



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTI-  
INFLAMATORIA Y CITOTÓXICA DE FRACCIONES  
DERIVADAS DE HOJAS DE *Jacaranda copaia***

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Giselle A. Ramos G. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutores: Dr. Peter Taylor (IVIC)  
Dra. Vincenza Cervino (IBE)

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO - 2011

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Griselda González por todo el apoyo brindado, los buenos valores transmitidos, por alentarme siempre a luchar por mis metas y sueños. Simplemente, le agradezco por ser ella mi amiga, mi compañera, mi madre. A mi padre y a mi familia, les agradezco por todo el cariño que siempre me han demostrado.

Gracias a Ernesto, por su cariño, por hacerme feliz, por ayudarme y apoyarme; por enseñarme tantas cosas maravillosas del mundo, de la vida; por guiarme siempre al camino de la excelencia y la sabiduría. Gracias por estar a mi lado.

Agradezco a Hiliana, Vanessa, Maryant, Oriana, David, Ricardo, Jennire y Eduardo, por acompañarme, por escucharme, por compartir conmigo buenos momentos y otros no tan buenos... por ser mis amigos, mis hermanos del alma...

Gracias a mi tutor “El Doc” por aceptarme en su laboratorio, por este proyecto tan interesante que llevamos a cabo, gracias por sus consejos y regaños. A mis compañeras y amigas de laboratorio, Izaskun, Mirian T. y María Jesús, gracias por brindarme su apoyo y ayuda, por sus consejos y recomendaciones, pero sobre todo gracias por sacarme una sonrisa cuando las cosas no iban bien. Gracias por la enseñanza.

Le agradezco a Omar Estrada por su gran colaboración en este proyecto. A Josefa por sus recomendaciones.

A mis queridos profesores gracias por los conocimientos transmitidos. Gracias a “Mina” por escucharme siempre. Gracias a mi tío Aníbal Castillo por su apoyo. Gracias a la profe “Enza” por su cariño y ayuda. Gracias al jurado por sus correcciones.

Gracias a mi querida UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, por ser la casa que vence las sombras...

Ciencias, Ciencias, UCV.

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad fundamentalmente caracterizada por el crecimiento incontrolado de las células debido a varios factores. Su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el ciclo celular, causando mutaciones que les confieren a la célula ciertas características como ser autosuficientes en señales de crecimiento, ser insensibles a señales inhibitorias de crecimiento, evadir la apoptosis, replicarse ilimitadamente, generar angiogénesis y ser capaz de invadir otros órganos generando metástasis.

Hoy día se sabe que existe una relación funcional entre la inflamación crónica y el cáncer, ya que ciertas células del sistema inmunitario tales como macrófagos, células NK, linfocitos T, granulocitos y mastocitos, son componentes prominentes del tejido maligno y contribuyen funcionalmente al desarrollo del cáncer debido a la producción de potentes mediadores solubles que regulan la proliferación, migración celular, angiogénesis, etc.

Se ha demostrado que drogas anti-inflamatorias pueden ejercer un efecto anti-tumoral, y estas drogas pueden ser derivadas de plantas naturales. Por esta razón, nos hemos planteado el objetivo de evaluar la actividad citotóxica y anti-inflamatoria del extracto crudo, fracciones, subfracciones y compuestos derivados de hojas de *Jacaranda copaia*. Existen resultados que indican que un extracto de *J. copaia* puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer en ratón. Se realizaron ensayos *in vitro* de citotoxicidad mediante la técnica de Sulforodamina B y por MTS/PMS. Debido a la posibilidad de que la planta pueda ejercer un efecto anti-tumoral a través de un efecto anti-inflamatorio, se midieron mediante ensayos *in vitro* el efecto de *J. copaia* sobre dos mediadores pro-inflamatorios como los son el Óxido Nítrico (NO) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), y también sobre el Factor Nuclear kappa Beta (NF- $\kappa$ B).

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan que la fracción E2 derivada de hojas de *J. copaia* fue citotóxica a altas concentraciones en las líneas celulares tumorales HT-29, 4T1, y en células macrofágicas RAW 264.7. No obstante, el extracto crudo, la fracción E2 y los compuestos aislados de hojas de *J. copaia* mostraron efecto citostático sobre las células HT-29, 4T1, HeLa y RAW. En cuanto al estudio de la actividad anti-inflamatoria de *J. copia*, se observó que el extracto crudo, la fracción E2, la subfracción E2II y el compuesto A aislado de hojas de *J. copaia* mostraron un ligero efecto inhibitorio sobre la producción de la citocina TNF- $\alpha$  en macrófagos RAW 264.7. Por otro lado, *J. copaia* mostró un mayor efecto inhibitorio dosis dependiente a partir de 0,3  $\mu$ g/mL sobre la producción de NO en presencia del extracto crudo, fracción E2, subfracción E2II y compuesto A. Sin embargo, sólo se observó efecto inhibitorio de la activación de NF- $\kappa$ B en presencia del extracto crudo y la fracción E2 a partir de 30  $\mu$ g/mL. Estos resultados no son atribuibles a un efecto citotóxico directo sobre las células macrofágicas. Además de evaluar el efecto citotóxico y anti-inflamatorio de *J. copaia* se determinó que los compuestos aislados en este estudio son derivados de ácido cafeico, y se ha demostrado en diferentes investigaciones que el ácido cafeico y sus derivados poseen actividad anti-inflamatoria entre otras.

Los resultados sugieren que compuestos activos de la planta *J. copaia* pudieran ejercer un efecto anti-tumoral, no directamente sobre las células tumorales, sino indirectamente a través de un efecto inhibitorio sobre el componente inflamatorio que apoya el crecimiento tumoral.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN   | 6  |
| 1.1. El cáncer a nivel mundial                                    | 6  |
| 1.2. Biología molecular del cáncer                                | 7  |
| 1.2.1. Cáncer   | 7  |
| 1.2.2. Mutaciones génicas relacionadas con el cáncer              | 9  |
| 1.2.2.1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento            | 10 |
| 1.2.2.2. Insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento | 12 |
| 1.2.2.3. Evasión de apoptosis                                     | 13 |
| 1.2.2.4. Potencial replicativo ilimitado                          | 16 |
| 1.2.2.5. Desarrollo de angiogénesis sostenida                     | 16 |
| 1.2.2.6. Capacidad de invadir y generar metástasis                | 17 |
| 1.3. Inmunología del Cáncer                                       | 21 |
| 1.3.1. Relación entre la inflamación y el cáncer                  | 21 |
| 1.3.2. TNF- $\alpha$ , sus receptores y su relación con el cáncer | 23 |
| 1.3.3. NO y su relación con el cáncer                             | 25 |
| 1.3.4. NF- $\kappa$ B y su relación con el cáncer                 | 27 |
| 1.4. Extractos de Plantas en la Terapia del Cáncer                | 29 |
| 2. ANTECEDENTES   | 33 |
| 3. OBJETIVOS  | 35 |
| 3.1. Objetivo general   | 35 |
| 3.2. Objetivos específicos  | 35 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS   | 36 |
| 4.1. Materiales   | 36 |
| 4.1.1. Líneas celulares   | 36 |
| 4.1.2. Medios de cultivo  | 36 |
| 4.1.3. Material vegetal   | 37 |
| 4.1.4. Fraccionamiento  | 37 |
| 4.1.5. Drogas controles   | 37 |
| 4.2. Metodología  | 39 |
| 4.2.1. Fraccionamiento del extracto crudo de J. copaia            | 39 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.2. Cultivo celular   | 41 |
| 4.2.3. Ensayo de citotoxicidad mediante la técnica de Sulforodamina B  | 42 |
| 4.2.4. Cuantificación de NO y TNF- $\alpha$ en macrófagos Raw 264.7  | 44 |
| 4.2.5. Ensayo <i>in vitro</i> para la cuantificación de NO   | 45 |
| 4.2.6. Ensayo de ELISA “sándwich” para la cuantificación de TNF- $\alpha$  | 47 |
| 4.2.7. Ensayo de citotoxicidad por MTS/PMS   | 48 |
| 4.2.8. Ensayo para la determinación de la activación de NF- $\kappa$ B   | 50 |
| 4.2.9. Análisis estadístico  | 51 |
| <br>   |    |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN  | 52 |
| 5.1. Actividad citotóxica de <i>J. copaia</i> sobre diferentes líneas celulares  | 52 |
| <br>   |    |
| 5.2. Actividad anti-inflamatoria de <i>J. copaia</i>   | 56 |
| 5.2.1. Efecto <i>in vitro</i> del extracto crudo y fracciones E1, E2 y E3 derivadas de hojas de <i>J. copaia</i> sobre la producción de TNF- $\alpha$ y NO en macrófagos RAW 264.7 | 59 |
| 5.2.2. Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III sobre la producción de TNF- $\alpha$ y NO en macrófagos RAW 264.7   | 61 |
| 5.2.3. Efecto de los compuestos A y B sobre la producción de TNF- $\alpha$ y NO en macrófagos RAW 264.7  | 63 |
| 5.2.4. Efecto del extracto crudo y la fracción E2 sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B   | 65 |
| 5.2.5. Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B  | 67 |
| 5.2.6. Efecto de los compuestos A y B sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B   | 69 |
| <br>   |    |
| 5.3. Fraccionamiento Biodirigido   | 72 |
| <br>   |    |
| 5.4. Identificación de los compuestos A y B  | 73 |
| <br>   |    |
| 6. CONCLUSIONES  | 79 |
| <br>   |    |
| 7. RECOMENDACIONES   | 80 |
| <br>   |    |
| 8. BIBLIOGRAFÍA  | 81 |

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El cáncer a nivel mundial

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2011). Se han reportado 12,7 millones de nuevos casos de cáncer por año y 7,6 millones de muerte por año para el 2008, aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales (American Cancer Society, 2011) y 21 millones de nuevos casos de cáncer por año y 13 millones de muerte por año para el 2030 (World Health Organization, 2011).

La mortalidad anual generada por los principales tipos de cáncer es de 1,4 millones de muerte (pulmón), 866.000 (estómago), 653.000 (hígado), 677.000 (colon) y 4548.999 (mama) (World Health Organization, 2011).

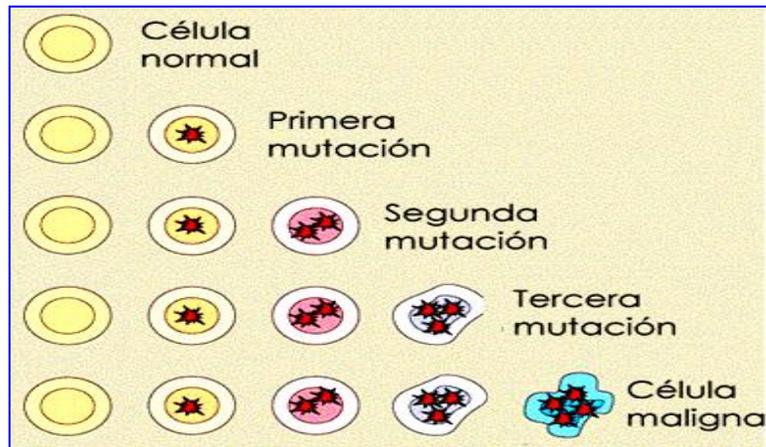
Según Capote (2006), el cáncer es la segunda causa de muerte en Venezuela con 15% de mortalidad, siendo superado por enfermedades del corazón que ocupan 20% de mortalidad. En los hombres, el cáncer de próstata es la primera posición, con un total de 1766 defunciones (20% de mortalidad por cáncer), seguido de pulmón, estómago, colon y recto. En mujeres se encuentra en primer lugar el cáncer de cuello uterino con 1612 defunciones que representa el 18% de las muertes por cáncer en mujeres venezolanas, seguido por cáncer de la glándula mamaria que alcanzó en el 2005 unas 1425 muertes y ha mostrado un aumento en los últimos años, luego está el cáncer de pulmón, estómago, colon y recto. En ambos géneros, el cáncer de pulmón (con 2668 muertes) es la neoplasia maligna que lidera la mortalidad en el país ya que corresponde a una patología de órgano común.

## **1.2. Biología molecular del Cáncer**

### **1.2.1. Cáncer**

El cáncer o neoplasia es una enfermedad fundamentalmente caracterizada por el crecimiento incontrolado de las células; debido a factores físicos, químicos y biológicos (Cooper, 1993). Existen decenas de formas en que se presenta la enfermedad pero su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el ciclo celular causando desregulaciones en el mismo (Golias y col., 2004).

Las células son las unidades básicas que forman los tejidos del cuerpo, éstas crecen, se dividen y mueren de una manera ordenada. Pero a veces, este proceso ordenado de división se descontrola. El cáncer comienza con una célula normal, que luego se transforma en una célula cancerosa debido a daños que ocurren a nivel del ADN (molécula donde se encuentra almacenada la información genética de las células). La célula normal es capaz de reparar el daño ocasionado en el ADN, o es destinada a morir. Sin embargo, la célula cancerosa no es capaz de reparar el ADN dañado y puede ser heredado a otras generaciones (Figura 1), generando un clon neoplásico (Luque y Herráez, 2006; American Cancer Society, 2009).



**Figura 1. Transformación de una célula normal a una célula maligna**  
 (Tomado de <http://timerime.com/users/385/media/cancer/genes-cancer.gif>).

La masa de tejido formada por células anormales (cancerosas) que proliferan excesivamente se denomina tumor (Mackay y col., 2001). Los tumores se clasifican en benignos cuando las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única (tumor primario) y en general carecen de capacidad invasiva, y malignos cuando las células neoplásicas tienen la capacidad de llegar a la circulación e invadir otros tejidos (tumor secundario o metástasis).

Los tumores dependiendo del tejido y del tipo celular del cual provienen se pueden clasificar en carcinomas que proceden de células epiteliales, y sarcomas que proceden de células del tejido conectivo o de células musculares (Lodish y col., 2004). Las neoplasias derivadas de células hematopoyéticas (provenientes de la médula ósea) originan leucemias y linfomas.

### **1.2.2. Mutaciones génicas relacionadas con el cáncer**

La mayoría de los cánceres se deben a cambios genéticos inducidos por mutaciones. Hoy día, se conocen muchas mutaciones responsables de causar cáncer, afectando genes de dos tipos, protooncogenes y genes oncosupresores (Luque y Herráez, 2006).

Los protooncogenes son un grupo de genes que al ser mutados causan la conversión de células normales a cancerosas (Adamson, 1987; Weinstein y Joe, 2006). Estos genes codifican proteínas que tienen como funciones estimular la división celular (proliferación) e inhibir la diferenciación celular, también están relacionados con la muerte celular (apoptosis); algunas de estas proteínas son: factores estimuladores del crecimiento celular, receptores de factores de crecimiento o de hormonas, proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales y factores de transcripción. Todos estos procesos son importantes y necesarios en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos y órganos. Los oncogenes (forma mutada del gen normal o protooncogen) se expresan en forma dominante (Chial, 2008) y producen en exceso las proteínas mencionadas anteriormente, conduciendo así, a una proliferación descontrolada o a una apoptosis reprimida, dando como resultado la aparición del cáncer. Otra posibilidad de que un protooncogen se transforme en un oncogen es cuando se activa en el organismo fuera de tiempo (por ejemplo, un gen embrionario activado en estado adulto) o cuando se produce como una proteína no regulable (por ejemplo, el gen v-Src).

Otros genes que causan cáncer como consecuencia de una mutación de la forma normal, son los llamados genes oncosupresores, genes supresores de tumores o antioncogenes que actúan deteniendo la proliferación o induciendo la apoptosis. Algunas proteínas oncosupresoras son: factores inhibidores del crecimiento celular, receptores de esos factores

inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular, proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales, factores de transcripción y proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis (Luque y Herráez, 2006).

Según investigaciones realizadas por Hanahan y Weinberg en el 2000, la mayoría de los genotipos cancerígenos son resultado de alteraciones en la fisiología de la célula que permiten el crecimiento maligno, adquiriendo la capacidad de autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de apoptosis, replicación potente e ilimitada, generación de angiogénesis e invasión y metástasis (Contreras, 2007; Kumar, 2008). A continuación se presentarán algunos ejemplos de estas estrategias de las células cancerosas.

#### 1.2.2.1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento

Las células normales requieren ciertos factores para su crecimiento, los cuales son transmitidos al interior celular mediante receptores transmembranas que se unen a distintas clases de moléculas de señalización tales como factores de crecimiento difusibles, componentes de matriz extracelular y moléculas responsables de la adhesión célula-célula (Hanahan y Weinberg, 2000). Las células tumorales generan sus propias señales de crecimiento, disminuyendo la dependencia de ser estimuladas por el microambiente del tejido normal. Un ejemplo de señal estimuladora es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) cuya cadena  $\beta$  es codificada por el protooncogén *sis* (Luque y Herráez, 2006), el PDGF juega un papel crítico en la proliferación y desarrollo celular (Leveen y col., 1994; Soriano, 1994; Boström y col., 1996; Fruttiger y col., 1999; Karlsson y col., 1999; Gnessi y col., 2000; Karlsson y col., 2000; Hoch y Soriano, 2003), participa en varios procesos tales como mitogénesis, diferenciación,

angiogénesis y en procesos patológicos como angioplastia, aterosclerosis, glomerulonefritis y cáncer, entre otros (Morales y Ariza, 2005).

Los receptores de la superficie celular que transducen las señales estimuladoras al medio intracelular son blancos importantes de la regulación del origen y evolución del tumor (Fedi y col., 1997). Un ejemplo es el receptor de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que es codificado por el protooncogén *erbB* (Luque y Herráez, 2006). Se ha demostrado que el crecimiento de células tumorales puede ser atenuado bloqueando a EGFR (Stratford y col., 2007).

Otra proteína que es causante de numerosos procesos cancerosos es Ras, codificada por el gen *ras*. Su activación es un paso esencial en la transducción de señales producidas por muchos factores de crecimiento. Una alteración frecuente en una proporción elevada de tumores (especialmente de colon y páncreas) es la mutación del gen *ras*, originando una proteína Ras incapaz de hidrolizar el GTP, por lo que permanece en su forma activa Ras:GTP, desencadenando una señal de proliferación continua y no regulada (Luque y Herráez, 2006).

Hoy día, sabemos que existe una gran relación entre los distintos procesos neoplásicos y las alteraciones en algunos genes, en especial aquellos que codifican proteínas importantes en el control del ciclo celular.

En el ciclo celular existen dos puntos de control principales situados en la interfase, concretamente en las transiciones de G1 a S y de G2 a M. El punto de control en G1/S también es llamado punto R (restricción), o inicio o de entrada en S y el otro punto de control es en G2/M o de entrada en M. En ambos puntos de control intervienen las ciclinas y las proteínas quinasas (CdK) que se asocian y forman complejos CdK:ciclina que cuando están activos, la CdK es la subunidad catalítica (fosforila proteínas sustratos) y la ciclina es la subunidad reguladora (Sherr, 2000). Las mutaciones que activan

los genes de ciclina o que inactivan los reguladores normales de ciclinas y quinasas dependientes de ciclina se observan en una amplia variedad de cánceres como melanoma y cáncer cerebral, pulmonar y pancreático (Kumar y col., 2008).

#### 1.2.2.2. Insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento

La falla en las señales inhibitorias del crecimiento es una alteración fundamental en la carcinogénesis. En principio, las señales anti-crecimiento pueden prevenir la proliferación celular mediante dos mecanismos complementarios. La señal puede causar la detención de las células en G0 (quiescencia), donde permanecen hasta que señales externas activan nuevamente la proliferación. Alternativamente, las células pueden entrar en un agrupamiento post-mitótico diferenciado y perder el potencial replicativo (Kumar y col., 2008).

Entre los múltiples genes supresores de tumores descritos, uno de los más estudiados es *Rb* que codifica la proteína del retinoblastoma (pRb). Según Weinberg en 1995, a nivel molecular, la mayoría de las señales anti-proliferativas son interceptadas por esta proteína (Contreras, 2007) y su importancia radica en su función de ejecución en la fase G1 (entre la mitosis “fase M” y la replicación del ADN “fase S”), donde se determina si la célula debe entrar en el ciclo celular, salir del ciclo y diferenciarse, o bien si ha de morir. Al comienzo de la fase G1 la proteína Rb se encuentra hipofosforilada, luego se une e inhibe a la familia de factores de transcripción E2F, impidiendo la transcripción de la ciclina E (necesaria para la iniciación de la replicación del ADN) (Kumar y col., 2008). pRb es modificado por varias Cdk implicadas en el desarrollo del cáncer (Ewen, 1994), estas proteínas Cdk son activadas por factores de crecimiento y son capaces de fosforilar a Rb y

de esta manera, anular su efecto inhibitorio sobre la progresión del ciclo en G1/S (Luque y Herráez).

Otro gen supresor de tumores es el *p53*, el cual sigue siendo el gen más comúnmente mutado en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos (Cory, 1995; Meyn y col., 1996; Gasco y col., 2002). El gen *p53* codifica la proteína p53, cuya función principal es actuar como una proteína activadora de la transcripción, uniéndose a secuencias específicas de ADN (Fields y Jang, 1990; Raycroft y col., 1990; Funk y col., 1992; el Deiry y col., 1992). La proteína p53 detecta daños en el ADN y ayuda a repararlos mediante una parada en la fase G1 del ciclo celular e induciendo genes encargados de la reparación del ADN. Una célula que tenga el ADN dañado y no pueda repararlo, es dirigida por p53 a entrar en senescencia (parada permanente del ciclo celular) o sufrir apoptosis (Kumar y col., 2008). Los defectos homocigóticos en p53 conducen, por tanto, a una falta de control en el punto G1/S y una reducción de la entrada de apoptosis, resultando una proliferación celular descontrolada que ocasiona tumores. En individuos heterocigóticos se genera el síndrome de Li-Fraumeni, caracterizado por una predisposición al desarrollo de tumores. De igual manera a lo que ocurre sobre Rb, diversas proteínas víricas generan tumores a través del bloqueo de p53, por ejemplo el antígeno T de SV40, la proteína E6 de papilomavirus y la proteína E1B de adenovirus (Luque y Herráez, 2006; Kumar y col., 2008).

#### 1.2.2.3. Evasión de apoptosis

La acumulación de células neoplásicas puede deberse no sólo a la activación de oncogenes promotores del crecimiento o a la inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral, sino también a mutaciones en los genes que regulan la apoptosis. La apoptosis o “muerte celular programada” es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de

manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y la regulación del sistema inmunitario (Onishi y Kizaki, 1994). Determinados procesos celulares pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y progresión de tumores (Arango y col., 1997). La apoptosis puede desencadenarse por diferentes señales, las cuales pueden ser fisiológicas o por estimulaciones exógenas ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascadas de proteínas citoplasmáticas; ello trae como resultado la activación de un programa genético que conduce generalmente a la nucleólisis por acción de las endonucleasas (Silvestri y col., 1995).

Desde el punto de vista celular y molecular, los cambios en la apoptosis parecen transcurrir en tres etapas: la primera es la inducción que corresponde a la reacción ante un estímulo o señal adecuada (señal positiva), las señales negativas son aquellas que bloquean la apoptosis (Luque y Herráez, 2006). La inducción positiva resulta de la unión de un ligando y su receptor como por ejemplo Fas/FasL y TNF/TNFR (Cascino y col., 1994; Ashkenazi y Dixit, 1999; Corado y Mora, 2003). Otros estímulos de muerte provienen de moléculas agonistas de receptores citoplasmáticos como por ejemplo los glucocorticoides, además de ciertas citocinas coestimuladoras (Corado y Mora, 2003).

El segundo paso es la ejecución o fase efectora que comprende diversas alteraciones: cambios morfológicos y de la membrana con disminución de la adhesión a otras células y a la matriz extracelular, contracción del citoplasma, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, disminución del volumen nuclear y posterior desintegración, rotura de mitocondrias y liberación de su contenido al citoplasma, aparición de protuberancias en la membrana celular (zeiosis), entre otras. En esta fase se activa una cascada de proteasas y nucleasas; dentro las proteasas se

encuentran las caspasas que actúan degradando proteínas sustrato y activando otras caspasas (Luque y Herráez, 2006). Una de las principales señales inductoras es la liberación del contenido mitocondrial al citoplasma como por ejemplo el citocromo c (perteneciente a la cadena respiratoria), la proteína Apaf (factor activador de las proteasas apoptóticas) y la proteína Bax que posee actividad pro-apoptótica (Pérez y col., 2007) y está inactiva en cánceres (Corado y Mora, 2003; Luque y Herráez, 2006). El control negativo de la apoptosis, por inactivación de las caspasas, viene determinada por proteínas Bcl-2 y Bcl-x, las cuales bloquean la apoptosis (actividad anti-apoptótica) (Pérez y col., 2007) y se encuentran sobreexpresadas en algunos cánceres (Reap y col., 1995; Munn y col., 1995; Luque y Herráez, 2006).

La proteína nuclear p53, además de regular la transcripción de ciertos genes relacionados con la progresión del ciclo celular, es capaz de inducir apoptosis en condiciones normales. Se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína p53 o inducción de la misma por agentes que dañan el ADN, incrementa la expresión del gen *Bax* y disminuye la expresión del gen *Bcl-2* (Miyashita y col., 1994; Zhan y col., 1994).

En la fase final de la apoptosis o fase de degradación, las protuberancias externas de las células que se forman en la etapa de ejecución, se separan mediante fragmentación celular originando los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales quedan rodeados de la membrana celular, y son reconocidos y fagocitados por otras células, tanto vecinales o del propio tejido, como especializadas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) sin producir una reacción inflamatoria (Corado y Mora, 2003; Luque y Herráez, 2006).

#### 1.2.2.4. Potencial replicativo ilimitado

Una de las características principales de los cánceres avanzados es la potencialidad de las células anormales de replicarse ilimitadamente, y este proceso está estrechamente relacionado con la reactivación de la telomerasa (Shay y Keith, 2008), esta enzima es una transcriptasa reversa que añade nuevas secuencias de ADN en los telómeros que están localizados en los extremos de los cromosomas (Collins y Mitchell, 2002). Los telómeros consisten de muchas repeticiones de una secuencia de seis pares de bases (TTAGGG), asociadas a un complejo de proteínas llamadas “caperuzas”, que protegen a las secuencias teloméricas (de Lange, 2005). Estas secuencias son acortadas en cada división de las células normales (Harley, 1991; Wright y Shay, 2000). La telomerasa es detectada en aproximadamente el 90% de los tumores malignos (Kim y col., 1994; Shay y Bacchetti, 1997). Cuando algunos telómeros son acortados excesivamente, se detecta el crecimiento descontrolado de las células, lo que dispara una señal indicando que el ADN está dañado, llevándola a un estado de senescencia celular (Shay, 2003). Sin embargo, las células tumorales son capaces de evitar estas vías de señalización y la senescencia celular.

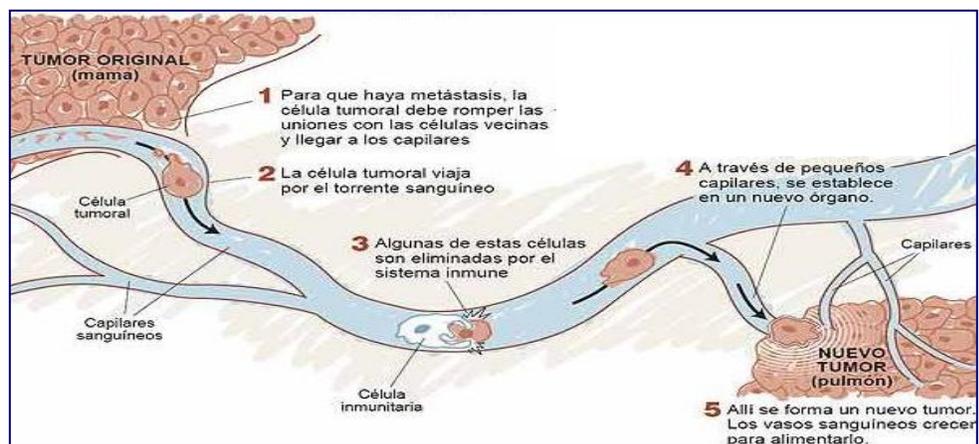
#### 1.2.2.5. Desarrollo de angiogénesis sostenida

Ésta es una característica que presentan los tumores y es necesario para su continuo crecimiento (Folkman, 2003; Zee y col., 2010). La vascularización o angiogénesis consiste en la capacidad que tiene un tejido para formar una red vascular propia mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Luque y Herráez, 2006). Este proceso permite, tanto en tejidos normales como en tumores, el suministro de oxígeno y nutrientes necesarios para su crecimiento (Kumar y col., 2008). Las células tumorales producen agentes angiogénicos que actúan sobre células endoteliales vecinas lo que genera la angiogénesis. Los factores pro-

angiogénicos y anti-angiogénicos están regulados por muchos genes que mutan frecuentemente en el cáncer. Por ejemplo, en las células normales el gen *p53* puede estimular la expresión de moléculas anti-angiogénicas (trombospondina 1) y reprimir la expresión de moléculas pro-angiogénicas (VEFG: factor de crecimiento endotelial vascular). En la transcripción de VEFG intervienen también señales procedentes de la vía de la quinasa RAS-MAP (Kumar y col., 2008). La inhibición de la angiogénesis es considerada como una posible vía para el tratamiento del cáncer (Paris y col., 2010).

#### 1.2.2.6. Capacidad de invadir y generar metástasis

Oppenheimer (2006), considera que si todas las células permanecieran en el tumor primario, el cáncer tendría poca importancia clínica. La metástasis es la propagación de las células tumorales a áreas que no están directamente adyacentes al tumor primario. Tal propagación puede ocurrir por invasión de los vasos sanguíneos o vasos linfáticos, o debido a que las células cancerosas penetran la cavidad corporal o espacios alrededor de los órganos.



**Figura 2. Proceso de metástasis en cáncer** (Tomado y modificado de [http://www.newhopeblog.com/poster\\_metastasis.jpg](http://www.newhopeblog.com/poster_metastasis.jpg)).

El proceso metastásico generalmente se desarrolla en varias etapas, como se puede observar en la figura 2 (Wood, 1958; Wood y col., 1966; Willis, 1973; Oppenheimer, 2004; Gao y col., 2005; Mazzocca y col., 2005) que se consideran a continuación:

Pérdida de la cohesión intercelular. Una etapa necesaria para que ocurra el proceso de migración celular es la pérdida de cohesión entre células provenientes del tumor sólido primario (Arvelo y Poupon, 2001; Sánchez y col., 2005; Kumar y col., 2008). En la adhesión celular un grupo de proteínas de membrana permiten la interacción de una célula con otra o de una célula con la matriz extracelular, se puede decir que éste proceso es específico, ya que cada receptor o molécula tiene su ligando particular (Corado y Mora, 2003). Una molécula importante implicada en el proceso metastásico es la E-cadherina (del tejido epitelial) (Takeichi, 1988; Cavallaro y Christofori, 2001), la cual es una proteína transmembrana y en presencia de calcio se une a una estructura idéntica que se encuentra en la célula adyacente (Arvelo y Poupon, 2001). Se ha demostrado que la pérdida de la adhesión célula-célula mediante la E-cadherina está asociada al potencial metastásico en muchos tipos de cáncer (Birchmeier y Behrens, 1994; Skoudy y col., 1996; Anzai y col., 1996; Kuramochi y col., 1997; Richmond y col., 1997; Onder y col., 2008). Un grupo de investigadores demostraron que la reconstitución de la molécula de adhesión E-cadherina funcional, suprime el fenotipo invasivo de diferentes tipos de células tumorales (Vleminckx y col., 1991; Frixen y col., 1991).

Síntesis de enzimas proteolíticas. Las enzimas proteolíticas permiten la degradación de la membrana basal y del tejido intersticial (Arvelo y Cotte, 2006; Kumar y col., 2008), muchas de éstas son sintetizadas por las células tumorales, entre las cuales se encuentran las metaloproteasas (MMP), las catepsinas y las glicosilasas (Arvelo y Poupon, 2001; Kumar, 2008). Las metaloproteasas son proteasas que degradan la matriz extracelular y

además, desempeñan un papel importante en la promoción tumoral, proliferación celular, invasión tumoral, angiogénesis y apoptosis (Arvelo y Cotte, 2006; Reiss y col., 2006). Los inhibidores de proteasas regulan la actividad proteolítica, y pueden ser producidos por las células normales o por las células tumorales, siendo capaces de bloquear su actividad y de esta manera funcionar como proteínas supresoras de metástasis (Arvelo y Poupon, 2001; Hotary y col., 2003). Por ejemplo: los TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) son inhibidores de las metaloproteasas capaces de bloquear la capacidad invasiva de células tumorales y reducir su velocidad de crecimiento (Wike, 2000).

Migración y motilidad. En la metástasis se genera un incremento en la motilidad de las células tumorales (migración celular) (Mayoral y col., 2004). La migración celular está regulada por la expresión de moléculas de adhesión, deposición de proteínas de la matriz extracelular o de la membrana basal, y por moléculas solubles extracelulares; mediante la interacción con receptores específicos de la superficie celular. Se ha demostrado que ciertas quimiocinas, factores de crecimiento y citocinas inflamatorias estimulan la migración celular (Shida y col., 2004). Por ejemplo, el factor de motilidad autocrino es una citocina liberada por las células tumorales, capaz de regular la migración y el crecimiento celular (Silletti y col., 1998).

Células metastásicas circulantes. Esta etapa corresponde a la capacidad que tienen las células tumorales de producir factores que inducen la angiogénesis, proceso que fue explicado anteriormente. Según Arvelo y Poupon (2001), el fenómeno de latencia de ciertas metástasis, son explicadas por su incapacidad de promover la angiogénesis, además de que las células tumorales circulantes presentan una viabilidad y una capacidad de proliferación frecuentemente limitada. La sobrevivencia de estas células depende de la capacidad de resistir agresiones mecánicas como choques

debido a la presión sanguínea, elongación y fricción en los capilares sanguíneos. Weiss en 1985, demostró que sólo una fracción de células tumorales sobrevive a este tipo de condiciones y que estas células resistentes muestran un elevado potencial metastásico. Además, según Niers (2007), las células tumorales inducen la activación y agregación de plaquetas sobre su superficie, originando un complejo de plaqueta-fibrina-célula tumoral que permite prolongar la supervivencia de las células en las venas pulmonares.

Resistencia a Anoikis. Entre la matriz extracelular y el citoesqueleto celular existe una conexión que se da mediante un mecanismo conocido como adhesión focal, que es un elemento dinámico de unión. Estas adhesiones sirven como soporte para permitir la unión entre el filamento terminal de actina intracelular con la matriz extracelular, en estas uniones también participan otras proteínas estructurales. Las células normales del epitelio y endotelio, cuando pierden contacto con las proteínas de la matriz extracelular activan una forma de apoptosis denominada Anoikis (Arvelo y Poupon, 2001; Frisch y Screatton, 2001; Simpson y col., 2008). Liu y col. (2008) demostraron que la resistencia a Anoikis era mediada por la proteína tirosinquinasa FAK (focal adhesion kinase) la cual controla varias vías de señalización celular, incluyendo proliferación, propagación celular, migración y supervivencia (Schaller y col., 1992). Se piensa que la supervivencia de las células tumorales circulantes se debe a la resistencia a Anoikis (Arvelo y Poupon, 2001).

Implantación en un tejido secundario. La selección del tejido secundario donde llegan las células metastásicas no es un proceso al azar (Gout y col., 2008). La adhesión de estas células en el tejido secundario se lleva a cabo cuando mecánicamente hay una disminución del flujo sanguíneo (especialmente dentro de los capilares), permitiendo entonces que las células tumorales tengan contacto directo con el sustrato (células

endoteliales y membrana basal subyacente), dicha interacción es mediada por la unión de estructuras moleculares a sus receptores específicos (Arvelo y Poupon, 2001).

Existen mediadores moleculares de extravasación que promueven la metástasis, como por ejemplo la proteína de anclaje al citoesqueleto (Ezrin), la cual une la membrana celular al citoesqueleto de actina, permitiendo así que la célula se acople al microambiente (DeVita y col., 2008).

Las metástasis son más frecuentes en algunos órganos blanco, que poseen ciertas condiciones necesarias, tales como la vascularización y la presencia de factores que regulan la adhesión y proliferación, constituyéndose de esta manera un ambiente propicio para la proliferación y desarrollo de las células emigrantes, llamado “ecosistema metastásico” (Arvelo y Poupon, 2001).

### **1.3. Inmunología del Cáncer**

#### **1.3.1. Relación entre la inflamación y el cáncer**

La inflamación es el término general que se da a la acumulación local de fluido, proteínas plasmáticas y glóbulos blancos que se genera debido a un daño físico, infección o a una respuesta inmune local. Es definido tradicionalmente por cuatro palabras: calor, dolor, rubor y tumor (hinchazón) (Murphy y col., 2008). Aunque la inflamación es un mecanismo de defensa para el organismo, una respuesta inflamatoria inadecuada puede conducir a varias enfermedades crónicas incluyendo el cáncer (Jackson y Evers, 2006; Schottenfeld y Dimmer, 2006).

La inflamación crónica ocurre cuando persisten estímulos inflamatorios, durante enfermedades autoinmunes o por la desregulación de

mecanismos anti-inflamatorios endógenos (Lawrence y col., 2002; Lawrence, 2007). El papel de la inflamación en carcinogénesis fue por primera vez propuesta por Rudolf Virchow en 1863, cuando notificó la presencia de leucocitos en tejidos neoplásicos (Balkwill y Mantovani, 2001; Schottenfeld y Dimmer, 2006; Kundu y Surh, 2008). Otros investigadores proponen también la relación existente entre la inflamación y el cáncer, indicando que los tumores pueden originarse en sitios de infección o inflamación crónica (Mueller y Fusenig, 2004), encontrándose dicha relación en aproximadamente 25% de todos los tipos de cáncer (Hussain y Harris, 2007). Por ejemplo: el desarrollo de carcinomas de estómago, hígado, vesícula biliar, próstata y páncreas ha sido atribuido a inflamación gástrica inducida por *Helicobacter pylori*, hepatitis crónica, colecistitis, atrofia inflamatoria de la próstata y pancreatitis crónica, respectivamente (Philpott y Ferguson, 2004; Schottenfeld y Dimmer, 2006; Matsuzaki y col., 2007; Kundu y Surh, 2008).

Entre las características histopatológicas de la inflamación crónica está la predominancia de macrófagos y linfocitos (células del sistema inmunitario), hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis. Los macrófagos y linfocitos activados son capaces de liberar mediadores pro-inflamatorios (citocinas y otros) que amplifican la respuesta inmunitaria. Las citocinas representan una familia de modificadores de la respuesta biológica, donde también se encuentran las interleucinas, quimiocinas, interferones, factores de crecimiento y factores que estimulan a los leucocitos. Estas citocinas pueden ser secretadas por los leucocitos, células del tejido conectivo y células endoteliales (Schottenfeld y Dimmer, 2006; Jackson y Evers, 2006).

La infiltración de leucocitos en tejidos neoplásicos pudiera ser visto como parte de una respuesta anti-tumoral. Sin embargo, hay pruebas convincentes de que el infiltrado de linfocitos y macrófagos activados que son reclutados de la circulación, es una fuente principal de citocinas pro-

inflamatorias tales como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factores de crecimiento y factores angiogénicos. La infiltración extendida de leucocitos en tumores sólidos es controlada en parte por la producción local de quimiocinas tanto por células neoplásicas como por células del estroma. Las señales provenientes de la interacción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento con receptores específicos de la superficie celular, actúan sobre ciertos genes blancos como el gen que codifica el Factor de Transcripción Nuclear kappa Beta (NF- $\kappa$ B) implicados en la proliferación celular e influyen en la supervivencia de las células tumorales, angiogénesis y migración hacia la matriz del estroma (Schottenfeld y Dimmer, 2006).

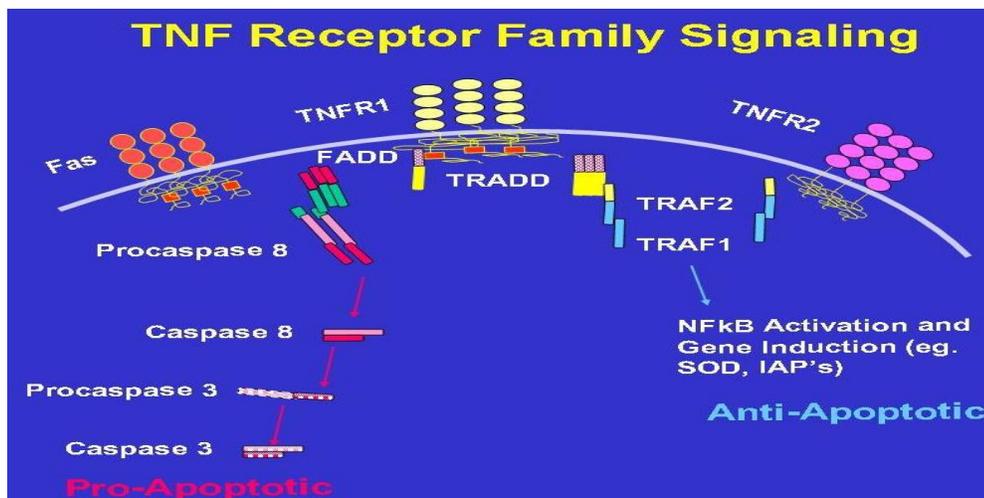
La inflamación crónica y la fagocitosis de productos metabólicos, frecuentemente están acompañadas de la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como el Óxido Nítrico (NO) que son potencialmente dañinas para el ADN, las lipoproteínas y las membranas celulares (Schottenfeld y Dimmer, 2006).

### **1.3.2. TNF- $\alpha$ , sus receptores y su relación con el cáncer**

TNF- $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria multifuncional secretada predominantemente por macrófagos activados, células NK y linfocitos T (Mocellin y col., 2005; Casas y Gómez, 2008), aunque también se ha demostrado que otros tipos de células secretan esta citocina, como por ejemplo los fibroblastos, astrocitos, células de Kupffer, queratinocitos, células del músculo liso y células tumorales (Mocellin y col., 2005). TNF tiene múltiples actividades biológicas tales como citotoxicidad, proliferación de hepatocitos y mediación de la respuesta inflamatoria (Mahmood y Shukla, 2010). TNF transduce sus señales a través de dos receptores distintos: TNF-R1 (también llamado TNFRp55/p60, expresado en todas las células) y TNF-R2 (también llamado TNFRp75/p80, expresado sólo en células del sistema

inmunitario y células endoteliales). Las señales son transmitidas a través del reclutamiento de varias proteínas diferentes de señalización, que juntas inician la cascada de señalización que conduce a la activación de proteínas efectoras por ejemplo las caspasas, y proteínas quinasas por ejemplo, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la quinasa del inhibidor kappa beta I $\kappa$ B (IKK), estas últimas están implicadas en la activación de factores de transcripción (Figura 3) (Mocellin y col., 2005).

Las propiedades de citotoxicidad y anti-proliferación fueron unas de las primeras actividades atribuidas al TNF (Mocellin y col., 2005). Las acciones anti-cáncer de TNF pudieran deberse al efecto directo sobre células tumorales y/o indirectos en células del estroma, y muchos de estos efectos son potenciados por INF- $\gamma$  (Interferón  $\gamma$ ) (Balkwill, 2002). Se cree que el daño vascular producido por el TNF es un mecanismo importante de su acción tumoricida (Balkwill, 2002; Mocellin y col., 2005). Sin embargo, se ha demostrado la relación existente entre la inflamación crónica y el incremento de la susceptibilidad a desarrollar cáncer. Balkwill y Mantovani (2001) creen que tal relación se debe a una producción crónica de TNF- $\alpha$  y otras citocinas inflamatorias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y también el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) en el microambiente tumoral. El TNF- $\alpha$  puede actuar como un factor de crecimiento tumoral autocrino y también promover la supervivencia celular a través de la activación de NF- $\kappa$ B y de las vías de proliferación/supervivencia/anti-apoptosis dependiente de MAPK (Figura 3). Debido a sus funciones pleiotrópicas, el TNF puede favorecer la progresión tumoral mediante la expresión de metaloproteasas, la sobreexpresión de varias moléculas tales como VEGF, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2), NO, etc. las cuales promueven la angiogénesis (Mocellin y col., 2005).



**Figura 3. Receptores de TNF y sus vías de señalización.** La unión de TNF a su receptor TNFR1 asociado a dominios de muerte, es capaz de inducir apoptosis a través de una cascada de señalización que induce la activación de la caspasa 8 que está asociada a procesos apoptóticos. Por otro lado, la unión TNF/TNFR1 puede inducir procesos anti-apoptóticos mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Tomado y modificado de Wak y Yeh, 2002).

### 1.3.3. NO y su relación con el cáncer

El NO es una de las moléculas endógenas más pequeñas implicadas en funciones biológicas (Sonveaux y col., 2009). Es un radical libre, gaseoso e inorgánico cuya función predominante es de molécula mensajera y efectora (Lechner y col., 2005; Sonveaux y col., 2009). Es difusible en agua y a través de la membrana celular; su alta reactividad limita su tiempo de vida media en los fluidos biológicos, y actúa directa o indirectamente como un precursor de especies de nitrógeno reactivo estable (RNS) (Sonveaux y col., 2009). El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas como sintasas de óxido nítrico (NOS). Existen tres isoformas de NOS: NOS1 (neural o nNOS), NOS2 (epitelial o eNOS), ambas se expresan constitutivamente, y NOS3 (inducible o iNOS). La actividad de iNOS ha sido demostrada en una amplia gama de células y tejidos entre los cuales están los macrófagos,

condrocitos, células de Kupffer, hepatocitos, neutrófilos, epitelio pulmonar y en varias enfermedades neoplásicas (Lechner y col., 2005). Como su nombre lo indica, las células deben ser inducidas a expresar la enzima iNOS y para ello, los estímulos típicos implicados son mediadores pro-inflamatorios (citocinas), endotoxinas y/o lipopolisacáridos (LPS). Una vez expresada dicha enzima, las células generan grandes cantidades de NO (Nussler y Billiar, 1993).

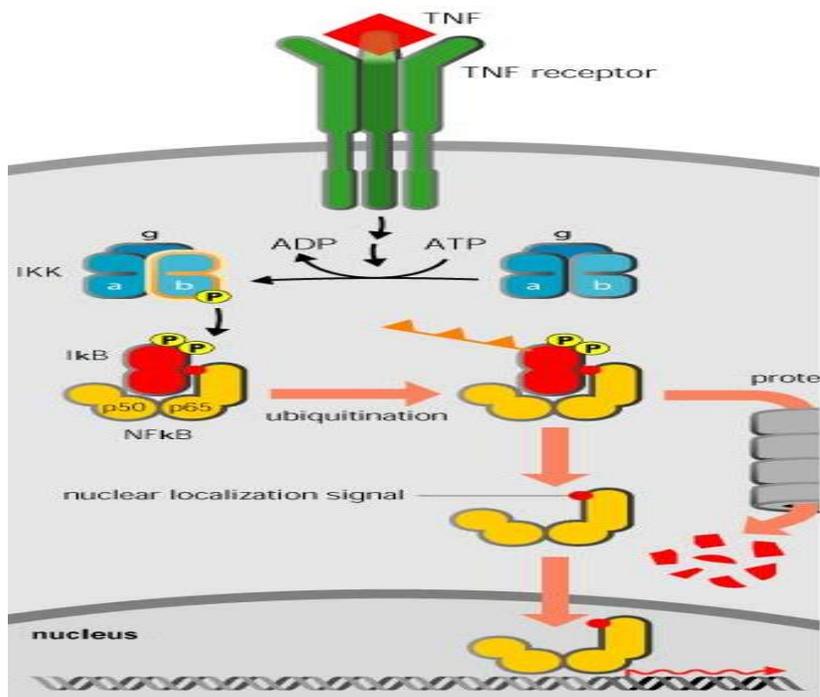
Para sintetizar NO es necesario el sustrato L-arginina, el cual es hidrolizado por el  $O_2$  y el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) a la forma N-w-hidroxi-L-arginina. Subsecuentemente, éste es oxidado al producto L-citrulina, hidrógeno y NO (Lechner y col., 2005). Aunque la iNOS es inducida y expresada en macrófagos durante mecanismos de defensa del organismo, se ha observado un alto nivel de expresión y/o actividad de la iNOS en una variedad de cánceres humanos (Hofseth, 2008).

Niveles crónicamente elevados de NO y RNS conducen a varios procesos químicos; incluyendo la nitración, nitrosilación, nitrosación y la oxidación. La modificación química de proteínas relacionadas con el cáncer, puede generar carcinogénesis por causa de la disfunción de dichas proteínas. También puede ocurrir la desaminación de bases del ADN y la ruptura de las cadenas dobles y sencillas del ADN, lo cual puede incrementar el riesgo de mutación somática en los genes implicados en el cáncer (Hofseth, 2008). Por otra parte, el factor de hipoxia inducible (HIF-1) controla la expresión de una variedad de proteínas que median la supervivencia celular y/o ayuda a restaurar la oxigenación a los tejidos. Entre esas proteínas se encuentran VEGF y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF/FGF2), las cuales son las principales proteínas promotoras de la angiogénesis. El NO actúa como un regulador de la activación de HIF-1 y como un efector de VEGF, lo que lleva a este radical a ocupar una posición central en el proceso de angiogénesis y por tanto, en la

progresión tumoral (Sonveaux y col., 2009). Por esta razón, se podría sugerir que agentes anti-inflamatorios que sean capaces de disminuir la producción de NO tengan un posible efecto anti-tumoral.

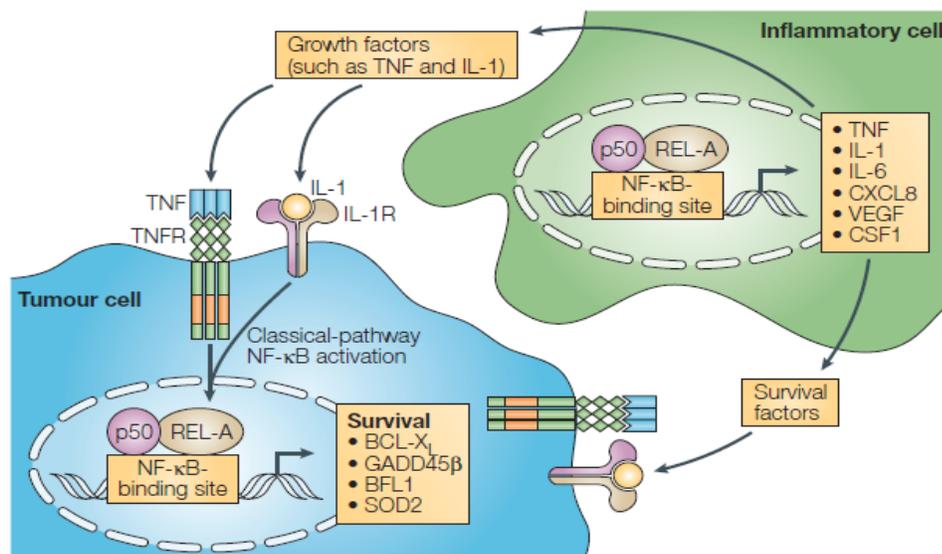
#### **1.3.4. NF- $\kappa$ B y su relación con el cáncer**

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción responsable de regular la expresión de muchos genes implicados en la respuesta inflamatoria, adhesión celular, proliferación, angiogénesis y apoptosis (Barnes y Karin, 1997; Sun y Zhang, 2007). Las proteínas de NF- $\kappa$ B son reguladas por el inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Radhakrishnan y Kamalakaran, 2006). El desbalance entre NF- $\kappa$ B y su inhibidor kappa beta (I $\kappa$ B), ha sido asociado al desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo tumores (Radhakrishnan y Kamalakaran, 2006). NF- $\kappa$ B es activado por una variedad de estímulos, incluyendo citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) (Figura 4), por infección con bacterias y virus, por varios carcinógenos y promotores de tumores, radiación UV, y otros. Los genes regulados por NF- $\kappa$ B implicados en carcinogénesis incluyen *c-myc*, receptores de factores de crecimiento epidérmico, moléculas de adhesión intercelular (ICAM), moléculas de adhesión vascular (VCAM), E-selectina, iNOS, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares, ciclooxigenasas (COX), Bcl-2, Bcl-xL, y otros (Ohshima y col., 2005).



**Figura 4. Activación del factor de transcripción NF-κB mediante la vía clásica.** Esta vía de activación es mediada, entre otros, por la unión de citocinas proinflamatorias tales como TNF-α a sus receptores específicos. Tal estimulación activa el complejo quinasa IκB (IKK) el cual fosforila al inhibidor de NF-κB (IκB) que se encuentra unido al factor de transcripción (inicialmente en el citosol). Esta fosforilación marca al IκB mediante ubiquitinación para ser degradado en el proteosoma, y de esta manera el dímero de NF-κB es liberado y translocado al núcleo, se une a la secuencia de reconocimiento de la región promotora e induce la transcripción de genes implicados en la progresión y promoción tumoral y en inhibición de la apoptosis celular (Tomado y modificado de Karin y Greten, 2005).

Debido a la variedad de genes blanco que son regulados por el factor de transcripción NF-κB a través de la vía clásica, se ha propuesto que éste podría relacionar los procesos inflamatorios crónicos con la iniciación y progresión tumoral (Figura 5) (Karin y Greten, 2005). Dichas observaciones sugieren que agentes anti-inflamatorios que supriman a NF-κB o regulen sus productos, pueden tener un efecto potencial en la prevención y tratamiento del cáncer.



**Figura 5. Activación de NF-κB en diferentes tipos de células.** La activación del factor de transcripción NF-κB en diferentes tipos de células puede incrementar la progresión y crecimiento tumoral a través de la activación de diferentes genes blanco. La activación de NF-κB en células tumorales a través de la estimulación de mediadores proinflamatorios tales como TNF-α e interleucina 1 (IL-1), lleva a la regulación de la expresión de genes anti-apoptóticos, lo cual le permite a las células tumorales sobrevivir y proliferar. En células inflamatorias, la activación de NF-κB promueve el desarrollo tumoral ya que induce la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y sobrevivencia que estimulan a las células tumorales (Tomado de Karin y Greten, 2005).

#### 1.4. Extractos de Plantas en la Terapia del Cáncer

La investigación sobre las plantas medicinales, hoy día, es un campo interdisciplinario que comprende diversas áreas como la botánica, bioquímica, medicina, toxicología, nutrición, ecología, farmacología, biología celular y molecular, entre otros. La etnofarmacología es una ciencia que abarca el estudio de las especies de plantas a las cuales se les ha encontrado alguna actividad terapéutica por las poblaciones indígenas y pudieran convertirse en potenciales medicamentos. Esta disciplina se enfoca en el estudio de las medicinas indígenas que establece una relación entre la

etnografía de la salud y curación con la composición de medicinas y su fisiología (Arvelo y col., 2008).

Las plantas medicinales y los componentes derivados de ellas son una buena fuente de nuevos inhibidores específicos de procesos inflamatorios que podrían tener algún efecto terapéutico en el cáncer. Entre los compuestos químicos sintetizados por las plantas están los metabolitos secundarios (terpenoides, alcaloides, flavonoides, y otros) que cumplen funciones no esenciales en ellas. Es importante mencionar que dependiendo de la radiación solar, composición del suelo, altitud, temperatura, humedad, etc., la misma especie de una planta puede secretar metabolitos secundarios diferentes. Estos compuestos pueden cumplir una función semioquímica, ya que constituyen un mecanismo de interacción con el resto de seres vivos de su entorno que se manifiesta en formas diversas, lo cual constituye un factor más de heterogeneidad (Llorens y col., 2008).

Se ha demostrado que componentes fenólicos derivados de plantas actúan como anti-oxidantes y como inhibidores de la NOS, COX y lipoxigenasa. Además, las lactonas sequiterpénicas provenientes de plantas han sido estudiadas como inhibidores de la actividad de NF- $\kappa$ B (Rios y col., 2009). El potencial terapéutico de las drogas anti-cáncer también pudiera deberse a la capacidad de inducir apoptosis en las células tumorales, al comportarse como agentes anti-angiogénicos, agentes inmunomoduladores o inhibidores de proteasas (Contreras, 2007).

Venezuela es un país que posee una gran diversidad en flora, encontrándose 20000 especies de plantas ya descritas, de las cuales aproximadamente 1500 han sido usadas (con propósitos medicinales) por indígenas y comunidades locales (Taylor y col., 2006).

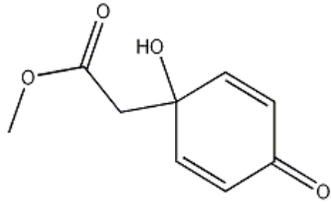
En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico y anti-inflamatorio de la planta *Jacaranda copaia*.

**Jacaranda.** Es miembro de la familia dicotiledónea Bignoniaceae (posee entre 700-800 especies agrupadas en 100-125 géneros), es especialmente común en los trópicos de América del Sur y se encuentra en hábitats donde predominan árboles, arbustos, lianas y, raramente, plantas herbáceas. El género *Jacaranda* contiene 49 especies alrededor del mundo que son nativas de América Central y del Sur, y también del Caribe (Gachet y Schühly, 2009).

***Jacaranda copaia.*** Es comúnmente conocida en Venezuela como copaya. En América Central es conocida como tambor, gualancho, zorra, gallinazo, copaia y parapara; en Colombia como chingalé, izcuandé, escobillo y pavito; en Perú como solimán de monte, palo de buba, Huamán y samará; y en Ecuador conocida como gualundaño. Su descripción botánica es: árbol grande de aproximadamente 35 m de altura y 80 cm de diámetro, copa cónica con ramas verticiladas horizontales, la corteza es de color parduzco o parduzco amarillento, sus hojas son compuestas y de color verde oscuro con la lámina foliar de forma elíptica, las inflorescencia se desarrollan en racimos terminales grandes con flores de color púrpura; y sus frutos son cápsulas elípticas que se abren en dos valvas planas con numerosas semillas aladas (Salazar y col., 2000).

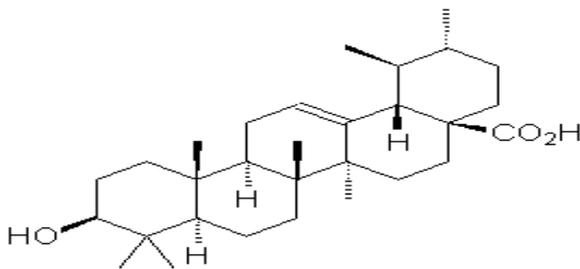
Entre los constituyentes químicos reconocidos en *J. copaia* están los terpenos, flavonoides, taninos y azúcares (Gachet y Schühly, 2009). Sauvain y colaboradores (1993) aislaron un tipo de quinona denominada Jacaranona de las hojas de *J. copaia* durante un estudio de su actividad anti-leishmaniasis. Además, aislaron un tipo de triterpeno denominado ácido ursólico (Gachet y Schühly, 2009).

A) Jacaranona aislada de hojas de *J. copaia*



2,5-Cyclohexadiene-1-acetic acid, 1-hydroxy-4-oxo-, methyl ester

B) Ácido ursólico aislado de hojas de *J. copaia*



C) *Jacaranda copaia*



**Figura 6. *Jacaranda copaia*.** Los principales constituyentes químicos aislados de hojas: A) Jacaranona y B) Ácido ursólico (Tomado de Gachet y Schühly, 2009). C) Árbol de *Jacaranda copaia* con sus flores de color púrpura, sus frutos son cápsulas elípticas que se abren en dos valvas planas con numerosas semillas aladas (Tomado de <http://www.panoramio.com/photo/5096042>).

## 2. ANTECEDENTES

En estudios realizados con *J. copaia* en las regiones amazónicas, se pudieron describir dos usos diferentes para la planta, uno de ellos es externo y consiste en la aplicación de savia de la corteza y hojas para el tratamiento de infecciones de la piel. En Colombia, los indios Andoke preparan una decocción de las hojas y las aplican para curar y cicatrizar heridas, también se ha reportado que los indios Wao y Shuar del Ecuador, aplican este tratamiento. En cuanto al uso interno, los indígenas colombianos preparan una decocción caliente utilizando la corteza rallada, esta decocción es utilizada para fuertes resfriados o neumonía (Fox, 1998). Los indios Vaupés River utilizan la savia de la corteza para tratar infecciones de la piel (Gachet y Schühly, 2009).

En la región amazónica de Brasil, los curanderos tradicionales utilizan los tubérculos de *J. copaia* para tratar alteraciones gastrointestinales (Rodríguez, 2006). Además, preparan una infusión fría con las raíces utilizando bajas dosis tratan la diarrea, pero a altas concentraciones induce vómitos (Gachet y Schühly, 2009). En Sur América, la corteza de *J. copaia* ha sido usada para el tratamiento de Leishmaniasis, principalmente en las poblaciones que habitan la meseta de la Guayana. Otros indios como los Waimiri Atroari (Brasil), sólo utilizan la madera de esta planta para realizar construcciones y combustible. En el norte de Brasil, los indios Tiriyo usan la infusión de las hojas para curar la debilidad general y fiebre (Gachet y Schühly, 2009).

Los indios Chácobo de Bolivia, preparan una decocción con las hojas de *J. copaia* para tratar reumatismo. Los indios Wayãpi de la Guayana Francesa las hojas quemadas para repeler mosquitos (Gachet y Schühly, 2009). Según la Organización de los Estados Americanos (1987), la corteza de árboles jóvenes de esta planta es usada para tratar la sífilis (en la

Guayana Francesa y en Perú) y sus flores han resultado útiles en casos de disentería.

Roth y Lindorf (2002) reportaron que en Venezuela, *J. copaia* es usada como cicatrizante, para prevenir infecciones y usada contra el cáncer. Los estudios realizados por Villasmil y colaboradores en el 2006 y en el 2008, y por Taylor y colaboradores en el 2006, muestran la actividad citotóxica de los extractos etanólicos provenientes de las hojas jóvenes de *J. copaia* en varias células cancerígenas (páncreas, colon y mama), tal actividad anti-tumoral pudiera ser debida al compuesto Jacaranona. También se ha encontrado que el extracto de hojas de *J. copaia* posee actividad anti-inflamatoria (Villasmil y col., 2006; Villasmil y col., 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad anti-inflamatoria y el efecto citotóxico de las fracciones derivadas de hojas de *Jacaranda copaia*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotóxico o citostático del extracto crudo y fracciones provenientes de hojas de *J. copaia* en células tumorales y no tumorales *in vitro*.
- Estudiar el efecto del extracto crudo y fracciones sobre la producción de la citocina TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de cultivos de macrófagos mediante el ensayo de ELISA.
- Estudiar el efecto del extracto crudo y fracciones sobre la producción de NO en sobrenadantes de cultivos de macrófagos mediante la reacción de Griess.
- Evaluar el efecto del extracto crudo y fracciones sobre NF- $\kappa$ B en células HeLa transfectadas con el gen reportero de la activación de NF- $\kappa$ B.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Líneas celulares**

- Línea 4T1 (células tumorales de mama, aisladas de tumor primario originado en ratones BALB/c).
- Línea HT-29 (células epiteliales de carcinoma de colon humano).
- Línea HeLa 57 (células de carcinoma de endocérvix humana, transfectadas con el gen reportero de la activación de NF-κB).
- RAW 264.7 (macrófagos de ratones BALB/c).

#### **4.1.2. Medios de cultivo**

- Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose; (Sigma Life Science, EE.UU) suplementado con 5% de SFB (Suero Fetal Bovino), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina; para el cultivo de las líneas celulares 4T1 y RAW 264.7.
- Medio DMEM suplementado más 0,45% de glucosa; para el cultivo de la línea celular HT-29.
- Medio DMEM suplementado más neomicina (1mg/mL); para el cultivo de la línea celular HeLa 57.

#### **4.1.3. Obtención del material vegetal**

El extracto crudo etanólico de *J. copaia* fue donado por el laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC. Este extracto se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). La solución madre de este extracto se preparó a una concentración final de 100 mg/mL.

#### **4.1.4. Fraccionamiento**

Las fracciones, sub-fracciones y compuestos del extracto crudo de *J. copaia* fueron obtenidas empleando la metodología descrita en la sección 4.2.1, y para evaluar su efecto citotóxico y anti-inflamatorio fueron disueltas en 100% DMSO y llevadas a una concentración final donde la concentración de DMSO no fue mayor a 1%.

Las concentraciones del extracto crudo, fracciones, subfracciones y compuestos fueron evaluadas a concentraciones de: 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Las diluciones fueron hechas en medio suplementado (específico de cada línea celular).

#### **4.1.5. Drogas controles**

- Paclitaxel (Taxol®) es un diterpeno que posee actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer (Vyas, 1995) ya que interfiere en el proceso de división celular al alterar el equilibrio normal entre los dímeros de tubulina y microtúbulos (Belotti y col., 1996). Taxol fue utilizado como control positivo en el ensayo de citotoxicidad mediante Sulforodamina B, y las concentraciones probadas fueron: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 ( $\mu\text{g/mL}$ ).
- Aminoguanidina o Pimagedine, es un inhibidor selectivo de la enzima iNOS (Wolff y col., 1997; Rodrigo y col., 2010), y fue utilizado en el

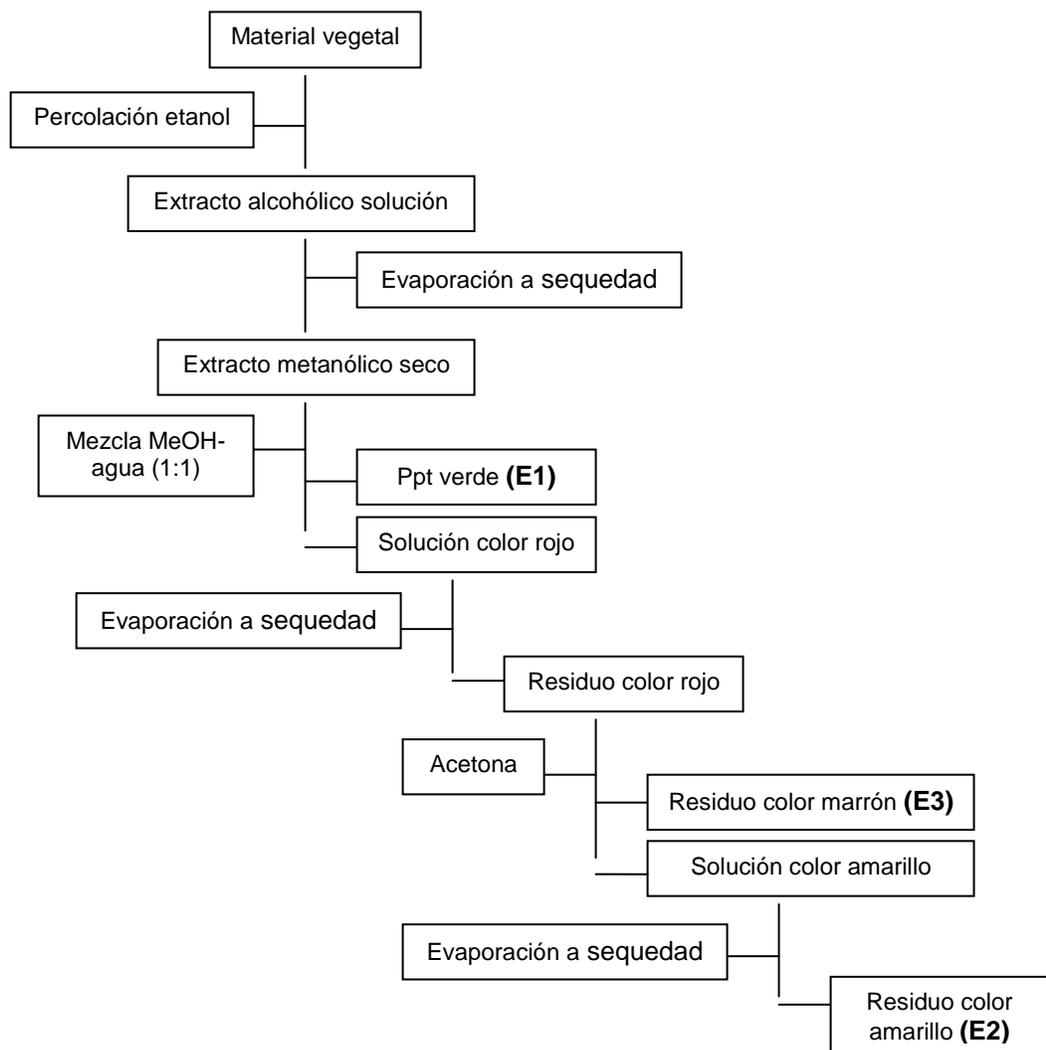
ensayo *in vitro* de cuantificación de NO como control positivo. La concentración usada en el ensayo fue de 50 µg/mL/pozo.

- Fosfato de Dexametasona (Decalona®) es un potente glucocorticoide sintético con acciones que se asemejan a las de las hormonas esteroides usada como anti-inflamatorio o agente inmunosupresor (Crinelli y col., 2000). Los glucocorticoides inhiben la síntesis de varias citocinas y quimiocinas que son particularmente importantes en enfermedades inflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-6 (Cosío y col., 2005). La dexametasona fue usada como control positivo en el ensayo de cuantificación de TNF, a una concentración final de 50 µg/mL/pozo.
- Parthenolide es una lactona sesquiterpénica que inhibe la activación de NF- $\kappa$ B al prevenir la inducción (mediada por TNF- $\alpha$ ) de la quinasa I $\kappa$ B (IKK) impidiendo así la degradación del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Hegner y col., 1999). Parthenolide fue usado como control positivo en el ensayo de determinación de la activación de NF- $\kappa$ B a una concentración final de 5 µg/mL/pozo.

## 4.2. Metodología

### 4.2.1. Fraccionamiento del extracto crudo de *J. copaia*

El extracto seco de las hojas de *J. copaia* fue obtenido por percolación con etanol durante una semana. El solvente fue evaporado a sequedad. Una vez obtenido el extracto metanólico seco, se realizó una partición del mismo en una mezcla metanol-agua (1:1), y se obtuvieron dos fracciones: un precipitado de color verde denominado fracción “E1” y una solución roja que fue evaporada a sequedad produciendo un residuo rojo, el cual fue disuelto con acetona y se obtuvieron dos nuevas fracciones: un residuo de color marrón denominado fracción “E3” y una solución de color amarillo que fue evaporada a sequedad produciendo un residuo amarillo denominado fracción “E2” (Figura 7). Sólo la fracción E2 mostró efecto citotóxico y actividad anti-inflamatoria *in vitro* (ver Resultados). Después, la fracción “E2” fue separada por cromatografía en columna de exclusión molecular (Sephadex LH20 como soporte y metanol como eluyente), se obtuvieron tres fracciones denominadas: I, II y III respectivamente. De las tres, sólo la fracción II mostró actividad anti-inflamatoria. Por último, la fracción II fue separada por cromatografía en columna en fase reversa (RP18) utilizando una mezcla de acetonitrilo-agua en proporción 1:1, obteniéndose dos compuestos denominados: A y B respectivamente, como se indica en la figura 7. Ambos compuestos se analizaron e identificaron por Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono (RMNH-1 y RMN C-13). Los espectros se registraron en un espectrómetro BRUKER modelo Avance 500, usando  $\text{dmsO}_{\text{d6}}$  como solvente deuterado, en el Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.



**Figura 7.** Obtención del material vegetal (Fracciones E1, E2 y E3 derivadas de hojas de *J. copaia*).

#### 4.2.2. Cultivo Celular

Las células fueron descongeladas y seguidamente cultivadas en frascos de cultivos de 75 cm<sup>2</sup> con 20 mL de medio suplementado específico para cada tipo de célula, mantenidas en estufa a una temperatura de 37°C y en una atmósfera húmeda de 5% de de CO<sub>2</sub>. El pH del medio se ajustó agregando solución HEPES (agente amortiguador) hasta obtener un pH fisiológico, el medio de cultivo fue cambiado cada tres días para descartar detritus celular, cambio de pH, etc. Las células fueron cultivadas hasta la formación de una monocapa celular, es decir, 70-80% de confluencia celular.

Posteriormente las células fueron despegadas del frasco de cultivo mediante un método enzimático. Se descartó el medio de cultivo, se realizó un lavado con buffer fosfato (PBS 1X) y se añadió aproximadamente 3 mL de solución tripsina/EDTA/PBS que se dejó actuar por 4 min en estufa a 37°C. Las células colectadas se colocaron en un tubo Falcon con PBS, y se centrifugaron a 1000g durante 10 min, luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en un volumen de medio suplementado específico. Seguidamente se tomó una pequeña alícuota y se realizó una dilución 1:2 con el colorante azul de tripano, se contaron las células en una cámara de Neubauer, se calculó el promedio de células, para ello se multiplica por 10<sup>4</sup> (factor de la cámara) y por 2 (factor de dilución). El resultado se expresa en células/mL. La suspensión celular se ajustó al protocolo experimental deseado (tomando en cuenta el número de pozos a sembrar) con medio suplementado. Las células se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano (100 µL/pozo) y se incubaron en la estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humedad) hasta la formación de monocapa.

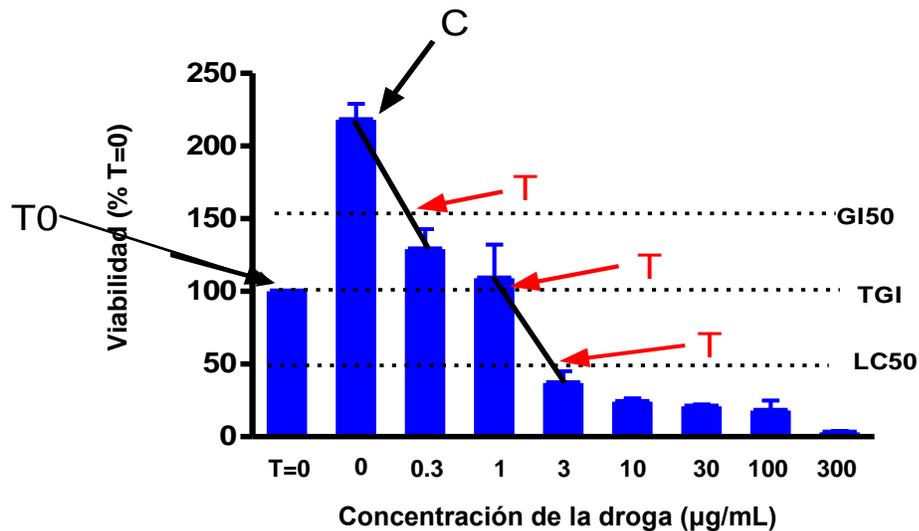
### 4.2.3. Ensayo de citotoxicidad mediante la técnica de Sulforodamina B

Este ensayo es usado para la determinación de la densidad celular, basado en la medición del contenido de proteínas celulares. La Sulforodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano, rosado brillante que posee dos grupos sulfónicos ( $=\text{SO}_3^-$ ) cargados negativamente que tienen la capacidad de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas, la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, proporcionando un índice del contenido de proteína de las células que han sido previamente fijadas en la placa, se elimina el colorante no fijado con ácido acético. El colorante unido a las proteínas celulares se extrae y se solubiliza en medio alcalino, y finalmente se lee la densidad óptica (DO) a 515 nm. La DO es directamente proporcional a la densidad celular (Vichai y Kirtikara, 2006).

Protocolo: Para cada ensayo se utilizaron dos placas: una denominada T=0h y otra denominada T=48h. En la primera, se sembraron las células (5000 células/pozo) únicamente con medio de cultivo, estos pozos corresponden al “control T=0”, y a los pozos correspondientes al “blanco” sólo se añadió medio de cultivo. En la segunda placa, se sembraron las células (5000 células/pozo) únicamente con medio de cultivo, estos pozos corresponden al “control T=48”; a los pozos correspondientes al “tratamiento” se aplicaron las diferentes concentraciones del extracto crudo, fracciones, sub-fracciones y compuestos de *J. copaia*. Además, se realizó un control positivo utilizando Paclitaxel que es un agente con actividad anti-tumoral, y también un control con DMSO, el solvente utilizado en la preparación de los extractos.

Las células de la placa T=0h se fijaron agregando al medio de cultivo 25  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 1% durante una 1 h a 4°C, seguido de 5 lavados con agua. A las células de la placa T=48 se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones del extracto crudo, fracciones, sub-fracciones y compuestos (por triplicado). Después de 48 h, se fijaron las células con ácido tricloroacético. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de Sulforodamina B (Sigma EE.UU) a cada pozo de las placas fijadas y secas, se incubaron por 20 min a 25°C (protegidas de la luz), se descartó el colorante, se realizaron 5 lavados con ácido acético 1%, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de trizma base 10 mM (Sigma, EE.UU), se agitaron las placas y se leyó la DO a 515 nm en un lector de ELISA.

Los resultados fueron reportados según el grado de inhibición de crecimiento o letalidad celular (ver figura 8), empleando un formato de Excel.



**Figura 8. Citotoxicidad y/o citostasis celular mediante el ensayo se Sulforodamina B (SRB).** T=0 es la DO al momento de añadir el tratamiento, C es la lectura del control (células + medio de cultivo) luego de 48 horas, GI50 es la concentración de la droga que inhibe el crecimiento de las células en un 50%, TGI es la concentración de la droga que inhibe el crecimiento celular en un 100% y LC50 es la concentración de la droga que induce 50% de citotoxicidad.

#### 4.2.4. Cuantificación de NO y TNF- $\alpha$ en macrófagos RAW 264.7

Los sobrenadantes de cultivo de macrófagos RAW fueron recolectados con la finalidad de cuantificar dos importantes mediadores de inflamación como lo son el NO y el TNF- $\alpha$ .

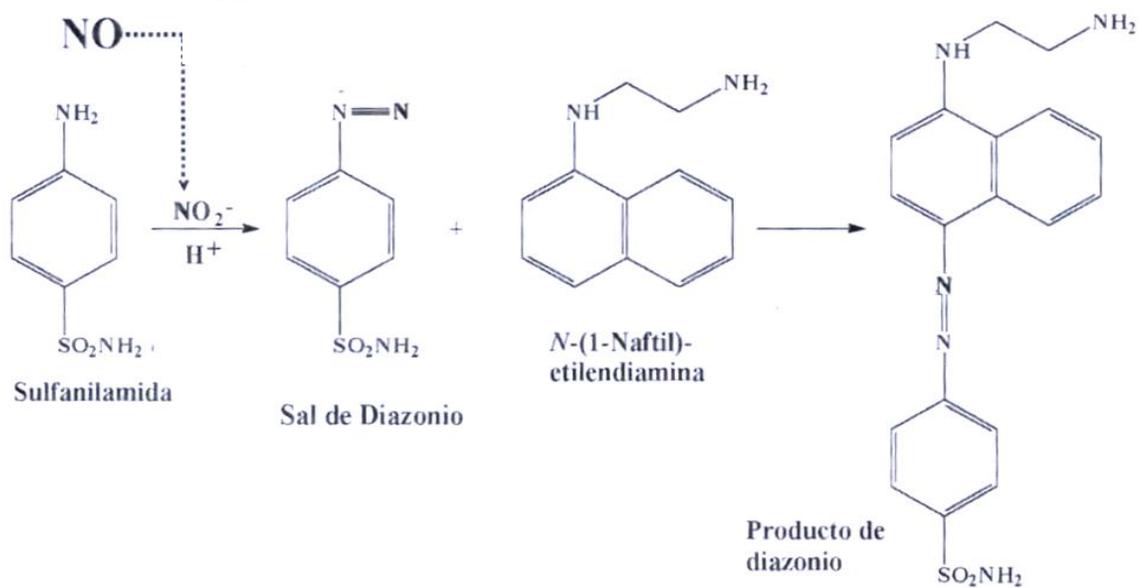
Protocolo: Se cultivaron las células RAW en placas de 96 pozos a una densidad celular de 50000 cél/pozo. Una vez formada la monocapa celular, se colocó el tratamiento (50  $\mu$ L/pozo del extracto crudo, fracciones, subfracciones y compuestos a las diferentes concentraciones). Los pozos correspondientes al control positivo fueron tratados con aminoguanidina (Sigma, EE.UU) en el ensayo de NO a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL y dexametasona (Biotech Laboratorios, EE.UU) en el ensayo de TNF- $\alpha$ . a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL. Las células fueron incubadas a 37°C durante 2 h y luego estimuladas con LPS (Lipopolisacárido de *E.coli*. Sigma, EE.UU) a una concentración final de 4  $\mu$ g/mL en el ensayo de TNF- $\alpha$  y con INF- $\gamma$  (Interferón-gamma. BD Biosciences Pharmingen, EE.UU) a una concentración final de 0,01  $\mu$ g/mL) en el ensayo de NO. Después de 24 h, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### 4.2.5. Ensayo *in vitro* para la cuantificación de NO

Debido a que el NO es una molécula muy inestable y su vida media en la matriz biológica es muy corta, su cuantificación directa es difícil. Sin embargo, el NO es rápidamente oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y/o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por el oxígeno; las concentraciones de estos aniones han sido usadas para cuantificar la producción de NO (Sun y col., 2003).

El ensayo para la cuantificación de NO se basa en la determinación de nitritos en los sobrenadantes de las células RAW mediante la Reacción de Griess. Esta reacción consiste en tratar el nitrito con un reactivo de diazotación en medio ácido, para formar una sal de diazonio transitoria. Luego este intermediario reacciona con un agente de acoplamiento para formar un compuesto azo estable de color fucsia o rosado intenso que absorbe luz visible a una longitud de onda de 562 nm (Sun y col., 2003). La reacción general está esquematizada en la figura 9.

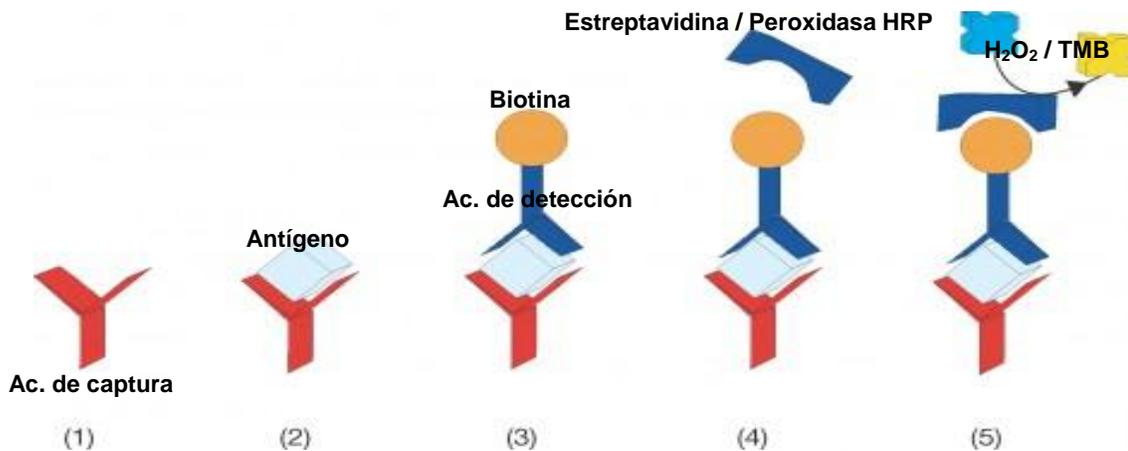
Protocolo: Se añadieron 40  $\mu\text{L}$ /pozo de sulfanilamida (Sigma, EE.UU) 1% en ácido fosfórico 2.5% al sobrenadante. Las placas fueron incubadas a 4°C por 20 min (protegiendo de la luz), luego se añadieron 40  $\mu\text{L}$ /pozo de diclorhidrato de naftilendiamina (NED) (Sigma, EE.UU) 0.1%, las placas fueron incubadas de nuevo a 4°C por 20 min (protegiendo de la luz). Finalmente, se midió la DO a 562 nm en un lector de ELISA. Conjuntamente se realizó una curva estándar de nitrito de sodio (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100)  $\mu\text{M}$  diluido en medio de cultivo.



**Figura 9. Reacción de Griess** (Tomado de Tenorio y col., 2005).

#### 4.2.6. Ensayo de ELISA “sándwich” para la cuantificación de TNF- $\alpha$

Para cuantificar la citocina TNF- $\alpha$  se realizó un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) que consiste en una reacción inmunológica anticuerpo-antígeno que tiene lugar en una fase sólida (Clark y col., 1985). El ensayo ELISA utilizado fue de tipo sándwich y se describe en el siguiente esquema:



**Figura 10. ELISA sándwich.** En una fase sólida se fija el anticuerpo de captura (específico del antígeno a detectar). Luego se añade la muestra problema que contiene el antígeno. Seguidamente se agrega el anticuerpo de detección, luego se añade el conjugado enzimático capaz de degradar un sustrato particular (Tomado de <http://www.bendermedsystems.com/>).

Protocolo: Se sensibilizaron las placas o tiras de ELISA (Inmulon 4) agregando el anticuerpo de captura (anti-mouse TNF- $\alpha$ , R&D Systems, Europa) a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml en PBS pH 6.5, las placas fueron incubadas 24 h a 4°C. Se lavaron las placas una vez con PBS, se añadió la solución de bloqueo (PBS, 2% albúmina sérica bovina (BSA), 2% glucosa y 0.02% NaN<sub>3</sub>), las placas fueron incubadas por 1 h a 25°C, o durante 24 h a 4°C. Luego de tener las placas sensibilizadas y bloqueadas, se añadieron los sobrenadantes diluidos (1/5) en buffer diluyente (pH 7.4)

que está constituido por tris-salina, 0.1% BSA, 0.05% tween 20. Las placas fueron incubadas durante 1 ½ h a 25°C. Luego se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (PBS-tween 20, pH 7.4). Se agregó el anticuerpo de detección conjugado con biotina (anti-mouse TNF- $\alpha$ -Biotina, R&D Systems, Europa) a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/mL; se incubaron las placas durante 1 ½ h a 25°C. Se realizaron 3 lavados. Se agregó el conjugado enzimático de estreptavidina-peroxidasa (BD Biosciences Pharmingen, EE.UU). Se incubaron las placas por 30 min a 25°C, se realizaron 4 lavados. Luego se añadió el sustrato: peróxido de hidrógeno/tetrametilbenzidina (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB), se detuvo la reacción a los 20 min agregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N). Por último, se leyó DO a 450 nm en un lector de ELISA.

#### **4.2.7. Ensayo de citotoxicidad por MTS/PMS**

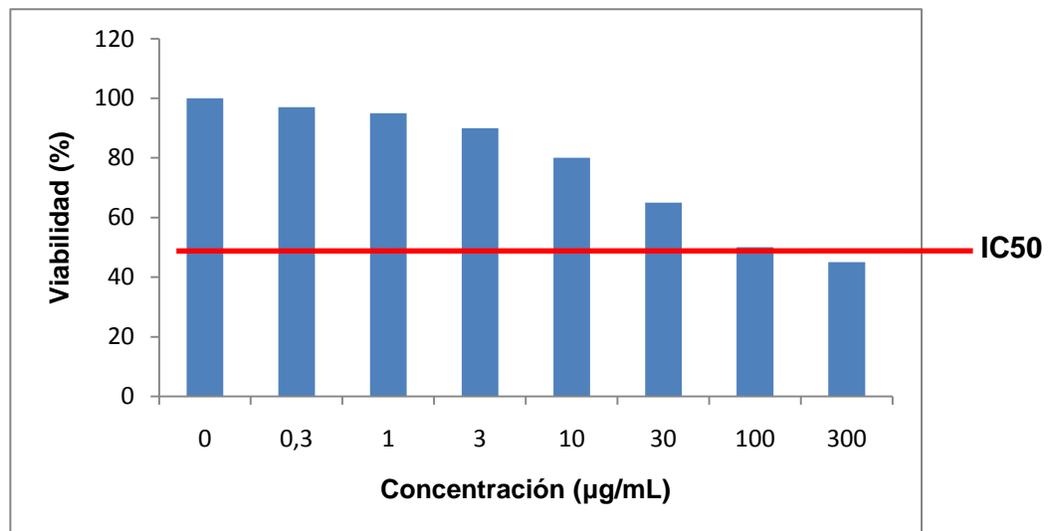
Luego de recolectar los sobrenadantes de macrófagos a las 24 h, se realizó un ensayo *in vitro* mediante MTS/PMS en las células que quedan adheridas a la placa de cultivo, para medir el efecto citotóxico del extracto crudo, fracciones, sub-fracciones y compuestos derivados de *J. copaia*. De esta manera, se evalúa si la disminución en la producción de NO y/o TNF- $\alpha$  se debe a un efecto anti-inflamatorio o a un efecto citotóxico directo.

Este ensayo representa un método colorimétrico para determinar el número de células viables en proliferación, que comprende: una sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y un reactivo aceptor de electrones fenacina metosulfato (PMS). El MTS o reactivo de Owen es biorreducido por las células a formazán que es soluble en medio de cultivo celular; esta reacción se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas, principalmente de las deshidrogenasas del ácido málico que reducen la sal de tetrazolio. La reacción que ocurre en las células vivas origina la formación de un

compuesto de coloración marrón conocido como trifenilformazán, indicando que hay actividad respiratoria en las mitocondrias, y consecuentemente, que las células son viables (ver figura 11). Las células muertas no reaccionan con la solución, manteniendo su color natural (Promega, 2009).

Protocolo: Se descartó el contenido de las placas de cultivo celular, estérilmente. Luego se añadieron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de medio de cultivo, se agregaron 25  $\mu\text{L}$ /pozo de solución MTS/PMS (MTS Promega, EE.UU; PMS Sigma, EE.UU) a una proporción 20:1 (protegiendo de la luz), las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 h, y por último se leyó la DO a 492 nm en un lector de ELISA.

Los resultados fueron reportados según el grado de inhibición celular como lo esquematiza el siguiente gráfico:



**Figura 11. Citotoxicidad celular mediante el ensayo MTS/PMS.** IC50 indica la concentración de la droga que produce 50% de inhibición celular.

#### 4.2.8. Ensayo para la determinación de la activación de NF- $\kappa$ B

Este ensayo se basa en la determinación de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Para ello, se utilizaron células tumorales HeLa 57 establemente transfectadas con el gen de la luciferasa acoplado al promotor del gen de la interleucina-6 que lleva secuencias de reconocimiento de NF- $\kappa$ B. En el modelo, la adición de TNF al medio de cultivo lleva a la activación de NF- $\kappa$ B por la vía de señalización del receptor de TNF (vía clásica). El NF- $\kappa$ B activado pasa al núcleo donde se acopla al promotor iniciando la transcripción del gen y la síntesis de la proteína de luciferasa. Esta expresión se detecta por la degradación del substrato luciferina, a un intermediario denominado luciferil adenilato que reacciona con el oxígeno produciendo oxiluciferin, luz y dióxido de carbono (Figura 12) (Promega, 2005). La luz liberada en dicha reacción representa una medida de la activación de NF- $\kappa$ B.

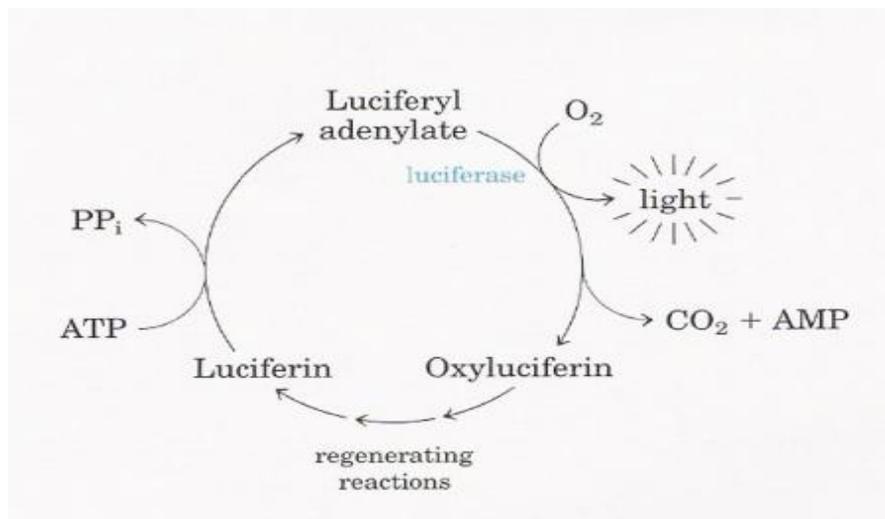


Figura 12. Reacción de la luciferasa (Tomado y modificado de <http://www.promega.com>).

Protocolo: Se cultivaron células HeLa 57 a 20000 cél/pozo. Se agregó geneticina a una concentración final de 400 µg/mL, es un marcador de selección para mantener la expresión del gen reportero en las células transfectadas. Una vez formada la monocapa en las placas de 96 pozos, se descartó estérilmente el sobrenadante y se agregaron 100 µL/pozo del tratamiento (extracto crudo, fracciones, sub-fracciones y compuestos a sus diferentes concentraciones, y a otros pozos se agregó la droga parthenolide (Sigma, EE.UU) que corresponde al control positivo a una concentración final de 5 µg/mL, a los pozos correspondientes al control basal se les agregó sólo medio suplementado específico. Las placas fueron incubadas a 37°C por 1 h. Sin descartar el contenido, se agregaron 20 µL/pozo de TNF-α humano (huTNF-α. BD Biosciences Pharmingen, EE.UU) a una concentración final de 50 ng/mL excepto a los pozos correspondientes a la respuesta basal, y fueron incubadas a 37°C durante 4 h. Posteriormente, se agregaron 20 µL/pozo del sustrato Luciferina + ATP en buffer lisis (Steady Glo® Luciferasa Assay System. Promega, EE.UU), se dejó actuar por 5 min y luego se transfirió todo el contenido de la placa a una placa blanca (opaca) de 96 pozos. Finalmente, se realizó la lectura de luminiscencia en el lector de ELISA (TECAN).

#### **4.2.9. Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Se utilizó la Prueba T para datos no pareados para determinar las diferencias significativas, con un nivel de aceptación del 95%. Así,  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Actividad citotóxica de *J. copaia* sobre diferentes líneas celulares.

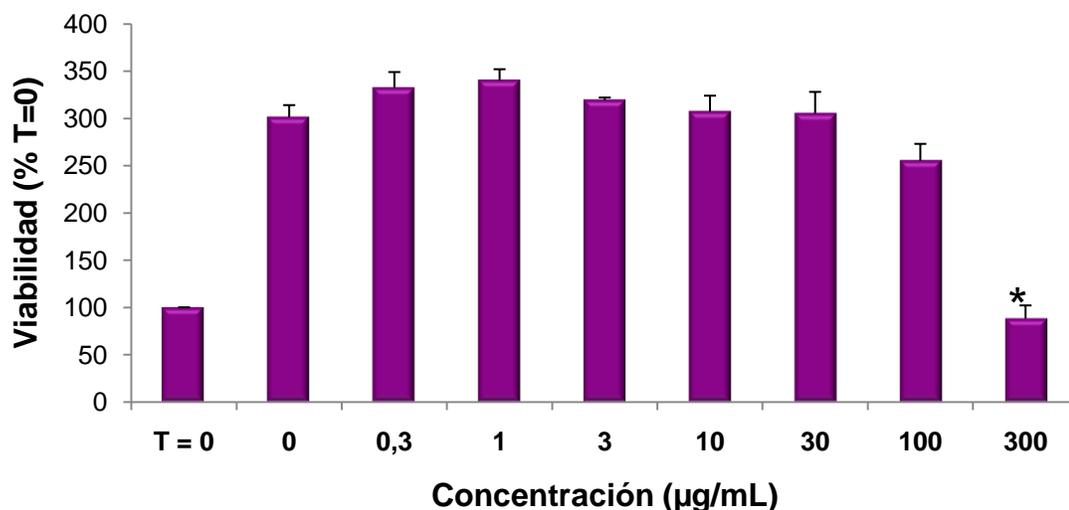
Estudios previos realizados por Villasmil y colaboradores en el 2006 y por Taylor y colaboradores en el 2006, muestran que el extracto crudo de *J. copaia* posee actividad anti-tumoral. Tomando en cuenta tales antecedentes, se realizaron ensayos preliminares de citotoxicidad mediante la técnica de Sulforodamina B con células tumorales (colon, mama y endocérvix) y macrófagos.

Se debe destacar que el extracto de *J. copaia* evaluado por Villasmil, era un extracto hidroetanólico cuyas hojas fueron recolectadas en un lote diferente a las hojas utilizadas para realizar el extracto hidroetanólico evaluado en este trabajo. Por lo tanto, es posible que los componentes activos encontrados en este estudio sean diferentes a los componentes contenidos en el extracto evaluado por Villasmil.

El extracto hidroetanólico de *J. copaia* de Villasmil mostró un efecto citotóxico a altas concentraciones en células tumorales de páncreas (PANC-1) y colon (HT-29), a 223 µg/mL y 228 µg/mL respectivamente (Villasmil y col., 2006). De las fracciones obtenidas del extracto crudo (hidroetanólico) las que mostraron mayor actividad citotóxica fueron hexano y cloroformo (fracciones no polares) en las células tumorales B16/BL6 y HeLa y en células macrofágicas RAW 264.7 (Villasmil y col., 2008).

Se ha reportado que el extracto hidroetanólico proveniente de hojas jóvenes de *J. copaia* posee actividad citotóxica sobre células tumorales de páncreas, colon y mama, tal actividad citotóxica fue medida por MTS/PMS (Taylor y col., 2006). Además, se observó que las células tumorales de mama SKBR3 y MDA-MB231 fueron las más sensibles al extracto.

La figura 13 muestra un experimento típico del efecto de diferentes concentraciones del extracto crudo de *J. copaia* sobre la viabilidad de la línea celular tumoral HT-29, el cual fue citostático al 100% a la mayor concentración probada (300 µg/mL) pero no se encontró actividad citotóxica en estas células.



**Figura 13.** Efecto *in vitro* del extracto crudo de *J. copaia* sobre la viabilidad de la línea celular tumoral HT-29. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo colorimétrico Sulforodamina B. Los resultados fueron reportados como porcentaje de la densidad óptica respecto a T=0 (media ± D.E., n = 3). El asterisco (\*) indica la concentración citotóxica del extracto crudo sobre las células.

La tabla 1 representa un resumen de los resultados de todos los experimentos que se efectuaron para evaluar el posible efecto citotóxico y/o citostático del extracto crudo, fracciones, subfracciones y compuestos derivados de hojas de *J. copaia* sobre tres líneas celulares tumorales y una línea celular de macrófagos. Sólo la fracción E2 mostró citotoxicidad al 50% en células 4T1 (tumor de mama de ratón), HT-29 (tumor de colon humano) y RAW 264.7 (macrófagos de ratón) a altas concentraciones (280,8 µg/mL, 282,5 µg/mL y 248,4 respectivamente). Los compuestos A y B, derivados de E2, mostraron citotoxicidad sólo en las células RAW a altas concentraciones, el compuesto A a 288,2 µg/mL y el compuesto B a 296,9 µg/mL.

En este trabajo, se observó en líneas generales, que la fracción E2 derivada de hojas de *J. copaia* fue citotóxico sólo a muy altas concentraciones. Además, se observó una actividad citostática (inhibición del crecimiento celular al 50% y al 100%) mucho menor que la observada con Taxol (control positivo). Las células 4T1 fueron las más sensibles al extracto crudo, fracción E2, subfracción E2II y compuestos aislados de *J. copaia* y las células más resistentes fueron las células HeLa 57. Además, se observó que las células RAW fueron un poco más susceptibles a la droga Taxol (Tabla 1).

En un experimento control, se demostró que la mayor concentración del solvente utilizado en estos experimentos (DMSO al 1,2%) no tuvo actividad citotóxica ni citostática en las líneas celulares evaluadas (resultados no mostrados). Por lo tanto, el efecto mostrado fue debido a *J. copaia* y no a un efecto no-específico del solvente.

**Tabla 1. Efecto citotóxico y/o citostático *in vitro* de *J. copaia* sobre diferentes líneas celulares, evaluado mediante la técnica de Sulforodamina B.**

| (µg/mL)                   | HT-29 |       |       | 4T1   |       |       | HeLa 57 |       |      | RAW   |       |       |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|------|-------|-------|-------|
|                           | GI50  | TGI   | LC50  | GI50  | TGI   | LC50  | GI50    | TGI   | LC50 | GI50  | TGI   | LC50  |
| <b>Extracto crudo</b>     | 165,2 | 285,3 | >300  | 64,7  | 105,2 | >300  | >300    | >300  | >300 | 140,5 | 298,9 | >300  |
| <b>Fracción E1</b>        | >300  | >300  | >300  | 244   | >300  | >300  | >300    | >300  | >300 | >300  | >300  | >300  |
| <b>Fracción E2</b>        | 117,1 | 227,5 | 282,5 | 56,7  | 93,3  | 280,8 | 127,4   | 231,7 | >300 | 63,8  | 177,2 | 248,4 |
| <b>Fracción E3</b>        | >300  | >300  | >300  | >300  | >300  | >300  | >300    | >300  | >300 | >300  | >300  | >300  |
| <b>Sub-fracción E2I</b>   | >100  | >100  | >100  | >100  | >100  | >100  | >100    | >100  | >100 | >100  | >100  | >100  |
| <b>Sub-fracción E2II</b>  | >100  | >100  | >100  | 68    | 100   | >100  | 100     | >100  | >100 | 100   | >100  | >100  |
| <b>Sub-fracción E2III</b> | >100  | >100  | >100  | >100  | >100  | >100  | >100    | >100  | >100 | >100  | >100  | >100  |
| <b>Compuesto "A"</b>      | >300  | >300  | >300  | 178,8 | >300  | >300  | 114,4   | >300  | >300 | 91,8  | 261,8 | 288,2 |
| <b>Compuesto "B"</b>      | >300  | >300  | >300  | 76,9  | >300  | >300  | 57,3    | 99,7  | >300 | 92,9  | 270,6 | 296,9 |
| <b>Taxol</b>              | 0,2   | 0,6   | >30   | 0,2   | >30   | >30   | 0,2     | 8,7   | >30  | 0,01  | 0,1   | >30   |

**GI50:** Inhibición del crecimiento al 50%, **TGI:** Inhibición total del crecimiento, **LC50:** Efecto citotóxico al 50%. La densidad celular fue medida por el ensayo de Sulforodamina B. Los resultados fueron expresados en µg/mL.

## 5.2. Actividad anti-inflamatoria de *J. copaia*.

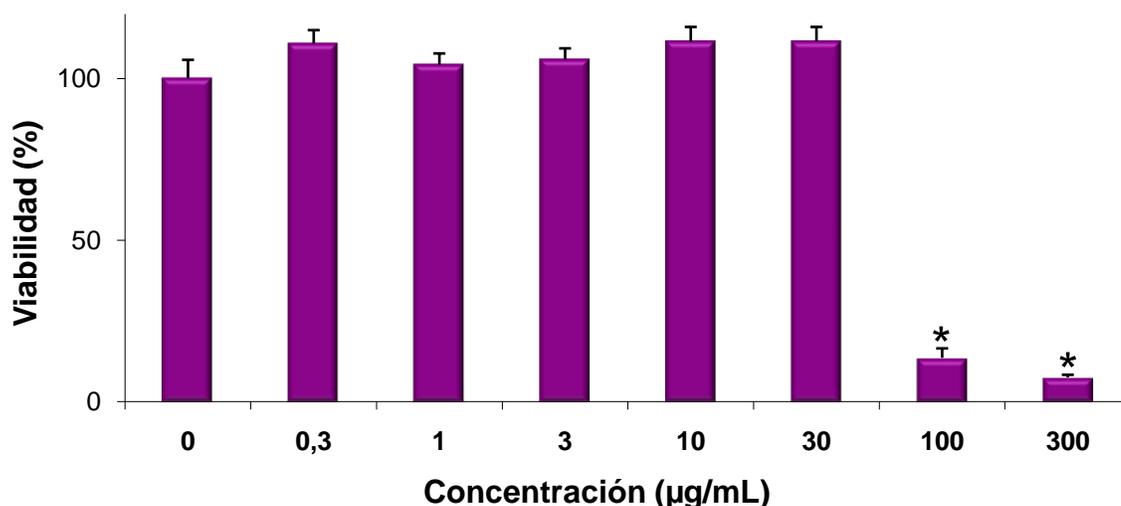
En el estudio realizado por Villasmil y colaboradores en el 2008, se demostró que el extracto crudo (a partir de 30 µg/mL) y las fracciones de hexano y cloroformo (a partir de 10 µg/mL) inhibieron la producción de mediadores pro-inflamatorios tales como TNF- $\alpha$ , NO e IL-6. Además, se observó la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B.

Tomando en cuenta los antecedentes sobre la actividad anti-inflamatoria de *J. copaia* (Villasmil y col., 2006; Villasmil y col., 2008), en este estudio se realizaron ensayos de cuantificación de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  y NO, para evaluar las fracciones y compuestos preparados por la metodología de este trabajo. Además, se midió la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Para la cuantificación de mediadores inflamatorios se utilizaron las células RAW 264.7 (macrófagos), las cuales cumplen funciones muy importantes en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, entre las cuales, producir una gran variedad de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y NO. Los macrófagos poseen en su membrana una gran variedad de receptores como por ejemplo el receptor para lipopolisacáridos (CD14) y numerosos receptores para citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y otras (Corado y Mora, 2006).

En los ensayos de inflamación es importante establecer que un efecto observado sobre la secreción de mediadores de inflamación por las células se debe a un efecto inhibitorio verdadero, y no a un efecto citotóxico general. Por esta razón, se realizó un ensayo de citotoxicidad mediante la técnica MTS/PMS, el cual permitió evaluar la viabilidad de las células RAW en los mismos cultivos utilizados para medir el efecto anti-inflamatorio.

La figura 14 muestra un experimento típico del efecto citotóxico del extracto crudo de *J. copaia* sobre las células RAW, el extracto mostró citotoxicidad a partir de 100 µg/mL.



**Figura 14.** Efecto *in vitro* del extracto crudo de *J. copaia* sobre la viabilidad de la línea macrofágica RAW. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo colorimétrico MTS/PMS. Los resultados fueron reportados como porcentaje de inhibición de la viabilidad celular (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los asteriscos (\*) indican las concentraciones citotóxicas del extracto crudo sobre las células.

La tabla 2 representa un resumen de los resultados de todos los experimentos que se efectuaron para evaluar el efecto citotóxico del extracto crudo, fracciones, subfracciones y compuestos derivados de hojas de *J. copaia* sobre las células RAW que fueron estimuladas con LPS. Se observó citotoxicidad del extracto crudo, la fracción E2 y la subfracción E2II.

La tabla 3 representa un resumen de los resultados de los experimentos realizados para evaluar el efecto citotóxico del extracto crudo, fracciones, subfracciones y compuestos derivados de *J. copaia* sobre las células RAW que fueron estimuladas con INF- $\gamma$ . Se observó citotoxicidad del extracto crudo y la fracción E2.

**Tabla 2. Efecto citotóxico *in vitro* de *J. copaia* en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, evaluado mediante el ensayo MTS/PMS.**

| ( $\mu\text{g/mL}$ ) | IC50  |
|----------------------|-------|
| Extracto crudo       | 73,9  |
| Fracción E1          | 219,5 |
| Fracción E2          | 72,3  |
| Fracción E3          | >300  |
| Sub-fracción E2I     | >100  |
| Sub-fracción E2II    | 85,8  |
| Sub-fracción E2III   | >100  |
| Compuesto "A"        | 210,7 |
| Compuesto "B"        | 240,5 |

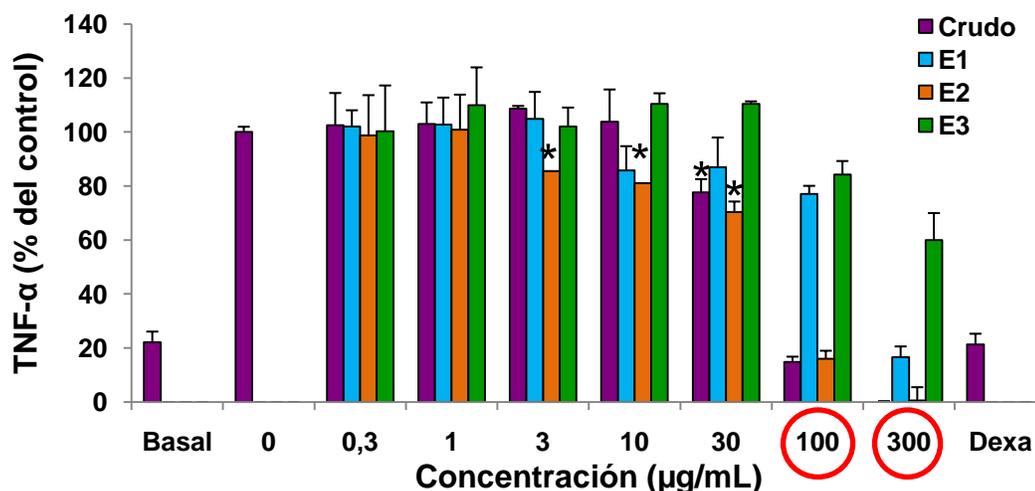
**Tabla 3. Efecto citotóxico *in vitro* de *J. copaia* en células RAW 264.7 estimuladas con INF- $\gamma$ , evaluado mediante el ensayo MTS/PMS.**

| ( $\mu\text{g/mL}$ ) | IC50  |
|----------------------|-------|
| Extracto crudo       | 92,2  |
| Fracción E1          | >300  |
| Fracción E2          | 64,2  |
| Fracción E3          | >300  |
| Sub-fracción E2I     | >100  |
| Sub-fracción E2II    | >100  |
| Sub-fracción E2III   | >100  |
| Compuesto "A"        | 287,9 |
| Compuesto "B"        | >300  |

**IC50:** concentración de la droga que produce 50% de inhibición celular.

### 5.2.1. Efecto *in vitro* del extracto crudo y fracciones E1, E2 y E3 derivadas de hojas de *J. copaia* sobre la producción de TNF- $\alpha$ y NO en macrófagos RAW 264.7.

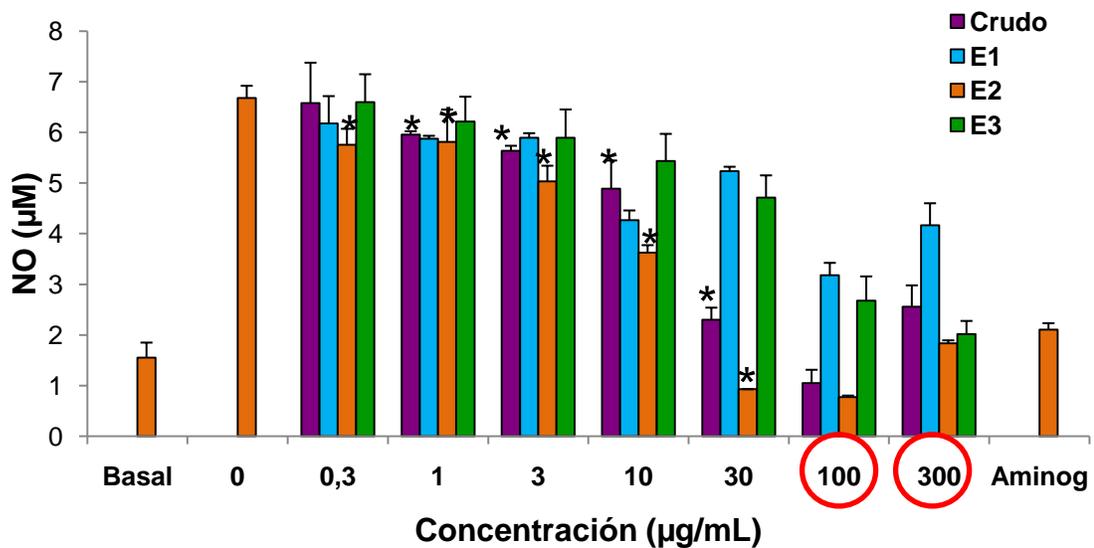
La disminución en la producción de TNF- $\alpha$  a altas concentraciones del extracto crudo y de la fracción E2 se debió a un efecto citotóxico directo sobre las células (ver círculos rojos en la figura 15). No obstante, se observó una inhibición en la producción de TNF- $\alpha$  del 22% a 30  $\mu\text{g/mL}$  del extracto crudo, y la fracción E2 mostró un efecto inhibitorio de 14% a 3  $\mu\text{g/mL}$ , 19% a 10  $\mu\text{g/mL}$  y 30% a 30  $\mu\text{g/mL}$ , dosis que no causaron variación en la viabilidad celular (Tabla 2).



**Figura 15.** Efecto del extracto crudo y fracciones E1, E2 y E3 derivadas de hojas de *J. copaia* sobre la producción de TNF- $\alpha$  *in vitro*. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 h con LPS de *E.coli*. Control positivo: dexametasona. El TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes fue medido por ELISA (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como porcentaje de respuesta máxima. Los círculos rojos indican las concentraciones citotóxicas del extracto crudo y la fracción E2. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) del extracto crudo y la fracción E2 con respecto al control sin tratamiento.

La figura 16 muestra el efecto del extracto crudo y las fracciones derivadas de hojas de *J. copaia* sobre la producción de NO. Se observó una disminución significativa de la producción de NO en presencia del extracto crudo a partir de 1  $\mu\text{g/mL}$  hasta 30  $\mu\text{g/mL}$ , a esta última concentración se

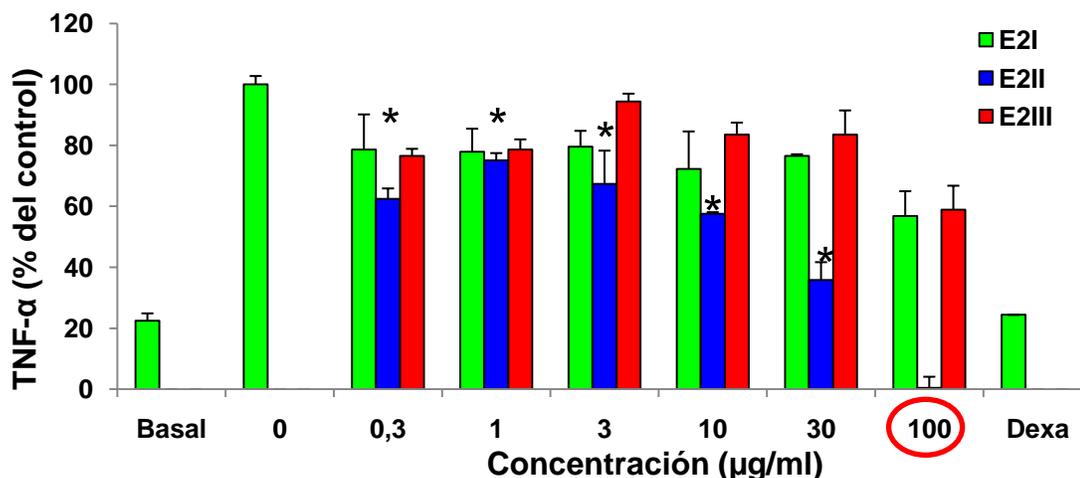
produjo sólo 2,3  $\mu\text{M}$  de NO que corresponden al 66% de inhibición con respecto al control sin tratamiento. La fracción E1 disminuyó la producción de NO a partir de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el efecto en las concentraciones siguientes fue muy variable, sin embargo, ninguna de las concentraciones probadas fue citotóxica para las células RAW (Tabla 3). La fracción E2 fue la que mostró mayor inhibición de la producción de NO (a partir de 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se produjo 0,9  $\mu\text{M}$  de NO que corresponden al 87% de inhibición. En presencia de altas concentraciones (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del extracto crudo y la fracción E2 se observó citotoxicidad (ver los círculos rojos en la figura 16). La fracción E3 también logró inhibir la producción de este mediador inflamatorio, observándose el efecto a partir de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 16.** Efecto del extracto crudo y fracciones E1, E2 y E3 derivadas de hojas de *J. copaia* sobre la producción de NO *in vitro*. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 h con INF- $\gamma$ . Control positivo: aminoguanidina. El NO en los sobrenadantes fue medido mediante la reacción de Griess (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como  $\mu\text{M}$  de NO. Los círculos rojos indican las concentraciones citotóxicas del extracto crudo y la fracción E2 y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) del extracto crudo y la fracción E2 con respecto al control sin tratamiento.

### 5.2.2. Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III sobre la producción de TNF- $\alpha$ y NO en macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

Las tres subfracciones derivadas de E2 mostraron un efecto inhibitorio sobre la producción de TNF- $\alpha$  en las siete concentraciones probadas, tal efecto fue mayor en presencia de la subfracción E2II (Figura 17). La mayor inhibición generada por E2II se observó a 30  $\mu\text{g/mL}$  donde la disminución de la producción de TNF- $\alpha$  fue de 23% en comparación al control sin tratamiento. A 100  $\mu\text{g/mL}$  E2II fue citotóxico para las células RAW (ver círculo rojo en la figura 17).

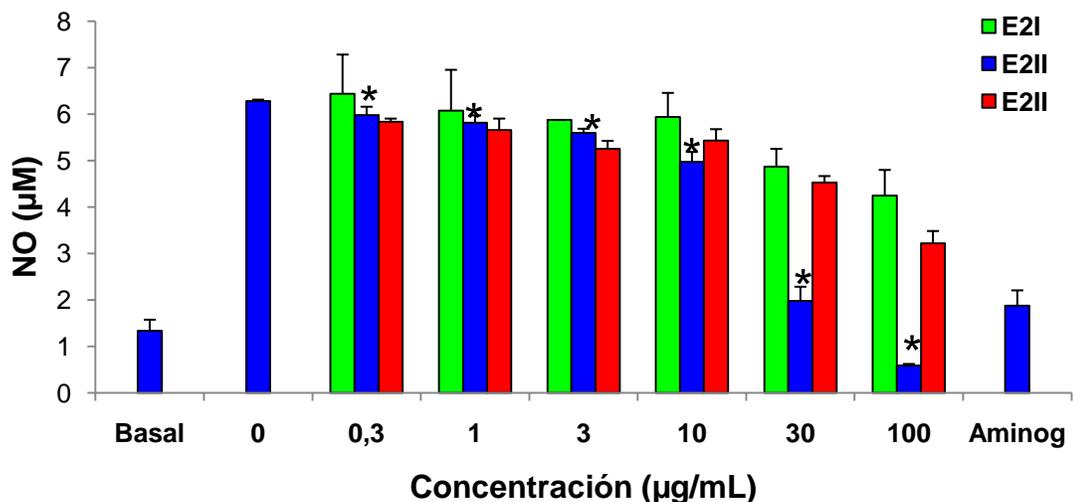


**Figura 17.** Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III sobre la producción de TNF- $\alpha$  *in vitro*. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 h con LPS de *E.coli*. Control positivo: dexametasona. El TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes fue medido por ELISA (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como porcentaje de respuesta máxima. El círculo rojo indica la concentración citotóxica de la subfracción E2II y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de las tres subfracciones con respecto al control sin tratamiento.

Las tres subfracciones E2I, E2II y E2III mostraron un efecto inhibitorio en la producción de NO, siendo más notable para la fracción E2II (Figura 18) que generó un descenso en la producción de NO en todas las concentraciones probadas sin mostrar un efecto tóxico directo sobre las

células RAW (Tabla 3). A 100  $\mu\text{g/mL}$  E2II inhibió un 91% la producción de NO.

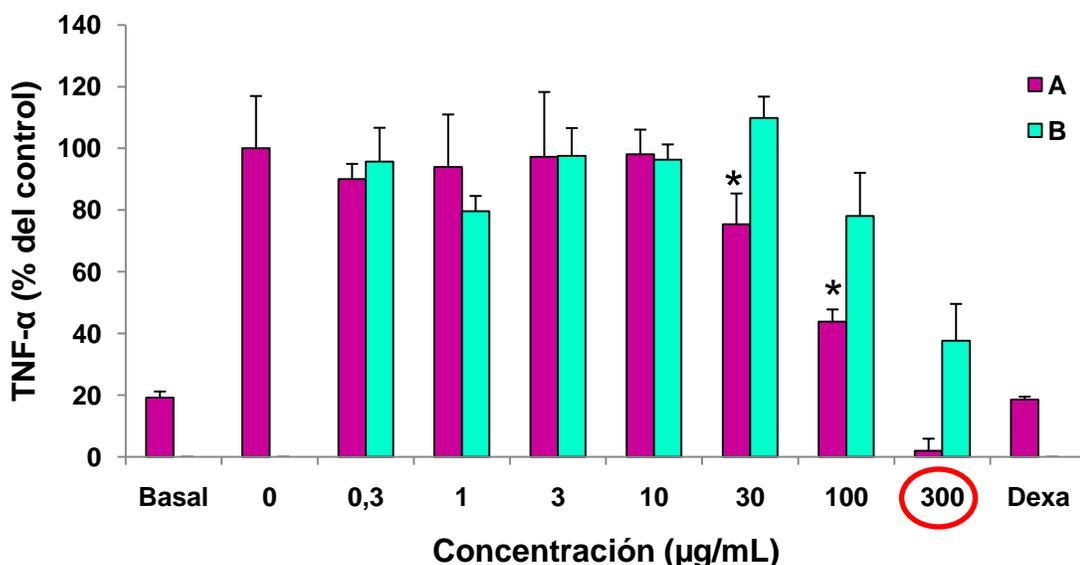
Aunque la fracción E2 fue tóxica en las células RAW a 100  $\mu\text{g/mL}$  y 300  $\mu\text{g/mL}$ , ninguna de las subfracciones (E2I, E2II, E2III) mostró citotoxicidad en las concentraciones probadas (Tabla 3). Ésta pérdida de efecto citotóxico de las subfracciones llama la atención ya que la fracción E2 está compuesta únicamente por E2I, E2II y E2III. Por lo tanto, es posible que algún componente activo se haya perdido en la columna durante el proceso de fraccionamiento. También es posible que el efecto citotóxico se debía al sinergismo entre componentes de las tres subfracciones; aunque esto se tendría que demostrar evaluando la citotoxicidad de mezclas de subfracciones.



**Figura 18.** Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III sobre la producción de NO *in vitro*. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 h con INF- $\gamma$ . Control positivo: aminoguanidina. El NO en los sobrenadantes fue medido mediante la reacción de Griess (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como  $\mu\text{M}$  de NO. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de la subfracción E2II con respecto al control sin tratamiento.

### 5.2.3. Efecto de los compuestos A y B sobre la producción de TNF- $\alpha$ y NO en macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

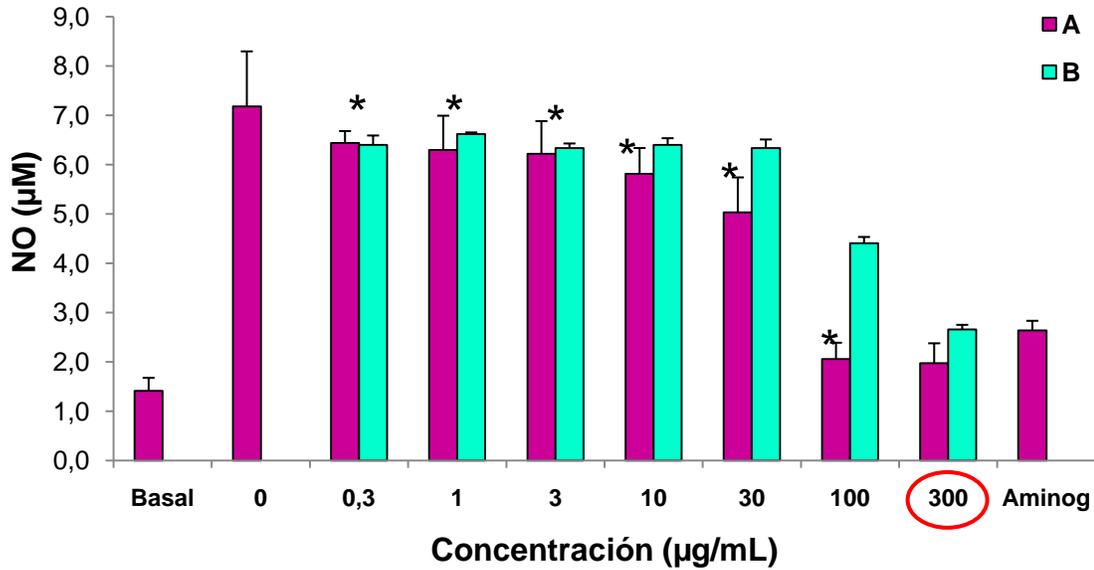
De los compuestos aislados de la subfracción E2II, el compuesto A mostró mayor efecto inhibitorio sobre la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 19) a partir de 30  $\mu\text{g/mL}$  donde se observó 25% de inhibición. A 100  $\mu\text{g/mL}$  el compuesto A mostró 56% de inhibición. Se observó efecto citotóxico de los compuestos A y B a la mayor concentración probada (ver círculo rojo en la figura 19).



**Figura 19.** Efecto de los compuestos A y B sobre la producción de TNF- $\alpha$  *in vitro*. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 h con LPS de *E.coli*. Control positivo: dexametasona. El TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes fue medido por ELISA (media  $\pm$  D.E.,  $n = 3$ ). Los resultados fueron reportados como porcentaje de respuesta máxima. El círculo rojo indica la concentración citotóxica de los compuestos y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) del compuesto A con respecto al control sin tratamiento.

El efecto inhibitorio sobre la producción de NO generado por el compuesto A fue mayor que el compuesto B a partir de 10  $\mu\text{g/mL}$ . El efecto inhibitorio en presencia de 100  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto A fue de 71%. A 300  $\mu\text{g/mL}$  se observó citotoxicidad (ver círculo rojo en la figura 20). El compuesto B mostró una inhibición de 62% a la mayor concentración, este

efecto no fue causado por un efecto citotóxico directo sobre las células RAW (Tabla 3).



**Figura 20.** Efecto de los compuestos A y B sobre la producción de NO *in vitro*. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 h con INF- $\gamma$ . Control positivo: aminoguanidina. El NO en los sobrenadantes fue medido mediante la reacción de Griess (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como  $\mu$ M de NO. El círculo rojo indica la concentración citotóxica del compuesto A y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) del compuesto A con respecto al control sin tratamiento.

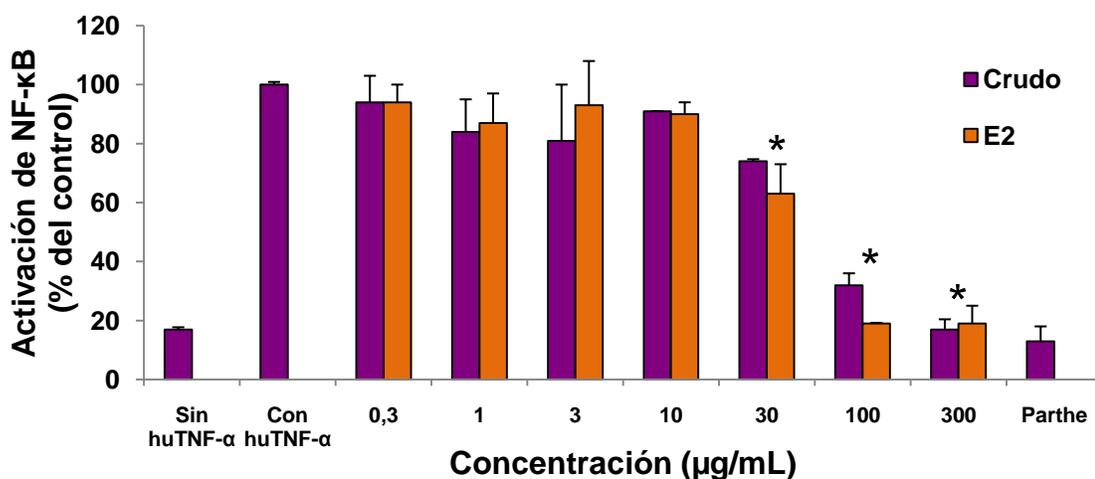
En resumen, el extracto crudo, la fracción E2, la subfracción E2II y el compuesto A obtenido de hojas de *J. copaia* mostraron un ligero efecto inhibitorio sobre la producción de TNF- $\alpha$ . No obstante, se observó un mayor efecto inhibitorio dosis dependiente sobre la producción de NO sin que este efecto pudiera ser atribuible a un efecto citotóxico directo sobre los macrófagos.

#### **5.2.4. Efecto del extracto crudo y la fracción E2 sobre la activación del factor de transcripción NF-κB.**

El factor de transcripción NF-κB está implicado tanto en el crecimiento tumoral como en procesos inflamatorios. Este factor ha sido propuesto como un posible blanco para inhibidores derivados de plantas y muchos agentes anti-inflamatorios que parecen modularlo (Bremner y Heinrich, 2002; Fazio y col., 2010). Con la finalidad de investigar las posibles rutas de señalización relacionadas con inflamación y cáncer, por la cuales pudieran estar actuando los componentes activos presentes en hojas de *J. copaia*, se evaluó el efecto sobre la activación del factor de transcripción NF-κB.

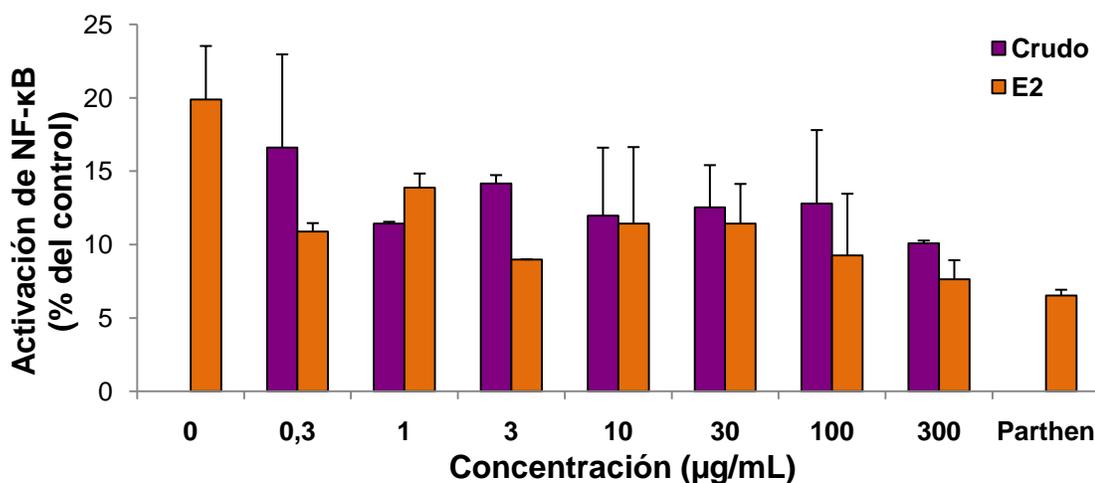
Se debe destacar que ninguna de las concentraciones probadas del extracto crudo y de la fracción E2 fueron citotóxicas para las células tumorales HeLa utilizadas en estos ensayos (Tabla 1). Las células fueron estimuladas con huTNF-α ya que esta citocina es capaz de activar al factor NF-κB (Karin y Greten, 2005).

En la figura 21 se puede observar el efecto inhibitorio del extracto crudo y de la fracción E2, mostrando una inhibición de la activación de NF-κB significativa a partir de 30 µg/mL, con respecto al control de respuesta máxima (100%). El mayor porcentaje de inhibición se observó en presencia de 300 µg/mL del extracto crudo (83% de inhibición) y en presencia de 300 µg/mL de la fracción E2 (81% de inhibición). Sin embargo, la concentración requerida para observar este efecto es muy alta, 300 µg/mL.



**Figura 21.** Efecto del extracto crudo y la fracción E2 derivada de hojas de *J. copaia* sobre la activación de NF-κB *in vitro*. Las células tumorales HeLa 57 transfectadas con el plásmido reportero NF-κB/luciferasa fueron estimuladas durante 4 h con huTNF-α. Control positivo: parthenolide. La actividad de NF-κB fue evaluada usando luciferina como sustrato de la enzima (media ± D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como % de activación de NF-κB con respecto al control de respuesta máxima (100%). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) del extracto crudo y la fracción E2 con respecto al control sin tratamiento.

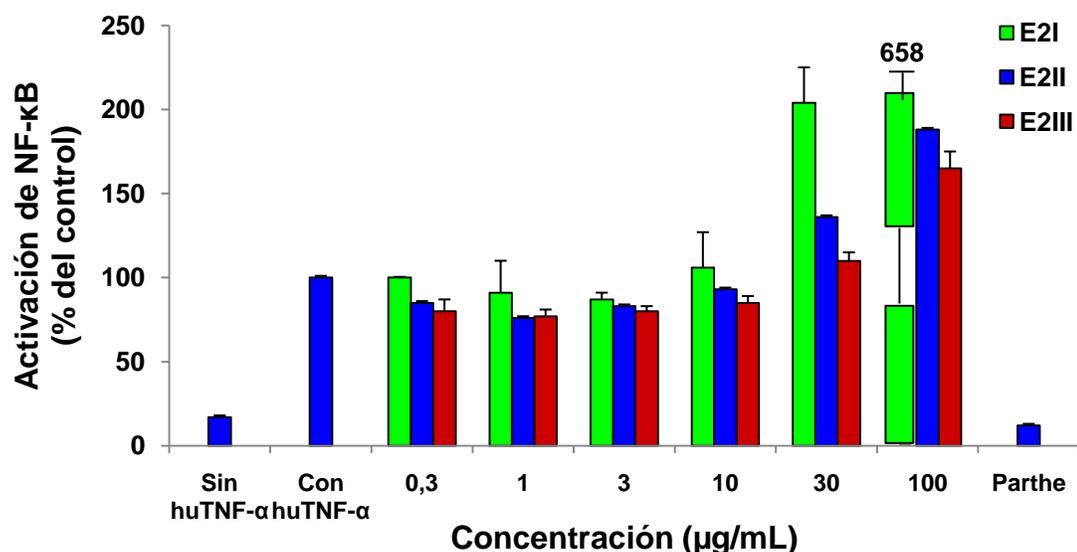
Para comprobar el efecto inhibitorio sobre la activación de NF-κB en presencia del extracto crudo y la fracción E2, se realizó el mismo experimento pero sin estimular las células con huTNF-α, y se observó que el extracto crudo y la fracción E2 también mostraron un ligero efecto inhibitorio sobre los niveles basales de la activación del factor de transcripción (Figura 22).



**Figura 22.** Efecto del extracto crudo y la fracción E2 derivada de hojas de *J. copaia* sobre la activación de NF-κB en células HeLa 57 no estimuladas. Control positivo: parthenolide. . La actividad de NF-κB fue evaluada usando luciferina como sustrato de la enzima (media ± D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como % de activación de NF-κB con respecto al control de respuesta máxima (100%).

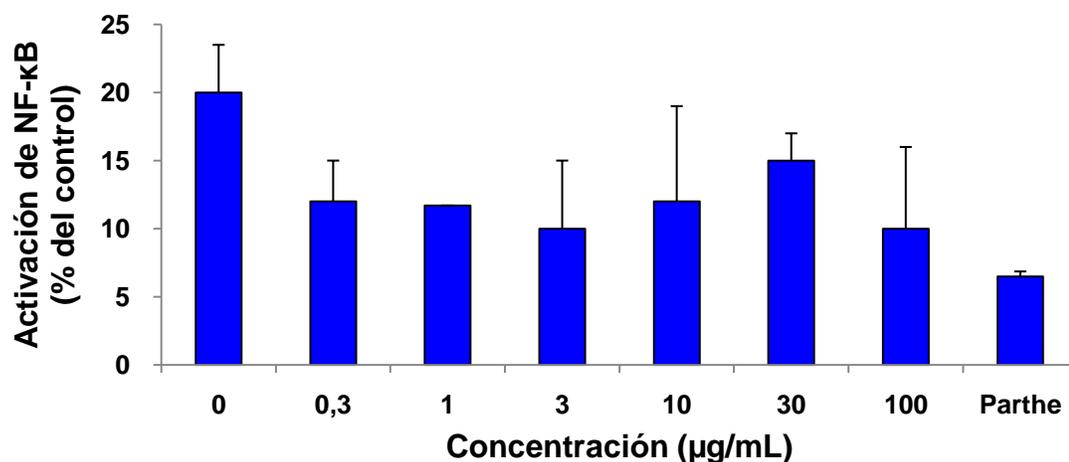
### 5.2.5. Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III sobre la activación del factor de transcripción NF-κB.

Una vez evaluado el efecto inhibitorio del extracto crudo y la fracción E2 sobre la activación de NF-κB, se evaluaron las tres subfracciones derivadas de la fracción E2 (Figura 23). Ninguna de las subfracciones mostró inhibición sobre la activación de NF-κB. Además, se observó que a altas concentraciones fue estimulada la activación de NF-κB, principalmente en presencia de la subfracción E2I.



**Figura 23.** Efecto de las subfracciones E2I, E2II y E2III derivadas de hojas de *J. copaia* sobre la activación de NF-κB *in vitro*. Las células tumorales HeLa 57 transfectadas con el plásmido reportero NF-κB/luciferasa fueron estimuladas durante 4 h con huTNF-α. Control positivo: parthenolide. La actividad de NF-κB fue evaluada usando luciferina como sustrato de la enzima (media ± D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como % de activación de NF-κB con respecto al control de respuesta máxima (100%).

La figura 24 muestra el efecto de la subfracción E2II sobre la activación de NF-κB en células que no fueron previamente estimuladas con huTNF-α. Se observó que esta subfracción inhibió escasamente los niveles basales de activación del factor de transcripción.

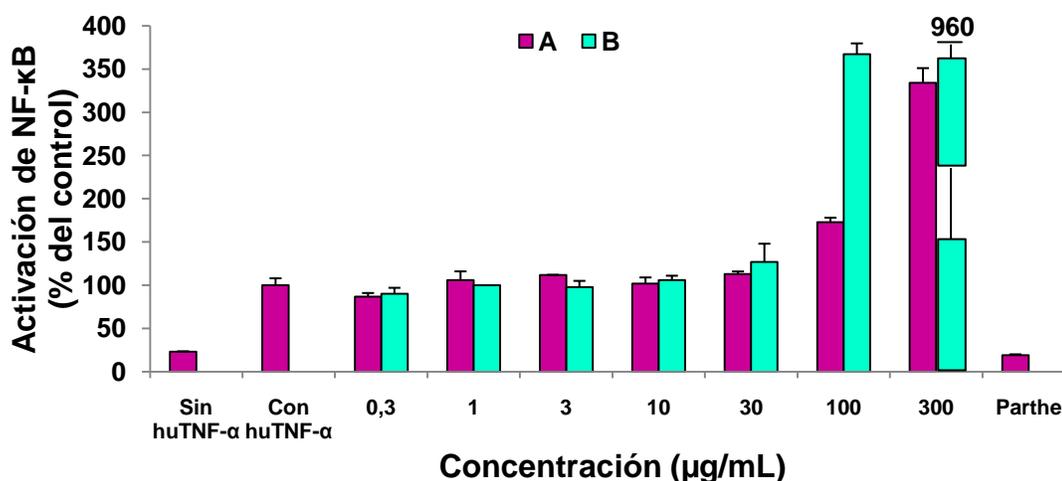


**Figura 24.** Efecto de la subfracción E2II derivada de hojas de *J. copaia* sobre la activación de NF-κB *in vitro*. Las células tumorales HeLa 57 transfectadas con el plásmido reportero NF-κB/luciferasa no fueron estimuladas durante 4 h con huTNF-α. Control positivo: parthenolide. La actividad de NF-κB fue evaluada usando luciferina como sustrato de la

enzima (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como % de activación de NF- $\kappa$ B con respecto al control de respuesta máxima (100%).

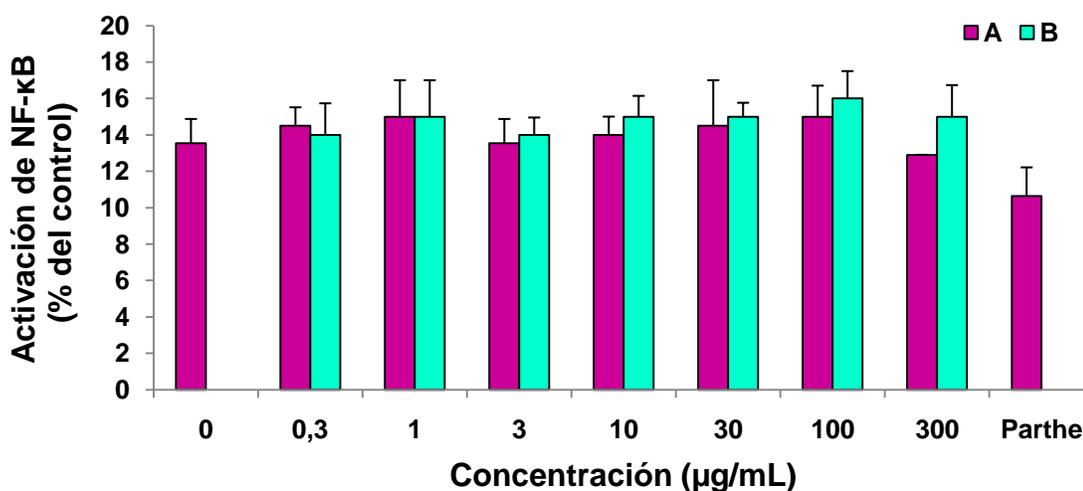
### 5.2.6. Efecto de los compuestos A y B sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

La figura 25 muestra el efecto de los dos compuestos A y B aislados de la subfracción E2II, sobre la activación de NF- $\kappa$ B. Se observó que ambos compuestos no poseen un efecto inhibitorio de la activación del factor de transcripción, y a altas concentraciones, ambos compuestos estimularon la activación de NF- $\kappa$ B, principalmente el compuesto B.



**Figura 25.** Efecto de los compuestos A y B derivados de hojas de *J. copaia* sobre la activación de NF- $\kappa$ B *in vitro*. Las células tumorales HeLa 57 transfectadas con el plásmido reportero NF- $\kappa$ B/luciferasa fueron estimuladas durante 4 h con huTNF- $\alpha$ . Control positivo: parthenolide. La actividad de NF- $\kappa$ B fue evaluada usando luciferina como sustrato de la enzima (media  $\pm$  D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como % de activación de NF- $\kappa$ B con respecto al control de respuesta máxima (100%).

Se observó que en ausencia de la estimulación de las células con huTNF- $\alpha$ , los compuestos no poseen efecto estimulador de la activación del factor de transcripción (Figura 26).



**Figura 26.** Efecto de los compuestos A y B derivados de hojas de *J. copaia* sobre la activación de NF-κB *in vitro*. Las células tumorales HeLa 57 transfectadas con el plásmido reportero NF-κB/luciferasa no fueron estimuladas durante 4 h con huTNF-α. Control positivo: parthenolide. La actividad de NF-κB fue evaluada usando luciferina como sustrato de la enzima (media ± D.E., n = 3). Los resultados fueron reportados como % de activación de NF-κB con respecto al control de respuesta máxima (100%).

En resumen, se observó en este trabajo un efecto inhibitorio de la activación de NF-κB, en presencia del extracto crudo y la fracción E2 (a partir de 30 µg/mL) de hojas de *J. copaia*, tal efecto se manifestó tanto en células estimuladas con TNF-α como en células que no fueron estimuladas (Figuras 21 y 22). No obstante, este efecto inhibitorio observado con E2 se perdió durante el proceso de fraccionamiento del mismo (Figuras 23 y 25), encontrándose un fuerte efecto potenciador de la activación de NF-κB cuando las células son previamente estimuladas con TNF-α, principalmente en presencia de la subfracción E2I y el compuesto B. En contraste, este efecto potenciador no se observó en células no activadas (Figuras 24 y 26). Una posible explicación de este resultado sería que el efecto potenciador no actúa directamente sobre NF-κB sino en la vía de señalización “upstream” entre la interacción de TNF-α/Receptor y NF-κB. Por lo tanto, el efecto potenciador de las subfracciones y compuestos se manifiesta sólo en células estimuladas con TNF-α, debido a la ausencia de los componentes activos que inhiben NF-κB.

Los resultados de este estudio sugieren que el efecto inhibitorio de *J. copala* sobre la producción de NO en macrófagos 264.7 estimulados previamente con INF- $\gamma$ , no está relacionado directamente con la activación de NF- $\kappa$ B. Se ha reportado que ciertos factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, ERF-1 (Factor Regulador 1) y STAT1 (Señal transductora y activadora de la transcripción) interactúan cooperativamente con el promotor iNOS, induciendo así la activación de la transcripción del gen iNOS (Jung y col., 2010). De esta manera, estos resultados indican que el efecto se ejerce a través de otra vía de señalización celular.

La citocina INF- $\gamma$  tiene como principal vía de señalización la vía de Janus quinasa (JAK) / (STAT), la cual se inicia cuando la citocina se une a su receptor (INFR) promoviendo la fosforilación de las proteínas STAT1 mediante las quinasas JAK1 y JAK2 y la consecuente formación de homodímeros de STAT1 denominados factor de activación de interferón gamma (GAF). Luego, GAF migra al núcleo y se une al ADN, específicamente en la secuencia activada por INF- $\gamma$  (GAS) lo que genera la activación de la inducción y transcripción de genes estimulados con INF- $\gamma$  (ISGs) (El Bougrini y col., 2010). Las proteínas STAT1 también pueden formar heterotrímeros con el factor regulador 9 (STAT1:STAT1:ERF-9) los cuales se translocan al núcleo y son capaces de unirse a la región promotora ISRE (Elemento de respuesta estimulado con INF- $\gamma$ ) de genes blanco (por ejemplo iNOS) para regular la transcripción. Otros factores de transcripción también se unen a la región ISRE, entre ellos están IRF-1 y el factor 3 de genes estimulados con INF- $\gamma$  (ISGF3) (Schroder y col., 2004).

Se han reportado tres familias de reguladores capaces de modular la señalización mediada por INF- $\gamma$ , entre ellos están las fosfotirosin fosfatasas (SHPs, CD45, PTP1B/TC-PTP), las proteínas inhibidoras de STAT activado (PIAS), y proteínas supresoras de la señalización de citocina (SOCS); los tres tipos de reguladores inhiben aspectos diferentes y específicos de la

transducción de la señal mediada por INF- $\gamma$ . Las fosfatasa s citoplasmáticas pueden desfosforilar receptores activados, SOCS (inducido por STAT activado) puede unirse a receptores para evitar la activación de STAT, y las PIAS pueden bloquear la unión de STAT activado con el ADN (El Bougrini y col., 2010).

Posiblemente, el efecto inhibitorio de *J. copaia* observado en este estudio sobre la producción de NO se deba a la inhibición de la expresión del gen iNOS mediante la supresión de la vía de señalización JAK/STAT.

Para dilucidar e investigar las posibles rutas de señalización por la cuales pudieran estar actuando los componentes activos de *J. copaia*, sería de gran interés evaluar el efecto sobre otros factores de transcripción como lo son STAT1 y ERF-1 principalmente, y así determinar si en presencia de los compuestos derivados de hojas de *J. copaia* se lleva a cabo la expresión de la enzima iNOS. Otros factores de transcripción que parecen regular la expresión de iNOS son la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor HIF-1 (Kleinert y col., 2004).

### **5.3. Fraccionamiento Biodirigido**

Mediante el análisis de cromatografía de capa fina se pudo evidenciar que la fracción E1 contiene principalmente compuestos de tipo triterpenos y clorofilas, la fracción E2 contiene flavonoides y la fracción E3 contiene taninos y azúcares.

Como se observa en la tabla 1 y en las figuras 15 y 16, las fracciones E1 y E3 no mostraron efecto significativo en comparación a la fracción E2 en los ensayos donde se evaluó *in vitro* su actividad citotóxica y anti-inflamatoria. Sin embargo, cabe resaltar la poca solubilidad de la fracción E1 en el medio de cultivo y podríamos atribuir la ausencia de efecto de esta

fracción a esta propiedad de solubilidad y por ende, no podemos descartar la posibilidad que parte del efecto mostrado inicialmente por el extracto crudo estuviese en esta fracción E1.

La fracción E2 retuvo parte del efecto mostrado por el extracto crudo de *J. copaia*. Esta fracción fue separada por exclusión molecular y se obtuvieron tres nuevas fracciones denominadas: E2I, E2II y E2III. La subfracción E2II mostró efecto anti-inflamatorio, y de ésta se aislaron por cromatografía en columna en fase reversa dos compuestos denominados "A" y "B", los cuales fueron identificados por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno 1 y Carbono 13 (RMN H-1 y C-13).

#### 5.4. Identificación de los compuestos A y B

Los datos espectroscópicos de RMN H-1 y C-13 del compuesto A se muestran en la tabla 4. El compuesto A fue denominado éster del ácido (ramnosil 2'- $\alpha$ -1''-glucosil-4'- $\alpha$ -etil-4-5-dihidroxifenil) cafeico (Figura 27). Este compuesto posee un peso molecular de 624,59 g/mol.

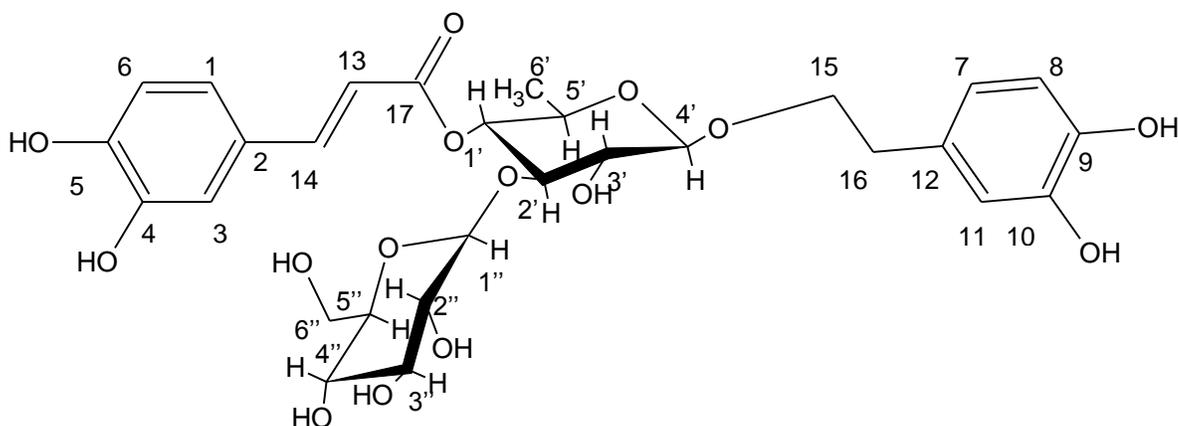


Figura 27. Compuesto "A" aislado de hojas de *Jacaranda copaia*



**Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN H-1 y C-13 del compuesto A**

| $\delta$ (ppm) | Dep. 135 | Asignación |
|----------------|----------|------------|
| 18,36          | CH3      | C-6'       |
| 35,34          | CH2      | C-15       |
| 61,06          | CH2      | C-16       |
| 63,13          | CH2      | C-6''      |
| 69,11          | CH       | C-2'       |
| 69,56          | CH       | C-3'       |
| 72,01          | CH       | C-5'       |
| 74,81          | CH       | C-2''      |
| 74,86          | CH       | C-3''      |
| 79,48          | CH       | C-4''      |
| 101,58         | CH       | C-1'       |
| 102,62         | CH       | C-1''      |
| 113,92         | CH       | C-1        |
| 115,00         | CH       | C-3        |
| 115,44         | CH       | C-6        |
| 115,84         | CH       | C-7        |
| 116,16         | CH       | C-8        |
| 116,67         | CH       | C-11       |

|        |    |      |
|--------|----|------|
| 119,96 | CH | C-7  |
| 121,88 | CH | C-13 |
| 125,88 | C  | C-12 |
| 129,53 | CH | C-14 |
| 130,71 | C  | C-2  |
| 143,87 | C  | C-10 |
| 145,32 | C  | C-9  |
| 145,91 | C  | C-12 |
| 145,96 | C  | C-4  |
| 148,82 | C  | C-5  |
| 166,10 | C  | C-17 |

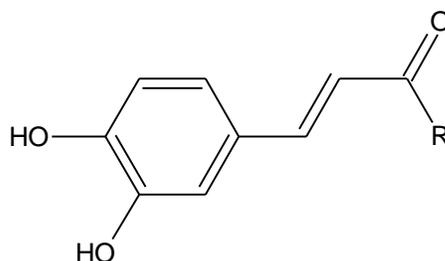
**Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN H-1 y C-13 del compuesto B**

| $\delta$ (ppm) | Dep. 135 | Asignación |
|----------------|----------|------------|
| 18,11          | CH3      | C-6'       |
| 18,51          | CH3      | C-6''      |
| 34,98          | CH2      | C-15       |
| 56,01          | CH2      | C-16       |
| 68,69          | CH       | C-2'       |
| 69,14          | CH       | C-3'       |
| 70,21          | CH2      | C-4'       |
| 70,38          | CH       | C-5'       |
| 70,50          | CH       | C-2''      |
| 71,65          | CH       | C-3''      |
| 74,49          | CH       | C-4''      |
| 79,04          | CH       | C-5''      |
| 101,17         | CH       | C-1'       |
| 102,27         | CH       | C-1''      |
| 113,56         | CH       | C-1        |
| 114,95         | CH       | C-5        |
| 115,44         | CH       | C-6        |
| 115,76         | CH       | C-8        |
| 116,28         | CH       | C-9        |

|        |    |      |
|--------|----|------|
| 119,50 | CH | C-12 |
| 121,36 | CH | C-1  |
| 125,49 | C  | C-7  |
| 130,17 | C  | C-2  |
| 143,53 | C  | C-4  |
| 144,97 | CH | C-5  |
| 145,54 | C  | C-10 |
| 148,46 | C  | C-11 |
| 165,65 | C  | C-17 |

Es conocido que el ácido cafeico y sus derivados (Figura 29) son compuestos de tipo catecol no flavonoide, los cuales están distribuidos en muchas plantas medicinales (Moridani y col., 2001). Entre los derivados simples de ácido cafeico incluyen amidas, ésteres de azúcar y glucósidos, y las formas más complejas incluyen el ácido rosmarínico (dímero), ácido litospérmico (trímero), verbascosido (éster heterosídico y glucósido de dihidroxifeniletanol y ácido cafeico), y los derivados de tipo flavonoide (Son y Lewis, 2002).

Se debe destacar que estos compuestos (A y B) fueron aislados e identificados por primera vez, en este estudio. Por lo tanto, este es el primer reporte de la actividad anti-inflamatoria de estos derivados de ácido cafeico obtenidos de las hojas de *J. copaia*.



**Figura 29. Estructura química del ácido cafeico** (Tomado y modificado de Shin y col., 2004)

El efecto fisiológico del ácido cafeico y sus derivados ha sido estudiado por muchos investigadores en los últimos años. Estos compuestos tienen propiedad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antiaterosclerótica, antioxidativa, antiproliferativa, inmunoestimuladora y neuroprotectora. Las propiedades de estos compuestos están asociadas a sus actividades antioxidantes y como inhibidores de enzimas o con su actividad de unión a receptores específicos (Son y Lewis, 2002).

Los derivados de ácido cafeico aislados de *J. copaia* en este estudio, principalmente el compuesto A, poseen actividad anti-inflamatoria (inhibición

de TNF- $\alpha$  y NO) según indican los resultados mostrados anteriormente. Esta actividad anti-inflamatoria también se ha encontrado con otros derivados de ácido cafeico obtenidos en otros estudios. Por ejemplo, el éster metílico del ácido cafeico es un potente inhibidor de la producción de NO, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y TNF- $\alpha$  (Shin y col., 2004). Otro ejemplo, es el éster fenetil del ácido cafeico que inhibe la producción de NO y PGE<sub>2</sub> dosis dependiente, en macrófagos Raw 264.7 estimulados con LPS (Jung y col., 2008). Tanto el éster metílico como el éster fenetil del ácido cafeico poseen efecto inhibitorio sobre la activación del factor NF- $\kappa$ B y se ha demostrado que este efecto es el mecanismo responsable de la inhibición de iNOS, COX-2 y TNF- $\alpha$ . En contraste con los resultados obtenidos en este estudio donde los dos derivados de ácido cafeico (compuestos A y B) no mostraron inhibición sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Esta diferencia pudiera deberse a la estructura química de cada compuesto.

## 6. CONCLUSIONES

- 1) El extracto crudo, la fracción E2, la subfracción E2II y los compuestos A y B mostraron un efecto citostático en células tumorales HT-29, 4T1 y HeLa, y en células macrofágicas RAW 264.7. Sólo la fracción E2 fue citotóxica a altas concentraciones en células HT-29, 4T1 y RAW 264.7.
- 2) El extracto crudo, la fracción E2, la subfracción E2II y el compuesto A mostraron un ligero efecto inhibitorio sobre la producción de TNF- $\alpha$ .
- 3) El extracto crudo, la fracción E2, la subfracción E2II y el compuesto A generaron un efecto inhibitorio mucho mayor sobre la producción de NO con respecto al efecto observado sobre la producción de TNF- $\alpha$ .
- 4) El extracto crudo y la fracción E2 mostraron un efecto inhibitorio a altas concentraciones sobre la activación del factor NF- $\kappa$ B. Sin embargo, este efecto se perdió en las subfracciones y compuestos durante el proceso de fraccionamiento realizado en este estudio.
- 5) Los compuestos A y B son derivados de ácido cafeico y este trabajo es el primer reporte de estos compuestos obtenidos de hojas de *J. copaia*.

## 7. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos *in vivo* y de esta manera evaluar si realmente el extracto crudo, fracción E2, subfracción E2II y los compuestos A y B obtenidos de *J. copaia* en este estudio, ejercen un efecto sobre el crecimiento de tumores y metástasis. De esta manera, comparar estos resultados con los obtenidos en otro estudio realizado *in vivo* (Villasmil y col. en 2006) que demuestra que el extracto hidroetanólico de *J. copaia* retrasó el crecimiento de tumor primario en ratones C57Bl/6 inoculados con células de melanoma murino B16/BL6, y también inhibió la producción de metástasis en pulmones de ratones.
- Sería interesante evaluar el efecto inhibitorio de *J. copaia* sobre la respuesta inflamatoria *in vivo* ya que se ha reportado un efecto inhibitorio de extractos de algunas plantas sobre los niveles séricos de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , NO e IL-6, producidos por ratones previamente estimulados.
- También sería de gran importancia evaluar el efecto de *J. copaia* sobre las proteínas ciclooxigenasas (COX) que intervienen en la síntesis de mediadores lipídicos inflamatorios denominados prostaglandinas (PG). Se ha demostrado que la mayoría de las drogas anti-inflamatorias, como por ejemplo la aspirina, actúan a través de una inhibición de esta enzima y así, la producción de PG (Pérez, 2010). Numerosos estudios clínicos, epidemiológicos y experimentales sugieren que las drogas anti-inflamatorias no esteroideas, particularmente los inhibidores selectivos de la enzima COX-2, tienen potencial como agentes anti-tumorales (Thum y col., 2002).
- Evaluar el efecto sobre otros factores de transcripción como lo son STAT1, ERF-1, AP-1, HIF-1, entre otros, y así determinar si en presencia de los compuestos derivados de hojas de *J. copaia* se lleva a cabo la expresión de la enzima iNOS (Kleinert y col., 2004).

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, E.D. 1987. Oncogenes in development. *Development*. **99**: 449-471.
- Anzai, H., Kitadai, Y., Bucana, C.D., Sánchez, R., Omoto, R., Fidler, I.J. 1996. Intratumoral heterogeneity and inverse correlation between expression of E-cadherins and collagenase type IV in human gastric carcinomas. *Differentiation*. **60**: 119-127.
- Arango, M.C., Llanes, L., Díaz, T., Foxas, M.E. 1997. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol*. **13(2)**: 126-134.
- Arias, J.I., Aller, M.A., Sánchez, F., Arias, J. 2006. Inflammation and cancer: Is trophism the link?. *Surg Oncol*. **15**: 235-242.
- Arvelo, F. Poupon, M.F. 2001. Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Cient Venez*. **52**: 304-312.
- Arvelo, F., Cotte, C. 2006. Metaloproteasas en la progresión tumoral. *Invest Clin*. **47(2)**: 185-205.
- Arvelo, F., Suárez, A., Galindo, I., Compagnone R., Usubillaga A. 2008. Productos Naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental (IBE)*. **5**: 69-72.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. **11**: 255-260.
- Balkwill, F. 2002. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?. *Cytokine & Growth Factor Rev*. **13**: 135-141.
- Balkwill, F., Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. **357**: 539-545.
- Barnes, P.J., Karin, M. 1997. Nuclear Factor - kB - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. **336(15)**: 1066-1071.
- Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T., Bersotti, P., Pitelli, M.R., Viale, G., Giavazzi, R. y colaboradores. 1996. The microtubule – affecting drug Paclitaxel has angiogenic activity. *Clin Cancer Res*. **2**: 1843-1849.
- Birchmeier, W., Behrens, J. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. **1198**: 11-26.

Bostrom, H., Willetts, K., Pekny, M., Leveen, P., Lindahl, P., Hedstrand, H., Pekna, M., Hellstrom, M., Gebe, S., Schalling, M. 1996. PDGF – A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Development*. **124**: 2691-2700.

Bremner, P., Heinrich, M. 2002. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*. **54(4)**: 453-72.

Capote, L. 2006. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol*. **18(4)**: 269-281.

Casas, L.A., Gómez, A. 2008. Asociación de polimorfismos genéticos de TNF- $\alpha$  e IL-10, citocinas reguladoras de la respuesta inmune, en enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. *Asociación Colombiana de Infectología*. **12(1)**: 264-279.

Cascino, I., Papoff, G., De María, R., Ruberti, G. 1994. Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmatic signaling domain protects tumor cells from Fas – mediated apoptosis. *J Immunol*. **156(1)**: 13-17.

Cavallaro, U., Christofori, G. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta*. **1552**: 39-45.

Chial H. 2008. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Educat*. **1(1)**. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/Proto-oncogenes-to-Oncoogenes-to-cancer-883> [Consulta: 10 de febrero de 2010]

Clark, B.R., Engvall, E. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. In: Maggio Edward T. Enzyme-immunoassay. CRC Press. **63**: 941-943.

Collins, K., Mitchell, J.R. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. **21**: 564-579.

Contreras, A.M. 2007. Estudio *in vitro* e *in vivo* del posible efecto anti-inflamatorio y anti-tumoral del extracto etanólico de una planta de la familia Piperacea *Piper maginatum*. Tesis de Licenciatura, Universidad central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Cooper G.M. 1993. The Cancer Book. <http://books.google.es> [Consulta: 28 de marzo de 2010]

Corado, J.A., Mora, S. 2003. Inmunología Actual. Alfa Impresores, Primera Edición, Valencia, Venezuela.

Cory, S. 1995. Regulation of lymphocytos survived by the Bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol*. **13**: 513-543.

Cosío, B.G., Torrego, A., Adcock, I.M. 2005. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol.* **41(1)**: 34-41.

Crinelli, R., Antonelli, A., Bianchi, M., Gentilini, L., Scaramucci, S., Magnani, M. 2000. Selective inhibition of NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of Dexamethasone. *Blood Cells Mol Dis.* **26(3)**: 211-222.

De Lange, T. 2005. Shalaterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**: 2100-2110.

DeVita V.T., Lawrence T.S., Rosenberg S.A., Weinberg R.A. 2008. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer. Principles & Practice of Oncology. Vol 1. Octava Edición. <http://books.google.co.ve> [Consulta: 5 de febrero]

El Bougrini, J., Dianoux, L., Chelbi-Alix, M.K. 2010. PML positively regulates interferon gamma signaling. *Biochimie.* doi:10.1016/j.biochi.2010.11.005.

el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* **1(1)**: 45-49.

Ewen, M.E. 1994. The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev.* **13(1)**: 45-66.

Fazio, A.L., Ballén, D., Cesari, I.M., Abad, M.J., Arsenak, M., Estrada, O., Taylor, P. 2010. Antitumour and anti-inflammatory activities in a hydroethanolic extract of *Lindackeria paludosa*, a South American shrub. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* **9(2)**: 143-150.

Fedi, P., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. 1997. Growth factors. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, M.D. Williams and Wilkins). Pp 41-64.

Folkman, J. 2003. Fundamental Concepts of the Angiogenic Process. *Curr Mol Med.* **3**: 643-651.

Fox, N. 1998. La mayoría de las plantas medicinales en la Reserva Jatun Sacha Ecuador. Guía informativa de los usos tradicionales. Pág 14. [http://www.sini-bodemer.de/docs/Plantas\\_Medicinales.pdf](http://www.sini-bodemer.de/docs/Plantas_Medicinales.pdf). [Consulta: 25 de marzo de 2010]

Frisch, S.M., Screatton, R.A. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* **13**: 555-562.

Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner D. y colaboradores. 1991. E-Cadherin – mediated cell – cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.* **113**: 173-185.

Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A., Abramsson, A., Calver, A., Bostrom, H., Willetts, K. y colaboradores. 1999. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development.* **126**: 457-467.

Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E., Shay, J.W. 1992. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* **12**: 2866-2871.

Fields, S., Jang, S.K. 1990. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science.* **249(4972)**: 1046-1049.

Gachet, M.S., Schühly, W. 2009. Jacaranda – An ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol.* **121**: 14-27.

Gao, C.F., Xie, Q., Koeman, J., Khoo, S.K., Gustafson, M., Knudson, B.S., Hay, R. y colaboradores. (2005). Proliferation and invasion plasticity in tumor cells. *PNAS.* **102**: 10528-10533.

Gasco, M., Shami, S., Crook, T. 2002. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **4**: 70-76.

Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C. y colaboradores. 2000. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet – derived growth factor (PDGF) - A – deficient mice. *J Cell Biol.* **149**: 1019-1025.

Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract.* **58(12)**: 1134-1141.

Gout, S., Tremblay, P.L., Huot, J. 2008. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis.* **25**: 335-344.

Hanahan, D., Weinberg, R. 2000. The hallmarks of Cancer. *Cell.* **100**: 57-70.

Harley, C.B. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?. *Mutat Res.* **256**: 271-282.

Hehner, S.P., Hofmann, Th.G., Dröge, W., Schmitz, M.L. 1999. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- $\kappa$ B by

targeting the I $\kappa$ B kinase complex. *The Journal of Immunology*. **163**: 5617-5623.

Hoch, R., Soriano, P. 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development*. **130**: 4769-4784.

Hofseth, L.J. 2008. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Lett*. **268**: 10-30.

Hotary, K.B., Allen, E.D., Brooks, P.C., Dalta, N.S., Long, M.W., Weiss, S. 2003. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three – dimensional extracellular matrix. *Cell*. **114**: 33-45.

Hussain, S.P., Harris, C.C. 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. **121**: 2373-2380.

Jackson, L., Evers, B.M. 2006. Chronic inflammation and pathogenesis of G1 and pancreatic cancers. *Cancer Treat Res*. **130**: 39-65.

Jung, W-H., Choi, I., Lee, D-Y., Yea, S.S., Choi, Y.H., Kim, M-M., Park, S-G. y colaboradores. 2008. Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF- $\kappa$ B pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. **40**: 2572-2582.

Jung, J-S., Kim, D-H., Kim, H-S. 2010. Ginsenoside Rh1 suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in IFN- $\gamma$ -stimulated microglia via modulation of JAK/STAT and ERK signaling pathways. *Biochem Biophys Research Commun*. **397**: 323-328.

Karin, M., Greten, F.R. 2005. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression (Reviews). *Immunology*. **5**: 749-759.

Karlsson, L., Bondjers, C., Betsholtz, C. 1999. Roles for PDGF - A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development*. **126**: 2611-2621.

Karlsson, L., Lindahl, P., Heath, J., Betsholtz, C. 2000. Abnormal gastrointestinal development in PDGF – A and PDGFR –  $\alpha$ ? Deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development*. **127**: 3457-3466.

Khail, A., Aziz, F., Price, P. 2006. Tumor necrosis factor: implications for surgical patients. *ANZ J Surg*. **76**: 1010-1016.

Kim, N.W., Pietyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M. y colaboradores. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **266**: 2011-2015.

Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P.M. 2004. Regulation of the expression inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. **500**: 255-266.

Kuramochi, H., Ichikawa, T., Nihei, N., Kawana, Y., Susuky, H., Schalken, J.A., Takeichi, M. y colaboradores. 1997. Suppression of invasive ability of highly metastatic rat prostate cancer by introduction of human chromosome 8. *Prostate*. **31**: 14-20.

Hoch, R., Soriano, P. 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development*. **130**: 4769-4784.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. 2008. Robbins Patología Humana. ELSEVIER SAUNDERS, Octava Edición, España. <http://books.google.co.ve/books?id=FTtwgi4Eh5oC&printsec=frontcover&dq=Patologia+Humana&cd=3#v=onepage&q&f=false> [Consulta: 20 de marzo de 2010]

Kundu, J.K., Surh, Y.J. 2008. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. **659**: 15-30.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. **2**: 787-795.

Lawrence, T. 2007. Inflammation and cancer: a failure of resolution?. *Trends Pharmacol Sci*. **28(4)**: 162-165.

Lechner, M., Lirk, P., Rieder, J. 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*. **15**: 277-289.

Levéen, P., Pekny, M., Gebre, S., Swolin, B., Larsson, E., Betsholtz, C. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular and hematological abnormalities. *Genes Dev*. **8**: 1875-1887.

Liu, G., Meng, X., Jin, Y., Bai, J., Zhao, Y., Cui, X., Chen, F. y colaboradores. 2008. Inhibitory role of focal adhesion kinase on anoikis in the lung cancer cell A549. *Cell Biol Int*. **32**: 663-670.

Llorens, J.A., Castell, V., Pascual, R. 2008. Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L procedente del término municipal de

Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales. *Xiloca*. **36**: 61-84

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scout, M., Zipursky, L. y colaboradores. 2004. *Molecular Biology*. Freeman and Company.

Luque, J., Harráez, A. 2006. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier, Madrid, España.

Mackay, J., Jemal, A., Lee, N., Parkin, M. 2001. *The Cancer Atlas*. American Cancer Society.

Mahmood, Z., Shukla, Y. 2010. Death receptors: Targets for cancer the therapy. *Exp Cell Res*. **316**: 887-899.

Mak, T.W., Yeh, W.C. 2002. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res*. **4(3)**: 243-252.

Matsuzaki, K., Murata, M., Yoshida, K., Sekimoto, G., Uemura, Y., Sakaida, N., Kaibori, M. y colaboradores. 2007. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor B. Signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **46(1)**: 48-57.

Mayoral, M.A., Zenteno, E., Espinosa, B., Martínez, S., Guevara, J. 2004. Enfoques moleculares de la metástasis tumoral. *REB*. **23(3)**: 117-122.

Mazzocca, A., Coppari, R., De Franco, R., Cho, J., Liebermann, T.A., Pinzani, M., Toker, A. 2005. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor – stromal interactions. *Cancer Res*. **65**: 4728-4738.

Meyn, R.E., Stephens, L.C., Mason, K.A., Medina, D. 1996. Radiation – induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and p53 status. *Int J Cancer*. **66**: 466-472.

Misyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Red, J.C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. **9**: 1799-1805.

Mocellin, S., Rossi, R.C., Pilati, P., Nitti, D. 2005. Tumor necrosis factor cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. **16**: 35-53.

Morales, L., Ariza, M. 2005. Eventos de señalización asociados al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). *Rev de la Facultad de Ciencias (Pontificia Universidad Javerian - Bogotá)*. **10**: 5-20.

Moridani, M.J., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., Orlie, P.J., 2001. Caffeic acid, chlorogenic acid and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab Dispos.* **29**: 1432-1439.

Mueller, M.M., Fusenig, N.E. 2004. Friends or foes – bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* **4(11)**: 839-849.

Munn, D.H., Pressey, J., Beall, A.C., Hudes, R., Alderson, M.R. 1995. Selective activation induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. *J Immunol.* **156(2)**: 515-522.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2008. Janeway's Immunobiology. Garland Science, Taylor & Francis Group, Séptima Edición New York, E.U.A.

Niers, T., Klerk, C., Di Nisio, M., Van Noorden, C., Bruller, H., Reitsma, P., Richel, D. 2007. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol.* **61**: 195-207.

Nussler, A.K., Billiar, T.R. 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* **54**: 171-178.

Ohshima, H., Tazawa, H., Sylla, B.S., Sawa, T. 2005. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res.* **591**: 110-122.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Sendurai, A.M., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A. 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* **68(3645)**: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.

Onishi, Y., Kizaki, H. 1994. Apoptosis and diseases. *Hum Cell.* **7(1)**: 27-32.

Oppenheimer, S.B. 2004. Cancer, a biological and clinical introduction. Upper Saddle River, Cuarta Edición, NJ, USA.

Oppenheimer, S.B. 2006. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and news advances. *Acta Histochem.* **108**: 327-334.

Organización de los Estados Americanos. Estudio de los casos de manejo ambiental: Desarrollo integrado de un área en los trópicos húmedos – Selva Central del Perú. 1987. Capítulo 7. Factores relacionados con la salud que afecta la ocupación de los trópicos húmedos americanos.

Washington, D.C. <http://www.oas.org/dsd/publications/unit/oea27s/begin.htm> [Consulta: 15 de marzo de 2010]

Paris, D., Patel, N., Ganey, N., Laporte, V., Quadros, A., Mullan, M.J. 2010. Anti-tumoral activity of a short decapeptide fragment of the Alzheimer's A $\beta$  peptide. *Int J Pept Res Ther*. Doi: 10.1007/S10989-010-9198-8. Pp 1-8.

Pérez, Y., Galindo, I., Arvelo, F. 2007. La muerte celular programada en las plantas: ¿Es semejante a la "apoptosis" en animales?. *INCl*. **32(12)**.

Pérez, C. 2010. La aspirina y los caminos diversos del desarrollo de nuevos fármacos. *Revista Química Viva*. **9(2)**: 65-75.

Philpott, M., Ferguson, L.R. 2004. Immunonutrition and Cancer. *Mutat Res*. **551**: 29-42.

Radhakrishnan, S.K., Kamalakaran, S. 2006. Pro-apoptotic role of NF- $\kappa$ B: Implications for cancer therapy. *Biochem Biophys Acta*. **1766**: 53-62.

Raycroft, L., Wu, H.Y., Lozano, G. 1990. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science*. **249(4972)**: 1049-1051.

Reap, E.A., Felix, N.J., Wolthusen, P.A., Kotzin, B.L., Cohen, P.L., Eisenberg, R.A. 1995. Bcl-2 transgenic Lpr mice show profound enhancement of lymphadenopathy. *J Immunol*. **115(1)**: 5455-5462.

Reiss, K., Ludwig, A., Saftin, P. 2006 Breaking up the tie: Disintegrin – like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther*. **111**: 985-1006.

Richmond, P.J., Karayiannakis, A.J., Nagafuchi, A., Kaisary, A.V., Pignatelli, M. 1997. Aberrant E-cadherins and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res*. **57**: 3189-3193.

Ríos, J.L., Recio, M.C., Escandell, J.M., Andujar, I. 2009. Inhibition of Transcription Factors by Plant – Derived compounds and their implications in inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. **15(11)**: 1212-1237.

Rodríguez, E. 2006. Plants and animals utilized as medicines in the Ján National Park (JNP), Brazilian Amazon. *Phytother Res*. **20**: 378-391.

Roth, I., Lindorf, H. 2002. South American Medicinal Plants. Springer, New York.

Salazar, R., Soihet C., Méndez, J.M. 2000. *Jacaranda copaia* (Aubl) D. Don. Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. *Nota técnica sobre manejo de semillas forestales N°59*. **1**: 117-118. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/a0008s/a0008s.htm> [Consulta: 26 de marzo de 2010]

Sánchez, L., Hernández, J.M., López, R. 2005. Papel de las cadherinas en la metástasis. *REB*. **24(3,4)**: 97-103.

Sauvain, M., Dedet, J.P., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Kunesch, G. 1993. In vitro and in vivo leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids. *Phytother Res*. **7**: 167-171.

Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reymolds, A.B., Parsons, J.T. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein – tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89(11)**: 5192-5196.

Schottenfeld, D., Dimmer, J.B. 2006. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin*. **56**: 69-83.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. 2004. Interferon- $\gamma$ : overview of signals, mechanisms and functions. *J Leuko Biol*. **75**: 163-189.

Shay, J.W. 2003. Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal. *Clin Cancer Res*. **9**: 3521-3525.

Shay, J.W., Bacchetti, S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. **5**: 787-791.

Shay, J.W., Keith, W.N. 2008. Targeting telomerase for cancer therapeutics. *Br J Cancer*. **98**: 677-683.

Sherr, Ch.J. 2000. The Pezcoller Lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*. **60**: 3689-3695.

Shida, D., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Hama, K., Aoki, J., Arai, H., Yamashita, H. y colaboradores. 2004. Dual mode regulation of migration by lysophosphatidic acid in human gastric cancer cells. *Exp Cell Res*. **301**: 168-178.

Shin, K-M., Kim, I-T., Park, Y-M., Ha, J., Choi, J-W., Park, H-J., Lee, Y.S., y colaboradores. 2004. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandina E<sub>2</sub>, nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Biochem Pharmacol*. **68**: 2327-2336.

- Silletti, S., Paku, S., Raz, A. 1998. Autocrine motility factor and the extracellular matrix. II. Degradation or remodeling of substratum components directs the motile response of tumor cells. *Int J Cancer*. **76(1)**: 129-135.
- Silvestri, F., Ribatti, D., Nico, B., Silvestri, N., Romito, A., Dammacco, F. 1995. Apoptosis or programmed cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms. *Ann Ital Med Int*. **10(1)**: 7-13.
- Simpson, C.D. Anyiwe, K., Schimmer, A.D. 2008. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*. **272**: 177-185.
- Skoudy, A., Llosas, M., Garcia, A. 1996. Intestinal HT-29 cells with dysfunction of cadherins show increased pp60src activity tyrosine phosphorylation of p20 – catenin. *Biochem J*. **317**: 279-284.
- Son, S., Lewis, B.A. 2002. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure – Activity relationship. *J Agric Food Chem*. **50**: 468-472.
- Soriano, P. 1994. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF  $\alpha$  – receptor mutant mice. *Genes Dev*. **8**: 1888-1896.
- Stratford, A.L., Habibi, G., Astanehe, A., Jiang, H., Hu, K., Park, E., Shadeo, A. y colaboradores. 2007. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal – like breast cancer, providing a potential target for therapy. *Breast Cancer Res*. **9(5)**: 1-14.
- Sonveaux, P., Jordan, B.F., Gallez, B., Feron, O. 2009. Nitric oxide delivery to cancer: why and how?. *Eur J Cancer*. **45**: 1352-1369.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*. **3**: 276-284.
- Sun, X.F., Zhang, H. 2007. NF $\kappa$ B polymorphisms in relation to susceptibility of tumor and other diseases. *Histol Histopathol*. **22**: 1387-1398.
- Takeichi, M. 1988. The cadherins: cell – cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. **102**: 639-655.
- Taylor, P.G., Cesari, I.M., Arsenak, M., Ballen, D., Abad, M.J., Fernández, A., Milano, B. y colaboradores. 2006. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. *Pharm Biol*. **44**: 349-362.

Tenorio, F.A., del Valle, L., Pastelín, G. 2005. Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Rev Mex Cienc Farma.* **36(1)**: 31-41.

Thum, M.J., Henley, S.J., Patrono, C. 2002. Review: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacology, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* **94(4)**: 252-266

Vichai, V., Kirtikara, K. 2006. Sulforodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protocols.* **1(3)**: 1112-1115.

Villasmil, J., Abad, M.J., Arsenak, M., Fernández, A., Ruiz, M.C., Williams, B., Michelangeli, F. y colaboradores. 2006. Cytotoxic and antitumor activities of Venezuelan plant extracts in vitro and in vivo. *Pharmacologyonline.* **3**: 808-816.

Villasmil, J., Arsenak, M., Fernández, A., Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Fraile, S., Mailló, M. y colaboradores. 2008. Efecto antitumoral y anti-inflamatorio de un extracto en solvente no polar de hojas de Jacaranda copaia. *LVIII Convención Anual de ASOVAC.* San Felipe, Venezuela, 30 de noviembre – 5 de diciembre.

Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W., Van Roy, F. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* **66**: 107-119.

Vyas, D.M. 1995. Paclitaxel (Taxol®) Formulation and prodrugs. In: Farina, V. (Ed). *The Chemistry and Pharmacology of Taxol and its Derivatives.* Elsevier Science. British Vancouver.

Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* **81**: 323-330.

Weinstein, I.B., Joe, A.K. 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction – a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol.* **3**: 448-457.

Weiss, L. 1985. Principles of metastasis. Academic Press, New York.

Wike, J.A. 2000. Overview burgeoning promise in metastasis research. *Eur J Cancer.* **36**: 1589-1594.

Willis, R.A. 1973. The spread of tumors in the human body. Tercera Edición, Lóndres, Paris.

Wolff, D.J., Gauld, D.S., Neulander, M.J., Southan, G. 1997. Inactivation of Nitric Oxide Synthase by substituted aminoguanidines and aminoisothioureas. *J Pharmacol Exp Ther.* **283(1)**: 265-273

Wood, S.J.R. 1958. Pathogenesis and metastasis formation observed in the rabbit ear chamber. *AMA Arch Pathol.* **66**: 550-568.

Wood, J.S., Holyoke, E.D., Yardley, J.H. 1966. Mechanisms of metastasis production by blood borne cancer cells. *Can Cancer Conf.* **4**: 167-223.

Wright, W.E., Shay, J.W. 2000. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med.* **6**: 849-851.

Zee, Y., O'Connor, J.P., Parker, G.J., Jackson, A., Clamp, A.R., Taylor, M.B., Clarke, N.W. y colaboradores. 2010. *Nat Rev Urol.* **7**: 69-82.

Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. 1994. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene.* **9(12)**: 3743-3751.

### Consultas en Líneas:

American Cancer Society. 2011. <http://www.cancer.org> [Consulta: el 25 de mayo de 2011]

Bender MedSystems an eBioscience Company. 2007. <http://www.bendermedsystems.com> [Consulta: 27 de septiembre de 2010]

Instituto Nacional del Cáncer. 2010. Tratamiento del cáncer. <http://www.cancer.gov/español/cancer/tratamiento> [Consulta: 27 de marzo de 2010]

New Hope Blog. 2007. [http://www.newhopeblog.com/poster\\_metastasis.jpg](http://www.newhopeblog.com/poster_metastasis.jpg) [Consulta: 17 de noviembre de 2009]

Panoramio. 2007. <http://www.panoramio.com/photo/5096042> [Consulta: 5 de enero de 2010]

Promega. Steady-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System. 2005. <http://www.promega.com> [Consulta: 29 de Julio de 2010]

Promega: Tchnical Bulletin. The CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. 2009. <http://www.promega.com> [Consulta: 10 de enero de 2010]

Rodrigo, J., Alonso, D., Fernández, A.P., Serrano, J., López, J.C., Encinas, J.M., Fernández, P. y colaboradores. 2010. El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad. <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/n2/colab.html> [Consulta: 10 de enero de 2010]

Timerime. <http://timerime.com/users/385/media/cancer/genes-cancer.gi> [Consulta: 10 de diciembre de 2010]

World Health Organization. 2011. <http://www.who.int/en/> Consulta: 25 de mayo de 2011]