



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y  
CÁNCER

LABORATORIO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR Y  
MOLÉCULAR DEL CÁNCER

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y APOPTÓTICO DE  
LA LACTONA SCHKUHRIOLIDA EN CÉLULAS  
PROVENIENTES DE CÁNCER CERVICOUTERINO  
Caski.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**DANAHE**

**CANCINO**

**PINEDA**

DIRECTOR DE TESIS  
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2007





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS:

A mi Familia a quienes les debo todo lo que soy, quienes han estado conmigo en todo momento sin pensarlo ni siquiera por un momento, gracias por estar aquí siempre y por amarme tal y como soy.

A mi Madre por apoyarme incondicionalmente en todo sin excepción, por soportar mis ratos de humor, por que gracias a todo tu trabajo y esfuerzo yo he logrado ser una persona de bien, por la vida muchas gracias Ma.

A mi Padre quien me ha dado la fuerza para seguir este largo camino que ha sido difícil pero que sin ti no hubiera sido posible, por tu gran empeño en que yo fuera una mejor persona y por darme todo lo necesario para lograr esta primera meta, por la vida gracias Pa.

A mi Hermana a quien le bebo grandes enseñanzas de valor y superación, a quien me ha dado el mejor de los ejemplos, a quien ha estado conmigo en las buenas y en las malas, a mi mejor amiga y confidente, a ti que te amo tanto, gracias por todo lo que has hecho por mi Mar.

A mi Hermano que ha sido un gran pilar de donde sostenerme, a quien a sabido conocerme a tal extremo que sabe exactamente como soy, quien con su corta edad me ha apoyado en los momentos en que pensé ya no había más, a quien no se si le he dado el mejor ejemplo pero que espero que sea una persona de bien, a quien amo profundamente, por todo gracias Rafa.

## AGRADECIMIENTOS:

Al M. en .C Luis Sánchez Sánchez, primero por permitirme trabajar en su equipo, luego por brindarme todo lo necesario para la realización de este trabajo, por sus enseñanzas y por ultimo y lo más importante por apoyarme en los momentos más difíciles que he pasado en vida como tutor y amigo, por todas estas cosas le doy las gracias de todo corazón.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por haberme apoyado durante mi permanencia en este laboratorio acondicionándome de todo lo necesario para realizar este proyecto.

A la M. en .C María Luisa Escobar Sánchez por su gran apoyo en la realización de las técnicas de caspasa y tunel respectivamente ya que sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de estas, además quiero agradecerle por su calidez como persona.

Al M. en .C Arturo Cano Flores por su apoyo en la extracción y donación de la lactona Schkuhriolida para la realización de este proyecto.

Al M. en .C Hugo López quien me enseñó muchas de las cosas que se, gracias por tu amistad y por ser la persona que eres.

Al M. en .C Vicente Hernández por que fue quien tuvo la paciencia de enseñarme desde lo más básico en el laboratorio y quien ha sido un gran compañero y amigo durante mi estancia en el laboratorio, por eso gracias chente.

## AGRADECIMIENTOS:

A todos mis compañeros del laboratorio: Susana, Gris, Carmina, Edmundo, Jorge, Oswaldo, Carla, Guadalupe, Mari carmen, Norma, Itzen y Vanihamin, a todos ellos quienes de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo gracias.

A mis amigas: Susana, Raquel y Luz quienes de igual manera han estado ahí siempre que las he necesitado y de quienes espero conservar su amistad, a ustedes gracias.

A mis compañeros de carrera: Armando, Víctor, Gabriel, Héctor, Max, Yanet, Esmeralda, José, Miriam, Dulce, Karina, Estela, Noe, Paulina, y a todos los que estuvieron conmigo durante esta etapa de mi vida.

## Índice

Resumen	2
Introducción	3
Marco teórico	5
proliferación celular.....	
ciclo celular.....	
muerte celular.....	
apoptosis.....	
necrosis.....	
cáncer.....	
cáncer cervico- uterino.....	
lactonas.....	
Planteamiento del problema	18
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo General	20
Objetivos particulares.....	
Metodología	21
Cultivo de células tumorales Caski.....	
Aislamiento y purificación de la lactona Schkuhriolida	
Evaluación de la caspasa-3.....	
Detección específica de fragmentos de ADN a través de la	
técnica de TUNEL en cultivos celulares...	
Evaluación del efecto de la schkuriolida en el ciclo celular	
Resultados	26
Discusión de resultados	34
Conclusiones	36
Referencias	37
Apéndice	41

## Resumen

El cáncer cérvico – uterino es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. El carcinoma de cérvix, en un 99%, es originado por el virus del papiloma humano (VPH) y en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan el VPH 31 y 45 y sólo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cérvico – uterino es negativo a VPH.

Dentro de las estrategias para combatir al cáncer, se ha explorado la acción de compuestos de origen vegetal como agentes terapéuticos, donde destacan las lactonas sesquiterpénicas, las cuales han mostrado actividad citotóxica en un amplio espectro de las líneas celulares. Sin embargo, la obtención de nuevas lactonas a partir de su fuente natural o por transformación química o biológica abren un panorama interesante, en lo que se refiere a estudios de su estructura y actividad, para poder ser consideradas como posibles agentes terapéuticos. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis de la lactona sesquiterpénica schkuriolida, en la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino Caski. Los resultados obtenidos establecen que se requiere una concentración de 35µg/ml de la lactona schkuriolida para decrecer en un 50% la densidad celular en cultivos de células Caski. Esta disminución es debida a un efecto citotóxico observada en las células que se desprendieron de la caja de cultivo, mientras que para las células adheridas, la disminución fue dada por una detención en la fase G1 del ciclo celular y la inducción a una muerte apoptótica, como lo revela el incremento en la expresión de la caspasa 3 y el rompimiento de la cadena de ADN, evaluada por la técnica de TUNEL.

## Introducción

El Cáncer cérvico - uterino es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Los factores de riesgo involucran el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, la promiscuidad, haber tenido varias parejas sexuales y haber padecido enfermedades de transmisión sexual. Además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión de éste cáncer (Lira, 2001). El carcinoma de cérvix, en un 99% es originado por la infección del virus del papiloma humano (HPV) y en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan el HPV 31 y 45 (Muñoz & Bosch , 1997) y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cérvico-uterino es negativo a HPV. El estudio de la biología del cáncer cérvico-uterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla y manifiesta, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatir este cáncer, aún no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana.

Dentro de las estrategias para combatir al cáncer en general, en los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales elementos se tiene a las lactonas.

Las lactonas son compuestos cíclicos que poseen al menos un anillo que tiene involucrado un grupo carbonilo y un oxígeno.

Dentro de éstas encontramos a las lactonas sesquiterpénicas, que son un largo y diverso grupo de productos naturales presentes en más de 100 familias. Por ejemplo, en la familia *Compositae* (Asteraceae) se han reportado al menos 3,000 estructuras (Siyuan Zhang *et; al* 2005).

Algunas de estas estructuras ya han sido probadas en líneas celulares de cáncer de mama, piel y vejiga (Shyng-Shiouo F *et; al* 2006), sin embargo, el continuo hallazgo de nuevas lactonas hace que estos compuestos estén bajo estudio constantemente.



Por ello, este trabajo pretende evaluar la actividad antiproliferativa de la lactona Schkuhriolida, una lactona sesquiterpénica aislada de las partes aéreas de la planta *Schkuhria schkuhriodes*, colectada en Teoloyucan Estado de México.

## **Marco teórico**

### Proliferación celular

La proliferación celular es un evento biológico que se regula mediante señales químicas que la activan o la inhiben. Las células presentan diferentes ritmos de proliferación lo cual depende del tejido del cual formen parte. Además de las células especializadas que no se dividen después de su diferenciación, se tienen a otras que se dividen de manera regular y a ritmo acelerado, entre estos dos extremos se encuentran aquellas que se dividen lentamente o que no se dividen, pero que pueden llegar a ser estimuladas por factores de crecimiento secretados por células vecinas o localizadas en tejidos u órganos distantes y que actúan de manera autocrina, paracrina o endocrina. Las células necesitan señales procedentes de otras células, no solamente para proliferar, sino también para sobrevivir. Si se les priva de tales factores de supervivencia, las células activan un programa intracelular de suicidio y mueren por un proceso denominado muerte programada (apoptosis). El hecho de necesitar señales procedentes de otras células para poder sobrevivir ayuda a garantizar que las células sobrevivan sólo cuándo y dónde son necesarias. Este control de la división celular es tan solo uno de los eventos que constituyen el ciclo celular.

### Ciclo celular

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los cuales duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división es conocido como ciclo celular, donde se encuentran los mecanismos esenciales mediante el cual todos los seres vivos se reproducen. En las especies unicelulares, como las bacterias y levaduras, cada división celular genera un nuevo organismo completo. En las especies pluricelulares, para producir un organismo funcional se requieren secuencias de divisiones celulares largas y complejas. Incluso en el adulto, la división celular es necesaria para remplazar las células que mueren. De hecho cada uno de nosotros debe fabricar muchos millones de células cada segundo simplemente para sobrevivir: si todas las divisiones celulares se detuvieran-por

ejemplo, por la exposición a grandes dosis de rayos X, moriríamos al cabo de pocos días.

Los pormenores del ciclo celular varían. Sin embargo, ciertas características son universales. El conjunto mínimo de procesos que una célula tiene que realizar son aquellos que le permiten llevar a cabo su tarea más importante: la transmisión de su información genética a la siguiente generación de células. Para producir dos células hijas genéticamente idénticas, el DNA de cada cromosoma ha de ser replicado fielmente generando dos copias, el DNA de cada cromosoma replicado tiene que ser distribuido (*segregados*) con exactitud a las dos células hijas, de manera que cada célula reciba una copia del genoma completo como se muestra en la fig.1

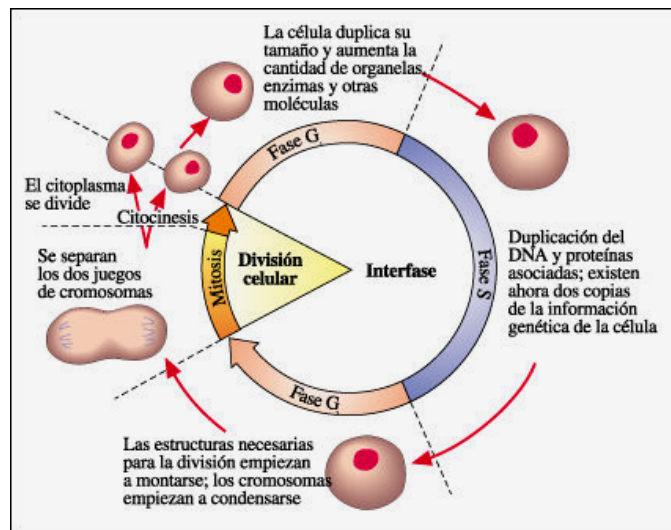


Fig.1 La imagen muestra la división hipotética de una célula eucariota con dos cromosomas para poder ilustrar cómo se forman dos células hijas genéticamente idénticas en cada ciclo.

Las células eucariotas han desarrollado una compleja red de proteínas reguladoras, conocida como sistema de control del ciclo celular, que gobierna la progresión a través del ciclo celular. El núcleo de este sistema es una serie ordenada de interruptores bioquímicos que controlan los principales acontecimientos del ciclo, incluyendo la replicación del DNA y la segregación de los cromosomas replicados. En la mayoría de células, unos niveles adicionales de regulación aumentan la fidelidad de la división celular y permiten que el sistema de control responda a varias señales procedentes tanto del interior como del exterior de la célula. En el interior de la célula, el sistema de

control comprueba la progresión a través del ciclo celular y retrasa los acontecimientos posteriores hasta que se hayan completado los acontecimientos previos.

En mayoría de los ciclos celulares, se intercalan fases de descanso que les permiten disponer de más tiempo para crecer –la **fase G<sub>1</sub>** entre la fase M y la fase S y la **fase G<sub>2</sub>** entre la fase s y la mitosis-. Así el ciclo celular eucariota se divide tradicionalmente en cuatro fases secuenciales: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. Al conjunto de estas fases se le denomina interfase, la cual puede tener una duración de unas 23 horas de las 24 horas del ciclo celular y una hora para que se lleve acabo la mitosis, solo por dar un ejemplo.

La fase **G<sub>1</sub>** y **G<sub>2</sub>** son mucho más que meros períodos de espera que permiten crecer a la célula. Proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo para así asegurarse de que las condiciones son adecuadas y de que se han completado los preparativos antes de la fase S y de la mitosis. La fase **G<sub>1</sub>** es especialmente importante a este respecto. Su duración puede variar mucho dependiendo de las condiciones externas y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Por ejemplo, sí las condiciones son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase **G<sub>1</sub>** incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado **G<sub>0</sub>** (**G** cero), en el cual pueden permanecer durante días, semanas, incluso años antes de volver a proliferar.

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que forman entre ambas (CDK-ciclina). Las formas activas de los complejos CDK-ciclina están constituidas de dos proteínas (una cinasa y una ciclina). La cinasas son enzimas que realizan la fosforilación de proteínas, y este evento es de gran importancia para la regulación del ciclo celular. Los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular.

Por lo tanto, la dinámica del ciclo celular dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, entre otros muchos sucesos (Peralta – Zaragoza et; al 1997).

Durante el proceso de transformación de las células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas. En este proceso se

presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como la segregación del material genético. Aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia. (Peralta et al, 1997)

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas. Estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico. La alta incidencia de cáncer, como una función de la longevidad celular, sugiere que múltiples alteraciones génicas se requieren para el proceso de tumorigénesis (Volgestein & Kinzler, 1993). Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen la inestabilidad genómica y, por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones del genoma. Algunas de estas mutaciones afectan genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular (puntos de control), los cuales determinan el orden de los eventos en dicho ciclo, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN. (Fishel et al, 1993). Otra característica de las células tumorales con respecto a las normales es su capacidad para evadir los sistemas de muerte, ya que una célula normal presenta un número de divisiones finito, mientras las células tumorales pueden dividirse infinitamente si existen las condiciones para ello. Es decir, las células normales presentan una muerte celular programada o apoptosis, mientras que las células tumorales han evadido dicho mecanismo.

### Muerte celular

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea por que el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en

particular de esa célula, o bien por que la célula sufrió un daño irreversible y la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso. (Evan & Littlewood, 1998).

### Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. La apoptosis tiene un significado biológico muy importante, que es opuesto al de la mitosis en la regulación del volumen tisular. La apoptosis contribuye a dar forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autorreactivas, las células infectadas y las genéticamente dañadas, cuya existencia es potencialmente dañina para el huésped. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos tales como la pérdida de la estructura distintiva de la cromatina, presentan al mismo tiempo la concentración celular, inicia en la periferia del núcleo y es seguida por la fragmentación nuclear. Los fragmentos constituyentes nucleares junto con los del citoplasma, incluyendo organelos intactos son empacados en los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales son envueltos en la membrana plasmática y la aparición de fosfatidilserina en la lámina externa de la membrana citoplasmática, entre otros. (Caballero & Morán, 2002). En vivo estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas sin provocar una respuesta inmune. En los últimos años se han identificado una gran cantidad de moléculas que participan en este fenómeno y que regulan este proceso a diferentes niveles.

La muerte apoptótica es un proceso complejo que requiere de la activación de varias señales y mecanismos de regulación, los cuales involucran la participación de una serie de moléculas con acción proapoptóticas como en el caso de los miembros de la familia de las caspasas, así como antiapoptóticas como algunos de los miembros de la familia del Bcl2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) (Caballero & Morán, 2002).

Se sabe que diferentes proteasas median muchos de los eventos bioquímicos que ocurren en la muerte apoptótica. Estas proteasas se conocen actualmente como caspasas y se sabe que su activación ocurre de manera secuencial y específica.

Una gran variedad de eventos generados durante el proceso apoptótico se producen en la mitocondria, incluyendo alteraciones en el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, así como la liberación de moléculas proapoptóticas y su interacción con otras proteínas como algunos miembros de la familia del Bcl2.

Algunos estudios han demostrado que la activación de algunas caspasas depende de la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma. La consecuencia de la liberación de citocromo c podría depender del tipo celular. En este caso, el citocromo c remanente en la mitocondria podría acoplarse al sitio de unión de alta afinidad del citocromo b y al citocromo c oxidasa para mantener el transporte de electrones. Bajo estas condiciones, el consumo de oxígeno y la producción de ATP derivadas de la fosforilación oxidativa podrían mantenerse sin abatirse, mientras que las caspasas activas podrían atacar proteolíticamente sustratos citosólicos y nucleares llevando a la célula a la muerte apoptótica (Reed 1994) (Fig. 2).

### Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. Este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos.

Los cambios morfológicos son: el hinchamiento de la mitocondria seguida por la ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático. Involucra cambios en la membrana plasmática conduciendo a una pérdida en el balance de los iones  $Ca^{++}$  y  $Na^{+}$ , que presentan un influjo al tiempo que se presenta en una pérdida de  $K^{+}$ , seguido por una acidosis, un trauma osmótico, condensación de cromatina y los patrones característicos de picnosis nuclear. En este estado la mitocondria pierde la matriz granulosa llegando a presentar

una apariencia densa y la membrana interna se contrae alejándose de la membrana externa (Studinski, 1995) (Fig. 2).

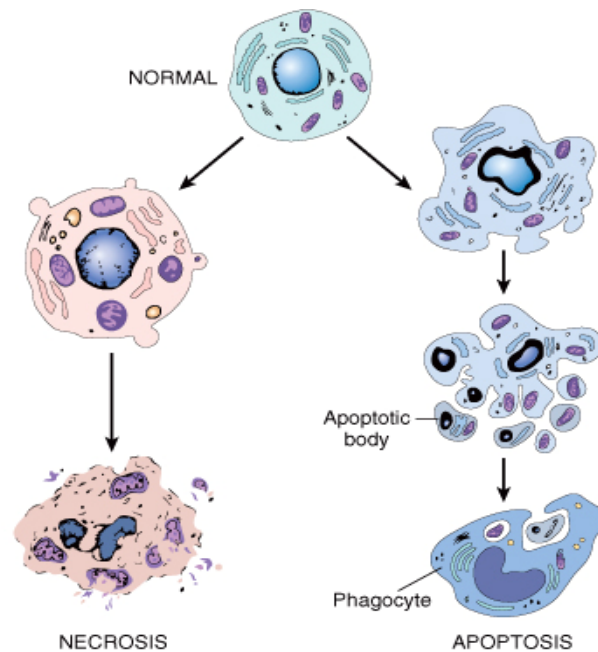


Fig.2. Esquemización de muerte por necrosis a la izquierda, en la cual podemos observar como la célula vierte todo su contenido hacia el exterior, provocando una respuesta inflamatoria. A la derecha, observamos la muerte por apoptosis en la cual podemos ver como es que se encapsula el contenido de la célula provocando lo que conocemos como cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados por los macrófagos.

## Cáncer

El cáncer es una proliferación acelerada, desordenada e incontrolada de una o algunas células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen tanto al mismo órgano donde se inició el tumor, así como a otros tejidos sanos del organismo. Las causas que provocan tales cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Vocota, 2000), tales como la radiación ultravioleta, emisiones radiactivas e infecciones recurrentes con organismos patógenos, así como la exposición a compuestos químicos carcinogénicos (Weinberg, 1996).

El desarrollo de una célula con crecimiento y características anormales puede generar un tumor, el cual derivará a partir de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas y transmitidas y que además provocan un descontrol en el ritmo de la división celular, así como una mejor adaptación



a condiciones de bajas concentraciones en nutrientes y cambios en las características morfológicas debidas a una perturbación de los procesos de diferenciación, alterando con ello, la homeostasis del organismo (Alberts *et al*, 1994).

El desarrollo de los diferentes tipos de tumores depende del tipo de tejido en el que progresan estos sitios de crecimiento anormales, y estos pueden ser benignos o malignos. Los tumores malignos derivan en cáncer y estos se clasifican en sarcomas para el tejido conjuntivo y el muscular, leucemias en el tejido hematopoyético y linfoide, así como carcinomas en el tejido epitelial (Pardo, 1998).

El desarrollo de cáncer deriva de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas y que son transmitidas generando células con características fenotípicas diferentes de aquellas células de la cual provino la célula del nuevo linaje y con las cuales guarda una correspondencia.

En general el cáncer de tejidos sólidos es una enfermedad neoplásica, constituida por una masa anormal de células cuyo crecimiento lo hace sin respetar el mantenimiento de la estructura del tejido y sin respetar la disponibilidad de espacio con respecto a las células normales vecinas.

Esta enfermedad neoplásica persiste de manera excesiva luego de cesar el estímulo que desencadenó su transformación (Fidler, 1999). El sitio de donde empieza a emerger esta masa celular se le denomina tumor primario, el cual no ha desarrollado aun su capacidad de infiltrar, invadir o generar metástasis a diferentes tejidos u órganos (Welch *et al*, 2000). Un tumor secundario connota el desarrollo de implantes celulares los cuales carecen de continuidad con los sitios de crecimiento primarios, ya que después de penetrar e ingresar a los vasos sanguíneos viaja a través del torrente sanguíneo llegando a colonizar otros órganos lejanos.

Entre los tumores malignos sólidos, la formación de lesiones a nivel de la región cérvico-uterina es la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer a nivel mundial y la primera a nivel nacional (Muñoz & Bosch, 1997)

## Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino, una clase común de cáncer en la mujer, es una enfermedad en la cual se encuentra células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. El cuello uterino es la abertura del útero, el órgano hueco en forma de pera donde se desarrolla el feto, y lo conecta con la vagina (canal de nacimiento).

El cáncer cervicouterino suele crecer lentamente por un período de tiempo en años. Antes de que se encuentren células cancerosas en el cuello uterino, sus tejidos experimentan cambios y empiezan a aparecer células anormales (proceso conocido como displasia). La prueba de Papanicolaou generalmente encuentra estas células. Posteriormente, las células cancerosas comienzan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y en las áreas circundantes.

Ya que en general no hay síntomas asociados con el cáncer cervicouterino, el médico debe hacer una serie de pruebas para buscar el cáncer. La primera prueba es la de Papanicolaou, que se lleva a cabo usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula de madera pequeña para raspar suavemente el exterior del cuello uterino con el fin de recoger células. La paciente puede sentir algo de presión, pero generalmente no se siente dolor.

Si se encuentran células anormales, el médico tendrá que extraer una muestra de tejido (este procedimiento se conoce con el nombre de biopsia) del cuello uterino y lo observará a través del microscopio para ver si hay células cancerosas. Para efectuar una biopsia sólo se necesita una pequeña cantidad de tejido y puede hacerse en el consultorio médico. Si para hacer la biopsia el médico necesita extraer una muestra mayor en forma de cono (conización), la paciente quizá tenga que ir al hospital.

El pronóstico (posibilidades de recuperación) y la selección del tratamiento dependen de la etapa en que se encuentra el cáncer (si se encuentra en el cuello uterino o si se ha diseminado a otros lugares) y el estado de salud en general de la paciente (Fig. 3).

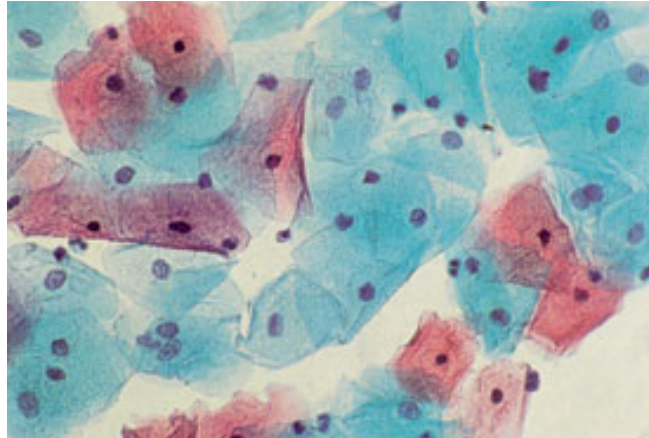


Fig. 3. Detección de células cancerosas en el cuello uterino a través de la técnica de Papanicolauo, donde podemos observar en color más sobresaltado las células anormales.

Una vez detectado el cáncer, el tratamiento sólo tiene dos opciones, someter a la paciente a quimio y / o radioterapia o extirpar el tumor. Esta segunda opción esta recomendada bajo ciertas condiciones, tales como el haber tenido el número de hijos deseados, mayor de 40 años, entre otros. Este hecho, ha generado un fuerte interés en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, ya sea en combinación con las terapias existentes o terapias cuyo mecanismo de acción esta basado en nuevas drogas o compuestos con actividad antitumoral. Actualmente hay un gran interés en la utilización de compuestos de origen vegetal, y particularmente en las lactonas, dada su diversa actividad biológica, ya que se ha reportado que éstas presentan actividad antimicrobiana, fungicida, antiviral, antitumoral, entre otros.

## Lactonas

Las lactonas sesquiterpénicas (LsS), son un amplio y diverso grupo de productos naturales presentes en más de 100 familias de plantas con flores. Siendo la familia Compositae (Asteraceae), la más importante, de donde se han aislado cerca de 3000 sustancias, dentro de dicha familia se encuentran plantas de uso medicinal – *Árnica montana*, *Artemisia annua* y *Tanacetum parthenium* - las cuales contiene lactonas sesquiterpénicas, como sus principales componentes activos, muchos de estos compuestos se han aislado de la hoja y flores de estas plantas, donde pueden constituir cerca del 5% del peso seco (Heywood V.H et al; 1997).

Dentro de las actividades farmacológicas descritas para las LsS incluyen su actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral. En el mecanismo de acción de estas sustancias, es generalmente aceptado que la unión covalente de las LsS a grupos sulfhidrilos libres en proteínas, inactiva las funciones de varias macromoléculas, dando como resultado que las LsS pueden interferir con algunos procesos biológicos claves, tales como, señalización celular, proliferación celular, muerte celular (apoptosis) y respiración mitocondrial, entre otros, que dejan ver su diversa actividad farmacológica. (Beekman, A.C. et al; 1997).

El prefijo “sesqui” indica que las LsS están formadas por 15 átomos de carbono. De acuerdo con su esqueleto carbocíclico, las LsS pueden ser clasificadas en cuatro grupos principalmente; a) germacranolidas: anillos compuesto de 10 átomos de carbono; 2) eudesmanolidas – compuestos bicíclicos constituidos de 6/6 átomos de carbono; 3) guayanolidas y 4) pseudoguayanolidas, ambos compuestos bicíclicos constituidos de 5/7 átomos de carbono respectivamente. La estructura química de algunas lactonas sesquiterpénicas, se muestran en la figura 4.

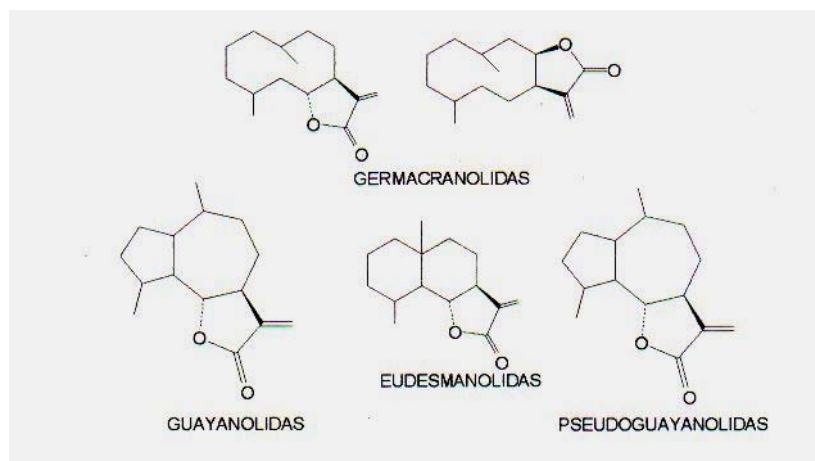


Figura 4. Grupos de lactonas sesquiterpénicas

Dentro de las germacranólidas se encuentra la Schkuhriolida, lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano – melanpólida, trans, trans-1(10),4-germacranólida- aislada de las partes aéreas de *Schkhuria schkuhriodes*, planta endémica de México.

Las lactonas sesquiterpénicas de Umbelliferae son interesantes por el hecho de que, pese a encontrarse tipos químicos usuales (germacranólidos, guaianólidos, etc.) todos difieren en su estereoquímica de los compuestos análogos de las *Compositae*, generando la posibilidad de que, pese a que los pasos biosintéticos en las dos familias, constituyan dos series paralelas de compuestos, la conformación trans del precursor trans-farnesil difosfato, sea diferente en los dos casos (ver Holub, M. et al., *Phytochemistry*, 1986, 25, 2015).

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen una de las áreas más activas de la investigación fitoquímica, respecto a las *Compositae* y, en menor magnitud, en las Umbelliferae. (Holub, M., and C. Budesinsky. 1986.), también se sugiere que las lactonas sesquiterpénicas son un prometedor agente anticancerígeno en terapias para leucemia. (Siyuan Zhang, et; al 2005).

La gran cantidad de lactonas aisladas así como la determinación de sus actividades biológicas han permitido generar modelos que explican su posible mecanismo de acción, tal es el caso de la partenolida, que su mecanismo de acción puede ser comparado con Schkuhriolida ya que forma parte del grupo de las lactonas sesquiterpénicas y son similares en estructuras químicas, por

esta razón es que se puede tomar como base para un posible mecanismo de acción de Schkuhriolida, como lo podemos observar en la fig.5.

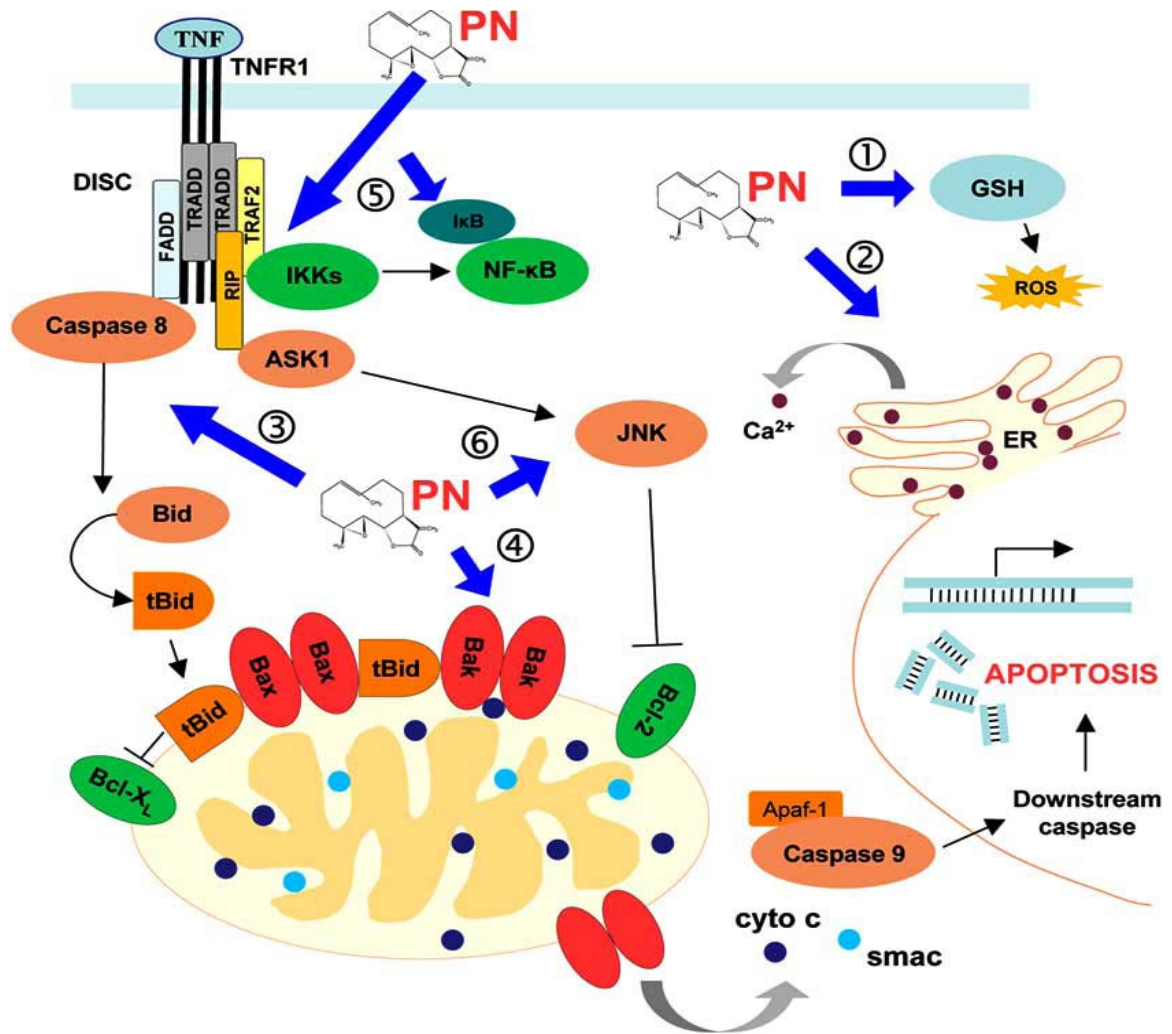


Fig.5. Vías por las cuales puede estar actuando la partenolida. Imagen tomada de Siyuan Zhang, *et al* 2005.



## Planteamiento del problema

Dentro de las estrategias para combatir el cáncer en general, en los últimos años se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos figuran las lactonas. Estudios de la actividad biológica de las lactonas sobre líneas celulares carcinogénicas han mostrado que éstos compuestos pueden tener actividad antitumoral; sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado en la región cérvico-uterina y a los cuales se ha determinado el mecanismo por el cual ejercen su efecto, por lo que resulta de gran interés realizar una valoración de la actividad biológica de esta lactona schkuhriolida en la línea celular proveniente de cáncer cérvico uterino Caski, de tal manera que aporte información que determine si esta lactona afecta el potencial proliferativo de estas células, el cual detiene a las células en alguna fase del ciclo celular y / o las induce a una muerte por apoptosis, como parte de su mecanismo de acción.



## Hipótesis

Actualmente existen diversas lactonas que han sido aisladas de diferentes especies vegetales, algunas de estas han mostrado actividad antifúngica, antibacteriana, antiparacitida, y citotóxica. Particularmente se conoce que ciertas lactonas como el squamocin presentan actividad antitumoral mediada por la detención del ciclo celular e inducción de muerte celular por apoptosis sobre líneas celulares provenientes de carcinoma de cérvix, por lo que se espera que la lactona schkuhriolida presente un efecto antiproliferativo sobre la línea celular proveniente de cáncer cérvico-uterino Caski.

## Objetivo general

Determinar si la lactona Schkuriolida ejerce una actividad antiproliferativa sobre la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino Caski y si esta actividad antiproliferativa afecta alguna fase del ciclo celular y / o induce una muerte apoptótica como parte de su mecanismo de acción.

## Objetivos particulares

- I. Generar cultivos de células tumorales de CaCu Caski.
- II. Determinar la concentración de lactona que disminuya el número celular en un 50 % (IC<sub>50</sub>).
- III. Establecer si la lactona Schkuhriolida detiene a las células Caski en la fase G1 del ciclo celular a través de la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular, evaluada por citometría de flujo.
- IV. Valorar si la lactona schkuhriolida induce muerte por apoptosis en las células Caski, mediante la detección de la fragmentación de DNA y la expresión de la procaspasa 3 a través de la técnica de TUNEL e inmunocitoquímica respectivamente.

## Metodología

### Cultivo de células tumorales Caski:

Las células provenientes de cáncer cérvico – uterino Caski fueron sembradas en cajas petri de cristal de 10 ml (Pirex USA), en 10 ml de medio RPMI-1640(Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y sin rojo fenol, al 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado a 56 ° C por 30 minutos(Gibco BRL) .Los cultivos fueron mantenidos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair US Autoflow). Para la realización de los ensayos, los cultivos se desarrollan hasta un 70 % de saturación de la caja de cultivo (Morgan y Darling, 1993).

### Aislamiento y purificación de la lactona Schkuhriolida:

La planta *S.schkuhriodes* ( Fig. 7), fue colectada en el Estado de México, carretera Teoloyucan – Huehuetoca, a 4 Kms. en terrenos urbanizados, pantanosos y contaminados por residuos industriales, por el Maestro en Ciencias Arturo Cano.

La lactona Schkuhrioides fue aislada de las partes aéreas de la planta *S.schkuhriodes*, las cuales fueron deshidratadas a temperatura ambiente, para posteriormente someterlas a una extracción en acetona, macerándolas en condiciones normales. Una vez obtenido el extracto acetónico, se procedió a su diferenciación cromatografica pH CCV de las fracciones obtenidas con n-hex/acdet, (40:60), obteniendo un residuo color naranja, soluble en acetona, que fue recromatografiada en CCV. De la fracción obtenida con mezcla n-hex/acdet(60:40), nuevamente el residuo fue disuelto en acetona y lentamente se agregó eter isoprófilico frío para inducir la cristalización.

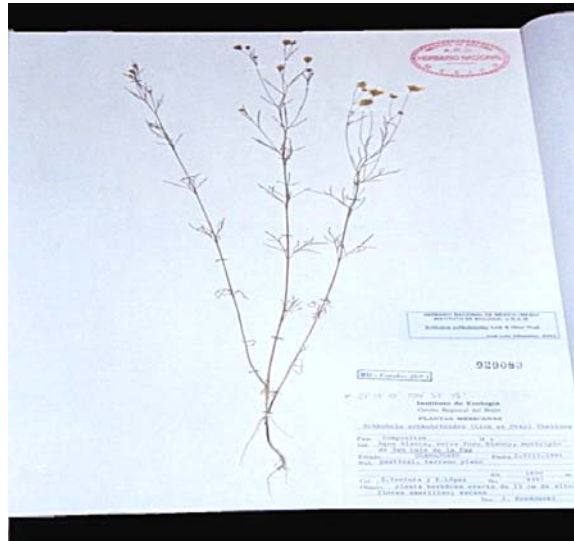


Fig.7. Fotografía de *Schkuhria schkuhrioides* tomada del herbario nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para solubilizar la lactona sckhuriolida se utilizó como vehículo acetona, y la lactona en estas condiciones fue empleada en los ensayos para determinar su actividad biológica con células provenientes de CaCu en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para determinar la concentración de Schkuriolida que decrece en un 50 % el número celular ( $IC_{50}$ ), 5000 células Caski provenientes de cáncer cervicouterino fueron sembradas en cajas de plástico de 96 pozos (Corning Inc.), en 100 $\mu$ l de medio RPMI al 10% de SFB, por 24h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó el compuesto a probar en RPMI fresco (10% de SFB) a concentraciones de 10 hasta 100 $\mu$ g/ml. El ensayo control contempló la cantidad de vehículo (disolvente) utilizada en la concentración máxima a probar. El cultivo con el compuesto se mantuvo por 48 h más, dando un tiempo total de 72 h. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción con cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al* (1989). Se retiró el medio de cultivo. Se dejó secar al aire. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% (Sigma Chemical Co.) por 10 minutos, al cabo de los cuales se retiró el fijador y se dejó secar muy bien al aire, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma Chemical Co.) por 10 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de

lavados con agua desionizada (Mili-Q plus Millipore). Se dejó secar al aire. Por último, el colorante fue solubilizado en ácido acético (J.T.Baker) al 10 % en agitación por 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 570 nm (Image Tecan Spectra). Los resultados de los grupos estimulados fueron comparados con el respectivo control.

### Evaluación de la caspasa-3

Para determinar si la lactona Schkuriolida induce un incremento en la concentración de la procaspasa 3, como un parámetro para inducir apoptosis, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1 x 1 cm, en un volumen de 300  $\mu$ l de RPMI al 10 % de SFB en cámara húmeda por 24h. Al término de las 24h se procedió a estimular a las células con 35 $\mu$ g/ml de schkuriolida en medio de cultivo RPMI al 10% de SFB por 48 h y se procedió a realizar la detección de la procaspasa 3 por inmunocitoquímica, brevemente: las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% de PBS durante 15 minutos, al término de el tiempo se procedió a lavar cuidadosamente 3 veces con PBS la muestra, posteriormente se permeó con tritón X-100 0.5% durante 5 minutos a 4°C, fueron lavadas nuevamente 3 veces las muestras con PBS ,después se adicionó el anticuerpo primario (anticaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:100 en PBS) durante un periodo de 2½ h en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ h, posteriormente se lavó la muestra 3 veces con PBS para después aplicar el DAPI de manera muy cuidadosa durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar la muestra con medio de montaje antifolding y selladas con barniz de uñas. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías en un microscopio de alta definición, para su posterior análisis.

Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL en cultivos celulares.

Para determinar si el efecto antiproliferativo de la lactona Schkuriolida induce fragmentación del ADN, como un segundo parámetro que determine la inducción de muerte apoptótica, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la procaspasa3. Al término del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS el cual debe ser preparado al momento. Se lavó 3 veces con PBS y se permeó con tritón X-100 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4°C. Se lavó con PBS 3 veces. Se adicionó inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30  $\mu$ l) en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar. Se incubó inmediatamente por 1h con enzima Tdt ( 33 $\mu$ l de enzima más 77  $\mu$ l de buffer de reacción), en cámara húmeda. Se detuvo la reacción con buffer de paro ( 1ml de buffer de paro en 34 ml de agua Milli Q), 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Se lavaron 3 veces con PBS, 1 minuto cada lavado. Se incubaron con anti-digoxigenina acoplada a FITC, 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (68 $\mu$ l de solución bloqueo más 62 $\mu$ l de anti-digoxigenina). Se realizaron los respectivos lavados 3 veces con PBS en cámara húmeda, dos minutos cada lavado. Se procedió a Incubar con DAPI 30 segundos.(añadir rápidamente). Se lavó 3 veces la muestra con PBS en cámara húmeda 1 minuto, cada lavado. Las preparaciones fueron montadas en medio de montaje “antifolding”, se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

## Evaluación del efecto de la schkuriolida en el ciclo celular.

La cantidad de ADN presente en las células se determinó utilizando citometría de flujo de acuerdo al método descrito por (Vindelot *et al*, 1985). La citometría de flujo es una herramienta de análisis que permite discriminar partículas de diferente tamaño y color. Esta técnica de análisis es utilizada de forma rutinaria en muchos laboratorios clínicos y de investigación para medir y cuantificar propiedades fenotípicas, bioquímicas y/o moleculares de células individualizadas mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas de uno o varios parámetros celulares.

La principal característica de la citometría es que puede ofrecer de forma muy rápida información simultánea de varios parámetros de cada una de las partículas analizadas, así como la relación entre dichos parámetros. Los parámetros analizables por citometría de flujo son: i) los relacionados con las características físicas de la partícula: el tamaño y la complejidad y ii) las distintas fluorescencias asociadas a la partícula. El análisis se realiza a velocidades de miles de células/segundo, lo que permite obtener datos de elevada fiabilidad estadística, así como identificar poblaciones representadas en baja frecuencia dentro de la población global. Otra importante característica de la citometría de flujo es que el análisis se realiza en una suspensión de partículas individualizadas, por lo que las partículas o células objeto de análisis deben encontrarse en suspensión y en forma de partícula (célula) única. Finalmente, es importante destacar que existe una restricción respecto al tamaño de las partículas objeto de análisis, ya que estas deben tener tamaños comprendidos entre las 0.5-100um.( Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO)).

Las células fueron sembradas con una densidad de 250 000 células por caja, en cajas de plástico con capacidad de 2.5 ml en RPMI al 10 % de SFB. Se dejan 24h para permitir su adherencia, después de lo cual son estimuladas con la IC50 de schkuriolida previamente determinada para las células Caski, la concentración debe ser preparada con medio fresco, RPMI al 10% SFB y estas condiciones se mantienen en el cultivo por 24h. El grupo control contempla la cantidad de vehículo empleado en el IC50 en RPMI al 10 % DE SFB , un control sin estímulo contempla RPMI al 10% de SFB. Para la

evaluación por citometría de flujo, las células son despegadas de las cajas de cultivo en verseno, centrifugadas y lavadas con un buffer salino de fosfatos, pH =7.2(PBS). El botón celular es fijado y resuspendido en 1ml de metanol al 50% en PBS, pasados 20 minutos se centrifugó y se lavó con PBS. El botón es resuspendido en 200  $\mu$ l de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 750  $\mu$ l de una solución de yoduro de propidio (200 mg/l), se mezcla y se incuba en hielo por 15 minutos protegiendo los núcleos de la luz. Finalmente se analizan las muestras en un FACS (Coulter, USA).



## Resultados

Actualmente, la búsqueda de compuestos antitumorales ha despertado un gran interés, sobre todo, aquellos que son de origen biológico y específicamente los de origen vegetal. En el caso particular de las lactonas, se ha informado que algunos de ellos presentan actividad antiviral y antitumoral entre otros efectos. Por ejemplo, la escamosina, extraída de la planta *Annonaceous acetogenins*, se le ha reportado actividad citotóxica en células tumorales provenientes de vejiga (Shyng-Shiou, et al. 2006). Sin embargo, poco se conoce de cuántas y cuáles lactonas pudieran presentar actividad antitumoral. El laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, ha logrado purificar la lactona Sckhuriolida, de la cual se desconocen sus propiedades antiproliferativas, citotóxicas, o su papel en células de cáncer cervicouterino. Para determinar su efecto en el potencial proliferativo de células provenientes de CaCu, se estimuló a la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino Caski, con diferentes concentraciones de Sckhuriolida, con el propósito de encontrar la concentración que decrece en un 50 % la densidad celular ( $IC_{50}$ ) (Fig.8).

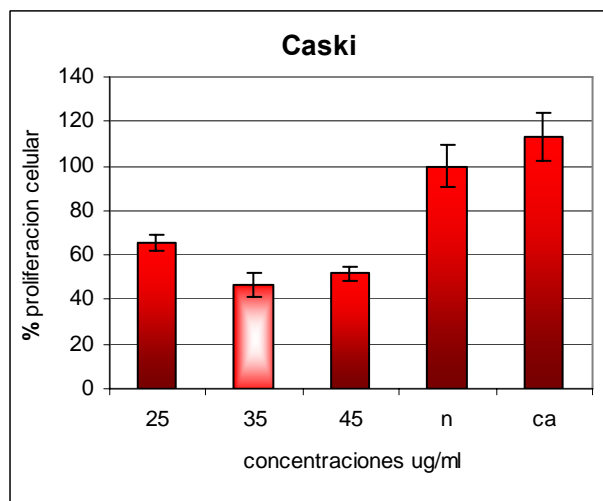


Fig.8. Determinación de la concentración de la lactona Schkuriolida que decrece en un 50% la densidad celular de la línea de CaCu Caski. Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos (5000células /pozo) por 24hrs de adherencia y estimuladas con Sckhuriolida por 48h. La densidad celular fue evaluada con la técnica de cristal violeta. La gráfica representa uno de los tres experimentos realizados por separado. n = control normal, ca =control con acetona.

Los resultados obtenidos, indican que 35µg/ml inducen un decremento del 50% en la densidad celular, por lo que esta concentración es considerada la IC<sub>50</sub> y por lo tanto la concentración a utilizar para los demás ensayos. El decremento de la densidad celular observado en la Fig.8, genera la inquietud de saber si dicho decremento es causado por un paro en el ciclo celular, por inducción a una muerte celular por necrosis o una muerte por apoptosis. Para dar respuesta a esta inquietud, cultivos de células Caski fueron estimulados con 35 µg/ml de Sckhuriolida por 48 hrs. y la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo (FACS-calibur) con el propósito de determinar si la Sckhuriolida detiene a las células Caski en alguna fase del ciclo celular (tabla1.Fig.9).

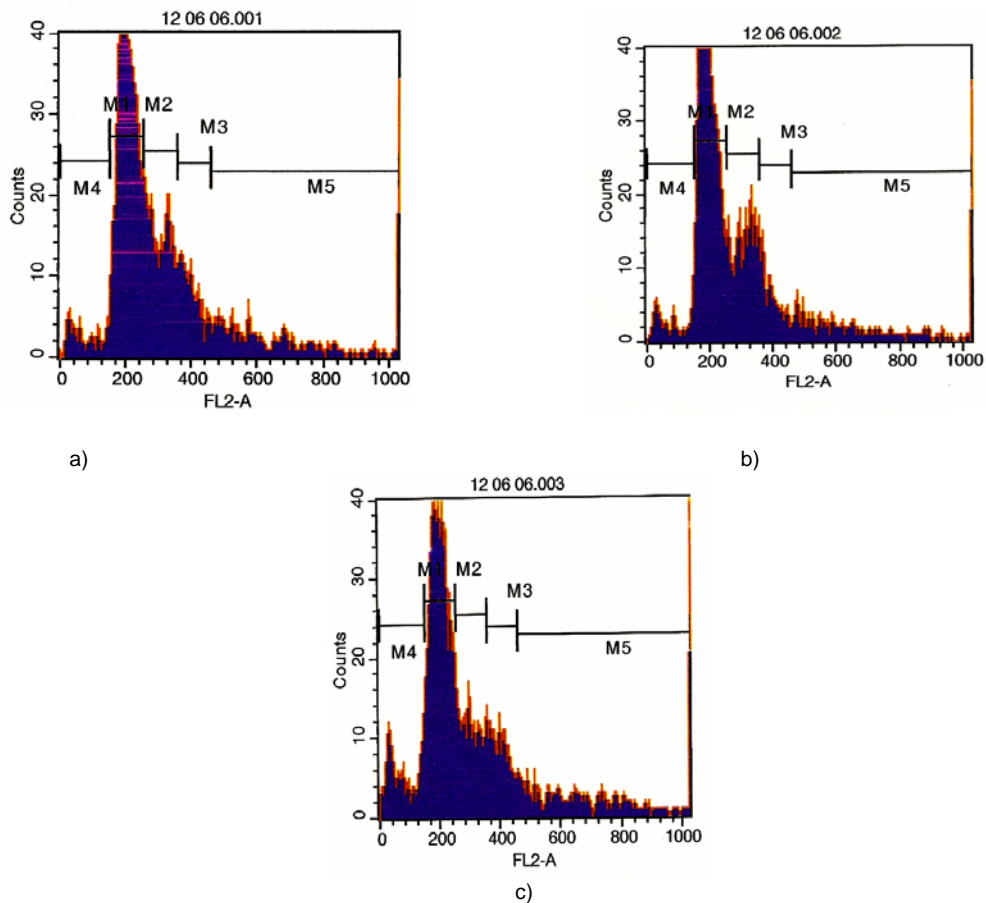


Fig.9. Análisis de la distribución del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de células de cáncer Cérvico-uterino Caski; a) Control normal, b) Control con vehículo y c) Control con Sckhuriolida

Fase	Control	Acetona	Schkuhriolida
<b>M1-G1</b>	51.0	60.0	49.0
<b>M2-S</b>	24.0	20.0	18.0
<b>M3-G2M</b>	11.0	7.0	10.0
<b>M4 - Muerte</b>	4.0	5.0	12.0
<b>M5-Agregados</b>	10.0	7.0	11.0

Tabla1. Efecto de la lactona Schkuhriolida en la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular de la línea de CaCu Caski evaluada por citometría de flujo. Las cantidades están expresadas en porcentaje.

Para dar una interpretación adecuada de nuestros resultados, primero consideremos lo siguiente: normalmente cuando las células son detenidas en alguna fase del ciclo celular, se observa un incremento o decremento del porcentaje de las células que se encuentran en alguna de las fases del ciclo, de tal manera que la suma de los porcentajes de cada una de las fases es igual a 100. Para ello, se debe considerar no sólo a las fases G1, S y G2/M, que se encuentran en las regiones M1, M2 y M3 respectivamente en el gráfico de distribución de ADN del citómetro, sino además a las regiones M4 y M5 que contemplan a la fragmentación de núcleos, representando una carga menor de 2n que sugiere una muerte por necrosis o por apoptosis y la agregación de núcleos o poliploidias respectivamente. Es decir, las células son separadas dependiendo de su carga de ADN, por lo que las células diploides (2n) se encuentran en la fase G1, mientras que las células que han duplicado su ADN completamente (4n) y están listas para dividirse se encuentran en la fase G2 /M, sin embargo, las células que se encuentran replicando su ADN no presentan una carga de 2n y tampoco de 4n, se encuentran en la fase S (de síntesis), presentando una carga de ADN incompleta, por lo que esta fase se encuentra en medio de G1 y G2/M. Las células que presentan una carga menor de 2n (Región M4) son consideradas un indicativo de muerte por necrosis o apoptosis y las células que presentan una carga genética mayor a 4n (Región M5), son consideradas como agregados celulares o células poliploides.

En nuestros resultados observamos que las células Caski al ser estimuladas con 35  $\mu\text{g/ml}$  presentan un decremento en las células que se encuentran en la fase G1, pasando de 60% en el control con acetona a 49% con la sckhuriolida, indicando que la Sckhuriolida actúa en esta fase. El hecho de registrar un incremento en la región M4 del gráfico (Muerte), pasando de 5% en las células control con acetona a un 12% en las células estimuladas con la Sckhuriolida, sugiere que la Sckhuriolida manda a las células que están en G1 a morir. No obstante este indicativo de muerte, el resultado no es concluyente para determinar si la muerte es por apoptosis o por necrosis. Para determinar que la muerte inducida por la lactona Schkuriolida en las células Caski es una muerte apoptótica, cultivos de células Caski fueron estimuladas con 35  $\mu\text{g/ml}$  de la lactona y sus núcleos fueron teñidos con el fluorocromo DAPI, el cual tiñe la cromatina, generando un color azul en los núcleos. (Fig. 10).

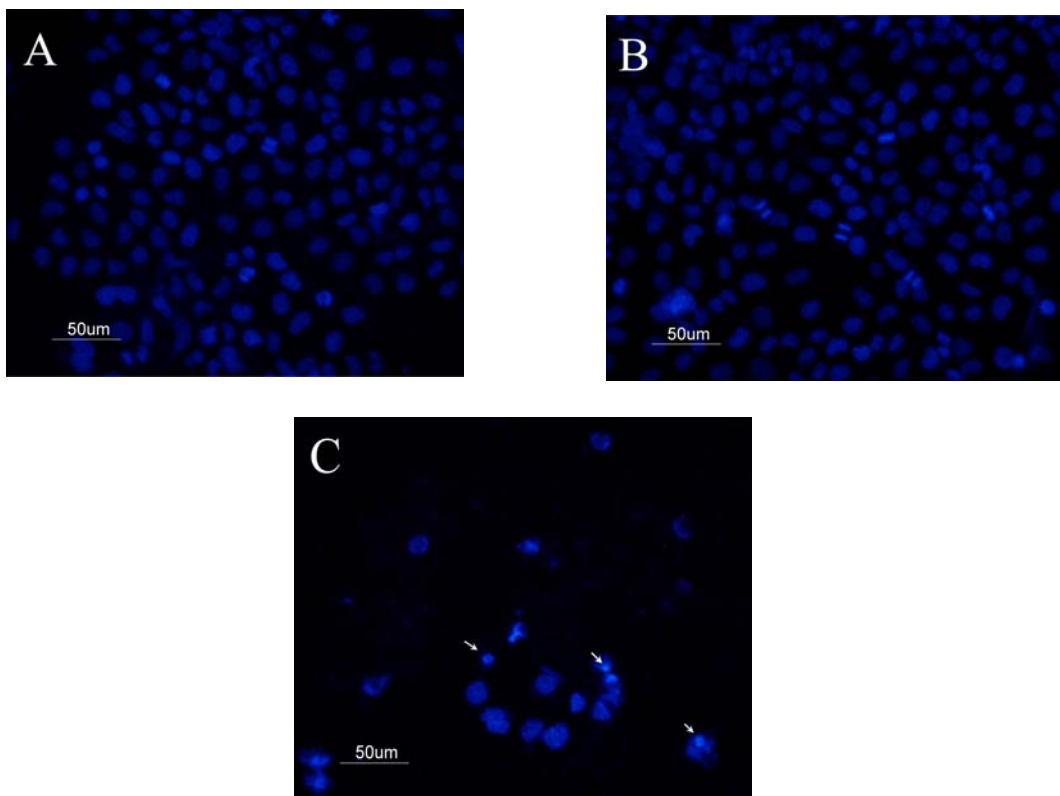


Figura 10. Observación de cuerpos apoptóticos en núcleos teñidos con el fluorocromo Dapi, provenientes de cultivos de células Caski. A: células creciendo en RPMI al 10% de SFB; B: células creciendo en RPMI al 10% de SFB y 0.5% de acetona; C: células creciendo en RPMI al 10% de SFB, 0.5% de acetona y 35  $\mu\text{g/ml}$  de la lactona Schkuriolida. Las flechas indican cuerpos apoptóticos. La fotografía es una representación de un mínimo de tres ensayos realizados por separado.

Los resultados obtenidos indican que las células tratadas con la Schkuriolida son inducidas a generar cuerpos apoptóticos, los cuales se caracterizan por ser cuerpos pequeños constituidos de cromatina fuertemente condensada rodeados de membrana plasmática. Este resultado coincide con lo obtenido en la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular determinado por citometría de flujo. Sin embargo, estos resultados siguen siendo insuficientes para determinar una muerte por apoptosis, ya que en ambos casos lo observado podría deberse tan solo al rompimiento de núcleos por cuestiones técnicas o como parte del proceso de obtención. Por ello, es necesario evaluar algunos de los componentes que participan en la cascada de señalización de la apoptosis así como la fragmentación del ADN, que es una consecuencia tangible de esta cascada de señalización. Por lo tanto, cultivos de células Caski fueron estimuladas con 35  $\mu\text{g/ml}$  de la lactona y se evaluó la presencia de la procaspasa-3, la cual es una caspasa efectora y la fragmentación del DNA a través de la técnica de inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente (Fig. 11 y 12).

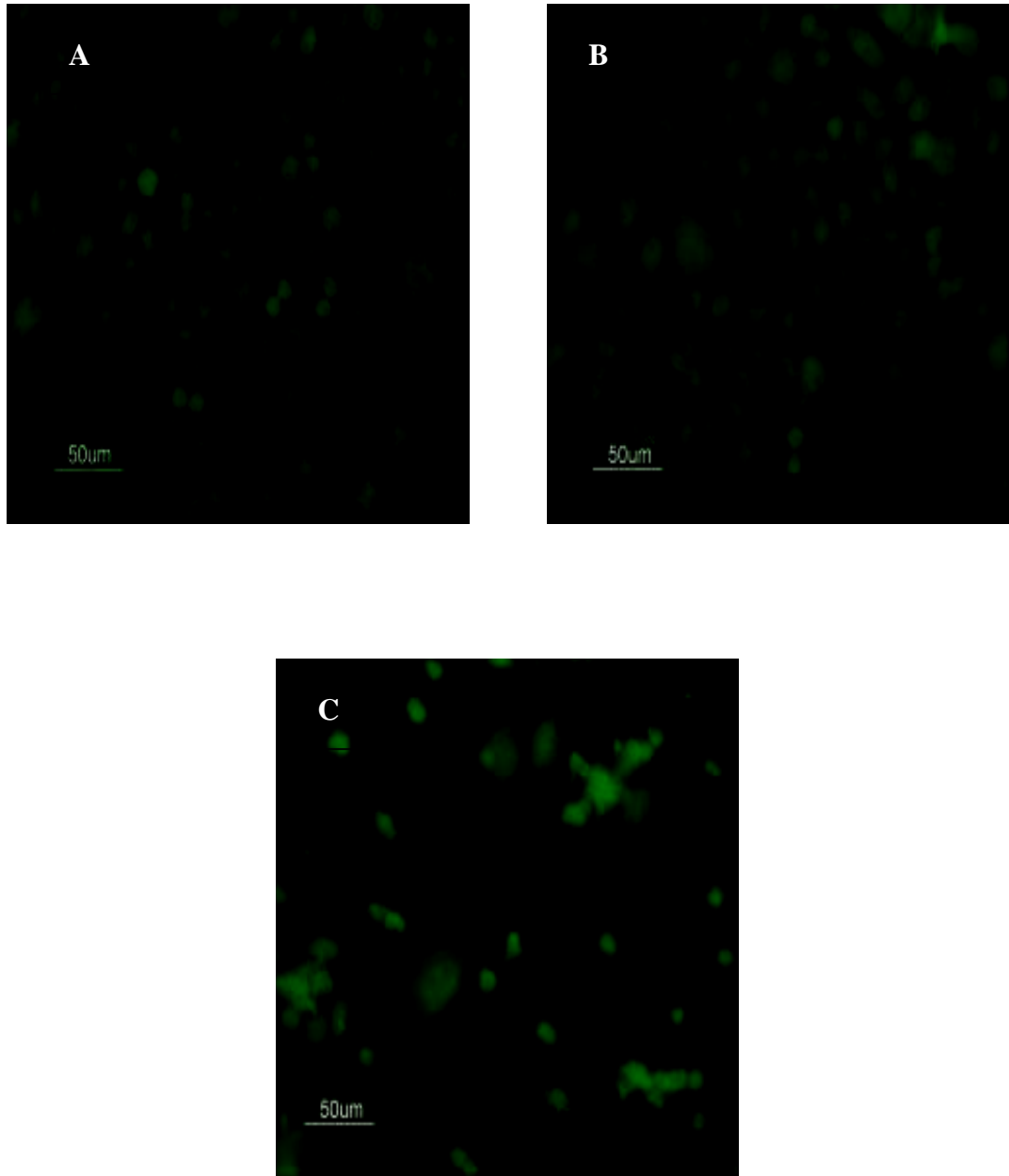


Figura 11. 50,000 células Caski fueron sembradas en cubreobjetos y fueron inducidas con 35 µg/ml de Schkurioloda por 48 hrs. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído y la detección de caspasa-3 fue determinada por inmunocitoquímica. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. A: células creciendo en RPMI al 10% de SFB; B: células creciendo en RPMI al 10% de SFB y 0.5% de acetona; C: células creciendo en RPMI al 10% de SFB, 0.5% de acetona y 35 µg/ml de la lactona Schkuriolida. Todas las imágenes presentan un aumento de 40x.

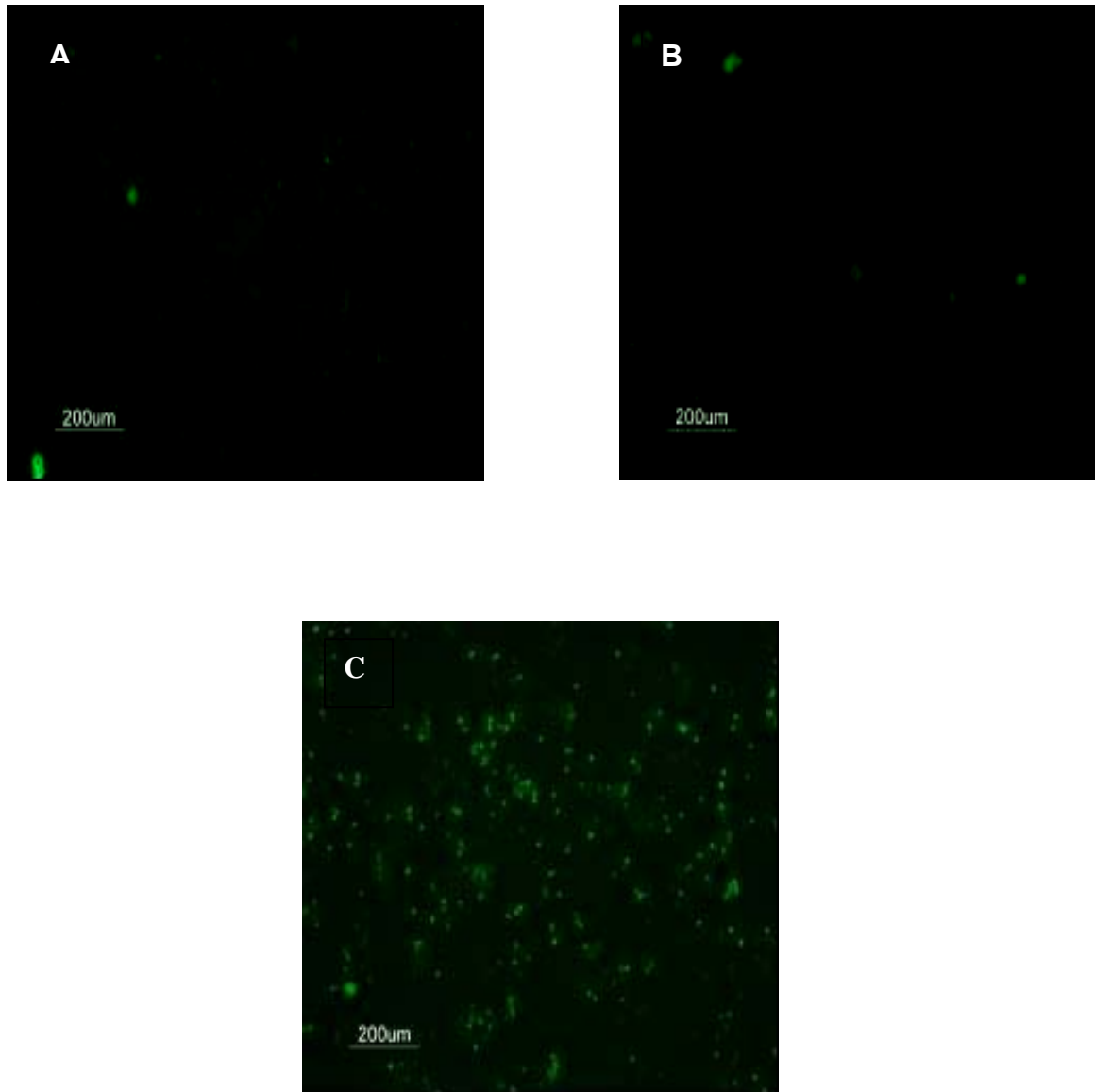


Figura 12. 50,000 células Caski fueron sembradas en cubreobjetos y fueron inducidos con 35  $\mu\text{g/ml}$  de Schkurioloda por 48 hrs. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído y la identificación de fragmentos de DNA fueron determinados por la técnica de TUNEL. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. A: células creciendo en RPMI al 10% de SFB; B: células creciendo en RPMI al 10% de SFB y 0.5% de acetona; C: células creciendo en RPMI al 10% de SFB, 0.5% de acetona y 35  $\mu\text{g/ml}$  de la lactona Schkuriolida. Todas las imágenes presentan un aumento de 10x.

El hecho de observar en las figuras 11 y 12 que las células estimuladas con la Schkuriolida son fuertemente positivas a la marca específica dada por los anticuerpos, indican que la Schkuriolida induce a las células Caski a una muerte apoptótica vía caspasa 3, provocando una fragmentación del ADN.

Dado que las células Caski son células tumorales que implican que su información genética se encuentra alterada, genera la posibilidad que el efecto antiproliferativo inducido por la lactona Sckhuriolida observado sea consecuencia de esa alteración genética, generando una diferencia con respecto a las células normales, por lo que es necesario evaluar el efecto en células normales. Con este propósito, células fibroblásticas provenientes de cérvix fueron inducidas con diferentes concentraciones de Sckhuriolida y la densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. (Fig.14).

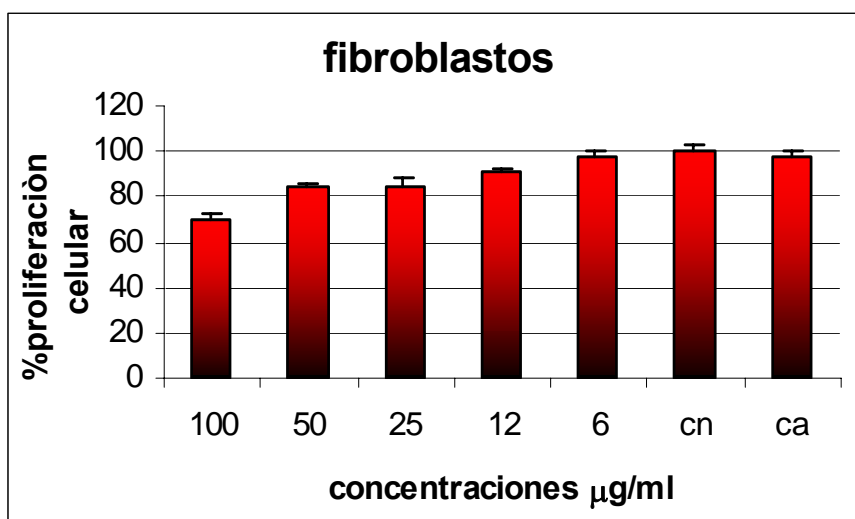


Figura 14. Efecto de la lactona Sckhuriolida sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano. 5000 células fibroblásticas por pozo fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos en RPMI al 10% de SFB por 24 hrs. y fueron estimuladas con la lactona Sckhuriolida por 48 hrs. más. La densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. 6, 12, 25, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ : concentraciones de Sckhuriolida utilizadas; cn: células fibroblásticas cultivadas en RPMI al 10% de SFB; ca: células fibroblásticas cultivadas en RPMI al 10% de SFB y 0.5% de acetona.

Los resultados indican que las células fibroblásticas presentan un 30 % de decremento en su densidad celular a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , que indica que estas células son menos sensibles a la lactona que las células tumorales Caski, indicando una diferencia entre las células tumorales y las células normales.



## Discusión de resultados

Es conocido que productos naturales son importantes fuentes de nuevos compuestos bioactivos de bajo peso molecular con prometedoras propiedades quimioterapéuticas (Harvey et al., 2000). Un número considerable de compuestos de bajo peso molecular son estudiados por sus propiedades farmacológicas en la manipulación de apoptosis o muerte celular programada, la cual es clave en el proceso patológico del desarrollo del cáncer (Kinloch et al., 1999). Actualmente no sólo se determina el efecto antiproliferativo de las lactonas sobre líneas celulares, sino además se evalúa su actividad inductora de apoptosis como parte de su mecanismo de acción. La lactona Schkuriolida aislada y caracterizada en 1998 (Delgado. G, 1998), inhibe el potencial proliferativo de las células de CaCu Caski, donde con 35 µg/ml decrece en un 50% la densidad de esta línea celular, sugiriendo que presenta una actividad antiproliferativa sobre estas células. Además, se observó que ejerce un efecto en la fase G1 que indica que las células son inducidas a salir de la fase G1. Sin embargo, tanto la fase S como la fase G2/M no muestran cambios significativos, datos que hacen pensar que las células que salen de la fase G1 no son inducidas a continuar ciclando. Estos datos y el hecho de que las células Caski sean positivas a la marca que identifica una mayor presencia de pro-caspasa 3 así como la positividad a TUNEL que indican un fuerte incremento en la fragmentación de ADN en células tratadas con la Schkuriolida, sugieren que dicha lactona induce a las células Caski a morir por apoptosis a una dosis de 35 µg/ml. Por otro lado, células fibroblásticas provenientes del cérvix humano de pacientes histerectomizadas por miomatosis uterina, sólo disminuyó en un 20% y en un 30% su densidad celular cuando fueron estimulados con la Schkuriolida a una concentración de 50 y 100 µg/ml respectivamente. Este dato interesante, abre la posibilidad de que las células tumorales sean más sensibles a la actividad antiproliferativa de la Schkuriolida que las células fibroblásticas en estas condiciones y le den a esta lactona un fuerte interés para considerarla como un posible agente con un fuerte potencial terapéutico. No obstante, es recomendable realizar más pruebas en otras líneas celulares de CaCu, así como en cultivos de células tumorales, provenientes de tumores primarios, para descartar que el efecto

antiproliferativo observado para esta lactona es debido a la transformación tumoral y no a la transformación ocurrida en el tiempo de cultivo de la línea celular. Por último, también es prudente realizar más pruebas tanto en líneas celulares de cáncer de cérvix HPV-16, así como de HPV-18 y otros tipos de menor incidencia, para establecer si el efecto antiproliferativo inducido por la Schkuriolida está relacionado con el HPV. El hecho de demostrar que la Schkuriolida presenta una actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, sugiere que esta misma lactona podría estar inhibiendo la secreción o producción de citocinas participantes en estos dos eventos biológicos, por lo que sería interesante en un futuro, determinar si la lactona Schkuriolida es capaz de inhibir la actividad de citocinas tales como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-10, entre otras, de tal manera que se pueda aportar más información sobre el mecanismo de acción de esta lactona y así poder construir un modelo que permita explicar el mecanismo de acción de esta lactona, con el propósito de valorar su potencial quimioterapéutico.

## Conclusiones

1. La lactona Schkuhriolida induce una disminución de la densidad celular de un 50% en cultivos *in vitro* de células provenientes de cáncer cérvico-uterino a una concentración de 35  $\mu\text{g/ml}$ .
2. Schkuhriolida induce a las células Caski a salir de la fase G1 del ciclo celular.
3. Schkuhriolida induce a las células Caski a una muerte celular por apoptosis.
4. Células fibroblásticas provenientes de cérvix humano son menos sensibles a la actividad antiproliferativa observada por la lactona Schkuriolida en células Caski.

## Referencias

1. Alberts , B; D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K . Raberts & J. D . Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishising inc. New York.pp, 1294.
2. Alfaro.M.E,García.C.C,Dueñas.G.A.(2000).Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones.vol.46,Núm.4:pp275-280.
3. B.A.Bhat, K.L.Dhar,S.C.Puri,M.A.Qurishi,A.Khajuria,Amit Gupta and G.N.Qazi.(2005).Isolation,characterization and biological evaluation of datura lactones as potential immunomodulators.
4. +Beekman,H;Schmidt,T;Structure-Cytotoxicity relationships of some helenanolide-tipe sesquiterpen lactones.J .Nat.Pord.1997,60,252-257.
5. Bowen, I & Bowen S. M.1990. Programmed cell death in tumor and tissues.
6. Caballero.B.A y Morán.A.J.(2002).Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica.2/(4):235-244.
7. Centro de Biología Molécula Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid y el consejo superior de investigaciones científicas. Chapman and Hall, London.pp.268.
8. Delgado.G,Tejada.V,Salas.A,Chávez.M.I,Guzmán.S,Bolaños.A,Aguilar. M.I,Navarro.V, y Villarreal.M.L.(1998). New Melampolides from *Schkuria schkuriodes*.61,(9)1082-1085.
9. Heywood V,H; Harborne,J.B:Turner,B.L.The biology and chemistry of the compositae.Vols I YII,Academic Press:New York,1997.
10. .García.M,Vecino.E.(2003).Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina.Núm.7.Sociedad española de oftalmología.
11. Harvey,A;(2000).Strategies for discovering drugs previously unexplored natural productcs.drugs discovry today.5,294-300.
12. Kinloch,R.A;Treherne,J.M;Furness,L.M;Hajimohamadreza,I;(1999).The pharmacology of apoptosis.Toxicology and Applied Pharmacology. 175,95-103.
13. Kahn,A.J.et al.(2005).Jornal of Adolescent Health.Vol.(36).pp363-371.
14. Lira, H.H.2001.Análisis de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en ocho líneas celulares derivadas de cáncer cérvico- uterino. Tesis de licenciatura. FES- Zaragoza. UNAM. México.

15. Longworth, M. S. & L. A. Laimins. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology Reviews*, 68:362-372.
16. Morgan, S. J. & D. C. Darling. 1993. Cultivo de células animales. Editorial Acriba. España. pp 159.
17. Muñoz. N. & X. Bosch. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica México*, 39:174-282.
18. Ortiz M.R.; Fierro R.P. 2003. Academia de Profesores de Biología Celular.
19. Oscar, P-Z. Biol.; M en C; Margarita B-R, Biol.; Cinthya E.D-B; Biol., Vicente M-M; Dr; en C. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud publica*. vol.39.(5).451-462.
20. Pardo, F. J. 1998. Anatomía patología general y especial de las neoplasias. Editorial Científico- Médico. España .pp 335.
21. Pérez Gill R; Àvila Cabrera A; Edgill Labori R; Colon Loo, Y; Quesada Cerero, Waldo; Bello Garcita J. L; Panfet C. (2005). *Revista cubana medica*. Vol(10).
22. Reed J. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J cell boil* 124:1-6.
23. Rzedowski, J.; Rzedowski, G. (1985). Flora fanerogámica del valle de México Vol II. Editorial Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. pp 585.
24. S.H. Inayat-Hussain, B.O. Annuar, L.B. Din, A.M. Ali, D. Ross. (2003). Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl- lactone goniothalamin in HL-60 leukemia cell.
25. Shyng-Shiou, F. Y.; Husueh-Ling, C.; Hsiao-Wen, C.; F-Chen, K.; Chinh-Chuang, L.; Jinu-Huang S.; Yang-Chang, W. (2006). *Life Sciences*. Vol(78). pp 869-874.
26. Siyuan Zhang, Yen-Kim Won, Con-Nam Ong and Han-Ming Shen. (2005). Anti-cancer Potential of sesquiterpene lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms. 5:239-249.
27. Studzinski, G. P. 1995. Cell growth and apoptosis. Oxford University Press. New York .pp 269.
28. Tomasz Jacki, Tomasz Wasek, Marek Rózalski, Urszula Krajewska, Kazimierz Studzian and Ann Janecka. (2006). 4-

- Metihylideneisoxazolidin-5-ones- Anew class of a-methylidene-g-lactones with high cytostatic activity.16:1430-1433.
29. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
  30. Walboomers, J.M.M; et al. (1999). *Journal of pathology*. Vol(189).pp 12-19.
  31. Wang, H.K.2000.The therapeutic potential. *Expert Opinion Investigation Drugs*, 9(9).2103-2119.
  32. Weinberg, R.A.1996.How cancer arises. *Cientific American*, 275(3):62-70.
  33. Welch, P.R; P.S. Steeg & W.R. Rinker-Schnefer.2000. Molecular biology of breast cancer metastasis:Gene regulation of human breast carcinoma metastasis.2:408-416.
  34. Xiao-Feng Zhu, Zong-Chao LIU, Bin-Fen Xie, Zhi-Ming Li, Gong-KANfENG, Hai-Hui, Shu-jun-Wu, Ren-Zhou Yang, Xiao-Yi Wei, Yi-Xin Zeng.(2002).Involvement of capase-3 activation in squamocin-induced apoptosos in leukaemia cell line HL-60.70:1259-1269.
  35. Yocota, M; M.Noguchi, Y.Nakao, A.Peter & T.Iwasaka.2004.The tea polypenol, effecs on groth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lineas. *Ginecologic Oncology*, 92:197-204.
  36. Ze, T; Sinbao, C; Yaou, Z; Minghui, H, Lin, S; Feng, H; Chichón, F; Mengsu; Peinen, X. (2005).The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*. Vol(13).pp181-186.
  37. Zentella, A; R.López-Marure, E.Gómez, R.E.Paredes y Ma. de J. Ibarra.1995.El ciclo celular y su regulación: la interacción entre las proteínas cinasas CDKs y la familia de las ciclinas. *Boletín de educación Bioquímica*, 15(1):4-12.
  38. Holub, M, C. Budesinsky.(1986). Particularly, the biological activity of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 25: 2015Ð2026.

## Apéndice

### ➤ Composición del RPMI-1640(Sigma Chemical Co .U.S.A.

Nitrato de calcio tetrahidratado	0.100000
Sulfato de magnesio anhídrido	0.048840
Cloruro de sodio	6000000
Fosfato dibásico de sodio anhidro	0.800000

### Amonoácidos

L- arginina	0.200000
L-aspargina	0.050000
L-ácido aspárgico	0.200000
L-cisteina 2HCL	0.065200
L-ácido glutámico	0.020000
L-glutamina	0.300000
Glicina	0.100000
L-histidina	0.015000
L-hidroxiprolina	0.020000
L-isoileucina	0.050000
L-leucina	0.050000
L-lisina HCL	0.040000
L-metionina	0.015000
L-fenilalanina	0.015000
L-prolina	0.020000
L-serina	0.030000
L-treonina	0.020000
L-triptofano	0.005000
L-tirosina	0.028830
L-valina	0.020000

## Vitaminas

D-biotina	0.000200
Cloruro de colina	0.003000
Ácido fólico	0.001000
Myo-inostil	0.035000
Niacinamida	0.001000
Ácido-p-Amino Benzoico	0.001000
Ácido – D- pantoténico	0.000250
Piridoxina HCL	0.001000
Riboflavina	0.000200
Tianoma HCL	0.001000
Vitamina B-12	0.000005

## Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza las siguientes sustancias:

Tris base Co.U.S.A)	3.04 g (sigma chemical
Cloruro de sodio Co.U.S.A)	8.00 g (sigma chemical
Cloruro de potasio Co.U.S.A)	0.04 g (sigma chemical
Etilen –diamen-tetra-acético(EDTA) Co.U.S.A)	0.40 g (sigma chemical



Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

#### ☛ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio Co.U.S.A)	0.10 g(sigma chemical
Cloruro de calcio Co.U.S.A)	0.10 g (sigma chemical
Cloruro de sodio Co.U.S.A)	8.00 g (sigma chemical
Cloruro de potasio Co.U.S.A)	0.20 g (sigma chemical
Fosfato monoácido de sodio Co.U.S.A)	2.16 g(sigma chemical
Fosfato diácido de potasio Co.U.S.A)	0.20 g (sigma chemical

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de

membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 $\mu$ . La solución se almacena a 4° hasta el momento del uso.

#### Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 ml de ácido fórmico aforados a 500ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución se filtra y posteriormente se usa.

#### Desactivación del suero

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone, U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50ml para su mejor uso y manipulación.