



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFFECTO DEL ÁCIDO OLEANÓLICO Y ALGUNOS DERIVADOS SINTÉTICOS
EN LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER
DE HÍGADO Y COLON**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

JESSICA ZULEMA DELGADILLO

GAMBOA

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. REBECA LÓPEZ
MARURE**

Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

ASESOR INTERNO:

**DR. EDELMIRO SANTIAGO
OSORIO**

Noviembre, 2015

México, D. F.



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular, departamento de Fisiología, del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

La investigación fue llevada bajo la dirección de la Dra. Rebeca López Marure y el Dr. Edelmiro Santiago Osorio. Con el apoyo de la Dra. Yolanda Ríos Gómez.

Jurado asignado

M en C Carlos Bautista Reyes

Dra. Rebeca López Marure

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dr. Edgar Ledesma Martínez

Dra. Rosalva Rangel Corona

*A la Dra. **Rebeca López Marure** por permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo y por su paciencia.*

*Al Dr. **Edelmiro Santiago Osorio** y a la **M en C Itzen Aguiñiga Sánchez** por abrirme las puertas de la ciencia, por permitirme integrarme en sus proyectos y por brindarme la oportunidad de trabajar y convivir con todas esas personas que me ayudaron a forjar mis principios y valores básicos como profesionalista y como ser humano.*

*A **Viridiana Enríquez** y **Francisco Armando Hernández** por toda su paciencia y sus enseñanzas, por su tiempo, su empeño, su apoyo, y sobre todo por su amistad. Por regalarme un pedacito de su vida y hacerme una mejor persona.*

*Al Dr. **Edgar Ledesma Martínez** por todo su apoyo y su paciencia, por compartir conmigo un poquito de todo ese conocimiento que posee.*

A los apreciables miembros de mí jurado por el apoyo y el tiempo que me han brindado.

A todas las personas que me acompañaron a lo largo de mi formación como profesionalista.

Y por último pero no menos importante a esta gran casa de estudios que me brindó la oportunidad de estudiar en sus aulas y compartir con toda la valiosa gente que la integra.

A **mi madre** porque sin ella jamás habría sido posible llegar hasta aquí, por todo su amor y confianza, por los desvelos, los ayunos y los sacrificios que le he significado. Porque este logro es compartido y si alguien merece el reconocimiento, eres tú.

A **mi padre** por ayudarme a forjar mi carácter, por los consejos, por la confianza y por ser para mí un amigo y un guía.

A **Adrián Lemus** porque sin su apoyo no habría llegado hasta aquí jamás.

A mis amigas **Cynthia Jiménez** y **Mariana Suarez** por estar ahí siempre que me hacen falta, por ser un apoyo incondicional, por compartir conmigo sonrisas, llantos y en general la vida.

A **Orson Sánchez**, por llegar a mi vida en el momento preciso, por todo su apoyo y comprensión, por su amor, su amistad, sus consejos. Por esa visión tan bonita que tienes de mí, por no dejarme rendirme.

ÍNDICE

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	1
INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Ciclo celular	10
Muerte celular	12
Cáncer.....	13
Tipos de cáncer	14
Cáncer colorrectal	14
Cáncer hepatocelular.....	15
Tratamientos para el cáncer	16
Productos naturales como antitumorales	17
Terpenos.....	18
Ácido oleanólico.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
MÉTODO	23
Cultivo celular.....	23

Proliferación celular.....	23
Actividad metabólica mitocondrial.....	25
Concentración inhibitoria máxima media (IC50).....	26
Morfología celular.....	26
Ciclo celular.....	26
Muerte celular.....	27
Lactato deshidrogenasa (LDH).....	28
RESULTADOS.....	30
Proliferación celular.....	32
Reducción del MTT.....	34
Concentración inhibitoria máxima media.....	37
Morfología celular.....	39
Translocación de la fosfatidilserina.....	42
Ciclo celular.....	45
Liberación de la LDH.....	48
DISCUSIÓN.....	50
PERSPECTIVAS.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	57

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. El ácido oleanólico y sus derivados.....</i>	30
<i>Tabla 2. Concentración inhibitoria máxima media (IC50).....</i>	38
<i>Tabla 3. Translocación de la fosfatidilserina y tinción con el IP en las células HCT15.</i>	43
<i>Tabla 4. Translocación de la fosfatidilserina y tinción con el IP en las células HepG2..</i>	44
<i>Tabla 5. Fases del ciclo de las células HCT15</i>	46
<i>Tabla 6. Fases del ciclo de las células HepG2.....</i>	47
<i>Tabla 7. Resumen de resultados.....</i>	49

INDICE DE FIGURAS

<i>Ilustración 1. Proliferación de las células HCT15.....</i>	33
<i>Ilustración 2. Proliferación de las células HepG2.</i>	34
<i>Ilustración 3. Actividad metabólica mitocondrial de las células HCT15.....</i>	36
<i>Ilustración 4. Actividad metabólica mitocondrial de las células HepG2</i>	37
<i>Ilustración 5. Morfología de las células HCT15</i>	40
<i>Ilustración 6. Morfología de las células HepG2.....</i>	41
<i>Ilustración 7. Liberación de la LDH</i>	48

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOL	Ácido oleanólico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
°C	Centígrados
CB	Compuesto B
C1	Compuesto 1
C2	Compuesto 2
C3	Compuesto 3
C4	Compuesto 4
C5	Compuesto 5
C6	Compuesto 6
C7	Compuesto 7
C8	Compuesto 8
C9	Compuesto 9
C10	Compuesto 10
C11	Compuesto 11
C12	Compuesto 12
CO₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
HCl	Ácido clorhídrico
h	Horas
IC50	Concentración inhibitoria del 50% de la proliferación
IP	Ioduro de propidio

INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LDH	Lactato deshidrogenasa
µg	Microgramos
m	Minutos
mL	Mililitros
µ	Microlitros
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N	Normal
nm	Nanómetros
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
ERO	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal de bovino

RESUMEN

El ácido oleanólico (AOL) es un triterpenoide pentacíclico, ampliamente distribuido en las plantas. Entre las actividades reportadas del AOL se encuentra la anti-inflamatoria, cicatrizante, hepato-protectora, anti-angiogénica, e inmuno-moduladora, entre otras. También está demostrado el efecto anti-proliferativo y la inducción de muerte celular por apoptosis en las líneas celulares HL60 y NB4, provenientes de leucemia promielocítica aguda. Las modificaciones químicas que se han realizado en el AOL produjeron análogos más potentes capaces de inducir apoptosis en distintas líneas celulares. En este trabajo se evaluó el efecto del AOL y 12 de sus derivados sintéticos en la proliferación, la reducción del MTT, el ciclo celular, la translocación de la fosfatidilserina y la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa en las líneas celulares derivadas de cáncer de colon (HCT15) e hígado (HepG2).

El AOL no mostró un efecto inhibitorio en la proliferación, en el metabolismo mitocondrial, en la translocación de la fosfatidilserina, en las fases del ciclo celular, ni en la liberación de la LDH en las líneas celulares HepG2 y HCT15 a las 72h de tratamiento, sin embargo; algunos de sus compuestos produjeron disminución en la proliferación y la actividad metabólica mitocondrial y los compuestos C1 y C10 en HCT15 y C4, C5, C7 y C9 en HepG2 indicaron un aumento en la fase Sub G₁ del ciclo celular, lo cual es sugerente de apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso que se inicia al término de una división celular y que acaba con el final de la siguiente división. Las células se reproducen mediante un ciclo de división en el que primero se duplica el ácido desoxirribonucleico (ADN), y luego se dividen en dos células hijas genéticamente idénticas (Suarez, 2005). Los detalles de la división celular pueden variar; sin embargo, existen dos elementos que son imprescindibles: 1) que el ADN de la célula madre se replique con exactitud y 2) que los cromosomas que resultan de esta replicación sean segregados simétricamente a las dos células hijas.

En los organismos pluricelulares la división celular es imprescindible para el crecimiento y desarrollo del organismo, así como para la regeneración y reemplazo de células envejecidas o deterioradas. En las células eucariotas el ciclo celular se divide en una serie de etapas por las que cronológicamente va pasando la célula, hasta que se produce la división. Básicamente, el ciclo celular se divide en dos etapas funcionales (fase M o mitosis y fase S o de síntesis) y dos etapas preparatorias (G_1 y G_2). La mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente (Lundberg y Weinberg, 1999).

La ejecución de esos eventos divide al ciclo celular en cuatro fases:

Fase G_1 . Transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis del ADN, es una fase en la que la célula desarrolla una intensa actividad metabólica y aumentando de tamaño (Suárez, 2005). Durante esta fase la célula se prepara para crecer y producir todas las proteínas necesarias para la síntesis del ADN. La célula aumenta de tamaño y se

sintetiza nuevo material citoplásmico, sobre todo proteínas y ácido ribonucleico (ARN) (Rodríguez *et al.*, 2004).

Fase S. Es el periodo en que tiene lugar la síntesis del ADN y de la ADN-polimerasa. En esta fase se sintetizan las proteínas histonas, asociadas al ADN en células eucariotas. Al final de la fase cada cromosoma queda duplicado y formado por dos cromátidas idénticas (Suárez, 2005).

Fase G₂ o pre-mitótica. Se sigue sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y organelos, por lo que la célula aumenta de tamaño y hay cambios visibles en la estructura celular (Rodríguez *et al.*, 2004). Esta fase termina cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis (Suárez, 2005).

Fase M o mitosis. Es cuando ocurre la división nuclear (cariocinesis) y celular (citocinesis). Los cromosomas duplicados se distribuyen de manera idéntica en cada una de las células hijas, aunque es frecuente que el contenido citoplasmático no se reparta equitativamente (Lundberg y Weinberg, 1999).

Existe una quinta fase llamada G₀. En esta fase la célula está "quiescente", es decir, no está en división, por lo que se encuentra fuera del ciclo celular (Rodríguez *et al.*, 2004).

La coordinación entre las diferentes fases del ciclo celular depende de un sistema de puntos de restricción y de controles por retroalimentación que evitan la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que se haya completado la anterior. Los puntos de restricción más importantes son dos: uno se encuentra al final de la fase G₁, permitiendo que se repare el ADN dañado antes de ser replicado en la fase S; y el otro en la fase G₂,

antes de entrar en la mitosis. El punto de restricción en la fase G₂, detecta el ADN que no ha sido replicado y/o el ADN dañado, generando una señal que evita que comience la fase M antes de que se haya completado la fase S, permaneciendo la célula en G₂ (Lukas *et al.*, 2004).

Normalmente, el ciclo celular procede sin interrupciones, bajo el monitoreo, control y regulación de los mecanismos ya mencionados. Las células normales tienen la capacidad de interrumpir el ciclo celular, cuando ocurre un daño celular y se afecta la maquinaria bioquímica o la información genética involucrada en el ciclo. Esta interrupción, es comúnmente denominada detención de la proliferación; y puede ocurrir en las fases G₁, S y G₂. La detención del avance del ciclo, tiene la finalidad de brindar el tiempo necesario para reparar los daños. Una vez que los daños han sido reparados, el ciclo continúa hasta la división de la célula. Cuando ésta no es capaz de reparar los daños, se activan los mecanismos de muerte celular programados para impedir que se produzcan células hijas con alteraciones en la información genética. En caso contrario, si la célula no muere y queda con un ADN alterado, entonces continúa hacia la transformación maligna (Rodríguez *et al.*, 2004).

Muerte celular

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis, entre otras. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando la célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana, lo cual la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que favorece la aparición de procesos inflamatorios (Alfaro *et al.*, 2000). Por otro lado, la apoptosis se puede definir como un proceso coordinado dependiente de energía,

que involucra la activación de un grupo de proteasas de cisteína denominadas “caspasas” y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula (Elmore, 2007), y sin la activación de procesos inflamatorios. Este proceso está encaminado a mantener la homeostasis de un organismo desde el embrión, hasta el organismo adulto fisiológicamente sano.

En la actualidad se ha demostrado que las alteraciones en la apoptosis son un mecanismo fundamental para el desarrollo del cáncer, participando desde las etapas iniciales de la carcinogénesis, en el fenómeno metastásico y por supuesto, en la respuesta a los tratamientos antineoplásicos (Alfaro *et al.*, 2000).

Cáncer

Desde épocas remotas el cáncer ha acompañado a la humanidad; hacia el año 400 a.C. Hipócrates lo nombró *karkinos* que en griego significa cangrejo (Barruti, 2012). Esta enfermedad es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que producen la degeneración de las células, originando lesiones pre-cancerosas y finalmente tumores malignos (INEGI, 2014). Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (OMS, 2014).

A nivel mundial, este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en el año 2012, causó 8.2 millones de defunciones (OMS, 2014). En México, son las neoplasias del epitelio las que afectan principalmente a la población adulta (de 20 años y más); estos tumores están en las capas

de células que recubren los órganos huecos y las glándulas, al igual que aquellos que forman la superficie externa del cuerpo. Las neoplasias epiteliales o carcinomas, se asocian a factores de riesgo ambientales y a estilos de vida poco saludables (Mejía *et al.*, 2005).

En México, la principal causa de defunciones por tumores malignos fue originada por el de órganos digestivos (33.18 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100 mil); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72 por cada 100 mil); y de mama (8.13 defunciones por cada 100 mil) durante el año 2012 (INEGI, 2014).

Tipos de cáncer

Los cánceres difieren en función del tipo celular del que derivan (Bruce, 2004). El 90% de los tumores se originan a partir de células epiteliales (carcinomas). Otros tipos mayoritarios de tumores son los derivados de tejido conectivo o muscular (sarcomas), de la sangre (leucemias, mielomas o linfomas) o de células del sistema nervioso (neuroblastomas, gliomas). Las células epiteliales son las que mantienen durante más tiempo la capacidad de dividirse; y por otro lado, debido a su localización recubriendo las superficies externas e internas del organismo, están más expuestas a la acción de agentes tóxicos que pueden alterar su comportamiento (Cortes, 2006).

Cáncer colorrectal

El carcinoma colorrectal es la afección maligna más común del tubo digestivo. En México, de acuerdo a los datos disponibles del último análisis del Registro Histopatológico de Neoplasias en México, el cáncer colorrectal no se encontraba dentro de las diez neoplasias

más frecuentes; sin embargo, al analizar de manera específica los tumores malignos del aparato digestivo, se encontró que el cáncer colorrectal es la segunda neoplasia más frecuente después del cáncer gástrico (Pacheco *et al.*, 2008).

En cuanto a la distribución por edad, el cáncer colorrectal se presenta como un padecimiento propio de la edad adulta y se observa un incremento muy acentuado en la tasa de incidencia a partir de los 45 años tanto en hombres como en mujeres, dicho incremento se mantiene hasta alcanzar su valor máximo en la población de 65 años y más (164 y 117 por 100,000 habitantes, de manera respectiva) (Tirado y Betancourt, 2008). Sin embargo, a pesar de ser una neoplasia ubicada en pacientes de edad avanzada con una media de diagnóstico de 50.8 años, cada día se detectan casos en gente más joven (Erazo, 2008).

En el año 1985, el cáncer de colon produjo 1,004 defunciones en ambos sexos. En el 2002, el número de casos registrados fue un poco más del doble (2,178 defunciones), situación que da una tendencia ascendente. En relación con la magnitud de las tasas de incidencia por género, se observó que tanto la tasa global de incidencia (17.6 vs. 15.3 por 100,000 habitantes) como las tasas por grupo de edad son mayores en el sexo masculino (Tirado y Betancourt, 2008).

Cáncer hepatocelular

El carcinoma hepatocelular es la neoplasia maligna primaria de hígado más frecuente y la quinta a nivel mundial, convirtiéndose en un problema de salud pública (Uribe *et al.*, 2010). Su incidencia se ha duplicado en los últimos 20 años en Europa y los Estados Unidos, siendo la causa de mortalidad relacionada a cáncer con mayor incremento en los últimos

años (Edwards, 2005). Se espera que la incidencia aumente aún más en los Estados Unidos y México en las dos próximas décadas (Méndez-Sánchez *et al.*, 2005). En relación a lo anterior, el carcinoma hepatocelular es la causa de muerte relacionada con cáncer que mayor incremento ha tenido en varones entre los años 1985 y 2002 en los Estados Unidos (El-Serag, 2004), ocupando el tercer lugar como causa de muerte relacionada a cáncer a nivel global. Las muertes por cáncer hepatocelular entre los años 2000 y 2006 publicadas por el Ministerio de Salud en México fueron recientemente revisadas (Sangiovanni *et al.*, 2004). El análisis muestra una tendencia creciente de la mortalidad del 2004 al 2006, aumentando 14% como causa específica de muerte de 4.16 por 100 000 habitantes en el año 2000 a 4.74 por 100 000 habitantes en el 2006. El cálculo estadístico de la tendencia analizado por el método de Pearson muestra una correlación con una $p > 0.01$. La mortalidad más alta se observó en pacientes mayores de 60 años (Uribe *et al.*, 2010). Este aumento en la mortalidad coincide con el informado en Estados Unidos, del cual ha alcanzado 31% en el mismo periodo y con un aumento significativamente mayor y preocupante en la población hispana (60%) (Méndez-Sánchez *et al.*, 2005).

Tratamientos para el cáncer

El cáncer es un problema de salud pública, y no existe un tratamiento adecuado para esta enfermedad (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. La selección de uno de ellos o su combinación depende de la etapa en que se encuentre el tumor (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010). La mayoría de fármacos antineoplásicos son sistemáticamente agentes anti-proliferativos que preferentemente van a atacar a las células que se encuentran en constante división. Sin

embargo, estos fármacos no son verdaderamente selectivos para células cancerígenas y su eficacia terapéutica está limitada por el daño que puedan causar a las células sanas (Denny, 2001).

Es por ello que existe un gran número de trabajos relacionados con la búsqueda de compuestos que tengan la capacidad de combatir esta enfermedad. En esta búsqueda los productos naturales han jugado un papel importante, como es el caso del paclitaxel y los alcaloides de la vinca (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

Productos naturales como antitumorales

Las plantas han sido y seguirán siendo una posible alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010), es significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos aproximadamente el 67% sean de origen natural (Newman, 2003). Estos medicamentos se han clasificado como: productos de origen natural, productos semi-sintéticos derivados de un producto natural, o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural (Vega *et al.*, 2006).

Fabricant y Farnsworth (2001) reportan que de 94 especies de plantas se han obtenido 122 compuestos de estructura química definida, que de manera general se emplean como fármacos. De las plantas usadas en la etnobotánica el 58% no ha sido analizada con respecto a su composición química o actividad biológica (Vega *et al.*, 2006).

Terpenos

Los terpenos (terpenoides), son quizás la más diversa familia dentro de los productos naturales sintetizados por las plantas. Estos terpenos pueden ser clasificados como metabolitos primarios necesarios para las funciones celulares y el mantenimiento, y como metabolitos secundarios, los cuales no están involucrados en el crecimiento y desarrollo (Roberts, 2007). Los triterpenos glicósidos son algunas veces llamados saponinas debido a su capacidad de formar espuma; su toxicidad se debe a su capacidad para formar complejos con esteroides, característica que los hace antimicrobianos y están presentes en las plantas incluso antes de que los patógenos ataquen (Taiz y Zeiger, 2002). Los triterpenos contienen 30 carbonos en su estructura, y son bio-sintéticamente derivados del escualeno, e incluyen esteroides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, entre otros. Sólo unos pocos triterpenos son distribuidos ampliamente entre las plantas, los cuales incluyen a las amirinas, el ácido oleanólico y el ácido ursólico (Briemann et al., 2006).

Ácido oleanólico

El AOL o ácido 3β -hidroxi-olea-12-en-28-oico, es un triterpenoide pentacíclico, ampliamente distribuido en las plantas, en forma de ácido libre o como aglicona formando parte de las saponinas (Liu y Wang, 2007). Estos compuestos tienen un amplio espectro de actividades farmacológicas, y por esta razón se han convertido en medicamentos promisorios de origen natural (Liu, 1995).

Entre las actividades reportadas del AOL se encuentra la anti-inflamatoria, cicatrizante, hepato-protectora, anti-angiogénica, e inmuno-moduladora, entre otras (Ortiz, 2011). También está demostrado el efecto anti-proliferativo y la inducción de muerte celular por

apoptosis en las líneas celulares HL60 (Zhang *et al.*, 2007) y NB4 (Li *et al.*, 2013), ambas líneas provenientes de leucemia promielocítica aguda.

Las modificaciones químicas que se han realizado en el AOL produjeron análogos más potentes como el ácido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oico (CDDO), el éster metílico del CDDO (CDDO-Me) y el 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-imidazólido (CDDOIm). El CDDO-Me induce la apoptosis en líneas celulares de leucemia linfocítica aguda y la fosforilación de la proteína p38 en células U937 (leucemia linfocítica humana), lo que sugiere que el CDDO-Me puede ser efectivo para el tratamiento de este tipo de leucemia (Kopleva *et al.*, 2005). El CDDO-Im antagoniza el crecimiento de las células de cáncer de páncreas, induciendo la apoptosis en concentraciones nanomolares. El CDDO-Im reduce de manera selectiva el glutatión mitocondrial, lo que conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la oxidación del glutatión celular, a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a la externalización de la fosfatidilserina, característica importante de la muerte apoptótica (Samudio *et al.*, 2005). Los 3-oxo derivados del AOL inhiben el crecimiento de células derivadas de cánceres procedentes de diferentes tejidos (Huang, 2006). Teniendo en cuenta las características del AOL, en este trabajo se evaluó el efecto de algunos de sus derivados en la proliferación, el ciclo celular y en la muerte de dos líneas celulares, una procedente de cáncer de colon (HCT15) y la otra de cáncer hepatocelular (HepG2).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública, y a la fecha no existe un tratamiento selectivo adecuado para esta enfermedad (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010). Por ello, es necesario seguir en la búsqueda de tratamientos capaces de combatirlo, inhibiendo la proliferación de las células tumorales sin afectar la de las células normales, para lo cual, los productos naturales sintetizados por las plantas son una alternativa.

El AOL es un triterpeno presente en una gran variedad de plantas (Li *et al.*, 2013). Varios reportes científicos demuestran que tiene una actividad antitumoral, que inhibe la proliferación e induce muerte por apoptosis en líneas celulares provenientes de diferentes tipos de cáncer como leucemia mieloide, promielocítica y carcinoma oral escamoso; además, algunas modificaciones químicas del AOL produjeron análogos más potentes (Huang, 2006). Del mismo modo, se ha comprobado su actividad como antiinflamatorio y cicatrizante. Es por ello, que el AOL surge como un compuesto de interés para su estudio en relación al cáncer.

HIPÓTESIS

Se sabe que el AOL inhibe la proliferación e induce apoptosis de las líneas celulares HL60 y NB4 (leucemias promielocíticas humanas), por lo que se espera que el AOL y algunos de sus derivados sintéticos inhiban la proliferación y produzcan muerte de las líneas celulares derivadas de otros cánceres humanos como el hepatocelular (HepG2) y el de colon (HCT15).

OBJETIVOS

General

- **Evaluar el efecto del AOL y 12 de sus derivados sintéticos en la proliferación, el ciclo celular y la muerte de las líneas celulares de cáncer de hígado HepG2 y de colon HCT15.**

Particulares

- Obtener la concentración de AOL y de sus 12 derivados sintéticos que inhibe en un 50% (IC50) la proliferación o la actividad metabólica mitocondrial.
- Evaluar la morfología celular.
- Determinar las fases del ciclo celular.
- Determinar la muerte celular apoptótica y necrótica.
- Determinar la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa.

MÉTODO

Cultivo celular

El cultivo de las células se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich St. Louise, USA.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL NY, USA) desactivado previamente a 56°C por 30 min, y con 1% de una mezcla de antibiótico y antimicótico (Gibco BRL NY, USA). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, al 5% de CO₂ y humedad saturada. Para realizar los experimentos, las células fueron despegadas de la superficie de las cajas de cultivo con 0.05% de tripsina, centrifugadas a 1200 rpm por 3 min, y sembradas nuevamente.

El AOL y 12 de sus derivados sintéticos fueron proporcionados por la Dra. Yolanda Ríos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Todos los compuestos se disolvieron en etanol puro.

Proliferación celular

Para determinar el efecto del AOL y sus derivados sintéticos sobre la proliferación de las líneas celulares HepG2 y HCT15 se utilizó la tinción de cristal violeta. Ésta tinción es una prueba muy útil para obtener información cuantitativa acerca de la densidad relativa de células (Kueng, 1989). El cristal violeta es un colorante que tiñe los núcleos celulares (Gillies, 1986 y Kueng, 1989); por lo que la tinción es directamente proporcional al número de células.

Para ello, se utilizó una densidad celular de 5,000 células por pozo con 100 µL de medio de cultivo suplementado con SFB. Las células se trataron con diferentes concentraciones

del AOL o de sus derivados sintéticos, utilizando 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, empleando además etanol puro como vehículo en una concentración del 2% respecto al contenido de medio de cultivo, se mantuvieron en cultivo durante 72 h en placas de 96 pozos (Corning NY, USA). Un cultivo sin tratamiento fue utilizado como control negativo. Transcurridas las 72 h del tratamiento, el sobrenadante se retiró y posteriormente las células se fijaron con 50 μL de glutaraldehído al 1.1% por pozo durante 10 min. Posteriormente, se retiró el glutaraldehído, y las células se lavaron con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente y las proteínas celulares se tiñeron con 50 μL de una solución del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM (3.96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico, pH 6, aforados a 500 mL con agua bidestilada) durante 20 min en agitación continua. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada hasta eliminar completamente el exceso del colorante. Al finalizar los lavados, el colorante incorporado se disolvió con 50 μL de ácido acético al 10 % por pozo y se mantuvo en agitación continua durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas (BioTek Instruments, Inc.) a 595 nm.

Actividad metabólica mitocondrial

Para evaluar la toxicidad se utilizó la reducción del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El fundamento de ésta técnica, se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, metabolizándola en su forma insoluble de color azul a un compuesto denominado formazán, permitiendo de esta manera; determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Mossmann, 1983). La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Jiménez *et. al* 2007). Para este experimento se utilizaron placas de 96 pozos con una densidad celular de 5,000 células por pozo con 100 μ L de medio de cultivo suplementado. Las células se trataron con diferentes concentraciones del AOL o de sus derivados sintéticos, utilizando 5, 10, 20 y 40 μ g/mL, y etanol puro como vehículo, se mantuvieron en cultivo durante 72 h. Concluido el tiempo de cultivo, se adicionaran 20 μ L /pozo del MTT (5 mg/mL) y se dejaron incubando por 4 h. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y las sales de formazán formadas se solubilizaron con 100 μ L /pozo de alcohol isopropílico acidificado (HCl 0.04 N en isopropanol). Se agitó durante un par de minutos y la absorbancia a 570 nm se determinó en un espectrofotómetro de placas.

Concentración inhibitoria máxima media (IC50)

Adicionalmente, con ayuda del programa Biograph (Version 2.5, Bio-Tek, Instruments Inc.), mediante la ecuación de regresión lineal se determinó la concentración del ácido oleanólico y de sus derivados sintéticos necesaria para inhibir la proliferación celular en aproximadamente un 50% (IC50) con respecto a las células control sin tratamiento.

Morfología celular

Debido a que algunos de los compuestos tuvieron un fuerte efecto en la inhibición de la proliferación y en la reducción del MTT, se evaluó la morfología celular con la finalidad de descartar daño celular. Para ello, se sembraron 250,000 cel/pozo en 2 mL de medio suplementado en placas de seis pozos. Las células se trataron durante 72 h con las concentraciones obtenidas al realizar la curva de regresión lineal (IC50) del ácido oleanólico y los derivados sintéticos. Transcurrido el tiempo de cultivo se tomaron fotografías con un objetivo 10x en un microscopio invertido (TMS/F, Nikon) con una cámara acoplable a microscopio (Moticam 1SP).

Ciclo celular

En cada una de las fases del ciclo celular, las células tienen una cantidad de ADN conocido: en la fase G_0 (reposo) y G_1 (pre-sintética), la célula tiene un contenido diploide ($2n$) de ADN, correspondiente a 23 pares de cromosomas. Durante la fase S o de síntesis, la célula duplica su contenido en ADN convirtiéndose en tetraploide (paso de $2n$ a $4n$). En la fase G_2 o postsintética, y al inicio de la mitosis M la célula mantiene este doble contenido de ADN hasta que se divide en dos hijas de contenido diploide (Sainz, 2002). Para evaluar el ciclo celular se utilizó al ioduro de propidio (IP), que es un compuesto fluorescente que se intercala en el ADN, por lo que la intensidad de fluorescencia es directamente

proporcional a la cantidad del ADN. Para ello, en dos placas de seis pozos cada una, se sembraron 250,000 células/pozo en 2 mL de medio suplementado, mismas que fueron tratadas con las IC50 del ácido oleanólico y los derivados sintéticos para las que se obtuvo un valor menor a 40 µg/mL. Transcurrido el tiempo de cultivo, las células se despegaron de la placa de cultivo con una solución de tripsina 0.05%, se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos y se realizó un lavado con una solución amortiguadora de HEPES (10 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, pH 7,4) (HEPES). Posteriormente las células se fijaron con etanol diluido al 70% en HEPES a 4°C durante 10 min. Después de fijar las células, se realizó un lavado más y el botón celular se resuspendió en 50 U/mL de ARNasa con HEPES y se incubó durante 1 h a 37°C. Al término de la incubación se realizó nuevamente un lavado, el botón celular se resuspendió en 400 µL de HEPES y se adicionó 1 µL de yoduro de propidio (IP) (50 µg/mL). Posteriormente, las fases del ciclo celular se analizaron en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson). La distribución del ciclo celular se analizó con el software Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA).

Muerte celular

La translocación de la fosfatidilserina se utiliza como una prueba de detección de la apoptosis. Uno de los eventos de la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática, evento que causa que la fosfatidilserina quede expuesta hacia el exterior de la membrana. Bajo ciertas concentraciones de calcio, la molécula de la Anexina V, tiene afinidad específica por este fosfolípido, por lo que se utiliza acoplada a un fluorocromo y a la par se utiliza IP como colorante supravital, lo que permite diferenciar entre las células apoptóticas que fijan Anexina V y excluyen al IP y las células necróticas que captan tanto

Anexina V como IP. Las células vivas son negativas para ambos fluorocromos (Sánchez-Torres, 2003).

En dos placas de seis pozos cada una, se sembraron 250,000 células/pozo en 2mL de medio suplementado. Las células se trataron durante 24, 48 y 72 h con las IC50 del ácido oleanólico y los derivados sintéticos. Transcurrido el tiempo del tratamiento, se colectó el sobrenadante en tubos de 15 mL y las células se despegaron con TrypLE Express (Gibco, Life Technologies) para posteriormente ser colocadas, según su tratamiento, en el mismo tubo que el sobrenadante. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 min. El sedimento celular se resuspendió en 50 µL de la solución de marcaje [20 µL de anexina-V-fluoresceína + 20 µL de IP en 1 mL de solución amortiguadora de HEPES y se incubaron durante 15 min. Posteriormente los botones celulares se lavaron con solución amortiguadora de HEPES y se analizaron en un citómetro de flujo a 488 nm (excitación), 515 nm para la detección de la fluoresceína y 560 nm para la detección del IP. Las células teñidas solo con anexina-V-fluoresceína se encuentran en apoptosis, mientras que las células con doble tinción (anexina-V-fluoresceína + IP) están en apoptosis tardía o necrosis. La cuantificación se realizó utilizando el software Cell Quest.

Los experimentos para la evaluación de la translocación de la fosfatidilserina también se realizaron a las 24 y 48 h, sin embargo los resultados no son mostrados debido a que el efecto observado fue similar al de los experimentos realizados a 72 h.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

La LDH es una enzima citoplasmática muy estable presente en todas las células y se libera rápidamente al medio de cultivo cuando existe un daño en la membrana plasmática

(Espada, 2010). La LDH se emplea para cuantificar el daño a la membrana celular mediante su liberación en el sobrenadante (Monroy *et al.*, 2009). La actividad de la LDH se mide por una prueba enzimática en la cual, el NAD^+ se reduce a NADH/H^+ y el LDH catalizado se convierte en lactato de piruvato. En la segunda etapa de la catálisis se transfieren H/H^+ y el lactato de piruvato se convierte en sal de tetrazolio que se reduce a un producto de formazán rojo. El incremento en la actividad de la LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas. Para este ensayo, se utilizaron placas de 24 pozos y se sembraron 75,000 cel/pozo. Las células se trataron con las IC50 durante 72 h. La liberación de la LDH se midió con un kit para citotoxicidad (CytoTox 96®, Promega). Adicionalmente se utilizó un control con etanol, un control con buffer de lisis 10x y un control de medio de cultivo sin células. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió el buffer de lisis a uno de los controles sin tratamiento y se incubó durante 45 min. Después se transfirieron 50 μL del sobrenadante de cada condición a otra placa de cultivo, se adicionaron 50 μL de sustrato mix y se incubó a temperatura ambiente, protegiendo de la luz, durante 30 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 50 μL por pozo de solución para detener la reacción y la absorbancia se leyó a 490 nm. Las células lisadas se consideraron como el 100% de la liberación de la LDH.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados de manera independiente. Para determinar la diferencia estadísticamente significativa se utilizó una prueba de ANOVA con una $P < 0.05$, que se realizó con el programa IBM SPSS Statistics V21X64.

RESULTADOS

El AOL y sus derivados sintéticos fueron obtenidos según describen Ramírez y colaboradores (2014).

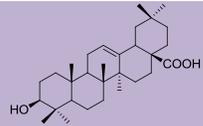
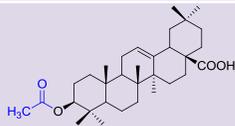
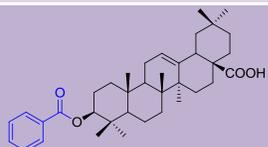
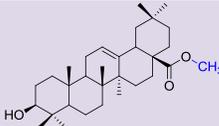
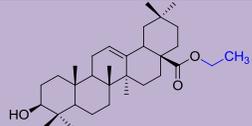
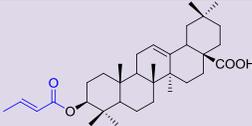
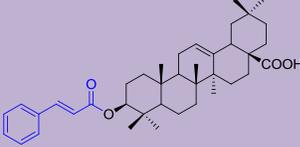
Compuesto	Estructura química	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)
CB		$C_{30}H_{48}O_3$	456
C1		$C_{32}H_{50}O_4$	498
C2		$C_{31}H_{50}O_3$	470
C3		$C_{37}H_{52}O_4$	560
C4		$C_{32}H_{52}O_3$	484
C5		$C_{34}H_{52}O_4$	524
C6		$C_{39}H_{54}O_4$	586

Tabla 1. El ácido oleanólico y sus derivados. Se muestra la estructura, la fórmula y el peso molecular de cada uno de los compuestos utilizados así como la abreviatura empleada para referirnos a ellos a lo largo de este escrito.

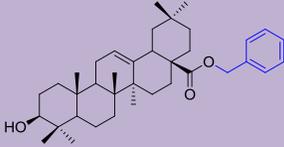
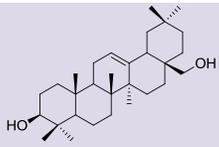
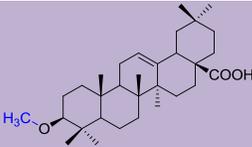
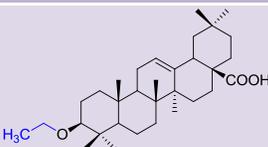
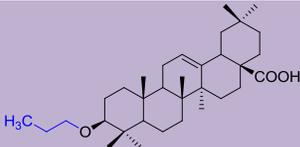
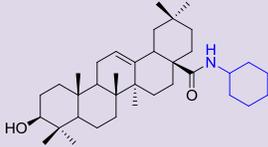
Compuesto	Estructura	Formula	Peso
C7		$C_{37}H_{54}O_3$	546
C8		$C_{30}H_{50}O_2$	442
C9		$C_{31}H_{50}O_3$	470
C10		$C_{30}H_{52}O_3$	484
C11		$C_{33}H_{54}O_3$	498
C12		$C_{36}H_{59}NO_2$	537

Tabla 1. Continuación. El ácido oleanólico y sus derivados. Se muestra la estructura, la fórmula y el peso molecular de cada uno de los compuestos utilizados así como la abreviatura empleada para referirnos a ellos a lo largo de este escrito.

Proliferación celular

El efecto de los compuestos se evaluó en la proliferación de las líneas celulares HCT15 y HepG2 por medio de la tinción con el cristal violeta a las 72 h. Los resultados mostraron que la línea celular HCT15 disminuyó más del 50% su proliferación con los compuestos C1, C2, C5, C6 y C10 a todas las concentraciones utilizadas (Figura 1). Por otro lado, los compuestos C3, C4, C7, C8, C9 y C11 inhibieron la proliferación solo a la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$, los compuestos CB y C12 no tuvieron efecto significativo en la proliferación.

En la línea celular HepG2 se observó una disminución en la proliferación con los compuestos C1, C2, C5, C6 y C10 a todas las concentraciones usadas (Figura 2); sin embargo, los compuestos C4, C7, C8, C9 y C11 inhibieron la proliferación solo a la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$. En estas células, no se vio una disminución de la proliferación con los compuestos CB, C3 y C12.

Además, con las concentraciones más bajas de los compuestos C3, C4, C7, C9, C11 y C12 se observó también un aumento en la proliferación, dicho efecto pudo observarse en ambas líneas celulares.

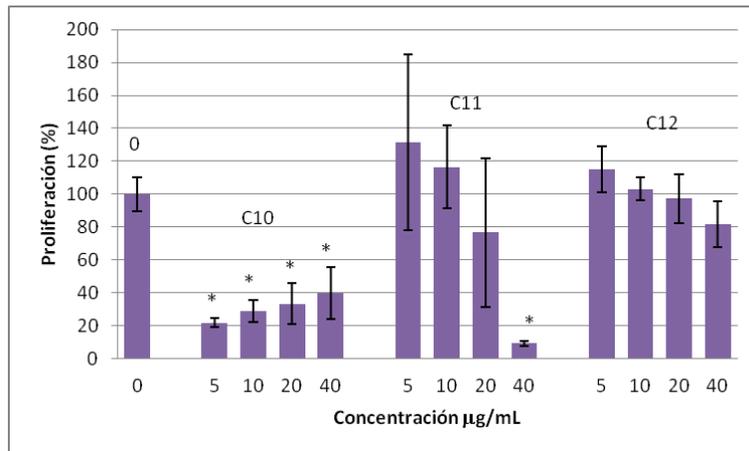
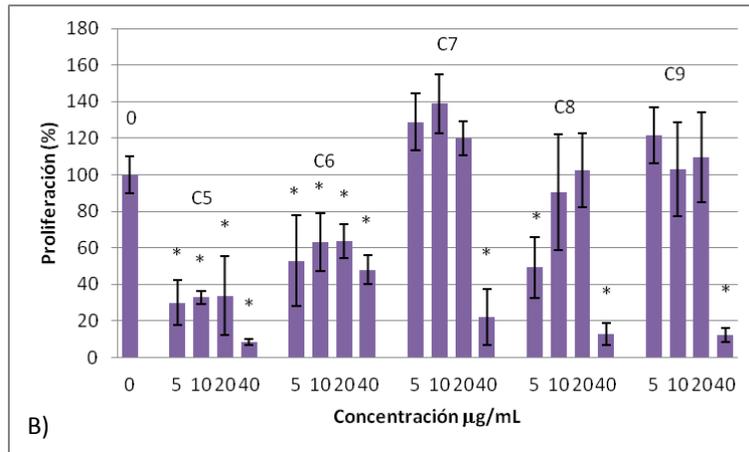
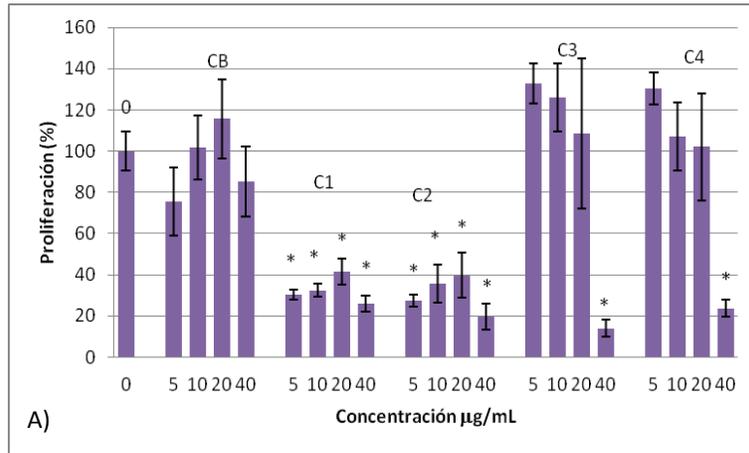


Ilustración 1. Proliferación de las células HCT15. En esta gráfica se muestran los resultados de las células tratadas con los compuestos: A) CB, C1 a C4, B) C5 a C9 y C) C10 a C12; a 5, 10, 20 y 40 µg/mL. La proliferación se evaluó por la tinción con cristal violeta después de 72 h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de la proliferación con respecto a las células control o concentración 0, tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 2 experimentos realizados de manera independiente. * Los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$ con respecto al control.

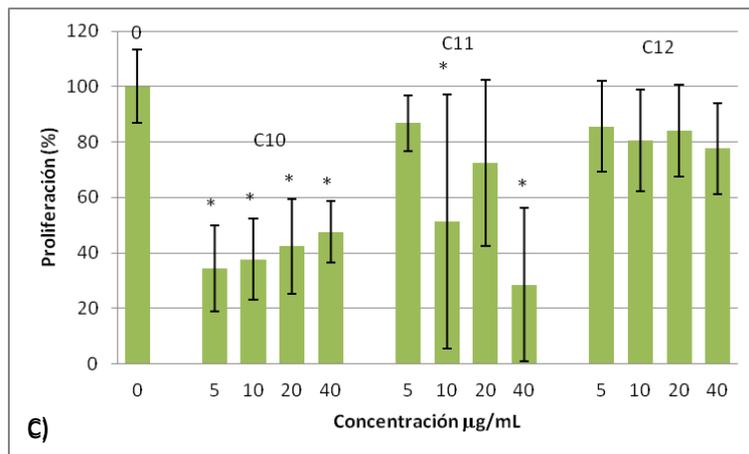
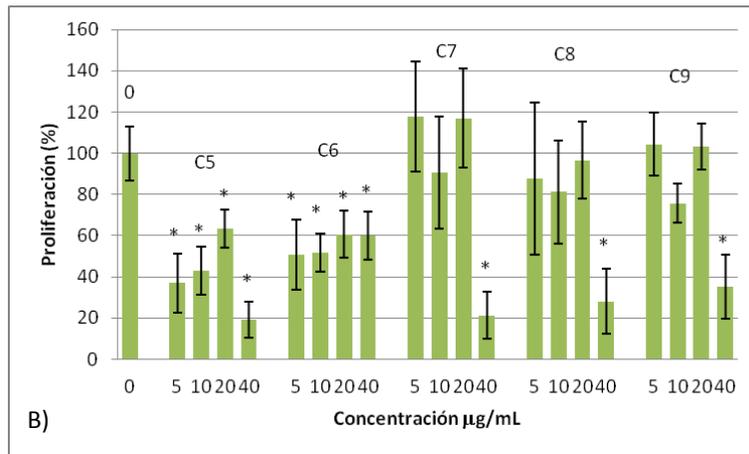
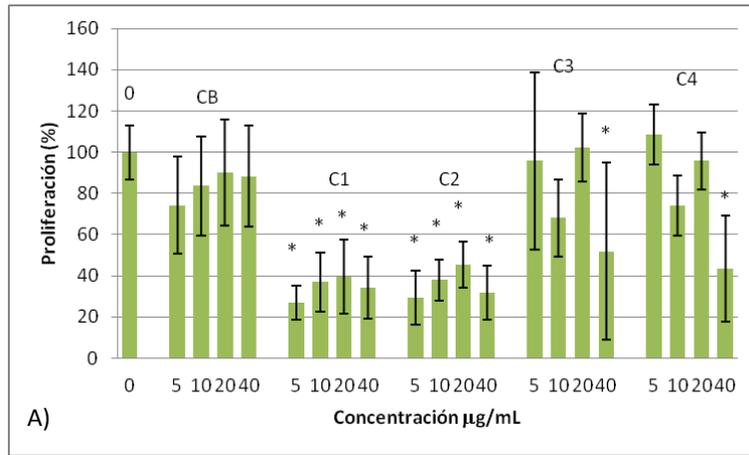


Ilustración 2. Proliferación de las células HepG2. En esta gráfica se muestran los resultados de las células tratadas con los compuestos: A) CB a C4, B) C5 a C9 y C) C10 a C12; a 5, 10, 20 y 40 µg/mL. La proliferación se evaluó por la tinción con cristal violeta después de 72 h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de la proliferación con respecto a las células control o concentración 0, tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados de manera independiente. * Los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$ con respecto al control.

Reducción del MTT

Se evaluó el efecto del AOL y 12 de sus derivados sintéticos en las líneas celulares HCT15 y HepG2. Los resultados mostraron que algunos compuestos disminuyeron la reducción del MTT en ambas líneas celulares con respecto al control con etanol a las 72 h de cultivo.

Para la línea celular HCT15, los compuestos C3, C4, C7, C8, C9 y C11 provocaron un decremento en la reducción del MTT de manera dependiente de la concentración, obteniéndose el mayor efecto a 40 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3). Los compuestos C1, C2, C5, C6 y C10 disminuyeron la reducción del MTT a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ y de un modo muy similar con todas las concentraciones. El CB y el C12 no tuvieron efecto significativo en la reducción del MTT.

Para la línea celular HepG2, la disminución en la actividad mitocondrial no fue dependiente de la concentración con ninguno de los compuestos utilizados; sin embargo, se observó un decremento en la reducción del MTT con los compuestos C1, C2, C5 y C10 a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$. Con los compuestos C4, C7, C8, C9 y C11, se observó un decremento en la reducción del MTT solo a 40 $\mu\text{g/mL}$. Al igual que con las células HCT15, el CB y el C12 no tuvieron efecto en la reducción del MTT (Figura 4).

Las concentraciones más bajas de los compuestos C3, C4, C7, C9, C11 y C12 mostraron una tendencia al aumento de la actividad mitocondrial.

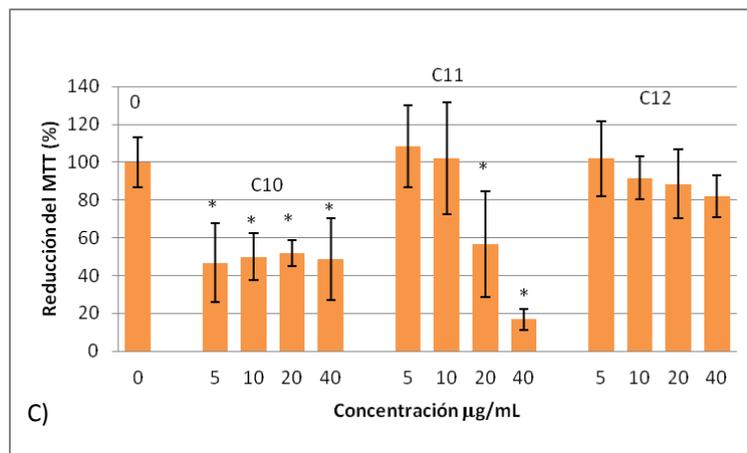
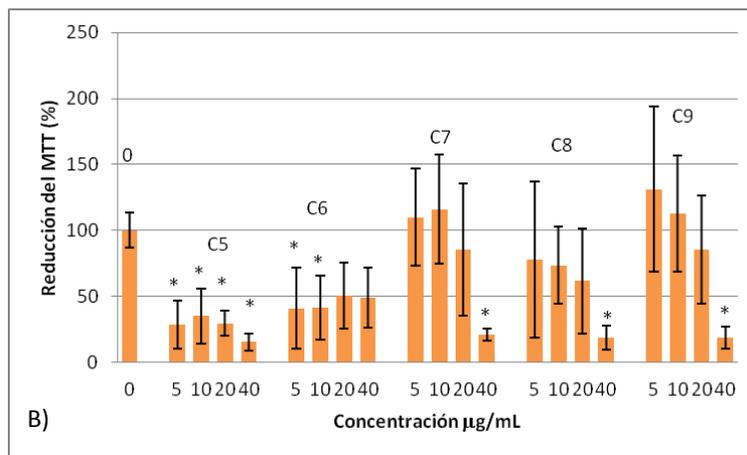
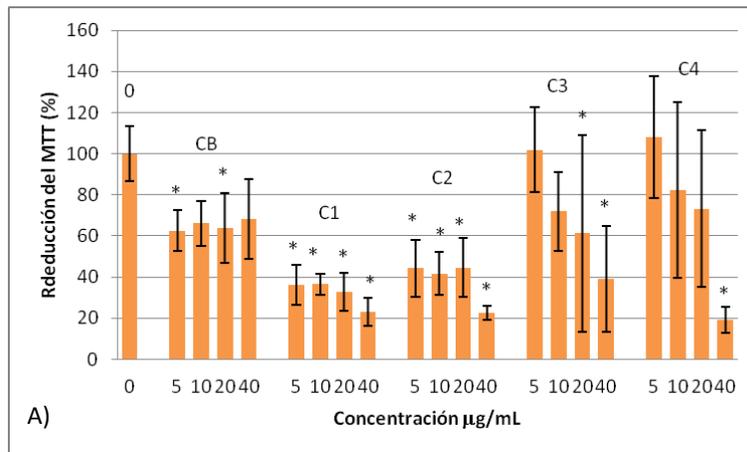


Ilustración 3. Actividad metabólica mitocondrial de las células HCT15. A) En esta grafica se muestran los resultados de células tratadas con los compuestos CB, C1 a C4, en B) con C5 a C9 y en C) con C10 a C12; a 5, 10, 20 y 40 µg/mL. La actividad mitocondrial se evaluó por la reducción del MTT después de 72 h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de la reducción del MTT con respecto a las células control o concentración 0, tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados de manera independiente. * Los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$ con respecto al control.

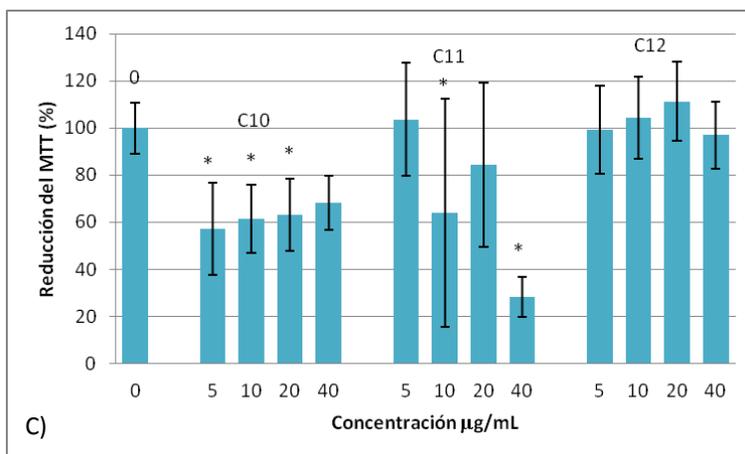
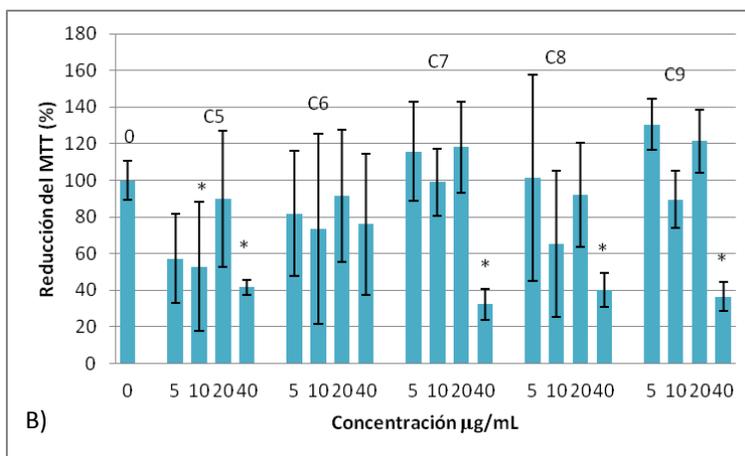
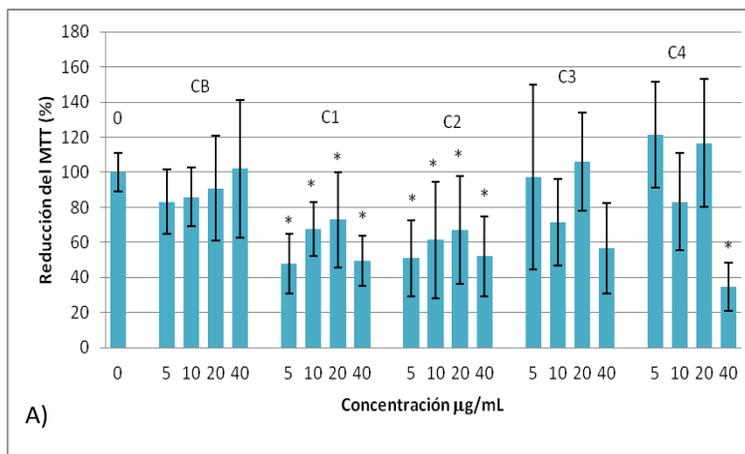


Ilustración 4. Actividad metabólica mitocondrial de las células HepG2. Las células se trataron con los compuestos: A) CB, C1 a C4, B) C5 a C9 y C) con C10 a C12; a 5, 10, 20 y 40 µg/mL. La actividad mitocondrial se evaluó por la reducción del MTT después de 72 h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de la reducción del MTT con respecto a las células control o concentración 0, tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados de manera independiente. * Los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$ con respecto al control.

Concentración inhibitoria máxima media

Para evaluar la IC50 de los compuestos sobre la reducción del MTT y la proliferación de las líneas celulares HCT15 y HepG2, se utilizó el programa Biograph (Versión 2.5, Bio-Tek, Instruments, Inc.). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

IC50 (µg/mL)				
HCT15		HepG2		
Compuesto	Cristal violeta	MTT	Cristal violeta	MTT
CB	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00
C1	<5.00	<5.00	>40.00	>40.00
C2	<5.00	<5.00	<5.00	>40.00
C3	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00
C4	26.58	21.79	32.96	31.54
C5	<5.00	<5.00	<5.00	34.19
C6	<5.00	<5.00	9.83	>40.00
C7	>40.00	25.87	25.64	31.94
C8	22.96	18.10	26.92	32.79
C9	22.44	22.75	31.76	33.91
C10	>40.00	27.56	>40.00	<5.00
C11	18.66	19.76	22.17	26.55
C12	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00

Tabla 2. Concentración inhibitoria máxima media (IC50). Se muestran las IC50 para la proliferación y reducción del MTT de los compuestos en las células HCT15 y HepG2. Las IC50 menores a 40 µg/mL (negritas) fueron estadísticamente significativas y son las que se consideraron activas y se utilizaron para evaluar la morfología celular, las fases del ciclo celular, la translocación de la fosfatidilserina y la liberación de la LDH.

Solo las IC50 iguales o menores a 40 µg/mL obtenidas para los compuestos se probaron en los siguientes efectos celulares evaluados, de acuerdo lo descrito por Li, 2013 en la línea celular NB4, donde el AOL produce muerte por apoptosis con una dosis de 80 µM (equivalente a 36.5 µg/mL).

Morfología celular

Las células HCT15 se derivan de un adenocarcinoma colorectal en estadio III. Y por otro lado, las células HepG2 se derivan del tejido del hígado de un varón caucásico de 15 años de edad con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado (ATCC). Ambas células tienen morfología epitelial. Con la finalidad de determinar el efecto de los compuestos que inhibieron la proliferación e indujeron una reducción del MTT, en la morfología celular, las células HepG2 y HCT15 se trataron con las IC50 obtenidas y la morfología se evaluó en un microscopio invertido. Los resultados mostraron que en las células HCT15 los compuestos C4, C8 y C11 disminuyeron el número celular, sin afectar la morfología epitelial característica (Figura 5). Sin embargo, en los compuestos C1, C2, C5 C6 y C10 se observó, además de una disminución en el número celular, cambios en la morfología. Se observaron células con una forma redondeada y aumento considerable en el detritus celular, sin perder adherencia al plato de cultivo. Los compuestos C7 y C9 no produjo disminución en el número celular, ni cambios en la morfología.

En las células HepG2, los compuestos C4, C5, C7 y C9 disminuyeron el número celular, sin aparente cambio de la morfología epitelial (Figura 6). El compuesto C10, además de disminuir drásticamente el número de células, cambió la morfología epitelial a una forma más redondeada e indujo la pérdida de la adherencia al plato de cultivo, observándose un incremento en el detritus celular, lo que indica que posiblemente se induzca muerte. Y los

compuestos C8 y C11 no disminuyeron el número celular ni provocaron cambios en la morfología.

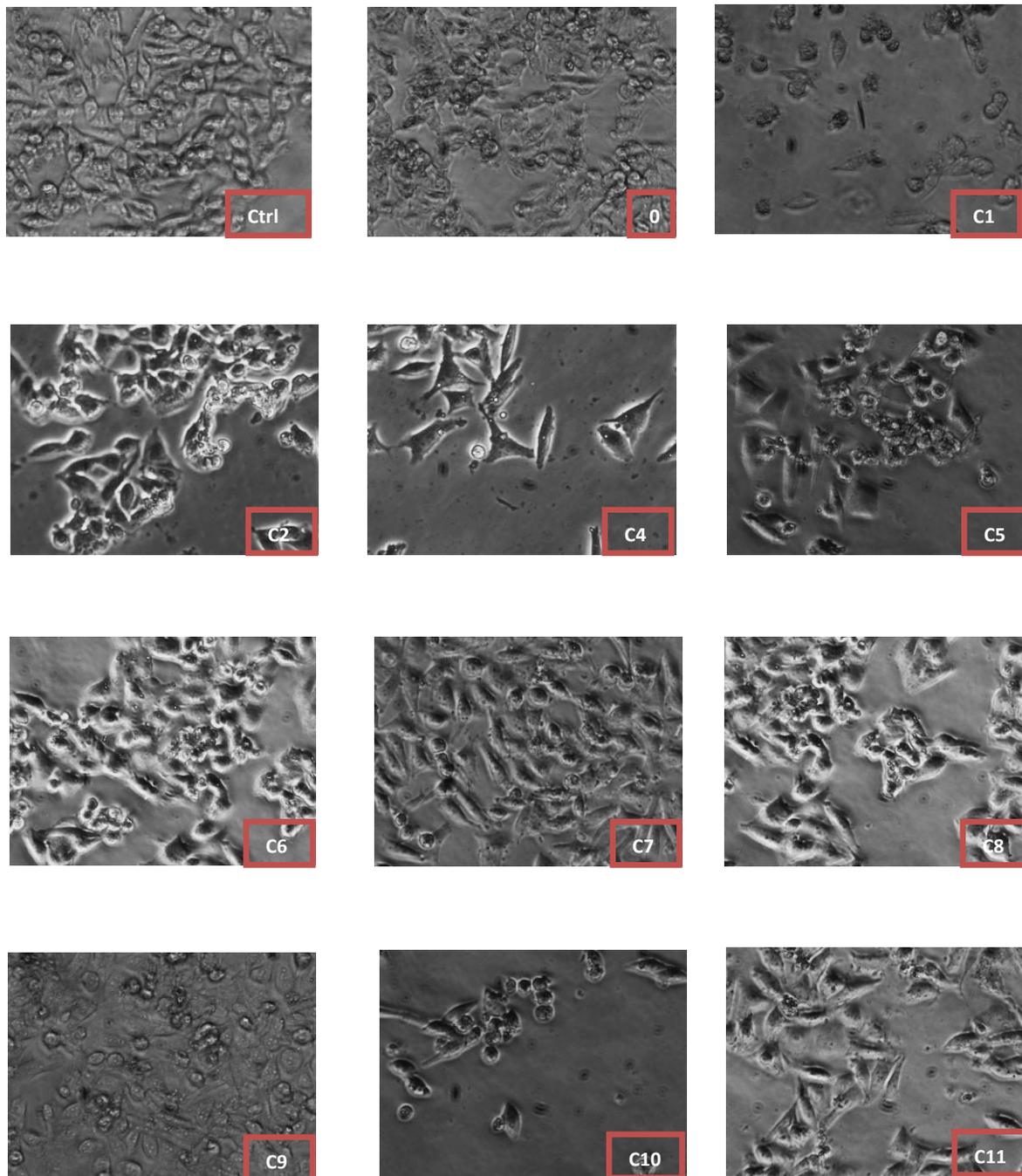


Ilustración 5. Morfología de las células HCT15. Se muestran fotografías (10x) de los cultivos celulares después de 72 h de tratamiento con las IC50 de los compuestos. Ctrl = células control sin tratamiento; etanol (0) = disolvente de los compuestos.

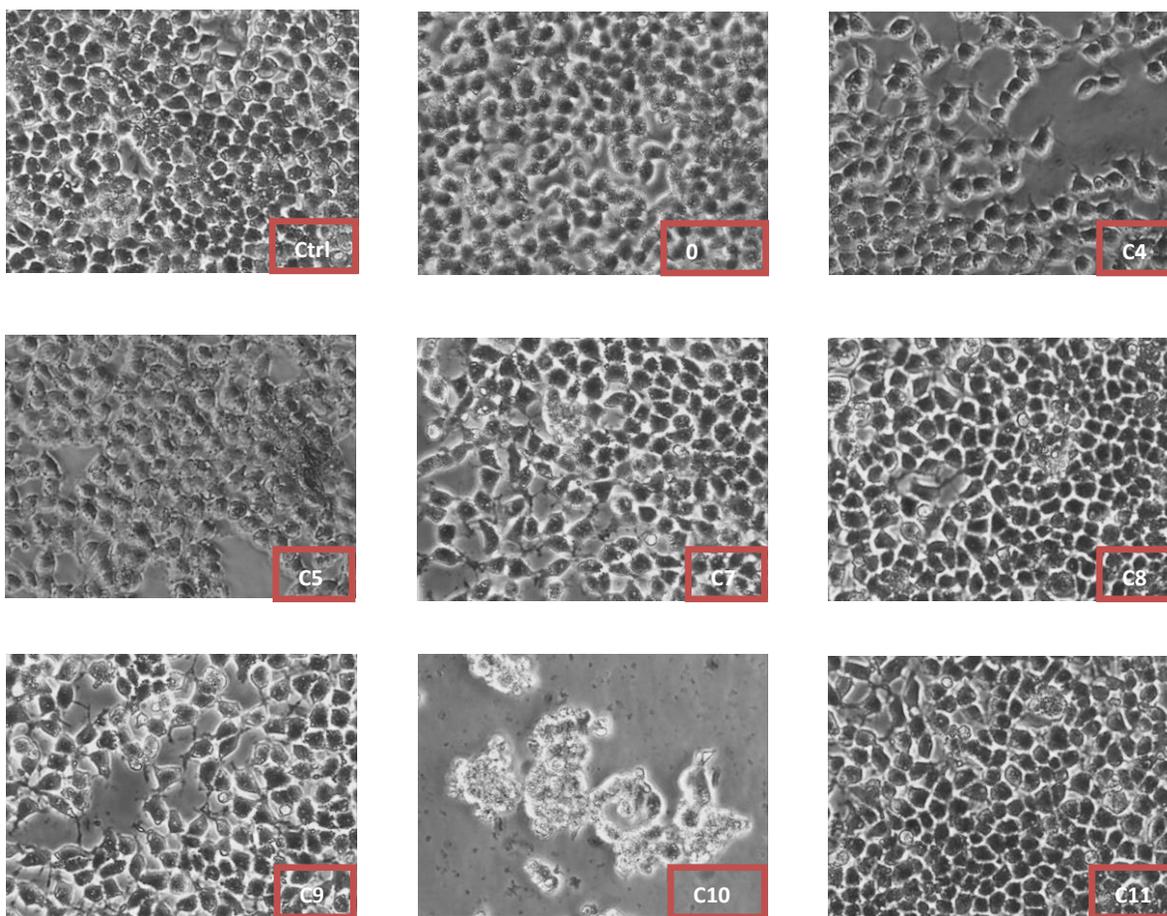


Ilustración 6. Morfología de las células HepG2. Se muestran fotografías (10x) de los cultivos celulares después de 72 h de tratamiento con las IC50 de los compuestos. Ctrl = células control sin tratamiento; etanol (0) = disolvente de los compuestos.

Translocación de la fosfatidilserina

Con la finalidad de evaluar el daño a la membrana celular, se determinó la translocación de la fosfatidilserina y se realizó una tinción con IP después de 24 y 48 h de tratamiento con las IC50 de los compuestos. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los compuestos indujo la translocación de la fosfatidilserina a estos tiempos (datos no mostrados). Con la finalidad de determinar si a un tiempo mayor se producía este evento, se realizó un experimento en células tratadas por 72 h. Los resultados para la línea HCT15 mostraron que únicamente el compuesto C5 produjo un 11.4% (Tabla 3) mientras que el resto de los compuestos no tuvo más de 10% de translocación de la fosfatidilserina. Por otro lado, en las células HepG2, ninguno de los compuestos indujo cambios significativos con respecto al control en la translocación de la fosfatidilserina (Tabla 4).

Porcentaje de células HCT15			
Condición	Vivas	Apoptosis	Necrosis
0	94.95	2.94	1.05
CB	94.72	3.20	2.07
C1	95.48	3.41	1.10
C2	90.63	7.55	1.80
C4	97.70	1.71	0.57
C5	84.05	11.41	4.73
C6	97.88	2.11	0
C7	97.49	2.00	0.50
C8	98.94	1.00	0.05
C9	98.00	1.93	0.05
C10	90.73	7.84	1.42
C11	99.04	0.90	0.05

Tabla 3. Translocación de la fosfatidilserina y tinción con el IP en las células HCT15. Las células se trataron con el etanol (0) y con las IC50 de los compuestos que inhibieron la reducción del MTT por 72 h. Se muestran los resultados en porcentaje de un ensayo representativo de tres experimentos realizados de manera independiente. (0)= Células control tratadas con etanol (disolvente de los compuestos).

Porcentaje de células HepG2			
Condición	Vivas	Apoptosis	Necrosis
0	91.9	4.79	3.59
CB	87.01	7.21	5.77
C4	86.26	5.97	7.75
C5	89.68	6.33	3.98
C7	93.47	3.83	2.72
C8	93.30	3.44	3.24
C9	92.14	4.25	3.54
C10	88.93	6.13	4.92
C11	92.6	4.52	2.87

Tabla 4. Translocación de la fosfatidilserina y tinción con el IP en las células HepG2. Las células se trataron con el etanol (0) y con las IC50 de los compuestos que inhibieron la reducción del MTT por 72 h. Se muestran los resultados en porcentaje de un ensayo representativo de tres experimentos realizados de manera independiente. (0)= Células control tratadas con etanol (disolvente de los compuestos).

Ciclo celular

Los resultados para las células HCT15 mostraron cambios significativos, con respecto al control con etanol, al ser tratadas con los compuestos CB, C4, C6, C8, C9 y C10.

Para los compuestos CB y el C8 se observó un aumento de células en la fase S y disminución en la fase Sub G_1 , Para los compuestos C4 y C9 se observó un incremento en la fase de síntesis, para el compuesto C6 se observó un aumento en las fases G_1/G_0 y S y una disminución en la fase Sub G_1 . Por último, el C10 produjo un cambio en todas las fases, induciendo una disminución de células en las fases G_0/G_1 y G_2/M , y un aumento en las fases S y sub G_1 (Tabla 5). El resto de los compuestos no tuvo cambios significativos respecto al control con etanol.

La evaluación de las etapas del ciclo celular se llevó a cabo en un citómetro de flujo cuantificando la cantidad del ADN por medio de la adición del IP. Los resultados para HepG2 mostraron cambios significativos, con respecto al etanol, en las fases del ciclo celular al tratar las células con los compuestos C4, C5, C7, C8, C9, C10 y C11 (Tabla 6).

Con los compuestos C4 y C9 hubo una disminución de células en las fases G_0/G_1 y un aumento en las fases G_2/M y Sub G_1 ; con el compuesto C5 hubo disminución en las fases G_0/G_1 y S, y aumento en la fase Sub G_1 ; para el compuesto C8 solo hubo una disminución en la fase G_2/M ; con el compuesto C7 hubo disminución en la fase S y un aumento en la fase Sub G_1 . Finalmente, con el compuesto C10 hubo disminución en la fase G_0/G_1 y aumento en el resto de las fases.

HCT15				
Fases del ciclo celular (% de células)				
	G₀/G₁	S	G₂/M	Sub G₁
0	32.75 ± 2.26	18.58 ± 1.73	22.19 ± 6.27	26.46 ± 5.75
CB	31.24 ± 1.37	25.75 ± 4.40*	28.77 ± 0.76	14.21 ± 5.01*
C1	33.85 ± 3.39	15.17 ± 2.73	16.44 ± 0.96	34.50 ± 5.15
C2	37.25 ± 1.16	17.6 ± 1.76	21.04 ± 5.53	24.08 ± 6.13
C4	29.85 ± 8.88	26.64 ± 6.12*	21.71 ± 5.51	21.8 ± 2.71
C5	30.08 ± 5.19	27.31 ± 11.09	20.47 ± 2.96	31.70 ± 4.71
C6	36.12 ± 0.5*	29.09 ± 3.11*	17.91 ± 0.48	15.34 ± 0.07*
C7	29.38 ± 0.94	23.5 ± 11.12	25.46 ± 5.30	21.41 ± 15.1
C8	31.33 ± 1.25	26.85 ± 5.23*	30.29 ± 3.23	11.51 ± 0.74*
C9	31.91 ± 5.39	25.31 ± 3.30*	25.68 ± 10.21	17.07 ± 8.11
C10	19.68 ± 5.48*	29.55 ± 1.73*	12.23 ± 0.67*	38.52 ± 3.061*
C11	29.78 ± 1.23	22.74 ± 8.83	24.05 ± 6.51	23.46 ± 14.04

Tabla 5. Fases del ciclo de las células HCT15. Las células se trataron con el etanol (0) y con las IC50 de los compuestos que inhibieron la reducción del MTT. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes en porcentajes. 0= células tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). * Los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa con una P < 0.05 con respecto al control con etanol.

HepG2				
Fases del ciclo celular (% de células)				
Compuesto	G₀/G₁	S	G₂/M	Sub G₁
0	39.26 ± 1.4	29.71 ± 0.21	19.47 ± 0.28	11.53 ± 1.32
CB	26.56 ± 15.16	29.16 ± 2.27	21.03 ± 6.66	20.85 ± 11.31
C4	10.54 ± 0.61*	18.55 ± 14.81	28.20 ± 0.21*	42.68 ± 15.65*
C5	10.1 ± 7.83*	7.03 ± 0.73*	18.86 ± 6.93	61.9 ± 4.58*
C7	32.28 ± 5.37	28.01 ± 0.57*	17.99 ± 2.70	21.7 ± 3.23*
C8	43.45 ± 13.79	29.39 ± 2.18	12.95 ± 2.89*	14.18 ± 8.71
C9	17.9 ± 3.43*	31.50 ± 1.67	24.57 ± 0.021*	26 ± 5.09*
C10	7.62 ± 2.86*	44.33 ± 4.36*	33.52 ± 1.21*	14.50 ± 2.72*
C11	34.93 ± 2.84	30.67 ± 1.14	22.33 ± 0.57*	12.05 ± 3.42

Tabla 6. Fases del ciclo de las células HepG2. Las células se trataron con el etanol (0) y con las IC50 de los compuestos que inhibieron la reducción del MTT. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes en porcentajes. 0= células tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). * Los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa con una P < 0.05 con respecto al control con etanol.

Liberación de la LDH

La liberación de la LDH se evaluó a las 72 h de tratamiento. Los resultados mostraron que ninguna de las IC50 de los compuestos producía un cambio en la liberación de la LDH de manera significativa con respecto al control ni para la línea celular HCT15 ni para la línea HepG2.

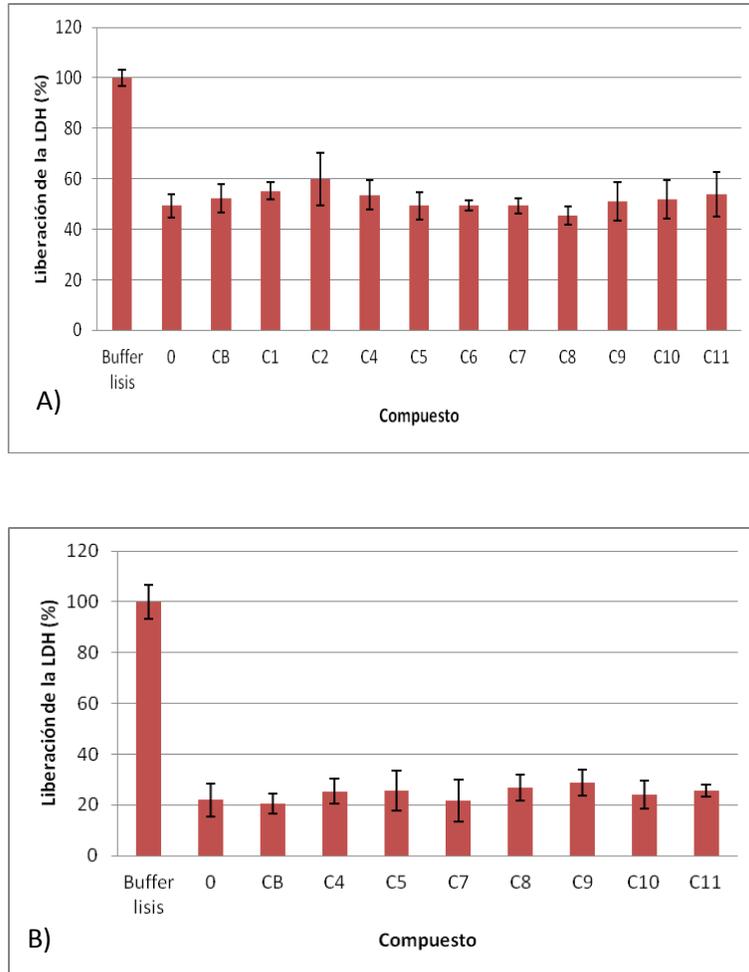


Ilustración 7. Liberación de la LDH. En esta gráfica se muestran las gráficas del porcentaje de la liberación de LDH de A) HCT15 y B) HepG2 provocada por el tratamiento con las IC50 de los compuestos señalados, respecto al control con buffer de lisis.

RESUMEN DE RESULTADOS

Compuesto	IC50		Anexina % vivas		Fase del Ciclo		LDH	
	HepG2	HCT15	HepG2	HCT15	HepG2	HCT15	HepG2	HCT15
CB	>40	>40	91.9	94.95	SD	SD	SD	SD
C1	>40	<5	_____	94.72	_____	SubG ₁	_____	SD
C2	>40	<5	_____	95.48	_____	SD	_____	SD
C3	>40	>40	_____	_____	_____	_____	_____	_____
C4	31.54	21.79	86.26	97.7	SubG ₁	S	SD	SD
C5	34.19	<5	89.68	84.05	SubG ₁	SD	SD	SD
C6	>40	<5	_____	97.88	_____	S	_____	SD
C7	31.94	25.87	93.47	97.49	SubG ₁	SD	SD	SD
C8	31.94	25.87	93.3	98.44	SD	S	SD	SD
C9	33.91	22.75	902.14	98.00	Sub G ₁	S	SD	SD
C10	<5	27.56	88.93	90.73	S- G ₂ /M	S y SubG ₁	SD	SD
C11	26.55	19.76	902.6	99.04	G ₂ /M	SD	SD	SD
C12	>40	>40	_____	_____	_____	_____	_____	_____

Tabla 7. Resumen de resultados. Se muestra un resumen de los resultados desde la IC50 hasta la liberación de la LDH. En "fases del ciclo" se hace mención a la fase donde se encontró un mayor número de células respecto al control tratado con etanol. SD= Sin diferencia significativa con respecto al control de células tratadas con etanol (disolvente de los compuestos). _____ = no existieron resultados en esa condición.

DISCUSIÓN

El AOL es un triterpenoide pentacíclico, ampliamente distribuido en las plantas, que se clasifica en el grupo de las saponinas (Liu y Wang, 2007). Entre las actividades reportadas del AOL se encuentran el efecto antiproliferativo y la inducción de muerte celular por apoptosis en las líneas celulares HL60 (Zhang *et al.*, 2007) y NB4 (Li *et al.*, 2013).

Las modificaciones químicas que se han realizado en el AOL produjeron análogos más potentes como el CDDO-Me, el cual induce la apoptosis en líneas celulares de leucemia linfocítica aguda y la fosforilación de la proteína p38 en células U937. Por otro lado, el análogo CDDO-Im reduce de manera selectiva el glutatión mitocondrial, lo que conduce a la acumulación de las ROS, a la oxidación del glutatión celular, a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a la externalización de la fosfatidilserina (Samudio *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta los efectos biológicos del AOL y de sus análogos en varias líneas celulares de cáncer, en este trabajo se evaluó el efecto del AOL y doce nuevos derivados sintéticos en la proliferación, el ciclo celular y la muerte de dos líneas celulares, una de ellas derivada de cáncer de hígado y la otra de cáncer de colon.

De manera general, los resultados muestran que el AOL el cual se manejó a lo largo de este trabajo como compuesto CB no provocó cambios en ninguno de los factores evaluados en este trabajo y no se halló su IC50 por debajo de los 40µg/mL (dosis en la que se basó este proyecto). La modificación química de los compuestos obtenidos de plantas, realizada en búsqueda de la potenciación de sus efectos no es algo nuevo; entre los primeros compuestos anticancerosos obtenidos de las plantas se encuentran la *vincristina* y la *vinblastina*, aislados de *Catharanthus roseus*, planta empleada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes (Cragg *et al.*, 1994). La vincristina es administrada en

combinación con otros medicamentos anticancerosos en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda en niños, cáncer cervicouterino, de colon, de mama y otros carcinomas (Moura *et al.*, 2002), mientras que la vinblastina se emplea para el tratamiento de linfoma de Hodgkin (Warber, 1999), carioepitelioma y cáncer de ovario (Silva *et al.*, 2003). Las modificaciones químicas que se realizaron a la *vincristina* y *vinblastina* condujeron a los compuestos semisintéticos *vinorelbina* y *vindesina*, aprobados en Europa para el tratamiento del cáncer (Newman *et al.*, 2000). El cáncer no es una entidad sencilla sino que se suponen entre 100 y 200 tipos diferentes de cáncer con diferentes conductas evolutivas y que se diferencian entre sí por la localización del tumor, su estadio clínico, las enfermedades asociadas, las condiciones generales del enfermo entre otras características (Marinello, 2002). Es sabido que las células derivadas de distintos tipos de carcinomas, pueden responder a los tratamientos de diferentes maneras; en este trabajo las células HCT15 tuvieron respuesta a una mayor cantidad de compuestos, así como una IC50 de menor concentración en comparación con las obtenidas para la línea celular HepG2. Estos resultados hacen notar una mayor sensibilidad de las células HCT15, lo que puede relacionarse con el trabajo realizado por López-Terrada y colaboradores (2009), en donde mencionan que las células HepG2 se derivan de un hepatoblastoma (tipo de cáncer de hígado que se origina a partir de precursores de los hepatocitos epiteliales y además células pequeñas indiferenciadas), y no de un carcinoma hepatocelular bien diferenciado como es caracterizado por ATCC, pues los tumores bien diferenciados tienden a crecer y a extenderse a un paso más lento que los tumores que son indiferenciados o escasamente diferenciados (INC, 2015). Por esto es probable que debido a que las células del carcinoma hepatocelular son epiteliales y las del hepatoblastoma tienen una apariencia menos

diferenciada pudieran ser más agresivas y no responder satisfactoriamente al efecto inhibidor de varias moléculas o compuestos, contrario a lo observado en las células HCT15.

Nuestros resultados mostraron que solo el compuesto C5 indujo levemente la translocación de la fosfatidilserina en las células HCT15, que es un indicador de muerte apoptótica, sin embargo tampoco se observó ningún indicativo de muerte necrótica, lo que coincide con la no liberación de la enzima LDH, que nos indica el rompimiento de la membrana celular y muerte celular por necrosis. Cuando se evaluaron las fases del ciclo celular, se observó un incremento en la fase Sub G₁ con el C1 y C10. Por otro lado, el incremento de la fase Sub G₁ inducido por los compuestos C4, C5, C7 y C9 en las células HepG2 no coincide con los resultados obtenidos en la translocación de la fosfatidilserina. Es probable que los tiempos a los que se determinó la muerte no sean los adecuados para observar muerte, por lo que sería interesante evaluar si a tiempos más largos hay muerte celular.

A pesar de que no se observó una relación entre las fases del ciclo celular y la muerte, los compuestos indujeron una inhibición de la proliferación celular, evaluada por la tinción con cristal violeta, y una disminución en el metabolismo mitocondrial, evaluado por la reducción del MTT. El efecto del AOL y sus derivados sobre la actividad metabólica y la proliferación, podría tener relación con el metabolismo de las células tumorales, pues se sabe que las células tumorales requieren una inusual cantidad de energía para sobrevivir y crecer, la demanda metabólica global en estas células es significativamente más grande que en la gran parte de los otros tejidos. Para la mayoría de sus necesidades de energía, las células normales se basan en un proceso llamado respiración, que consume oxígeno y glucosa para formar moléculas de almacenamiento de energía de trifosfato de adenosina (ATP),

pero las células cancerosas suelen depender más de la glucólisis, que es la descomposición anaeróbica de la glucosa en ATP. Este aumento de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno disponible, se conoce como el efecto Warburg (Garber, 2006). Además, se sabe que independientemente de las alteraciones genéticas que adquiere la célula durante el proceso de transformación, no se puede descartar la posibilidad de que el fenotipo glucolítico que se observa en la mayor parte de los tumores humanos corresponda en realidad al fenotipo metabólico de la célula proliferativa (Lopez-Rios *et al.*, 2007). Se ha descrito que cuando se estimula la proliferación de linfocitos mediante su exposición a la concavalina A se incrementa la glucólisis aerobia, y que cuando vuelven al estado quiescente disminuye la producción de lactato (Wang *et al.*, 1976). Las levaduras cultivadas sin un exceso de glucosa presentan un ciclo de replicación sincrónico unido a un consumo de O₂ oscilante, alternando de esta forma una fase reductiva y una oxidativa (Klevecz *et al.*, 2004). En este sentido, la síntesis de los componentes moleculares de la mitocondria ocurre preferencialmente durante la fase reductiva constructiva en levaduras (Tu *et al.*, 2005) y en las fases S, G₂ y M del ciclo de celular de mamífero (Martínez-Diez *et al.*, 2006); lo que se relaciona con lo descrito en un artículo publicado recientemente por Ramírez y colaboradores (2014), que demuestran que los derivados del ácido oleanólico utilizados en este trabajo producen un efecto inhibitor mejorado sobre la actividad de la enzima PTP-1B (enzima intracelular específicamente implicada en la regulación negativa de la señalización de la insulina) y producen un efecto hipoglucemiante en un modelo de ratas con diabetes no dependiente de insulina, donde además se sugiere que la presencia del ácido carboxílico y/o su derivado carbinol producto de la reducción correspondiente (donante H-bond) en C-28 es requerida para mantener la actividad inhibitora. Por otra parte, este es

aún mayor por formación de éster o éter en C-3, sugerencia que es coincidente con los compuestos que presentaron actividad en alguna de las líneas celulares aquí estudiadas, exceptuando los compuestos C4 y C7.

Esta afección en el metabolismo podría estar evitando la proliferación descontrolada de las células tumorales sin enviarlas necesariamente a muerte celular. Lo que además podría explicar por qué las células HCT15 son más sensibles a los compuestos, ya que el cáncer de colon está asociado a la hiperinsulinemia (Gárciga y Licea, 2012).

En resumen, el AOL o compuesto CB no mostró un efecto inhibitorio en la proliferación, en el metabolismo mitocondrial, en la translocación de la fosfatidilserina, en las fases del ciclo celular, ni en la liberación de la LDH en las líneas celulares HepG2 y HCT15, en cambio, los resultados con algunos de sus derivados sintéticos produjeron la disminución de la proliferación, la actividad mitocondrial e incluso modificaciones en ciclo celular. Los compuestos C1 y C10 en HCT15 y los compuestos C4, C5, C7 y C9 en HepG2 indicaron un aumento en la fase Sub G1 del ciclo celular, lo cual es sugerente de apoptosis, sin embargo estos resultados no fueron coincidentes con la evaluación de la translocación de la fosfatidilserina, por lo que sería importante realizar su evaluación a tiempos más largos y comparar sus resultados con otro experimento diseñado para la evaluación de la muerte celular por apoptosis.

CONCLUSIÓN

El AOL y algunos de sus derivados sintéticos evaluados en este trabajo, no mostraron un efecto citotóxico significativo en las células HCT15 y HepG2 a los tiempos evaluados, sin embargo los compuestos C1 y C5 en HCT15 y C4, C5, C7 y C9 en HepG2 incrementaron el número de células en la fase Sub G₁ sugiriendo a estos como candidatos viables para la investigación de nuevos tratamientos contra el cáncer de hígado y colon.

PERSPECTIVAS

- Sería interesante observar lo que sucede con los compuestos a un tiempo más prolongado de exposición, esto con la finalidad de descubrir o descartar si a tiempos más largos se produce muerte celular.
- Probar los compuestos con líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer.
- Realizar un estudio comparativo con las líneas celulares de leucemia NB4 y HL60, en donde previamente se mostró un efecto citotóxico con el AOL.
- Realizar tratamientos a largo plazo para determinar si las células recuperan su capacidad proliferativa.
- Determinar la especificidad de los compuestos, evaluando su efecto en células normales de diferentes tejidos.

BIBLIOGRAFIA

- Alfaro, E. García, C. Dueñas, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 46(4): 275-280.
- ATCC. www.atcc.org Recuperado el 10 de marzo del 2015.
- Barruti, S. (2012). Breve historia del cáncer. *Gerontogeriatría on line. Órgano oficial de la Federación Argentina de Geriatría y Gerontología y de la Asociación Gerontológica Argentina*. Recuperado el 5 de diciembre de 2013, de: <http://www.gerontogeriatría.org/component/content/article/42-recomendaciones/2009-breve-historia-del-cancer.html>
- Bruce, A. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. (2004). *Biología molecular de la célula*. Cuarta edición. Ediciones Omega. España. pp. 1728.
- Cortes, P. (2006). Influencia del aceite de oliva virgen frente a otras grasas de uso común en la prevención del desarrollo, crecimiento y diseminación del cáncer de mama. Estudio en un modelo animal inducido por N-metil nitrosourea. Universidad de Jaen. España.
- Cragg, GG. Boyd, MR. Cardellina, II. Newman, DJ. Snader, KM. Mc Cluod, TG. (1994). *Ethnobotany and Drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. Ethnobotany and the search for new drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. Chichester, UK: Wiley & Sons; 1994: 178-196.
- Denny, A. (2009). Prodrug strategies in cáncer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Estados Unidos. 36(7): 577-595.
- Edwards, B. Brown, M. Wingo, P. (2005). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring based population based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 97:1407-1427.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. Estados Unidos. 35(4):495-516.
- El-Serag, H. (2004). Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*. 127 (5 Suppl 1): (S27-S34).
- Erazo, A. (2008). Comentario editorial. *GAMO. Instituto Nacional de Cancerología*. México. 7(4). 1.
- Espada, S. (2010). regulación de la vía nrf2/ho-1 por receptores acoplados a proteínas g heterotriméricas y efecto farmacológico del ácido nordihidroguayarático. Relevancia en neuroprotección frente a estrés oxidativo. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Universidad Autónoma de Madrid.
- Fabricant, D. Farnsworth, N. (2001). The value of plants used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *University of Illinois-Chicago. USA. Environmental Health Perspectives*. 109(1): 69-75.
- Garber K. (2006). Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312: 1158-9.

- Gárciga, F. Licea, M. (2012). Relación entre la diabetes mellitus y el cáncer. *Revista peruana de epidemiología*. 16(2): 69-74.
- Gillies, R.J. Didier, N. Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*. 159 (1):109-13.
- Huang, D. Ding, Y. Li, Y. Zhang, W. Fang, W. Chen, X. (2006). Antitumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid. *Cancer Lett*. 233: 289-296.
- Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Recuperado el 24 de marzo del 2015 de: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/higadoinfantil/HealthProfessional/page2>
- INEGI. (2014). Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de Febrero) datos nacionales. Aguascalientes, México.
- Jiménez, N. González, M. Fernández, C. López, J. (2007). Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. *Biomecánica*. 15(1): 63-71.
- Klevecz, RR. Bolen, J. Forrest, G. Murray, DB. (2004). A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1200-5.
- Kopleva, M. Contractor, R. Kurinna, S. Chen, W. Andreeff, M. Ruvolo, P. (2005). The novel triterpenoid CDDO-Me suppresses MAPK pathways and promotes p38 activation in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 19: 1350-1354.
- Kueng, W. Silber, E. Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*. 182(1): 9-16.
- Li, H. He, N. Li, X. Zhao, M. Jiang, H. Zhang, X. (2013). Oleanolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in NB4 cells by targeting PML/RAR α . *Oncology letters*. 6: (885-890).
- LIU, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic. *Journal of Ethnopharmacology*. 49: (57-68).
- Lopez-Rios, F. Sanchez-Arago, M. Garcia-Garcia, E. Ortega, AD. Berrendero, JR. Pozo-Rodriguez, F. Lopez-Encuentra, A. Ballestin, C. Cuezva, JM. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67: 9013-7.
- López-Terrada, D. Wai, S. Finegold, M. Knowles, B. (2009). Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*. 40(10): 1512-1515.
- Lukas, J. Lukas, C. Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair*. 3:(997-1007).
- Lundberg, A. Weinberg, R. (1999). Control of cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer*. 35(14):1886-1894.
- Marinello, J. 2002. Tratamientos de medicina alternativa con intención curativa en el manejo del paciente con cáncer. Consideraciones éticas. *Revista cubana de medicina*. 41(4): (238-240).
- Martínez-Diez, M. Santamaría, G. Ortega, AD. Cuezva, JM. (2006). Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* 1: e107.

- Mendez-Sanchez, M. Villa, A. Chavez-Tapia, N. Uribe, M. (2005). Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol.* 4: (52-55).
- Monroy, E. Soto, M. Cadena, J. Santiago, E. Ruiz, L. Rosas, H. (2009). Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq) Swartz. *Agrociencia.* 43: (777-790).
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 65: (55-63).
- Moura MD, Silva JS, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Barbosa-Filho JM. Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farm Bonaerense* 2002; 21: 67-74.
- Newman, D. Cragg, G. Snader, K. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 66: (1022-1037).
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 2000; 17: 215-234.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). *Cáncer. Nota descriptiva N° 297*. Recuperado el 14 de Agosto del 2014, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Ortiz, J. (2011) Evaluación de la producción de ácido oleanólico y otros metabolitos secundarios a partir de cultivos elicitados de células en suspensión de *Caléndula officinalis*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Pacheco, A. Torres, C. Rubio, C. Silva, S. Rodriguez, A. (2008). Experiencia en el manejo de cáncer de colon y recto ingresados en el Hospital Regional General Ignacio Zaragoza del ISSTE durante los años 2003-2006. *Cirujano General.* 30(3): (156-160).
- Ramírez, J. Rios, Y. Paoli, P. Flores, V. Camici, G. De la Rosa, V. Hidalgo, S. Navarrte, G. Estrada, S. (2014). Synthesis of oleanolic acid derivatives: In vitro, in vivo and in silico studies for PTP-1B inhibition. *European Journal of Medicine Chemistry.* 87 :(316-327).
- Rodriguez, L. Hernandez, E. Reyes, J. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer.
- Sainz, C. (2002). Análisis de la influencia in vitro de bajas dosis de radiación producidas por ^{222}Rn sobre proliferación celular, apoptosis y respuesta a agentes citotóxicos. Universidad de Cantabria. Santander, España.
- Samudio, I, Konopleva, M. Hail, N. Shi, Y. McQueen, T. Hsu, T. (2005). 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9-dien-28-imidazolide (CDDO-Im) directly targets mitochondrial glutathione to induce apoptotic in pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 280: (36273-36282).
- Sangiovanni, A. Del Ninno, E. Fasani, P. (2004). Increased survival of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology.* 126: (1005-1014).
- Sanchez-Torres, L. (2003). Apoptosis el fenómeno y su determinación. *Téc Pecu. México.* 41(1): (49-62).
- Schlaepfer, L. Mendoza-Espinoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Asociación farmacéutica mexicana. México.* 41(4): (18-27).

- Silva JS, Moura MD, Oliveira RAG, Diniz MFF, Barbosa-Filho JM. Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine* 2003; 10: 221-232.
- Suarez, I. (2005). Ciclo celular y apoptosis como dianas de nuevos fármacos antitumorales. Estudio experimental en cáncer de mama. Facultad de medicina, Universidad de Granada. España.
- Tirado-Gomez, L. Mohar, A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. *GAMO. Instituto Nacional de Cancerología*. 7(4): (3-11).
- Tu, BP. Kudlicki, A. Rowicka, M. McKnight, SL. (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310: 1152-8.
- Uribe, M. García, M. Chávez, N. Roman, J. (2010). Carcinoma hepatocelular. *Revista de gastroenterología de México*. 2(75): (168-176).
- Vega, E. Velasco, R. Jiménez, M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Medigraphic artemisa. UAMI-UNAM. México*. 31(3): (97-111).
- Wang, T. Marquardt, C. Foker, J. (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261: 702-5.
- Warber S. Models of action at target sites. In: Kaudman P, Cseke LJ, Warber S, Duke J A, Brielmann HL. (eds). *Natural products from plants*. USA: CRC Press; 1999: 158-181.
- Zhang, T. Li, H. Chen, D. Ni, J. Kang, Y. Wang, S. (2007). Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly (ADP-ribose) Polymerase Cleavage. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39(10): (803-809).