



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIÓLOGO**

**UNIDAD MULTIDICIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA
(UMIEZ) LAB. 2, P. B.**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

**Efecto antitumoral de los análogos de la Capsaicina: 12-Fenil-
acetil-rinvanil (12-FAR) y Rinvanil en la línea celular HeLa
proveniente de cáncer cérvico-uterino.**

**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 :
ELICEO QUISEHUATL TEPEXICUAPAN**

**DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**



México, D.F.

2009



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.

“Algo he aprendido en mi larga vida: que toda nuestra ciencia, contrastada con la realidad, es primitiva y pueril; y, sin embargo, es lo más valioso que tenemos.”

Albert Einstein

Por eso debes hacer ciencia no solo para complacer tu ansiedad sino para tratar de ayudar a dar sentido al rumbo de la humanidad, y cuando alguien te diga que es imposible, no te desanimes recuerda que...

"Los grandes espíritus siempre han encontrado una violenta oposición de parte de mentes mediocres."

Albert Einstein

A mis padres

Víctor y Cirila

Porque este logro suyo, es el reflejo de su entrega. Junto a ellos soy comparsa para conquistar esta meta.

A mis hermanos

Iván, Israel, Omar, Eleazar, Vladimir y David

“Nunca consideren el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia, pues han sido mis brazos para romper la barrera de la incuria y me han encaminado hacia la humildad y el valor.

Al M. en C. Luis Sánchez, por proporcionarme todos los recursos para construir un peldaño más en la escalera de mi formación, conocimiento y excelencia.

Al Dr. Ignacio Regla, por donar los compuestos con los que se realizo este trabajo

A la M. en C. María Luisa Escobar, por su gran ayuda y contribuciones que me permitieron realizar de este trabajo.

Al Biol. Vicente Hernández, un excelente trabajador de las minas del conocimiento, pues su colaboración fue fundamental en este trabajo y porque sus cuestionamientos me incitaron a seguir buscando respuestas.

Al M. en C. Hugo López, porque con su gran conocimiento me ayudo a disipar muchas de las sombras de ignorancia.

A la Biol. Carla Ornelas, porque su apoyo fue crucial para realizar este trabajo, porque no solo fue para mí una profesora, sino una amiga y porque siempre estuvo dispuesta a regalarme algo de su conocimiento y de su tiempo.

Al Dr. René García Sánchez, jefe de enseñanza del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSTE y al Dr. Dionisio Parra Roldan jefe del departamento de ginecología y perinatología del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSTE, por habernos facilitado las muestras de cérvix humano con las que se realizo este trabajo.

Al Dr. Benny Weiss Steyder y a la Dr. Lourdes Mora, porque con su conocimiento y observaciones contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

A Karla, Elizabeth, Reynaldo, Mariana, Itzel, Gabriela y demás compañeros, que se convirtieron en mis amigos y mi familia, siendo parte fundamental de mi vida a lo largo de la licenciatura y porque me mostraron que la escuela no es la vida sino que la vida es una escuela y hay que aprender a vivir mientras aprendes a estudiar.

La tesis fue realizada con apoyo del PAPIME: proyecto PE204609.

Índice

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	2
III.	Marco Teórico	
A.	Proliferación celular.....	3
B.	Ciclo celular.....	5
C.	Muerte celular.....	7
D.	Cáncer.....	11
E.	Cáncer cérvico-uterino.....	13
F.	VPH.....	15
G.	Capsaicinoides.....	17
IV.	Planteamiento del problema.....	20
V.	Justificación.....	21
VI.	Hipótesis.....	22
VII.	Objetivos.....	23
VIII.	Método	
A.	Cultivo de la línea celular HeLa.....	24
B.	Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.....	24
C.	Aislamiento y purificación 12-FAR y rinvanil	24
D.	Preparación de los stocks.....	25
E.	Determinación de la proliferación celular por incorporación del colorante cristal violeta.....	26
F.	Obtención de la IC ₅₀	26
G.	Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.....	26
H.	Evaluación de la expresión de la procaspasa-3.....	27
I.	Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de túnel.....	27
J.	Análisis estadístico.....	28
IX.	Resultados.....	29
X.	Discusión.....	36
XI.	Conclusiones.....	38
XII.	Bibliografía.....	39

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) se ubica como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas representando un problema de salud grave. Actualmente, se cuenta con diferentes alternativas terapéuticas, sin embargo, éstas no son suficientemente selectivas y producen efectos que deterioran la calidad de vida del paciente, esto generó la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas de origen biológico y que manifiesten selectividad hacia células tumorales.

Se ha reportado que la capsaicina, compuesto presente en el chile y que le da su sabor picante, presenta un efecto inductor de apoptosis de células cancerosas gástricas y leucémicas, entre otras; pese a esto se ha distinguido por ser un compuesto sumamente citotóxico, carcinogénico, irritante y costoso. Sin embargo aun no se sabe si este compuesto actúa de manera selectiva, es decir, que su acción antiproliferativa y/o apoptótica se dé solo en células tumorales y no en células normales. No obstante, sus características indeseables, este compuesto podría servir de modelo estructural para sintetizar análogos o derivados que mantengan las propiedades antiproliferativas e inductoras de apoptosis, sin presentar las características indeseables, tratando de generar en ellos un fuerte potencial selectivo, de tal manera que induzcan un fuerte daño a las células tumorales afectando en lo menos posible a las células normales. Al respecto, se han sintetizado análogos de la capsaicina describiendo su actividad citotóxica pero no su actividad anticancerígena y mucho menos su actividad selectiva, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto antitumoral e inductor de apoptosis de los análogos de la capsaicina 12-fenilacetilrinvanil (12-FAR) y rinvanil (análogos que han sido descritos como menos irritantes, de fácil obtención y relativamente económicos) en la línea tumoral proveniente de CaCu HeLa, así como en células no tumorales. Al respecto, se obtuvo que ambos compuestos disminuyeron en un 50 % el número celular a una concentración de 56.57 $\mu\text{g/ml}$ para 12-FAR, mientras que para rinvanil fue de 62.24 $\mu\text{g/ml}$. Además, para comparar el potencia antiproliferativa, se realizó un ensayo con capsaicina, de la cual se requirió de 100 $\mu\text{g/ml}$ para observar la misma actividad, sugiriendo que las células tumorales de la línea HeLa son más sensibles a los análogos. Esta actividad antiproliferativa provoca una alteración en el ciclo celular, donde 12-FAR y rinvanil inducen una disminución de las células en fase G1 y G2, en conjunto con el incremento en la expresión de la procaspasa-3 así como la fragmentación del ADN provocada por ambos análogos, sugieren que el 12-FAR y el rinvanil inducen a las células HeLa a una muerte por apoptosis. Sorprendentemente estas concentraciones de 12-FAR y rinvanil no afectaron el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes de cérvix, generando en estos compuestos un fuerte potencial selectivo, de tal manera que los hacen dignos candidatos para ser evaluados como agentes con potencial anticancerígeno.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de su existencia el ser humano padece la probabilidad de desarrollar enfermedades que pueden tener consecuencias fatales. Tal es el caso representado por el cáncer, que en su variante cérvico-uterina representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas (INEGI, 2009).

El CaCu es una de las enfermedades neoplásicas más agresivas en la población femenina. Su desarrollo se asocia a factores entre los que destacan: el nivel socioeconómico bajo, el inicio temprano de la vida sexual, el antecedente de haber tenido más de una pareja sexual, embarazo a temprana edad, más de dos partos, el uso de anticonceptivos hormonales y el tabaquismo (Tirado *et al*, 2005). Además, a nivel mundial se ha registrado la prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) en 99.7 % de los carcinomas cérvico-uterinos (Lewis, 2004) y los tipos oncógenos 16 y 18 juegan un papel primordial en la patofisiología del CaCu, que provocan el 20 % del total de muertes femeninas relacionadas con el cáncer. (Garnett, 2006)

Entre las estrategias para combatir el cáncer, dependiendo del grado de la lesión se realizan terapias ablativas ambulatorias, curetaje endocervical, conización, histerectomía, radioterapia externa e intracavitaria y quimioterapia (Serman, 2002). Los productos naturales son la más exitosa fuente de fármacos y de agentes con posible potencial terapéutico, (Harvey A. 2000) en ellos se ha buscado el efecto de compuestos que puedan ser usados como agentes terapéuticos o preventivos. Por ejemplo, se ha reportado que lactonas (Cancino, 2007), flavonoides (Hernández, 2004), capsaicinoides (Zhang *et al*, 2003), entre otros, presentan actividades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas y antitumorales que le dan a estos compuestos un fuerte interés para ser estudiados con un enfoque terapéutico.

La capsaicina (compuesto proveniente de las plantas del género *Capsicum*) ha llamado la atención debido a la actividad antiproliferativa que han mostrado tener sobre líneas celulares tumorales de esófago, próstata, hígado, leucémicas, entre otros, pero ha sido demeritada debido a sus propiedades irritantes, su acción hiperalgésica, su obtención de alto costo y de bajo rendimiento (Castillo *et al*, 2008), generando la necesidad de buscar nuevos análogos de la capsaicina que mantengan su actividad antiproliferativa sin ser irritantes, además de poderlos sintetizar de manera sencilla y a un costo bajo. Al respecto, en este trabajo se utilizaron dos compuestos análogos de la capsaicina, el 12-FAR y el rinvanil, que a diferencia de la capsaicina, éstos no presentan propiedades irritantes, son de fácil manejo, con mayor afinidad a su receptor (Appendino *et al*, 2005b) y son más económicos. Sin embargo, son compuestos relativamente nuevos, que requieren ser evaluados en su actividad biológica y muy en especial, su actividad antitumoral. En consecuencia, este trabajo reporta la actividad antitumoral de 12-FAR y rinvanil, evaluados cultivos celulares de la línea HeLa y en células fibroblásticas no tumorales humanas provenientes del cuello uterino, con la intención de probar su acción selectiva.

MARCO TEÓRICO

Proliferación Celular

La célula es considerada la unidad morfológica, estructural y funcional de todo ser viviente; ya que resulta ser una entidad dinámica e integrada cuyos componentes desempeñan funciones específicas que contribuyen con la organización de la materia viva (figura 1). Éstas se clasifican en procariotas (sin núcleo definido) y eucariotas (con núcleo definido), las procariotas forman parte de organismos menos complejos y pequeños; mientras que las eucariotas son más grandes, radicalmente más complejas y son éstas quienes dan forma y estructura a los animales y plantas superiores. (Curtis y Barnes, 2005)

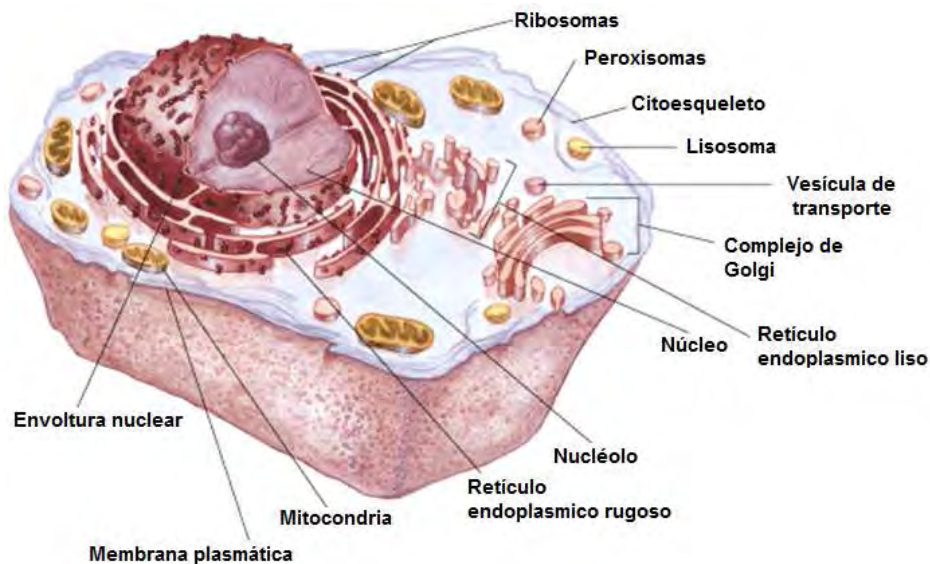


Figura1. Esquema general de una célula animal (tomado y modificado de Nelson y Cox, 2008)

La vida de un mamífero inicia con la formación de un óvulo fecundado, a partir del cual se pueden desarrollar animales que poseen trillones de células, y cada parte de su cuerpo tiene una estructura determinada por su información genética, la cual dicta un desarrollo ordenado de diferenciación, división y por ende de proliferación celular para cada tejido específico del cuerpo. Es por eso que ciertos tejidos mantienen niveles relativamente altos de actividad mitótica, mientras que otros, son mitóticamente inactivos. Además, el fenómeno de proliferación es una respuesta al medio ambiente, ya sea celular o química, en el que se encuentran incluidas; y se piensa que las respuestas de la células a estos estímulos esta mediada por la membrana plasmática. Por ejemplo, conforme aumenta la densidad de las células, disminuye el potencial de la proliferación celular o sea que hay inhibición de crecimiento dependiente de la densidad (Karp, 1996).

A diferencia de los organismos unicelulares (como bacterias o levaduras) que viven bajo condiciones en las que la suficiencia de nutrientes en el ambiente es el factor principal que determina si una célula crece o se divide, en los organismos pluricelulares las células viven rodeadas de fluidos extracelulares ricos en nutrientes pero el organismo sería destruido si todas las células proliferan continuamente por el simple hecho de tener acceso a los nutrientes. Sin embargo, en ocasiones algunas células logran escapar a los mecanismos de control del cuerpo, pudiendo así continuar su proliferación irrefrenable y adquirir nuevas características, como presentar crecimiento independiente del anclaje (Becker *et al*, 2007) e inmortalidad, lo que les confiere ciertas ventajas sobre las células normales. Para evitar la división descontrolada de células, los organismos utilizan proteínas extracelulares de señalización denominados factores de crecimiento, que controlan la tasa de crecimiento y división celular. Así cuando la célula ha recibido el estímulo de división entra en un proceso conocido como ciclo celular.

Ciclo celular

El proceso conocido con el nombre de ciclo celular, representa el mecanismo fundamental subyacente a la reproducción de todos los organismos vivos. Para su mejor entendimiento, el ciclo celular, se ha dividido en dos intervalos (Murray y Hunt, 1993) (figura 2).

1) La Interfase, que a su vez se ha subdividido en:

- Fase G₁ (gap 1): las células aumentan su volumen intracelular y la síntesis de proteínas como las ADN helicasas, primasas y polimerasas involucradas en la síntesis del Acido desoxirribonucleico (ADN), así como factores de transcripción y enzimas denominadas ciclinas.
- Fase S (síntesis): En esta etapa la célula duplica su genoma.
- Fase G₂ (gap 2): En este intervalo la célula incrementa su tamaño, aumentando el número de proteínas y orgánulos. Se activan ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas de que posteriormente activaran proteínas reguladoras en la mitosis. (Garret. 2001)

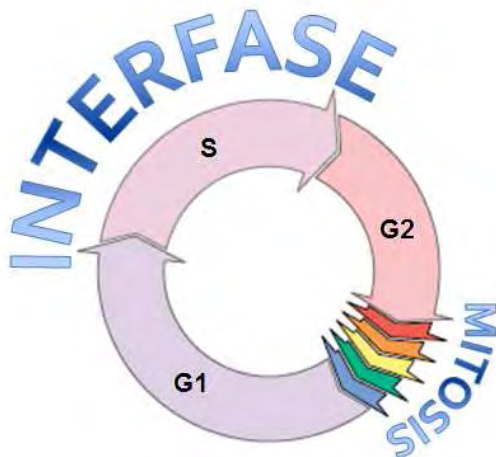


Figura 2. La interfase ocurre, mientras las células continúan haciendo su trabajo (las células del músculo cardíaco siguen bombeando sangre, las células intestinales siguen absorbiendo nutrientes, las células de la glándula tiroidea siguen produciendo hormonas, etc). En contraste, la mayoría de estas actividades cesan durante la mitosis. (Imagen tomada y modificada de US-NIH, 2005)

2) La fase M: En esta fase se reparte a las células hijas el material genético duplicado ya sea por mitosis o por meiosis. En el caso de las células somáticas, la fase M se divide en 5 etapas: Profase, Metafase, Anafase, Telofase, Citocinesis.

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 se forman entre ambas (CDK-ciclina) (Peralta *et al*, 1997). Estas ejercen el control en la entrada y la progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo. Las proteínas-kinasas dependientes de ciclinas (cyclin-dependent kinases o CDK) fosforilan elementos claves en la progresión del ciclo celular y para ser activas requieren unirse a las ciclinas, hay tres tipos: CDK G1 (CDK 4, 6 y 2), CDK fase S (CDK2)

y CDK mitóticas (CDK 2 y 1). Por otro lado, las ciclinas, son proteínas que se unen a las CDK y controlan su capacidad de fosforilación. Se denominan ciclinas porque se sintetizan y degradan durante el ciclo celular, también se clasifican en: ciclinas G1 (D1, D2, D3 y E), ciclinas fase S (A y E) y ciclinas mitóticas (A y B). Además, también hay Inhibidores de las CDK (cyclin-dependent kinases inhibitors o CDKI): de estas existen dos familias de CDKI, la familia del inhibidor de la CDK4 (INK4) y la familia de la proteína inhibidora de CDK (CIP / KIP). (Gasión *et al*, 2005)

Conjuntamente, el número de veces que una célula se ha dividido anteriormente también influye en la división celular. Cuanta mayor edad tiene el organismo de donde se toman las células, menor será el número de veces que las células se dividan en cultivo. A este fenómeno se le denomina senescencia o envejecimiento celular. Esta restricción en el número de divisiones se correlaciona con el acortamiento progresivo de los telómeros a lo largo de los sucesivos ciclos celulares. Esto no ocurre en ciertos tipos celulares, como en las células germinales o en algunas células de la sangre. En estas células, se encuentra activa una enzima llamada telomerasa, que agrega continuamente ADN a los extremos de los cromosomas, evitando su acortamiento. Esta enzima también se encuentra activa en células cancerosas (Wai, 2004). Aunque por sí sola la telomerasa no causa transformación de células normales en cancerosas, su reactivación coopera durante la carcinogénesis con mutaciones en proto-oncogenes como *ras* y genes supresores como *p53* y *Rb*. Si la expresión de *p53* se anula por mutación, se produce una acumulación masiva de mutaciones.

En el desarrollo y mantenimiento de la estructura de los organismos pluricelulares, no sólo se requiere de la división celular, que aumenta el número de células somáticas, sino también del proceso de muerte celular programada o apoptosis. En los vertebrados, por apoptosis se regula el número de neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso, se eliminan linfocitos que no realizan correctamente su función y se moldean las formas de un órgano en desarrollo, eliminando células de manera específica (Sánchez y Trigo, 2001).

Muerte celular

La palabra griega apoptosis significa caída con fragmentación, lo que hace referencia a la disminución del número celular mediante la fragmentación de la cromatina y del citoplasma. Una vez recibido el estímulo apoptótico la cromatina se condensa y el ADN es cortado entre los nucleosomas, el citoplasma experimenta condensación, reducción de volumen y fragmentación con formación de los denominados cuerpos apoptóticos. Debido a que en todo momento se conserva la integridad de la membrana y a que los fragmentos celulares son fagocitados por macrófagos no existe reacción inflamatoria, no deja huellas en el tejido que la sufre y se considera un proceso discreto (Fink y Kookson, 2005) (figura 3 y tabla 1).

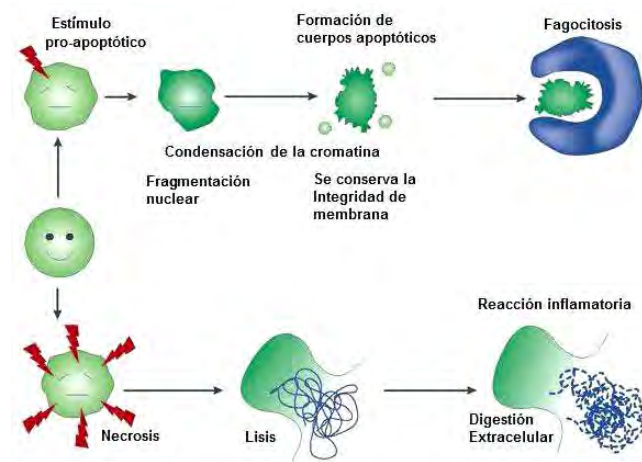


Figura 3. Diferencias básicas entre la muerte apoptótica y la necrótica (esquema tomado y modificado de Kumiko y Earnshaw, 2005).

La apoptosis puede ser desencadenada por señales internas de las células, en este caso tiene lugar por el denominado camino intrínseco mediante el apoptosoma (también conocido como vía mitocondrial) o bien puede tener lugar mediante la vía extrínseca, que es desencadenada por señales externas a la célula y es conocida por el camino de la muerte vía receptor (Putcha *et al*, 2002).

Camino intrínseco:

Los factores que desencadenan la muerte por este camino pueden ser la presencia de toxinas bacterianas, el efecto de radicales libres de oxígeno, o bien la acción de agentes como rayos gamma sobre el núcleo. Estos factores activan proteínas proapoptóticas como Bim que a su vez activan a Bcl-2 (B cell leukemia 2), proteína presente en la membrana de la mitocondria, que interacciona con una proteína cercana llamada Bax promoviendo la salida del citocromo C del interior mitocondrial al citosol donde se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) y a la procaspasa-9. La unión se realiza con la intervención de ATP (Adenosín trifosfato), así se forman los llamados apoptosomas (Ting-Jun *et al*, 2005). De este modo se activa la procaspasa-9 formándose la caspasa 9

(las caspasas, son una familia de proteasas, enzimas que degradan cadenas polipeptídicas) que en consecuencia activara a la procaspasa-3, y ésta dará lugar a una serie de eventos en cascada que termina con la degradación de los componentes celulares y nucleares (activación de endonucleasas) (Cohen, 1997). Los factores llamados IAPs son inhibidores de la apoptosis y funcionan en ciertas condiciones uniéndose a los apoptosomas. En cuanto a p53, se libera en caso de daño al ADN y es un potente inductor de la apoptosis; por eso cambios genéticos en el gen de p53 están relacionados con las células cancerosas (figura 4).

Camino extrínseco:

La vía extrínseca involucra la activación de receptores de la membrana celular en respuesta a señales (ligandos) extracelulares. Los Inductores de esta vía son los miembros de la familia TNF [TNF (del inglés, Tumoral necrosis factor), Fas L (del inglés, Fas Ligand), Trail (del inglés, TNF-related apoptosis-inducing ligand)], ligandos de los receptores de muerte celular (Zhaoyu y El-Deiry, 2005). Una vez activado el receptor se inicia la fase intracelular. Durante esa fase la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula logra sobrevivir. Pero una vez pasado cierto punto, no hay retorno y la célula morirá. FADD (del inglés, Fas-Associated protein with Death Domain) está asociado al receptor de muerte y a su vez está en contacto con la caspasa 8, cuando se activa la caspasa 8 desencadena una sucesión en cascada que activa a la caspasa-3 (Díaz *et al*, 2005) induciendo al complejo sistema de desmontaje celular característico de la apoptosis. Sin embargo, hay factores como el FLIP y IAPs que tienen la capacidad de evitar la apoptosis (Zhaoyu y El-Deiry, 2005). La caspasa 8 puede también cortar a la proteína Bid para dar lugar a la forma inhibida (tBid) que actúa sobre la mitocondria, de éste modo se da la conexión entre ambas vías (Figura 4). La descripción anterior resalta la complejidad del proceso, ya que se trata de un mecanismo verdaderamente controlado que si se sale de control puede producir grandes daños.

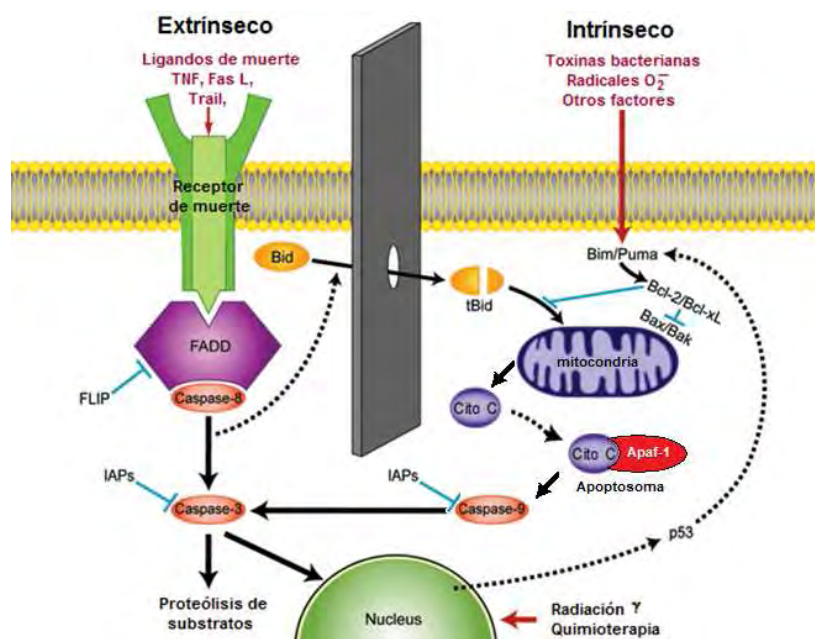


Figura 4. Esquema simplificado de la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis (modificado de Coto, 2007)

Además de la apoptosis, existe otro tipo de muerte denominada necrosis, ésta es un proceso pasivo y degenerativo que se da por factores ajenos al control celular, generalmente representa la respuesta celular a una lesión grave y es frecuentemente inducido por una sobredosis de agentes citotóxicos (Fink y Cookson, 2005) daño mecánico, isquemia o por temperaturas extremas.

Uno de los principales síntomas de la necrosis es el hinchamiento de la mitocondria, seguido por el rompimiento de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático, el cual libera enzimas proteolíticas que provocan un efecto irritante y una reacción inflamatoria en el tejido vecino que incluso puede provocar cicatrices (Studzinski, 1995). (Tabla 1)

Apoptosis	Necrosis
Afecta a una sola células	destrucción masiva de tejido
Programada genéticamente	Accidental
Disminución del volumen celular	Aumento del volumen celular
Hidrólisis de ADN en fragmentos nucleosomicos	Hidrólisis del ADN en fragmentos heterogéneos
Picnosis y Canorexis (Condensación de la cromatina)	Canolisis, precedida del aglutinamiento irregular de cromatina
Grandes masas heterocromaticas perinucleares	Pequeños agregados de cromatina
Orgánulos celulares intactos	Orgánulos celulares perturbados
Formación de cuerpos apoptóticos	Ruptura de la membrana celular
Cuerpos apoptóticos son fagocitados	Reacción inflamatoria

Tabla 1. Diferencias entre la muerte necrótica y apoptótica. (Mezquita, 1995 y Studzinski, 1995).

La muerte necrótica suele ser una consecuencia accidental y esto contribuye a desviar la atención de ella, para considerar al mecanismo de muerte celular apoptótico más importante en el desarrollo de los organismos pluricelulares ya que regula el número celular. La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que tiene un papel crítico en la embriogénesis, metamorfosis, mecanismos de acción de hormonas y factores parácrinos, respuestas del sistema inmunitario, respuesta celular a las infecciones víricas, enfermedades autoinmunes y respuesta celular a la quimio y radioterapia, y en muchos procesos fisiológicos, patológicos y para la homeostasis tisular del organismo resulta esencial la existencia de un balance adecuado entre mitosis y apoptosis (**Jacobson et al, 1997**). Cuando se rompe este balance, aunado a otras anomalías, se pueden desencadenar irregularidades con consecuencias severas como la generación del cáncer.

Cáncer

El término cáncer (del *latín* “cangrejo”), describe enfermedades en que las células se dividen de manera relativamente autónoma e incontrolada, conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división. La masa resultante del tejido en crecimiento se denomina neoplasma (o tumor) (Farber, 1984).

Existen diferentes tipos de cánceres y se clasifican según el tejido y célula de la cual se originan. Por ejemplo, los cánceres que se presentan en células epiteliales como la piel o endotelios se llaman carcinomas, los que se presentan en las células del tejido fino conectivo (huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos), del músculo o tejido adiposo se llaman sarcomas; y los que proceden de los tejidos formadores de células sanguíneas (células hematopoyéticas) se les llama leucemias y linfomas (Pardo, 1998).

Un cáncer generalmente resulta de mutaciones que traen como consecuencia la alteración del comportamiento normal de las células y se originan durante la exposición a carcinógenos, como químicos y radiaciones ultravioleta o por errores en la transcripción y reparación de los genes. Incluso si el daño genético lo sufre sola una célula somática, ésta se lo heredará a sus células hijas y darán inicio a un clon de células alteradas que eventualmente crecerá hasta convertirse en un aglomerado celular con características tumorales. Raramente, sin embargo, la simple mutación de un gen derivará en el inicio de un cáncer, mas bien, una serie de mutaciones en múltiples genes crea un tipo progresivamente más rápido de proliferación celular que escapa de la restricción de crecimiento normal, creando una oportunidad para mutaciones adicionales. Además, existen genes que contribuyen a originar un cáncer, éstos se relacionan con el control del crecimiento y la sobrevivencia de la célula.

La célula, cuenta con genes cuyos productos proteicos controlan la secuencia normal de acontecimientos que permiten su proliferación y diferenciación, éstos son los denominados genes supresores de tumores o antioncogenes. Entre los más estudiados se encuentran el p53 y el Rb. El primero, está implicado en el control del ciclo celular, ante la presencia de daños en el DNA, bloquea el proceso de división celular. El producto del gen Rb mantiene inhibido el factor de la transcripción E2F y por tanto, detiene el ciclo celular en la fase G1. Por otro lado, los protooncogenes son los genes celulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación. La presencia de mutaciones en éstos puede resultar en variantes alteradas u oncogenes que codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que mantienen a la célula estimulada para pasar de una mitosis a otra. (Hernández y Ríos, 1999). En ambos casos, la presencia de estos genes alterados conduce a la proliferación descontrolada de células que en su conjunto presentan un comportamiento maligno (Weinberg, 1989).

Las células de un tumor no solo crecen en un área delimitada y localizada, sino que en ocasiones suelen ser capaces de invadir los tejidos circundantes, de entrar en el torrente circulatorio, y migran a otras partes del hospedero desarrollando metástasis, estas células

forman nuevos tumores que a menudo son quienes tienen un mayor impacto en la salud (Li *et al*, 2007 y Weigelt *et al*, 2005) (figura 5).

La capacidad de dispersión implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios. Por otro lado, tejidos de baja ofensiva son más vulnerables si producen factores de crecimiento y de angiogénesis. Pero hay más resistencia si producen factores antiproliferativos, inhibidores de enzimas proteolíticas y factores antiangiogénicos (Alberts *et al*, 2006). Finalmente, cuanto más ampliamente produzca metástasis un cáncer, más difícil resultará de erradicar (Lance *et al*, 1991).

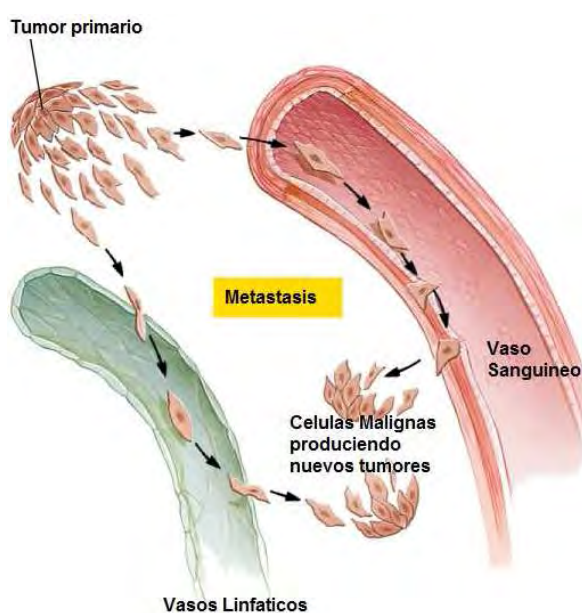


Figura 5. La metástasis es el proceso en el que una o varias células producidas en un tumor logran emigrar a otros órganos mediante los vasos sanguíneos o linfáticos. (Modificado de Thibodeau y Patton, 2008)

Se ha reportado que cerca del 90 % de los cánceres humanos son carcinomas (Becker, *et al*, 2007), quizás porque la mayoría de la proliferación de las células en el cuerpo ocurre en el epitelio, además de que los tejidos epiteliales se exponen con más frecuencia a las varias formas de daño físico y químico que favorecen el desarrollo de un cáncer. Un ejemplo llamativo lo proporcionan las células HeLa, que se obtuvieron en 1952 de un adenocarcinoma de cérvix infectado con virus de papiloma humano tipo 18 diagnosticado a una mujer de 31 años llamada Henrietta Lacks (Gey *et al*, 1952 y Masters y Palsson, 1999), estas células de carcinoma epitelial han proliferado durante más de 50 años, dividiéndose más de 18'000 veces sin que parezca que vayan a detenerse.

Cáncer cérvico-uterino (CaCu)

Hacia el año 2000, se calculó que habría 470'606 nuevos casos de CaCu y en consecuencia 233'372 defunciones al año entre las mujeres de todo el mundo. Además, se calculó que más del 80 % de esta carga se presentaría en los países menos desarrollados, donde esta enfermedad es la principal neoplasia maligna entre las mujeres. Especialmente en América Latina y el Caribe, se tienen unas de las tasas de incidencia y mortalidad por CaCu más altas del mundo. En México representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (INEGI, 2009), tal vez inherente a ésta esté la pobreza, el acceso limitado a los servicios, la vida en zonas rurales y los bajos niveles de educación.

El CaCu se origina de mutaciones en las células de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino (Figuras 6 y 7), manifestándose inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa. Evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable, cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial, luego a microinvasor y posteriormente a invasor cuando el tumor traspasa la membrana basal (James *et al*, 1984).

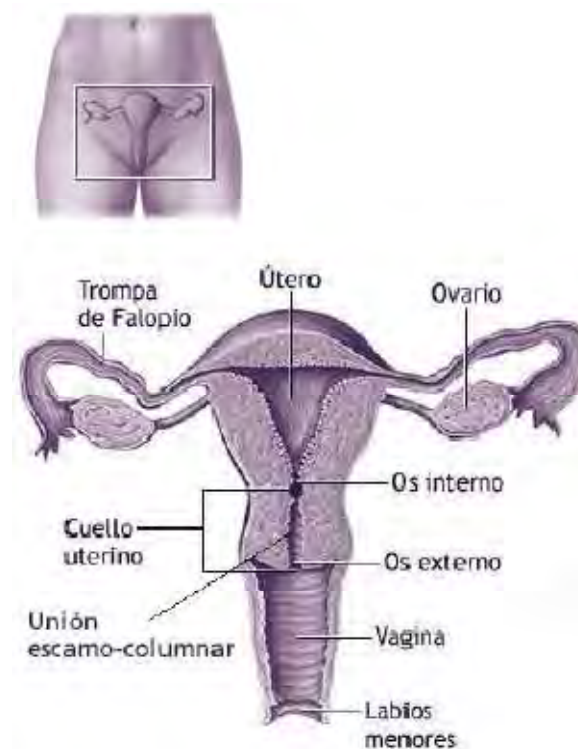


Figura 6. Esquema del aparato reproductor femenino (Alemán, 2007).

En el CaCu se reconocen tres principales categorías: carcinoma de células escamosas (60-80 %) que predomina entre los carcinomas cervicales invasivos e incluye variantes verrugosas como condilomas. El adenocarcinoma (que representa del 5-15 % de carcinomas invasivos), muestra una tendencia creciente en mujeres jóvenes. Y finalmente el carcinoma adenoescamoso (5-25 %), como el adenoide-quístico, adenoide-basal,

neuroendocrinos y carcinomas indiferenciados constituyen otros tumores epiteliales del cuello uterino (Phaik-Leng y Lai-Meng, 1999).

Aunque la causa del cáncer es multifactorial, la investigación sugiere que el CaCu es causado por un virus que se transmite sexualmente llamado virus del papiloma humano (Muñoz y Bosch, 1997).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de transmisión sexual, que se transmite por contacto genital (como el contacto sexual vaginal y anal). También se transmite por contacto cutáneo. Actualmente la infección por VPH es reconocida como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo (Longworth y Laimins, 2004) y produce una amplia variedad de lesiones, de especial importancia se pueden mencionar las neoplasias intraepiteliales del tracto genital inferior y cáncer (Beutner y Tying, 1997)

Han sido identificados más de cien tipos de VPH, actualmente alrededor de 33 de ellos han sido vinculados a lesiones genitales intraepiteliales e invasoras (Frattini *et al*, 1996) y por el tipo de lesiones que provocan los VPH se han clasificado en dos subtipos; de bajo riesgo oncogénico (entre lo que destacan los subtipos virales 6 y 11) suelen asociarse con condiloma y/o lesiones intraepiteliales de bajo grado, y aquellos de alto riesgo (entre los que destacan los subtipos 16, 18, 31, 33 y otros) con lesiones intraepiteliales de alto grado, incluido el carcinoma in situ, y con carcinoma infiltrante (Lacruz *et al*, 2003).

A nivel mundial, se ha registrado la prevalencia del VPH en 99.7 % de los carcinomas cérvico-uterinos (Walboomers *et al*, 1999) y numerosos estudios han confirmado reiteradamente la presencia de VPH-16 y VPH-18 en CaCu de mujeres de América Latina y el Caribe. Además, se han evaluado agentes ambientales tales como el humo del tabaco (Moore *et al*, 2001), los anticonceptivos hormonales (De Villiers, 2003), el régimen alimentario y diversos microorganismos infecciosos como posibles cofactores del VPH en la carcinogénesis cervical (Tirado *et al*, 2005).

En consecuencia el mecanismo por el cual el VPH lleva a cabo su infección ha sido ampliamente estudiado. Así pues, se ha descrito que durante la actividad sexual se experimenta un microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, lo que permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi terminal (Guiroglou *et al*, 2001) (Figura 7 a). Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, proceso que ha sido identificado como endocitosis (Bousarghin *et al*, 2003) (Figura 7 b y d). Posterior a la endocitosis, la cápside viral experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfido que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Rivera *et al*, 2006). (Figura 7 f)

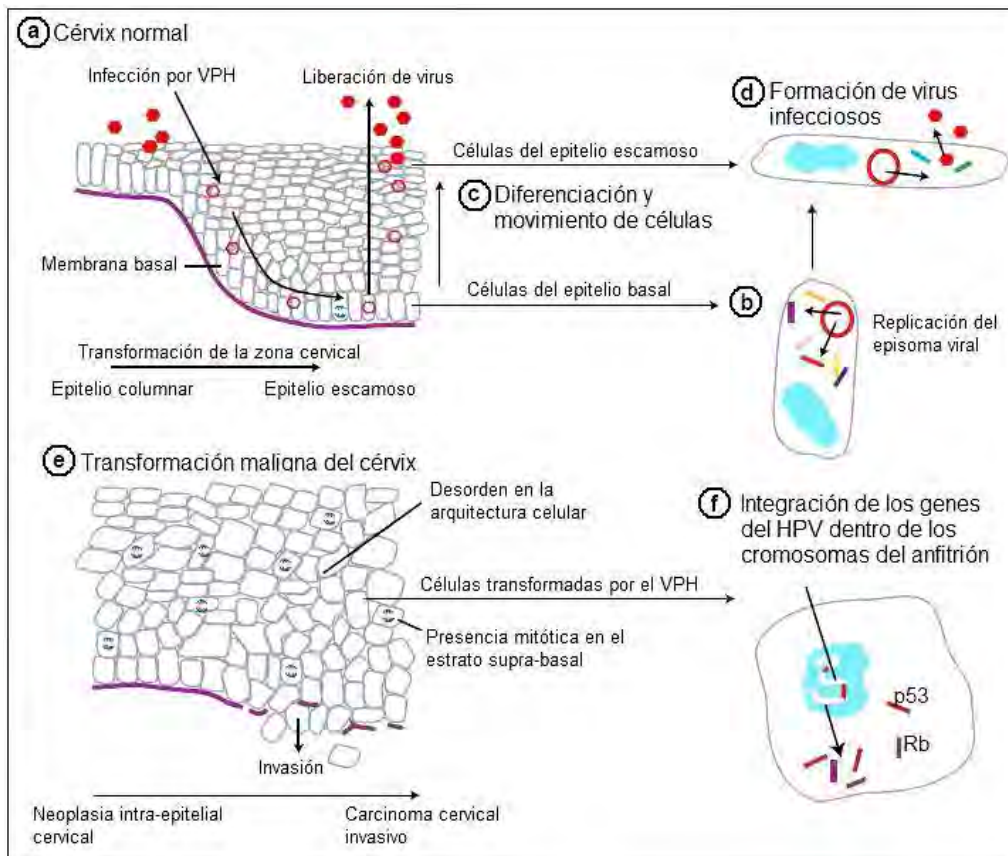


Figura 7. Virus del papiloma humano (VPH), invasión y replicación en células epiteliales de cérvix (modificados de Man, 1998).

La infección por VPH puede provocar lesiones de diversas magnitudes en el tejido invadido, que en consecuencia se combaten dependiendo del grado de la lesión, mediante terapias ablativas ambulatorias, curetaje endocervical, conización, histerectomía, radioterapia externa e intracavitaria y quimioterapia (Serman, 2002), y según la extensión del cáncer, el tratamiento puede consistir en una o más terapias, que desafortunadamente suelen disminuir la calidad de vida del paciente. En consecuencia, actualmente se ha incrementado el interés por encontrar tratamientos menos agresivos con el paciente. A propósito, los productos naturales son la más exitosa fuente de agentes con potencial terapéutico, y uno de los compuestos estudiados en este ámbito es la capsaicina, debido a que ha mostrado actividad inhibitoria en diversos tipos de cáncer.

Capsaicina y análogos

Los capsaicinoides son compuestos provenientes de las plantas pertenecientes al género *Capsicum* y dan a estos sus propiedades irritantes, se cree que el nombre del género, deriva del griego *Kapto*, que significa “picar”, lo que describiría la principal característica del fruto, o del latín *capsa*, caja, refiriéndose al hecho de que el fruto del chile es hueco (Salazar y Silva, 2004).

Los capsaicinoides son producidos por ciertas glándulas en la placenta del chile, el sitio del fruto donde se producen las semillas. La capsaicina (*8-metil-N-vanillil-6-nonenamida*), es el más abundante de los capsaicinoides presentes en el chile y es la principal responsable de la pungencia de éste. La capsaicina fue descubierta por L. T. Thresh en 1846 (Chow *et al*, 2007), se aisló por primera vez en 1876, su estructura química se determinó en 1919 y se logró sintetizar en 1930 (Szallasi y Blumberg, 1999). (Figura 8)

Por los estudios de actividad estructural, la capsaicina tradicionalmente se ha dividido en tres fracciones, la región aromática, la región lipofílica y la amida enlazadora (Appendino *et al*, 2005a). (Figura. 8)

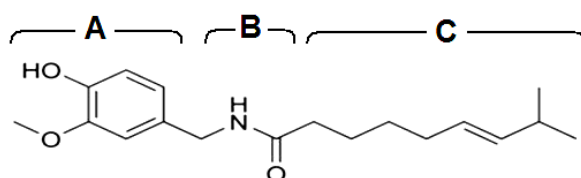


Figura 8. Molécula de la capsaicina donde se muestra la región aromática (A), la región lipofílica (C) y la amida enlazadora (B) (modificado de Appendino *et al*, 2005a).

Se ha determinado que la actividad estructural de la capsaicina (y de sus variantes estructurales) requiere la 4-hidroxi-3-metoxibencilamida (anillo vaniloide farmacoporo) y la fracción acilo de la cadena para tener actividad farmacológica (Caterina y Julius, 2001 y Szallasi y Blumberg, 1999) mediante el canal catiónico no selectivo TRPV1. Además, se ha reportado que la activación sostenida del canal TRPV1 provoca una severa citotoxicidad, la que conduce a una muerte celular (Han *et al*, 2006). Esto ha propiciado que la actividad de los capsaicinoides sea estudiada en diferentes áreas de la medicina. Sin embargo, mientras algunos investigadores sospechan que la capsaicina es un carcinógeno, co-carcinógeno o promotor de tumores (Surh y Lee, 1996), otros la han reportada con funciones quimiopreventivas o quimioterapéuticas. (Young-Joon y Lee, 1995)

Si bien la exposición inicial a la capsaicina produce dolor e hiperalgesia, además de que tratamientos repetidos o prolongados con capsaicina pueden desensibilizar neuronas nociceptivas llevando a un decremento progresivo en subsecuentes respuestas a la capsaicina u otros estímulos (Winter *et al*, 1995) y puede causar inflamación neurogénica bajo ciertas condiciones fisiológicas. Por otro lado, posee actividad analgésica y antiinflamatoria que se utilizan actualmente en cremas y geles tópicos (por ejemplo, Axsain y Zostrix) para mitigar el dolor neurógeno. (Young-Joon, 2002).

Además la capsaicina ha presentado efecto citotóxico en líneas tumorales como: epitelial branquial humana (BEAS-2B), adenocarcinoma de epitelio alveolar humano (A549), hepatoma humano (HepG2) (Reilly *et al*, 2003), en células de glioma (C6) (Qiao *et al*, 2005). Además de inductor de apoptosis en células de leucemia (HTLV-1) (Zhang *et al*, 2003), de próstata (PC3) (Sanchez *et al*, 2007), entre otras. Sin embargo, aunque la actividad antiproliferativa de la capsaicina ha sido atribuida a su capacidad de inducir apoptosis, el mecanismo molecular de la muerte celular programada inducido por éste compuesto es poco claro (Young-Joon, 2002).

A lo largo de la investigación que se ha realizado en la capsaicina, se ha modificado la fracción aromática y la fracción amida, y de igual manera han sido ampliamente estudiadas estas modificaciones. Sin embargo, las modificaciones en la fracción acilo son nuevas y se requiere de información al respecto (Appendino *et al*, 2002). Para ello fue desarrollada una común y simple síntesis de vanilamidas y empleada para investigar grupos de ácidos grasos e isoprenoides propuestos como análogos de la capsaicina con nuevas fracciones acilo de relevancia biológica.

El descubrimiento de nuevos análogos de la capsaicina que se unen al receptor TRPV1 con alta especificidad, pero que no presentan efectos colaterales derivados de la irritabilidad, puede conducir a drogas más efectivas para el tratamiento de desórdenes de la salud como hiperalgesia inflamatoria, hiperactividad de la vejiga, vómito, crecimiento canceroso, dolor e inmovilidad (Appendino *et al*, 2005b) y ha dado como resultado el desarrollo de rinvanil y 12-fenilacetilrinvanil, compuestos considerados análogos ultrapotentes, varias veces más afines al receptor TRPV1 que la capsaicina (Castillo *et al*, 2008), por lo que su estudio es necesario y prometedor.

Rinvanil

Rinvanil es un nuevo vaniloide más potente que capsaicina, lo que le da gran valor para la investigación de sus relaciones estructura-actividad (figura 9). La presencia de un grupo hidroxilo secundario en la región lipofílica de éste compuesto, da la oportunidad de una variedad de modificaciones interesantes (Appendino *et al*, 2005b).

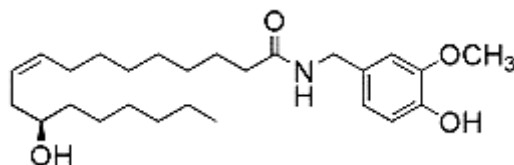


Figura 9. Molécula de rinvanil (Castillo *et al*, 2008).

12-fenilacetilrinvanil

Éste compuesto agonista de TRPV1, en términos de su afinidad por el receptor resulta ser similar a resiniferatoxin (un poderoso análogo de la capsaicina). Su estudio resulta interesante debido a que la alta afinidad de 12-FAR (figura 10) por el TRPV1 deriva de la fenilacetilación del grupo 12-hidroxil en rinvanil ([Apenndino et al, 2005b](#)).

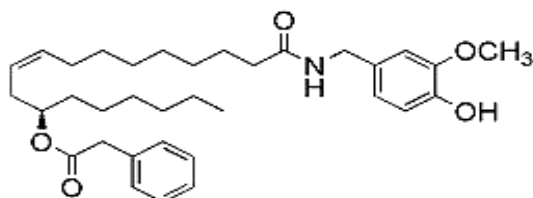


Figura. 10. Molécula de 12-fenilacetilrinvanil ([Castillo et al, 2008](#)).

Puesto que la síntesis de los compuestos 12-FAR y rinvanil es reciente, parece lógica la escasez de información y reportes que se tienen al respecto. En consecuencia, el que se ponga atención en el estudio de sus efectos sobre cáncer y otros padecimientos no será tarea vana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La capsaicina es un compuesto que ha demostrado tener actividad inhibitoria sobre diversos tipos de cáncer. Sin embargo, debido a sus características irritantes se ha generado la necesidad de sintetizar compuestos análogos que conserven su actividad inhibitoria, pero carezcan de propiedades irritantes. De este modo, a los compuestos 12-FAR y rinvanil se les atribuye dicha peculiaridad y en consecuencia se ha despertado interés en el estudio de estos compuestos.

Aunque las características de 12-FAR y rinvanil prometen gran potencial terapéutico, no se han hecho estudios correspondientes a su actividad sobre líneas de cáncer. Debido a esto, es importante iniciar el estudio de estas moléculas, para aportar información al respecto de los efectos de dichos compuestos puedan tener en la proliferación y la muerte celular de cultivos de líneas celulares cancerosas.

JUSTIFICACIÓN

En México el cáncer cérvico-uterino representa la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres (INEGI, 2009), de estos, el 95% está asociado con el VPH (Muñoz *et al*, 2003), donde el tipo 16 y 18 se consideran los de mayor incidencia y por tanto de alto riesgo (Lewis, 2004).

Para enfrentar este problema se cuentan con diferentes estrategias que disminuyen la calidad de vida del paciente. Es por ello que se ha optado por continuar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que reduzcan estos efectos y sobre todo que se obtengan a partir de fuentes naturales. De esta manera, se ha reportado que la capsaicina posee un gran potencial terapéutico en líneas celulares de leucemia humana (HTLV-1) (Zhang *et al*, 2003), de próstata (PC-3) (Sanchez *et al*, 2007), de cáncer gástrico (AGC) (Chow *et al*, 2007), entre otras. Pese a esto, se caracteriza por ser un compuesto sumamente citotóxico, irritante e hiperalgésico, esto sumado al poco contenido de capsaicinoides en los chiles (0.6-1.0 %) y los bajos rendimientos de los procesos de extracción, que hace limitada la disponibilidad de la capsaicina, por lo que, se han tratado de desarrollar moléculas análogas de fácil obtención y manejo que puedan desempeñar su acción biológica disminuyendo su capacidad irritante.

Por este motivo este trabajo tiene el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis del 12-FAR y rinvanil, considerados como análogos ultrapotentes de la capsaicina, en la línea celular proveniente de cáncer cérvico-uterino HeLa.

HIPÓTESIS

La capsaicina es un compuesto que ha mostrado tener efectos antiproliferativos sobre líneas celulares cancerosas de próstata (Sánchez *et al*, 2007), gástricas (Chow *et al*, 2007), entre otras. Sin embargo, pese a su actividad, presenta propiedades sumamente irritantes, por lo que, se ha optado por generar análogos que conserven su efecto farmacológico y carezcan de propiedades irritantes. En este sentido, se ha expresado que los compuestos 12-FAR y rinvanil cumplen con dicha expectativa (Castillo *et al*, 2008), no obstante, se desconoce si poseen efecto antiproliferativo en cultivos de células cancerosas. Por lo que, al tratar nosotros cultivos de la línea celular HeLa (proveniente de CaCu) con 12-FAR y rinvanil, esperamos se presente un efecto antiproliferativo en los cultivos tal como se ha reportado con capsaicina.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si los compuestos 12-FAR y rinvanil inducen un efecto antiproliferativo y apoptótico sobre la línea celular proveniente de CaCu HeLa.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración requerida de capsaicina y sus análogos 12-FAR y rinvanil, para disminuir en un 50% el número celular (IC_{50}) de la línea tumoral HeLa.
- Evaluar si la concentración de IC_{50} obtenida para la capsaicina, 12-FAR y rinvanil, afectan el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales.
- Establecer si el 12-FAR y rinvanil afectan el ciclo celular de las células tumorales HeLa, a través de la distribución de ADN en las diferentes fases del ciclo celular, evaluadas por citometría de flujo.
- Evaluar si el 12-FAR y rinvanil inducen un incremento en la expresión de la procaspasa-3 así como la fragmentación del ADN en cultivos de células HeLa, evaluados por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente, como dos parámetros de muerte apoptótica.

METODOLOGÍA

Cultivo de la línea tumoral HeLa

Se establecieron las condiciones necesarias para hacer proliferar cultivos de la línea celular (proveniente de CaCu) HeLa (American Type Culture Collection), sembrando en cajas petri de cristal de 10 ml (Pirex, USA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), al 10 % de suero neonato de ternera (NCS; Gibco, USA) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera a saturación húmeda. Se permitió la proliferación de los cultivos hasta alrededor de un 70 % de confluencia para realizar los ensayos (Morgan y Darling, 1995).

Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco, USA) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en escindir el tejido en trozos pequeños (5mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.1 %. La cual se lleva a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pirex, USA) de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37 °C en un baño maría durante 15 minutos en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vierte a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. El filtrado se centrifuga (centrifuga; Dinac, USA) por 5 minutos a 70 unidades, se decanta el sobrenadante y el botón celular es cultivado en cajas petri de 5 ml que se mantienen en una incubadora (Nuair, USA) al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante dos días máximo, después de este tiempo de incubación, se realiza el cambio de medio (totalmente), de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continúa así hasta obtener un buen número de células proliferando. En este momento se obtienen poblaciones (fibroblásticas o epiteliales), las cuales son utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitan mantener poblaciones de un solo tipo celular.

Aislamiento y purificación de 12-FAR y rinvanil.

Los análogos de la capsaicina 12-FAR y rinvanil fueron sintetizados en el laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM) tal como se especifica en: Castillo, 2008. Brevemente: se realizó la transesterificación del Aceite de Ricino con KOH al 0.2% en MeOH produciendo Metil Ricinoleato (1). La reacción de 1 con ácido fenilacético y DCC/DMAP produjo a 2

(figura 11). Finalmente la amidación enzimática de 2 con vanillylamina, catalizada por la lipasa B (CaLB) de *Candida antarctica*, nos proporcionó a 12-FAR (5) en un rendimiento global del 70% de aceite de ricino.

En una segunda estrategia sintética, la preparación enzimática de rinvanil (3) se consiguió mediante la amidación de 1 con vanillylamina catalizada por CaLB. La difenilacetilación de 3 con ácido Feniacetico-DCC-DMAP, seguida por una aminolisis región-selectiva con pirrolidina, proporcionó también a 5, pero en un 50% a partir de metil ricinoleato (figura 11).

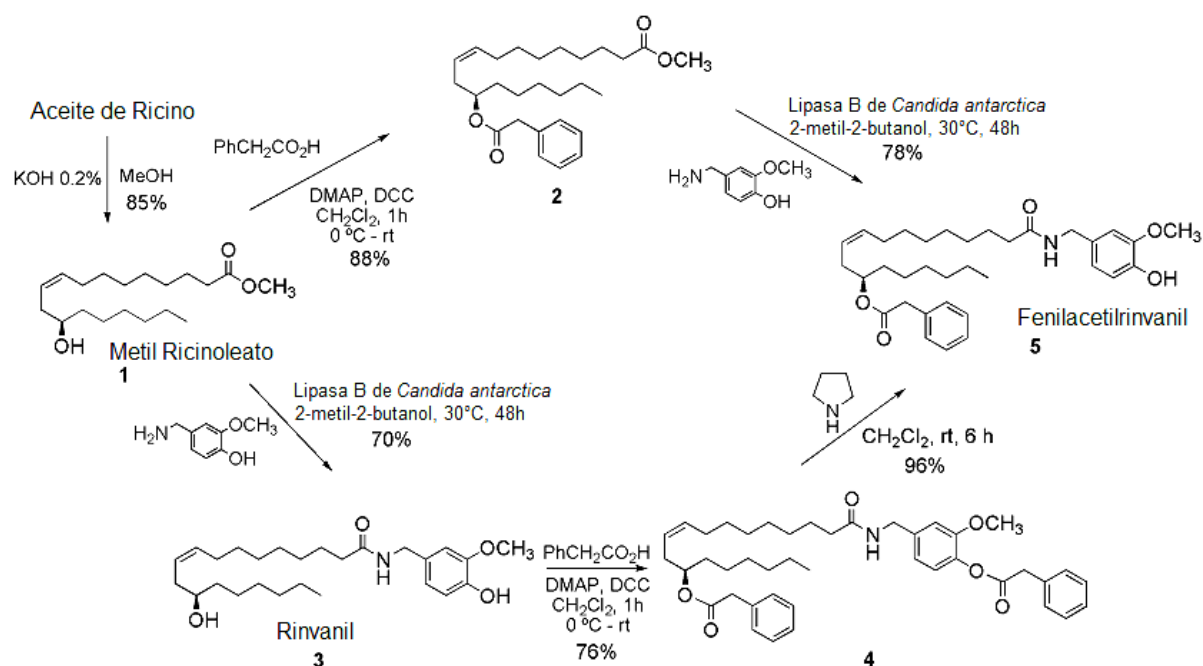


Figura 11. Aislamiento y purificación de la capsaicina y los capsaicinoides 12-FAR y rinvanil. (Modificado de [Castillo et al, 2008](#))

Preparación de los stocks

a) 12- Fenilacetilrinvanil (12-FAR) y rinvanil

A partir de 20 mg de 12- Fenilacetilrinvanil (12-FAR) y 20 mg de rinvanil, se preparó un stock para cada compuesto, diluyéndolos en 500 μ l de acetato de etilo (vehículo), depositando las soluciones en tubos de 500 μ l tipo eppendorf y almacenados bajo refrigeración hasta su utilización.

b) Capsaicina

El stock se preparó tomando 1000 μ g de capsaicina (Sigma-Aldrich, USA) y se diluyeron en 50 μ l de acetato de etilo, depositado en un tubo de 500 μ l tipo eppendorf y almacenado bajo refrigeración hasta su utilización.

Determinación de la proliferación celular por incorporación del colorante cristal violeta

Se cultivaron células de la línea HeLa en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), poniendo por pozo, 7500 células con 100 μ l de RPMI-1640 al 5 % de NCS, por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó compuesto (capsaicina, 12-FAR o rinvanil) diluido en RPMI-1640 al 5 % de NCS a concentraciones desde 25 μ g/ml hasta 200 μ g/ml, y se permitió actuar al compuesto por 24 horas. Además se incluyó un ensayo control-vehículo que contempló 5 μ l de acetato de etilo diluido en RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al término del estímulo con las diferentes concentraciones de los diferentes compuestos se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng, *et al*, 1989. Para ello, a los cultivos tratados se les retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con PBS (Phosphate buffered saline, pH =7.3) durante tres minutos por lavado, posteriormente se dejaron secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante fue solubilizado en ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% en agitación por 20 minutos. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (imagine tecan spectra). En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal y se obtuvo la concentración inhibitoria del 50 % de la población celular (IC_{50}).

Obtención de la IC_{50}

Para calcular las IC_{50} , los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dosis respuesta, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular. A estas curvas se les aplica regresión lineal y es obtenida la ecuación de la recta, de este modo, en base a la ecuación obtenida de la recta, el valor de "Y" se substituye por 50 y el valor de X = IC_{50} . Obteniendo así finalmente el valor de la IC_{50} respectiva.

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

750,000 células de la línea HeLa fueron sembradas en cajas petri de 5 ml (Kimex, USA) con 5 ml de RPMI al 5 % de NCS. Se incubaron por 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente fueron estimuladas con las IC_{50} obtenidas de 12-FAR y Rinvanil y se permitió actuar al compuesto por 24 horas. Consecutivamente al estímulo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con verseno, se centrifugaron y lavaron con PBS. El botón celular fue fijado y resuspendido con 1 ml de una solución 1:1 metanol/PBS, pasados 20 minutos se centrifugó y se lavó con PBS. El botón fue resuspendido con 500 μ l de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron

10 µl de yoduro de propidio (200 mg/l), se mezcló y se protegió de la luz. Para ulteriormente analizar las muestras en un citómetro de flujo (Coulter, USA).

Evaluación de la expresión de la procaspasa-3.

Se sembraron 50 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 300 µl con RPMI al 5 % de NCS y se incubaron por 24 horas. Al término del tiempo, se procedió a estimular con las IC₅₀ de 12 FAR y rinvanil. A continuación, se realizó la detección de la procaspasa-3 por inmunocitoquímica, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 20 minutos, al término de el tiempo las células fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS y a continuación se permearon con Tritón (X-100 0.5 %) durante 5 minutos a 4 °C. Nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y sucesivamente se adicionó el Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-procaspasa 3, 1:100 en PBS (CPP32 Ab4; Lab Vision, USA) durante un periodo de 24 horas en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo de cabra anticonejo con FIT-C (Invitrogen, USA), 1:200 en PBS en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ horas. Posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS, después se aplicó el un fluorocromo afín al ADN (Dapi; Sigma-Aldrich, USA) de manera muy cuidadosa durante 1 minuto. Nuevamente se lavaron las muestras con PBS. Finalmente se montaron las muestras con medio de montaje (Vector Laboratories, USA) y se sellaron con esmalte. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a analizarlas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (Nakon, JAP).

Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de Tunel.

Fueron sembradas 50 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 300 µl con RPMI al 5 % de NCS y se incubaron por 24 horas. Al término, las células fueron fijadas con paraformaldehído (al 2% en PBS) el cual se preparó al momento. Brevemente las células fueron lavadas con PBS y permeadas con Tritón (X-100 al 0.5 %) en PBS, durante 5 minutos a 4° C. Se lavaron con PBS, y se adicionaron inmediatamente 30 µl buffer de equilibrio en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejarlas secar. Se incubaron por 1 hora con enzima Tdt (solución 1:3 enzima/buffer de reacción), en cámara húmeda. Al término del tiempo se detuvo la reacción adicionando buffer de paro (Chemicon international, USA) (1:34 buffer de paro/agua desionizada), por 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Se lavaron con PBS y se incubaron con anti-digoxigenina-rodamina (Chemicon international, USA) (68 µl de solución de bloqueo más 62 µl de anti-digoxigenina) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron los respectivos lavados con PBS en cámara húmeda. Se incubó con Dapi por 1 minuto. A continuación, se lavaron las muestras con PBS en cámara húmeda. Las preparaciones fueron montadas con medio

de montaje, se etiquetaron y guardaron en oscuridad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

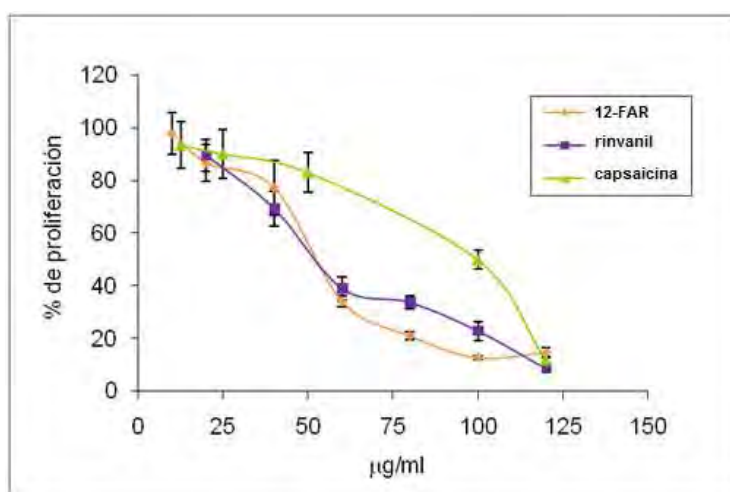
Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les realizaron un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows. Seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

Actualmente, la búsqueda de compuestos antitumorales ha despertado un fuerte interés, sobre todo en aquellos que son de origen biológico y específicamente en los de origen vegetal. En el caso particular de los capsaicinoides, se ha reportado que la capsaicina ha mostrado acción antiproliferativa e inductora de apoptosis sobre células cancerosas de leucemia, de próstata, entre otras. Sin embargo, su empleo o aplicación se encuentra limitada debido a sus características irritantes, generando la necesidad de desarrollar análogos que mantengan su acción biológica sin presentar dichas propiedades negativas. Al respecto, el laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. José Ignacio Regla (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM) recientemente ha sintetizado dos análogos de la capsaicina (12-FAR y rinvanil) que no son irritantes ni picantes. Sin embargo, no se ha determinado si dichos análogos presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis sobre líneas cancerosas.

Con el propósito de evaluar si el 12-FAR y el rinvanil presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, cultivos de la línea tumoral proveniente de CaCu HeLa fueron tratados con diferentes concentraciones de dichos análogos, y además también se determinó el efecto antiproliferativo de capsaicina para comparar la potencia de los compuestos. La concentración a la cual los compuestos inducen un decremento del 50 % en la proliferación celular (IC_{50}) fue calculada (ver material y métodos) (gráfica 1, tabla 2).



Gráfica 1. Efecto antiproliferativo de la capsaicina, 12-FAR y rinvanil, en cultivos de células tumorales HeLa. En cajas de plástico de 96 pozos fueron cultivadas 7×10^5 células con 100 µl RPMI al 5 % de NCS por pozo y estimuladas con las diferentes concentraciones de capsaicina, 12-FAR y Rinvanil a las 24 horas. La proliferación celular fue determinada por la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan por lo menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.

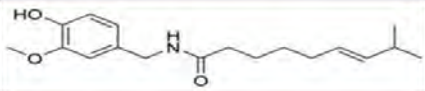


Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	Molécula
capsaicina	100	
rinvanil	62.24	
12-FAR	56.57	

Tabla 2. Determinación de la concentración requerida de capsaicina, 12-FAR o rinvanil que induce un decremento del 50 % en la proliferación celular (IC₅₀) en cultivos de células HeLa. La IC₅₀ fue calculado en base a la ecuación de la recta $y=mx+b$ (ver material y métodos).

Los resultados mostrados en la grafica 2 establecen que el efecto inhibitorio de la capsaicina, 12-FAR y rinvanil depende de la dosis, ya que, conforme se incrementa la concentración, la densidad celular disminuye. En la obtención de las IC₅₀ se obtuvo que, para el caso de la capsaicina el valor es de 100 µg/ml., mientras que para 12-FAR y rinvanil fue de 56.57 y 62.24 µg/ml respectivamente, estableciendo que las células HeLa son más sensibles a los análogos que a la capsaicina, por lo que, de a aquí en adelante solo se realizaron ensayos con 12-Far y rinvanil. Asimismo, con el fin de determinar sí los compuestos analogos ejercen un efecto en la morfología celular, estas mismas células fueron fotografiadas y la forma fue analizada (Figura 12).

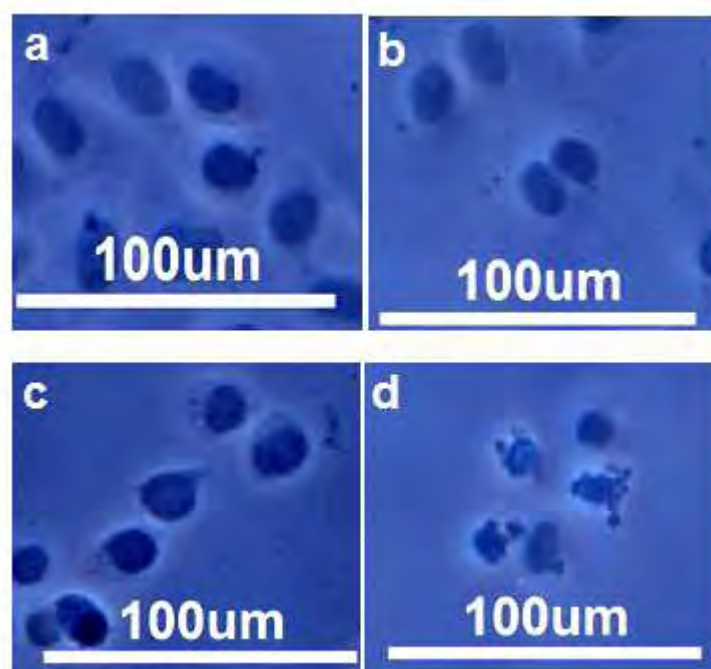
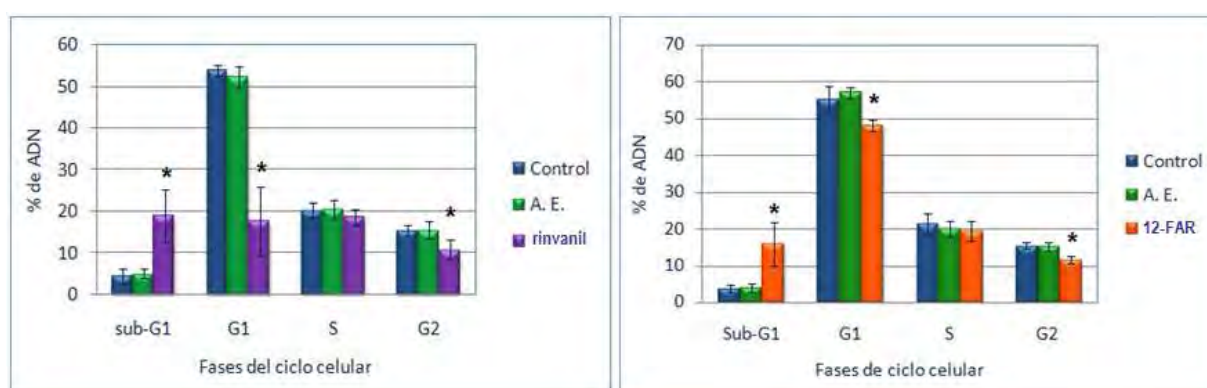


Figura 12. Fotografías tomadas en contraste de fases. Los ensayos se realizaron con cultivos de 500'000 células en cubreobjetos con 300 µl de RPMI al 5 % de NCS y tratados a las 24 horas. Se aprecian células pertenecientes a cultivos control (a), estimulados con acetato de etilo (b), y estimulados con los compuestos 12-FAR (c) y rinvanil (d).

Los resultados establecen que tanto capsaicina así como sus análogos 12-FAR y rinvanil afectan la morfología de las células HeLa, induciendo una reducción en el citoplasma que implica un efecto en la adherencia celular (figura 12c), la formación de núcleos pequeños que denotan compactación de la cromatina (figura 12 c y d), una forma celular redonda u ovoide más que poliédrica (figura 12c), además de la formación de pequeñas vesículas (figura 12d).

Para determinar si la causa del decremento en el número celular observado en los cultivos tratados con los análogos de la capsaicina, 12-FAR y rinvanil (gráfica 1) es debido a la detención en alguna fase del ciclo celular, cultivos de células HeLa fueron tratados con 12-FAR y rinvanil (56.57 y 62.24 $\mu\text{g/ml}$) y la distribución de la cantidad de ADN en las fases G1, S, G2/M y subG1 fue determinada por citometría de flujo (grafica 2, Tabla 2).



Gráfica 2. Efecto de la capsaicina, 12-FAR y rinvanil en las diferentes fases del ciclo celular de células HeLa. Los ensayos se realizaron con cultivos de 750'000 células en cajas petri con 5 ml de RPMI al 5 % de NCS y tratados a las 24 horas con las IC_{50} obtenidas de 12-FAR y Rinvanil. La distribución del ADN en las fases del ciclo celular fue evaluada a través de citometría de flujo. La gráfica representa el promedio de seis eventos independientes. (*. $p < 0.05$ vs A. E., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey)

Los resultados obtenidos indican que 12-FAR y rinvanil inducen un decremento de células en la fase G1 y G2/M, expresando que la población celular se ve afectada en dichas fases. Posteriormente, con el propósito de determinar si las células tratadas con 12-FAR y rinvanil son inducidas a una muerte por apoptosis, nuevamente cultivos de células HeLa fueron tratadas con 56.57 $\mu\text{g/ml}$ de 12-FAR y 62.24 $\mu\text{g/ml}$ de rinvanil, y la observación de cuerpos apoptóticos fue determinada marcando los núcleos con el fluorocromo Dapi, para ser observados en un microscopio de epifluorescencia, como un parámetro que caracteriza a la apoptosis. (Figura 13)

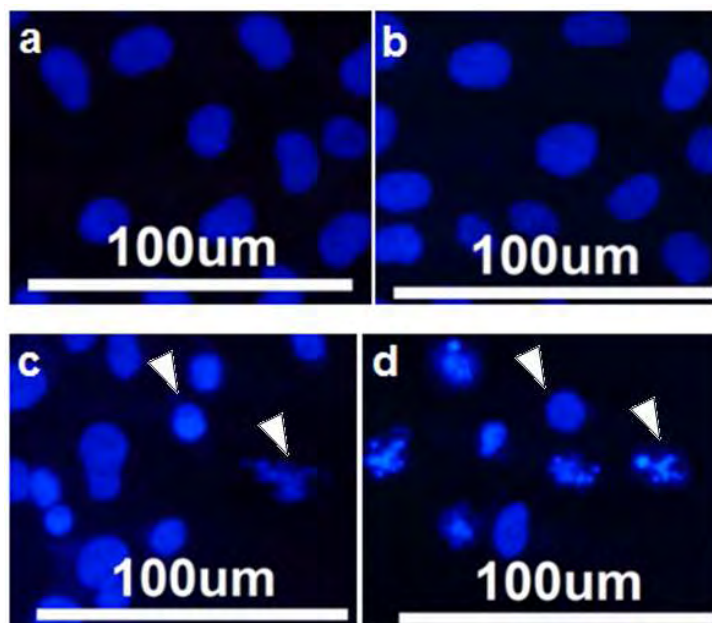


Figura 13. Fotografías tomadas que muestra los núcleos en color azul (marcados con Dapi) de las células en los cultivos. Los ensayos se realizaron con cultivos de 500'000 células en cubreobjetos con 300 µl de RPMI al 5 % de NCS y tratados a las 24 horas. Se muestran fotografías de un cultivo control (a), un tratado con acetato de etilo (b) y tratados con los compuestos 12-FAR (c) y rinvanil (d).

Las fotografías de los cultivos marcados con Dapi revelaron un cambio en la forma de los núcleos de las células tratadas, inducido por los compuestos 12-FAR y rinvanil. Se distinguieron núcleos redondos y compactos (figura 13c), además de formación de cuerpos apoptóticos (figura 13d), ésto es un indicio de que los compuestos conducen a una muerte apoptótica en las células de la línea HeLa; por lo que se realizó una prueba de inmunocitoquímica para la detección de procaspasa-3, la cual contribuiría a ratificar una muerte por apoptosis.

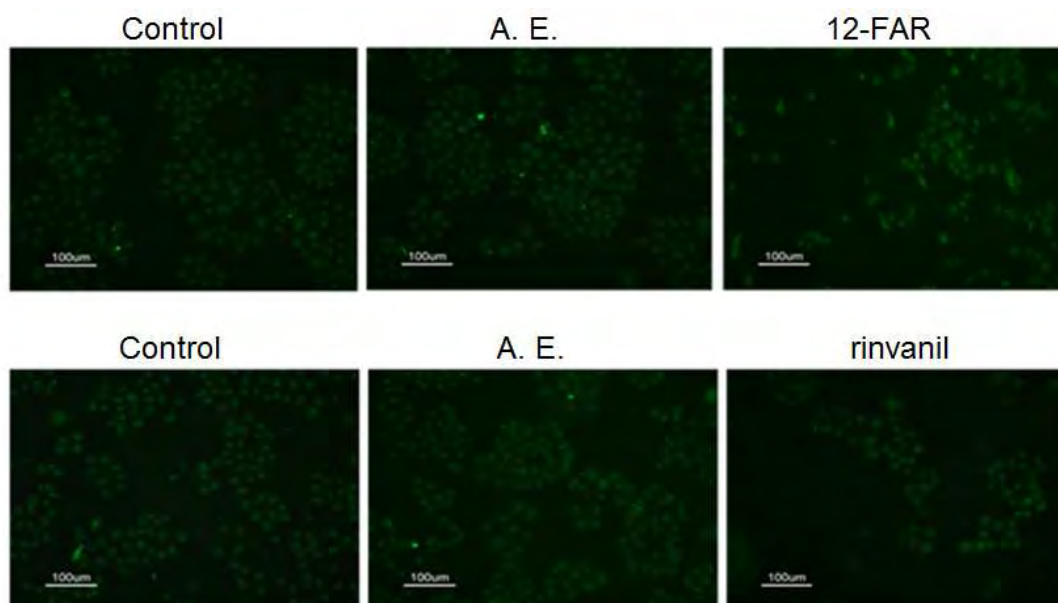
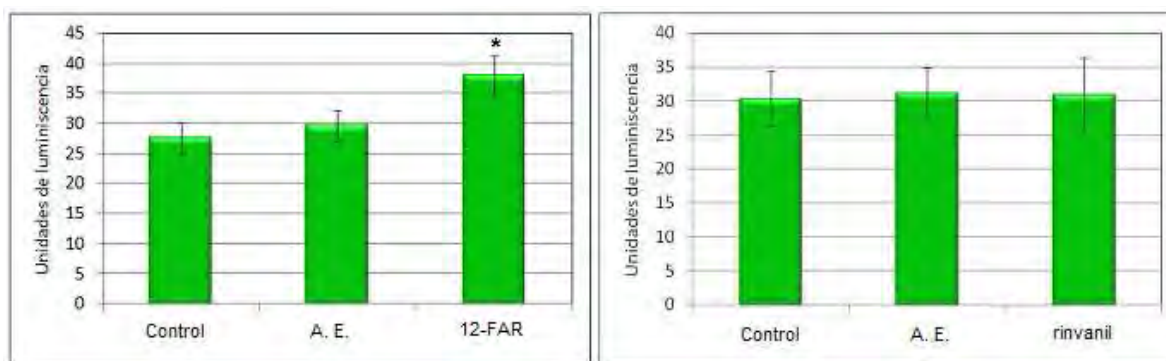


Figura 14. Imágenes tomadas de cultivos sometidos a la técnica de inmunocitoquímica para la detección de procaspasa-3. Los ensayos se realizaron con cultivos de 500'000 células en cubreobjetos con 300 μ l de RPMI al 5 % de NCS y tratados a las 24 horas. La coloración verde indica la presencia de procaspasa-3. En los cultivos Control (superior izquierda), tratados con vehículo (superior centro) y tratados con rinvanil (superior derecha) se observa una cantidad basal de procaspasa-3 en las células, a diferencia del tratado con 12-FAR (inferior derecha), pues muestra un incremento en la expresión de procaspasa-3.

Las fotografías tomadas a los cultivos tratados con 12-FAR respaldan una muerte apoptótica ya que muestra un incremento en la expresión de procaspasa-3 con respecto del control y el vehículo (figura 14). Por otro lado los cultivos tratados con rinvanil no registraron incremento en la expresión en la expresión de procaspasa-3. Para cuantificar la expresión de procaspasa-3 observada, las fotografías (figura 14) se trabajaron en Adobe Photoshop CS2 y se evaluó la luminiscencia de un número mayor a 50 células. Los datos se graficaron y se observó la diferencia en la luminiscencia entre los controles y los tratados. (Grafica 3)



Gráfica 3. Estas graficas se obtuvieron mediante un análisis realizado a las fotografías del ensayo de procaspasa-3 (figura 14). Un aumento en la luminiscencia reflejara un incremento en la expresión de procaspasa-3. (*. $p < 0.05$ vs A. E., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey)

La cuantificación de la expresión de procaspasa-3 guía hacia la probabilidad de una muerte por apoptosis en los cultivos provocada por 12-FAR. Sin embargo, para concluir en una muerte apoptótica aun se requiere de una prueba más que confirme la muerte apoptótica en nuestros cultivos. De este modo, para continuar con la evaluación de la muerte se realizó la prueba de TUNEL para detectar fragmentación de ADN mediante un marcador fluorescente (Rodamina). De igual manera se incluyó un cultivo control, un control-vehículo y los tratados con los compuestos 12-FAR y rinvanil. Se observó la aparición del color rojo en las fotografías (figura 15) lo que indica que los cultivos tratados experimentaron fragmentación de ADN, junto con la visión de siluetas intactas en los núcleos.

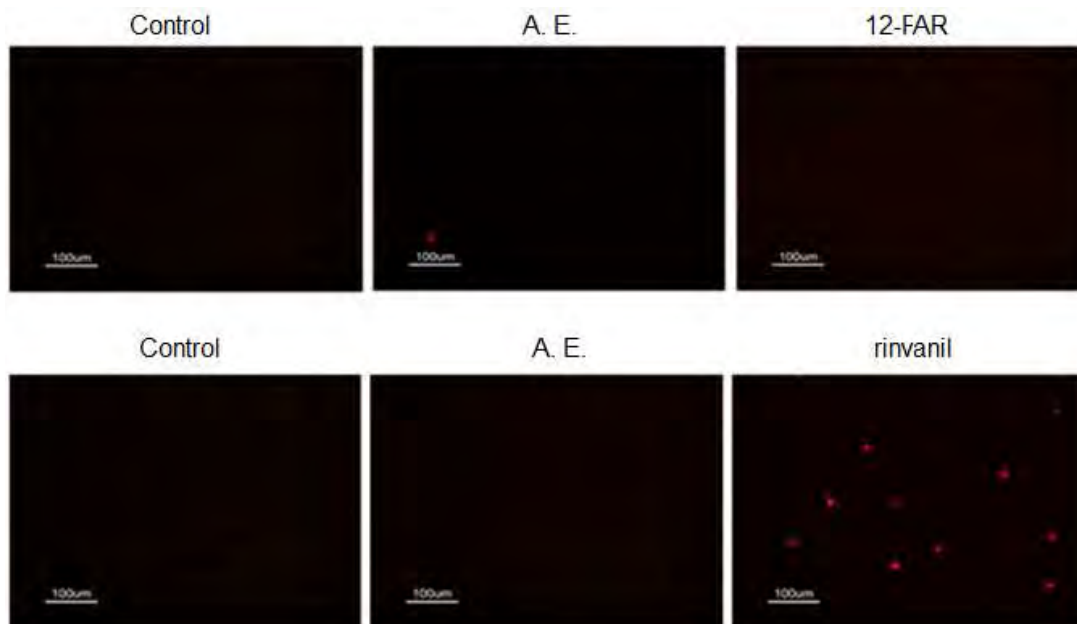
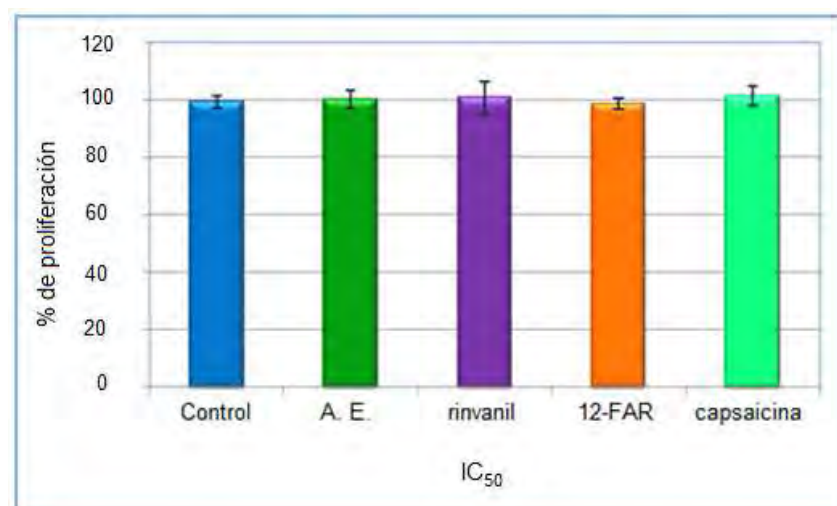


Figura 15. Las imágenes fueron obtenidas de cultivos sometidos a la técnica de TUNEL. La coloración roja indica células con fragmentación de ADN. Los ensayos se realizaron con cultivos de 500'000 células en cubreobjetos con 300 µl de RPMI al 5 % de NCS y tratados a las 24 horas. Como se aprecia, los cultivos tratados con los compuestos 12-FAR y rinvanil presentan una mayor fragmentación de ADN mientras que los cultivos control (control y A. E.) no presenta fragmentación.

Además con el propósito de evaluar si 12-FAR y rinvanil presentan actividad antiproliferativa sobre cultivos de células sanas, cultivos primarios de fibroblastos humanos fueron tratados con las diferentes IC_{50} de dichos análogos, y asimismo, se realizaron ensayos con capsaicina para comparar el efecto citotóxico que se le atribuye con el mostrado por sus análogos. (Gráfica 4)



Gráfica 4. La grafica no muestra efecto inhibitorio de las IC_{50} (tabla. 2) sobre los cultivos de fibroblastos no tumorales. Para el ensayo se sembraron en cajas de 96 pozos, 5'000 células con 100 µl RPMI al 10 % de SFB por pozo y estimuladas con las diferentes concentraciones de capsaicina, 12-FAR y rinvanil a las 48 horas. ($p > 0.05$ vs A. E. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey)

La gráfica 4 muestra que capsaicina y sus análogos no afectaron el potencial proliferativo de fibroblastos humanos de cuello uterino, pues no se observa una diferencia en el número celular entre los cultivos tratados y los controles (Control y A. E.)

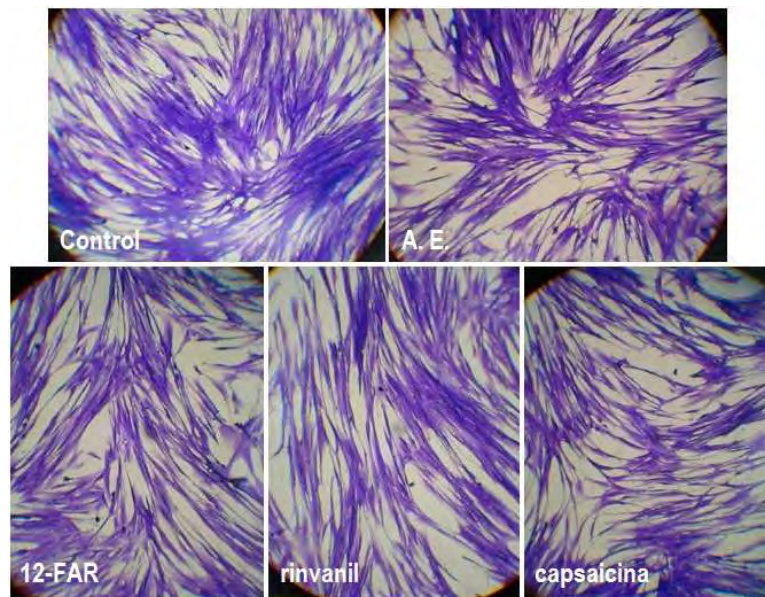


Figura 16. Las fotografías muestran cultivos de fibroblastos (teñidos con cristal violeta) tratados con las IC_{50} (tabla, 2). Para el ensayo se sembraron en cajas de 96 pozos, 5'000 células con 100 μ l RPMI al 10 % de SFB por pozo y estimuladas con las diferentes concentraciones de capsaicina, 12-FAR y rinvanil a las 48 horas. Se aprecia que no existe un efecto evidente de los compuestos sobre la apariencia de las células.

Finalmente y con la intención de observar algún efecto en la morfología se fotografiaron los cultivos tratados de fibroblastos no tumorales. Los resultados indican que las células fibroblásticas sanas no son afectadas en su morfología por alguna de las concentraciones (IC_{50}) obtenidas para capsaicina, 12-FAR y rinvanil.

DISCUSIÓN

A lo largo de la historia, la humanidad ha usado a las plantas como parte fundamental de su dieta. Sin embargo, no sólo se ha explorado su papel como producto alimenticio, sino que actualmente se desean encontrar compuestos bioactivos con propiedades quimioterapéuticas o quimiopreventivas que puedan inhibir el proceso oncogénico. Por ejemplo, se ha reportado que los capsaicinoides (Zhang *et al*, 2003), lactonas (Ornelas, 2009), flavonoides (Hernández, 2004) y otros compuestos naturales han mostrado inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer. Entre los compuestos que despiertan mayor interés, tenemos a la capsaicina, por los resultados que ha mostrado frente a líneas celulares de cáncer gástrico, leucemia, cáncer de hígado, entre otras. Sin embargo, pese a sus excelentes aplicaciones farmacológicas (Young-Joon, 2002), su uso está restringido a efectos secundarios inherentes e indeseables, como una fuerte irritabilidad, hiperalgesia (Castillo *et al*, 2008), y difícil manejo, lo que generó la necesidad de desarrollar moléculas análogas.

Aunque hay una gran variedad de análogos de la capsaicina, se trabajó con 12-FAR y rinvanil, porque éstos carecen de pungencia, son de fácil manejo y con mayor afinidad al receptor TRPV1 que la capsaicina (Castillo *et al*, 2008), además de no haber registros del efecto de estos compuestos sobre líneas celulares de cáncer y específicamente de CaCu.

Nuestros resultados, muestran que los análogos de la capsaicina 12-FAR y rinvanil presentan una mayor actividad antiproliferativa ya que requieren de menor cantidad que la capsaicina para observar el mismo efecto, implicando que los cambios estructurales generados en el 12-FAR y el rinvanil, afectaron la actividad antiproliferativa presente en los análogos, haciendo de rinvanil 1.5 veces más potente y 1.9 veces más potente al 12-FAR con respecto a la capsaicina en la línea tumoral HeLa. Sería conveniente en un futuro cercano, probar a la capsaicina y a sus análogos 12-FAR y rinvanil en más líneas tumorales de CaCu, para confirmar y generalizar su efecto antiproliferativo en líneas de CaCu. De igual manera, convendría determinar si la capsaicina y sus análogos 12-FAR y rinvanil afectan sólo a líneas celulares provenientes de CaCu infectadas con el VPH tipo 18, como es el caso de las células HeLa o existe un efecto diferencial o específico asociado al tipo de VPH.

Por otro lado, con respecto al efecto de la capsaicina en el ciclo celular, se conoce que la capsaicina en células leucémicas (Zang *et al*, 2003), en carcinoma de esófago (Chih-Chung *et al*, 2006) y en células de mieloma (Bhutani *et al*, 2006), induce una detención del ciclo en la fase G1. Sin embargo, el 12-FAR y el rinvanil inducen un decremento en las células HeLa que se encuentran en G1 y G2 con un subsiguiente incremento en la fase subG1, que sugiere que ambos análogos inducen a las células HeLa a salir de la fase G1 y G2 para inducirlas a una muerte celular. No obstante el efecto observado por los análogos 12-FAR y rinvanil en el ciclo celular, se conoce que la capsaicina induce una muerte por apoptosis en células leucémicas y en la línea celular epitelial de próstata PC-3 (Sánchez *et al*, 2007), que coincide con el efecto del 12-FAR, el

cual induce a las células HeLa a una muerte por apoptosis, como lo indica el incremento en la expresión de la procaspasa-3, la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN. Sin embargo, el rinvanil no indujo un incremento en la expresión de la procaspasa-3, pero sí indujo la formación de cuerpos apoptóticos así como la fragmentación del ADN, sugiriendo que el rinvanil también induce a las células HeLa a una muerte por apoptosis sin la participación de la procaspasa-3 o podría ser que la procaspasa-3 en estas condiciones esté convertida en su totalidad a caspasa 3 activa, por lo que sería conveniente determinar si el rinvanil induce la activación de la caspasa 3, para confirmar o descartar la participación de esta caspasa.

Ya que se ha publicado que la capsaicina provoca daño tanto a células no tumorales como a líneas tumorales (Reilly *et al*, 2003), decidimos observar si la capsaicina o sus análogos provocan un efecto inhibitorio sobre cultivos de células no tumorales de cérvix uterino. Para lo que elegimos como modelo a células fibroblásticas de cérvix debido a que son células con ciertas características semejantes a las líneas tumorales de cérvix y provienen de la misma región afectada (cuello del útero). Los resultados permiten observar que las IC₅₀ obtenidas de los compuestos 12-FAR y rinvanil no afectan los cultivos de células sanas. Esto nos indica que la línea HeLa es más sensible a estos compuestos que las células no tumorales, pero de igual manera es conveniente probar estos compuesto con más cultivos de células no tumorales y de diferentes tipos celulares.

CONCLUSIONES

- Los compuestos 12-FAR y rinvanil reducen la densidad celular en un 50% a una concentración de 56.57 mg/ml y 62.24 mg/ml respectivamente.
- 12-FAR y rinvanil inducen una disminución de la población celular en fase G1 y G2.
- 12-FAR y rinvanil inducen muerte por apoptosis en la línea celular HeLa.
- 12-FAR y rinvanil no afectan el potencial proliferativo de células (fibroblastos) no tumorales de cérvix.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y P. Walter. 2006. Introducción a la biología celular: Cáncer, 2 Ed. Editorial Panamericana, Madrid. Pp: 726-736.
2. Alemán E. M. 2007. Boletín de información científica para el cuidado en enfermería. Secretaria de Salud. Pp: 1-6.
3. Appendino G., De Petrocellis L., Trevisani M., Minassi A., Daddario N., Moriello A. S., Gazzieri D., Ligresti A., Campi B., Fontana G., Pinna C., Geppetti P. y V. Di Marzo. 2005b. Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels, and its therapeutic potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 312: 561–570.
4. Appendino G., Minassi A. y Nives D. 2005a. Hot cuisine as a source of anti-inflammatory drugs. *Phytochem Reviews*; 4: 3-10.
5. Appendino G., Minassi A., Morello A., De Petrocellis L. y V. Di Marzo. 2002. N-acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*; 45: 3739-3745.
6. Becker W., Kleinsmith L. y J. Hardin. 2007. El mundo de la célula: Celulas cancerosas, 2 Ed. Pearson, Madrid. Pp: 833-869.
7. Beutner K., y S. Tyring. 1997. Human papillomavirus. *American Journal of Medicine*; 102: 9-15.
8. Bhutani M., Pathak A., Sethi G. y B. Aggarwal. 2006. Capsaicin induces G1/S cell cycle arrest leading to apoptosis of multiple myeloma cells through suppression of STAT3 activation and STAT3-regulated gene products. *Journal of Clinical Oncology. Abstrac*; 24
9. Bousarghin L., Touzé A., Sizaret P. y P. Coursaget. 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology*; 77: 3846-50.
10. Cansino D. 2007. Efecto antiproliferativo y apoptótico de la lactona schkuhriolida en células provenientes de cáncer cérvico-uterino CasKi. *Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.*
11. Castillo E., Regla I., Demare P., Luviano A. y A. López. 2008. Efficient chemoenzymatic Synthesis de phenylacetylirvanil: An ultrapotent capsaicinoid. *Synlet*; 18: 2869-2873.
12. Caterina M. y D. Julius. 2001. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*; 24: 487–517.
13. Chih-Chung W., Jing-Pin L., Jai-Sing Y., Su-Tze C., Ssu-Ching C., Yuh-Tzy L., Hui-Lu L. y C. Jing-Gung. 2006. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutation Research*; 601:71-82.
14. Chow J., Norng M., Zhang J., y J. Chai. 2007. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells-mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1773:565-576.
15. Cohen G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*; 326:1-16
16. Coto C. 2007. Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. *Química Viva*; 1:9-16.

17. Curtis H. y N. Barnes. 2005. *Biología*, 6° ed. Editorial Medica Panamericana, México DF. Pp: 1491
18. De Villiers E. 2003. Relationship between steroid hormone contraceptives and hpv, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *International Journal of Cancer*; 103: 705–708.
19. Díaz L., Chiong M., Quest A., Lavandero S. y A. Stutzin. 2005. Mechanisms of cell death: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Cell Death and Differentiation*; 12:1449–1456
20. Farber E. 1984. The multistep nature of cancer development. *Cancer Research*; 44:4217–4223.
21. Fink S. y T. Cookson. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*; 4:1907–1916.
22. Frattini M., Lim H. y L. Laimins. 1996. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Microbiology*; 93: 3062-7.
23. Garnett T. y P. Duerksen. 2006. Modulation of Apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *National Institute of Health*; 151: 2321–2335.
24. Garrett M. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science*; 81: 515-522.
25. Gasi3n J., Pontones J., Vera C., Jim3nez J. y M. Ozonas. 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los f3rmacos de uso intravesical en el c3ncer superficial de vejiga. *Actas Urol3gicas Espa3olas*; 29: 846-859.
26. Gey G., Coffman W. y M. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*; 12:264.
27. Giroglou T., Florin L., Sch3fer F., Streeck R. y M. Sapp. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*; 75: 1565-70.
28. Han P., McDonald H., Bianchi B., Kouhen R., Vos M., Jarvis M., Faltynek C., y R. Moreland. 2007. Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochemical Pharmacology*. 73:1635-1645.
29. Harvey A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. 5: 294-300.
30. Hern3ndez M. y M. R3os. 1999. Oncogenes y c3ncer. *Revista Cubana de Oncolog3a*; 15:131-9.
31. Hern3ndez V. 2004. Determinaci3n de la actividad antitumoral del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavonona y la de su derivado 5"-hidroxi-7,8-(6",6"-dimetilcromano) de la glabranina, sobre la proliferaci3n de c3lulas provenientes de c3ncer c3rvico-uterino VPH-18: CaLo, HeLa e InBl. *Bi3logo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM*.
32. Instituto Nacional de Estadística, Geograf3a e Inform3tica. 2008. Estadísticas a prop3sito del d3a mundial del c3ncer: datos nacionales. México DF. Consultada el 12 de abril de 2009. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2676&ep=8>
33. Jacobson M., Weil M. y M. Raff. 1997. Programed cell deat in animal development. *Cell*; 88: 347-354.
34. James H., Averette H. y R. Richart. 1984. Dysplasia, Carcinoma in Situ, and Early Invasive Cervical Carcinoma. *Cancer Journals for Clinicians*; 34: 306-327.
35. Karp G. 1996. *Biolog3a celular*, 2 ed. Mc Graw Hill, México DF. Pp: 950
36. Kueng W., silver E. y V. Eppenverg. 1989. Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical*. Pp: 186.
37. Kumiko S. y W. Earnshaw. 2005. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 6: 677-688.

38. Lacruz C., Di Martino B. y E. Álvarez. 2003. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (VPH) en las lesiones escamosas del cérvix uterino. *Revista Española de Patología*; 36: 79-84.
39. Lance A., Stetler W. y P. Steeg. 1991. Metastasis suppressor genes en: *Important advances in Oncology 1991*. Lippincott Company, Philadelphia . Pp 85-100
40. Lewis M. 2004. Análisis de la Situación del cáncer cérvico-Uterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C. Pp: 32.
41. Li F., Tiede B., Massagué J. y Y. Kang. 2007. Beyond tumorigenesis: Cancer stem cells in metastasis. *Cell Research*; 17: 3-14
42. Longworth M. y L. Laimins. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 68: 362-72.
43. Man S. 1998. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Molecular Medicine*; 1: 1-19.
44. Man S. 1998. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Molecular Medicine*; 1:1-19.
45. Masters J. y B. Palsson. 1999. *Human cell culture volumen 2: cancer cell lines part 2*. Kluwer Academic Publishers, London. Pp376.
46. Mezquita C. 1995. Oncogenes y genes supresores: Mecanismos de la apoptosis. *Medica Clinica*; 105: 389-395.
47. Moore T., Moore A., Carrasco D., Straten M., Arany I., Au W. y S. Tyring. 2001. Human papillomavirus, smoking, and cancer. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*; 5:323–328
48. Morgan S. y C. Darling. 1995. *Cultivo de células animales*. Acribia, Zaragoza. Pp: 159.
49. Muñoz N. y X. Bosch. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica México*; 39:174-282.
50. Muñoz N., Bosch F., De Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K., Snijders P., and Meijer C. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*; 348:518-527.
51. Murray A. y T. Hunt. 1993. *The cell cycle: an introduction*. Oxford University Press, New York. Pp: 251.
52. Nelson D. y M. Cox. 2008. *Lehninger: Principles of biochemistry*, 5 Ed. Freeman and Company, New York. Pp: 1119.
53. Ornelas C. 2009. Determinación del efecto antiproliferativo de la lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) en la proliferación, ciclo celular e inducción de la apoptosis sobre líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino. *Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM*.
54. Pardo F. 1998. *Anatomía patología general y especial de las neoplasias*. Editorial Científico-Médico, España. Pp: 335.
55. Peralta O., Bahena M., Diaz C. y V. Madrid. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública México*. 39: 451-452
56. Phaik-Leng C. y L. Lai-Meng. 1999. Carcinoma of the uterine cervix: A review of its pathology and commentary on the problem in Malaysians. *Malaysian Journal Purhology*; 21: 1-15.
57. Putcha V., Harris C., Moulder K., Easton R., Thompson B., y E. Johnson. 2002. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice Girish. *The Journal of Cell Biology*; 3:441–453.

58. Qiao S., Li W., Tsubouchi R., Haneda M., Murakami K. y M. Yoshino. 2005. Involvement of peroxyinitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosciency. Research*; 51:175–183.
59. Reilly C., Taylor J., Lanza D., Carr B., Crouch D. y G. Yost. 2003. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicological Sciences*; 73: 170–181.
60. Rivera Z., Delgado D., Painel P., Barrero P. y H. Larraín. 2006. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*; 71:135-140.
61. Salazar L. y C. Silva. 2004. Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biologia Scripta*; 1: 7-14.
62. Sánchez A., Malagarie S., Vara N., Chiloeches A. é I. Díaz. 2007. Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*; 12:2013–2024.
63. Sánchez V. y J. Trigo. 2001. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*; 20:266-274.
64. Serman F., 2002. Cáncer cérvico-uterino: epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano, perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*; 67:318-323.
65. Studzinski G. 1995. Cell growth and apoptosis: A practical Approach. Oxford University Press, New York. Pp: 144, 145.
66. Surh Y. y S. Lee. 1996. Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chemical Toxicology*; 34:313-6.
67. Szallasi A. y P. Blumberg. 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*; 51:159–212.
68. Thibodeau G. y K. Patton. 2008. Estructura y función del cuerpo humano, 13 ed. Harcourt Brace, Madrid. Pp: 553.
69. Ting-Jun F., Li-Hui H., Ri-Shan C., y L. Jin. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*; 37: 719–727.
70. Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F. y G. Borges. 2005. Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública México*; 47:342-350.
71. U.S. Department Of Health And Human Services, National Institute of General Medical Sciences. 2005. inside the cell. National Institutes of Health Publication; No. 05-1051. Pp: 84.
72. Wai L. 2004. Telomeres, telomerase and tumorigenesis. A review. *Medscape General Medicine*; 6: 19.
73. Walboomers J., Jacobs M., Manos M., Bosch F., Kummer J. y K. Shah. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal Pathology*; 189:12-9.
74. Weigelt B., Peterse J. y L. van't Veer. 2005. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nature Reviews Cancer*; 5:591-602.
75. Weinberg R. 1989. Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*; 49:3713-3721.
76. Winter J., Bevan S. y E. Campbell. 1995. Capsaicin and pain mechanism. *British Journal of anaesthesia*; 75: 157-168.
77. Young-Joon S. 2002. More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*; 94: 1263-1265.

78. Young-Joon S. y S. Lee. 1995. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sciences*; 22:1845-1855
79. Zhang J., Nagasaki M., Tanaka Y. y S. Morikawa. 2003 .Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia Reseach*; 27:275-83.
80. Zhaoyu J. y W. El-Deiry. 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*; 4:139-163.

ABREVIATURAS USADAS

12-Far	12-Fenilacetilrinvanil
A. E.	Acetato de etilo
ADN	Acido desoxirribonucleico
Apaf-1	(del ingles) Apoptosis protease-activating factor-1
ATP	Adenosín trifosfato
Bax	(del ingles) Bcl-2–associated X protein
Bcl-2	(del ingles) B cell leukemia 2
Bim	(del ingles) BCL-2-interacting mediator of cell death
Bin	(del ingles) BCL-2 interacting domain
Cacu	Cáncer cérvico-uterino
Cdk	(del ingles) Cyclin-dependent kinases
CIP	(del ingles) Cdk-interacting protein
DAPI	(del ingles) 4',6-diamidino-2-phenylindole
FADD	(del ingles) Fas-associated protein with death domain
FasL	(del ingles) Fas ligand
Fit-C	(del ingles) Fluorescein isothiocyanate
FLIP	(del ingles) FLICE-like inhibitor protein
IAPs	(del ingles) Inhibitors of apoptosis
IC ₅₀	(del ingles) Inivitor concentration (50%)
KIP	(del ingles) Kinase inhibitor protein
PBS	(del ingles) Phopate buphered saline
Puma	(del ingles) p53 up-regulated modulator of apoptosis
RPMI	(del ingles) Roswell park memorial institute
SCN	Suero neonato de ternera
SFB	Suero fetal bobino
Tdt	Deoxinucleotidil transferasa
TNF	(del ingles) Tumor necrosis factor
TRAIL	(del ingles) TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRPV1	(del ingles) Transient receptor potential vaniloid tipe 1
VPH	Virus del papiloma humano

APÈNDICE

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

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

Aminoácidos

L- arginina	0.200000
L-aspargina	0.050000
L-ácido aspárgico	0.200000
L-cisteina 2HCL	0.065200
L-ácido glutâmico	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-inositol	0.035000
Niacinamida	0.001000
Ácido-p-Amino Benzoico	0.001000
Ácido – D- pantoténico	0.000250
Piridoxina HCL	0.001000
Riboflavina	0.000200
Tiamina 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 utilizan las siguientes sustancias:

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

Los reactivos se disuelven en 800 ml. de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 M 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 a 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	0.10 g(sigma chemical U.S.A)
Cloruro de calcio	0.10 g (sigma chemical U.S.A)

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

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 8 N 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 micras, la solución se almacena a 4 °C 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 500 ml 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 50 ml. para su mejor uso y manipulación.