FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE KINESIOLOGÍA

Evaluación del rol del estrés oxidativo en la citotoxicidad inducida por extracto de *Cimicifuga racemosa* en la línea celular MCF- 7

Tesis para optar al grado de magister en Ciencias mención radicales libres en Biomedicina.

ANA CAROLINA BARRIA GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dra. CAROLINE WEINSTEIN OPPENHEIMER

CODIRECTOR DE TESIS: Dra. MARIA ELIANA HIDALGO LILLO

2015

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer y pedir perdón por los momentos de desesperanza en primer lugar a Dios , sin él no habría sido posible finalizar este trabajo que me puso en las manos a mi profesora de Tesis Caroline Weinstein O. a quien agradezco infinitamente la enorme paciencia, cariño y pedagogía que puso en cada detalle permitiéndome avanzar en este camino. No puedo dejar de expresar mi enorme gratitud a la profesora María Eliana Hidalgo quien confío en mis capacidades al optar a este magister.

En segundo lugar quiero dar las gracias a los coordinadores de magister quienes me dieron las facilidades para poder trabajar en esta tarea de mejorar y sacar adelante este proyecto tan importante para mi vida profesional y vocacional.

También agradezco a Carlitos que siempre tuvo la paciencia de explicarme los métodos y estar disponible en los momentos de dificultades.

Agradezco a Fernando mi soporte en este camino que me ayudo desde la distancia con el ánimo positivo y las largas escuchas de lo que era incomprensible para él escribiendo los largos dictados para aclarar mis ideas.

Agradezco a mis padres quienes tuvieron también la paciencia de escuchar mis opiniones de ayudar con el ánimo y la fuerza que me han infundido desde pequeña en finalizar todo lo que me he planteado en la vida a pesar de los obstáculos.

En esta etapa que ya finaliza, he aprendido de los reales valores de la vida a través de mis mentores, la humildad, el sentido de la vida, la perseverancia y la rectitud y finalmente lo pequeño que es el mundo de la ciencia ante tan grande maravilla que es su funcionamiento, los misterios que dejamos para que otros puedan ayudar a seguir aportando un granito de conocimiento a facilitar la comprensión de la perfección humana y ayudar a resolver los misterios de nuestra vida.

INDICE	**3**
RESUMEN	**4**
ABSTRACT	**5**
INTRODUCCION	**6**
HIPOTESIS	**15**
OBJETIVO GENERAL	**16**
OBJETIVO ESPECIFICO	**16**
MATERIALES Y REACTIVOS	**17**
RESULTADOS	**26**
DISCUSION	**38**
CONCLUSIONES	**46**
BIBLIOGRAFIA	**48**

2. RESUMEN:

Cimicifuga racemosa (CR) es un extracto vegetal utilizado como terapia de reemplazo hormonal durante el climaterio. Presenta una dualidad entre alta capacidad antioxidante y en determinadas condiciones una potente actividad oxidante. En esta tesis se planteó como objetivo evaluar la participación de especies reactivas de oxígeno en el mecanismo de acción citotóxica de CR en cultivos de células MCF-7 que corresponden a una línea celular de cáncer de mama. Para lograr este objetivo se determinó la capacidad antioxidante del extracto mediante la técnica ORAC, se evaluó en cultivo celular la producción de oxígeno singulete por estabilización con agua deuterada, se detectó por luminiscencia la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y la lipoperoxidación de las células expuestas mediante la técnica de TBARS. Además se evaluó la actividad enzimática de catalasa y superóxido dismutasa. Se comprobó la actividad antioxidante reportada para CR. La producción de oxígeno singulete no fue detectada en los cultivos expuestos a CR, en cambio se detectó especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. Por otra parte, la actividad catalasa se encontró aumentada luego del tratamiento con CR. No hubo detección de lipoperoxidación celular. En conclusión, los antecedentes indican que la actividad citotóxica del extracto CR está mediado por la producción de especies reactivas con exclusión de oxígeno singulete.

ABSTRACT

Cimicifuga racemosa (CR) is a plant extract used as hormonal replacement therapy during climatery. It shows a duality between a high antioxidant capacity and, in certain cases, a potent oxidant activity. This thesis proposed as aim to evaluate the participation of reactive oxigen species on the cytotoxic mechanism of action for CR on MCF-7 cell culture, a breast cáncer cell line. To achieve this aim, the antioxidant capacity of the extract by the ORAC technique, the oxygen singulet production was assesed by its stabilization with deuterated water, the production of reactive oxygen and nitrogen species was determined by luminiscence and the lipoperoxidation of exposed cells through the TBARS technique. In addition, the enzymatic activity for catalase and superoxide dismutase enzymes was evaluated. The antioxidant activity for the CR extract was demonstrated. The singlet oxygen production was not detected in cultures exposed to CR, however reactive oxygen and nitrogen species were detected. On the other hand, catalase activity was found increased after CR treatment. No lipoperoxidation was detected. In conclusión,the results indicated that the cytotoxic activity of CR extract is mediated by reactive species excluding singlet oxygen.

1. Introducción

Cimicifuga racemosa (CR) también conocida como *Actaea racemosa* (*Black cohosh)* fue descrita por Linneo en el siglo XVIII y posteriormente por Plukenet en 1960 (Alonso, 1999). Es un vegetal perteneciente a la familia ranunculaceae, que crece principalmente en la costa Atlántica Este de Estados Unidos y Canadá, en forma silvestre en bosques nativos ricos en humus y laderas con poca vegetación requiriendo de climas templados (Alonso, 1999). Es una planta de aproximadamente 1,3 metros, rizoma oscuro y grueso, tallo globoso provisto de surcos, hojas grandes, alternas compuestas por dos a cinco foliolos lobulados y dentados con flores blancas, cremosas y brillantes de aroma fétido, en racimo terminal que aparecen en temporadas de verano y otoño, cuyo extracto presenta glucósidos,triterpenos,acteína,12-actenil acteina,27 desoxiacteno, cimicifuginósido y cimicifugina, alcaloides, quinolizidinos, N-metilciticina, tanino, ácido acético, butírico, fórmico, gállico, isoferúlico, oleico, palmítico, salicílico, precipitados amargos, resina, fitoesteroles, aceite esencial que es obtenido a partir del tallo y rizoma usando etanol, metanol, o 2-propanol (Foster, 1999;Kligler, 2003; Lai y col, 2005).

Se ha demostrado que el extracto de CR contiene flavonoides, triterpenoides y cantidades variables de fenoles que en bajas concentraciones actúan como antioxidantes y secuestradores de especies reactivas que causan daño oxidativo en membranas y ADN (Buerdette y col, 2002; Lai y col, 2005; Allouche y col, 2011) y a altas concentraciones actúa como pro-oxidante con efectos citotóxicos en células hepáticas, de cáncer de mama y próstata produciendo detención del ciclo celular (Cipak y col, 2006; Lude y col 2007; Scharstuhl y cols,2009). Esta última información ha sido corroborada en experimentos *in vivo* con ratas (Campos y col, 2012). Sin embargo la relación entre ROS y bioactividad para CR sigue siendo desconocida.

El extracto de CR se usa para el tratamiento de jaquecas, mialgias, neuralgias desórdenes reumáticos, posible potente antidepresivo en terapias de estrés (Nadaoka y col, 2012) y alivio de los síntomas asociados a la menopausia (Mollá y col, 2009; Shams y col;2010 ;Depypere, 2014; Wuttke y col, 2014). Esto último, debido a que tiene actividad estrogénica (Wuttke y col, 2006) y está especialmente indicada en casos en que la terapia convencional se encuentra contraindicada (Borrelli, 2008; Mazzanti y col, 2008). También se ha utilizado como adyuvante en quimioterapia de cáncer mamario porque su débil actividad estrogénica no tiene efectos en el aumento de la neoplasia (Rock y col 2003; Fritz, 2014). Se ha informado en la literatura que CR produce efectos antiproliferativos *in vitro* en células MCF-7, una línea celular de cáncer de mama de morfología epitelial, que expresa el receptor de estrógeno, modulando la expresión de genes pro neoplásicos específicos, tales como ciclinas D1 y D3 (Levenson, 1997; Seidlova-Wuttke y col 2003; Palacio & Masri, 2009; Allouche y cols, 2011). También se ha informado su inhibición de la proliferación de células HepG2 con efectos antiproliferativos apoptóticos no necesariamente dependientes de la modulación del receptor de estrógeno (Gaube y cols, 2007; Einbondl y col y cols, 2008). En la línea celular LNCaP de cáncer de próstata se han reportado efectos similares. Efectos comparables proapoptóticos y antiproliferativos se han observado en la planta *Argania espinosa exert* que contiene moléculas antioxidantes como tocoferol y saponinas (Pinto, 2004; Jarry y cols, 2005; Drissi y cols, 2006). Solo un estudio es contradictorio al uso de CR previniendo su uso prolongado por riesgo de aumento en la proliferacion de células cancerígenas MCF-7 para personas que han sufrido cancer mamario por larga data (Henneicke-von Zepelin y cols, 2007).

Por otra parte se ha informado que el extracto de CR posee un elevado índice ORAC (1264,95 umolTE /g de peso seco) lo que ratifica su capacidad antioxidante (Jarry y col,

2005). Además se ha descrito que moléculas con capacidad antioxidante como triterpenos poseen capacidad citotóxica sobre células cancerosas (Cipak y col, 2006), No se han descrito inactivaciones enzimáticas de SOD y CAT debidas al aumento en la concentración de radicales libres en células neoplásicas generando un aumento de proteínas oxidadas, daño irreversible a ADN e inducción de apoptosis (Deok Kim y col, 2004; Cipak y col, 2006; Juarez y col, 2008; Curtis, 2010;(Riethmüller y col, 2015). Específcamente, moléculas antioxidantes como el ácido gamboico al interaccionar con doxorrubicina producen una acción sinérgica traducida en el aumento de la produccion de ROS induciendo a apoptosis en células neoplásicas de mama (Wang y Yuan, 2013) .También para otros extractos de plantas, como *Dilennia sufruticosa* se ha demostrado una dualidad de actividad antioxidante y altamente citotóxica en variadas lineas celulares como Hela, MCF-7, MDA-MB-231, A549 and HT-29 (Tor y col, 2014).

En el estrés oxidativo se debe tener presente que la mayor parte de las especies reactivas provienen del oxígeno (ERO), distinguiéndose entre los más importantes (Valenzuela,1983;Halliwell, 2000)

<u>Anión superóxido</u>: ($O_2^{\cdot -}$) especie que se forma por el acoplamiento de un electrón suplementario a la molécula de oxígeno. Es una forma reducida de O_2, que ha recibido un electrón de los procesos metabólicos.

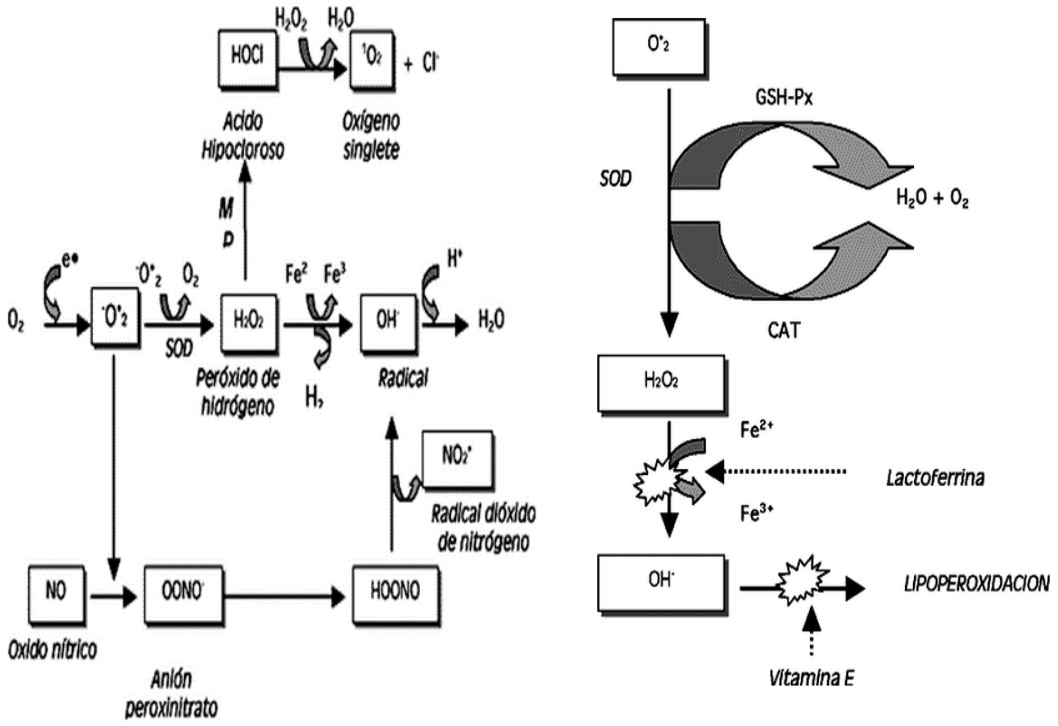
1) **<u>Peróxido de Hidrógeno</u>: (H_2O_2)** forma reducida por dismutación espontánea del $O_2^{\cdot -}$ o por la acción sobre este radical de la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 no es un radical libre, pero por su capacidad de generar el $OH^{\cdot}$ en presencia de metales como el hierro (reacción de Fenton) se considera una especie reactiva del oxígeno.
2) **<u>Radical Hidroxilo</u>:($OH^{\cdot}$)** se produce por la reducción y la oxidación de trazas de metal en presencia de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno (reacción de Haber-Weiss).

Es altamente reactivo con moléculas orgánicas presentes en células y tejidos y posee un elevado poder destructivo.

3) **Radical perhidroxílico** **(HO_2•)** forma reactiva, que surge al unirse un átomo de hidrógeno al (O_2•$^-$). Es liposoluble.
4) **Radical peroxilo** **(ROO•)** formado a partir de peróxido de hidróxido celular (lípidos y proteínas) por sustracción de un hidrógeno.
5) **Oxigeno Singulete** **(O_2^-•):**formado por absorción directa de radiación, por fotólisis (destrucción por acción de la luz) del ozono en aire contaminado, por irradiación de la especie **O_2^-•** o secundariamente a la excitación del óxido de nitrógeno luego de la absorción de energía radiante.

En la reducción univalente del oxígeno (proceso que ocurre en la mitocondria) se producen las principales especies reactivas del oxígeno (Halliwell, 2000).

Las ERO pueden ceder o recibir electrones que dan origen a una secuencia de reacciones y daño celular que se representa en la figura 1A. Las enzimas que participan en estos procesos se presentan en la figura 1B (Castillo y col, 2001).



A B

Figuras 1: Reacciones asociadas a daño celular (A) y mecanismos de defensa contra los daños producidos por EROS (B). (Castillo y col, 2001).

Entre las enzimas que regulan los procesos asociados a las especies reactivas del oxígeno se encuentran:

1. Superóxido Dismutasa (SOD): un grupo de métalo-enzimas presentes frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados. Son esenciales para su defensa contra la toxicidad producida por los metabolitos parcialmente reducidos, generados durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular (Fernandez y col, 2008; Juarez y col, 2008; Catz, 2009).

Se conocen 3 formas de SODs según el metal que utilizan como cofactor. Estas a su vez pueden dividirse en 2 familias filogenéticas diferentes: CuZn-SODs y Fe/Mn-SODs. No existe homología de secuencias ni de estructuras de orden superior entre éstas, lo que indica que

evolucionaron independientemente en respuesta a una presión evolutiva común: la presencia del oxígeno y la amenaza de su toxicidad (Halliwell, 2000).

Estas enzimas catalizan la conversión del anión radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), en una de las reacciones más rápidas catalizadas por enzimas que se conocen (k = 2 x x10^9 Mx1S^{-1} para la CuZn-SOD) (Donoso & Cuello, 2006;Schmid y col, 2009). La ecuación catalizada por las SODs se representa a continuación:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Como las concentraciones del $O_2^{\bullet -}$ son normalmente bajas, la velocidad de reacción depende de su difusión. Sin embargo, la asociación de la enzima con su sustrato no es una simple cuestión de difusión y colisión. La estructura sub-molecular de la enzima, la distribución de carga electrostática, interacciones de apantallamiento por solventes inter e intramoleculares y las interacciones hidrodinámicas, pueden afectar tanto la difusión del $O_2^{\bullet -}$ como su asociación con la enzima. Se ha encontrado que el campo eléctrico de la SOD favorece 30 veces la velocidad de asociación del anión (Drissi y col 2006; Fernandez y col, 2008;Juarez y col, 2008).

Estudios con mutantes deficientes de la SOD evidencian que la enzima, dentro de este sistema de defensa, tiene una función fundamental. Ésta consiste en eliminar el radical superóxido antes de que éste reaccione con moléculas biológicas susceptibles u origine otros agentes tóxicos (Becuwen y col, 2014). El peróxido de hidrógeno generado por la acción de la enzima, es eliminado por la catalasa y/o la glutatión peroxidasa. En eucariotas existen 3 tipos de SODs de diferente localización, que en su conjunto contribuyen a la

regulación de las concentraciones de este radical. Ellas son Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular (Juarez y col, 2008).

En estudios realizados en hepatocitos de rata se encontró que el 20 % de los $O_2^{\bullet -}$ formados en la mitocondria pueden pasar al citosol, mientras el 80 % restante puede ser neutralizado por la enzima mitocondrial disminuyendo su concentración (Boveris y Cadenas, 1997, Papa y cols, 2014).

También se ha descrito que células hepáticas in vivo expuestas a metales pesados ha llevado a oxidación de GSH a GSSG por aumento de anión radical superóxido y que lleva como consecuencia el agotamiento de SOD mitocondrial (Dijendra y cols, 2009).

2) <u>Catalasa (CAT)</u>: *es una enzima presente en variados tipos celulares. Su función es proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno producido en distintas reacciones redox. La CAT cataliza la siguiente reacción:*

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_20 + O_2$$

Es una de las enzimas más eficientes con una velocidad de aproximadamente 200.000 transformaciones/segundo/subunidad. La proteína es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas (350.000 kD). Cada monómero contiene un grupo prostético hemo en el centro activo. En algunas especies también contiene una molécula de nucleotinamidadifosfato (NADP) por subunidad cuya función es proteger a la enzima de la oxidación por su sustrato H_2O_2 (Halliwell, 2000).

La cascada radicalaria en células normales es mantenida a bajas concentraciones por las enzimas anteriormente mencionadas. (Scharstuhl y col 2009; Sashidhara y col, 2010). En células hiperplásicas existe un aumento de radicales libres que es contrarrestado por la

maquinaria enzimática. Dado que existe un permanente estrés oxidativo, Galleano propone que a altas concentraciones de extracto de CR, se generaría un aumento de ERO que no podría ser regulado por células neoplásicas debido a la insuficiente actividad enzimática y provocaría un ambiente citotóxico que no sería sostenible por éstas, induciendo a cambios permanentes en ellas que finalmente llevarían a apoptosis, evitando así la proliferación celular *in vivo* (Galleano y col, 2009). Por otra parte se ha descrito en un modelo animal *in vivo* de ratas ovarectomizadas hipertensas que dosis farmacológicas de CR produjeron aumento de generación de ERO mitocondrial, sin aumento de SOD y reducción de la actividad catalasa peroxisomal y aumento de sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico, que es indicativo de lipoperoxidación (Campos et al, 2012).

Asi el modelo propuesto es el siguiente:

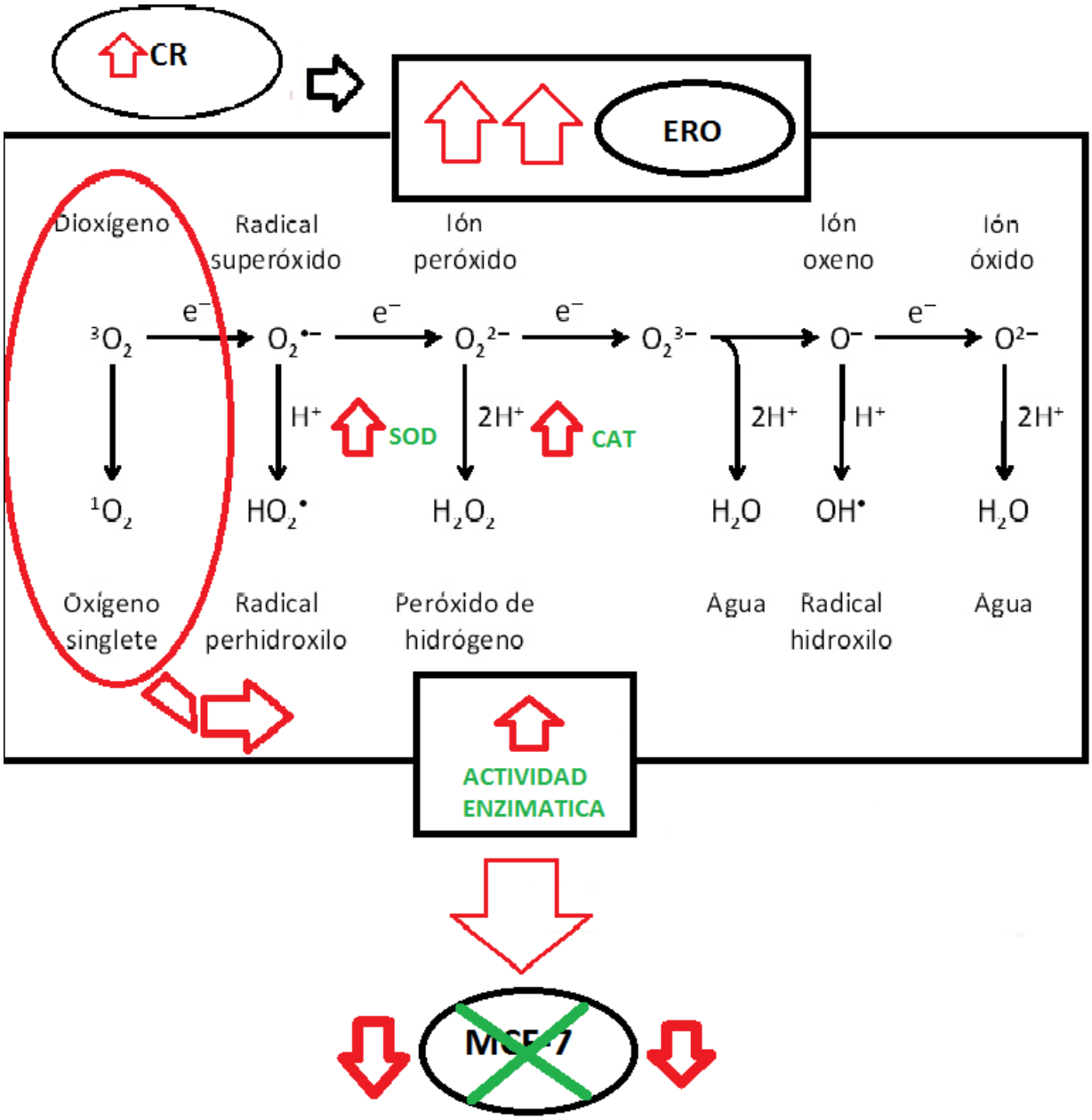


Figura 3: Modelo propuesto de respuesta de células MCF-7 a extracto de CR (elaboración propia).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Se espera que el extracto de *Cimicifuga racemosa,* que posee actividad antioxidante, genere especies reactivas de oxígeno, incluyendo oxígeno singulete, a dosis que son citotóxicas para la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Este efecto será paralelo al aumento en la lipoperoxidación y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa.

3. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Evaluar la participación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el mecanismo de acción citotóxica de CR.

Objetivo específicos:

1. Verificar la actividad antioxidante del extracto de CR

2.- Determinar la producción de oxígeno singulete frente a extracto de CR en cultivos de células MCF-7.

3.- Establecer el efecto del extracto de CR sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación en cultivos de células MCF-7.

4.- Estimar el efecto del extracto de CR sobre la actividad catalasa y superóxido dismutasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Extractos y reactivos

Los extractos fueron una valiosa donación del Dr. Kan HE, de la empresa Naturex, New Jersey, USA. Se utilizó:

- Extracto de *Cimicifuga racemosa* estandarizada con un contenido de 2,5% de triterpenos (CR).
- Estándar valorizado de triterpenos (KH).

Se trabajó con un stock de 10 g/L en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada uno de los extractos. Éste se diluyó posteriormente utilizando medio DMEM libre de rojo fenol (Invitrogen, Carisbad, California, USA) suplementado con suero bovino fetal (Hyclone, USA) al 10% tratado con carbón activo para adsorber las moléculas esteroidales, penicilina 0,1U/mL y estreptomicina 0,1mg/mL. Para obtener extractos de concentración 2000 µg/L y 20 ug/L se diluyó nuevamente la solución anterior usando medio DMEM libre de rojo fenol. (Henneicke-von Zepelin y col 2007).

Todos los reactivos utilizados fueron grado pro analisis marca Merck, excepto doxorrubicina que fue comprada a Sigma Chemical Co.

4.2 Actividad antioxidante por método ORAC.

Esta técnica se basa en la descomposición de un compuesto azida, que libera nitrógeno gaseoso que en presencia de oxígeno genera radicales peroxilos (ROO˙) que de ser atrapados por moléculas antioxidantes producen compuestos coloreados cuya absorbancia es detectable. Los resultados son calculados como el área bajo la curva (AUC) para la obtención de valores expresados como equivalente Trolox, molécula que es usado como referente (Schain y col, 2015).

Se utilizó los extractos CR y KH a concentraciones de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,25 mg/mL y 0,0625 mg/mL. Estos se incubaron con ABAP (2,2´-azobis (2-metilpropionamidina) 0,6 M y Pirogalol Rojo 5 mM en solución salina tamponada con fosfato 0,1M, pH7,4 (PBS) que habían sido previamente llevados a 37°C en baño termorregulado. Se detecta la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro Hanna en intervalos de tiempo de 1 min durante 20 min. Se usó agua destilada como blanco de reactivos.

4.3 Cultivos celulares

Se trabajó con células de cáncer humano de mama receptor de estrógeno positivo MCF-7. (Levenson, 1997; David & Ades, 2006; Gaube y col 2007) adquiridas de ATCC (ATCC® HTB-22™). Se mantuvieron en frascos de cultivo con medio DMEM/F12 glutamax alto en glucosa (suplementado con suero bovino fetal 10%, penicilina 0,1U/ml/estreptomicina 0,1mg/mL) a 37ºC, 5% de CO_2, en ambiente humidificado en un incubador Thermo Forma. El medio se reemplazó cada 3 días hasta alcanzar la confluencia del 80 a 90% para luego traspasar células a nuevo frasco en proporción 1:3.

Los medios de cultivo y antibióticos se adquirieron en INVITROGEN, Carisbad, USA y el suero bovino fetal en Biologicals Industries, Israel. Todas las actividades asociadas a cultivos celulares se efectuaron en un gabinete de bioseguridad ESCO.

4.3.1 Determinación de producción de oxígeno singulete en cultivo celular.

El fundamento de este métodos es que la presencia de agua deuterada reduce la velocidad de desactivación del estado singulete aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen (Valenzuela y col, 1983). El resultado es que oxígeno singulete poseerá un tiempo de vida mucho mayor en D_2O que en agua común (de 3 a 4 μs en H_2O a 62 μs en D_2O (Foote y col, 1995). Por lo tanto, si la producción de oxígeno singulete es parte del mecanismo de acción de CR, al ser estabilizado por deuterio, sus efectos se verán exacerbados.

Para observar este efecto se sembró 5.000 células en placas de 96 pocillos las que fueron expuestas a diferentes tiempos y concentraciones de CR, KH o doxorrubicina (control positivo para la producción de radicales libres (Birandra y col, 1987). Algunos cultivos se desarrollaron en presencia de agua deuterada (Wojcikowski, 2007). Cada condición se ensayó en cuadriplicado.

Para determinar la viabilidad celular se aplicó la técnica de resazurin que se basa en la reducción metabólica de (7-Hidroxi-3H-phenoxazin-3-one 10-oxido) por deshidrogenasas mitocondriales cuya actividad refleja la viabilidad celular. El compuesto reducido es fluorescente con una longitud de onda de excitación de 544 nm de excitación y de emisión a 590 nm que se lee en un lector Appliskan de Thermoscientific (Ahmed et al, 1994). La viabilidad celular se calculó a partir de la relación condición experimental sobre condición control expresada en porcentaje (Lamprecht y col ,1991).Las condiciones de cultivo, incluyeron controles para verificar efectos citotóxicos de la presencia de D_2O y DMSO en los cultivos que se detallan en la Tabla 4.1 y en la Fig. 4.1.

Las condiciones ensayadas fueron seleccionadas de experiencias preliminares desarrolladas en el laboratorio.

CODIGO PLACA	SIMBOLOGIA TRATAMIENTO	DESCRIPCION
A	MB 200	Medio sin tratamiento
B	H_2D 200	H_2D50%
C	DX0.1 200	Doxorrubicina 0,05 uM
D	DX1 200	Doxo 0,5 uM
E	DX0H 200	H_2D 50% y Doxo 0.05 uM
F	DX1H 200	H2D 50% y Doxo 0,5 uM
G	DM 1:10 200	DMSO 1:10
H	DM 5.9 200	DMSO 1:100
A	KH2000 200	KH 2000
B	KH20 200	KH 200
C	CR2000 200	CR 2000
D	CR20 200	CR 200
E	KDH2D2000/ 200	KH 2000 y H_2D50%
F	KDH2D20/ 200	KH 200 y H_2D 50%
G	CRH2D2000/200	CR 2000 y H_2D 50%
H	CRH2D20/200	CR 200 y H_2D 50%

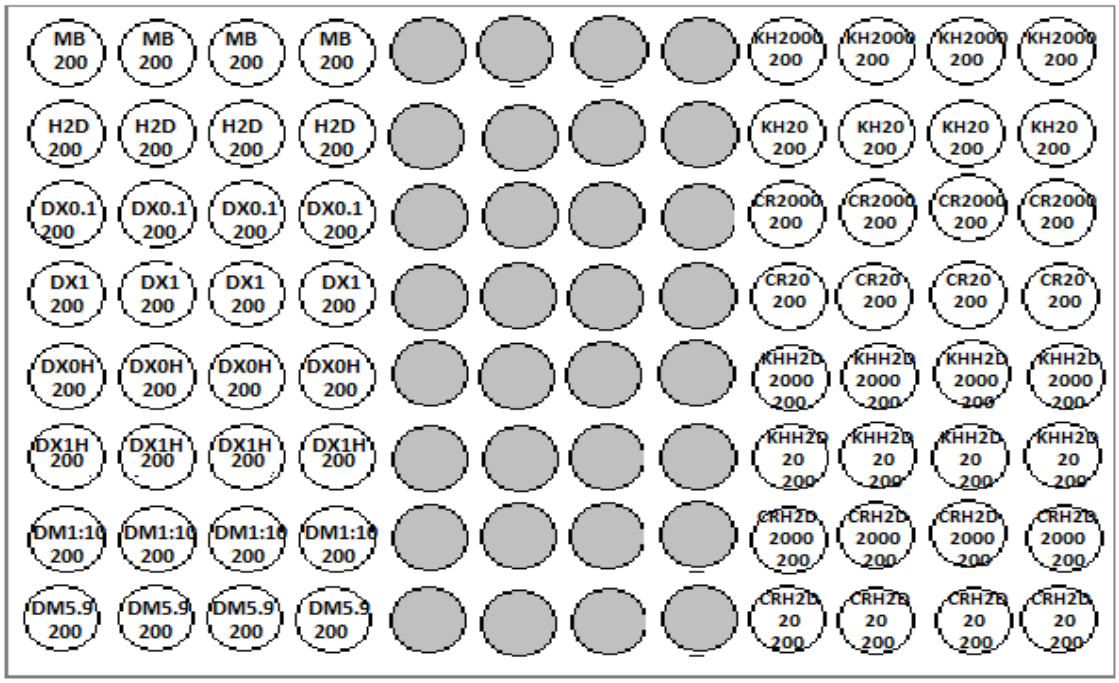


Fig. 4.1 Diseño de la placa de cultivo celular para detectar oxígeno singulete.

4.3 Detección de actividad superóxido dismutasa

La SOD cataliza la reducción de anión radical superóxido cuya concentración se puede determinar por la cinética de reducción de citocromo C, que se sigue mediante espectrofotometría de absorción a 540 nm cada 15 minutos. El método se basa en proporcionar el sustrato (anión radical superóxido), a través de la reacción xantina-xantina oxidasa, y luego medir su desaparición que será proporcional a la actividad de la SOD e inversamente proporcional al citocromo c reducido (Halliwell, 2000).

La actividad SOD fue evaluada en lisados de células cultivadas por 48 h en doxorrubicina 1 uM, KH 2000 mg/L, CR 2000 mg/mL y medio sin tratamiento. Se usó una solución de lisis de NaCl 0,1 M que fue suplementada con EDTA 5mM (inhibidor de metaloproteasas) y un cocktail de inhibidores de proteasas a 10 uL/mL (Thermoscientific). Los lisados fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Los lisados fueron expuestos a xantina 0,5 mM y xantina oxidasa 2,5% v/v y una solución de citocromo c cuya absorbancia ha sido previamente ajustada a 0,152. A continuación se lee a 550 nm usando una solución EDTA 0,1 mM, pH 7,8 que se usó para disolver los reactantes. Todas las condiciones fueron evaluadas en dos experimentos independientes con triplicados en cada uno de éstos.

La siguiente expresión permitió determinar la cantidad de citocromo C reducido:

$$\frac{\text{Absorbancia/minuto}}{21.1\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1} \times \text{célula/mL}} \quad [\text{nmol citocromo cel/min}]$$

Los resultados se normalizan por la concentración de proteínas determinada con el Kit BCA (Thermoscientific). Luego se calcula la actividad enzimática que se expresa en U/mg de proteína. Los cálculos se efectuaron aplicando un programa informático utilizando el software Microstat®.

4.5. Detección de especies reactivas de Oxígeno y/o Nitrógeno.

Este método se fundamenta en la propiedad del luminol de emitir luminiscencia en presencia de especies oxidantes (Catz, 2009). Como control de la técnica se usa 2',2'-azobis-2-metilpropionamida (APPH) como generador de radicales libres y la luminiscencia del luminol como indicador de concentración de ERO y especies reactivas de nitrógeno en estado estacionario (Haklar y col, 2001).

Las células (5.000) fueron cultivadas por 48 h en placas de 96 pocillos a concentraciones seleccionadas de extracto de CR y KH (las mismas que en experimento 4.3.1), doxorrubicina 1 µM (control positivo), APPH (control positivo) y en condiciones de cultivo control (sin tratamiento).

El diseño de la placa se presenta en la figura Fig. 4.2.

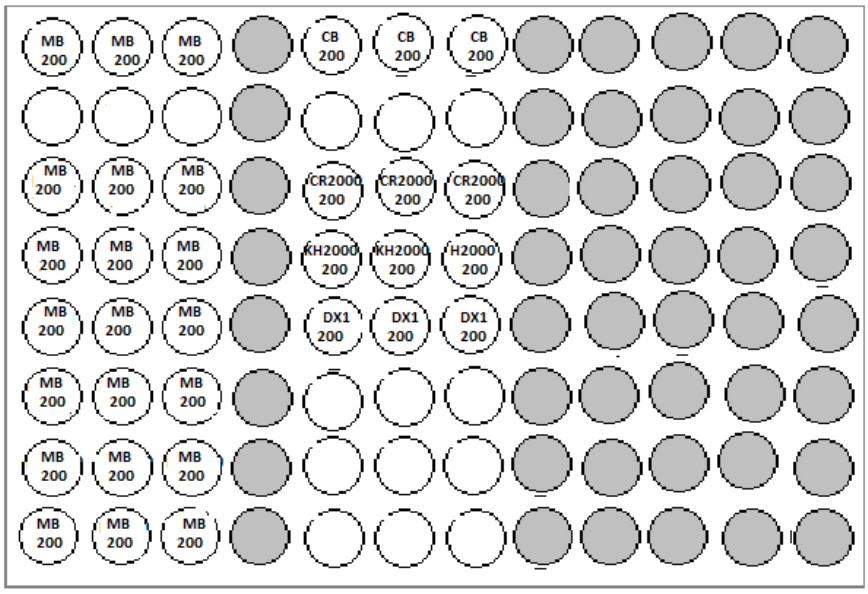


Fig.4.2 Diseño de placa de cultivo para evaluar especies oxidantes totales. Los códigos son los mismos de la sección 4.1.1.

Los sobrenadantes de los cultivos se transfirieron a pocillos libres de células de la misma placa y se efectuó una lectura basal de luminiscencia a tiempo 0, y luego se agregó luminol 25 mM y se leyó a tiempos de 0, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 min. La quimioluminiscencia fue medida en contador de fotones en espectrofotómetro utilizando placas para 96 pocillos especiales para leer luminiscencia (Appliskan, Thermo Forma). Los resultados se expresan como curvas de luminiscencia en el tiempo para el estado basal y posterior a la adición de luminol.

3.4.7 Actividad Catalasa (CAT)

El método se basa en el seguimiento, por espectrofotometría de absorción a 240nm, de la cinética de degradación de peróxido de hidrógeno.

Las células MCF-7 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta su pre-confluencia en presencia de concentraciones seleccionadas de extracto de CR y KH, a 2000 y 20 mg/L, doxorrubicina (control positivo) o en condiciones de cultivo control (sin tratamiento). Al cabo de 48 horas las células fueron lisadas utilizando una solución de NaCl 0,1 M que fue suplementada con EDTA 5mM (inhibidor de metaloproteasas) y un cocktail de inhibidores de proteasas a 10 uL/mL (Thermoscientific). Los lisados fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Los lisados celulares fueron expuestos a 100 µL de H_2O_2 a una concentración de 0,3M. A continuación la absorbancia a 240nm fue seguida cada 15 segundos por un período de un minuto. Al lisado celular se le detectó también la concentración de proteínas mediante un ensayo de microBiuret comercial (Thermoscientific). La actividad de catalasa se informó como unidades de actividad enzimática/por mg de proteína (Halliwell, B. 2000).

3.4.8 Detección de daño oxidativo en membranas por ROS (Lipoperoxidación)

TBARS

Este ensayo permite cuantificar los lipoperóxidos presentes en un sistema biológico. Se basa en la reacción entre malonaldialdehido (MDA), producto de la lipoperoxidación y ácido tiobarbitúrico (TBA) que genera un producto coloreado que absorbe a 540 nm.

En este ensayo se utilizó células cultivadas en las siguientes condiciones: control (sin tratamiento), extracto CR 2000 mg/L y doxorrubicina 1 µM. Se preparó lisados en las mismas condiciones descritas en experimentos anteriores y se eliminó las proteínas por precipitación con ácido tricoloroacético (TCA) (30% p/v). Luego el sobrenadante de cada muestra se hizo reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67% p/v), manteniendo en baño de agua a ebullición por 20 min y deteniendo luego la reacción en baño de hielo. Posteriormente se leyó la absorbancia en un rango de 400 a 600 nm para determinar el área bajo la curva del máximo de absorción. El resultado se interpoló en una curva de calibración de malondialdehido (MDA) previamente confeccionada utilizando el software microstat®. Los resultados se expresan en nM de MDA/mL de muestra.

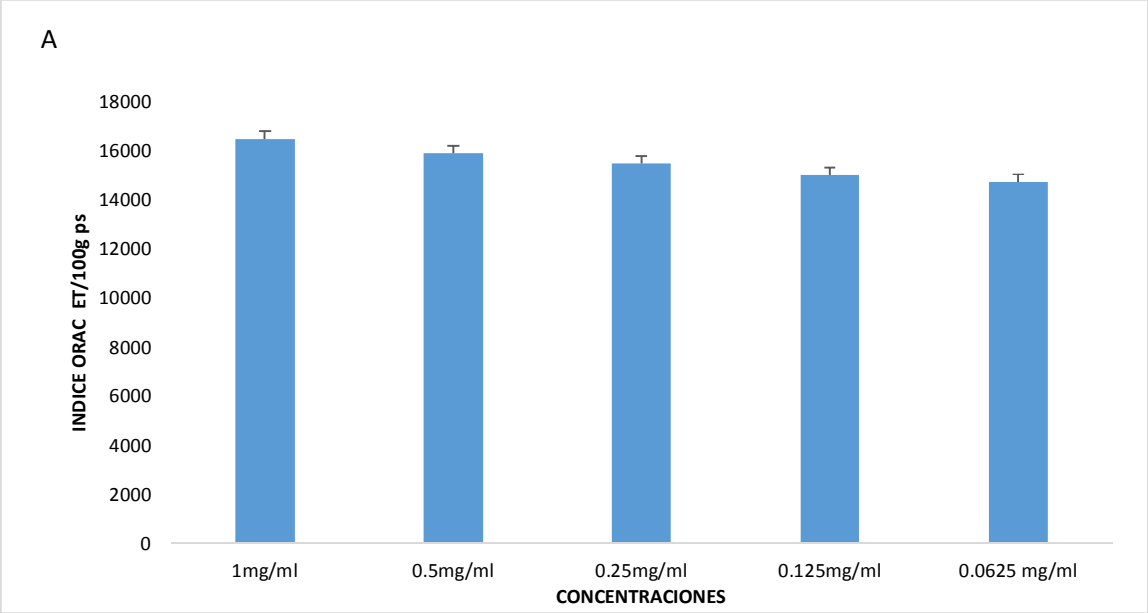
5. RESULTADOS

Esta sección se presenta organizada según su aporte al cumplimiento de los objetivos específicos.

O.E 1. Verificar la actividad antioxidante del extracto de CR

5.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Se cuantificó a través de la capacidad de absorción de radicales oxígeno inducidos por pirogalol por el método ORAC. Se calculó índice ORAC a cada una de las concentraciones evaluadas (Fig 5.1 y Tabla 5.1.). La actividad de CR no presenta una relación dosis respuesta y se considera que el extracto en todas sus diluciones posee actividad antioxidante. Esto es ligeramente diferente a lo encontrado con KH que corresponde a un extracto valorado de triterpenos, que si bien a 1 mg/mL presenta un valor del índice ORAC semejante a CR, se evidencia una disminución de este valor con la dilución del extracto.



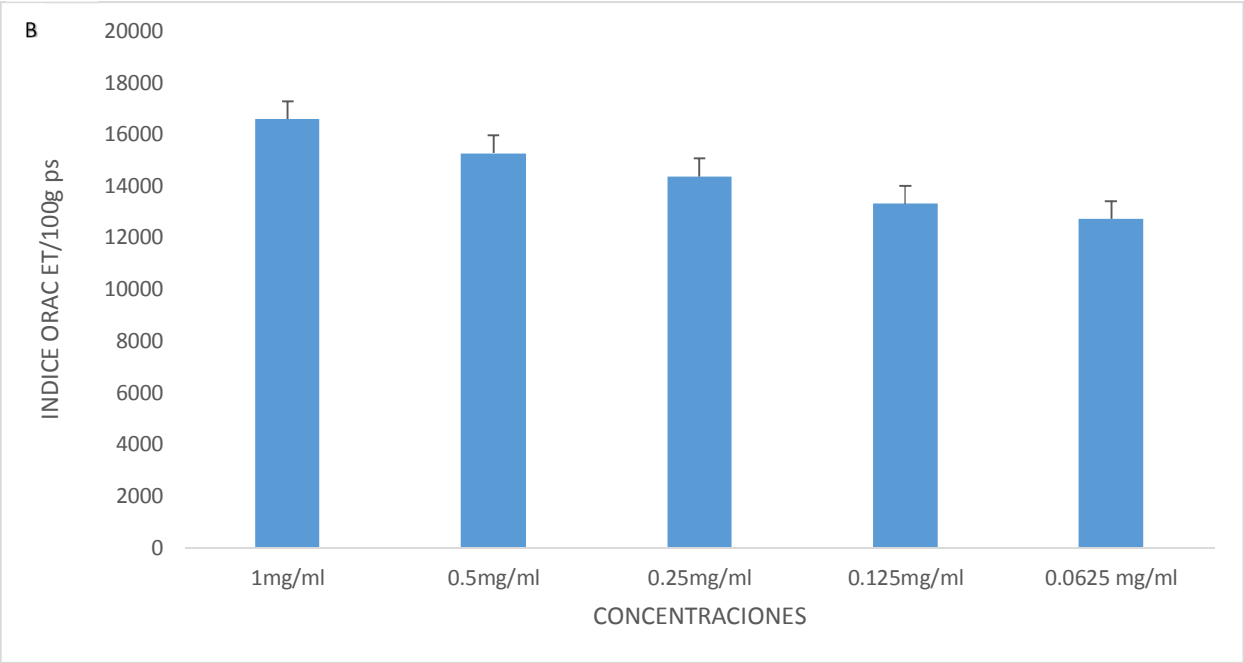


Fig. 5.2 Índice ORAC según concentración de CR (A) y KH (B). El índice fue calculado según lo descrito en materiales y métodos.

TABLA 5.1: INDICE ORAC A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS

CONCENTRACION EXTRACTO	INDICE ORAC (ET/100 g ps) CR	KH
1mg/ml	16471,7	16566,8
0.5mg/ml	15893,1	15240,9
0.25mg/ml	15469,4	14341,5
0.125mg/ml	15008,3	13275,3
0.0625 mg/ml	14735,8	12706,2

O.E 2. Determinar la producción de oxígeno singulete frente a extracto de CR en cultivos de células MCF-7.

5.2 DETERMINACIÓN DE OXIGENO SINGULETE

En primer lugar se determinó el efecto del H_2D sobre la viabilidad celular con la finalidad de establecer la dosis a utilizar en los experimentos posteriores usando los extractos en evaluación. Existe un efecto del deuterio sobre la viabilidad celular que es proporcional a la dosis, tal como se representa en la Fig. 5.2 y en la Tabla 5.2. Por este motivo se decidió usar el menor porcentaje de agua deuterada en los experimentos posteriores, para minimizar la pérdida viabilidad producida por dilución del medio.

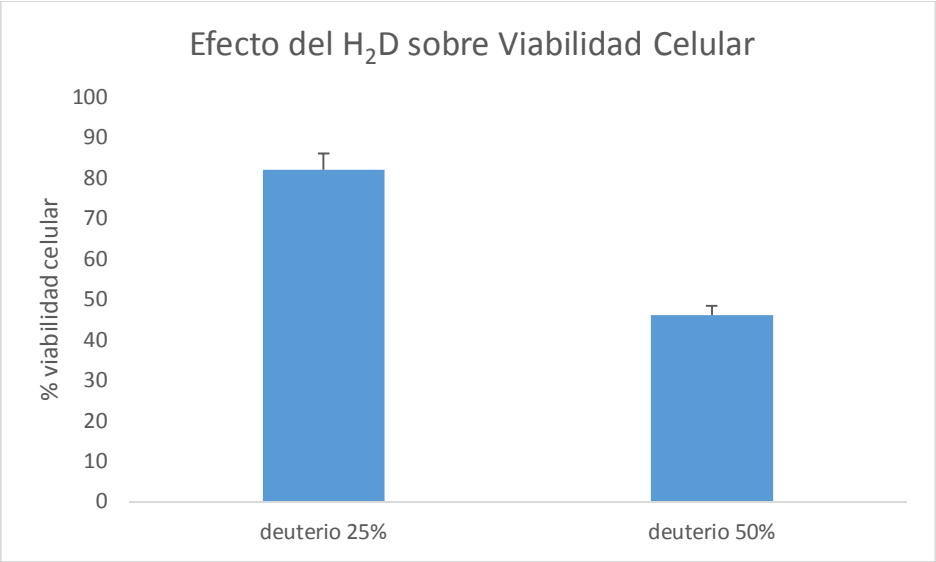


Fig.5.2: Porcentaje de Viabilidad celular de células expuestas a diferentes concentraciones de agua deuterada respecto a cultivos control. La viabilidad celular se determinó a las 48 h, según lo descrito en materiales y métodos.

El control de la técnica fue realizado utilizando doxorrubicina cuya capacidad de generar radicales como oxigeno singulete está demostrada en la literatura. Los resultados obtenidos

fueron los esperados, dado que a mayor concentración de agua deuterada la viabilidad celular disminuyó. Esto se explica por la mayor presencia de las especies citotóxicas de oxígeno singulete que resultan estabilizadas en presencia de H_2D.

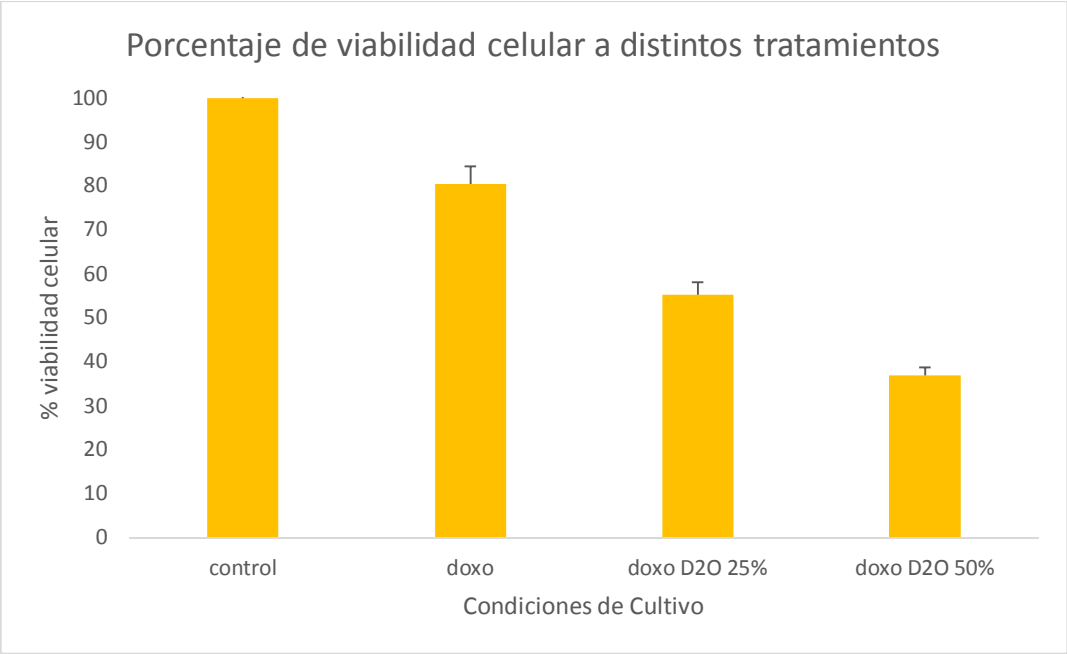


Fig.5.2 Viabilidad celular en los diferentes tratamientos. Las células fueron cultivadas en presencia de doxorrubicina o doxorrubicina en agua deuterada al 25 o 50%. La viabilidad celular determinó a las 48 h, y corresponde a la relación porcentual de unidades de fluorescencia generadas en la condición bajo estudio respecto a las células en condiciones control.

TABLA 5.2: VIABILIDAD CELULAR (%) DE CÉLULAS MCF-7 CULTIVADAS EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA DEUTERADA.

CONDICIONES	% VIABILIDAD CELULAR
DEUTERIO 25%	82
DEUTERIO 50%	46,1

A continuación se procedió a realizar los experimentos con los extractos a evaluar. Para el extracto KH, se detectó una disminución de viabilidad en presencia de agua deuterada que fue más notorio para la menor concentración evaluada. Sin embargo, este efecto no se detectó para el extracto CR, en ninguna de las dos concentraciones evaluadas. Esto descarta un mecanismo citotóxico mediado por oxígeno singulete.

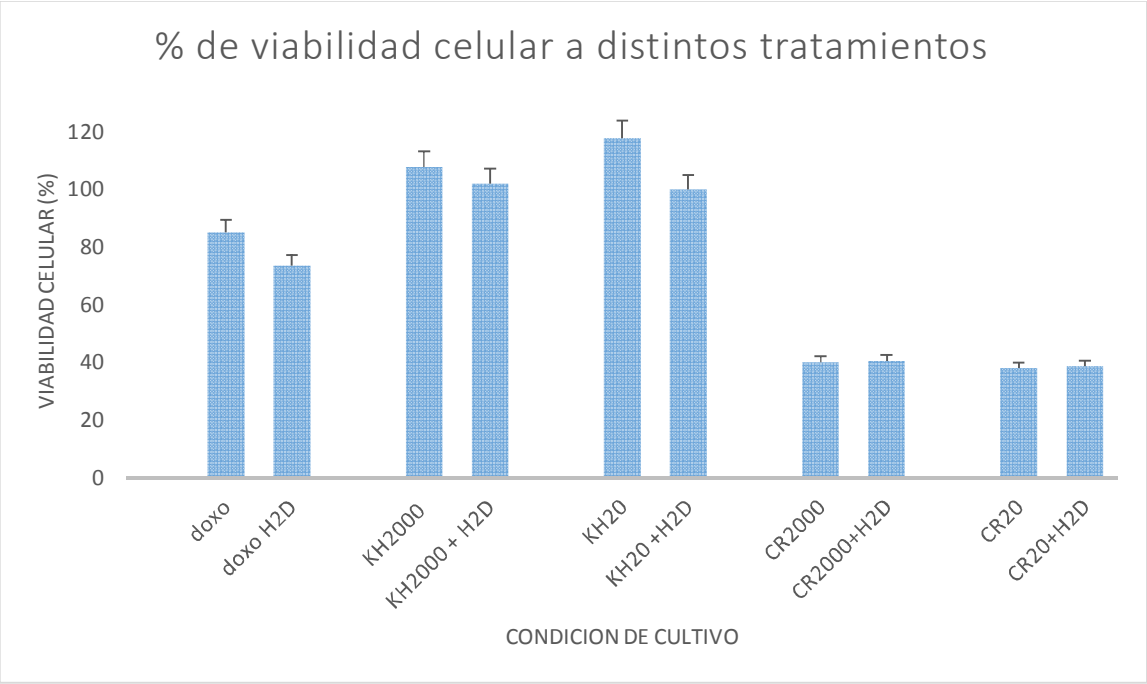


Fig.5.4 Porcentaje de Viabilidad celular de células expuestas a doxorrubicina, KH (2000 y 20 mg/L), CR. (2000 y 20 mg/L) en presencia y ausencia de H_2D al 25%. La viabilidad celular determinó a las 48 h, según lo descrito en materiales y métodos.

TABLA 5.3: VIABILIDAD CELULAR (%) DE CÉLULAS MCF-7 CULTIVADAS EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DOXO, KH Y CR.

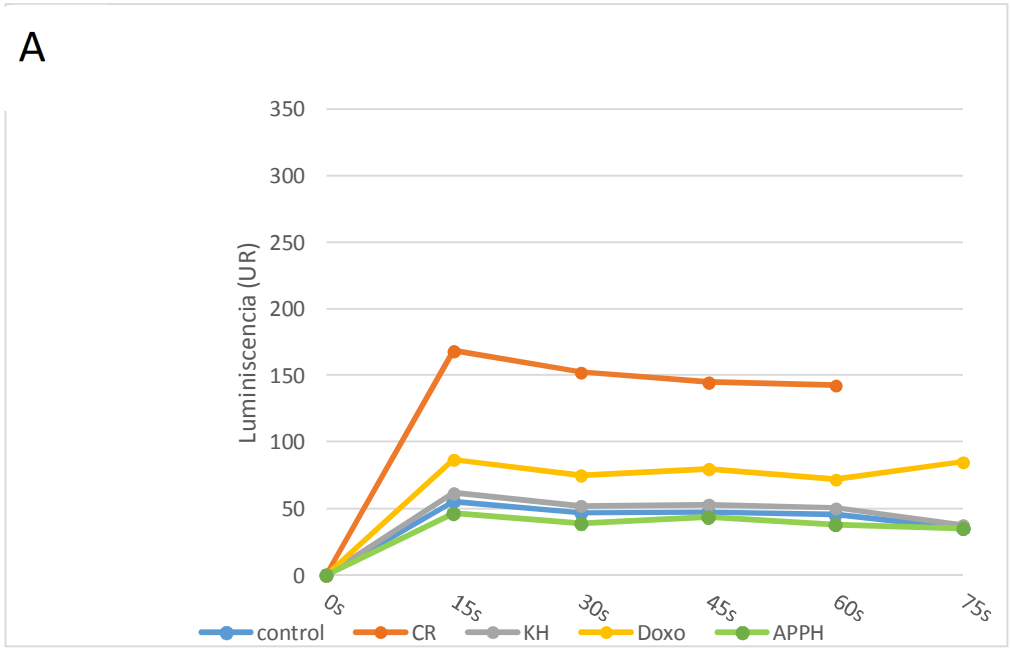
CONDICIONES	VIABILIDAD CELULAR (%±DE)
DOXO	85,3±1,7
DOXO H_2D	73,8 ±2,8
KH2000	108 ±3
KH2000 + H_2D	102,2 ±3,9
KH20	118,0±3,5
KH20 +H_2D	100,1±4,2
BC2000	40,1±10
BC2000+H2D	40,5±10,5
BC20	38,0±10,6
BC20+H2D	38,7±10,4

OE 2.Establecer el efecto del extracto de CR sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación en cultivos de células MCF-7.

5.3 DETERMINACION DE ESPECIES REACTIVAS DESDE OXIGENO Y/O NITROGENO

El luminol en presencia de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno emite luminiscencia. Los sobrenadantes de células en cultivo expuestos a los extractos en estudio fueron incubados con luminol y la luminiscencia detectada se considera proporcional a las ERO. Además se contó con un control con células sin tratamiento y una condición tratada con APPH, como control positivo para la generación de ERO.

Se efectuaron mediciones a tiempo 0 y luego de 1 h de exposición a luminol. Los resultados de las lecturas en ausencia de luminol se presentan en la Fig. 5.5. Se detectaron valores basales bajos para cada condición. En cambio, luego de la incubación con luminol, se observó la máxima reacción para triterpenos, consistente con sus resultados positivos en el ensayo de oxígeno singulete. Luego, CR también presentó actividad de luminiscencia superior a sus valores basales, señalando que se produce alguna especie reactiva de oxígeno o nitrógeno, aunque no es oxígeno singulete. Los dos extractos entregan una actividad superior a la del control positivo de la técnica APPH. Por su parte, doxorrubicina, droga reconocida por la producción de ERO presenta una actividad comparable con la del APPH y consistente con los resultados del ensayo de detección de la generación de oxígeno singulete.



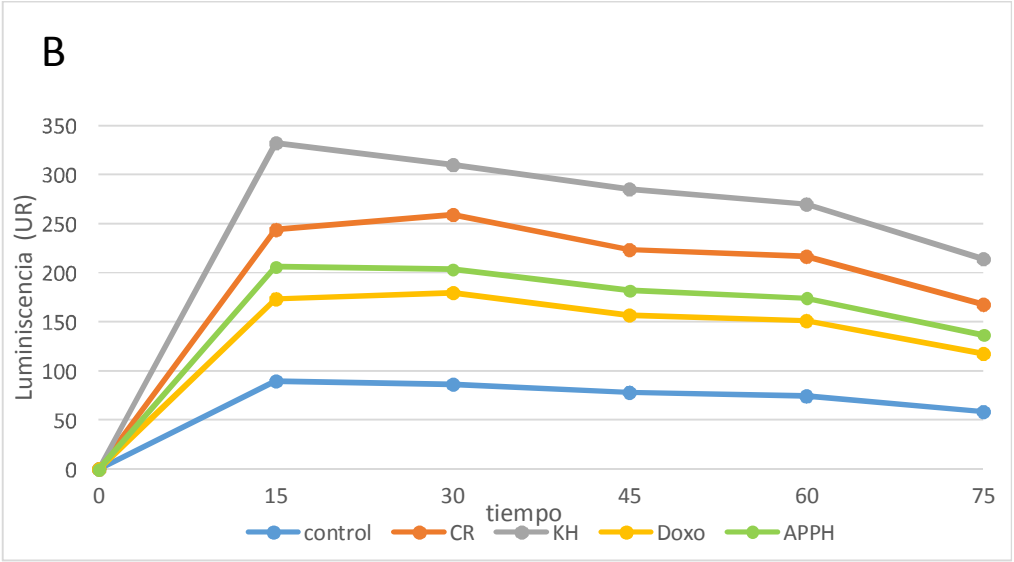


Fig. 5.5. Luminiscencia en el tiempo basal (A) y a una hora de incubación con luminol (B) para un sobrenadante de cultivos expuestos a diferentes condiciones de cultivo. Control (sin tratamiento), CR (cimifuga racemosa 2000 mg/L), KH (extracto estandarizado de triterpenos (2000 mg/L), Doxo (doxorrubicina), APPH (2',2'-azobis-2-metilpropionamida).

TABLA 5.4: LUMINISCENCIA BASAL PARA SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES SOMETIDOS A DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO

Tratamiento	Tiempo (s)					
	0	15	30	45	60	75
Control	0	55,0	46,7	47,3	45,2	35,3
CR	0	168,3	152,3	145,0	142,5	140,3
KH	0	61,7	52,0	53,0	50,5	37,7
DOXO	0	86,7	75,0	79,7	71,9	85,0
APPH	0	46,3	39,0	43,7	37,9	35,3

TABLA 5.5: LUMINISCENCIA PARA SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES SOMETIDOS A DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO

Tratamiento	Tiempo (s)					
	0	15	30	45	60	75
Control	0	89,7	86,3	80,0	74,0	78,7
CR	0	244,0	259,0	258,3	233,3	245,7
KH	0	332,0	310,0	317,0	322,3	322,0
DOXO	0	173,7	179,7	169,3	179,7	167,7
APPH	0	206,3	203,7	213,0	205,3	208,3

5.4 DETERMINACION DE LIPOPEROXIDACIÓN

Se evalúa la producción de malondealdehído en lisados provenientes de células en cultivo en las condiciones en estudio luego de su exposición a ácido tiobarbitúrico (TBA). Solamente doxorrubicina presentó valores sobre el control sin tratamiento, indicando la presencia de lipoperoxidación. Esto es esperable dada su condición de antineoplásico con mecanismo de acción parcialmente atribuido a la producción de ERO. La ausencia de este efecto para CR es deseable dado su uso como fitoterapéutico en el control de los síntomas del climaterio.

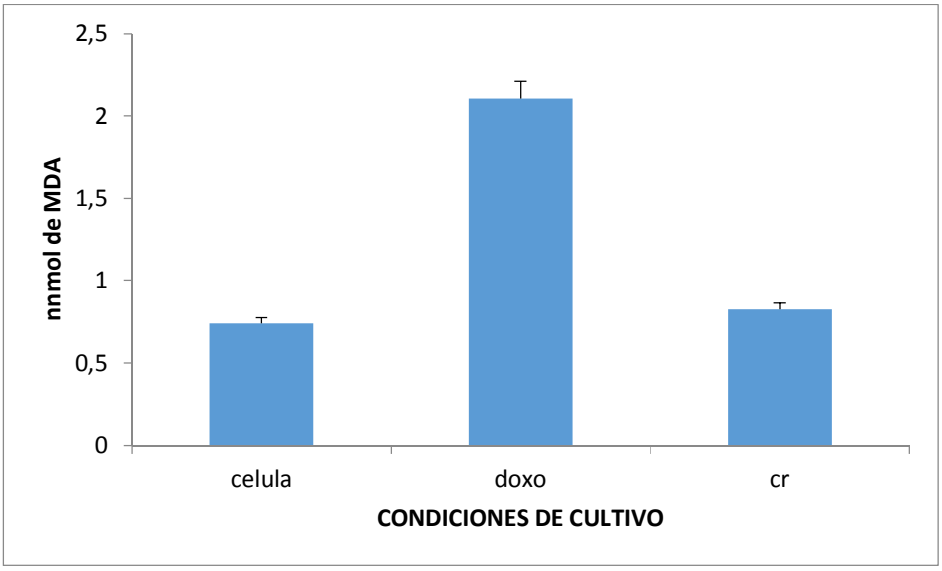


Fig. 5.6 TBARS para detectar lipoperoxidación en cada condición de cultivo, control (sin tratamiento), doxo (doxorrubicina 1mM) y CR (Cimicifuga racemosa 2000 mg/mL).

OE3. Estimar el efecto del extracto de CR sobre la actividad catalasa y superóxido dismutasa.

5.7 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

5.7.1 SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

Los cultivos celulares expuestos a los extractos en estudio originaron lisados que se utilizaron para detectar la actividad SOD. Esta se evaluó por generación *in situ* de anión radical superóxido por reacción enzimática xantina-xantina oxidasa y detección de la reducción del citocromo c, que compite por los electrones de anión radical superóxido con la SOD.

La actividad enzimática calculada para cada condición en estudio se representa en el gráfico de la Fig. 5.7. Solamente las células cultivadas en presencia de doxorrubicina por 48 h presentan mayor actividad de esta enzima, consistente con su reconocido mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno.

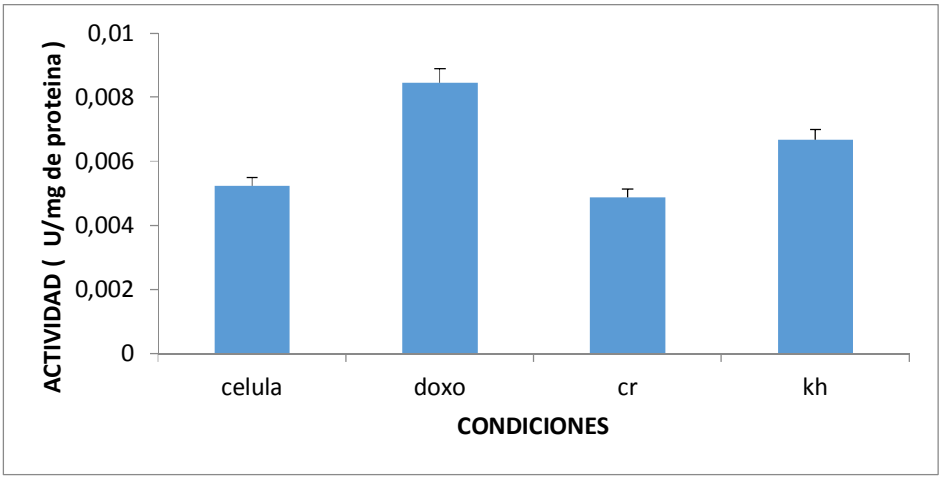


Fig 5.7: Actividad SOD en lisados celulares correspondientes a exposiciones en distintas condiciones. Control (medio de cultivo convencional), Doxo (doxorrubicina), CR (cimicifuga

racemosa 2000 mg/L), KH (Extracto estandarizado de triterpenos, 2000 mg/L). Las barras corresponden a la desviación estándar.

5.3.1 CATALASA (CAT)

La actividad catalasa en respuesta a los distintos estímulos fue evaluada en los lisados celulares expuestos a H_2O_2 y detección subsecuente de la reducción de la absorbancia en el tiempo. La actividad enzimática calculada se presenta en la Fig.5.8 y se evidencia un aumento de esta actividad enzimática en todos las casos, pero en células expuestas a CR es aparentemente de mayor magnitud (aunque existe una alta desviación estándar).

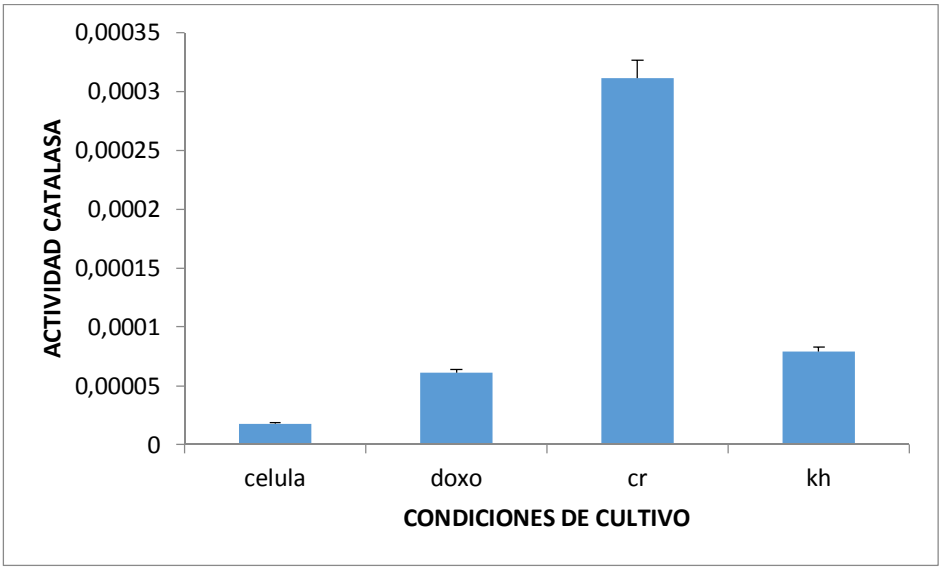


Fig 5.8: Actividad CAT en lisados celulares correspondientes a exposiciones en distintas condiciones. Control (medio de cultivo convencional), Doxo (doxorrubicina), CR (cimicifuga racemosa 2000 mg/L), kh (Extracto estandarizado de triterpenos, 2000 mg/L). Las barras corresponden a la desviación estándar.

6. DISCUSIÒN

Se estudió el extracto de *Cimicifuga racemosa* por sus propiedades antioxidantes y secuestradores de RL que causan daño a membranas y ADN debido a la diversidad de moléculas que lo componen como flavonoides, triterpenoides (entre los más abundantes) y variables cantidades de fenoles que poseen esta conocida actividad (Buerdette y col, 2002; Lai y col, 2005; Allouche y col, 2011). Se ha informado los efectos citotóxicos de esta molécula a altas concentraciones en células hepáticas, de cáncer de mama y próstata, sobre las que se informa la capacidad de detener el ciclo celular (Cipak y col, 2006; Lude y col, 2007). A pesar de estos informes, poco se ha estudiado sobre el mecanismo de acción y las moléculas a las que se pudieran atribuir estas importantes actividades biológicas de extracto de CR.

Para este estudio se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7, la cual se expuso a distintos tratamientos de extractos (CR y KH) comparando el efecto producido por doxorrubicina, potente antineoplásico con características pro-oxidantes y apoptóticas que actúa sinérgicamente con algunas moléculas antioxidantes como el ácido gamboico en cáncer de mama (Wang y Yuan, 2013). La línea celular MCF-7 fue utilizada porque existen estudios previos que demostraron la actividad citotóxica de CR sobre la misma línea celular (Pinto,2004 ;Orellana,2007; Acevedo,2010). Además, se evaluó el efecto sobre esta línea celular que representa un carcinoma mamario porque este extracto se usa en mujeres con contraindicación para uso de terapia de reemplazo hormonal convencional por padecer riesgo de cáncer de mama.

Se evaluó la capacidad antioxidante total por método ORAC-TROLOX, ocupando curva standard (Lissi, 2006) cuyos valores no presentaron una relación dosis respuesta para CR. Para el caso de KH mostró un acercamiento a la relación dosis respuesta que se evidenció con una disminución del valor a la dilución del extracto. Entre los inconvenientes

presentados para CR fue la dificultad para diluirlo al 100% lo que pudo haber afectado en los resultados obtenidos.

Los índices ORAC, que reflejan la capacidad antioxidante del extracto obtenidos, fueron del orden de 16.000 ET/100g ps, altos y comparables con valores reportados para frutos con reconocida capacidad antioxidante, como la variedad de berries para las que se reportan valores de 11 860 ET/100g ps (INTA, 2010;USDA database , 2010). Además el resultado reportado en esta tesis es más elevado que el índice ORAC reportado por otros autores para CR de 1264,95 umol TE/g (Wojcikowski y cols, 2007).

Al comparar las curvas de capacidad antioxidante para CR y KH no existen diferencias significativas entre ellos, lo que pudo deberse muestra problemas experimentales, ya que se esperaba que hubiere una mayor capacidad antioxidante para KH como extracto purificado para triterpenos que se considera una reconocida molécula antioxidantes de origen natural (Cipak y col,2006). Sin embargo, se puede especular, que otras moléculas presentes en el extracto de CR, tales como polifenoles puedan estar contribuyendo a la actividad antioxidante de este extracto.

En la determinación de oxigeno singulete se comprueba que el H_2D al 25% presenta un efecto citotóxico moderado al reducir al 82% la viabilidad celular, mientras que para H_2D al 50% su valor disminuye a un 46% . Por este motivo en los experimentos para evaluar la producción de esta especie reactiva de oxígeno en células expuestas a extractos de CR, se optó por la concentración inferior de agua deuterada. El efecto esperado de aumento de citotoxicidad no fue observado para células expuestas a CR por lo que se descarta la participación de oxígeno singulete en la citotoxicidad observada para este extracto. Según lo revisado en la literatura, este es el primer informe que reporta la evaluación de la producción de oxígeno singulete en células tratadas con extracto de CR. Se ha reportado para antioxidantes de tipo flavonoide una capacidad de detener a las especies de oxígeno

singulete (Sandoval, 2012) y como el extracto de CR contiene flavonoides sería posible atribuir a estas moléculas, más que a su contenido en triterpenos, la falta de detección de esta especie reactiva. Esto porque en el extracto de triterpenos, a diferencia de lo observado con CR, se produjo un descenso de viabilidad en presencia de H_2D. Por otra parte para doxorubicina, según lo esperado, se observó disminución de la viabilidad celular en presencia de H_2D, de acuerdo a lo esperable teóricamente, dado el mecanismo de acción de esta droga que incluye la producción de ERO, cuya acción citotóxica sobre las células ha sido establecida (Birandra et col, 1987, Wang y Yuan, 2013). Sin embargo, este descenso fue moderado, por lo que se puede prever que oxígeno singulete no es la principal especie radicalaria producida por doxorubicina.

Las concentraciones utilizadas reflejan las concentraciones plasmáticas alcanzables luego de la administración de una dosis. No tiene sentido probar *in vitro* dosis mayores si se tiene en cuenta los reportes que indican, toxicidad a nivel hepático para dosis mayores (Lude y col, 2007).

Es interesante discutir la observación del efecto del extracto KH que presentó un aumento en la proliferación celular que se reduce en presencia de H_2D para la menor concentración evaluada. Es posible especular que las bajas concentraciones los triterpenos tendrían un efecto pro proliferativo que es antagónico con la producción de oxígeno singulete de tal manera que al estabilizarse estas especies en presencia de H_2D, resulta neutralizado. Esta actividad pro proliferativa podría atribuirse a la actividad antioxidante de los triterpenos cuya acción dual (Cipak et al, 2006) podría inducir este efecto no esperado. Este es un tema que escapa al objetivo de esta tesis y que merece estudios posteriores. La presencia de oxígeno singulete en presencia de extracto de triterpenos podría explicar la hepatotoxicidad descrita por otros autores (Cipak y col, 2006; Lude y col, 2007)

El ensayo utilizado tiene como limitante la citotoxicidad intrínseca de agregar H_2D a los cultivos, lo que produce una pérdida de viabilidad debido a dilución del medio de cultivo. Se sugiere buscar otras sustancias químicas que aumenten estabilidad de oxígeno singulete en el tiempo, para lograr resultados más exactos que reflejen solamente el efecto de estabilización de esta especie.

Para la determinación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se utilizó la técnica de luminol que presenta la ventaja de ser sensible en presencia de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Entre las desventajas presentadas, al poner en práctica este método con células in-vivo, se observó que al exponer las células al extracto a niveles basales, la reacción seguía generando especies reactivas después de medir por espectroluminometría, lo cual hizo inestables los datos y la obtención de resultados por lo que fue necesario modificar la técnica. Para evitar el problema, se retiró el sobrenadante de cultivos celulares, se expuso la célula al extracto y se agregó luminol. Con esta modificación del procedimiento se obtuvo lecturas de luminiscencia estables con una caída proporcional de la curva por pérdida de luminiscencia en el tiempo.

En relación a las curvas de tiempo para la luminiscencia originada por las especies reactivas, se observa, tanto para niveles basales como los obtenidos después de 1 hora de exposición a los estímulos evaluados, decaimiento de la luminiscencia al final de los 75 segundos de reacción que está asociada a la desaparición de las especies reactivas cuantificadas.

Se observa una coherencia entre los resultados de los controles de APPH y doxorrubicina, ya que ambos indicaron una concordancia en el aumento de ROS y RNS en relación a los estados basales obtenidos previamente lo que valida la modificación de la técnica implementada. Para el caso de doxorrubicina los resultados obtenidos son consistentes con el ensayo de detección de la generación de oxigeno singulete. Estas

observaciones son consistentes con la literatura disponible que ha reportado su alta capacidad de generar especies y moléculas radicalarias (Saalu et col, 2010).

Los resultados obtenidos a la exposición de luminol reflejan incremento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que concuerda con los datos obtenidos en el ensayo de medición de oxigeno singulete para el caso de doxorubicina con un inicial de 173 RFU en contraste de 89,7 RFU del control. Se podría inferir que doxorubicina genera alta cantidad de ERO y ERN junto con una mayor producción de oxígeno singulete que explicaría su capacidad citotóxica sobre MCF-7.

Por otra parte, KH casi duplicó la producción de especies reactivas detectada en células expuestas a doxorubicina. Este resultado sugiere que los triterpenos de la muestra KH actuarían generando un aumento en las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. A pesar de que en general estas moléculas se asocian con un efecto antioxidante en que se espera reducción de ERO y ERN, hay reportes de la literatura que señalan efectos como el encontrado en este estudio. En este sentido un estudio reciente ha demostrado que la estimulación de macrófagos con triterpenos de origen natural ocasionó un aumento en la producción de ERO y ERN. Estos efectos contradictorios no deben sorprender si se considera la diversidad que existe dentro de la familia de los terpenos (Johnson y Fahey, 2012).

El aumento de algunas especies reactivas de oxígeno como anión radical superóxido, al acumularse actúan como segundos mensajeros promoviendo el aumento de la proliferación, lo que podría estar relacionado con el aumento de proliferación observado para KH y que es consistente con observaciones reportadas en la literatura que dicen relación con aumento celular del tumor mamario (Noor Nazirahanie et col, 2012).

Para CR su elevada producción de especies reactivas debería asociarse a su actividad citotóxica. A pesar de que esto es inconsistente con los resultados obtenidos para

KH, que produce elevados niveles de especies reactivas sin citotoxicidad, se puede especular que se debe a su contenido de polifenoles más que de triterpenos. Un trabajo realizado con otro producto natural, extraído de hojas de *P Betle*, rico en polifenoles, demostró actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7(Noor Nazirahanie y col, 2012).

El aumento de especies reactivas detectado para CR concuerda con el aumento de actividad CAT por lo que se podría sugerir que esta enzima está contrarrestando la generación de alguna de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y resulta en la disminución de la proliferación de células MCF-7. Se debe establecer en estudios posteriores si este aumento se debe a la regulación de la actividad enzimática propiamente tal, o a un aumento de su expresión génica. Este resultado es consistente con lo reportado en estudios con el extracto etilacetato de hojas de *P Betle*, rico en polifenoles que reporta actividad antiproliferativa, antioxidante y aumento de actividad catalasa (Noor Nazirahanie et col, 2012). Sin embargo, otros estudios (Borrelli ,2002) reportan resultados contradictorios informando disminución de la actividad enzimática CAT atribuida a un agotamiento de la maquinaria antioxidante. Para el caso de doxorrubicina y KH la baja actividad de CAT obtenida no es concordante con la hipótesis de trabajo ya que se postulaba un aumento de las enzimas antioxidantes por el aumento de ROS en el medio debido a la generación de especies reactivas. Sin embargo, como se señaló anteriormente algunos estudios han informado reducción de actividades enzimáticas antioxidantes en respuesta a estrés oxidativo por agotamiento de la maquinaria antioxidante. Dado que las especies particulares producidas en cada caso no fueron analizadas, cada inductor de especies reactivas, podría producir un patrón diferente que regula de manera particular la expresión génica o la actividad enzimática propiamente tal. Temas que escapan al ámbito de esta tesis y que merecen futuros estudios.

Al evaluar SOD se observa que en general no hay un aumento significativo de la actividad enzimática para los extractos estudiados. Este resultado es inconsistente con resultados obtenidos con otros extractos vegetales ricos en flavonoides que duplicaron la actividad SOD al ser tratados con este producto de elevada actividad antioxidante (Noor Nazirahanie y col, 2012). Esto se puede atribuir a problemas experimentales de la técnica. En cambio, el tratamiento con doxorrubicina permitió evidenciar el aumento en la actividad de esta enzima. Al respecto, un estudio *in vivo* demostró que doxorrubicina aumentaba los mARN para varias enzimas antioxidantes, entre las que se cuenta la Cu-Zn SOD (Yin y col, 1998).

Los resultados de lipoperoxidación obtenidos por técnica de T-BARS, no demuestran una relación dosis respuesta a nivel del extracto CR; no pudiéndose confirmar si el extracto produce un real daño oxidativo. La ausencia del efecto es esperada, dado el uso como fitoterapéutico en el control de los síntomas del climaterio y su rol antioxidante. El extracto de CR podría estar ejerciendo un rol protector a nivel celular, frente al aumento de ROS que genera en primera instancia el mismo extracto. Se confirma el posible rol dual anti y pro-oxidante de algunas moléculas tales como fenoles y triterpenos (Cipak y col, 2006; Gao y col, 2013).

En relación al modelo propuesto se podría decir que el aumento de CR desencadena un aumento en ERO, excepto para el oxígeno singulete, es posible que el aumento no lleve al agotamiento enzimático de manera total, por lo que podrían haber otros mecanismos no dilucidados que están generando la muerte celular que podrían abordarse en estudios futuros.

7. CONCLUSIONES

1.-El extracto de CR, a las concentraciones estudiadas, presenta actividad antioxidante y produce especies reactivas de oxigeno o nitrógeno.

2. Las especies reactivas producidas por CR no incluyen la generación de oxígeno singulete.

3.- El extracto CR no produce una alta lipoperoxidación sobre la línea celular MCF-7 a las concentraciones evaluadas.

4. El extracto CR induce un aumento en la actividad catalasa en la línea celular MCF-7, sin afectar la actividad SOD.

5. En CR coexiste la actividad antioxidante y citotóxica para células tumorales.

6. CR ejerce su actividad citotóxica a través de la producción de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno.

7. REFERENCIAS:

[1] Acevedo, F. (2010). Evaluación del efecto de extracto estandarizado de cimicifuga racemosa sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB231. Tesis para optar al título de químico farmacéutico, Facultad de Farmacia, *Universidad de Valparaiso*.

[2] Alonso, J. (1999). Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. *2* (2): 35-38. Isis Ediciones.

[3]Allouche Y, Warletta F, Campos M, Sanchez-Quezada C, Uceda M,Beltran G, Gaforio,J,J. (2011) Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA *Damage.Journal.Agric.Food,Chem* ,(59): 121-130.

[4] Becuwen P, Ennen M, Klotz R, Barbieux C, Grandemange S, (2014) Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. Free Radical Biology and Medicine.1 (1): 1-8.

[5] Borrelli, F. (2002). Cimicifuga racemosa : a systematic review of its clinical efficacy. *European Journal of Clinical Pharmacology* ; 58: 235-241.

[6] Campos L, Gilglioni E, Garcia R, Brito M (2012) Cimicifuga racemosa impairs fatty acid β-oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. 53 (4): 680-689.

[7] Castillo C, Benedito JL, Alonso L, Miranda M, Hernández J.(2001) Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición.Arch.Med.Vet;33: 5-20.

[8] Catz, S. (2009). Superoxide anion production and luminol-dependent chemiluminescence by activated human neutrophils. *Laboratorio de Metabolismo del oxigeno,Facultad de Farmacia y Bioquimica:1 54.*

[9] Cipak L, Miadokova E, Novotny, L, Rauko, P. (2006). Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. *Molecular Toxicology* ; 80: 429–435.

[10] Curtis CD, Thorngren DL, Nardulli AM. (2010). Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues. *BMC Cancer* ; (10) : 9, 1-13.

[11] Deok Kim C, Kuyung Lee W, Ho Lee M, Song Cho, H, Koo Lee, Y, SeonRoh, S. (2004). Inhibition of Mast Cell-Dependent Allergy Reaction by extract of black cohosh (Cimicifuga racemosa). *Immunopharmacology and Immunotoxicology* (26): 299-308.

[12] Depypere H, Comhaire F.2014). Herbal preparations for the menopause: Beyond isoflavones and black cohosh.*Mauritas.*(77):191-194.

[13] Donoso E, Cuello M (2006).Mortalidad por cáncer en la mujer chilena. Análisis comparativo entre 1997 y 2003.Revista Chilena de obstetricia y ginecología. 71(4):10-16

[14] Drissi A, Bennani H, Giton F, Charrouf Z, Fiet J A. (2006). Tocopherols and Saponins Derived from Argania spinosa Exert, an Antiproliferative Effect on Human Prostate Cancer. *Cancer Investigation* ; 24: 588–592.

[15] Einbond L, Wen-Cai Y, He K Wu H, Cruz E, Roller M, Kronenberg F (2008) Growth inhibitory activity of extracts and compounds from Cimicifuga species on human breast cancer cells. *Phytomedicine*; 15 (6-7) : 504-511.

[16] Fernandez I, Comini L, Farias A, Konigheim B, Rivarola V, Cabrera J. (2008). Producción de anión superoxido por una antraquinona de origen natural. *Congreso de Radicales Libres Cuba* ; 80. 1-10.

[17] Foote CS, Valentine J, Greenberg A, Liebman.,J. (1995).Properties and reactions of singlet oxygen. In: *Active oxygen in chemistry*. Springer Science & Business Media; 1:1-342.

[18] Foster S,(1999) Black Cohosh: review.*HerbalGram*; (45) :35-50.

[19] Fritz H, Seely D, McGowan J, Skidmore B, Fernandes R, Kennedy D, Cooley K (2014) Black cohosh and breast cancer: A systematic review. *Integrative Cancer Therapies*;13 (1) :12-29.

[20] Gao X, Deeb D, Liu P, Liu Y, Arbab-Ali S. (2011). Role of reactive oxygen species (ROS) in CDDO-iVle-mediated growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells. *Journal of Experimenral Therapeutics and Oncology* ;(9): 119-127.

[21] Gaube F. Wolfl S, Pusch L, Kroll T, Hamburger M. (2007). Gene expression profiling reveals effects of Cimicifuga racemosa (L.) NUTT. (black cohosh) on the estrogen receptor positive humanbreast cancer cell line MCF-7. *Bio med Central Pharmacology*;(1): 1-19.

[22] Galleano, M, Alvarez, S, Malanga G. (2009). Enzimatic Antioxidants Defenses. *Catedra de Fisico Química, Facultad de Farmacia y Bioquímica*. Buenos Aires.(1) 1-36

[23] Guerrero C, Antioxidant Capacity, Anthocyanins, and Total Phenols of Wild and Cultivated Berries in Chile. *Chilean J. Agric. Res.*, Dec 2010, vol.70, no.4, p.537-544.

[24] Halliwell B. (2000). *Free Radicals in Biology and Medicine* London Oxford University. (1)1-936

[25] Haklar G,Sayin-Ozvery E, Yuksel M,Aktan AO,Yalcin AS (2001) Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumor. Cancer Letters:165:219-224

[26] Haytowitz DB, Bhagwat S. (2010) USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. USDA; (2) :1-42.

[27] Henneicke-von Zepelin H, Meden H, Kostev K, Schröder-Bernhardi D. (2007). Isopropanolic black cohosh extract and recurrence-free survival after breast cancer. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* ; 45 (3): 143-154.

[28] Jarry H, Thelen P, Christoffel V, Spengler B, Wuttke W. (2005). Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP. *Phytomedicine*; *12*: 178-182.

[29] Juarez J, Manuia M, Burnett M, Betancourt O, Boivin B, Shaw D. (2008). Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H2O2-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 105 (20): 7147-7152.

[30] Johnson TL, Fahey JW (2012) Black Cohosh:Coming full circle? Journal of ethnopharmacol ; 141:775-779.

[31] Kligler B (2003) Cimicifuga racemosa. *American Family Physician*; *68* (1): 114-116.

[32] Lai G, Wang Y, Fan L, Cao J, Lou S. (2005) Triterpenoid glycoside from Cimicifuga racemosa. *Journal of Asian Natural Products Research* ; *7* (5): 695-699.

[33] Lamprecht J, Schroeter D, Paweletz N (1991) Derangement of microtubule arrays in interphase and mitotic PtK2 cells treated with deuterium oxide. *Journal Cell Science.* (98): 463-473.

[34]Levenson AS, Jordan VC (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Perspectives in Cancer Research ;57* (15): 3071-3078.

[35] Lissi E, Lopez C, (2006) A novel and simple ORAC Methodology based on the interaccion of pyrogallol red with peroxyl radical,Free Radical Research;40(9): 979 – 985.

[36] Lude S, Torok M, Dieterle S, Knapp A, Kaeufeler R, Jaggi R, (2007). Hepatic effects of Cimicifuga racemosa extract in vivo and in vitro. *Cellular and Molecular Life Science*; 64:2848 – 2857.

[37] Mollá M, García-Sánchez Y, Romeu Sarrió AL (2009). Cimicifuga racemosa treatment and health related quality of life in post-menopausal Spanish women. *Gynecological Endocrinology ; 25* (1): 21–26.

[38] Nadaoka I, Massaki Y, Manabu S, Yasushi K, Yoshihito K (2012) Oral administration of *Cimicifuga racemosa* extracts attenuates psychological and physiological stress responses. *Biomed. Research* ; 33 (3) 145-152.

[39] Noor Nazirahanie A, Kanthimathi MS, Abdul-Aziz A (2012) Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. BMC Complementary and Alternative Medicine;12: 220

[40] Orellana, C. (2007).Efecto del extracto estandarizado de Cimicifuga racemosa sobre la progresión del ciclo celular en la linea celular de cancer de mama MCF-7. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Facultad de Farmacia. *Universidad de Valparaiso*:1-79 .

[41] Palacio C, Masri G. (2009). Black Cohosh for the Management of Menopausal Symptoms.A systematic review of clinicals trials. *Drugs Aging , 26* (1): 23-36.

[42] Papa L, Hahn M, Marsh L (2014) SOD2 to SOD1 Switch in Breast Cancer Report .J. Biol. Chem (289): 5412-5416.

[43]Pinto V. (2004). Efecto del extracto estandarizado de Cimicifuga racemosa sobre la proliferación de la línea celular MCF 7. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Facultad de Farmacia. Universidad de Valparaíso.

[44] Rietmuller M, Burger N,Bauer G (2015) Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling. Redox. (15) 2213-2217

[45] Rock E, DeMichele A. (2003). Nutritional Approaches to Late Toxicities of Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Survivors. *International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer*; 133:3785-3792.

[46] Saalu L, Osinubi P, Jewo I, Oyewopo A , Ajayi G.O (2010) An Evaluation of Influence of Citrus paradisi Seed Extract on Doxorubicin-Induced Testicular Oxidative Stress and Impaired Spermatogenesis. *European International Journal of Science and Technology;* 1(1): 41-53

[47] Sandoval C (2012) Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete y flavonoides. Efecto del medio. Tesis para optar al título de Química. Facultad de Química. Universidad de Chile.

[48]Scharstuhl A, Mutsaers H, Pennings S, Szarek, W, Russel F, Wagener F. (2009). Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine ; 13* (4): 712-725.

[49] Schmid D, Woehs F., Svoboda M, Thalhammer T, Chiba P, Moeslinger T. (2009). Aqueous extracts of Cimicifuga racemosa and phenolcarboxylic constituents inhibit production of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated human whole blood. *Can. J. Physiol. Pharmacol* ; 87:963–972.

[50]Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T. (2003). Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol-17b. *European Journal of Endocrinology*; *149*: 351-362.

[51]Shams T, Setia.M S, Hemmings R, McCusker J, Sewitch M, Ciampi A. (2010). Eficcacy of Black cohosh-containing preparations on menopausal symptoms:a meta-analysis. *Alternative Theraphy Health Medicine ; 16* (1): 36-44.

[52] Tor Y, Yazan L, Foo J, Armania N, Cheah Y, Abdullah R, Imam M, Ismail N, Ismail M (2014) Induction of apoptosis through oxidative stress-related pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by ethyl acetate extract of Dillenia suffruticosa. *BMC complementary and alternative medicine*; 14 (1):55

[53] Valenzuela, A (1983). Citotoxicidad del Oxigeno:Aspectos Biologicos y Medicos. *Revista Medica de Chile* ; 111: 829-836.

[54] Wang J, Yuan Z (2013) Gambogic Acid Sensitizes Ovarian Cancer Cells to Doxorubicin Through ROS-Mediated Apoptosis. *Cell Biochem Biophys*; 67:199-206

[55]Wojcikowski K, S. L. (2007). Antioxidant capacity of 55 medicinal herbs traditionally used to treat the urinary system: a comparison using a sequential three-solvent extraction process. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* (13), 103-109.

[56] Wuttke W (2012) News about Black cohosh.Mauritas;71 (2):92-93.