

ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO* FRENTE A CÉLULAS TUMORALES

**Ana Carolina Martínez-Torres, Ashanti Concepción
Uscanga-Palomeque, Cristina Rodríguez-Padilla**

Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

ana.martinezto@uanl.edu.mx, ashanti.uscangapl@uanl.edu.mx,
cristina.rodriguezpd@uanl.edu.mx

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.318>

Martínez-Torres, A.C., Uscanga-Palomeque, A.C., & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 269-312.

Resumen

Los extractos de plantas medicinales han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad para el tratamiento de diferentes enfermedades. Actualmente, con los avances en diversas áreas de la ciencia, el conocimiento tradicional y popular sobre las plantas medicinales puede ser constatado y validado. Para ello normalmente se busca determinar si estas tienen potencialmente algún efecto deseado contra alguna patología. Dentro de las diversas patologías que afectan al humano se encuentra el cáncer, que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por diversas alteraciones a nivel celular que llevan a un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas, provocando anormalidades en el funcionamiento del organismo. Este grupo de enfermedades se ha vuelto un blanco importante de las investigaciones actuales. Por esta razón, el estudio del efecto de extractos o derivados de plantas que puedan tener un impacto sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales se ha vuelto de vital importancia. Esto con el fin de encontrar diferentes y mejores alternativas antitumorales basadas en derivados de plantas. En este capítulo se presentarán algunos ejemplos de plantas que han mostrado un efecto citotóxico *in vitro* frente a líneas celulares tumorales, además se mencionarán moléculas obtenidas de plantas que son usadas como medicamentos de primera línea contra el cáncer, y finalmente se describirán algunos de los principales métodos que permiten corroborar la citotoxicidad potencial de extractos u otros derivados de plantas sobre células tumorales y sanas. Se espera que al final del capítulo el lector tenga una visión general del interés de estudiar la actividad citotóxica de derivados de plantas sobre células tumorales.

Palabras clave

Extractos de plantas, muerte celular, cáncer.

9.1. Introducción

Desde sus orígenes, el ser humano ha utilizado la naturaleza para cubrir sus necesidades elementales, tales como la producción de alimentos, refugio, ropa, medios de transporte, fertilizantes, saborizantes y medicinas. Las plantas han formado la base de la medicina tradicional, por lo que el uso de estas y los métodos de su aplicación para el tratamiento de ciertas dolencias específicas se han transmitido a través de la palabra, de generación en generación. Con el tiempo, la información sobre la utilización de plantas medicinales se fue registrando en herbarios, lo que permitió tener un mejor registro de las plantas con propiedades de interés para el hombre (Balunas & Kinghorn, 2005). Históricamente, los medicamentos a base de hierbas se utilizaron como tinturas, emplastos, polvos, y té, seguido de formulaciones, y compuestos puros.

Los extractos de plantas medicinales han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad para tratar diferentes dolencias y, a pesar de que algunas de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas han demostrado ser erróneas, la herbolaria medicinal se basa en los hallazgos empíricos de miles de años y ha logrado proporcionar medicamentos valiosos. Entre estos se encuentran los analgésicos (morfina), antitusígenos (codeína), antihipertensivos (reserpina), cardiotónicos (digoxina), antipalúdicos (quinina y la artemisinina), y antineoplásicos (vinblastina y taxol) (Gurib-Fakim, 2006; Ramawat, Dass & Mathur, 2009).

Actualmente, con los avances en botánica, fitoquímica, farmacología, y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas debe ser constatado y validado. Para ello normalmente se busca determinar si estas tienen potencialmente algún efecto deseado contra alguna patología. Dentro de las diversas patologías que afectan al humano se encuentra el cáncer, que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por diversas alteraciones a nivel celular que llevan a un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas (Hanahan & Weinberg, 2011), provocando anomalías en el funcionamiento del organismo.

Debido a los efectos devastadores del cáncer, esta patología se ha vuelto un blanco importante de las investigaciones actuales. Por esta misma razón, investigaciones en todo el mundo se basan en probar el efecto de extractos o derivados de plantas sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales. Esto con el fin de

encontrar diferentes y mejores alternativas antitumorales basadas en derivados de plantas. Para estos análisis de escaneo, se suelen utilizar líneas celulares tumorales y se analiza si estos derivados de plantas son capaces de afectar su crecimiento, y/o viabilidad. Para ello existen una variedad de pruebas de citotoxicidad disponibles, que se utilizan comúnmente en laboratorios de investigación.

En este capítulo se presentarán algunos ejemplos de plantas que han mostrado un efecto citotóxico *in vitro* frente a líneas celulares tumorales, ejemplos de derivados de plantas que son usados como medicamentos de primera línea contra el cáncer, y finalmente se describirán algunos de los principales métodos que permiten corroborar la citotoxicidad potencial de extractos u otros derivados de plantas.

9.2. Extractos de plantas con actividad citotóxica

La selección de especies de plantas útiles en el desarrollo de medicamentos puede basarse en dos estrategias principales: la selección aleatoria y los conocimientos médicos tradicionales. Este último enfoque incluye plantas usadas en sistemas organizados de medicina tradicional como la herbolaria, el folclor, y el chamanismo, que han demostrado de manera empírica tener un efecto curativo (Pieters & Vlietinck, 2005).

Los trabajos de Jonathan Hartwell muestran que las plantas han sido empleadas en el tratamiento de enfermedades malignas desde hace 3500 años (Graham, Quinn, Fabricant & Farnsworth, 2000; Hartwell, 1982). Actualmente existen en el mercado 175 medicamentos utilizados contra el cáncer en Estados Unidos de América, de los cuales aproximadamente el 75% son de origen natural (Newman & Cragg, 2007). Además, hoy en día aproximadamente el 25% de todas las recetas médicas contienen uno o más ingredientes activos derivados de plantas (Pan et al., 2013). A continuación resumiremos algunos trabajos en donde se evalúa la actividad citotóxica de los extractos de diversas plantas empleadas en la medicina tradicional de diferentes países alrededor del mundo.

Alonso-Castro y su grupo de investigación, señalan que se han registrado 300 especies de plantas pertenecientes a 90 familias botánicas que son utilizadas para el tratamiento del cáncer, de los cuales sólo 181 han sido analizados experimentalmente en México (Alonso-Castro et al., 2011). Tan sólo 88 extractos

han presentado actividad citotóxica *in vitro*, sobre líneas celulares de cáncer. Un total de 187 compuestos se han aislado, de los cuales 77 (41%) han demostrado citotoxicidad y de los cuales, diecisiete principios activos no se han reportado en otras especies de plantas, haciéndolos atractivos para su investigación como posibles moléculas antineoplásicas (Alonso-Castro et al., 2011). Como ejemplo de estos estudios Mena-Rejon y colaboradores trabajaron con extractos de 9 plantas obtenidas de la península de Yucatán, y empleadas comúnmente por los mayas. Los extractos que obtuvieron fueron retados contra cuatro líneas celulares de cáncer humano: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de laringe (Hep-2), adenocarcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma escamoso de cérvix (SiHa), y una línea no tumoral, las células de riñón canino (MCDK). De los 16 extractos, 4 mostraron actividad contra células HEP-2; 5 contra células HeLa, 8 contra células SiHa y 4 mostraron efectos citotóxicos tanto en SiHa y HeLa. Ninguno de los extractos ensayados mostró una citotoxicidad significativa en las células KB y solo un extracto mostró alta actividad citotóxica sobre las células no tumorales (MDCK) (Mena-Rejon et al., 2009).

En Sudamérica, un estudio realizado por Laundry de Mesquita y colaboradores en el 2009, investigó el potencial citotóxico de 412 extractos derivados de 50 plantas brasileñas utilizadas en la medicina tradicional, dichos extractos se obtuvieron utilizando etanol, hexano, diclorometano y con una solución hidroetanólica. Estos se probaron contra 4 líneas celulares: carcinoma de colon humano (HCT-8), carcinoma mamario (MDA-MB-435), cerebro (SF-295), y leucemia aguda (HL-60). Sus resultados muestran que de los 412 extractos, 28 presentan un efecto antiproliferativo importante a 50 µg/mL, inhibiendo por lo menos el 85% de la proliferación de las cuatro líneas tumorales (de Mesquita et al., 2009).

En el sur de Asia, un trabajo muestra la actividad citotóxica de 23 extractos metanólicos derivados de 19 plantas medicinales de Bangladesh. La toxicidad fue evaluada tanto en líneas celulares no tumorales (fibroblastos de ratón, NIH3T3, y células de riñón de mono, VERO), como en malignas (Cáncer de mama humano, MCF7 y MDA-MB-231, colon, HT-29, y cáncer gástrico, AGS). En este estudio los extractos de *Aegicera corniculatum* e *Hymenodictyon excelsum* mostraron citotoxicidad no específica, eliminando tanto a células sanas como cancerosas. Mientras los extractos de *Clitoria ternatea*, *Jasminum sambac*, y *Mussaenda glabrata*, entre otras, presentaron citotoxicidad sólo en las líneas malignas (Akter, Uddin, Grice & Tiralongo, 2014).

En Europa, Cattaneo y colaboradores, trabajaron en el 2015 con el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero), donde observaron su potencial quimioprotector y antiproliferativo en células de melanoma, A375. Además, separaron compuestos puros derivados de dicha planta, pero observaron que para lograr el efecto antiproliferativo era necesario el extracto completo, debido a efectos multifactoriales de los componentes (Cattaneo et al., 2015).

También en Sudán, África, un país con una tradición herbolaria reconocida, realizaron un estudio a 35 diferentes especies de plantas (65 extractos crudos). Obteniendo que 3 especies vegetales *Lamsonia inermis*, *Trigonella foenum-graecum* y *Ambrosia maritima* tienen un potencial citotóxico sobre diferentes líneas celulares incluidas células de leucemia (CEM), cáncer de colon (HCT116), células de glioblastoma (U87) y una línea de riñón de embrión humano (HEK293), por lo que los componentes activos de estas plantas pueden ser considerados como candidatos prometedores para el desarrollo de agentes antitumorales (Saeed, Abdelgadir, Sugimoto, Khalid & Efferth, 2015).

Como estos, hay muchos otros ejemplos de investigaciones que son realizadas alrededor del mundo con el fin de encontrar potenciales tratamientos sobre el cáncer, basados también en el estudio de la actividad citotóxica de extractos de plantas, o derivados de estos, sobre diversas líneas celulares tumorales.

El conocimiento de las plantas medicinales y sus propiedades ha sido de gran importancia para el desarrollo de nuevos medicamentos de una sola molécula que son usados en el sistema moderno de la medicina (Ramawat et al., 2009). Esto se ha demostrado por la alta utilización de agentes antitumorales como la vinblastina, la vincristina y el paclitaxel, que son empleados ampliamente como agentes quimioterapéuticos de primera línea frente a diversos tipos de cáncer (Ramawat et al., 2009). A continuación daremos más detalles sobre éstos y otros agentes antineoplásicos.

9.3. Derivados de plantas: fármacos con actividad antitumoral

Para obtener medicamentos seguros, útiles y eficaces, es importante estudiar el efecto citotóxico de plantas con potenciales usos medicinales. A finales del 2013, la FDA había aprobado el uso de 547 productos naturales, incluyendo sus derivados, representando más de un tercio (38%) de todas las nuevas entidades moleculares aprobadas por la FDA (Patridge, Gareiss, Kinch & Hoyer,

2015). Dichos medicamentos incluyen tratamientos para el cáncer, enfermedades neurológicas, cardiovasculares, metabólicas e inmunológicas, y desórdenes genéticos (Patridge et al., 2015). Diez derivados de plantas son fármacos actualmente utilizados clínicamente para varios tipos de cánceres: 1) el Paclitaxel y 2) Docetaxel, obtenidos a partir de especies de *Taxus*; 3) la vinblastina, 4) la vincristina, 5) vindesina y 6) vinorelbina de *Catharanthus roseus*; 7) el topotecan y 8) el irinotecan, obtenidos a partir de *Camptotheca accuminata*; y 9) el etopósido y 10) el tenopósido, obtenidos de *Podophyllum peltatum* (Patwardhan, Warude, Pushpangadan & Bhatt, 2005). A continuación se darán más detalles sobre cada uno de estos fármacos.

El **Paclitaxel (Taxol)** y **Docetaxel (Taxotere)** son diterpenos aislados de la corteza de *Taxus brevifolia*. A pesar de que el interés por este árbol se dio en 1960, ya se conocían las propiedades medicinales del árbol del tejo desde siglos atrás. A este árbol se le denominaba «árbol de la muerte» por sus características venenosas; las tribus norteamericanas las usaban como desinfectante, para provocar el aborto, así como para el tratamiento del cáncer de piel (Nicolaou, Guy & Potier, 1996). En 1964 el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) encontró que un extracto de la corteza *Taxus brevifolia*, era tóxico para los cultivos de células de leucemia. Sin embargo, el aislamiento del compuesto responsable de la citotoxicidad fue realizado en 1967 por Mansuck C. Wani y Monroe E. Wall y lo nombraron Taxol, ya que comparte similitudes químicas con la familia de taxanos, además de que se obtuvo de una planta del género *Taxus* (Orbelies y Kroll, 2004). El mecanismo de acción del paclitaxel y docetaxel, ambos compuestos conocidos como taxanos, consiste en su unión a los microtúbulos, afectando de manera dinámica la división celular e induciendo la muerte de las células en constante replicación (Rowinsky & Donehower, 1995; Tannock & Hill, 1998).

El paclitaxel comenzó a utilizarse en 1993 en el tratamiento del cáncer de ovario, de pulmón, sarcoma de Kaposi, y cáncer de mama, mientras que el docetaxel se aprobó en Estados Unidos en 1996 para su uso en cáncer de mama (Shu, 1998). Estos fármacos atacan preferentemente a las células cancerosas, ya que se dividen con mayor frecuencia que las no tumorales. Sin embargo, existen células normales con una alta tasa de proliferación, como los linfocitos y los folículos pilosos, que con frecuencia son afectados por el uso de estas terapias. Esta afectación tiene como consecuencia la depresión del sistema inmune, el retraso de las sanciones nerviosas, náuseas y pérdida de cabello (Tannock & Hill, 1998).

La **Vinblastina (Alkaban-AQ, Velban)** y **Vincristina (Oncovir, Vincasar)** se aislaron de una planta usada para el tratamiento de la diabetes: *Catharanthus roseus* (Vinca de rosada) (Cragg et al., 1994). Posteriormente con modificaciones químicas se logró obtener compuestos semisintéticos como la **Vinorelbina (Navelbine)** y **Vindesina (Eldisine)** (Newman, Cragg & Snader, 2000; Newman, Cragg & Snader, 2003; Newman & Cragg, 2007).

La vincristina junto con otros medicamentos se emplea para tratar leucemia linfocítica infantil aguda, cáncer de cervicouterino, de colon, de mama, entre otros carcinomas (de Moura, de Se Silva, de Oliveira, Diniz & Barbosa-Filho, 2002). La vinblastina se ha empleado para tratar el linfoma de Hodgkin, carioepitelioma y cáncer de ovario (Silva, Moura, Oliveira, Diniz & Barbosa-Filho, 2003). La vinorelbina, se utiliza para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico y para las metástasis de cáncer de mama (Vega-Ávila, Velasco-Lezama & Jiménez-Estrada, 2006), mientras que la vindesina es empleada para tratar leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de mama y de pulmón (Ohta et al., 1993).

Estos compuestos son alcaloides que se unen a la tubulina, evitando la polimerización de los dímeros de tubulina y por ende la formación de los microtúbulos, los cuales son de vital importancia para la formación del huso en la célula que entrará en mitosis. Cuando el complejo tubulina-alcaloide se une a los microtúbulos trae como consecuencia que la célula en división, sea arrestada en la fase M del ciclo celular (Warber, 1999).

La **Camptotecina** fue aislada de la *Camptotheca acuminata*, árbol de ornato chino, sus extractos fueron investigados en la década de los 50 como fuente de saponinas esteroidales para su posterior conversión en cortisona (Cragg et al., 1994), observándose que el principio activo era la camptotecina (Oberlies & Kroll, 2004). Sin embargo, debido a la alta toxicidad de la sal sódica de la camptotecina, la evaluación clínica de este extracto fue suspendida (Newman et al., 2000). Y fue hasta 1985 que el interés por esta molécula se retomó debido a que su mecanismo de acción que involucra a la topoisomerasa I, una enzima encargada del relajamiento del ADN durante la replicación (Cragg & Newman, 2004). Esta molécula fue modificada químicamente y se obtuvieron distintos compuestos químicos como el **Topotecan (Hycamtin)**, aprobado posteriormente para el tratamiento contra el cáncer de ovario en 1996 en Estados Unidos (Shu, 1998), el **Irinotecan (Camptosar)**, usado en Japón desde 1994 y posteriormente aprobado en EUA en 1996, para tratar el cáncer colorrectal, ovario, y pulmón (Oberlies & Kroll,

2004; Shu, 1998). Otros compuestos derivados de la camptotecina son el 9-amino camptotecina (9-AC) y 9-nitro-camptotecina (9-NC) los cuales presentaron un mayor efecto citotóxico que la irinotecan y la topotecan (Shu, 1998), pero los estudios clínicos de fase dos en los que se emplea la 9-aminocamptotecina no mostraron actividad en contra de cáncer colorectal ni de pulmón (Takimoto & Thomas, 2000). Por otro lado la 9-nitro-camptotecina ha sido probada en pacientes con sarcoma avanzado y cordoma (fase II), donde se obtuvo que 9-NC tiene actividad modesta en el retraso de la progresión en pacientes con cordoma metastásico, y está asociado con toxicidad moderada y muestra pocos beneficios en pacientes con sarcoma de tejidos blandos avanzado (STB) y tumor del estroma gastrointestinal (GIST) (Chugh, 2005). Por lo que tan solo el irinotecan y el topotecan son los únicos derivados de la camptotecina, que se emplean clínicamente (Takimoto & Thomas, 2000).

Estos estudios corroboraron que el bloqueo de la actividad de la topoisomerasa I puede ser usado como blanco terapéutico, ya que esta enzima se ha encontrado sobreexpresada en los tumores malignos (Husain, Mohler & Seigler, 1994). La camptotecina y sus análogos (CPT's) actúan al enlazarse con el ADN-Topo I, lo que estabiliza dicho complejo divisible, evitando así la liberación del ADN y por lo tanto la replicación (Fan, Weinstein, Kohn, Shi & Pommier, 1998).

El **Etopósido** y **Tenipósido** son derivados semisintéticos provenientes de un lignano conocido como podofilotoxina 1, extraído de la planta *Podophyllum peltatum*. Estos fármacos resultan útiles en el tratamiento de neoplasias como linfomas, leucemias agudas, sarcoma de Kaposi asociado a al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, y cánceres de pulmón, ovario, testículo, vejiga, y cerebro (Xiao et al., 2004). La podofilotoxina 1 es un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina y es empleado como tratamiento tópico para verrugas genitales causadas por algunos tipos de virus del papiloma humano (VPH) y otras verrugas externas, este compuesto se comercializa bajo el nombre de Condylox (gel) y Wartec (solución o crema) (Xu, Lv & Tian, 2009). El etopósido y tenipósido actúan como inhibidores de la topoisomerasa II, una enzima nuclear que resuelve diversos problemas topológicos del ADN, los cuales surgen en procesos biológicos involucrados en la división celular, tales como transcripción, recombinación-replicación y reparación cromosómica (Alton y Harris, 1993). Tanto el etopósido como el tenipósido han sido sometidos a modificaciones estructurales, esto para mejorar su eficiencia clínica así como para superar algunos problemas asociados a su uso como el desarrollo de resistencias, mielosupresión, y baja biodispo-

nibilidad por vía oral. Algunos productos generados son TOP53, GL331, y el etopofos (Abad-Reyes et al., 2008).

Los compuestos anteriormente mencionados son un claro ejemplo de la utilización de derivados de plantas como tratamientos efectivos contra neoplasias. Esto incentiva la búsqueda de otros derivados de plantas que permitan la caracterización y utilización de nuevas moléculas útiles para el tratamiento del cáncer. Para el estudio de estos efectos es importante verificar si estos inducen la muerte de la célula. Antes se buscaba que estos fueran capaces de inducir apoptosis, sin embargo ahora se sabe que existen diversos tipos de muerte celular, de formas novedosas y útiles para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer resistentes a las terapias convencionales. A continuación se detallará como diferenciar una célula muerta de una célula viva y se presentan los principales tipos de muerte conocidos.

9.4. Muerte celular: Un objetivo clave de extractos de plantas con actividad antitumoral

La muerte celular es un proceso altamente complejo, mediante el cual la célula activa su propia maquinaria y se autodestruye. Como se menciona anteriormente, las células cancerosas tienen defectos a nivel celular que las vuelven resistentes a este proceso fisiológico y juegan un papel crucial en el crecimiento tumoral. Por esta razón, el estudio de la muerte celular se ha vuelto de gran interés, con el fin de poder reactivar este proceso alterado en las células de cáncer. A través de estos últimos años se han adquirido conocimientos que permiten una mejor comprensión de los procesos que la célula lleva a cabo para autodestruirse. El análisis de la muerte celular ha ido mejorando con la adquisición de nuevos y mejores datos generados a partir de los avances tecnológicos en la microscopía, citología, inmunología, biología molecular, bioquímica, entre otras ramas de las ciencias naturales.

Desde un punto de vista conceptual, la muerte celular, puede ser definida como la degeneración permanente de las funciones celulares vitales. Sin embargo, el límite preciso entre una alteración reversible en la homeostasis y una pérdida irreversible de las actividades celulares es difícil de identificar. Para ello el Comité de Nomenclatura de la muerte celular (NCCD) (Galluzzi et al., 2012) propuso tres criterios para identificar a las células muertas, y cuatro procesos celulares que son considerados puntos no reversibles de una célula moribunda (Tabla 1).

Criterios morfológicos y moleculares para identificar a una célula muerta	La pérdida de la integridad de la membrana plasmática, llevando a la destrucción de la identidad celular
	La fragmentación de la célula (incluido su núcleo)
	La fagocitosis de la célula, por células dotadas con actividad fagocítica
«Puntos de no regreso» que identifican a una célula moribunda	La activación masiva de proteasas «de muerte» (Ej. caspasas)
	Pérdida del potencial membranar mitocondrial
	Permeabilización de la membrana mitocondrial
	Exposición extracelular de fosfatidilserina

Tabla 1. Criterios establecidos por el Comité de Nomenclatura de la muerte celular para identificar a una célula muerta y diferenciarla de una célula moribunda

Se considera que una célula está comprometida a morir, cuando reúne al menos dos puntos de no regreso al mismo tiempo. Si sólo uno de ellos es detectado, la célula podría evadir la muerte, por lo que es importante evaluar al menos dos de estos parámetros. Por otro lado, si la célula cumple con al menos uno de los 3 criterios que identifican a una célula muerta, se puede asegurar que la célula ha perdido sus funciones vitales.

Dependiendo del mecanismo de muerte celular activado por un agente citotóxico, la muerte puede ser clasificada en muerte celular accidental (MCA) y muerte celular regulada (MCR) (Galluzzi et al., 2014). La MCA es un tipo de muerte prácticamente instantánea, causada por agravios severos, físicos (altas temperaturas o presiones), químicos (detergentes potentes o variaciones en el pH) o mecánicos, insensibles a cualquier tipo de intervención farmacológica o genética. Este proceso no involucra la activación de la maquinaria celular y, aunque puede ocurrir *in vivo* (por ejemplo en traumatismos severos), no puede ser prevenida ni modulada. Esto implicaría la falta de selectividad y daño en tejidos sanos circundantes. Por otro lado, la MCR involucra la activación de una maquinaria molecular codificada genéticamente. Además, este proceso generalmente culmina en la eliminación fisiológica por fagocitosis de la célula muerta o moribunda, debido a la exposición extracelular de fosfatidilserina en la membrana plasmática, evitando daños colaterales causados por la inducción de este proceso. Por estas razones es

importante discernir si la muerte celular inducida por algún derivado de planta induce MCA o MCR, ya que las consecuencias fisiológicas de estos dos tipos de muerte son muy diferentes.

La comprensión de ciertas características de los procesos de muerte nos ayuda a entenderlos mejor y por lo tanto a saber cómo explotarlos en situaciones en que las células sufren de su desregulación, como en el caso del cáncer. A continuación se describen brevemente tres de los tipos principales de MCR.

- **Apoptosis:** Es el tipo de MCR más estudiado, y se manifiesta morfológicamente por la formación de ampollas en la membrana, la activación de caspasas (cisteín-proteasas de muerte), la condensación nuclear y picnosis, la reducción del volumen citoplasmático, y la fragmentación nuclear y celular (Galluzzi et al., 2012). La activación bioquímica de la apoptosis se produce a través de dos vías generales: la vía intrínseca, que lleva a la activación de la caspasa 9 y la vía extrínseca, proveniente de la activación de los receptores de muerte de la superficie celular, y que resulta en la activación de la caspasa 8 o 10. Estas convergen en la activación de las caspasas efectoras, 3, 6, y/o 7, que llevan al corte de sustratos que dan a la célula moribunda sus características morfológicas distintivas (Kroemer et al., 2009).
- **Autofagia:** La muerte por autofagia es un proceso en el cual el citoplasma y los organelos son secuestrados masivamente en vesículas con doble membrana, que luego son fusionadas con lisosomas, llevando a la degradación del contenido dentro de estos autofagolisosomas. Este proceso tiene funciones homeostáticas y de biosíntesis, y ocurre durante el desarrollo pero también en situaciones de estrés. Se ha demostrado que las proteínas beclin-1, LC3, y AMBRA1, ATG5, ATG6, y ATG12, son necesarias para la inducción de la autofagia (Galluzzi et al., 2012; Kroemer et al., 2009).
- **Necrosis regulada:** La definición de necrosis hasta hace poco era negativa, ya que se consideraba como el tipo de muerte celular accidental. Sin embargo, ahora se sabe que es un tipo de muerte que puede ser regulada y que además tiene una importancia fisiológica. La necrosis regulada se caracteriza morfológicamente por granulación citoplásmica e hinchazón de la célula. Muchas formas de MCR comparten estas características morfológicas distintivas (necroptosis, parthanatos, ferroptosis, pyroptosis, entre otras) debido a que sus mecanismos moleculares pueden estar interconectados y ser activados por una innumerable

cantidad de estímulos. Los actores que participan en estos mecanismos dependen de la naturaleza del estímulo y el tipo celular en donde ocurre, llevando a diferentes resultados dependiendo del contexto celular particular.

Independientemente del tipo de muerte celular inducida, cuando se quiere evaluar el efecto citotóxico de un compuesto dado, es importante saber distinguir si la célula, después del tratamiento, está muerta, en proceso de muerte, o es viable. Para ello existen diversas pruebas que pueden ayudarnos a determinarlo. En la Tabla 2 presentamos los principales métodos empleados en los laboratorios de investigación para determinar si la célula está muerta/moribunda, o es viable.

Basados en la Tabla 2, a continuación presentaremos los principales métodos para estudiar la muerte celular *in vitro*. Se presentarán algunos de los métodos más empleados que permiten corroborar la citotoxicidad de diferentes extractos de plantas, así como de otros fármacos y productos tanto naturales como artificiales.

9.5. Métodos para el estudio de la actividad citotóxica *in vitro*

Existe una gran variedad de modelos biológicos que sirven para estudiar el efecto citotóxico de un determinado agente. Estos modelos pueden dividirse en dos: *in vivo* e *in vitro*, dependiendo de si se hacen en un organismo o en células aisladas, respectivamente. En este capítulo nos enfocamos en estudios *in vitro* para evaluar el efecto citotóxico de un determinado agente, debido a las ventajas que este modelo ofrece.

Las pruebas *in vivo* son aquellas que utilizan animales para probar los efectos sobre un organismo. Estos modelos, también llamados modelos preclínicos, son indispensables antes de utilizar algún fármaco en pruebas clínicas que involucran pacientes. Sin embargo, cuando lo que se quiere es hacer un análisis general sobre los efectos de extractos de plantas o derivados de estos, el primer paso, antes del uso de modelos preclínicos, es utilizar los ensayos *in vitro*. Además, los modelos *in vitro* son más apropiados cuando se quiere evaluar de manera general el efecto de un agente sobre células con características tumorales o no tumorales. Ya que estos modelos nos permiten observar los efectos a nivel celular del agente a evaluar sobre una variedad de cultivos celular-

	Características de la célula que se desea determinar	Método a emplear
Identificación de una célula muerta	La pérdida de la integridad de la membrana plasmática	<ul style="list-style-type: none"> – Técnicas de microscopía: Marcaje con Azul de tripán – Técnicas espectrofotométricas: Ensayo de LDH – Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con Yoduro de propidio
	La fragmentación de la célula (incluido su núcleo)	– Técnicas de microscopía: Visualización en microscopio óptico, Marcaje fluorescente Hoechst
	La fagocitosis de la célula	<ul style="list-style-type: none"> – Técnicas de microscopía: Visualización en microscopio óptico – Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje de célula fagocítica y de célula fagocitada
Identificación de una célula moribunda	La activación masiva de proteasas «de muerte» (Ej. caspasas)	<ul style="list-style-type: none"> – Técnicas espectrofotométricas: Análisis de actividad enzimática – Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Detección de caspasa activa, Análisis de actividad enzimática
	Pérdida del potencial membranar mitocondrial (o actividad mitocondrial)	<ul style="list-style-type: none"> – Técnicas espectrofotométricas: Reducción de sales de tetrazolio – Citometría de flujo: Marcaje con TMRE
	Permeabilización de la membrana mitocondrial	– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con TMRE, Marcaje de proteínas del espacio intermembranar de las mitocondrias
	Exposición extracelular de fosfatidilserina	– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaja con Anexina-V

Tabla 2. Principales métodos usados para identificar a una célula muerta y diferenciarla de una célula moribunda

res. Además estas pruebas han demostrado correlacionarse a los resultados en pruebas *in vivo*, siendo más rápidas, de menor costo, y no implican el cuestionamiento bioético por el uso de animales sobre agentes aún desconocidos. Así, los ensayos *in vitro* permiten seleccionar sustancias con actividad biológica, que posteriormente puedan ser caracterizadas con mayor detalle y sujetas a ensayos preclínicos que permitan garantizar una mayor seguridad para su utilización en pruebas clínicas.

A continuación se describirán los métodos más empleados, para probar la citotoxicidad de compuestos frente a líneas celulares, *in vitro*.

9.5.1. Análisis mediante técnicas de microscopía

9.5.1.1. Observación de las células tratadas con los extractos empleando el microscopio invertido

La morfología de las diferentes líneas celulares que están en estudio puede ser examinada con el microscopio invertido, antes y después de ser tratadas con los extractos o sustancias a estudiar. Este ensayo es muy sencillo y básico, y sirve para observar directamente los cambios originados por la sustancia en estudio, sobre las células tratadas.

El protocolo consiste en sembrar las células a la confluencia deseada, si son células adherentes se deben dejar adherir incubadas en la incubadora a 37°C (para permitir la adhesión celular al fondo de la placa) y posteriormente se coloca la sustancia a probar y de nuevo se incuba. Los cambios pueden ser observados a las horas subsiguientes de haber colocado la sustancia que se desea probar. Posteriormente, se observan al microscopio comenzando con el objetivo más bajo hasta el de 40X o más, dependiendo del microscopio y su poder de resolución. Un ejemplo de cómo se observan las células al microscopio después de su tratamiento con un extracto de planta que causa citotoxicidad se muestra en la Figura 1.

La limitación principal de este método es que es cualitativo, y su resultado sólo nos brinda una idea morfológica de lo que le está pasando a la célula tratada, comparada con la célula sin tratamiento.

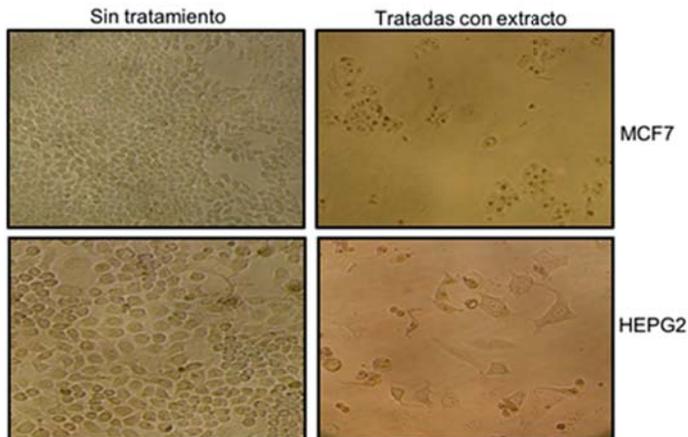


Figura 1. Muestra dos líneas celulares: MCF7 (adenocarcinoma mamario humano) y HEPG2 (Hepatocarcinoma humano), sin tratar (Control negativo) y tratadas con un extracto de planta. Se observa una disminución en el número de células y cambios morfológicos en las diferentes líneas celulares tratadas, con respecto al control

9.5.1.2. Uso del colorante de exclusión Azul tripán

Se emplea una solución azul tripan (ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico) al 0.4%, preparada en 0.81% de cloruro de sodio y 0.06% fosfato de potasio dibásico. Es un colorante vital que no se absorbe por células viables sanas. Cuando las células son dañadas o están muertas y su membrana está comprometida, el azul de tripano puede entrar a la célula, permitiendo a la célula muerta ser contada. Es un método de tinción por exclusión y sus aplicaciones son en ensayos de citotoxicidad y proliferación.

Este ensayo puede realizarse tanto de forma cualitativa o cuantitativa. Para el análisis cualitativo, se añade directamente en el cultivo celular el colorante azul de tripan, y después se observan las células directamente en el microscopio. Las células con membrana plasmática permeabilizada (muertas) se observarán azules, debido a que el colorante habrá penetrado, mientras que las células con la membrana plasmática intacta (vivas) no se verán azules (Figura 2).

Para hacer una evaluación cuantitativa del porcentaje de células muertas se deben tener las células en suspensión, se toman cierto volumen de dichas células (por

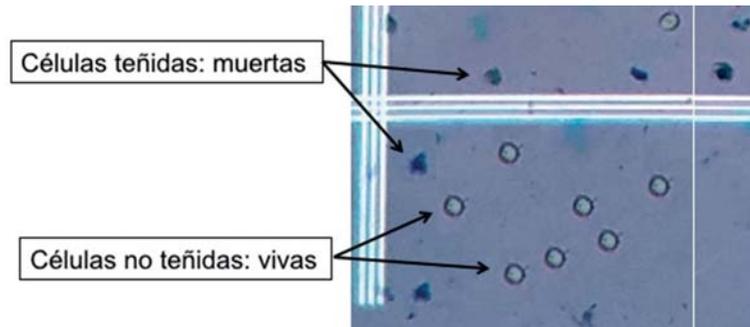


Figura 2. Vista al microscopio de células teñidas con azul tripán, donde se observan células refringentes (vivas) y células a las cuales el colorante ha penetrado (muertas)

ejemplo 20 μ L) y se les adiciona el mismo volumen del colorante azul tripán (en este ejemplo, 20 μ L), y se homogeniza la mezcla. Se toman 10 μ L de dicha mezcla y se colocan en un compartimento de la cámara de conteo (en este ejemplo se utilizó una cámara Neubauer, (Figura 3). Y posteriormente se deja reposar de 1-3 min para que las células se asienten, y a continuación se procede a observar la cámara de recuento en el microscopio óptico (objetivo 10X para enfocar el área de la cuadrícula y posteriormente a 20X o 40X para realizar el conteo de las células). Las células viables son refringentes y las células muertas se tiñen de azul (Figura 2). Si el número de células es muy elevado, se pueden hacer diluciones sin olvidar de tomar el factor de dilución, a la hora de hacer el recuento total de células.

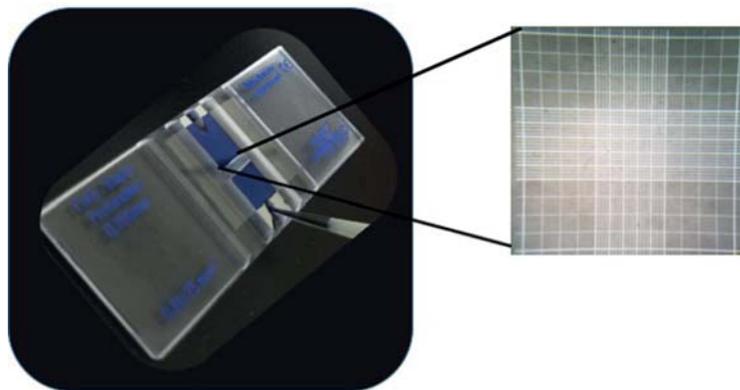


Figura 3. Cámara de Neubauer. Representación gráfica de la cámara de Neubauer y los cuadrantes en los que se divide

Para medir el porcentaje de células muertas se obtiene un porcentaje de las células azules, con respecto al total (incluyendo en el conteo las células azules y de las refringentes), tanto de la muestra sin tratamiento y de la muestra tratada, para verificar el efecto del agente a evaluar.

Existen muchos tipos de cámaras de conteo que permiten evaluar cuantitativamente el número de células vivas y muertas. Y, aunque todas las cámaras de recuento se utilizan para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido, cada tipo de cámara tiene una fórmula de valoración que permite determinar el número de partículas por volumen. Esta fórmula depende de la superficie contada, la profundidad de la cámara, de la dilución utilizada, y del tipo de célula que se va a evaluar. Además ahora existen contadores automatizados, como el TC20™ de BioRad, el cual, cuenta las células empleando la tecnología de enfoque automático y un algoritmo de recuento de células. Otro ejemplo de contador celular automatizado es el Countess II FL de Thermo Fisher Scientific, el cual se basa en la detección por fluorescencia, mediante el uso de cubos de luz LED EVOS™. También se encuentra en el mercado el NucleoCounter® NC-200™ de Chemometec, el cual se basa en la tecnología patentada llamada Via1- Cassette y utiliza tintes fluorescentes (naranja de acridina y DAPI). Finalmente también está disponible el Scepter™ 2.0 Cell Counter de Merck Millipore, un contador automatizado portátil, cuya tecnología se basa en detectar las células por cambios en la impedancia.

9.5.2. Ensayo clonogénico

El ensayo de formación de colonias o ensayo clonogénico es un ensayo de supervivencia de las células *in vitro* basado en la capacidad de una sola célula de crecer en una colonia, que debe consistir de por lo menos 50 células. Este ensayo es el método de elección para determinar la muerte celular reproductiva después del tratamiento con radiación ionizante, pero también se puede utilizar para determinar la eficacia de otros agentes citotóxicos. Sólo una fracción de células sembradas conserva la capacidad de producir colonias.

Para realizar este ensayo se deben sembrar las células en diluciones apropiadas para formar colonias en 1-3 semanas, se siembran en placas de 6 pozos, y debe de sembrarse un número menor para los controles que no recibirán tratamien-

to, para evitar la fusión de colonias y no dificultar el conteo de las mismas. Se adiciona el tratamiento a diferentes concentraciones y se incuba por el tiempo deseado (usualmente 24 h), pasado dicho tiempo se retira el medio, se coloca medio fresco y se deja incubar por 8 d (o más, dependiendo del crecimiento de los controles), a 37°C en una atmósfera controlada, revisando el crecimiento de las células cada 48h. Concluyendo los 8 d se retira el medio y se fijan las células con 0.5 mL de metanol: ácido acético (3:1) y se dejan incubar a -20°C durante 30 min. Pasado este tiempo se retira el metanol: ácido acético y se lava la placa con PBS (buffer fosfato salino), después de retirar el buffer se adiciona el colorante cristal violeta y se incuba a 37°C durante 4 h. Finalmente, se retira el tinte y se realizan lavados con PBS para quitar el exceso de cristal violeta (Figura 4).

Para realizar un análisis cuantitativo del ensayo, se procede a contar cada colonia (un grupo de más de 50 células) formada tanto en el control sin tratamien-

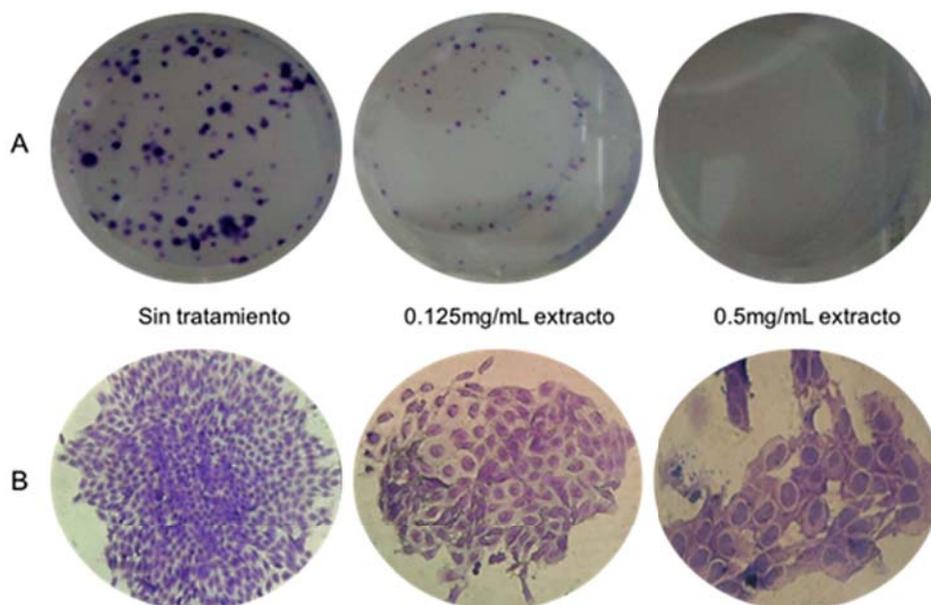


Figura 4. Ensayo clonogénico o de formación de colonias. A) Morfología macroscópica de las colonias de la línea de melanoma murino (B16F10). Sin tratar y tratadas con un extracto de planta. B) Morfología microscópica de las células B16F10 sin tratamiento y tratadas con un extracto de hierbas. Vistas con aumento de 10X, 20X y 40X respectivamente

to, como los ensayos tratados. Las ecuaciones para el análisis cuantitativo son (Franken, Rodermond, Stap, Haveman & van Bree, 2006):

$$\text{Eficiencia de Plaqueo (EP)} = \frac{\# \text{ de colonias contadas en el control}}{\# \text{ de células sembradas}} \quad (1)$$

Ecuación 1. Eficiencia de plaqueo

$$\text{Fracción de supervivencia} = \frac{\# \text{ de colonias formadas después del tratamiento}}{\# \text{ de células sembradas} \times \text{EP}} \quad (2)$$

Ecuación 2. Fracción de Supervivencia

La Eficiencia de Plaqueo (PE) es la relación entre el número de colonias y el número de las células sembradas. La PE depende de la línea celular empleada, es decir diferentes líneas celulares tienen diferentes eficiencias de plaqueo, por lo que se debe calcular para cada línea a emplear. Además, se conoce que cuando células no tratadas son sembradas como una suspensión de una sola célula, es decir a densidades bajas de 2-50 células, éstas crecerán en forma de colonias (Franken et al., 2006). La fracción de supervivencia (FS) es el número de colonias que surgen después del tratamiento de las células, expresada en términos de PE. Siendo la FS, el resultado cuantitativo que nos indica la porción de células que sobrevive al tratamiento y, por lo tanto, que tan efectiva es la sustancia utilizada para inhibir la capacidad replicativa de la célula.

9.5.3. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una herramienta utilizada en muchas áreas de la biología celular. Existen colorantes fluorescentes proporcionan mucha información, dependiendo de los marcadores utilizados. Los marcadores pueden ser de muchos tipos, como pequeñas moléculas, anticuerpos o proteínas recombinantes unidas a fluorocromo, entre otros. Hay una gran variedad de información que se puede obtener a partir de ensayos utilizando la microscopía de fluorescencia.

Básicamente, casi todos los ensayos que pueden analizarse por citometría de flujo (ver más adelante), pueden también observarse en un microscopio de fluores-

cencia. La diferencia radica en la información obtenida. La citometría de flujo da información cuantitativa de un cierto parámetro a observar, mientras que la microscopía de fluorescencia da sobre todo información cualitativa y permite observar las características morfológicas de las células analizadas.

Entre los diferentes colorantes comúnmente utilizados en ensayos de citotoxicidad se encuentran la calceína-AM, y el yoduro de propidio. La calceína-AM es comúnmente utilizada como un indicador fluorescente de color verde intenso de células viables, mientras que el yoduro de propidio, se usa como un indicador fluorescente de color rojo de las células con membranas comprometidas (debido a que es impermeable a una membrana plasmática intacta). Finalmente el Hoechst 33342, es un marcador fluorescente azul que tiñe los núcleos de todas las células y permite visualizar anomalías nucleares en el proceso de muerte celular. A continuación se describirá con mayor detalle este último.

9.5.4. *Determinación de la condensación nuclear por medio de la tinción de Hoechst*

Los marcadores de Hoechst son parte de una familia de colorantes fluorescentes azules utilizado para teñir el ADN (Latt, Stetten, Juergens, Willard & Scher, 1975). Su composición química es de bisbenzimidaz (Figura 5), las cuales tienden a unirse a regiones ricas en AT en el ADN y pueden disminuir su densidad. Fueron desarrollados originalmente por Hoechst AG. Hay tres colorantes de Hoechst relacionados: Hoechst 33258, Hoechst 33342, y Hoechst 34580. Siendo las tinturas Hoechst 33258 y Hoechst 33342 los más

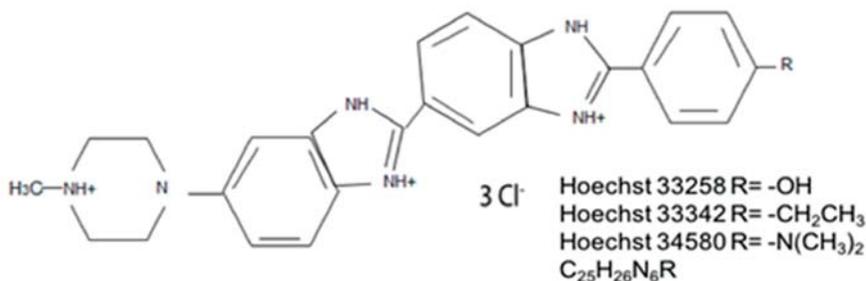


Figura 5. Esquema de la estructura del colorante Hoechst

utilizados en biología celular. Se emplean a menudo para distinguir núcleos picnóticos condensados en las células apoptóticas y para estudios del ciclo celular en combinación con BrdU.

Dentro de sus características moleculares, se sabe que tanto Hoechst 33258 como Hoechst 33342 son excitados por la luz ultravioleta en alrededor de 350 nm, y ambos emiten luz fluorescente azul/cian alrededor de un máximo de emisión a 461 nm. Mientras que el tinte no unido tiene su máxima emisión de fluorescencia en el rango de 510 a 540 nm. Estos colorantes pueden ser excitados con una lámpara xenón, mercurio o con un láser ultravioleta. Los colorantes Hoechst son solubles en agua y en disolventes orgánicos tales como dimetilformamida o sulfóxido de dimetilo. Las concentraciones pueden ser de hasta 10 mg/mL. Las soluciones acuosas son estables a 2-6 °C durante al menos seis meses protegidas de la luz. Para el almacenamiento a largo plazo las soluciones deberán estar en lugar congeladas a -20 °C (Johnson y Spence, 2011).

Este tipo de tinción es útil en experimentos en los que se usan múltiples fluoróforos, ya que existe una amplia diferencia entre las bandas máximas de excitación y sus espectros de emisión, en los tintes de Hoechst. Otra ventaja de estos tintes es que son permeables a la membrana celular y pueden teñir tanto a células vivas como a fijadas. Se unen al surco menor del ADN de doble cadena con una preferencia por secuencias ricas en adenina y timina (Chazotte, 2011).

Para realizar la tinción nuclear con Hoechst, es necesario utilizar guantes durante el proceso, debido a que estos tintes se unen al ADN, interfiriendo con la replicación del ADN durante la división celular. En consecuencia, son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos, por lo que se debe tener cuidado en su manipulación y eliminación.

Para llevar a cabo esta tinción para su posterior observación en un microscopio de fluorescencia, se requiere que las células sean adherentes o se encuentren fijadas en una superficie de vidrio o plástico adecuado para su observación en el microscopio. Las células deben mantenerse humectadas durante el transcurso del protocolo. En breve, las células se siembran o fijan formando una monocapa sobre la superficie, una vez adheridas se adiciona el medio de cultivo a los controles o el tratamiento. Es preferible conocer la dosis o concentración letal media y usar esta concentración para este protocolo. Posteriormente, se

incuba durante diferentes periodos de tiempo (de preferencia 24, 48 y 72 h), y se retira el medio de los pocillos. Posteriormente se lavan con PBS, y se fijan con Paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Se retira el PFA 4% al finalizar el tiempo de fijación y se realizan lavados con PBS. Después, se procede a la tinción con Hoechst, ya sea 33258 o 33342, agregando el colorante Hoechst (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS) durante 1-30 min, enseguida se descarta el exceso de colorante, y se realizan lavados con PBS. Para terminar, se observan las preparaciones en el microscopio de fluorescencia en la región UV (350 a 461 nm, (Figura 6).

Otro colorante fluorescente comúnmente utilizado, y con características similares al Hoechst es el DAPI. Sin embargo, las principales diferencias entre Hoechst y DAPI incluyen una menor toxicidad del colorante Hoechst, y una mayor permeabilidad celular. Los colorantes Hoechst son menos tóxicos que DAPI, manteniendo una mayor viabilidad de células teñidas (a pesar de que en el ejemplo mostrado se realiza un paso de fijación celular con PFA, este paso no es necesario debido a que el marcaje Hoechst es compatible con la viabilidad celular). Además, el grupo etilo adicional de los colorantes Hoechst los hace más permeables a las células.

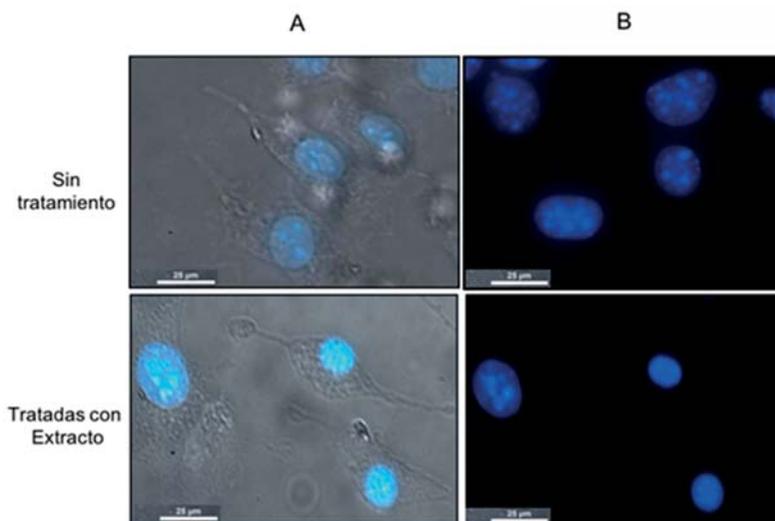


Figura 6. Tinción nuclear con Hoechst 33258. Micrografía fluorescente de las células B16F10 después de 48h. Sin tratar y Tratadas con extracto de hierbas. A) Imágenes compuestas: luz visible traslapada con la luz fluorescente. B) Imágenes con la fluorescencia emitida por el Hoechst 33258

9.5.5. Métodos colorimétricos: Técnicas espectrofotométricas

9.5.5.1. Ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Como se mencionó anteriormente, la muerte celular normalmente se analiza mediante la cuantificación de daño en la membrana plasmática. Muchos métodos estándar se basan en la captación o exclusión de colorantes vitales, o sobre la liberación de isótopos radiactivos, colorantes fluorescentes, o calceína-AM de las células diana pre-marcadas (Leibold y Bridge, 1979; Oldham, Ortaldo, Holden, y Herberman, 1977). Otros ensayos miden las enzimas citoplasmáticas liberadas por las células dañadas, donde la cantidad de actividad de la enzima detectada en el sobrenadante de cultivo se correlaciona con la proporción de células lisadas (Masanet, Gomez-Lechon, y Castell, 1988; Szekeres, Pacsa, y Pejtsik, 1981).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática estable que está presente en todas las células. Cuando la membrana plasmática está dañada, la LDH se libera rápidamente en el sobrenadante del cultivo. La detección de la actividad de LDH extracelular puede ser medida por un método colorimétrico simple y preciso. Este método se basa, en que NAD^+ se reduce a NADH/H^+ por la conversión catalizada de LDH de lactato a piruvato. Posteriormente, un catalizador incluido en la mezcla de reacción (diaforasa), transfiere H/H^+ a NADH/H^+ a la sal de tratazolio INT, que se reduce a un colorante de formazán (Figura 7).

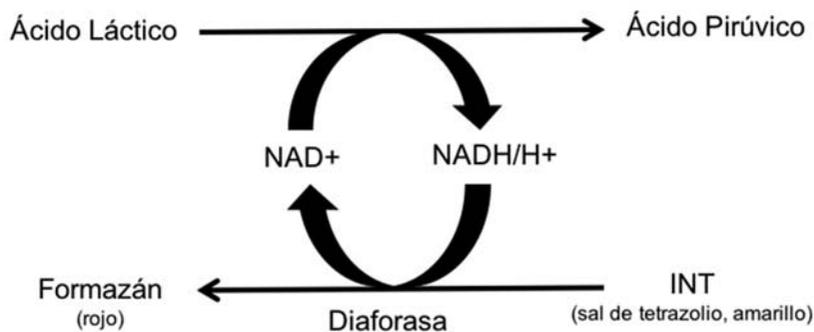


Figura 7. Reacción enzimática de dos pasos que cuantifica la lisis y muerte celular. Paso superior: reducción de lactato a piruvato por la LDH. Paso inferior: reducción de tetrazolio a formazán por la diaforasa incluida en el método de detección

Un aumento en el número de células con la membrana dañada o muertas conduce a una mayor actividad de la LDH en el sobrenadante del cultivo, que se correlaciona directamente con la cantidad de formazán producidos en un período de tiempo definido. Por lo tanto, la cantidad de colorante producida es proporcional al número de células con una membrana permeable. Los ensayos de LDH pueden llevarse a cabo mediante la evaluación de LDH liberada en los medios, como un marcador de células muertas, además se pueden medir las células vivas restantes después de lisarlas y de medir la actividad LDH.

Existen diferentes kits para la detección de la actividad de la LDH, y todos se basan en ensayos colorimétricos para cuantificar citólisis/citotoxicidad y se basan en la medición de la actividad de LDH liberada por las células dañadas al sobrenadante. Para realizar el protocolo para la detección de LDH se requiere tener tres controles en cada experimento:

1. Control de trasfondo. Se debe medir la actividad de LDH presente en el medio, y la absorbancia del medio debe de ser restada de la absorbancia problema.
2. Control bajo (negativo). Se miden los niveles espontáneos de LDH liberado en células no tratadas.
3. Control alto (positivo). En este se mide la actividad máxima de LDH liberada por las células (después de la lisis celular con algún detergente).

La liberación del LDH varía dependiendo con el tipo celular. Por lo que se tiene que establecer la concentración celular óptima. Esta concentración se encuentra, en la mayoría de las líneas celulares, entre 5×10^3 y 2×10^4 células/pozo en $200 \mu\text{L}$ ($2.5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ células/mL).

Para medir la citotoxicidad se preparan los controles, el de trasfondo, el de baja liberación de LDH (sin tratamiento), el alto para la liberación máxima de LDH (añadiendo algún detergente, como tritón 100X), y se agrega la sustancia de estudio a la concentración que se quiere evaluar. Se incuba la placa (37°C , 5% CO_2 , 90% humedad) por el tiempo planteado (comúnmente entre 24-72 h), y posteriormente se centrifuga la placa a 250 G durante 10min. Se transfieren $100 \mu\text{L}$ /pocillo de sobrenadante, sin alterar el sedimento celular, a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos de fondo plano, ópticamente transparente. Se añaden $100 \mu\text{L}$ de mezcla de reacción (mezcla del colorante

INT y la solución de catálisis) a cada pocillo, y se incuban a temperatura ambiente durante 30 min, protegidos de la luz. Se mide la absorbancia de las muestras a 490 o 492 nm (la longitud de onda de referencia debe ser mayor que 600 nm). Para hacer el análisis cuantitativo de citotoxicidad se sigue la siguiente ecuación:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{absorbancia problema} - \text{absorbancia control}}{\text{absorbancia de control alto} - \text{control bajo}} \times 100 \quad (3)$$

Ecuación 3. Porcentaje de citotoxicidad

9.5.5.2. *Ensayos basados en la reducción de sales de Tetrazolio*

Una variedad de compuestos de tetrazolio se han utilizado para detectar las células viables. Los compuestos más utilizados son: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se clasifican en dos categorías básicas: 1) MTT que está cargado positivamente y penetra fácilmente las células eucariotas viables y 2) aquellos tales como MTS, XTT, y WST-1 que están cargados negativamente y no penetran fácilmente en las células. La última clase (MTS, XTT, WST-1) se usan típicamente con un aceptor de electrones intermedio que puede transferir electrones desde el citoplasma o membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio en el producto formazán coloreado. Estos ensayos a menudo son usados como un screening primario para conocer si un extracto o fármaco es tóxico, y así poder establecer concentraciones medias.

• **MTT/MTS**

La formación de sales de formazán, es una técnica empleada por ser económica y fácil de realizar. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (Figura 8).

Una variante de esta técnica es el MTS, el cual se usa para células en suspensión y a diferencia del MTT, se lee a 490nm. Este reactivo de tetrazolio, puede ser

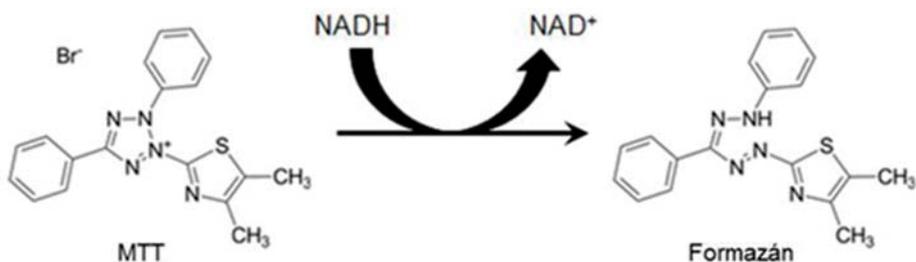


Figura 8. Estructura del MTT y su producto coloreado, el formazán

reducido por células viables para generar productos de formazán que son directamente solubles en medio de cultivo celular. Evitando así el paso de adición de un reactivo, como el DMSO, para solubilizar las sales de formazán formadas (Figura 9).

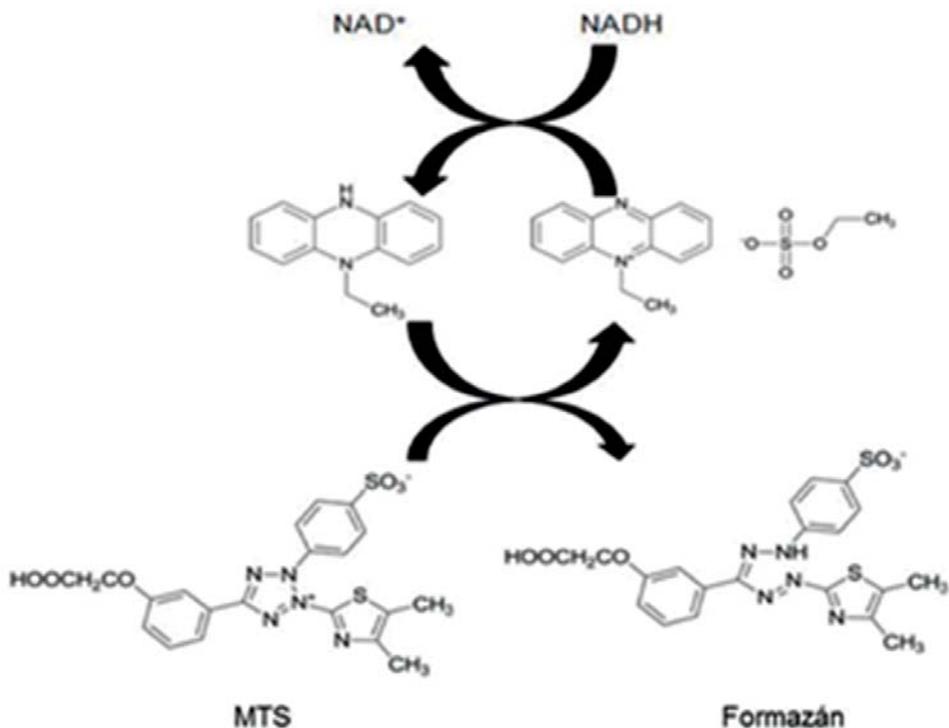


Figura 9. El aceptor intermediario de electrones sulfato de acetato de fenazina (PES), transfiere electrones de NADH en el citoplasma para reducir MTS en el medio de cultivo en formazán soluble

Este conjunto de reactivos de tetrazolio se usan en combinación con reactivos aceptores intermediarios de electrones tales como el sulfato de fenazina de metilo (PMS) o sulfato de acetato de fenazina (PES), que pueden penetrar en las células viables, y son reducidos en el citoplasma o en la superficie celular y salen de las células donde que pueden convertir del tetrazolio al producto formazán soluble. Estos compuestos se utilizan para medir la supervivencia y la proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por lo que entre más células vivas más se verá la coloración azul (Figura 10). Es un método desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

La técnica de MTT, requiere tener las células que se van a estudiar adheridas a una placa de cultivo (preferentemente de 96 pozos de fondo plano, optimizadas para espectrofotometría) y dejar células sin tratar como control y poner un grupo en contacto con el extracto, fármaco, o sustancia que se quiera probar. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se añade una suspensión de MTT para obtener una concentración final de 0.5 mg/mL (en PBS) por pozo y se incuba de 1 h a 4 h a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Subsiguientemente se retira el sobrenadante y se añaden 100 µL de Dimetil Sulfoxido (DMSO) por

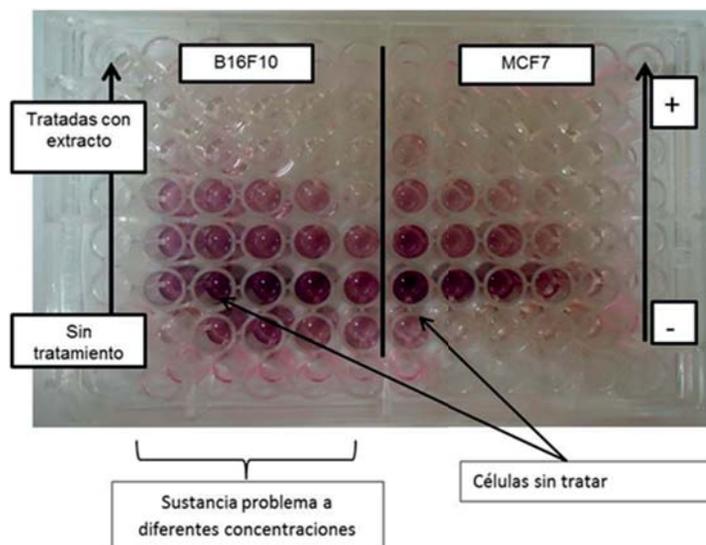


Figura 10. Ensayo de MTT. Placa de 96 pozos, con y sin extracto de planta, en dos líneas celulares B16F10 (*Melanoma murino*) y MCF7 (*adenocarcinoma mamario humano*)

pozo (para disolver los cristales), posteriormente se incubó por 10 min a temperatura ambiente y la placa (Figura 10) se lee al espectrofotómetro a 570 nm.

El porcentaje de Viabilidad se obtiene por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\# \text{ DO células control}} \times 100 \quad (4)$$

Ecuación 4. Porcentaje de viabilidad

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia que de antemano se conozca su poder citotóxico) y células no tratadas.

Para células en suspensión se emplea el MTS, el cual requiere tener previamente la solución de MTS (2 mg/mL en PBS), que se utilizará para disolver el PES a 0.21 mg/mL, y se ajusta el pH a 6.0-6.5. El procedimiento que se sigue para llevar a cabo esta técnica es similar al llevado a cabo para el MTT. La diferencia es que al final de los tratamientos se añade la solución que contiene MTS+PES a cada pocillo (concentración final de MTS será 0.33 mg/mL) y la placa se lee en un espectrofotómetro a 490 nm de absorbancia.

Actualmente existe una gran variedad de productos comerciales que contienen las soluciones necesarias para realizar estos protocolos. Algunos ejemplos son: CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation Cat.# G4000), Cell Growth Determination Kit MTT based (Sigma-Aldrich Cat.# CGD1-1KT), MTT Cell Growth Assay Kit (Millipore Cat.# CT02), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT Powder) (Sigma-Aldrich Cat.# M2128), CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation Cat.# G3580), *In Vitro* Toxicology Assay Kit, XTT based (Sigma-Aldrich Cat.# TOX2-1KT), MTS Reagent Powder (Promega Corporation Cat.# G1111), XTT sodium salt (Sigma-Aldrich Cat.# X4626), entre otros.

Estos ensayos de proliferación tienen dos principales limitaciones, por una parte pueden dar falsos positivos, cuando aspectos específicos del metabolismo celular son afectados (Berridge, Herst & Tan, 2005), además son incapaces de distinguir entre la inhibición del ciclo celular y la muerte celular (Galluzzi & Aaronson, 2009; Kroemer et al., 2009).

9.5.6. Métodos utilizando la Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células, conforme se les hace pasar a través de un rayo de luz. Para ello las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. En este proceso, las células pueden hacerse pasar a muy altas velocidades (pueden llegar a alcanzarse velocidades cercanas a las 100,000 cel/s).

Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este causando su dispersión. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (parámetro denominado *Forward Scatter*) y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de estas (parámetro denominado *Side Scatter*). Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de algún marcador fluorescente, se pueden evaluar las células que fueron marcadas y distinguir de aquellas que no.

El uso de distintas moléculas fluorescentes (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. La ventaja analítica que tiene la citometría de flujo es su capacidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células, para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. Entre esas propiedades está la de determinar la muerte de la célula, por características morfológicas y bioquímicas, que se pueden detectar mediante la tecnología de la citometría de flujo.

9.5.6.1. Determinación de muerte celular usando Anexina-V y Yoduro de propodio

Como se mencionó anteriormente, gracias a los avances tecnológicos en la citometría de flujo, el estudio de la muerte celular se ha visto impactado de manera significativa. La citometría de flujo puede utilizarse para la detectar células en proceso de MCR a través de la detección de anexina-V-(fluorocromo) unida a la superficie celular. La anexina-V se une, en presencia de Ca^{2+} , preferentemente a la fosfatidilserina, una señal cómete, expuesta en células moribundas.

Por otro lado, el yoduro de propidio (PI) es ampliamente utilizado en conjunción con Anexina V para determinar si las células se encuentran viables, moribundas,

o muertas, a través de la detección de la exposición de fosfatidilserina y la medición de la integridad de la membrana plasmática (Vermes, Haanen & Reutelingsperger, 2000; Vermes, Haanen, Steffens-Nakken & Reutelingsperger, 1995). El PI se utiliza con más frecuencia que otros colorantes nucleares porque es económico, estable y un buen indicador de la viabilidad celular, basado en su capacidad para excluir el colorante en las células vivas (Bacsó, Everson & Eliason, 2000). La capacidad de PI para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana; el PI no puede entrar a una célula con una membrana plasmática intacta. Como se mencionó anteriormente, en las células muertas la integridad la membrana plasmática se pierde (Denecker, Vercammen, Declercq & Vandennabeele, 2001; Kroemer, Dallaporta & Resche-Rigon, 1998) permitiendo que PI pase a través de las membranas, y se intercale en ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (Faleiro & Lazebnik, 2000).

Un compuesto que induce principalmente apoptosis, mostrará un diagrama como el mostrado en la Figura 11, en donde después del tratamiento las células se deslizan a la derecha (cuadrantes superior e inferior derecho), y la mayoría de la población anexina-V positiva es también PI negativa (mostrando células en proceso de apoptosis, cuadrante inferior derecho). Por otro lado las células anexina-V positivas y PI positivas (cuadrante superior derecho) pueden ser células en apoptosis tardía, o células que mueren por algún otro tipo de MCR no apoptótico. Si las células fueran PI positivas y anexina-V negativas (cuadrante superior izquierdo), correspondería a células muertas por MCA. Las células vivas

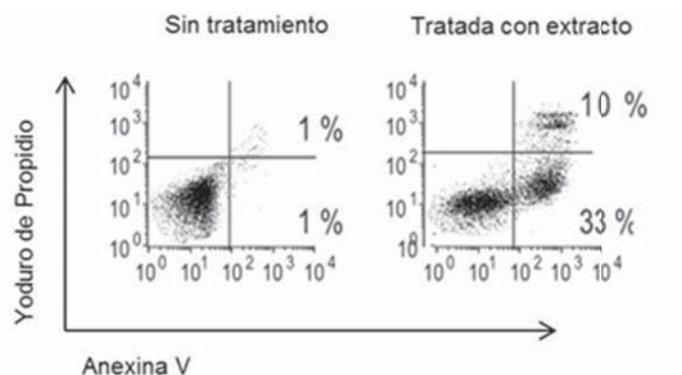


Figura 11. Diagramas de citometría de flujo de células B16F10, sin tratamiento (controles) y con tratamiento (tratadas con extracto de planta). Las células fueron teñidas con Anexina-V-APC, y Yoduro de propidio

son PI negativas y anexina-V negativas, correspondiendo al cuadrante inferior izquierdo (Figura 11).

La metodología a seguir para la doble tinción con anexina-V y yoduro de Propidio, requiere de 4×10^4 - 4×10^5 cel/mL (dependiendo del tipo celular). Estas serán incubadas a 37°C , durante diferentes tiempos con los tratamientos a probar, es conveniente tener un control positivo (una sustancia que se conozca que causa muerte por apoptosis) y un control negativo (que corresponde a las células sin tratamiento). Pasando los respectivos tiempos se deben recuperar las células, seguido de al menos un lavado con PBS. Una vez recuperadas todas las células, se centrifugan a 300 G por 5-15 min, y se le agrega una mezcla de anexina-V ($0.1 \mu\text{g/mL}$) más Yoduro de propidio ($0.5 \mu\text{g/mL}$) disueltos en Buffer de unión (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, Ca_2Cl 2.5 mM) por muestra. Posteriormente las células se incuban en la oscuridad a 4°C durante 20-30 min. Por último se puede o no realizar un lavado, y la muestra se lee en el citómetro de flujo y se analiza con un software especializado (como ejemplos se encuentran el FlowJo, Infinicyt, FCS Express 5, WinMDI, entre otros).

9.5.7. Determinación de la activación de caspasas efectoras

Las caspasas son cisteín proteasas que presentan un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas al nivel de un residuo de aspartato, de donde deriva su nombre (cisteinil- aspartato proteasas). Estas proteínas están involucradas activamente en los procesos inflamatorios y en la apoptosis (Adamić-Mroczeć, Zajac-Pytrus & Misiuk-Hojło, 2015). Las caspasas 2, 4/12, 8, 9 y 10, inician la muerte celular programada, mientras que las caspasas «efectoras» incluyen las caspasa 3, 6 y 7.

Debido a la implicación que estas proteínas tienen en la muerte celular, existen numerosos métodos para determinar su actividad enzimática. Estos métodos incluyen ensayos fluorométricos y colorimétricos, los cuales se basan en la capacidad intrínseca de la enzima, y un sustrato indicador diseñado para generar una señal fluorescente, de color, o luminiscente, que puede ser leída por espectrofotometría, o ser observados por microscopía de fluorescencia o mediante citometría de flujo.

Con los ensayos de citometría de flujo, podemos medir la actividad de caspasa en cada célula. Los kits comerciales se basan en la capacidad enzimática de las

caspasas, especialmente de la efectoras, 3 y 7, que cuando ocurre el proceso de la muerte celular son activadas y son capaces de cortar un péptido formado por 4 aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutámico, valina, y ácido aspártico (DEVD). Dicho péptido está conjugado con algún fluorocromo que una vez liberado genera fluorescencia. Cuando las caspasas 3/7 están activas cortan el DEVD unido al fluorocromo, dejándolo libre para producir fluorescencia, la cual es medida para cada célula mediante el citómetro de flujo.

Algunos ejemplos comerciales del uso del citómetro para medir la actividad de caspasa tenemos:

- El Kit Muse™ Caspase-3/7 (Merck Millipore). El cual permite medir la activación de caspasas 3/7 y la permeabilidad de la membrana celular. Este ensayo se basa en un colorante que se une al ADN, dicho colorante está unido al sustrato péptidico DEVD, de esta forma el colorante es incapaz de unirse al ADN. La escisión llevada a cabo por la caspasa 3/7 activa en las células, dan lugar a la liberación del colorante, el cual se transloca al núcleo, se une al ADN y genera fluorescencia, que puede ser medida. Además un marcador de células muertas el 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) también se incluye en el ensayo como un indicador de la integridad estructural de la membrana y la muerte celular.
- CellEvent® Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Permite la detección de la caspasa-3 y -7 activadas en las células apoptóticas mediante citometría de flujo. Este kit se basa también en un reactivo permeable a la célula que consiste de 4 aminoácidos (DEVD) conjugado con un colorante de unión a ácido nucleico. Durante la apoptosis, la caspasa 3 y 7 se activan y son capaces de escindir la secuencia de reconocimiento codificada en el péptido DEVD. El corte de la secuencia de reconocimiento y la unión al ADN por el reactivo, etiqueta las células apoptóticas con una señal fluorogénica.
- Vybrant® FAM™ Caspase Assay Kits. Sirve para detectar caspasas activas en células vivas. Su tecnología se basa en el inhibidor fluorescente de las caspasas (FLICA®). FLICA se compone de 3 subunidades: 1) un resto de fluorometil cetona (FMK), que puede reaccionar covalentemente con una cisteína, 2) una secuencia de amino ácidos caspasa específico, para la caspasa 3 y 7, esta secuencia de reconocimiento es DEVD, 3) un grupo de fluoresceína se adjunta

como reportero. Se dice que FLICA interactúa con las caspasas activas por medio del DEVD y se une covalentemente a través del residuo FMK. FLICA es permeable a la célula y no es tóxico, el FLICA no unido se lava, y la señal fluorescente es una medida directa de la cantidad de caspasa activa, que estaba presente en el momento que se añadió el inhibidor.

- Caspase 3 active FITC Staining Kit (ABCAM). Proporciona un medio conveniente para la detección sensible de la caspasa 3 activa en las células vivas. El ensayo utiliza el inhibidor de la caspasa 3, DEVD-FMK, conjugado con FITC (FITC-DEVD-FMK) como marcador. FITC-DEVD-FMK es permeable a las células, no tóxico, y se une de forma irreversible a la caspasa 3 activada en las células apoptóticas. FITC permite la detección de caspasa-3 activa en las células apoptóticas directamente por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, o un lector de placas de fluorescencia.

Otra manera de medir la actividad de caspasas por citometría de flujo es mediante el uso de anticuerpos específicos del sitio de activación y el uso posterior de un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo. Por ejemplo empleando anticuerpos anti-caspasa 3 activa. La base de estos anticuerpos es que reconocen el sitio específico de corte (Asp175), es decir que cuando la caspasa 3 está activa el anticuerpo se une posteriormente puede ser detectado por citometría de flujo, ya sea porque el anticuerpo primario está unido a fluorocromo, o utilizando un anticuerpo secundario marcado.

9.5.8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial: tinción con TMRE

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) está altamente relacionado con muchos procesos mitocondriales. El $\Delta\Psi_m$ controla la síntesis de ATP, la generación de ROS, el secuestro de calcio mitocondrial, el importe de proteínas a la mitocondria y la dinámica de la membrana mitocondrial. Por lo que cambios en $\Delta\Psi_m$, son indicadores de daño mitocondrial y pueden estar asociados a múltiples patologías mitocondriales, que pueden ser medidas independientemente. Es por ello que existen diferentes métodos y sondas moleculares indicadoras empleadas para estimar el potencial eléctrico de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$).

Estas sondas pueden ser clasificadas como cationes liofílicos o «colorantes de redistribución». Estos compuestos se acumulan tanto en la membrana interna como en el espacio de matriz mitocondrial, debido a su carga y solubilidad. Ejemplos de este tipo de compuesto son: la safranina, tetrafenilfosfonio (TTP) y la rodamina 123 (Scaduto & Grotyohann, 1999). Un derivado de este último compuesto es la Tetrametilrodamina etil éster (TMRE), el cual es usado para cuantificar cambios en el potencial de membrana mitocondrial por fluorescencia, este colorante exhibe una unión baja a las mitocondrias, lo cual lo hace adecuado para no tener una lectura errónea del daño mitocondrial. Los colorantes deben ser inocuos, es decir no causar daño mitocondrial y deben ser fáciles de detectar.

Actualmente se encuentran en el mercado diferentes kits para medir $\Delta\Psi_m$, además este colorante es manejado por diversas compañías. El TMRE es un colorante rojo-naranja cargado positivamente, que es permeable a la célula y que se acumula fácilmente en las mitocondrias activas debido a su carga negativa. Las mitocondrias despolarizadas o inactivas, tienen un potencial de membrana bajo y no logran secuestrar el TMRE en su interior. Este compuesto es excitado a 488nm y se emite a 575nm. Por lo tanto, la pérdida del $\Delta\Psi_m$ puede ser medida mediante la cuantificación de células con mitocondrias con un bajo marcaje con TMRE, con respecto a las células control, que secuestrarán adecuadamente el TMRE y por lo tanto serán más fluorescentes (Figura 12).

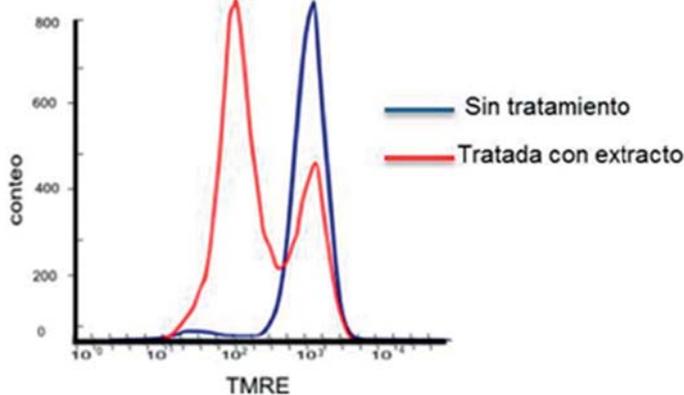


Figura 12. Análisis de tinción TMRE por citometría de flujo. Histograma de células *Mec-1* (*Leucemia linfocítica crónica*) teñidas con 100 nM TMRE, después de ser tratadas con un extracto de planta (rojo) y sin tratamiento (azul)

La realización de esta prueba requiere de 4×10^4 - 4×10^5 células (dependiendo del tipo celular), que se expondrán a los tratamientos a estudiar y se incubarán a 37°C en 5% CO₂ durante el tiempo deseado. Después del tiempo de incubación con el tratamiento, se recuperarán las células y se lavarán con PBS, centrifugando los tubos a 300G durante 5 min. A continuación se desecha el sobrenadante y las células en el pellet se marcan aplicando una solución de TMRE (0.1-0.5µM en PBS), y se incubarán a 37°C (para no alterar el metabolismo mitocondrial) por 20-30 minutos. Posteriormente se lavan las muestras con PBS, se extrae el sobrenadante y se aplican otros 100-500µL de PBS para ser leídas por FACS en el filtro FL-3. Las células cuya fluorescencia se desliza positivamente (con alta fluorescencia) serán aquellas que mantienen su potencial membranal mitocondrial, mientras que aquellas con deslizamiento discreto hacia la derecha (baja fluorescencia) son aquellas que han perdido la capacidad de mantener el TMRE en el interior de sus mitocondrias (Figura 12).

9.6. Conclusión

Como se mencionó a lo largo de este capítulo, existen estudios que prueban la importancia del uso de plantas y sus derivados para la obtención de nuevos fármacos. Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados (Amin, Gali-Muhtasib, Ocker & Schneider-Stock, 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos.

La gran diversidad de plantas que existen en el mundo puede ser estudiada para descubrir nuevos compuestos que ayuden a generar nuevos y mejores tratamientos contra las diversas enfermedades que afectan al ser humano, incluido el cáncer. Esto apunta a una gran variedad de extractos y derivados de plantas que pueden poseer un alto potencial antitumoral, cuya actividad citotóxica puede ser evaluada sobre células tumorales. Las diferentes metodologías previamente descritas abren la posibilidad de identificar nuevos compuestos con posibles aplicaciones terapéuticas contra el cáncer.

Referencias

- Abad-Reyes, J.A., López-Pérez, J.L., Santiago, C., Delgado, P., Bahsas, A., Manuel, J. et al. (2008). Productos inesperados en la transformación química de derivados de la podofilotoxona a través de la reacción de Takai. *Avances en Química*, 3(1), 27-34.
- Adamiec-Mroczek, J., Zajac-Pytrus, H., & Misiuk-Hojlo, M. (2015). Caspase-Dependent Apoptosis of Retinal Ganglion Cells During the Development of Diabetic Retinopathy. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 24(3), 531-535. <http://dx.doi.org/10.17219/acem/31805>
- Akter, R., Uddin, S.J., Grice, I.D., & Tiralongo, E. (2014). Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines*, 68(1), 246-252. <http://doi.org/10.1007/s11418-013-0789-5>
- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
- Alton, P.A., & Harris, A.L. (1993). The role of DNA topoisomerases II in drug resistance. *British Journal of Haematology*, 85(2), 241-245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03162.x>
- Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., & Schneider-Stock, R. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International Journal of Biomedical Science*, 5(1), 1-11.
- Bacsó, Z., Everson, R.B., & Eliason, J.F. (2000). The DNA of Annexin V-binding Apoptotic Cells Is Highly Fragmented. *Cancer Research*, 60(16), 4623-4628.
- Balunas, M.J., & Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431-441. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
- Berridge, M.V., Herst, P.M., & Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11(Suppl.), 127-152. [http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)

- Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignogna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G. et al. (2015). Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PLoS ONE*, 10(7), 1-18. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132439>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb-prot5557. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
- Chugh, R. (2005). Phase II Study of 9-Nitro-Camptothecin in Patients With Advanced Chordoma or Soft Tissue Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(15), 3597-3604. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.170>
- Cragg, G.G., Boyd, M.R., Cardellina II, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M., & McCloud, T.G. (1994). Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. «Ethnobotany and the Search for New Drugs». Ciba Foundation Symposium 185. In D. J. Chadwick & J. Marsh (Eds.), *Ciba Foundation Symposium 185*. (pp. 178–196.). Chichester, United Kingdom: Wiley & Sons.
- Cragg, G.M., & Newman, D.J. (2004). Contributed Reviews Wani Contribution to Cancer Chemotherapy †. *Chart*, 12, 232-244. <http://doi.org/10.1021/np030420c>
- de Mesquita, M.L., de Paula, J.E., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L. V., Grougnat, R. et al. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 439-445. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.018>
- de Moura, M.D., de Se Silva, J., de Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F.M., & Barbosa-Filho, J.M. (2002). Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(1), 67-74.
- Denecker, G., Vercaemmen, D., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2001). Cellular and Molecular Life Sciences Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Microbial Pathogenesis*, 58, 356-370.
- Faleiro, L., & Lazebnik, Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *Journal of Cell Biology*, 151(5), 951-959. <http://doi.org/10.1083/jcb.151.5.951>

- Fan, Y., Weinstein, J.N., Kohn, K.W., Shi, L.M., & Pommier, Y. (1998). Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(13), 2216-2226. <http://doi.org/10.1021/jm9605445>
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-9. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Galluzzi, L., & Aaronson, S. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16, 1093-1107. <http://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D. et al. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 2014, 1-16. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V. et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107-120. <http://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., & Farnsworth, N.R. (2000). Plants used against cancer - An extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 347-377. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00341-X](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00341-X)
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1-93. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartwell, J.L. (1982). *Plants used against cancer: - a Survey*. Lawrence, MA: Quarterman Publications, Inc.

- Husain, I., Mohler, J.L., & Seigler, H.F. (1994). Elevation of Topoisomerase I Messenger RNA , Protein , and Catalytic Activity in Human Tumors: Demonstration of Tumor-type Specificity and Implications for Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 54(2), 539-546.
- Johnson, I., & Spence, M.T. (2011). Assays for Cell Viability, Their Amine-Reactive Proliferation and Function. In *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies (Invitrogen)* (11th ed., pp. 650-738). N.Y. USA: Life Technologies.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., & Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 619-642. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.619>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H. et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3-11. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Latt, S.A., Stetten, G., Juergens, L.A., Willard, H.F., & Scher, C.D. (1975). Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 23(7), 493-505. <http://doi.org/10.1177/23.7.1095650>
- Leibold, W., & Bridge, S. (1979). 75 Se-release: A short and long term assay system for cellular cytotoxicity. *Zeitschrift Für Immunitätsforschung: Immunobiology*, 155(4), 287-311.
- Masanet, J., Gomez-Lechon, M.J., & Castell, J.V. (1988). Hepatic toxicity of paraquat in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 2(4), 275-282. [http://dx.doi.org/10.1016/0887-2333\(88\)90046-X](http://dx.doi.org/10.1016/0887-2333(88)90046-X)
- Mena-Rejon, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., & Moo-Puc, R. (2009). *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 462-465. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.012>

- Newman, D.J., & Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat Prod.*, 70(0163-3864 (Print)), 461-477. <http://doi.org/10.1021/np068054v>
- Newman, D.J., & Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461-477. <http://doi.org/10.1021/np068054v>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., & Snader, K.M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17(3), 215-234. <http://doi.org/10.1039/a902202c>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., & Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037. <http://doi.org/10.1021/np030096l>
- Nicolaou, K.C., Guy, R.K., & Potier, P. (1996). Taxoids: New Weapons against Cancer. *Scientific American*, june, 94-98. <http://doi.org/10.1038/scientificamerican0696-94>
- Oberlies, N.H., & Kroll, D.J. (2004). Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *Journal of Natural Products*, 67(2), 129-135. <http://doi.org/10.1021/np030498t>
- Ohta, S., Nishio, K., Kubo, S., Nishio, M., Ohmori, T., Takahashi, T. et al. (1993). Characterisation of a vindesine-resistant human small-cell lung cancer cell line. *British Journal of Cancer*, 68(1), 74-79. Recuperado de <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23178554\nhttp://sfx.huji.ac.il:3210/sfxtst3?sid=EMBASE&issn=00070920&id=doi:&atitle=Characterisation+of+a+vindesine-resistant+human+small-cell+lung+cancer+cell+line&stitle=BR.+J.+C.> <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1993.289>
- Oldham, R.K., Ortaldo, J.R., Holden, H.T., & Herberman, R.B. (1977). Direct comparison of three isotopic release microtoxicity assays as measures of cell-mediated immunity to Gross virus-induced lymphomas in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(4), 1061-1067.

- Pan, S.-Y., Zhou, S.-F., Gao, S.-H., Yu, Z.-L., Zhang, S.-F., Tang, M.-K. et al. (2013). New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 25. <http://doi.org/10.1155/2013/627375>.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., & Hoyer, D. (2015). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 00(00), 8-11. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>
- Patwardhan, B., Warude, D., Pushpangadan, P., & Bhatt, N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese medicine: A comparative overview. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4), 465-473. <http://doi.org/10.1093/ecam/neh140>
- Pieters, L., & Vlietinck, A.J. (2005). Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 57-60. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.029>
- Ramawat, K.G., Dass, S., & Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. En *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (pp. 7-32). Berlin, Alemania: Springer. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4_2
- Rowinsky, E.K., & Donehower, R.C. (1995). Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine*, 332(15), 1004-1014. <http://doi.org/10.1056/NEJM199504133321507>
- Saeed, M.E.M., Abdelgadir, H., Sugimoto, Y., Khalid, H.E., & Efferth, T. (2015). Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multi-drug-resistant cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 644-658. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.005>
- Scaduto, R.C., & Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal*, 76(1 Pt 1), 469-477. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77214-0](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77214-0)
- Shu, Y.Z. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61(8), 1053-1071. <http://doi.org/10.1021/np9800102>

- Silva, J.S., Moura, M.D., Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F., & Barbosa-Filho, J.M. (2003). Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10(2-3), 221-232. <http://doi.org/10.1078/094471103321659988>
- Szekeres, J., Pacsa, A.S., & Pejtsik, B. (1981). Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *Journal of Immunological Methods*, 40(2), 151-154. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90061-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(81)90061-2)
- Takimoto, C.H., & Thomas, R. (2000). The clinical development of 9-amino-camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 922, 224-236. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193898>
- Tannock, I.F., & Hill, R.P. (1998). *The Basic Science of Oncology* (3rd ed.). U.S.A.: McGraw Hill.
- Vega-Ávila, E., Velasco-Lezama, R., & Jiménez-Estrada, M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica*, 31(3), 97-111.
- Vermes, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 167-190. [http://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](http://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7)
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-1](http://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-1)
- Warber, S. (1999). Models of action at target sites. En Kaufman, P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., & Brielmann, H.L. (Eds.). *Natural Products from Plants* (1st ed., pp. 158-181). U.S.A.: CRC Press.
- Xiao, Z., Vance, J.R., Bastow, K.F., Brossi, A., Wang, H.-K., & Lee, K.-H. (2004). Antitumor agents. Part 235: Novel 4'-ester etoposide analogues as potent DNA topoisomerase II inhibitors with improved therapeutic potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(12), 3363-3369. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.056>

Xu, H., Lv, M., & Tian, X. (2009). A Review on Hemisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: 2003- 2007. *Current Medicinal Chemistry*, 16(3), 327-349.
<http://doi.org/10.2174/092986709787002682>