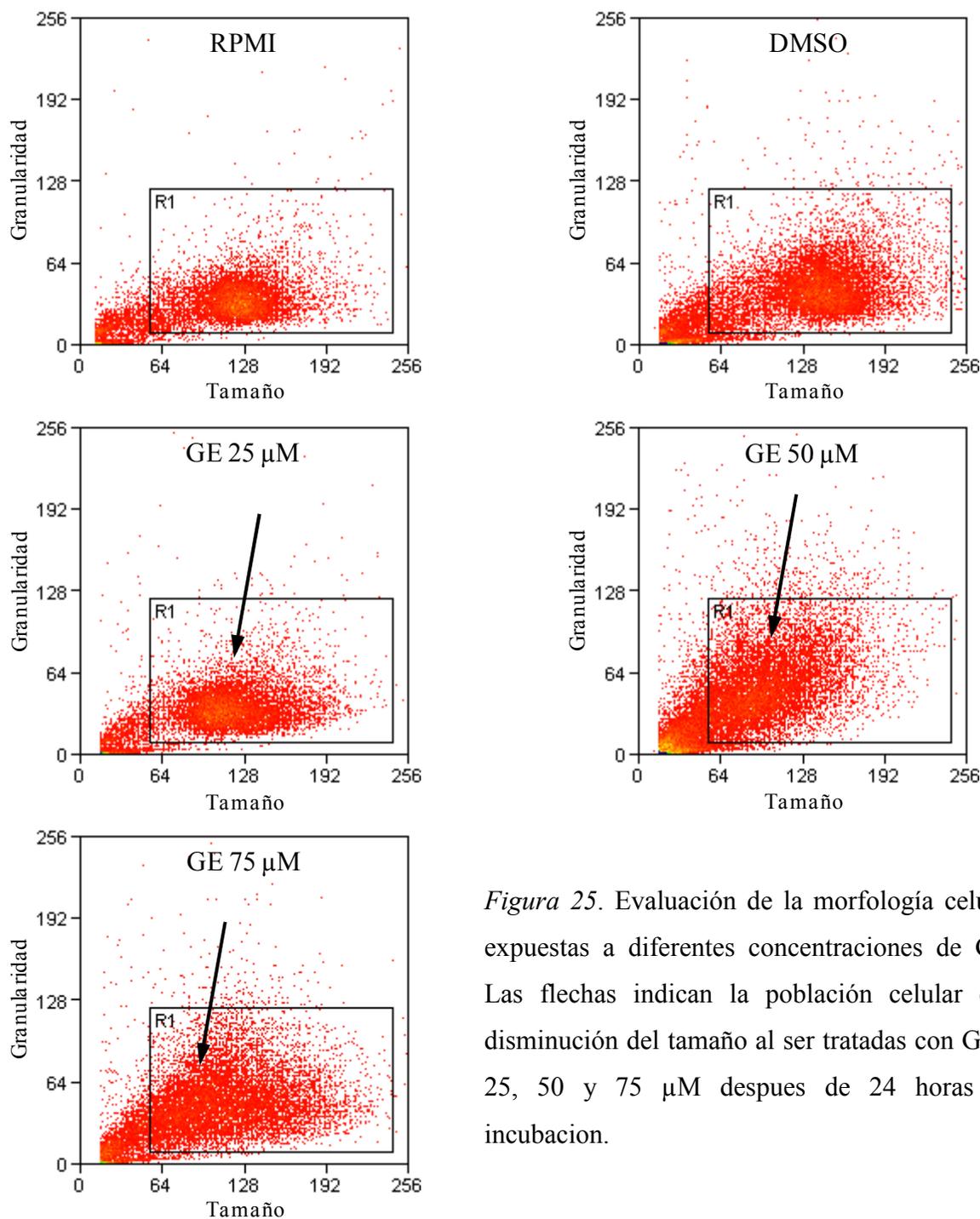


Figura 25. Evaluación de la morfología celular expuestas a diferentes concentraciones de GE. Las flechas indican la población celular con disminución del tamaño al ser tratadas con GE a 25, 50 y 75 μM despues de 24 horas de incubacion.

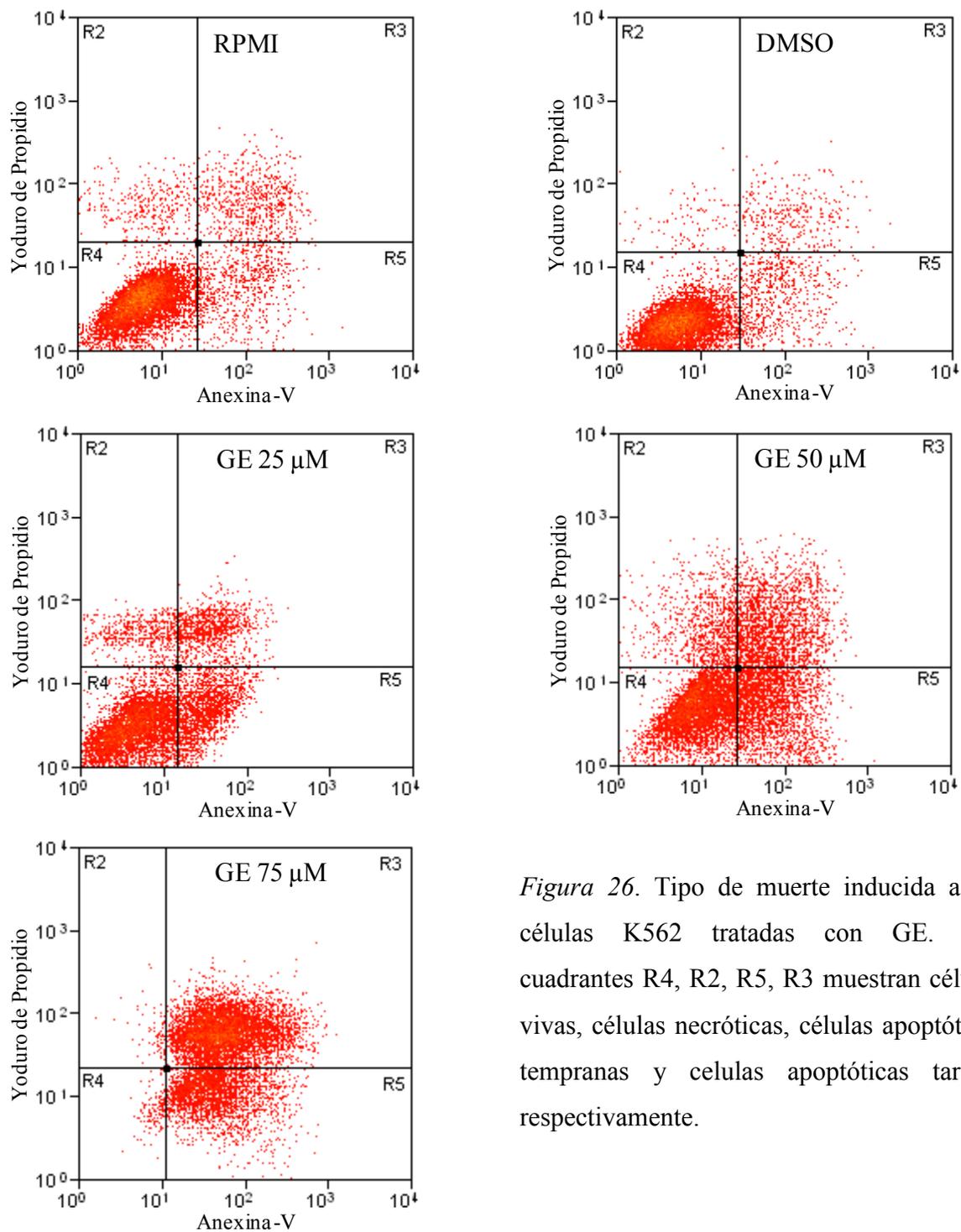


Figura 26. Tipo de muerte inducida a las células K562 tratadas con GE. Los cuadrantes R4, R2, R5, R3 muestran células vivas, células necróticas, células apoptóticas tempranas y células apoptóticas tardías respectivamente.

Como se puede observar en la *Figura 26*, GE muestra un efecto dependiente de la concentración en la inducción de apoptosis en células de leucemia K562, alcanzando un 71.73 ± 9.5 % de células Anexina-V positivas a $75 \mu\text{M}$.

En la *Figura 27* se presentan los resultados de la prueba de externalización de PS para GE-H en células K562 después de 24 horas de cultivo, observándose una importante actividad a 75 y 100 μM , los resultados del análisis estadístico que sólo a estas dos concentraciones hay diferencia significativa cuando son comparadas con RPMI. La significancia estadística se considero cuando $\rho \leq 0.05$, obsérvese que no se presentan los resultados a 25 μM , puesto que a dicha concentración GE-H no tiene efecto alguno.

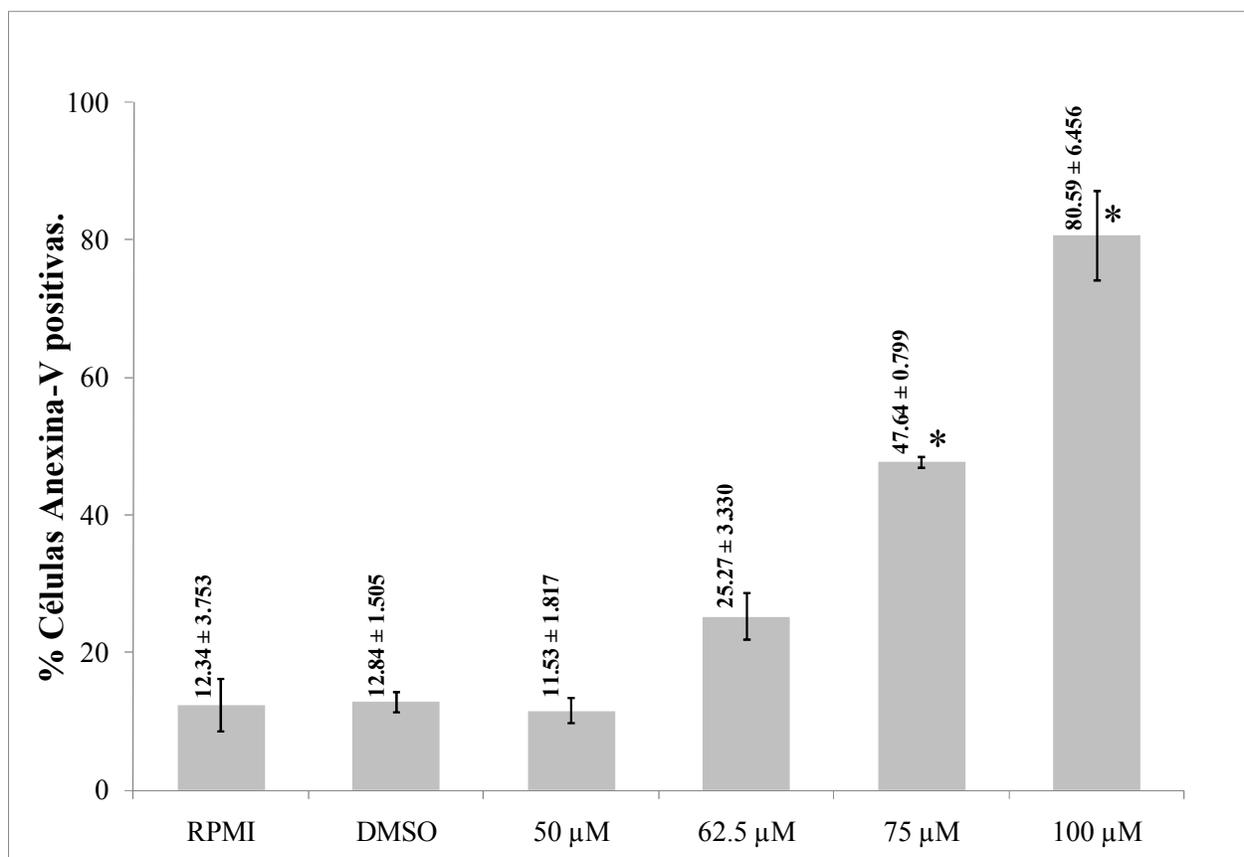


Figura 27. Células Anexina-V positivas en presencia de GE-H. Los resultados son la $\bar{x} \pm \text{D.S.}$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de ρ fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (* $\rho \leq 0.0001$).

Una de las características de las células apoptóticas es la disminución de su tamaño, en la *Figura 28* se puede observar que las células que han sido expuestas a diferentes concentraciones de GE-H, disminuyeron su tamaño y aumentaron su complejidad intracelular, teniendo un efecto dependiente de la concentración según se muestra.

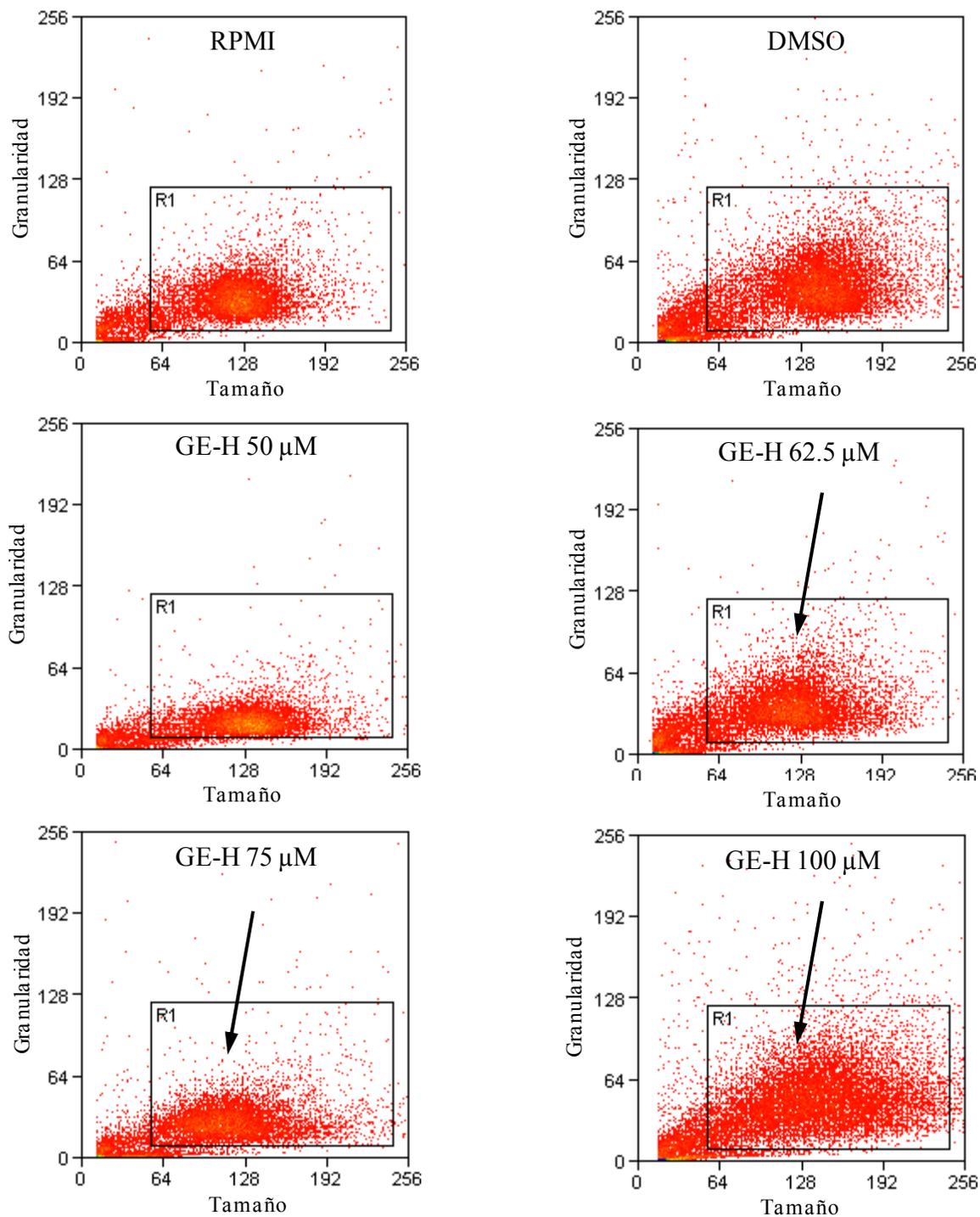


Figura 28. Evaluación de la morfología celular expuestas a diferentes concentraciones de GE-H. Las flechas indican la población celular con disminución del tamaño al ser tratadas con GE-H a 50, 62.5, 75 y 100 μM después de 24 horas de incubación.

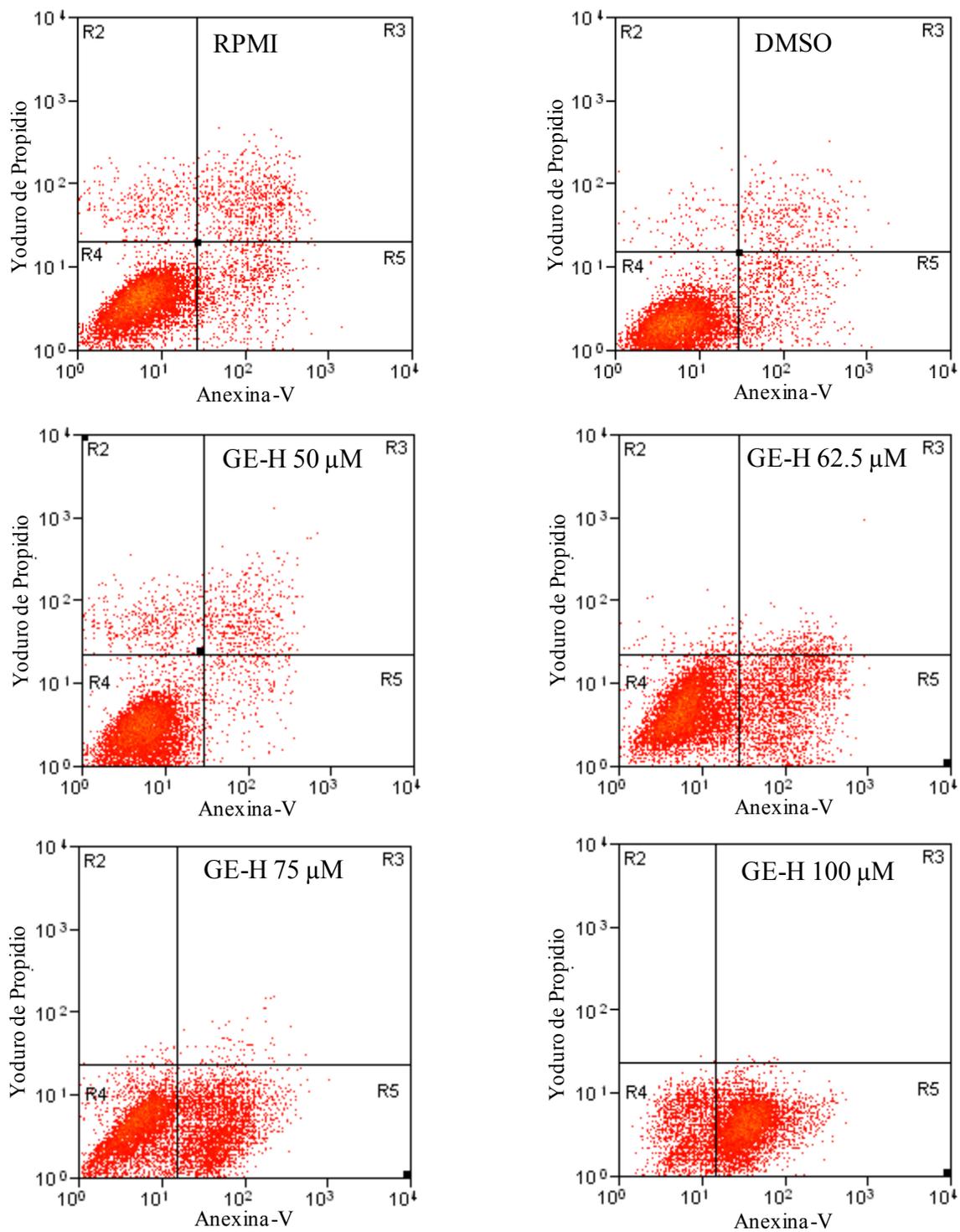


Figura 29. Tipo de muerte inducida a las células K562 tratadas con GE-H. Los cuadrantes R4, R2, R5, R3 muestran células vivas, células necróticas, células apoptóticas tempranas y células apoptóticas tardías respectivamente.

Las células tratadas con GE-H, a diferencia de aquellas incubadas en ausencia de este compuesto, presentaron externalización de PS dependiente de la concentración a partir de 62.5 μM , aunque tal concentración no haya mostrado diferencia estadísticamente significativa frente a RPMI en la prueba de *ANOVA*.

Determinación de la Disminución del Potencial de Membrana Mitocondrial.

Cuando la célula está en apoptosis, la mitocondria tiene una reducción en su potencial de membrana, principalmente cuando esta muerte es activada por la vía intrínseca.

La reducción del potencial de membrana mitocondrial, provoca que las células apoptóticas en presencia del fluorocromo Rho-123 se tiñan con menor intensidad que las células vivas, ya que el fluorocromo no puede ser retenido en el interior de la mitocondria, como ocurre con las células vivas, las cuales se tiñen fuertemente. Este procedimiento es posible gracias a que el colorante puede difundir libremente por las membranas celular y mitocondrial.

Considerando que solamente GE y GE-H tuvieron un efecto citotóxico estadísticamente significativo y biológicamente relevante, se determinó la disminución del potencial de membrana mitocondrial en células K562 en presencia de estos dos compuestos.

En la *Figura 30* se presentan los resultados de la prueba de disminución del potencial de membrana mitocondrial para GE en células K562 después de 24 horas de cultivo y como es posible observar, este compuesto muestra un importante efecto dependiente de la concentración desde la concentración mas baja probada de acuerdo a el análisis estadístico tipo *ANOVA* cuando estas concentraciones son comparadas frente a RPMI.

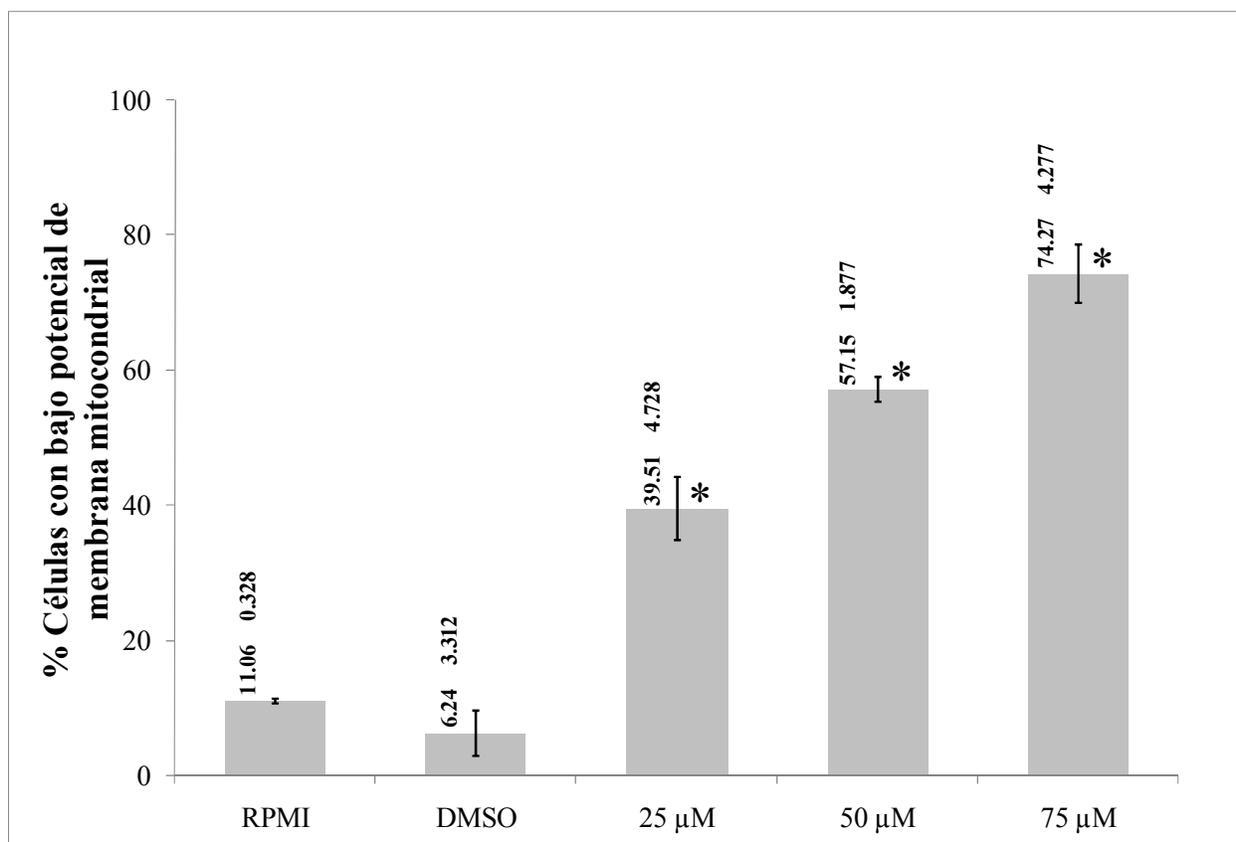


Figura 30. Células con bajo potencial de membrana mitocondrial en presencia de GE. Los resultados corresponden a la $\bar{x} \pm D.S.$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI ($*p \leq 0.0001$).

En la *Figura 31* se muestran los resultados de la adquisición por citometría de flujo de las células K562 sin y con tratamiento, se observa que al aumentar la concentración del compuesto disminuye la cantidad de Rho-123 retenida, y por lo tanto las células se desplazan hacia la derecha, a la región R2, dentro de la cual se encuentran aquellas con bajo potencial de membrana mitocondrial, al igual que la prueba de externalización de PS, no se incluyeron los resultados obtenidos a la concentración de 100 μM para este compuesto, ya que es difícil obtener resultados fiables cuando las células tratadas a dicha concentración presentan un alto índice de daño celular.

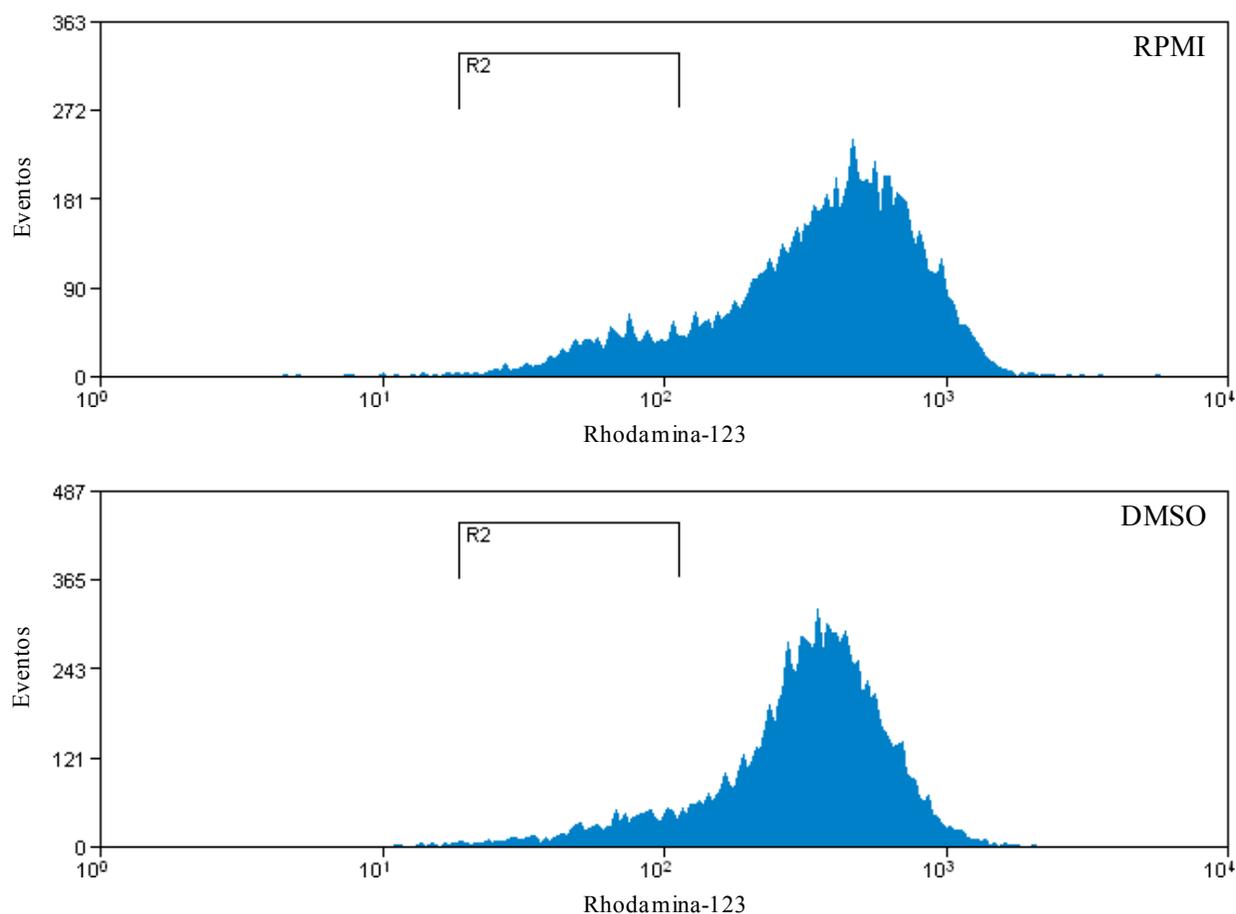


Figura 31. Efecto de GE sobre el potencial de membrana mitocondrial en células K562, la región R2 comprende las células con bajo potencial de membrana mitocondrial en la muestra control y las muestras tratadas a diferentes concentraciones de GE después de 24 horas de cultivo.

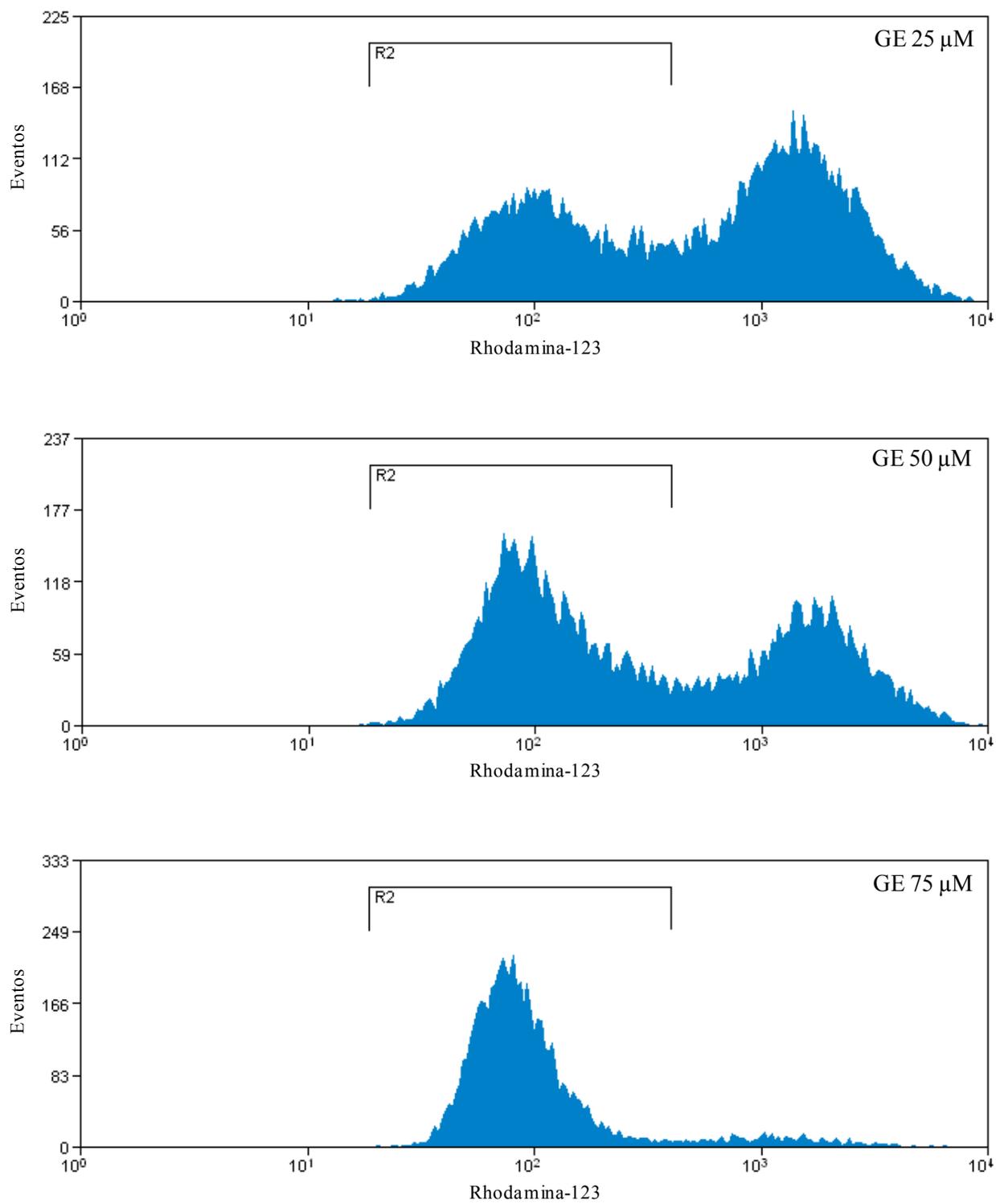


Figura 31. Efecto de GE sobre el potencial de membrana mitocondrial en células K562 (continuación).

En la *Figura 32* se presentan los resultados de la prueba de disminución del potencial de membrana mitocondrial para GE-H en células K562 después de 24 horas de cultivo. Se observa que este compuesto tiene un efecto concentración dependiente y estadísticamente significativo a partir de 50 μM , cuando se compara con RPMI y se considera una significancia estadística de $p \leq 0.05$, en esta prueba y para este compuesto, al igual que en la prueba de determinación del tipo de muerte celular, se excluyeron los datos obtenidos a la concentración de 25 μM , puesto que no presentaron efecto alguno.

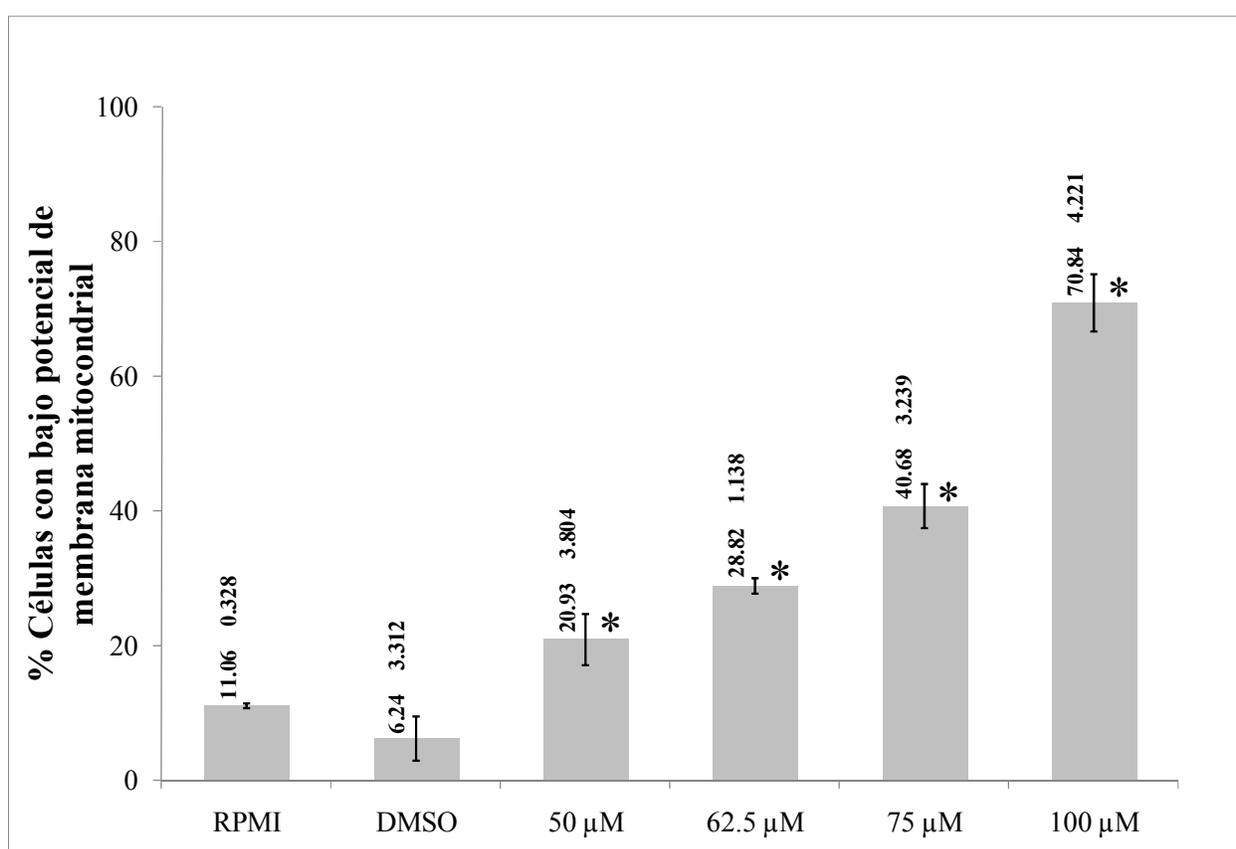


Figura 32. Células con bajo potencial de membrana mitocondrial en presencia de GE-H. Los resultados corresponden a la $\chi \pm \text{D.S.}$ de al menos tres experimentos independientes entre sí. Los valores de p fueron obtenidos de un análisis estadístico tipo *ANOVA* frente a RPMI (* $p \leq 0.0001$).

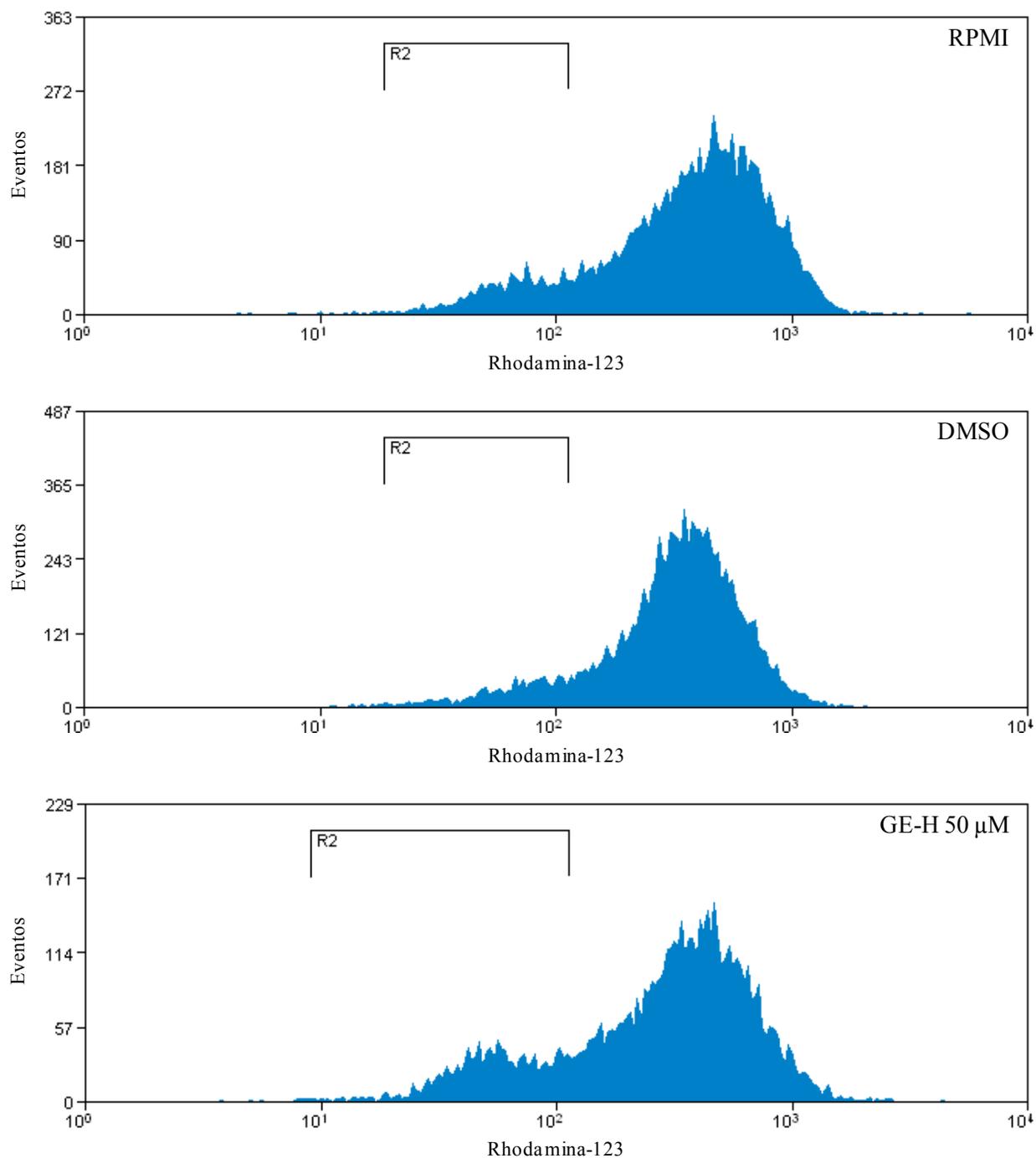


Figura 33. Efecto de GE-H sobre el potencial de membrana mitocondrial en células K562, la región R2 comprende las células con bajo potencial de membrana mitocondrial en las muestras control y muestras tratadas a diferentes concentraciones de GE después de 24 horas de cultivo.

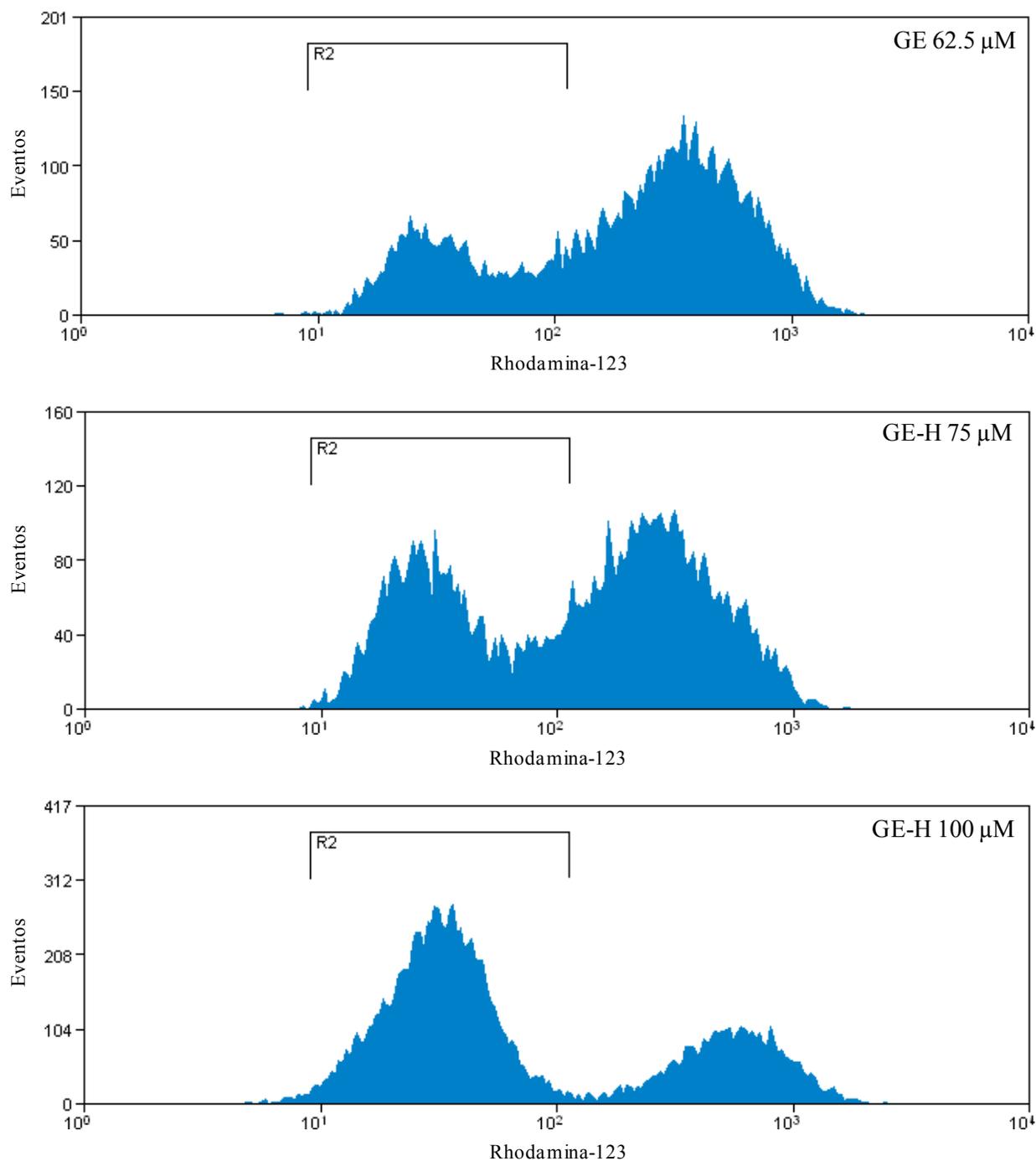


Figura 33. Efecto de GE-H sobre el potencial de membrana mitocondrial (continuación).

Como se logra observar en la *Figura 32*, las células de leucemia K562, disminuyen el potencial de membrana mitocondrial desplazándose hacia la región R2 en presencia de concentraciones crecientes del compuesto GE-H, puesto que dicho compuesto provoca daño en la mitocondria, y por tal motivo ésta no puede retener la Rho-123.

Discusión

El cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades infecciosas y cardiovasculares, por lo que se le ha considerado como un problema de salud tanto a nivel nacional como mundial. Lo anterior ha traído como consecuencia la necesidad de diseñar nuevos fármacos.

A pesar de que no siempre se han obtenido resultados satisfactorios, la quimioterapia es una de las herramientas de gran importancia en el tratamiento, ya que puede usarse en diferentes tipos de cáncer, tanto *in situ* como cuando se ha desarrollado metástasis. Sin embargo, debido al desarrollo de la resistencia a diferentes fármacos se ha tenido la necesidad de seguir buscando compuestos con actividad antineoplásica y que puedan presentar un mecanismo de acción que sea independiente de los mecanismos de resistencia en cada uno de los tumores a tratar.

Los productos naturales han servido en muchos casos para el diseño y elaboración de nuevas moléculas con actividad farmacológica, debido a que poseen diversas actividades biológicas, entre ellas la actividad anticancerígena.

Estudios recientes en el diseño de medicamentos contra el cáncer se han centrado en el desarrollo de fármacos que no actúen sobre el ciclo celular, puesto que las células cancerígenas han desarrollado resistencia a este tipo de fármacos; en esta búsqueda se han diseñado compuestos que induzcan apoptosis por la vía mitocondrial independientemente del ciclo celular, ejemplo de estos compuestos son las LS, ya que se ha visto que éstas actúan en la mitocondria como diana terapéutica.

La glaucólidas A, D y E son LS que se encuentran de manera natural en la planta *C. uniflora*, siendo la GE la de mayor abundancia; las glaucólidas E-C, E-H y E-OH son de origen semisintético, puesto que fueron obtenidas a partir de la GE modificada por diferentes reacciones; la GE-C fue obtenida por una reacción de ciclación, la GE-H por una hidrogenación y por ultimo la GE-OH por medio de una reducción.

Al evaluar el efecto citotóxico de todas las glaucólidas mencionadas anteriormente se observó que la GA, GD, GE y GE-H tuvieron un efecto significativo sobre las células de leucemia

mieloide crónica K562, sin embargo sólo la GE y la GE-H presentaron un efecto citotóxico mayor al 80 % en concentraciones que no superaron los 100 μM . Considerando que la GA y la GD tuvieron un efecto menor al 30 % se descartaron de estudios posteriores y sólo las glaucólidas GE y GE-H fueron consideradas para evaluar su efecto inductor de apoptosis.

Dentro de los parámetros evaluados para determinar el efecto proapoptótico de las glaucólidas sobre la misma línea celular fueron: disminución en el tamaño celular, translocación de PS y disminución del potencial de membrana mitocondrial, considerando este último parámetro como uno de las alteraciones que activan la vía intrínseca de apoptosis.

Consideramos que los compuestos GE y GE-H son moléculas con actividad proapoptótica debido a que ocasionaron cambios en la estructura y complejidad celular (GE a partir de 25 μM y GE-H a partir de 50 μM), observándose una disminución en el tamaño celular y aumento en la complejidad (*Figuras 25 y 28*), también se observó una translocación de PS (*Figuras 26 y 29*) y la disminución del potencial de membrana mitocondrial (*Figuras 30 – 33*). Estos efectos fueron dependientes de la concentración (*Figura 26*).

Diferentes autores^{66, 67, 71, 73} han publicado el efecto del GSH como una molécula protectora para la muerte celular debido a su efecto reductor y su gran capacidad para la eliminación de radicales libres. Schmidt⁶³ propuso el mecanismo de reacción entre LS y tioles principalmente en el GSH, causando una disminución en la concentración intracelular de este y favoreciendo el aumento en las concentraciones de ROS, los cuales pueden activar la muerte celular por apoptosis, siendo dependiente este efecto de la concentración de los radicales libres.

Considerando el efecto de las LS sobre la modificación en la concentración de tioles, se sugiere que el efecto proapoptótico de las GE y GE-H se debe probablemente a un mecanismo semejante, ya que se observó que las células tratadas con estos compuestos presentaron una disminución del potencial de membrana mitocondrial (*Figuras 30 – 33*).

Específicamente GE y GE-H inducen apoptosis en las células K562 por la vía intrínseca, donde la principal característica de esta vía, es la disminución del potencial de la membrana mitocondrial.

A partir de este cambio en la mitocondria, la célula entra en un proceso de muerte programada induciendo la translocación de PS, fragmentación del núcleo y alteraciones morfológicas que terminan en la muerte celular.

También se calculó la IC_{50} de cada uno de los compuestos que presentaron actividad citotóxica, determinando que sólo GE y GE-H tienen una IC_{50} por debajo de 100 μM , la cual es la máxima sugerida por *Journal of Natural Products* ($IC_{50} = 52.51$ y $62.52 \mu\text{M}$ respectivamente) lo que nos permite proponer a estos compuestos como posibles agentes antitumorales. El cálculo de IC_{50} es de gran importancia porque es el primer filtro para nuevos fármacos, y en este caso en particular, para aquellos que se pretende sean antineoplásicos.

Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo de tesis, se presentan las siguientes conclusiones.

- Solamente los compuestos GA, GD, GE y GE-H presentaron efecto citotóxico sobre las células de leucemia mieloide K562.
- La concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), fue determinada para los compuestos que presentaron actividad citotóxica, y se encontró que sólo GE y GE-H presentan efecto importante sobre esta línea celular, puesto que sus respectivos valores (GE IC_{50} = 52.51 μ M y GE-H IC_{50} =62.52 μ M) están por debajo del máximo considerado para productos naturales puros.
- Puesto que los compuestos GE y GE-H mostraron importante efecto citotóxico se estudiaron más a fondo determinando el tipo de muerte celular, y se encontró que estos inducen cambios morfológicos en las células (disminución del tamaño y fragmentación del núcleo), externalización de PS y disminución del potencial de membrana mitocondrial, las cuales son características fundamentales de células apoptóticas.
- De igual manera, la disminución del potencial de membrana mitocondrial nos permite sugerir que GE y GE-H inducen apoptosis a través de la vía intrínseca, la cual también es conocida como vía mitocondrial.

Referencias

1. Arnason J. T., Mata R., Romeo J. T., *Recent Advances in Phytochemistry*, **29**, 332, (1995).
2. Martinez J. C., *Scientia et Technica*, **33**, V, (2007).
3. Velasco B., *Reacciones de Ciclización in vitro, en Medio Ácido, de las Glaucolidas D y E*, Tesis de Maestría, FESC, UNAM, (2002).
4. Castillo A., *Monografía sobre Sesquiterpenos, Diterpenos y Sesterterpenos*, Tesis de Licenciatura, FESC C-1, UNAM, (2001).
5. Martinez M., Pineda M., *Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties*, **45**, (1996).
6. Cabrera A. L., *Darwiniana*, **64**, 578, (1944).
7. Jakupovic J., Schmeda-hirschmann G., Schuster A., Zdero C., Bohlmann F., King R. M., Robinson H., Pickardt J., *Phytochemistry*, **25**, 145, (1985).
8. Gleason H. A., *American Journal of Botany*, **10**, 187, (1923).
9. Jones B., Heywood V. H., *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Academic Press, N. Y., (1977).
10. Muñoz R., *Contribución al Estudio Fitoquímico del Genero Vernoneae*, Tesis de Licenciatura, FESC C-1, UNAM, (2002).
11. Pineda H. M., *Estudio Fitoquímico de la Vernonia mexicana*, Tesis de Licenciatura, FESC C-1, UNAM, (1995).
12. Martínez M. V., *Implicaciones Quimiotaxonómicas de transformación de glaucólidas en hiesutinólidas y cadinólidas*, Tesis de Doctorado, CINVESTAV, (1992).
13. Martínez M., Sepúlveda S., Belmont M. A., Rubio M., *Journal of Natural Products*, **55**, 884, (1992).
14. Gersherzon J., Pfei R. M., Liu Y. L., Mabry T. J., Turner B. L., *Phytochemistry*, **23**, 777, (1984).

15. Jones S. B., *Rhodora*, **83**, 59, (1981).
16. Marby T. J., Abdel-Beset Z., Pandolina W. G., Jones S. B., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2**, 185, (1975).
17. Da Costa F. B., Terfloth L., Gasteiger J., *Phytochemistry*, **66**, 345, (2005).
18. Martínez G., *Determinación de una Serie de Propiedades Físicoquímicas (KD, Log P, ΔG y π) así como del efecto citotóxico de 5 lactonas sesquiterpénicas*, Tesis de Licenciatura, FESC C-1, (2005).
19. Caddick S., *Tetrahedron*, **51**, 10403, (1995).
20. Strauss C., Strauss R., *Australian Journal Chemistry*, **52**, 83, (1999).
21. Fraga B., *Natural Products Reports*, **15**, 73, (1998).
22. Dirsch V. M., Stuppner H., Ellmerer-Müller E. P., Vollmar A. M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **8**, 2747, (2000).
23. Rodriguez E., Towers G. H. N., Mitchell J. C., *Phytochemistry*, **15**, 1573, (1976)
24. Robles M., Aregullin M., West J., Rodriguez E., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 11, 2064, (1995).
25. Robles M., Aregullin M., West J., Rodriguez E., *Planta Med.*, **61**, 199, (1995).
26. Bocca C., Gabriel L., Bozzo F., Miglietta A., *Chemico-Biological Interactions*, **147**, 1, 79, (2004).
27. Skaltsa H., Lazari D., Panagouleas C., Georgiadou E., Garcia B., Sokovic M., *Phytochemistry*, **55**, 8, 903.
28. Cho J. Y., Kim A. R., Joo H. G., Kim B. H., Rhee M. H., Yoo E. S., Katz D. R., Chain B. M., Jung J. H., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **313**, 4, 954, (2004).
29. Cho J. Y., Kim A. R., Jung J. H., Chun T., Rhee M. H., Yoo E. S., *European Journal of Pharmacology*, **492**, 2-3, 85, (2004).

30. Burim V. R., Canalle R., Callegari J. L., Takahashi C. S., *Genetics and Molecular Biology*, **22**, 3, (1999).
31. Tambe Y., Tsujiuchi H., Honda G., Ikeshiro Y., Tanaca S., *Planta Med*, **62**, 469, (1996).
32. Williams R. B., Norris A., Sleboznick C., Merola J., Miller J. S., Andriantsiferana R., Rasamison V. E., Kingston D. G. I., *Journal of Natural Products*, **68** (9), 1371-1374, (2005).
33. Tiunan T. S., Ueda-Nakamura T., Garcia D. A., Dias B. P., Morgado-Díaz J. A., De Souza W., Nakamura C. V., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** (1), 176-182, (2005).
34. Ohguchi K., Ito M., Yokoyama K., Inuma M., Itoh T., Nozawa Y., Akao Y., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **32** (2), 308-310, (2009).
35. Woerdenbag H. J., Lemstra W., Malingré Th. M., Konings A. W. T., *British Journal of Cancer*, **59**, 68-75, (1989).
36. Sülsen V. P., Frank F. M., Cazorla S. I., Anesini C. A., Malchiodi E. L., Freixa B., Vila R., Muschietti L. V., Martino V. S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** (7), 2415-2419, (2008).
37. Wang H., Wu T., Yan M., Liu G., Li P., Zhang X., Ye W., Zhang L., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **57** (6), 597-599, (2009).
38. Al-Saghir J., Al-Ashi R., Salloum R., Saliba N. A., Talhouk R. S., Homaidan F. R., *Complementary and Alternative Medicine*, **9** (36), (2009).
39. Wang F., Xie Z., Gao Y., Xu Y., Cheng X., Liu J., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **56** (6), 864-865, (2008).
40. Muhamad A., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **56** (11), 1535-1545, (2008).
41. Dupuy O. A., Murillo R., Bonilla J. A., *Revista Médica de Chile*, **136**, 64-72, (2008)
42. Tabopda T. K., Ngoupayo J., Liu J., Shaiq Ali M., Khan S. N., Ngadjui B. T., Luu B., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **56** (2), 231-233, (2008).

43. Hong S. S., Lee S. A., Xan X. H., Lee M. H., Hwang J. S., Park J. S., Oh K., Han K., Lee M. K., Lee H., Kim W., Lee D., Hwang B. Y., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **56** (2), 199-202, (2008).
44. Kang K., Lee H. J., Kim C. Y., Lee S. B., Tunsag J., Batsuren D., Nho C. W., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **30** (12), 2352-2359, (2007).
45. Gonzalez A., Galindo G. A., Mansilla H., Gutierrez A., *Revista Latinoamericana de Química*, **12**, 32, (1981).
46. Seaman F. C., Malcolm A. J., Fischer N. H., *Phytochemistry*, **23**, 5, 1063, (1984).
47. Fischer N. H., Oliver E. J., Fisher H. D., *Progress in the Chemistry of Natural Products*, Springer-Verlag, New York, **38**, (1979).
48. Strauss C., Strauss R., *Australian Journal Chemistry*, **52**, 83, (1999).
49. Fraga B., *Natural Products Reports*, **15**, 73, (1998).
50. Koukoulitsa C., Geromichalos G. D., Skaltsa H., *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **759**, 215, (2006).
51. Barrero F., Oltra J. E., Álvarez M., Raslan D. S., Saude D. A., Akssira M., *Fitoterapia*, **71**, 60, (2000).
52. Wedge D. E., Galindo J. C. G., Macías F. A., *Phytochemistry*, **53**, 747, (2000).
53. Bicchi C., Rubiolo P., *Journal of Chromatography A*, **727**, 211, (1996).
54. Scotti M. T., Fernandes M. B., Ferreira M. J. P., Emeciano V. P., *Biorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 292, (2007).
55. Pillay P., Vleggaar R., Maharaj V. J., Smith P. T., Lategan C. A., Chouteau F., Chibale K., *Phytochemistry*, **68**, 1200, (2007).
56. Cho J. Y., Park J., Yoo E. S., Baik K. U., Jung J. H., Lee J., Park M. H., *European Journal of Pharmacology*, **492**, 3, 94, (2004).

57. Rivero A., Quintana J., Eiora J. L., López M., Triana J., Bermejo J., Estévez F., *European Journal of Pharmacology*, **482**, 1-3, 77, (2003).
58. Hilmi F., Gertsch J., Bremner P., Valovic S., Heinrich M., Sticher O., Heilmann J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**, 17, 3659, (2003).
59. Page J. D., Chaney S. G., Hall I. H., Lee K. H., Holbrook D. J., *European Journal of Pharmacology*, **492**, 2-3, 85, (2004).
60. Heilmann J., Wasescha M. R., Schmidt T. J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**, 8, 2189, (2001).
61. Solomons T. W., Grahnan, *Química Orgánica*, 2ª Ed., Limusa Wiley, México, (1999).
62. McMURRY J., “*Química Orgánica*”, 5ª ed., Thomson, México, (2003).
63. Schmidt T. J., Lyâ G., Pahl H. L., Merfort I., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **7**, 2849-2855, (1999).
64. Cotran R. S., Kumar V. Y., Robbins S. L., “*Patología Estructural y Funcional*”, 5ª ed., Interamericana / McGraw Hill, España, (1995).
65. Perez, et al, *Cancer*, **71**, 1571-1580, (1993).
66. Beaver J. P., Waring P., *European Journal of Cell Biology*, **68**, 47-57, (1995).
67. McFarlane M., Williams A. C., *EMBO Reports*, **5** (7), 674-678, (2004).
68. Goodman & Gilman, “*The Pharmacological Basis of Therapeutics*”, onceava edicion, McGraw Hill, EUA, (2006).
69. Gomez E. O., Zentella A., *Boletín de Educación Bioquímica*, **17** (3), 105-114, (1998).
70. Constantini P., Jacotot E., et al, *Journal of the National Cancer Institute*, **5**, (2000).
71. Higuchi Y., *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **8** (4), 455-464, 2004).
72. Petrollini V., Constantini P., Scorrano L., Colonna R., Passamonti S., Bernardi P., *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 16638-16642, (1994).

73. Kroemer J., Martinez G., *Immunology Today*, **15** (5), 235-242, (1994).
74. Repetto M., *Toxicología fundamental, Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*, Tercera edición, 303 – 305, España (2002).
75. Fentem J. H., *Human Experimental Toxicology*, **13**, 2, 445-449.