



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACION EXPERIMENTAL
ZARAGOZA (UMIEZ) LAB 2, P.B.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÁNCER

**“Efecto de la lactona Arglanina sobre el potencial proliferativo
Y ciclo celular de células tumorales de cérvix humano
(ViBo, CaLo y CaSki)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

CARMINA ORTEGA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C Luis Sánchez Sánchez por haberme dirigido y apoyado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Maria Luisa Escobar por su ayuda y disponibilidad para la enseñanza de las técnicas realizadas en el trabajo.

Al M. en C. Arturo Cano flores por proporcionar la lactona con la cual se trabajo.

A los miembros del Jurado

Dr. Benny Weiss Steider.
M. en C. Luis Sánchez Sánchez.
M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores
Biól. Ana Laura Maldonado Tena.
M. en C. Hugo López Muños.

Por sus comentarios y sugerencias durante la revisión que permitieron el enriquecimiento en la realización de este trabajo.

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

Al Biól. José Misael Vicente Hernández Vásquez y al M. en C. Hugo López Muños por compartir sus conocimientos siempre con el fin de que mejoremos como estudiantes pero mucho más como seres humanos pensantes.

A la Dr. Maria Cristina Velasquillo por permitirme aprender en su equipo de trabajo en el Instituto Nacional de Rehabilitación durante la realización del servicio social.

A Carlos Landa Solís, Ricardo Gómez García y Valentín Martínez López por el apoyo brindado durante mi estancia en el I.N.R. y el gran apoyo brindado para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA.

A Dios porque pensar en él es tener fe en que cosas maravillosas aun pueden ocurrir. Gracias te doy Señor por la vida y el amor, por las flores, el aire y el sol, por la alegría y el dolor, por cuanto fue posible y por lo que no pudo ser. Te ofrezco cuanto hice durante mi formación académica, el trabajo que pude realizar y las cosas que pasaron por mis manos y lo que con ellas pude construir.

A mis padres que con su esfuerzo y sacrificios realizado día con día, me demostraron su amor y cariño brindándome la mejor herencia del mundo "educación".

A mis hermanos que con pequeños detalles me brindaron siempre ayuda incondicional.

A todas las personas que en algún momento durante la carrera rieron, compartieron y lloraron conmigo pero más a aquellos que en momentos difíciles tuvieron una palabra de aliento. Gracias amigos: Soledad, Edmundo, Dulce, Nayeli, Sergio, Marco, Elvia, Lupita.

Al Tae Kwo Do y a quienes con ello hicieron posible un logro más en mi vida. Al profesor Miguel Ángel Reyes Juárez y al Sabonny Federico Arceo García gracias de todo corazón.

A Julio mi novio por tenderme la mano incondicionalmente, por escuchar, por sus detalles y el amor recibido y con ello ayudarme a entender que en la vida podemos perder el camino pero lo importante es recuperar el destino con dignidad; aprendiendo ...siempre aprendiendo.

A las personitas que se que siempre elevaron una oración por mi. Mi tía Lupita y mi tía Quinti. Si las escucho!!!

Y a la vida por ponerme donde estoy, por ser lo que soy, y por crecer como ser humano, con el ejemplo de grandes personas que se encuentran en el camino recorrido.

Y en el camino por recorrer pido permitirme enseñar lo poco que sé y aprender lo mucho que no se, a disfrutar mucho las cosas buenas pero aprender más de las no tan buenas.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEORICO.....	4
LA CÉLULA.....	4
PROLIFERACIÓN CELULAR.....	5
CICLO CELULAR.....	6
• Reguladores del ciclo celular.....	10
MUERTE CELULAR.....	12
• Apoptosis.....	13
• Necrosis.....	14
• Caspasas.....	15
• Ruta de activación de caspasas.....	15
• Vía Extrínseca.....	15
• Vía Intrínseca o mitocondrial.....	16
CÁNCER.....	18
CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.....	22
• Factores de riesgo.....	23
• Tratamientos del cáncer cérvico-uterino.....	25
LACTONAS.....	29
• Arglanina.....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPOTESIS.....	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
METODOLOGÍA.....	36
• Cultivo de células tumorales.....	36
• Preparación del Stock de la lactona Arglanina.....	36

• Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación de colorante cristal violeta.....	36
• Determinación de la IC ₅₀ matemática.....	38
• Evaluación del efecto de la lactona Arglanina en el ciclo celular.....	37
• Evaluación de la procaspasa-3.....	38
• Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL en cultivos celulares.....	39
• Procedimiento para la obtención de cultivos primarios de células de cérvix humano.....	40
• Análisis estadístico.....	41
RESULTADOS.....	42
ANALISIS DE RESULTADOS.....	51
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
ANEXO.....	62
APÉNDICE.....	65

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino en la actualidad es considerado como un problema de salud pública importante, ya que es el segundo cáncer más común en mujeres mexicanas solo después del cáncer de mama (INEGI 2009). Dentro de las estrategias de prevención y tratamiento del cáncer se ha contemplado la valoración de compuestos de origen vegetal, entre este grupo de compuestos destacan las lactonas a las cuales se les ha atribuido diversas actividades como: antiinflamatorias, antivirales y antitumorales (Robles *et al.*, 1995). En el caso de las lactonas sesquiterpénicas se ha documentado su gran potencial en la intervención de procesos claves en células tumorales, tales como, ciclo celular y muerte por apoptosis entre otros (Siyuan *et al.*, 2005). En el presente trabajo se realizó una evaluación de la actividad antitumoral de la lactona Arglanina, sobre cultivos *In Vitro* de las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino positivas al virus del papiloma humano tipo 16, 18 (CaSki, CaLo) y negativas al HPV (ViBo). Los resultados mostraron que la lactona Arglanina disminuye el número celular en un 50% (IC_{50}) cuando los cultivos son tratados con las concentraciones de 5.05, 5.49 y 9.4 g/ml en células CaSki, CaLo y ViBo respectivamente. La disminución del número celular observada para las células CaSki, CaLo y ViBo fue debido a una detención en la fase del ciclo celular G2/M como lo demostró el análisis de distribución del ADN en cada una de las fases del ciclo, evaluado por citometría de flujo. Sin embargo, Arglanina no induce la expresión de la procaspasa-3 y la fragmentación de ADN en las líneas tumorales CaLo, CaSki y ViBo a las 24 h. descartando una muerte por apoptosis durante este tiempo. De igual forma, al tratar cultivos de fibroblastos de cérvix humano con las concentraciones de IC_{50} , sólo se ve afectado un 10 % con la concentración más alta utilizada. Generando en esta lactona un posible potencial citostático con la posibilidad de ser estudiada para su aplicación como un agente con potencial terapéutico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado como un crecimiento no controlado y desordenado de las células, que puede afectar a casi cualquier tejido del cuerpo humano. Según la organización mundial de la salud, se estima que en el mundo existen más de 11 millones de personas con diagnósticos de cáncer al año y habrá 16 millones de casos nuevos para el año 2020 (INEGI 2007). El cáncer causa 7 millones de muertes cada año, es decir 12.5% de la población mundial muere por esta causa. A nivel nacional, el cáncer en 2007 representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35 303 defunciones (15.4%) (INEGI 2009).

Con respecto al cáncer cérvico-uterino (CaCu), existen cerca de 490 mil casos reportados cada año en el mundo, 80% de estos casos son en países en desarrollo. En México es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres con un 14.0 por cada 100 000 habitantes (Castellanos, 2003).

Dentro de los diferentes factores que aumentan el riesgo de contraer cáncer cérvico-uterino destaca la infección con el virus del papiloma humano (HPV) asociado en un 97.9% de los casos con la infección y en particular los tipos 16 y 18 acumulan un 70% de los casos, siendo estos los más agresivos. El resto está representado por los tipos 31, 45 y sólo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cérvico-uterino es negativo al HPV (Teja *et al.*, 1996).

En nuestro país se han logrado avances significativos en esta área, en un esfuerzo conjunto con diversas instituciones, sin embargo, aun no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana. Es por esto que en los últimos años se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos se encuentran las lactonas sesquiterpénicas (SLs); las cuales son un grupo grande y diverso de productos naturales presentes en más de 100 familias de plantas con flores. Entre ellos, el mayor número de SLs derivan de la familia Asteraceae (*Compositae*), con más de 3,000 estructuras descritas (Scotti *et al.*, 2007).

Algunos como *Árnica montana*, *Artemisia annua* y *Tanacetum Parthenium* contienen lactonas sesquiterpénicas como el principal componente activo. Dichas lactonas son compuestos cíclicos que poseen al menos un anillo de γ -lactona que tiene involucrado un grupo carbonilo y un oxígeno. Las acciones farmacológicas descritas para las lactonas incluyen efectos antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorias y antitumorales. Se tienen reportes de que algunas de estas estructuras ya han sido probadas en líneas celulares de cáncer de mama, hígado, colon, piel, teniendo un efecto antiproliferativo y en algunos casos apoptótico (Siyuan *et al.*, 2005), sin embargo son pocos los datos sobre la actividad de estos compuestos en líneas provenientes de carcinoma de cérvix teniendo reportes de la línea celular SiHa con un efecto antiproliferativo al exponerla a la lactona partenolida (Wu *et al.*, 2006).

MARCO TEORICO

LA CÉLULA

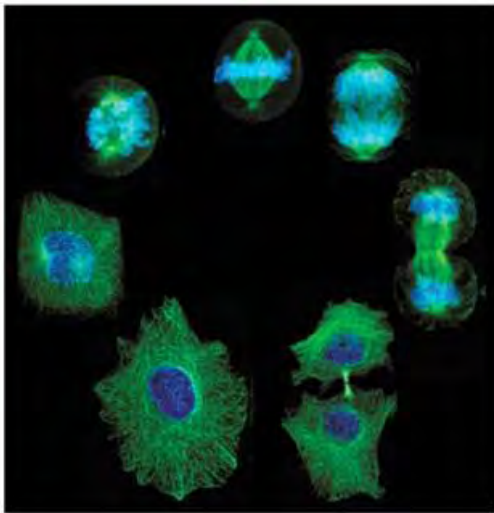
Una célula es la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. La teoría celular, propuesta en 1839 por Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann, postula que todos los organismos están compuestos por células, y que todas las células derivan de otras precedentes. De este modo, todas las funciones vitales emanan de la maquinaria celular y de la interacción entre células adyacentes; además, la tenencia de la información genética, base de la herencia, en su ADN permite la transmisión de aquella de generación en generación (Becker *et al.*, 2007). De hecho, la célula es el elemento de menor tamaño que puede considerarse vivo. La estructura se automantiene activamente mediante el metabolismo, asegurándose la coordinación de todos los elementos celulares y su perpetuación por replicación a través de un genoma codificado por ácidos nucleicos (Tavassoli, 1980).

De este modo, puede clasificarse a los organismos vivos según el número celular que posean: si sólo tienen una sola célula, se les denomina unicelulares (como pueden ser los protozoos o las bacterias, organismos microscópicos); si poseen más de una célula, se les llama pluricelulares. En estos últimos el número de células es variable: de unos pocos cientos, como en algunos nemátodos, a cientos de billones (10^{14}), como en el caso del ser humano. Las células suelen poseer un tamaño de 10 μm y una masa de 1 ng, si bien existen células mucho mayores. En este tipo de organismos las células guardan una estrecha interrelación entre sí, organizándose en una estructura jerarquizada y colaborando para mantener un estado de homeostasis en donde las condiciones de un ambiente relativamente constante son sostenidas para sobrevivir. Sin embargo, cada uno de los diferentes linajes de células que conforman al organismo tiene un micro ambiente particular en el cual se reúnen las condiciones necesarias para el establecimiento de una densidad celular requerida para conservar la estructura de un tejido o de un órgano (Maton, *et al.*, 1997)

El mantenimiento de la estructura que constituye a un organismo pluricelular requiere de señales celulares que permitan a un tejido u órgano crecer o detener su crecimiento. Estas señales guardan un equilibrio entre proliferación diferenciación y muerte celular procesos que están enmarcados dentro de lo que se denomina ciclo celular (Maton, *et al.*, 1997).

PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular es un evento biológico cuidadosamente regulado que responde a las necesidades del cuerpo obedeciendo señales químicas que la activan o la inhiben (Darnell, *et al.*, 1993), por consiguiente las células presentan diferentes ritmos de proliferación dependiendo del tejido que forme



Fug. 1 La proliferación celular se inicia por un proceso de duplicación exacto del contenido de ADN que posteriormente culmina con la generación de dos células hijas idénticas a las progenitoras. Tomada de: www.webpages.ull.es

parte, teniendo células con alta especialización estructural como las células nerviosas, las células musculares y los eritrocitos que maduran y pierden su capacidad de división, otras con alto nivel de división celular, tales como las células epiteliales, y por último se encuentran las células que normalmente no se dividen, pero que pueden iniciar un ciclo

de división celular como respuesta a un estímulo apropiado por ejemplo los hepatocitos y linfocitos (Lodish *et al.*, 2005).

Aunque las interacciones intercelulares y la matriz extracelulares juegan un papel importante, el control de la proliferación celular mayoritariamente está regulada por agentes químicos, generalmente proteínas presentes en el suero, que se activan a concentraciones muy reducidas y que reciben el nombre de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento, actúan mediante su unión reversible de alta afinidad a moléculas específicas denominadas receptores, que se

encuentran en la membrana celular (Roa, 2003). Dichos factores de crecimiento, son secretados por células vecinas o localizadas en tejidos u órganos distantes y que actúan de manera autocrina, parácrina o endócrina (Darnell *et al.*, 1993). La función de los receptores de los factores de crecimiento es la de sensibilizar a las células de la llegada de éstos, y por tanto, de enviar una señal al interior de la célula, conocidos como transmisión o transducción de señales que finalmente debe alcanzar el núcleo, lugar donde se encuentra parte de la maquinaria responsable del control del ciclo celular y el propio ADN que debe replicarse (Fig. 1) (Roa, 2003). Estas señales procedentes de otras células, no solamente inducen la proliferación sino también son utilizados para sobrevivir, como IL 3 que mejorar la respuesta natural del organismo a una enfermedad como parte del sistema inmune, o IGF-1 la cual es una proteína liberada por muchos tejidos del organismo y prácticamente afecta a casi todas las células del cuerpo (Trejo *et al.*, 2007). Si se les priva de tales factores de supervivencia, las células activan un programa intracelular de suicidio y mueren por un proceso denominado muerte programada (apoptosis). El hecho de necesitar señales procedentes de otras células para poder sobrevivir ayuda a garantizar que las células sobrevivan sólo cuándo y dónde son necesarias. Por lo tanto, las células pasan por diferentes etapas que implican síntesis de proteínas, ARN y ADN para llevar a cabo la división celular. La división celular es tan solo uno de los eventos que constituyen el ciclo celular (Alberts, *et al.*, 1994).

CICLO CELULAR.

El ciclo celular es el conjunto mínimo de procesos que una célula tiene que realizar para que puedan llevar a cabo su tarea más importante: la transmisión de la información genética a la siguiente generación de células. De esta forma una célula se reproduce mediante una secuencia ordenada de interruptores bioquímicos, que controlan los principales acontecimientos del ciclo, incluyendo la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas replicados para culminar con la división, obteniendo dos células hijas (Darnell *et al.*, 1993). En las especies unicelulares, como las bacterias y levaduras, cada división celular

genera un nuevo organismo completo. En las especies pluricelulares, para producir un organismo funcional se requieren secuencias de divisiones celulares largas y complejas (Alberts *et al.*, 1994).

Un ciclo celular típico se da en dos fases gigantes que son: la interfase que se divide a su vez en: G₁, S y G₂ y la mitosis que se divide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis Fig. 2. Todas las fases están reguladas por unas proteínas llamadas Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) que forman heterodímeros con otras proteínas denominadas ciclinas (Moeller *et al.*, 2006).

Con respecto a la carga genética la mayoría de las células en reposo son diploides, mientras que las células normales en proliferación existen en varios niveles de ploidía. Durante las varias fases del ciclo celular (G₀, G₁, S, G₂ y M), los núcleos de las células contienen cantidades diferentes de ADN que son características del estado de proliferación en que se encuentran (Mesa *et al.*, 2003).

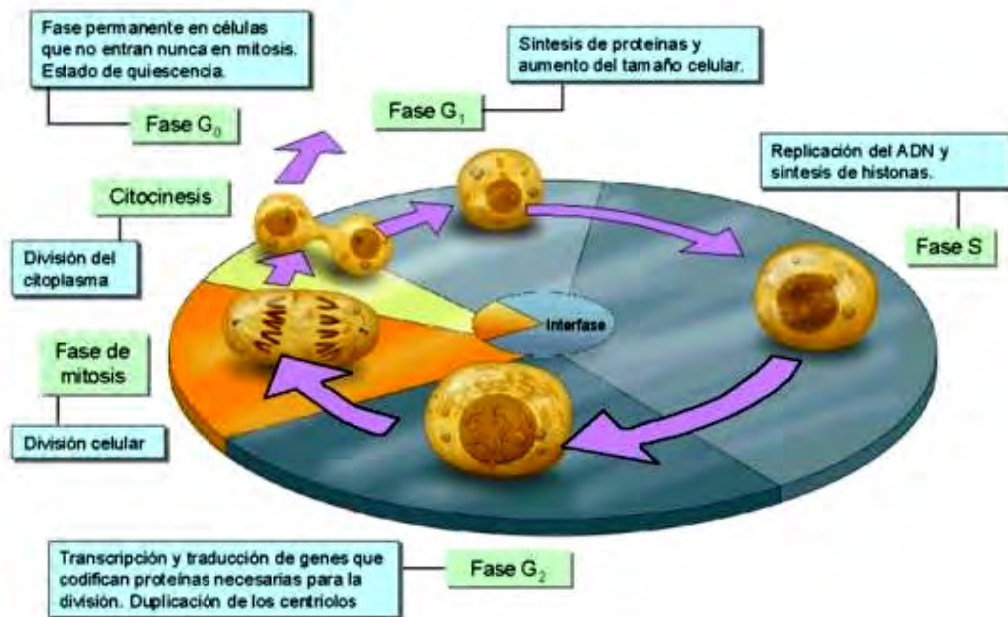


Fig. 2 Ciclo celular típico. Este se da en dos fases gigantes que son: la interfase el cual se divide en: G₁, S y G₂ y la mitosis que se divide en profase, metafase, anafase y telofase. Modificada de www.biogenmol.blogspot.com

La fase G1, es un periodo de actividad bioquímica intensa, se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular. Las células incrementan el material enzimático, sus orgánulos se replican, así como otras moléculas y estructuras son sintetizadas por la célula; entre éstas se encuentran microtúbulos, microfilamentos de actina y los ribosomas. Las estructuras membranosas como el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas se derivan del retículo endoplásmico, el cual se renueva y aumenta en tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos. También hay replicación de mitocondrias y cloroplastos previamente existentes. Los cromosomas se encuentran esparcidos en el interior del núcleo celular asociados a las histonas, formando las fibras nucleosomales. Las células sintetizan ARN y proteínas según las necesidades metabólicas que presenta en cada momento, al mismo tiempo que se mantienen diploides (contenido de ADN característico de los conjuntos complejos de cromosomas, $2n$) (Félix *et al.*, 1997).

Subsecuentemente, durante la fase S, se sintetiza el ADN. La replicación de ADN comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y las proteínas necesarias. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis debe generar dos juegos completos de ADN idénticos para ser repartidos entre las dos células hijas. Las células que están en esta fase del ciclo contienen cantidades de ADN que se definen como tetraploides G2 (contenido de ADN $2n + 2n$ pero solo al final, de la fase S) (Moeller *et al.*, 2006).

La fase G2, es el tiempo que transcurre entre la fase S y el inicio de la mitosis, se producirá una repartición equitativa del material esencial para la división de la célula progenitora en dos células hijas idénticas en contenido genético. La cromatina recién duplicada, que está dispersa en el núcleo en forma de cordones filamentosos, comienza a enroscarse lentamente y a condensarse en una forma compacta llamada cromosoma; además, la célula realiza una confirmación completa del ADN duplicado anteriormente (Mesa *et al.*, 2003).

Es aquí donde tiene lugar la síntesis de ARN y proteínas, que culminan en la fase de mitosis (M). Basándose solamente en el contenido de ADN, la fase M no se puede diferenciar de G2 (Nashmyt, 1996).

Por último, el ciclo celular culmina con la mitosis, donde se divide la cromatina duplicada de modo tal que cada célula hija obtenga una copia del material genético, un cromosoma de cada tipo. Una vez que ha ocurrido la mitosis, las células hijas $2n$ comienzan otro ciclo o entrarán en un estado de reposo que se define como G0. Este estado no se puede diferenciar de G1 en cuanto al contenido de ADN. Las células en G0, pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar o en ocasiones nunca más dividirse como por ejemplo las fibras musculares esqueléticas que no se dividen, pero sí renuevan sus organelos citoplasmáticos (Castrillo, 1997). De esta forma el estado de G0 es de reposo y ausencia de crecimiento, que difieren de todos los estados que experimenta el ciclo celular. La ausencia de factores de crecimiento apropiados lleva a las células a una especie de latencia en el ciclo celular, en el cual el sistema de control no avanza a través de G1, ya sea porque es incapaz o porque no lo necesita; además si se suprimen los nutrientes a la célula ésta no podría proseguir con el ciclo. Por ejemplo, en ausencia de aminoácidos la síntesis de proteínas no se llevaría a cabo óptimamente y por tanto la célula no continuaría con su división (Moyzis, 1997). En forma colectiva, el ciclo de replicación se describe como las fases G0/G1, S, G2/M (Mesa *et al.*, 2003).

La duración de los periodos de división G1, S, y G2/M dependen del tipo celular que se trate. Así en células de epitelio humano la duración es de 8 horas, en otros tipos de células puede ser de varios días o meses. También depende de las condiciones fisiológicas y de determinados factores y, en particular la temperatura.

Un caso típico de duración de un ciclo celular es el de los cultivos de células HeLa, en las que un ciclo celular dura 20 horas y cada fase tiene la siguiente duración: G1 8 horas, S 6 horas, G2 5 horas y M 1 hora (Castrillo, 1997).

Reguladores del ciclo celular

El ciclo celular está dirigido por una compleja red de señales extra e intracelulares, que activan o desactivan de manera coordinada y secuencial a la maquinaria básica de reguladores claves. Éstos son proteínas cinasas heterodiméricas, es decir compuestas de dos subunidades, dichas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas de residuos de serinas-treoninas denominadas CDK (del inglés Ciclin Dependent Kinase). Las subunidades CDK poseen el centro catalítico pero no son funcionales a no ser que estén unidas a la subunidad activadora, las ciclinas. Mientras que las CDK's suelen estar a lo largo de todo el ciclo celular, las ciclinas (de ahí su nombre), solo se sintetizan en determinadas fases de cada ciclo de división celular (Zhang, 1995). La forma en como actúan las ciclinas es fosforilando otras proteínas CDK's mediante la transferencia de grupos fosfatos a aminoácidos específicos Fig. 3.

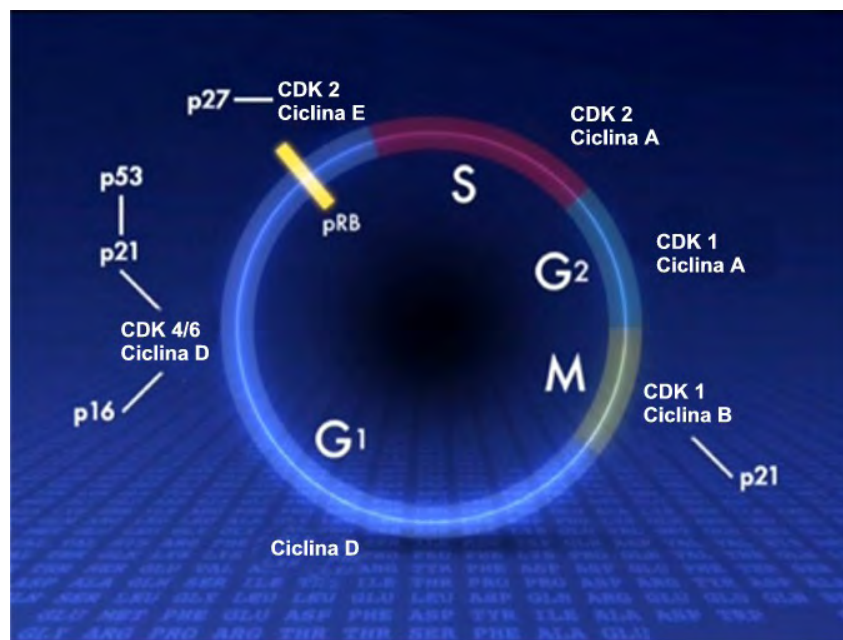


Fig. 3 Las proteínas cinasas (CDKs) se asocian con distintas ciclinas en las diferentes etapas del ciclo celular, formando el complejo CDK-ciclina. La activación de este complejo dispara procesos que conducen a la célula a través de las distintas fases del ciclo. La degradación de las ciclinas inactiva el complejo. Modificada de www.fisicanet.com.

Hoy en día está generalmente aceptado que las células de los mamíferos utilizan hasta cinco CDKs diferentes como mecanismo de control que permite el

adecuado término de la división celular, estas CDK's son por orden de intervención en el ciclo, CDK4 CDK6 CDK3 CDK2 y CDK1.

El ciclo celular comienza con un primer punto de restricción R en la fase G1. El evento fundamental que regula el punto R, es el nivel de fosforilación de la proteína codificada por el gen supresor de tumores Rb (retinoblastoma). CDK4 y CDK6 interaccionan con una familia específica de ciclinas denominadas ciclinas D, esencial para la clase preparatoria de entrada del ciclo celular o fase G1 y regulan la fosforilación de Rb en la fase G1/S del ciclo celular (Shackelford *et al.*, 1999).

La fase S está dirigida por las CDK 2 que primero se une a la ciclina E, durante el inicio de la fase S, y luego con la ciclina A durante la fase principal de la replicación del ADN. Se ha encontrado que esta proteína es esencial para la duplicación del centrosoma en células de mamíferos (Meraldi *et al.*, 1999)

Concluida la fase S, la ciclina A se une a la CDK1 durante la fase G2, y finalmente el complejo formado por CDK1 y la ciclina B (B1 Y B2) y la cinasa Cdc2, estas moléculas controlan el estado del ADN celular que ha sido previamente duplicado en la fase S y son las responsable de conducir a las células a través de la mitosis (Shackelford *et al.*, 1999).

La CDK3 ha sido muy poco estudiada ya que los ratones de laboratorio carecen de CDK3 funcional y solo ha sido estudiada en células humanas *in vitro* proponiendo un papel similar al de CDK2 (Barbacid, 2007). También ha sido propuesta como una quinasa reguladora de la fase G1 tardía (Matsuoka *et al.*, 2000). Por lo tanto contribuye en el inicio de la fase S y también se ha encontrado que CDK2 o CDK3 pueden promover la apoptosis por interferencia con la respuesta celular a los factores de sobrevivencia (Braun *et al.*, 1998).

Existe un tercer punto de control durante la transición de metafase a anafase en la mitosis denominado punto M, que asegura que no hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial y se produzca un reparto igualitario de cromosomas entre las dos células hijas (Shackelford *et al.*, 1999).

También se conocen dos familias de inhibidores de CDK's específicos que pertenecen a las familias CIP/KIP e INK4. Algunos de estos inhibidores pueden actuar como factores de ensamble entre algunas ciclinas y sus CDK's. Los miembros de estas familias son inhibidores generales de todos los complejos y se acumulan en respuesta a un amplio rango de estímulos antiproliferativos. Estas proteínas se asocian de preferencia con el complejo CDK-Ciclina y su sobreexpresión induce una detención de las células en diferentes fases del ciclo celular. Los miembros de la familia CIP/KIP más conocidos son las proteínas p21, p27 y p57 (Fig. 3) estas moléculas son consideradas inhibidores universales debido a que éstas pueden unirse e inhibir la actividad cinasa de diferentes complejos formados por las cinasas dependientes de ciclinas (CDK2 CDK4 y CDK6) (Shackelford *et al.*, 1999).

La progresión a través del ciclo celular está regulada con precisión mediante varios mecanismos inhibidores que detienen el ciclo celular en puntos de control específicos cuando los acontecimientos no se han completado satisfactoriamente, cuando se produce daño al ADN o cuando las condiciones extracelulares son desfavorables, la célula activa un programa intracelular de muerte (Alberts *et al.*, 1994).

MUERTE CELULAR

Las células de los organismos pluricelulares son miembros de una comunidad sumamente organizada. El número de células de esta comunidad está regulado con precisión, no solo controlando la velocidad de la división celular, sino también regulando el ritmo de la muerte celular, aquellas células que ya no son necesarias se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte. En condiciones fisiológicas las células dañadas, las que están sujetas a recambio y las senescentes, se eliminan a través de un tipo de muerte celular denominada apoptosis. Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular, porque cuando se altera, se producen enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Huntington desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer (Alberts *et al.*, 1994).

Por otro lado existe otro tipo de muerte celular que responde a una lesión aguda donde suelen hincharse y romper la membrana plasmática, dicho proceso es considerado como necrosis celular la cual es un tipo de muerte que da lugar a una respuesta inflamatoria potencialmente perjudicial.

Apoptosis.

La apoptosis presenta características que difieren marcadamente de la muerte celular degenerativa o necrosis, la cual tiene mecanismos de inicio específicos para el tipo de daño que recibe la célula, e implica la inducción de genes en la que pueden intervenir mecanismos internos como un reloj bioquímico. (Elinos *et al.*, 2003) Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia. Las células que entran en apoptosis muestran un estrechamiento rápido del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática. En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN en segmentos específicos que van de 180 a 200 pares de bases, condensación de la cromatina. Así mismo el citoplasma se condensa y se forman vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegidos por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico (Fig.4) y la aparición de la fosfatidilserina en la lámina externa de la membrana celular (Caballero *et al.*, 2002). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por las células aledañas o por fagocitos profesionales, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre la células.

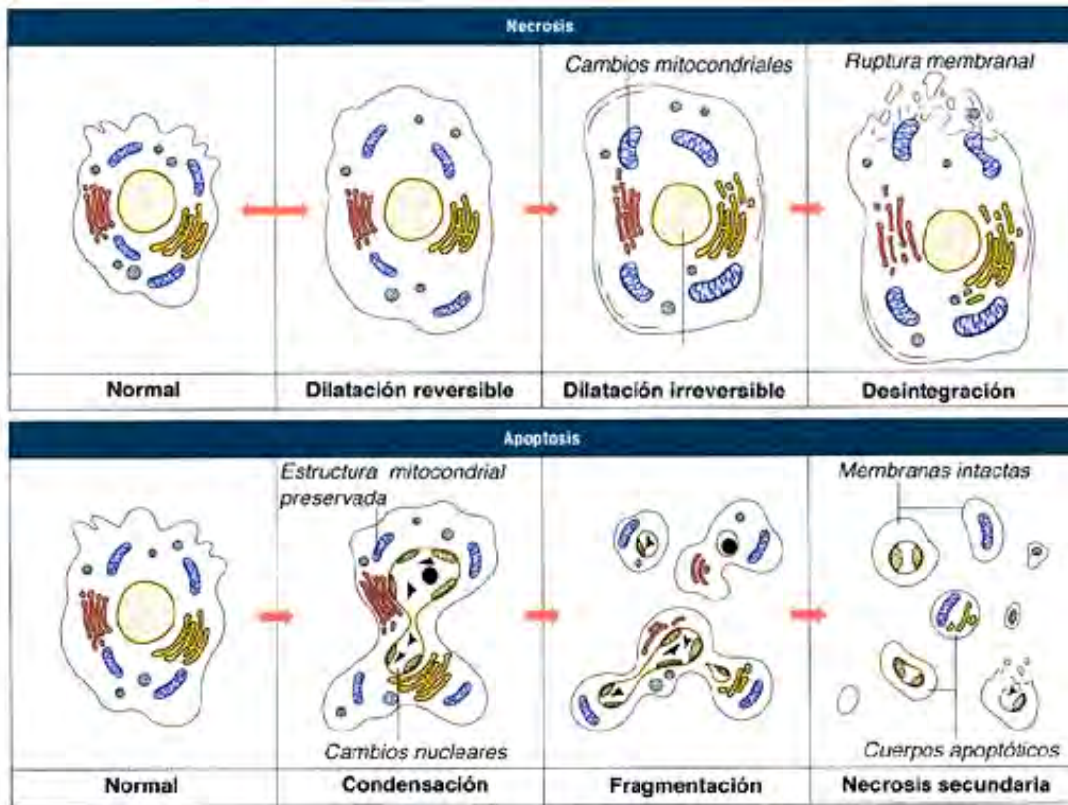


Fig. 4 Cambios morfológicos de los procesos de muerte celular necrótica y apoptótica. Tomada de <http://retina.umh.es/apoptosis/APOP-1.jpg>

Necrosis.

La necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como hipoxia, hipertermia, hipotermia, infecciones virales y venenos, observándose que ciertos tipos celulares responden a concentraciones farmacológicas de algunos medicamentos. Tal estímulo letal incrementa generalmente la permeabilidad de la membrana plasmática con cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana, provocando un hinchamiento de la mitocondria seguida de la ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático Fig. 4 (Bowen *et al.*, 1990).

Caspasas.

La apoptosis es inducida por una diversidad de estímulos ejecutados por proteínas denominadas caspasas las cuales son clave en la traducción y ejecución de las señales.

Al igual que muchas otras proteasas, las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos (procaspasas), los cuales son activados por proteólisis, proceso que permite la maduración a proteínas con plena actividad enzimática. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras (como las caspasas-8 y -9) son activadas por autoproteólisis cuando son traslocadas a comportamientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras (como las caspasas-3 y -7) son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras por medio de una hidrólisis en sitios específicos de diversos sustratos. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción, etc. (Elinos *et al.*, 2003).

Rutas de activación de caspasas.

Vía extrínseca

La vía extrínseca o "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Caballero *et al.*, 2002).

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (del inglés factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas-8 y -10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteínas cinasas que conducen al efecto contrario, es decir,

estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas (FasL), proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores (Kurokawa *et al.*, 2009).

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con proteínas como Tradd (del inglés TNF receptor associated death domain) y Raidd (del inglés receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (del inglés TNF receptor associated factor) activan proteínas cinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario ver Fig. 5 (Daniel *et al.*, 2006).

Vía intrínseca o mitocondrial.

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Ésta puede ocurrir en respuesta a un aumento en la producción de radicales libres (estrés oxidativo), un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]$ en el citoplasma o la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c (Cho *et al.*, 2002).

El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis ver Fig. 5 (Daniel *et al.*, 2006).

.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo BH3-only activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis (Cho *et al.*, 2002).

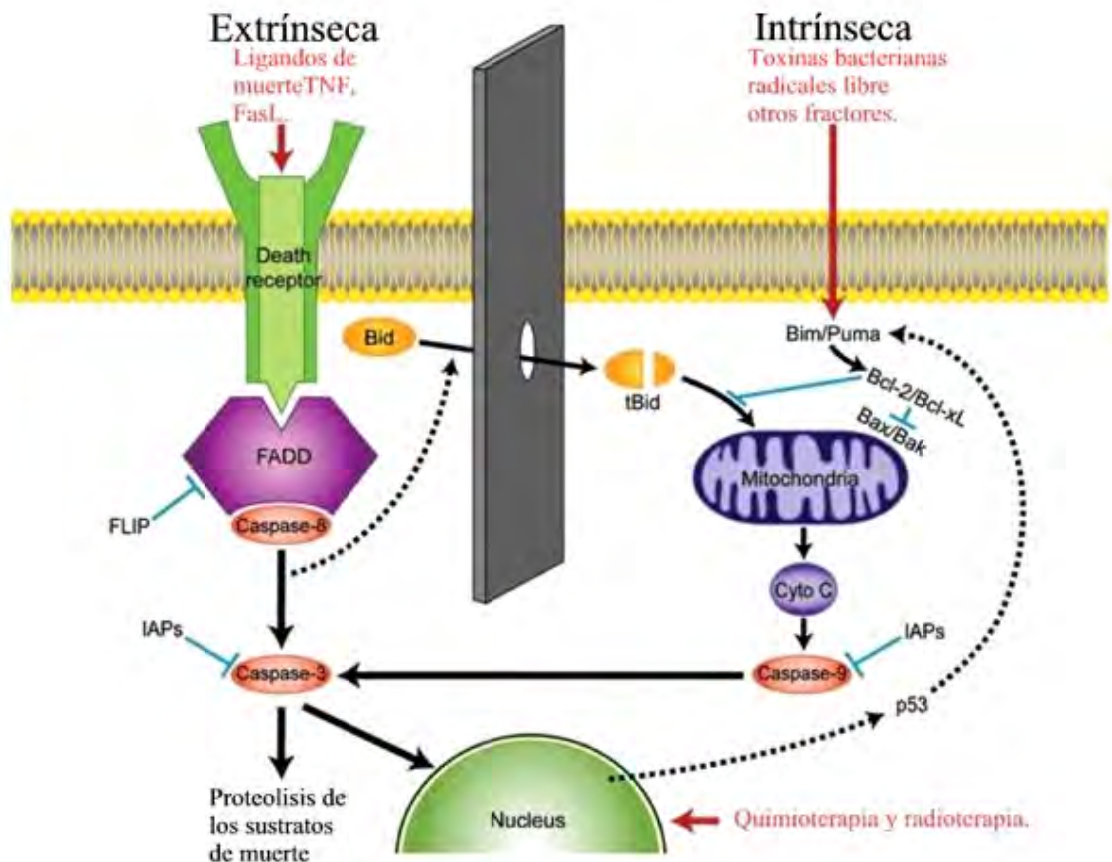


Fig.5 Rutas de activación de las caspasas: vía extrínseca receptor de muerte TNF o ligando Fas/FADD/caspasa 8 y vía intrínseca o mitocondrial (Activación de Bcl-2 liberación de citocromo c/Apaf-1/caspasa 9. Modificada de www.quimicaviva.qb.fcen.

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (Ventura *et al.*, 1999).

El desequilibrio de las rutas de activación de las caspasa provoca trastornos en la homeostasis tisular del cuerpo, provocando una acumulación de células dañadas que propician el desarrollar un tumor, provocando un daño fatal o potencialmente dañino (Alberts *et al.*, 1994), por ejemplo un aumento exagerado en la división de una célula en particular cuando no es necesario, se ocasiona una interrupción en el funcionamiento normal del órgano y finalmente del organismo provocando cáncer (Lewin, 2000).

CÁNCER

Es una enfermedad producida por diversas alteraciones genéticas en las que participan un conjunto de genes cuyos productos ejercen funciones básicas como el control de crecimiento la diferenciación y la muerte celular (Darnell *et al.*, 1993).

El cáncer también es definido como el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades que tiene en común un crecimiento celular desordenado (tumor) y una colonización tisular (metástasis), todo ello determinado por una alteración genética inicial seguida de la acumulación de otras alteraciones sucesivas que se van incrementando dramáticamente con la edad (Mas, 2004).

Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias: ellas y su progenie se reproducen a pesar de las restricciones normales e invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células. Una célula anormal que no prolifere más que sus vecinas normales no produce ningún daño significativo, sean cuales sean las otras propiedades que puedan tener; pero si su proliferación está fuera de control, producirá un tumor o neoplasia. Un tumor se considera canceroso sólo si tiene la tendencia a perder sus rasgos

diferenciados para producir una composición cromosómica alterada y metastásica (Alberts *et al.*, 1994).

Claramente para que una célula pueda causar cáncer, a medida que va evolucionando debe de ignorar las señales internas y externas que regulan la proliferación celular, evitar el suicidio por apoptosis, sortear las limitaciones programadas para la proliferación, eludiendo la senescencia replicativa y evitando la diferenciación, que le favorece por ser genéticamente inestable y generarle la habilidad de escapar de sus tejidos de origen así como de sobrevivir en entornos ajenos (Alberts *et al.*, 1994).

En la carcinogénesis pueden diferenciarse diversas etapas que son *iniciación*, *promoción* y *progresión*. Los agentes que actúan en la primera etapa pueden ser físicos químicos y biológicos (Weinberg, 1996).

Los carcinógenos físicos están constituidos por las radiaciones que dañan al ADN, ionizando las bases, deprimen el gen de la proteína p53, pueden estimular citocinas como la IL 1 y 6, que actúan como verdaderos factores de crecimiento, facilitan la formación de radicales libres. Las fuentes radiantes pueden surgir de la metodología diagnóstica o terapéutica así como también por exposición a los rayos solares en forma persistente. Los carcinógenos químicos tienen como blanco preferencial al nitrógeno de la guanina (alquilantes, aminas aromáticas, nitrosaminas, etc.) produciendo mutaciones irreversibles. Se atribuyen efectos genotóxicos a los compuestos policlorados contenidos en insecticidas y plaguicidas, así como también productos de la manufactura de materiales eléctricos y plásticos formando parte de los contaminantes ambientales, que llegan a los seres vivos a través del aire, del agua y de los alimentos. Los carcinógenos virales actúan introduciendo sus propias oncoproteínas al genoma de la célula afectada con lo que la misma cambiará su código normal, por el que le imponen los oncogenes virales. Tal es el caso del papiloma virus humano, el virus de Epstein Bar y de las hepatitis B y C. Los oncogenes virales se ubican generalmente en las proximidades de proto-oncogenes o de oncogenes supresores, activando a los primeros y desactivando a los segundos (Rubin, 2003 y Merck Sharp 2005).

La *promoción*, representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor.

La *progresión* implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes de la misma con modificaciones estructurales y funcionales. Las células normales, se encuentran “ancladas” en un hábitat que le es propio. El contacto con las células vecinas controla su propia división celular y existen moléculas de adhesión que las mantienen próximas y permiten la transmisión de señales de una a otra; las células normales son incapaces de atravesar la membrana basal que las separa del tejido conjuntivo sub-basal de donde obtiene los materiales que la nutren; tampoco tienen capacidad de introducirse a los capilares sanguíneos o linfáticos, aunque los linfocitos, hacen excepción a esta particularidad (Merck Sharp 2005).

Las células neoplásicas tienen incrementado su metabolismo y por ende requieren de mayor aporte de oxígeno; en las mismas existen genes que codifican factores que estimulan la angiogénesis tumoral (Fig. 6), que es el primer requisito necesario, para iniciar la cascada metastásica. Los vasos neoformados tienen paredes porosas que les permiten la entrada y salida de las células neoplásicas lo cual se acompaña de la mayor liberación de proteínas que degradan la matriz extracelular, permitiendo la migración de las mismas. Pero así como existen sustancias angiogénicas también existen sustancias angiostáticas, elaboradas por el mismo tumor. Lo fundamental de esta etapa de progresión, es comprender las dificultades que debe superar la célula maligna para colonizar en un lugar distante de su sitio de origen. Baste saber que sólo una célula de entre diez mil que logren introducirse al torrente sanguíneo o linfático, podrá asentarse para desarrollar un foco metastásico para lo cual: a) La célula maligna debe desprenderse de sus vecinas y “navegar” por el espacio intercelular y atravesar la membrana basal.(Degradación de matriz) b) Debe introducirse al vaso sanguíneo o linfático (Migración celular) c) Debe sobrevivir al ataque de la respuesta inmune (Respuesta inmune) d)Debe atravesar nuevamente la pared vascular y “anidar”

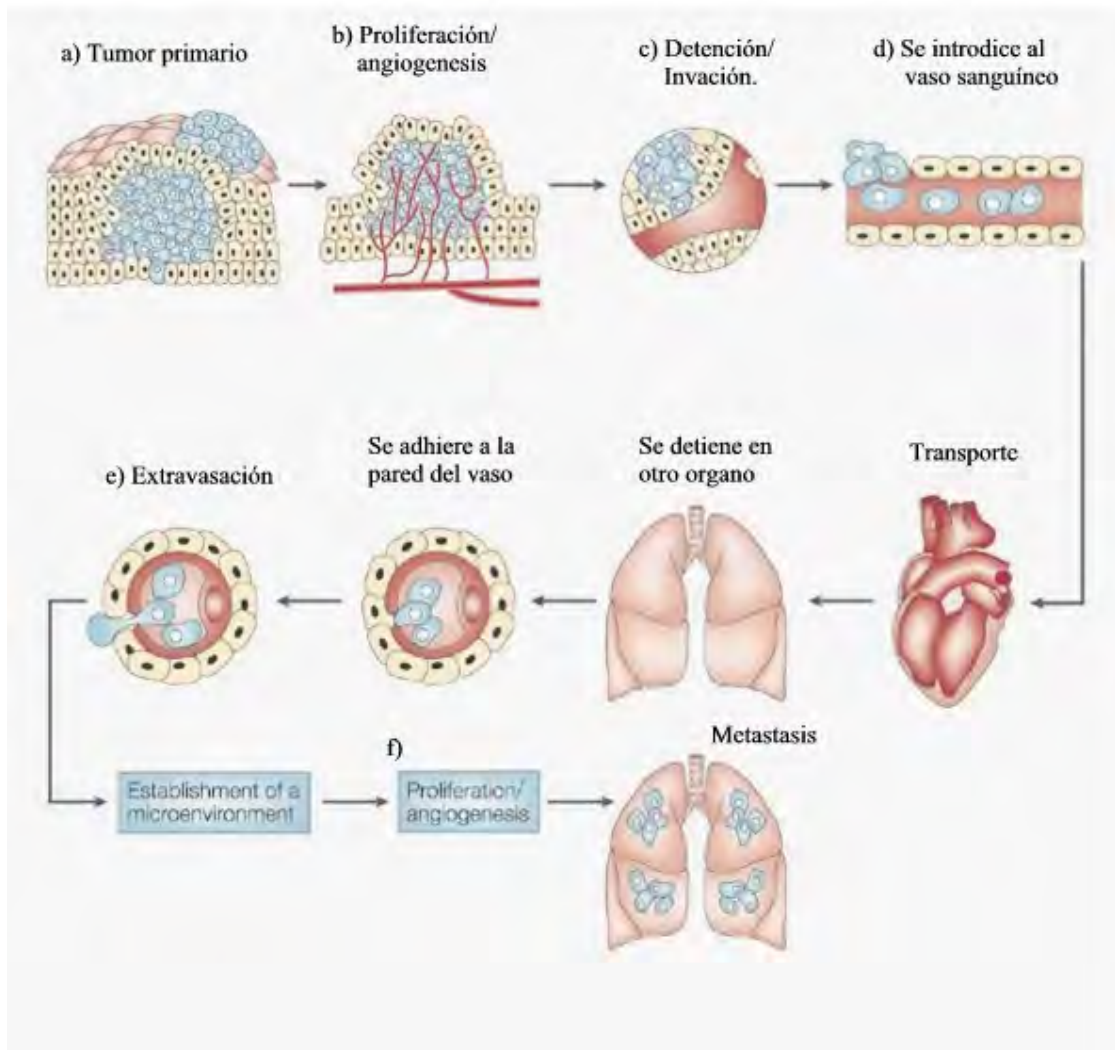


Fig. 6 Etapas de la carcinogenesis: iniciación: agentes físicos químicos y biológicos que provocan mutaciones en genes que ejercen funciones básicas como el control de crecimiento la diferenciación y la muerte celular, la promoción: crecimiento tisular con la formación del tumor primario y progresión la cual implica la capacidad de invadir tejidos vecinos a distancia (metástasis) destruyendo y reemplazando progresivamente los órganos y tejidos en el cuerpo. Modificada de www.nature.com

en otro tejido que muchas veces no comparte su estirpe.(Colonización metastásica ver Fig. 6) (Rubin, 2003).

Un cáncer se puede clasificar de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan, los que derivan de las células del endodermo y ectodermo como las células epiteliales se denominan carcinomas y los que derivan del mesodermo como el tejido conjuntivo o de fibras musculares se consideran sarcomas. Otro tipo de cánceres son las diversas formas de leucemia, derivadas de células hematopoyéticas y los cánceres derivados del

sistema nervioso. (Darnell *et al.*, 1993). De los carcinomas de mayor incidencia en México y el mundo se encuentra el cáncer cérvico-uterino ocupando el segundo lugar muertes de mujeres en etapa reproductiva.

CÁNCER CÉRVICO-UTERINO (CaCu)

Dentro de los diferentes tipos de cáncer que puede presentar el cuerpo humano, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) está documentado como la segunda causa de muerte entre la población femenina mexicana, considerado en la actualidad como un problema de salud pública (Hidalgo, 2006); esto es lamentable ya que el CaCu es un modelo de detección temprana, que por su larga y bien conocida historia ofrece una excelente oportunidad para su detección antes de llegar a ser invasor (Cetina *et al.*, 2006). La tasa de defunción ajustada por edad en E.U. es de 2.4 por 100 000 habitantes comparada con 14.0 por 100 000 habitantes en México (Castellanos, 2003).

El origen histológico del cáncer cérvico-uterino es de tipo epidermoide en el 85 a 90% de los casos, descrito como una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y del ectocervix sitio donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o más factores de riesgo. En esta área el epitelio columnar es remplazado por el epitelio escamoso y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que se sucede en etapas de displacia, leve, moderadas y severas que evolucionan a cáncer in situ, en grado variable, cuando éstas se circunscriben a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor figura 7 (Escandon *et al.*, 1992 y CNCC, 2004). Su prevalencia tiene que ver con factores socioculturales que obstaculizan su prevención y el tratamiento oportuno (Eifel *et al.*, 2001).

Las anomalías tempranas del cérvix conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad. Para que el NIC evolucione a CaCu invasor necesita de 8 a 20 años y en la mayoría de los casos se requiere de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos (Lazcano *et al.*, 1999).

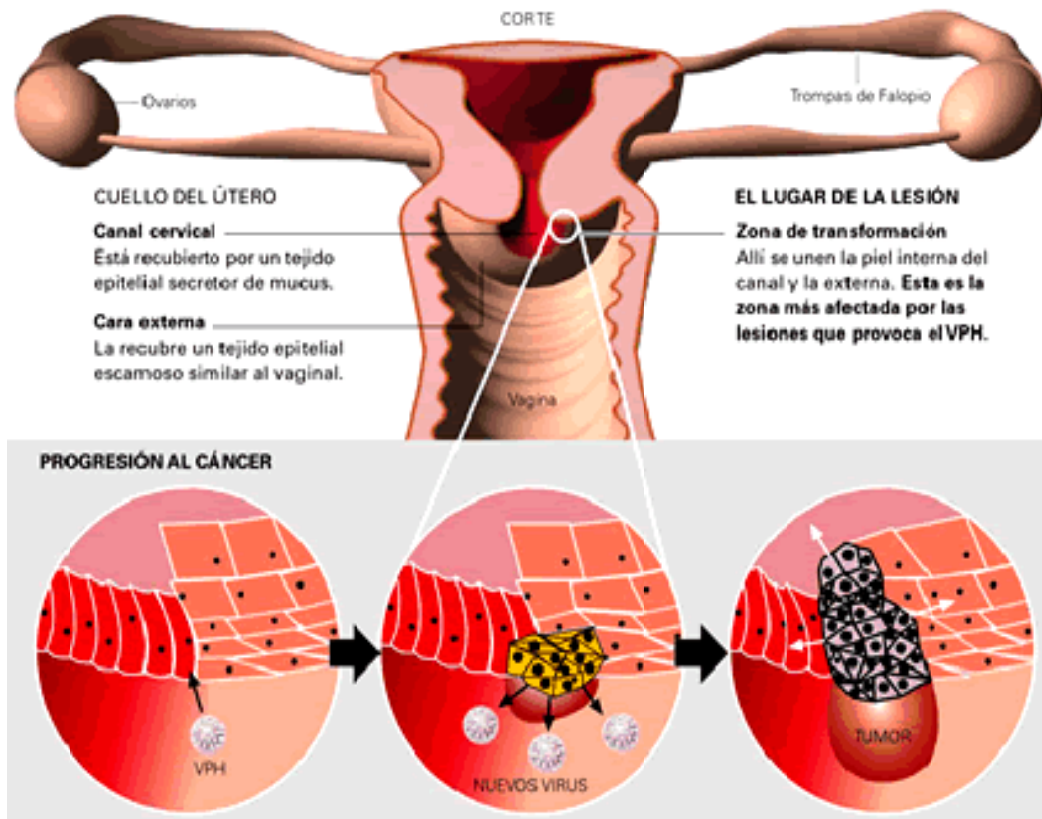


Fig. 7 Cáncer cervico-uterino. Canal cervical que es el sitio donde las células tienden sufrir transformaciones por la acción de uno o más factores de riesgo como el virus del papiloma humano. Modificado de <http://www.rnw.com>

Factores de riesgo

Dentro de los diferentes factores que aumentan el riesgo de contraer CaCu, destaca la infección con el virus del papiloma humano (HPV) asociado en un 97.9% de los casos con la infección (Herrera, 2005).

Los HPV son un grupo de más de 70 tipos de virus de los cuales 30 están relacionados con lesiones ano genitales, tanto en hombres como en mujeres (Teja *et al.*, 1996). Estos tipos de HPV se transmiten de una persona a otra durante el contacto sexual. La mayoría de las verrugas genitales se debe a dos tipos de virus del papiloma humano: HPV 6 y el HPV 11. Sólo en raros casos éstos se convierten en cáncer de cuello uterino, por lo que se les llama virus de bajo riesgo. Por el contrario los de alto riesgo se asocian con neoplasias

intraepiteliales cervicales grado III y la infección por los virus incluyen el HPV 16, HPV 18 HPV 33, HPV 45 y otros (Phelps *et al.*, 1988). La infección del virus del papiloma humano se limita a epitelios escamoso de piel y mucosa, iniciándose en las células basales del epitelio. La replicación del virus se encuentra aparentemente relacionada con el programa de diferenciación de las células epiteliales pero a la fecha no se conoce algún receptor específico para el HPV en las células blanco (Herrera, 2005)

Los genomas del HPV presentan una estructura básica muy similar entre ellos con homología de secuencia de 45% a 80%. El genoma es de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 000 pb en el que solo una de las cadenas sirve de molde para la transcripción. Se han identificado ocho marcos de lectura abierta unidireccional (ORF) organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L). En la región temprana se encuentran los genes que codifican para las proteínas relacionadas con la replicación (E1), con la transcripción (E2) y con la transformación celular (E6 y E7); los genes tardíos codifican para proteínas de cápside (L1 y L2). La transcripción de los oncogenes virales E6 y E7, parece jugar un papel muy importante en la inducción y el mantenimiento del estado transformado. Generalmente el ADN de los virus se encuentra integrado al ADN celular de CaCu y en líneas celulares derivadas de éste (Teja *et al.*, 1996). Existe evidencia de que las proteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo causan transformación celular, lo que sugiere un papel causal para el HPV en el CaCu, se demostró que E6 en combinación con E7 es necesario para una inmortalización eficiente en las células (Herrera, 2005). Se han detectado secuencias de HPV en más de 90% de carcinomas invasores de cuello uterino y en alrededor de un 80% de condilomas y neoplasias intraepiteliales(Herrera, 2005).

En general en células tumorales donde se encuentran genomas virales integrados al genoma celular se han perdido principalmente los genes tardíos, por lo que un posible mecanismo del virus para evitar respuesta inmune del hospedero, sea eliminar los genes de la proteína de cápside para evitar el reconocimiento por el sistema inmune (Teja *et al.*, 1996).

Otros factores que propician el riesgo de infección de cáncer cérvico-uterino es el comienzo de relaciones sexuales a temprana edad sin protección y el número de compañeros sexuales aumenta la posibilidad de contraer infecciones de transmisión sexual, el contacto sexual con alguien que haya tenido múltiples parejas sexuales. Presentar antecedentes familiares de cáncer cérvico-uterino, hábitos higiénicos deficientes, el consumo de tabaco donde se ha demostrado que el moco cervical de las fumadoras hay una concentración elevada de sustancias provenientes del tabaco, el sistema inmunológico deprimido, los factores genéticos que conducen a la inmunodepresión, las enfermedades como el VIH, los medicamentos o drogas que provocan la disminución del sistema inmunológico, los utilizados en la quimioterapia o en los tratamientos durante la donación de órganos, el uso prolongado de anticonceptivos y el alcohol predisponen al desarrollo de cáncer cérvico-uterino (Mc Nab, 1991).

Tratamientos del CaCu.

Ya que en general no hay síntomas asociados con el CaCu, se hace una serie de pruebas en busca de alguna anomalía. La primera prueba es la de Papanicolaou. Si se encuentran células anormales figura 8, el médico tendrá que extraer una muestra de tejido (biopsia) del cuello uterino y lo observará a través del microscopio para ver si hay células cancerosas (Herrera, 2005).

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

Se emplean tres clases de tratamiento: Cirugía (extracción del cáncer en una operación), radioterapia (radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas) y quimioterapia (medicamentos o "venenos" para eliminar las células cancerosas) (Herrera, 2005).

La cirugía es el tratamiento más común para el cáncer cérvico-uterino, si bien pueden realizarse diferentes tipos de cirugía la decisión final dependerá de ciertas características especialmente el estadio y el tamaño del cáncer.

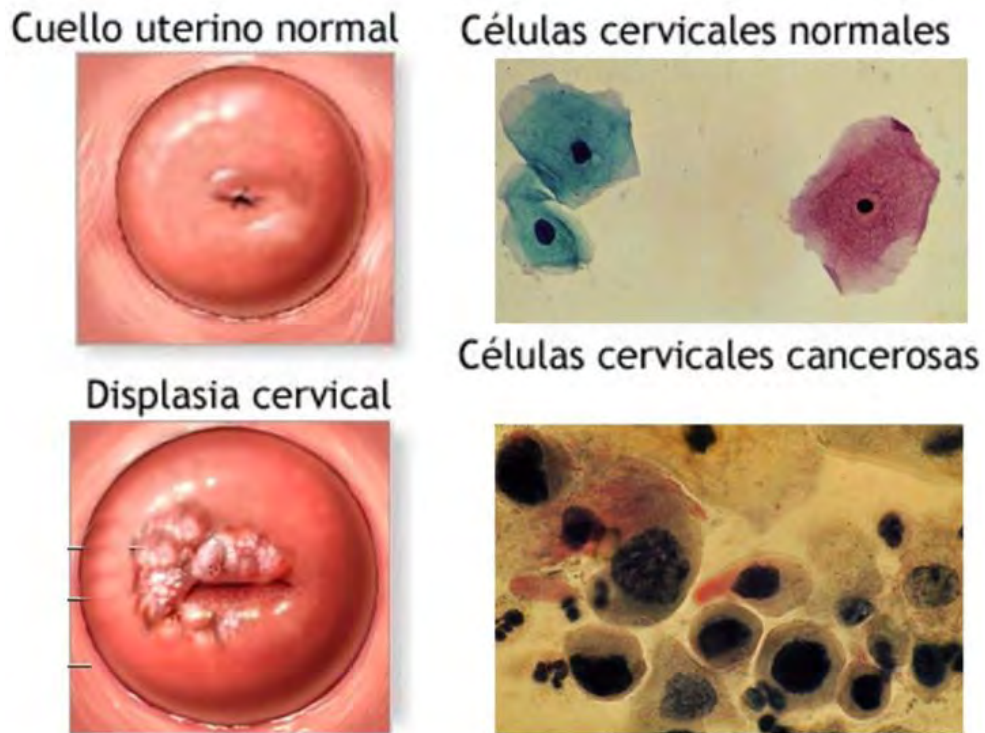


Fig. 8 Células de cervicales sanas y células cervicales transformadas. Modificada de www.oncologiaintegraldocctorfuentes.com y <http://escuela.med.puc>.

Si el cáncer no puede ser removido por medio de una biopsia de cono, la mujer es sometida a una operación para remover el útero para evitar que el cáncer invada otras partes del cuerpo empleando alguna de las siguientes operaciones: La criocirugía, la cirugía con rayo láser, la escisión electroquirúrgica (LEEP, siglas en inglés), o una histerectomía (Herrera, 2005).

La terapia de radiación (también conocida como radioterapia) utiliza rayos X de alta energía o de otro tipo de radiaciones para matar las células cancerosas o detener su crecimiento. Según la dosis de radiación y de sensibilidad de la célula, el daño a las células de mamífero puede ser de dos tipos: 1) daño letal, que es irreversible e irreparable y que por definición conduce a la muerte

celular y 2) daño subletal, que en circunstancias normales puede ser reparado (Herrera, 2005).

Por ejemplo en células irradiadas se han obtenido curvas de supervivencia celular a diferentes dosis y se han evaluado los efectos de la radiación a diversos puntos del ciclo celular (Sinclair *et al.*, 1966). Desde 1963 se demostró que las células HeLa sincronizadas eran más sensibles a la radiación durante la fase G2/M y S temprana, y más resistentes durante la fase S tardía y G1 temprana (Rudoltz *et al.*, 1996). Estos antecedentes demuestran que, en general, hay mayor resistencia a la radiación en la fase tardía de S mientras que la fase G2 es usualmente más sensible que la fase M. Ya que G2/M es el último punto de control del ciclo celular, resulta crítico reparar el daño inducido por radiación en esta fase para permitir que la célula se divida correctamente, si el daño no puede ser reparado entonces la célula activa vías de muerte celular.

La radiorresistencia es un fenotipo de las células de mamífero que consiste de un sistema complejo en el que interaccionan proteínas celulares constitutivas con los genes que son inducidos por la radiación y con los cambios en el microambiente, dando lugar a la generación de resistencia a determinadas dosis de radiación. La recurrencia local de un tumor después de la radioterapia se debe principalmente a la falla de la erradicación de todas las células tumorales; en otras palabras, a la presencia de clones radioresistentes. Teóricamente, todos los cánceres deberían ser controlados localmente si una dosis lo suficientemente alta se aplicara a la masa tumoral. Sin embargo, en la práctica clínica, no es posible administrar dosis altas sin llegar a generar toxicidad local o sistémica (Rosen *et al.*, 1999).

La terapia de radiación puede ser un tratamiento efectivo para cáncer cérvico-uterino incipiente. Sin embargo en el cáncer cérvico-uterino incipiente se utiliza más como un tratamiento adicional posterior a la cirugía a pacientes con alto riesgo de recidiva. También es utilizada para tratamientos de cánceres más grandes o en estadios más avanzados (Bravo *et al.*, 2005)

La quimioterapia consiste en la utilización de medicamentos para matar las células cancerosas. La quimioterapia para el tratamiento de CaCu se administra por lo general de manera intravenosa. El fármaco o los fármacos circulan a través de torrente sanguíneo para llegar a todas las partes del cuerpo. Por lo que este tratamiento es eficaz para cáncer en estadios avanzados. Sin embargo, los mismos fármacos que matan las células cancerosas dañan a las células sanas provocando efectos secundarios. Para limitar el daño a las células sanas, la quimioterapia se administra por lo general en ciclos. Los periodos de tratamiento se alternan con periodos de descanso (Cetina *et al.*, 2006).

La radioterapia sola o en combinación con quimioterapia o cirugía es uno de los primeros enfoques terapéuticos para el tratamiento del CaCu. Recientemente se ha prestado atención a la terapia combinada (neoadyuvante) sola o seguida de cirugía. A demás de preservar la fertilidad en muchos casos la quimioterapia combinada tiene la ventaja de reducir la masa tumoral (Bravo *et al.*, 2005). Una estrategia lógica es combinar la radiación con nuevos radiosensibilizantes (quimio-radiación) que son la utilización de medicamentos que hacen que las células tumorales se vuelvan más sensibles a la radioterapia. Éste es un tratamiento alternativo en donde se tiene a la quimio-radiación con cisplatino aceptado como un tratamiento estándar para pacientes con cáncer cervical (Cetina *et al.*, 2006)

Como los actuales tratamientos contra el cáncer cérvico-uterino se basan en la utilización de sustancias extremadamente tóxicas que aun con los cuidados más exhaustivos pueden causar serios problemas de toxicidad cómo infecciones, trastornos inmunológicos, diarreas, caída de cabello, nauseas, vómito etc., por su nula selectividad con las células tumorales y normales, el área de investigación se ha dado a la tarea en los últimos años de explorar la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos figuran las lactonas.

LACTONAS.

En la actualidad existen diversas alternativas en la cura contra el cáncer que han sido mejoradas gradualmente con el desarrollo de nuevas drogas antitumorales. El hecho es que muchos tratamientos de agentes terapéuticos anticancerígenos exhiben intrínsecamente y potencialmente actividad citotóxica a células normales. Estos problemas se reflejan en esfuerzos consumidos en el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos con pocos efectos y baja citotoxicidad en tejidos normales. Muchos productos de plantas presentan aplicación farmacológica y son potenciales para el uso como quimioterapia contra el cáncer por su baja toxicidad. Muchas investigaciones se han concentrado en diferentes compuestos extraídos de plantas con habilidades que inducen efecto citostáticos en células con cáncer, dentro de los compuestos extraídos se encuentran las lactonas a las cuales se les ha atribuido un efecto citotóxico e inhibidor de la proliferación de células tumorales(Siyuan *et al.*, 2005).

Las lactonas son compuestos cíclicos que poseen al menos un anillo que tiene involucrado un grupo carbonilo y un oxígeno. Dentro de éstas encontramos a las lactonas sesquiterpénicas (LsS), que son un largo y diverso grupo de productos naturales presentes en más de 100 familias de plantas con flores. Por ejemplo, en la familia Compositae (Asteraceae) se han reportado al menos 3,000 estructuras (Siyuan *et al.*, 2005).

El prefijo “sesqui” indica que las LsS están formadas por 15 átomos de carbono. De acuerdo con su esqueleto carbocíclico, las LsS pueden ser clasificadas en cuatro grupos principalmente; a) germacranolidas: anillos compuestos de 10 átomos de carbono; 2) eudesmanolidas compuestos bicíclicos constituidos de 6/6 átomos de carbono; 3) guayanolidas y 4) pseudoguayanolidas, ambos compuestos bicíclicos constituidos de 5/7 átomos de carbono respectivamente (Fig. 9).

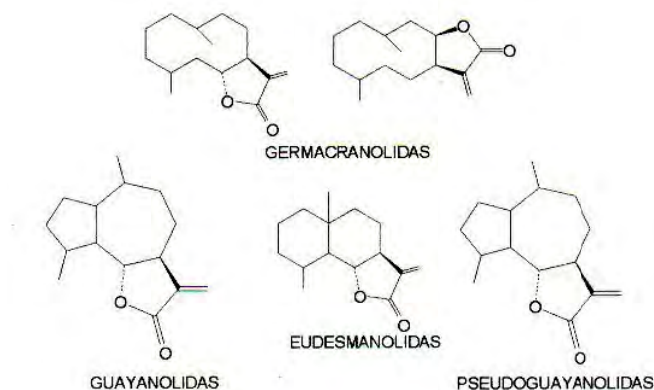


Fig. 9 Grupos de lactonas sesquiterpénicas

Dentro de las actividades farmacológicas descritas para las LsS incluyen su actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral. En el mecanismo de acción de estas sustancias, es generalmente aceptado que la unión covalente de las LsS a grupos sulfidrilos libres en proteínas, inactiva las funciones de varias macromoléculas, dando como resultado que las LsS pueden interferir con algunos procesos biológicos claves, tales como, señalización celular, proliferación celular, muerte celular (apoptosis) y respiración mitocondrial, entre otros, que dejan ver su diversa actividad farmacológica (Beekman *et al.*, 1997). La gran cantidad de lactonas aisladas así como la determinación de sus actividades biológicas han permitido generar modelos que explican su posible mecanismo de acción.

Arglanina

Dentro de las LsS se encuentra la Arglanina lactona aislada de la especie *Artemisia ludoviciana ssp mexicana* (Fig. 10) es una planta nativa de México y es una de las especies con mayor empleo de la Medicina Tradicional Mexicana, siendo su uso igualmente compartido y similar en todas las regiones donde se localiza. Dentro de sus principales usos, se describe para el tratamiento de padecimientos digestivos, entre otras muchas enfermedades (Martínez, 1969).

Artemisia es un género grande con más de 200 especies en las partes secas del mundo. Es una especie variable con numerosas subespecies descritas. La

subespecie presente en el Valle de México es *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* (Willd.) Keck (= *Artemisia mexicana* Willd., *A. ghisbreghtiana* Rydb.) (Rzedowski *et al.*, 1997).



Fig. 10 Planta *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* tomada de www.conabio.gob.mx

Categorías taxonómicas superiores

Reino: Plantae

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae.

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Artemisia*

Especie: *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* (Martínez, 1969).

Distribución en México

Se distribuye en el norte y centro del país, sobre todo en el altiplano: Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas (Villaseñor *et al.*, 1998).

Descripción de *Artemisia ludoviciana* ssp.

Es una hierba perenne, de 1 a 1.5 m de alto. Su tallo generalmente está constituido de varios tallos a partir de una base rizomatosa, estriado (con rayas longitudinales), sus hojas: alternas, sésiles o con un pecíolo corto y ancho, la inflorescencia es una panícula o racimo folioso, 20-50 cm de alto, ramas de hasta 30 cm, las cabezuelas generalmente en ramitas secundarias, casi sésiles. Las cabezuelas de las flores a menudo péndulas. Involucro campanulado, sus brácteas 6 a 16, las interiores de 2 a 4 mm de largo, más o menos tomentosas por fuera; receptáculo hemisférico; flores periféricas 5 a 12, sus corolas angostamente cilíndricas, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco 6

a 15, sus corolas tubulosas o con la garganta campanulada, de ± 2 mm de largo, teñidos de púrpuras, pero luego pasando a color paja. Los frutos y semillas son aquenios algo comprimidos, en forma de clavo o elipse, de ± 1 mm de largo, glabros, café claro, con 12 costillas, la raíz es principalmente un rizoma, es una planta aromática al estrujarse. Dentro de sus principales usos, se describe para el tratamiento de padecimientos digestivos, entre otras muchas enfermedades (Rzedowski *et al.*, 1997).

Del extracto diclorometano de las partes aéreas de *A. ludoviciana ssp mexicana* (estafiate), se aisló un sólido blanco cristalino de pf. 193-195°C, la cual fue caracterizada e identificada como Arglanina, lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano (Fig.11.) (Romo de Vivar *et al.*, 1977 y Matsueda *et al.*, 1967).

Cabe señalar, que el género *Artemisia*, es uno de los géneros de donde se ha reportado el mayor número de lactonas sesquiterpénicas que han sido aisladas y caracterizadas hasta hoy.

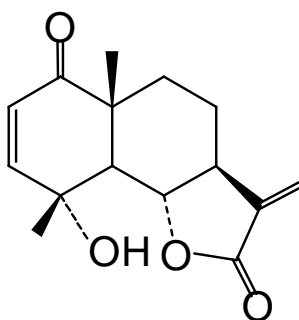


Fig.11 Estructura química de la lactona Arglanina.

El interés por conocer su reactividad y actividad biológica, se centra principalmente en su posible potencialidad como agente citotóxico. La presencia del grupo carbonilo α, β -insaturado; se ha descrito como la parte estructural más reactiva de las lactonas desde el punto de vista biológico, ya que pueden reaccionar con el azufre presente en ciertos aminoácidos mediante una reacción de adición 1,4. Sin embargo hasta este momento no se ha podido generalizar sobre la estructura-reactividad para este tipo de compuestos, debido a su diversidad estructural.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico-uterino en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, de igual forma en México. Durante 2007, los principales tipos de cáncer que causaron defunciones en las mujeres fueron el de mama (13.8%) y cuello uterino (12.1%) (INEGI 2009). Para combatir esta enfermedad, existen diversas alternativas de tratamientos, sin embargo, éstos son muy agresivos, poco selectivos y sin efecto en pacientes en fases avanzadas o terminales de la enfermedad, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. En la actualidad existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal, con actividad antitumoral y con acción selectiva. Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos y que presenta un fuerte interés por sus múltiples actividades biológicas, se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, las cuales han demostrado una diversa actividad biológica, como antivirales, antifúngicas, antiinflamatorias e inclusive antitumorales (Siyuan *et al.*, 2005). Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado sobre el cáncer cérvico-uterino, por lo que resulta de interés, determinar la actividad antiproliferativa de la lactona Arglanina en líneas de cáncer cervical, con el fin de aportar información que permita establecer si esta lactona tiene potencial antitumoral.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas siendo la tasa de defunción ajustada por edad en 14.0 por cada 100 000 habitantes. Dentro de los diferentes factores que aumentan el riesgo de contraer cáncer cérvico-uterino destaca la infección con el virus del papiloma humano (HPV) se ha encontrado en el 97.9% de todos los casos de cáncer invasor y de sus lesiones precursoras, teniendo los tipos 16 y 18 una relación con el cáncer de un 70% de los casos, por lo que se considera a la infección por este virus como el factor de riesgo más importante (Castellanos, 2003). Además del número creciente de resultados en investigación básica que emplean compuestos de origen vegetal y que han sido propuestos en terapias alternativas están orientados hacia la prevención del cáncer. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran las lactonas a las cuales se les ha atribuido un efecto citotóxico e inhibitorio de la proliferación de células tumorales como colon, mama, y leucemia (Siyuan *et al.*, 2005); sin embargo, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el carcinoma de cérvix, por lo que es necesario generar información acerca de la actividad de las lactonas sobre células tumorales de cáncer cérvico-uterino.

HIPOTESIS

Se sabe que algunas lactonas tienen un efecto citostático, apoptótico, sensibilizantes como coadyuvante para el uso de otro tipo de terapias, antitumorales y anti-inflamatorio en líneas celulares de cáncer (Zhang *et al.*, 2005), se espera que la lactona Arglanina promueva un efecto antitumoral en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (Calo, CaSki y ViBo) a través de la detención en alguna fase del ciclo celular con posible inducción de muerte celular apoptótica.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar sí la lactona Arglanina afecta el potencial proliferativo de las células provenientes de cáncer cérvico-uterino (CaCu), CaSki, CaLo y ViBo, así como el ciclo celular y su capacidad de inducir muerte apoptótica.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar cultivos de las líneas tumorales CaLo, ViBo, CaSki, provenientes de cáncer cérvico-uterino.
- Determinar la concentración de la lactona que disminuya el número celular en un 50% (IC₅₀) en las líneas celulares CaLo, ViBo, CaSki.
- Evaluar si el compuesto Arglanina afecta el ciclo celular de las células, CaLo, ViBo, y CaSki, a través de la distribución de ADN.
- Valorar sí la lactona Arglanina afecta la expresión de la procaspasa-3 en las líneas celulares CaSki, CaLo y ViBo, como indicador de muerte celular apoptótica.
- Determinar si la lactona Arglanina induce la formación de cuerpos apoptóticos, así como la fragmentación de ADN en las líneas celulares CaSki, CaLo y ViBo.
- Evaluar si la lactona Arglanina afecta el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales, provenientes del cérvix humano.

METODOLOGÍA

Cultivo de células tumorales.

Las células provenientes de cáncer cérvico-uterino CaSki, CaLo y ViBo fueron sembradas en cajas petri de cristal de 100mm (Pirex. USA), en 10ml de medio RPMI-1640 (DUBELCO, MEX) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) con rojo de fenol, al 10% de suero de neonato de cabra (CNS) (GIBCO BRL, NZ), desactivado a 56° C por 30 minutos. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair US Autoflow). Para la realización de los ensayos, los cultivos se desarrollan hasta un 70% de saturación de la caja de cultivo, para posteriormente ser utilizados.

Preparación del Stock de la lactona Arglanina

Para solubilizar la lactona Arglanina se utilizó Acetato de Etilo (vehículo Ac. Et.), con este antecedente se generó una solución concentrada estándar para los ensayos realizados con las células de CaCu, el cual consistió en pesar 2mg (2000µg) de Arglanina, (tomada del tubo el cual contenía 21mg de manera inicial proporcionado por el M. en C. Arturo Cano del laboratorio de síntesis Química) y se pusieron en un tubo cónico de 1.5 ml. (EPPENDORFS, MEX) donde fueron solubilizados con 200 µl de Acetato de Etilo.

Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación de colorante cristal violeta.

Para determinar la IC₅₀ se sembraron 5 000 células por pozo en una caja de cultivo de 96 pozos (CORNING, USA) con 100 µl de medio RPMI-1640 al 5% de CNS de cada línea celular, cultivadas por 24h. Posteriormente, se retira el medio de cultivo y se adiciona la lactona Arglanina previamente preparada haciendo diluciones seriadas del compuesto, de tal manera que se tomaron 500 µl del tubo con 200 µg/ml y se añadieron a uno de los tubos cónicos que

contenían 500 μ l de RPMI al 5 % de CNS y de este se tomaron 500 μ l para ser añadido a otro tubo conico de 1.5 ml con 500 μ l de RPMI al 5 % de CNS y así sucesivamente hasta terminar con todos los tubos, de tal manera que se obtuvieron las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 μ g / 500 μ l. La placa de cultivo de 96 pozos con 5000 células de cada línea / pozo fueron tratadas con 100 μ l de estas concentraciones, se dejaron en incubación a 37 °C por 24 h. La medición de la proliferación celular se realizo con la técnica de tinción con cristal violeta, para ello se retiro el medio de cultivo, se dejó secar al aire. Inmediatamente después las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% (SIGMA ALDRICH, USA) por 10 minutos, al cabo de los cuales se retiró el fijador, se lavó con agua destilada y se dejó secar muy bien al aire, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1% (SIGMA ALDRICH, USA) por 10 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y se dejó secar al aire. Por último, el colorante fue solubilizado en ácido acético (SIGMA ALDRICH, USA) al 10 % en agitación por 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 570 nm en un lector espectrofotómetro (Image Tecan Spectra) (Kueng *et al.*, 1989). Los resultados de los grupos estimulados fueron comparados con el respectivo control.

Determinación de la IC₅₀ matemática.

Las IC₅₀ se determinaron con los datos obtenidos con el espectrofotómetro Image Tecan Spectra, leídos a una absorbancia a 570 nm. Estos datos fueron convertidos en porcentaje celular y correlacionados con las concentraciones en μ g/ml de Arglanina. Para explicar lo que ocurría en los ensayos se utilizo un modelo de regresión lineal calculando la ecuación de la recta en cada ensayo, con esta se realizó una intrapolación para calcular la disminución del 50% de la población celular (IC₅₀), esto se hizo despejando “x” de la formula y substituyendo “y” por el 50% que fue el valor de interés. Todo esto se realiza en el programa Excel (2003).

Evaluación del efecto de la lactona Arglanina en el ciclo celular.

Las células fueron sembradas a una densidad de 250 000 células por caja, de cultivo de 60x15mm (CORNING, USA), con 5 ml de RPMI al 5 % de CNS. Se dejaron 24h. para permitir su adherencia, posteriormente fueron estimuladas con la IC₅₀ de Arglanina previamente determinada para cada línea celular, la concentración fue preparada con medio fresco, RPMI al 5% de CNS y estas condiciones se mantuvieron en el cultivo por 24h. Cada ensayo constaba de un grupo control formado por: un primer control que contempló las células con RPMI al 5 % de CNS, un segundo control con Ac. Et. Que tenía la cantidad empleado en la IC₅₀ con RPMI al 5 % de CNS, y por último las células estimuladas con la IC₅₀ de la Arglanina de cada línea suplementadas con RPMI al 5% de CNS. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con verseno o tripsina (SIGMA ALDRICH, USA) según fue el caso, posteriormente fueron centrifugadas y lavadas con un buffer amortiguador salino de fosfatos, pH =7.2 (PBS). El botón celular fue fijado y resuspendido en 1ml de metanol al 50% en PBS, pasados 20 minutos se centrifugó y se lavó con PBS. El botón fue resuspendido en 200µl de RNAsa (2.5 U/ml)(SIGMA ALDRICH, USA) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó 5 µl de una solución de yoduro de propidio (200 mg/l) (SIGMA ALDRICH, USA) y se mezcló, por último los tubos se cubrieron con papel aluminio protegiendo los núcleos de la luz. Finalmente se analizaron las muestras en un clitómetro de flujo FACS (COULTER, USA).

Evaluación de la procaspasa-3

Para determinar si la lactona Arglanina induce un incremento en la concentración de la procaspasa 3, como un parámetro para inducir apoptosis, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm. (CORNIG, MEX), en un volumen de 300 µl de RPMI al 5 % de CNS en cámara húmeda por 24h. Al término de las 24h. se procedió a tratar a las células con la IC₅₀ de Arglanina correspondiente a cada línea celular en medio de cultivo RPMI al 5% de CNS por 24h y se procedió a realizar la detección de la procaspasa-3 por

inmunocitoquímica, brevemente: las placas con células (muestras) fueron fijadas con paraformaldehído (SIGMA ALDRICH, USA) al 2% de PBS durante 15 minutos, al término de el tiempo se procedió a lavar 3 veces con PBS las muestras, posteriormente se permeó con tritón X-100 0.5% durante 5 minutos a 4°C, fueron lavadas nuevamente 3 veces las células con PBS, después se adicionó el anticuerpo primario (anticaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:100 en PBS) durante un periodo de 2½h en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FIT C 1:200 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1½h, posteriormente se lavó la 3 veces con PBS para después aplicar el DAPI durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar sobre un portaobjetos las muestra con medio de montaje antifolding (VECTOR, USA) y selladas con barniz de uñas. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON), para su posterior análisis.

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

Para determinar si el efecto de la lactona Arglanina induce fragmentación del ADN, como un segundo parámetro que determine la inducción de muerte apoptótica, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la procaspasa-3. Al término del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS. Se lavó 3 veces con PBS y se permeó con Tritón X-100 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4°C. Se lavó con PBS 3 veces. Posteriormente se utilizó el kit Apoptag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Las preparaciones fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje antifolding (VECTOR, USA), selladas con barniz de uñas, se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

Procedimiento para la obtención de cultivos primarios de células de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de una muestra de tejido del cérvix, de pacientes sometidas a histerectomías 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) a 4°C y procesada en las siguientes horas. El procesamiento consiste en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos, ambas partes son cortadas por separado en trozos pequeños (1-2mm.), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina (SIGMA ALDRICH, USA) al 0.05%. Estos consisten en colocar los trocitos del tejido en un matraz de fondo plano de 50 ml., con 10ml., de tripsina con agitación a 37°C en un baño María durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, la solución de tripsina se vierte a través de una malla de nylon sostenida con un embudo permitiendo solo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla, el filtrado fue colocado en un tubo de centrifuga de 15 ml (CORNING, USA) que contenía 1 ml de SFB el cual fue centrifugado a 2000 rpm en una centrifuga clínica. El paquete celular obtenido de la disgregación fue resuspendido en RPMI-1640 al 10% de SFB, de tal manera que las células del paquete fueron sembradas en cajas de cultivo de 60mm de diámetro (CORNING, USA), con 5ml., de RPMI-1640 al 10% de SFB con una densidad células de 5×10^5 células por caja. Por otro lado, se añade nuevamente la muestra de tejido remanente que quedo en la malla al matraz de fondo plano de 50 ml., y se colocan 10 ml., de tripsina y se continua durante 15 minutos más con agitación suave a 37°C. Nuevamente la mezcla se vierte a través de una malla de nylon y se colecta en otro tubo. Las células obtenidas fueron cultivadas en cajas de cultivo de 60mm de diámetro, y se mantuvieron a 37°C en una incubadora (SCIENTIFIC, USA), al 5% de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 h. máximo, después de este tiempo de incubación, se realizó 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 continua así hasta obtener 70% de saturación de células proliferando. La resiembra consistió en separar las células adheridas a la

superficie de la caja de cultivo que se encuentra a un 70% de saturación, con tripsinan al 0.05% de 1-3 minutos. Las células obtenidas son lavadas y centrifugadas (2000 rpm) dos veces y posteriormente son contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo.

Análisis estadístico.

Todos los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza ANDEVA, con una significancia de 0.05, seguida de una prueba de Tukey, realizado en el paquete StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7.

RESULTADOS.

Con el propósito de evaluar si la lactona Arglanina afecta el potencial proliferativo de células tumorales provenientes de cérvix, cultivos de las líneas tumorales de cérvix ViBo, CaLo y Caski fueron estimulados con diferentes concentraciones de la lactona (Fig. 12, Tabla 1).

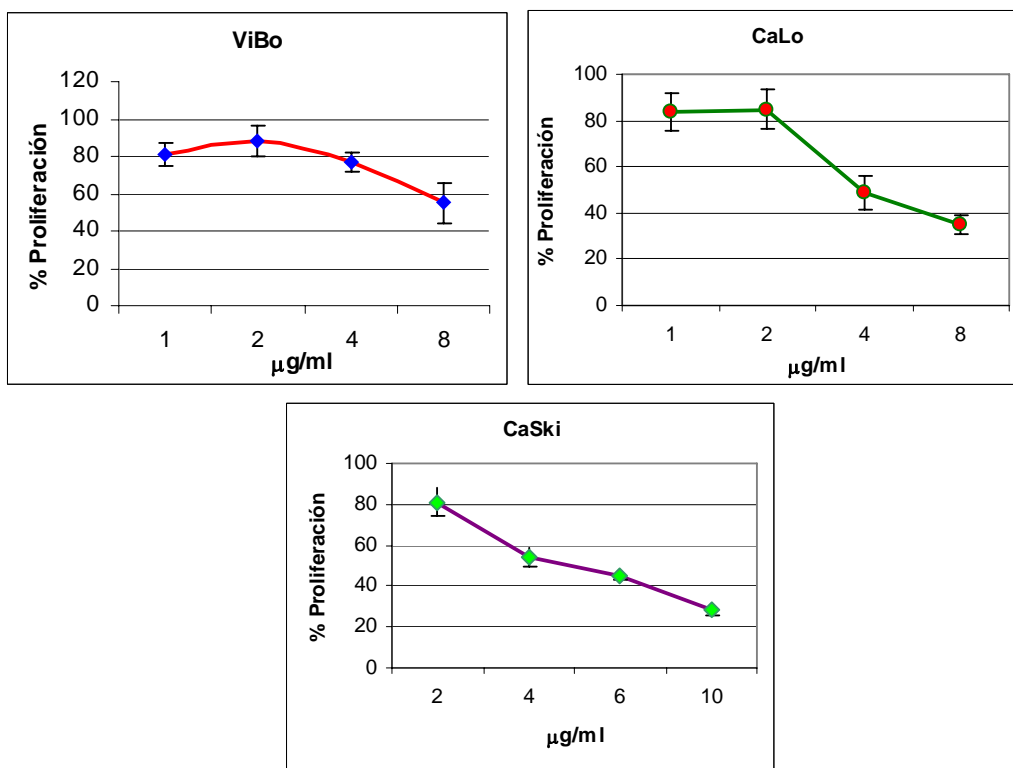


Fig. 12 Curva dosis-respuesta. Efecto de la lactona Arglanina sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares de CaCu ViBo, Calo y CaSki. Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos (5000 células/pozo) por 24 h. de adherencia y tratadas con Arglanina por 24 h. La densidad celular fue evaluada con la técnica de cristal violeta.

Línea celular	IC50 en µg/ml
ViBo	9.4
CaLo	5.49
CaSki	5.05

Tabla 1. Valores de IC₅₀ de la lactona Arglanina para las líneas tumorales de CaCu ViBo, CaLo y CaSki.

Los resultados obtenidos, establecen que el efecto antiproliferativo de la lactona Arglanina es dosis dependiente, es decir, conforme se incrementa la

concentración del compuesto se disminuye el número celular. De manera particular, también se observa que las células ViBo son más resistentes al efecto de la lactona ya que requirió de una mayor cantidad de compuesto para observar un decremento del 50% en la densidad celular, mientras que las células CaLo y CaSki sólo requirieron de 5 $\mu\text{g/ml}$ para obtener la misma actividad antiproliferativa, implicando que la magnitud del efecto es dependiente de la línea celular. De manera paralela, los cultivos en sus diferentes condiciones fueron fotografiados con la intención de observar el efecto de la lactona en la morfología celular (Fig. 13).

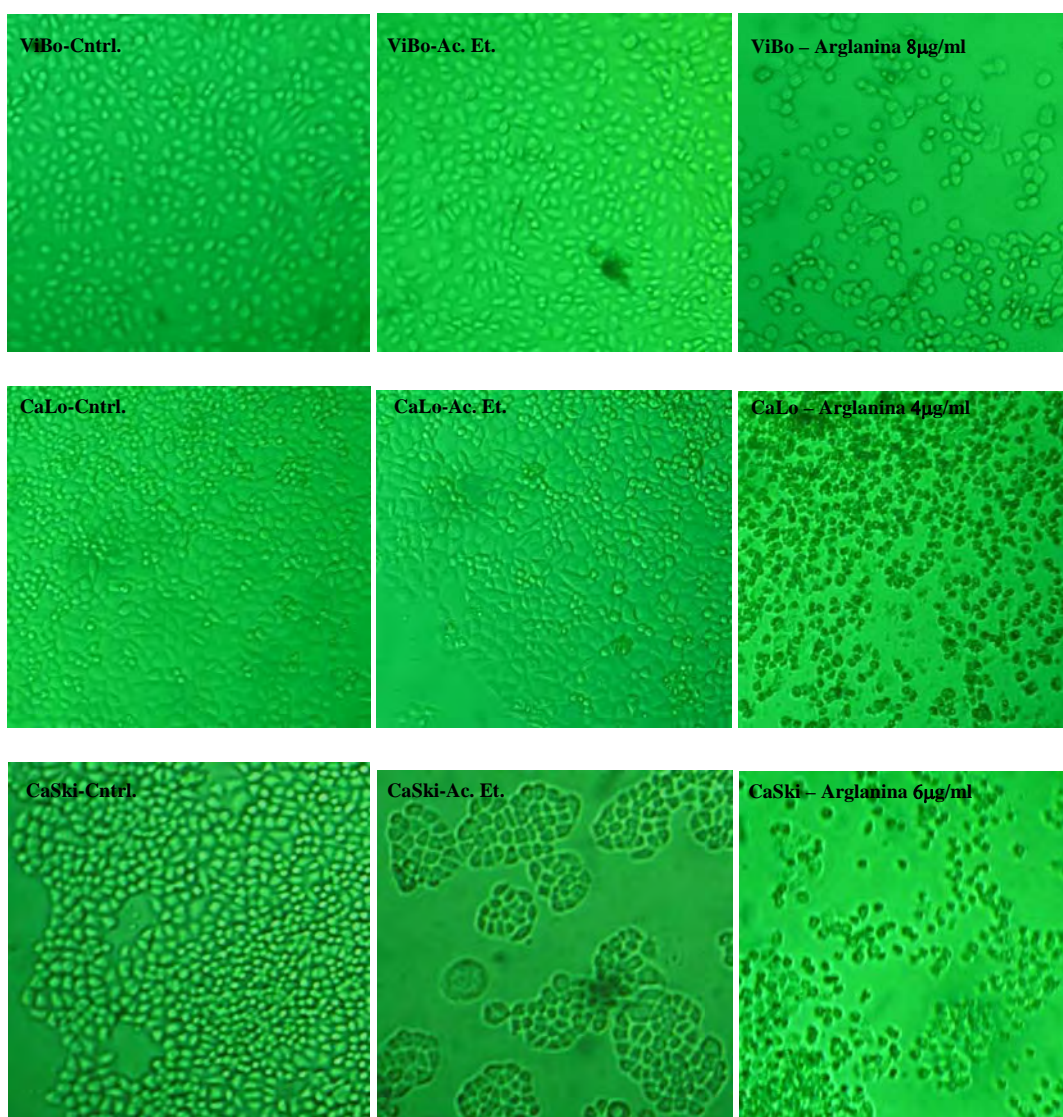


Fig. 13 Efecto de la lactona Arglanina sobre la morfología celular de las líneas tumorales de CaCu. Fotografías de cultivos de células ViBo, CaLo y CaSki tratadas con la concentración que se acercaba a la IC_{50} respectiva para cada línea celular. Cntrl. control; Ac. Et. Acetato de etilo.

Las fotografías de la figura 13 muestran que la Arglanina afecta la morfología de las tres líneas tumorales, observando células con morfología redonda que denota una pérdida de la adherencia celular, también se observa una disminución en la proporción núcleo citoplasma que da como consecuencia un menor tamaño de las células. No obstante el efecto de la lactona en la morfología celular, la causa del decremento de la densidad celular aún no es clara, por lo que se determinó si el efecto antiproliferativo de Arglanina es debido a la detención en alguna fase del ciclo celular. Para ello, cultivos de las diferentes líneas tumorales de CaCu fueron estimuladas con la lactona y la distribución de ADN en las diferentes fases del ciclo evaluada por citometría de flujo (Fig. 14 y Tabla 2).

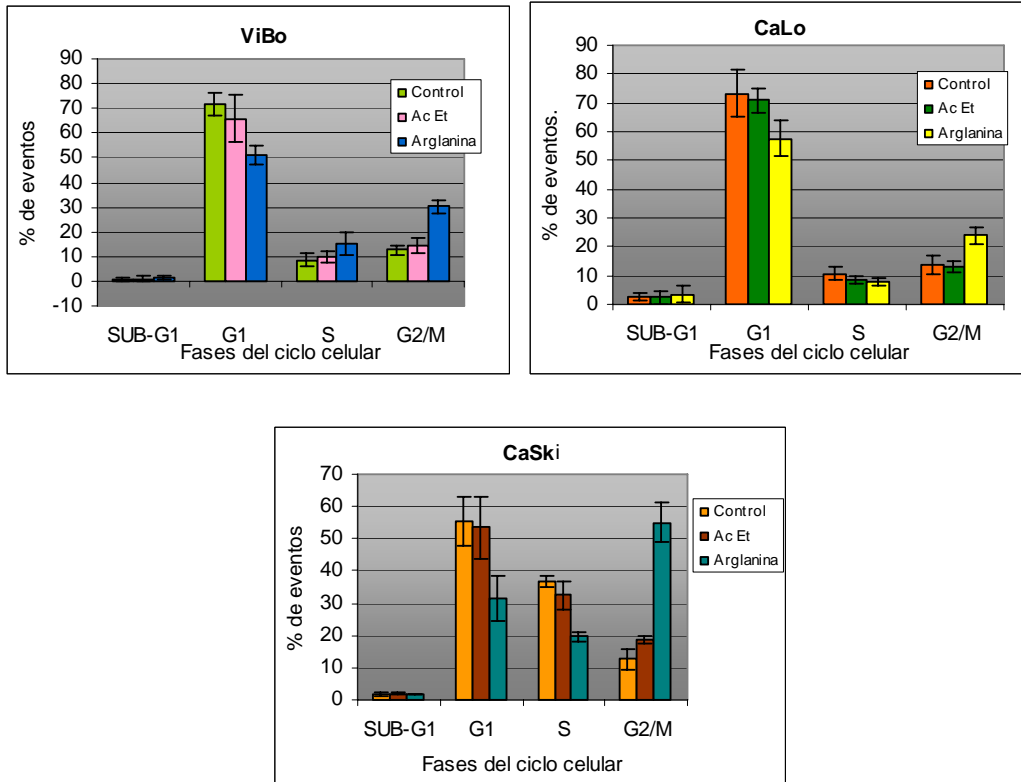


Fig 14. Efecto de la lactona Arglanina sobre la distribución de la cantidad de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las líneas de cáncer cérvico-uterino ViBo, CaLo y CaSki. * $p < 0.05$ vs Ac. Et. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

ViBo	CONTROL		Ac Et		ARGLANINA	
	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
Sub-G1	0,705	0,52	0,94	1,16	1,72	0,78
G1	71,53	4,80	65,75	9,57	51,27*	3,93
S	8,44	2,61	9,8	2,29	15,41	4,46
G2/M	12,56	1,94	14,37	2,87	30,31*	2,72
CaLo						
Sub-G1	2,73	1,13	2,52	2,34	3,41	2,94
G1	73,26	8,35	70,92	4,39	57,39*	6,19
S	8,44	2,20	8,62	1,27	7,92	1,51
G2/M	12,56	3,44	13,14	1,79	24,11*	2,94
CaSki						
Sub-G1	1,76	0,62	13,14	0,34	1,89	0,09
G1	55,60	7,48	53,46	9,45	31,59*	6,91
S	36,78	1,95	32,41	4,58	19,64*	1,58
G2/M	12,65	3,38	18,69	1,4	55,04*	6,02

Tablas. 2 Efecto de la lactona Arglanina en la distribución de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las líneas de CaCu ViBo CaLo y CaSki evaluadas por citometría de flujo. Las cantidades están expresadas en porcentajes y representan el promedio de un mínimo de cinco eventos independientes. *p<0.05 vs Ac. Et. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se observa en la figura 14 y la Tabla 2, la Arglanina induce en las tres líneas tumorales un incremento en las células que se encuentran en la fase G2/M, mientras que se observa un decremento en las células que están en la fase G1, sugiriendo que la Arglanina induce un decremento en la fase G1 para detenerlas en la fase G2/M.

Con la intención de determinar si la detención en la fase G2/M inducida por la Arglanina en las tres líneas tumorales, es para inducir a las células a una muerte por apoptosis, cultivos de células ViBo, CaLo y CaSki fueron estimulados con 9.4 5.49 y 5.05 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, la observación de cuerpos apoptóticos, la expresión de procaspasa 3 y la fragmentación de ADN fueron evaluadas a través de la tinción con el fluorocromo DAPI, por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente, como tres parámetros de muerte por apoptosis (Fig. 15, 16 y 17).

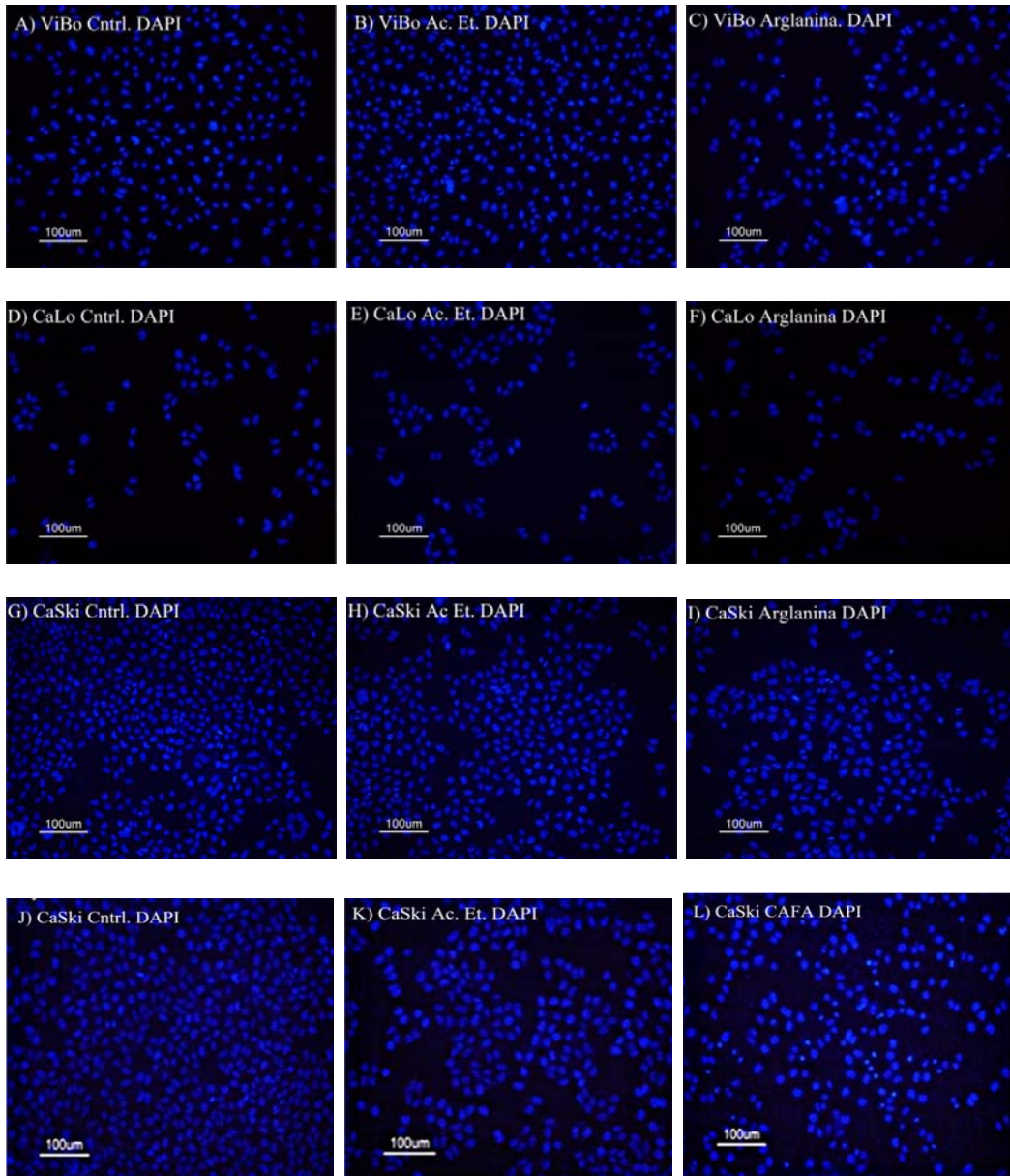


Fig. 15 Observación de núcleos de células tumorales tratadas con $9 \mu\text{g/ml}$ para ViBo, $5.49 \mu\text{g/ml}$ del compuesto para las células CaLo y $5.05 \mu\text{g/ml}$ del compuesto para las células CaSki durante 24h. A., B y C: fotografías de células ViBo; D, E y F: fotografías de células CaLo; G, H e I: fotografías de células CaSki y J, K y L: fotografías del control positivo con la lactona CAFA en la línea celular CaSki. Los núcleos fueron marcados con el fluorocromo DAPI y observados en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON). Las flechas indican los núcleos compactados que presentan la cromatina condensada. Las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. Cntrl. control; Ac. Et. Acetato de etilo.

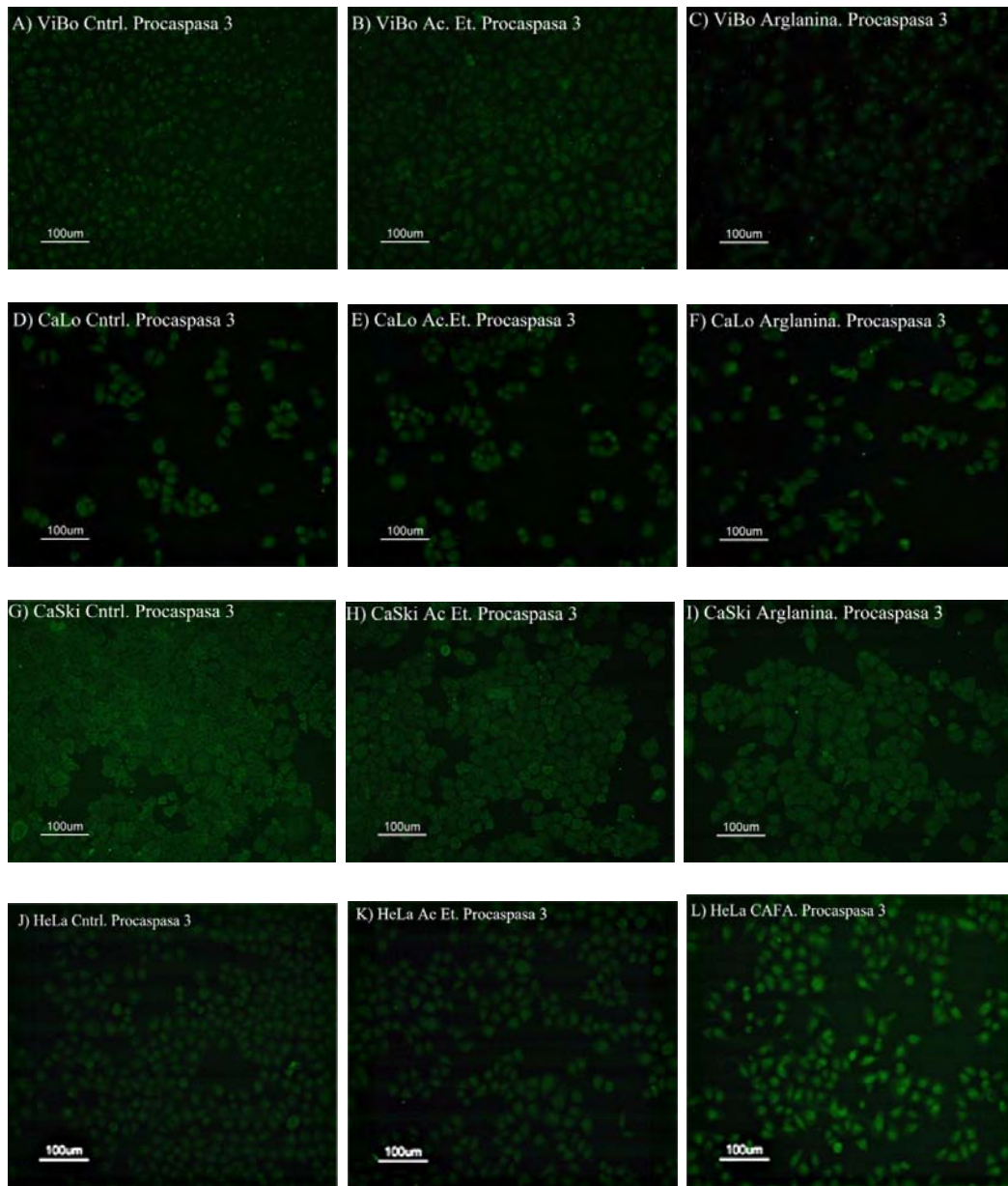


Fig. 16 Expresión de la procaspasa-3 en cultivos de células tumorales tratadas con 9.4 $\mu\text{g/ml}$ de Arglanina para las células ViBo, 5.49 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto para las células CaLo y 5.05 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto para las células CaSki durante 24h. A., B y C: fotografías de células ViBo; D, E y F: fotografías de células CaLo; G, H e I: fotografías de células CaSki y J, K y L fotografías del control positivo con la lactona CAFA en la línea celular HeLa. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON) y las imágenes fueron capturadas con una cámara NIKON acoplada a la computadora. Las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. Cntrl. control; Ac. Et. Acetato de etilo.

Como observamos en los resultados anteriores para las tres líneas celulares la presencia de la expresión de la procaspasa-3 son negativos, pero estos considerados como una fase intermedia del proceso apoptótico por lo que para descartar por completo este efecto se realizaron pruebas de detección de

fragmentación de ADN como prueba concluyente de un proceso apoptótico, por lo que 50 000 células de las tres líneas celulares de CaCu fueron sembradas en cubreobjetos para después de 24h. ser tratadas con sus IC₅₀ y ser evaluadas mediante la técnica TUNEL.

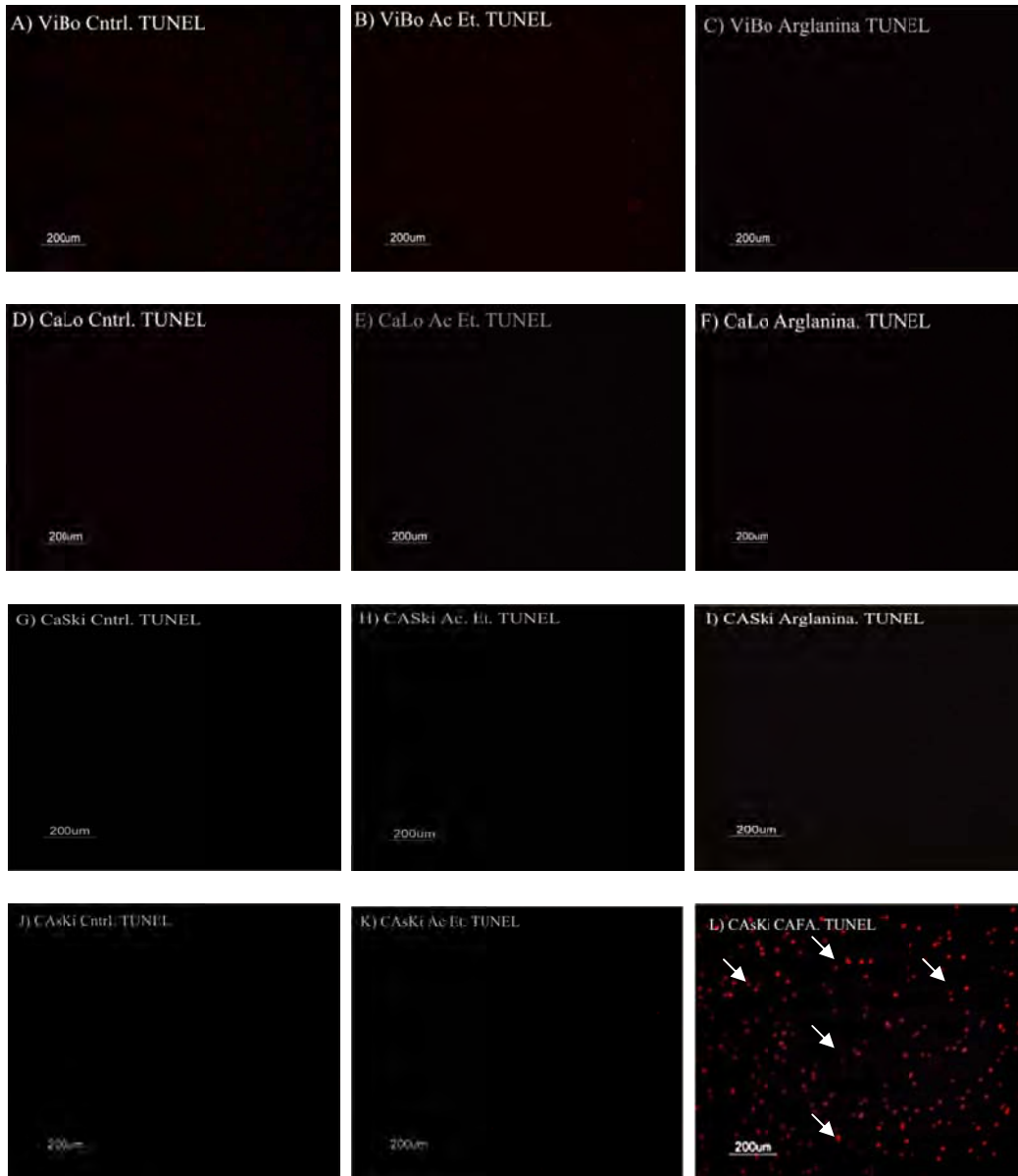


Fig. 17 Detección de fragmentos de ADN en cultivos de células tumorales tratadas con 9 µg/ml de Arglanina para las células ViBo, 5.49µg/ml del compuesto para las células CaLo y 5.05 µg/ml del compuesto para las células CaSki durante 24 h. A., B y C: fotografías de células ViBo; D, E y F: fotografías de células CaLo; G, H e I: fotografías de células CaSki y J, K y L fotografías del control positivo con la lactona CAFA en la línea celular CaSki. La detección de ADN fragmentado fue evaluada mediante la técnica de TUNEL observada por epifluorescencia a través del fluorocromo rodamina. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON) y las imágenes fueron capturadas con una cámara

NIKON acoplada a la computadora. Las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. Cntrl. control; Ac. Et. Acetato de etilo.

Como se observa en los resultados anteriores tanto la sobre expresión de procaspasa-3 y Tunel son negativos en relación al efecto que tiene la lactona Arglanina sobre las líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino, descartando un efecto apoptótico sobre las líneas CaSki, CaLo y ViBo.

Por otro lado cabe la necesidad de saber si la lactona presenta algún efecto sobre células normales, para determinar si existe diferencia en cuanto a la respuesta de las células ante el compuesto, con este propósito células fibroblásticas obtenidas de muestras de cérvix, fueron estimuladas con cada una de las IC₅₀ obtenidas para cada una de las líneas tumorales, y después de 24 h evaluar la densidad celular a través de la técnica de cristal violeta.

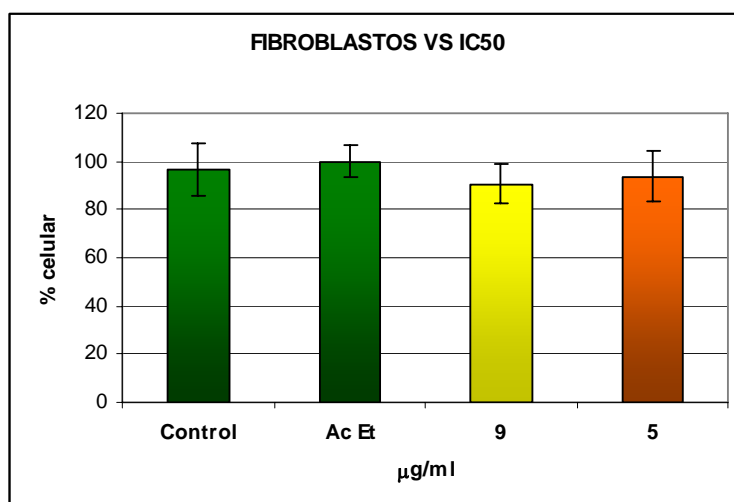


Fig. 18 Efecto de la lactona Arglanina sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano. 7500 células fibroblásticas fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos en RPMI-1640 al 10% de SFB y fueron tratadas con la lactona Arglanina por 24 h. la densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. Control, Ac. Et. (Acetato de Etilo) y 9.4 y 5 µg/ml concentraciones de Arglanina utilizados. * $p < 0.05$ vs Ac. Et. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

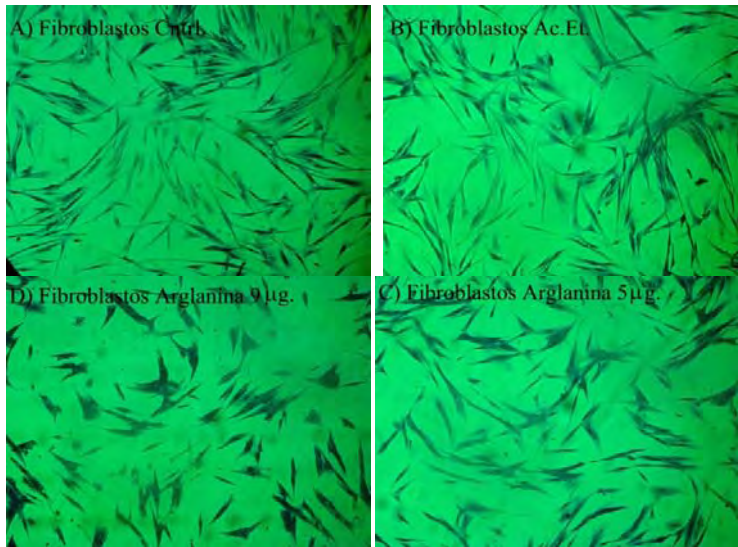


Fig. 19 Efecto de la lactona Arglanina sobre la morfología de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano. Control, Ac. Et. (Acetato de Etilo) y 5 y 9.4 $\mu\text{g/ml}$ concentraciones de Arglanina utilizadas. Evidenciando un cambio en las características morfológicas de las células expuestas e 9.4 $\mu\text{g/ml}$

Los resultados muestran que las células fibroblásticas no son afectadas con ninguna de las concentraciones utilizadas para las líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino a pesar de que morfológicamente las células con la concentración de 9.4 $\mu\text{g/ml}$ presenta una ligera retracción del citoplasma ver figura 19:D, estadísticamente observamos que solo presenta una disminución del 10 % de la población valor que no es significativo (Fig. 18), demostrando que las células tumorales son más sensibles a la lactona que las células normales.

ANALISIS DE RESULTADOS

La valoración de la actividad biológica de compuestos de origen vegetal ha llevado en los últimos años a una exploración de estos compuestos en varios campos de la salud humana. Datos epidemiológicos muestran que el tipo de dieta está relacionada con el progreso y desarrollo de diversas patologías ya sea contribuyendo al aumento o disminución de su incidencia en una población determinada (O'Prey *et al.*, 2003).

El creciente empleo de productos naturales en la prevención y cura de diferentes enfermedades ha incrementado el interés por evaluar la actividad antitumoral de nuevos extractos de plantas, especialmente de aquellas perteneciente a la flora endémica de cada país (Colom *et al.*, 2005).

Las lactonas sesquiterpénicas (LSs) se ubican como un grupo importante de productos naturales obtenidos de muchas especies de plantas medicinales, especialmente provenientes de la familia Asteraceae (Compositae).

En investigaciones recientes sobre estudios de cáncer *in vitro* y modelos animales *in vivo* se ha demostrado la capacidad que presentan diversas lactonas para ejecutar su respuesta citotóxica a través de la inhibición de respuestas inflamatorias, prevención de la metástasis e inducción de la apoptosis (Siyuan *et al.*, 2005)

Los resultados obtenidos para la lactona Arglanina, establecen que ésta posee un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre líneas de cáncer cérvico-uterino, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto se disminuye el número celular. Las concentraciones de lactona Arglanina requeridas para inducir un decremento del 50% en el número celular en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (IC₅₀ 9.4 µg/ml para ViBo; 5.49 µg/ml para CaLo y 5.05 µg/ml para CaSki) son muy similares con las obtenidas para otras lactonas, por ejemplo se ha reportado, una IC₅₀ de 4 y 8 µg/ml de lactona Dehidrocostus en células de cáncer de mama MCF-7 (Po-Lin Kuo *et al.*, 2009), o con la lactona Partenolida, en células de cáncer de cérvix SiHa, donde se reportó una IC₅₀ de 2.7 µg/ml y de 2.8 µg/ml en células MCF-7 (Wu *et al.*,

2006). Sin embargo, las concentraciones de lactonas para determinar las IC_{50} dependen de la línea celular y se han registrado un rango muy amplio donde se describen concentraciones que van desde 0.5 μM (Lactona Helenalin en células T Jurkat (Carsten *et al.*, 2009)) hasta 500 μM (Partenolida en células de cáncer de pulmón A549) (Liang-Jie *et al.*, 2009), aunque la mayoría está entre los 5 y 100 μM .

Por otro lado, el requerir una concentración mayor o menor de la lactona para ejercer el mismo efecto antiproliferativo en cada línea celular, sugiere que existe una diferencia en la sensibilidad de éstas en respuesta a la lactona. Tratando de explicar esta diferencia en la sensibilidad entre las tres líneas tumorales CaLo, CaSki y ViBo, es prudente tomar en cuenta que dichas células provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino, se encuentran infectadas con el virus del papiloma humano tipo 16 para CaSki, tipo 18 para CaLo, y HPV negativo para ViBo (Phelps *et al.*, 1988, Castellanos, 2003), lo cual abre la posibilidad de que la sensibilidad a la lactona en las células de cáncer cérvico-uterino esté relacionado con la presencia o ausencia del HPV, ya que tanto para CaLo (HPV-18) así como para CaSki (HPV-16) se obtuvo una IC_{50} muy similar, mientras que para las células ViBo su IC_{50} fue casi del doble que el de las células que presentan HPV. Sería importante que en un futuro, se llevara a cabo ensayos en más líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino infectadas con HPV-16, 18 y sin HPV con el propósito de establecer si está o no relacionada la sensibilidad de la respuesta a la lactona Arglanina con la presencia del HPV y con el tipo 16 y 18.

Respecto a la evaluación del ciclo celular en cada línea tumoral, la Arglanina presentó su acción en la fase G2/M, concordando con el efecto descrito para otras lactonas sesquiterpénicas en diferentes tipos de células cancerosas, donde en la mayoría, las lactonas actúan en la fase G2/M, por ejemplo, las lactonas tormentosina e inuviscolida se les ha asociado arresto en la fase G2/M (Rozenblata *et al.*, 2007), también se ha reportado esta acción para las lactonas Helenalina y Dehidrocostus entre otras (Carsten *et al.*, 2009 y Choi *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestro grupo de trabajo encontró que la lactona Schkuhriolida indujo una disminución en la fase G1 y un aumento notorio en la

fase sub-G1 (Cansino *et al.*, 2007), indicando que la acción sobre el ciclo celular no está restringido únicamente a la detención en la fase G2/M. La relevancia de inducir una detención en la fase G2/M es que se ha demostrado que en células irradiadas se han obtenido curvas de supervivencia celular a diferentes dosis (como la lactona partenolida en células de cáncer de próstata (Watson *et al.*, 2009)) y se han evaluado los efectos de la radiación en diversos puntos del ciclo celular (Sinclair, *et al.*, 1966). Desde 1963 se demostró que las células HeLa sincronizadas eran más sensibles a la radiación durante la fase G2/M y S temprana, y más resistentes durante la fase S tardía y G1 temprana (Rudoltz, 1996), confiriéndole a la lactona Arglanina un posible efecto radiosensibilizante.

El mecanismo por el cual la Arglanina realiza esta acción en la fase G2/M aún no está estudiada, sin embargo, en otras lactonas como dehydrocostus, se ha descrito que en la línea celular SK-OV-3 de cáncer de ovario causa una ligera disminución en la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular y de la ciclina E CDK4, así como un pequeño aumento en la expresión de la CDK inhibidor p21Cip1. Además, como resultado de la detención, una disminución significativa en CDK1 junto con ciclina A y ciclina B, se cree que es el mecanismo por el cual la lactona dehydrocostus provoca detención del ciclo celular (Choi *et al.*, 2009).

Con respecto a la falta de inducción a una muerte por apoptosis observada en la Arglanina, podría deberse a una falta de tiempo de inducción, ya que la Arglanina sólo tuvo 24 h. de acción y se ha reportado que la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas que se les ha reportado acción inductora de apoptosis lo hacen en un tiempo de 48 h., como es el caso de la lactona Dehidrocostus que ejerce una inducción de muerte apoptótica de 24 o 48 h., (Hung *et al.*, 2009)., dependiendo de la línea celular, o en el caso de la lactona Tormentosina que induce apoptosis en un tiempo de 48 h. en células de melanoma SK-28 (Rozenblata *et al.*, 2007), o de la lactona Partenolida, que también induce muerte apoptótica a las 48 h en células de cáncer de pulmón A549 (Liang-Jie *et al.*, 2009 y Wen *et al.*, 2002),entre otras. Sería conveniente, en un futuro cercano, evaluar sí la lactona Arglanina induce muerte por

apoptosis a las 48h., con el propósito de confirmar si realmente tiene esta acción o no. También sería interesante determinar el mecanismo por el cual se lleva a cabo la muerte por apoptosis ya que se ha reportado en algunas lactonas, que la inducción de apoptosis parece estar relacionado con la activación de p53 y la liberación del citocromo c (Choi *et al.*, 2009). No obstante que la mayoría de las lactonas detienen en la fase G2/M e inducen muerte por apoptosis a las 48 h., nuestro grupo de trabajo encontró que la lactona CAFA, tiene un efecto antiproliferativo a las 24 h., induciendo muerte por apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo sin alterar su ciclo celular (Ornelas, 2009), indicando que la acción antiproliferativa e inductora de apoptosis podrían ser independientes del ciclo celular.

Por otro lado es importante mencionar que en la mayoría de las lactonas o compuestos que describen actividad antitumoral, su efecto citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e inductor de apoptosis solo ha sido evaluado en líneas tumorales, careciendo en la mayoría de los casos de controles normales. Algunos comparan el efecto en líneas celulares normales, las cuales presentan una característica común con las células tumorales, ambas proliferan sin control, por lo que los resultados no son muy claros o contundentes. Otro control utilizado es el uso de células provenientes de ratón, sin embargo, éstas pueden responder de manera diferente a como lo haría una célula humana (Siyuan *et al.*, 2005). Por ello se recomienda el uso de células humanas, de preferencia del mismo origen o estirpe, para comparar los efectos observados.

En el caso de la lactona Arglanina el efecto antiproliferativo fue evaluado en células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano, ya que estas células forman parte del microambiente del cérvix normal así como del microambiente tumoral, además de presentar un fuerte potencial proliferativo que aunque lo idóneo sea utilizar células epiteliales del cérvix, la célula fibroblástica permite mantenerla proliferando en cultivo mientras que las células epiteliales del cérvix hasta el momento no se ha podido lograr. Sorprendentemente, ninguna de las concentraciones que indujeron un decremento en las células tumorales (5 y 9.4 $\mu\text{g/ml}$) afectó significativamente el potencial proliferativo de las células fibroblásticas, adjudicándole a la lactona

Arglanina un acción selectiva, que podría ser valorada para una posible aplicación terapéutica. Sin embargo, en la concentración de 9 $\mu\text{g/ml}$, la morfología de las células fibroblásticas se observa alterada, generando la posibilidad de que estas células podrían ser afectadas considerablemente en un mayor tiempo, así como el de afectar elementos del citoesqueleto, como los microtúbulos, sólo por mencionar alguno. Cabe resaltar que el tiempo de inducción de la Arglanina en los cultivos asincrónicos y en fase proliferativa o de crecimiento exponencial de las células fibroblásticas fue de 24 h., generando la posibilidad de no apreciar el efecto antiproliferativo de la Arglanina en estas células que se dividen cada 56 h., sin embargo, en estas condiciones de cultivo, las células pueden encontrarse tanto en la fase S como en G1 y G2/M, que al ser detenidas en la fase G2/M podría reflejar una disminución en esta fase y por lo tanto una disminución en el número celular. No obstante esta apreciación, es conveniente inducir con la lactona Arglanina a cultivos de células fibroblásticas con un mayor tiempo de inducción y evaluar su efecto antiproliferativo, citotóxico y de viabilidad, con el propósito de confirmar su acción selectiva y antitumoral.

CONCLUSIONES.

Las concentraciones a la cual disminuye en un 50% la densidad celular (IC_{50}) la lactona Arglanina para las líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino son: CaSki 5.05 $\mu\text{g/ml}$, CaLo 5.49 $\mu\text{g/ml}$ y ViBo 9.4 $\mu\text{g/ml}$.

La lactona Arglanina altera el ciclo celular de las líneas celulares CaSki, CaLo y ViBo, induciendo una detención en la fase G2/M del ciclo celular.

Arglanina no induce la expresión de la procaspasa-3 y la fragmentación de ADN en las líneas tumorales CaLo, CaSki y ViBo a las 24 h. de inducción.

La Lactona Arglanina no afecta el potencial proliferativo de fibroblastos no tumorales de cérvix con la dosis más alta utilizada (9.4 $\mu\text{g/ml}$).

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. *Biología molecular de la célula*. 4a edición Garland Publishing Inc. New York 1387 pp.
- Barbacid M., 2007. Desvelada una nueva jerarquía en las proteínas del ciclo celular. 1:1-4.
- Becker W., Kleinsmith L., Hardin J. 2007. *El mundo de la célula* 6ª ed. Ediciones pearson eddison wesley. México. 970 pp.
- Beekman H., Schmidt T. 1997. Structure-Cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpen lactones. *J.Nat.Pord.* 60:252-257.
- Bowen I., Bowen S. M. 1990. *Programmed cell death in tumor and tissues*. Chapman and Hall, London. 268pp.
- Braun K., Holz G., Pusch O. 1998. Deregulated expresión of CDK2- or CDK3-asiated kinase activities enhances c-Myc-induced apoptosis. *cell biol.*7:789-98.
- Bravo S. M., Heredia M.F. 2005. Quimioterapia combinada neoadyubante seguida de radioterapia externa en el tratamiento de dos casos de linfoma primario de cuello uterino. *Rev. Biomed.* 70:91-94.
- Caballero B., Morán J. 2002. Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *Rev. Biomed.* 21:235-244.
- Cansino P., Cano A., Escobar ML., Osorio E., Sánchez L. 2007. Efecto antiproliferativo y apoptotico de la lactona Schkuhriolida en células provenientes de cáncer cérvico-uterino CaSki. *2ºCNQM.* 1-5
- Carsten Berges., Dominik Fuchs., Gerhard Opelz., Volker Daniel., Cord Naujokat. 2009. Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms. *Elsevier Ltd. / Molecular Immunology.* 46:2892–2901
- Castellanos M. 2003. Cáncer cervicouterino y el HPV. Opciones de detección. *Revista de la facultad de medicina UNAM.* 46:63-66.
- Castrillo JL.1997. Factores de trascrición específicos de tejido. *Investig Ciencia.* 186:160-169
- Cetina L., Wegman T., Garcia Arias A., Candelaria M., Dueñas A. 2006. Radiosensibilizantes en cáncer cervicouterino. *Cancerología.* 1:4-29.
- Cho J. Y., Kim A. R., Jung J. H., Chum T., Rhee M. H., Yoo E. S. 2004. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene

lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European journal of Pharmacology*. 492:85-94.

- Cho SG., Choi EJ. 2002. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol*. 35:24-27.
- Choi EJ., Ahn WS. 2009. Antiproliferative effects of dehydrocostuslactone through cell cycle arrest and apoptosis in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Int. J. Mol. Med*. 23:211-216.
- Comisión Nacional de Cáncer Cérvico-uterino (CNCC). 2004. Diagnósticos y tratamiento cáncer cérvico-uterino. Gobierno de Chile Ministerio de salud.
- Daniel PT., Koert U., Schuppan J. 2006. Apoptolidin: induction of apoptosis by a natural product. *Angew Chem Int Ed Engl*. 45:872-893.
- Darnell J., Havey L., Baltimore D. 1993. Biología molecular de la celular. 2 edición. Scientific American Books. USA. 920pp.
- Eifel P., Berek., Thigpen J. 2001. Cancer of cervix, vaginal and vulva. Philadelphia. *Lippincott Williams and Wilkins*. 1526-1572.
- Elinos Báez C M., Maldonado V., Meléndez Z. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx*. 139: 493- 497.
- Escandon L., Benitez M., Navarrete E., Martinez M., Escobedo D. 1992. Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud publica de México*. 34:6 607-614
- Félix A. M., Karsetin E. 1997. La división celular. *Mundo científico*. 154:123-130.
- Herrera Cirión. 2005. Anatomía Patológica temas para enfermería. editorial Ecimed, 657pp
- Hidalgo M. 2006. El cáncer Cérvico-uterino, su impacto en México y el porque no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev. Biomed* 16:81-84.
- Hung Jen-Yu., Ya-Ling Hsua., Wen-Chiu Ni., Ying-Ming Tsai., Chih-Jen., Yangb., Po-Lin Kuo., Ming-Shyan Huang. 2009. Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer Elsevier Ireland Ltd*.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2007. "estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer" datos nacionales consulta interactiva de datos. Estadística de mortalidad, consultada en agosto del 2009

- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). 2009. consulta interactiva de datos. Estadística de mortalidad, consultada en agosto del 2009 www.inegi.com.mx
- Kueng W., Silver E., Eppnberg V. 1989. Cuantificación de células cultivadas en 96-wells plates. *Analytical biochemical*. 186:16-19.
- Kurokawa M., Kornbluth S. 2009. Caspases and kinases in a death. *Grip. Cell*. 138:838-54
- Lascano PR., López M., López A., Hernandez C. 1999. Instituto Nacional de Salud Pública de México. *Salud pública de México*. 35:65-73
- Lewin B. 2000. Genes. 5ª ed, McGraw-Hill, Oxford, 2912pp.
- Liang-Jie Fang., Xue-Ting Shao., ShuoWang., Guo-Hua Lu., TaoXu., Jian-Ying Zhou. 2009. Sesquiterpene Lactone Parthenolide Markedly Enhances Sensitivity of Human A549 Cells to Low-Dose Oxaliplatin via Inhibition of NF-κB Activation and Induction of Apoptosis. *Planta Med Georg Thieme*. 67:163-170
- Lodish Harvey., Berk Arnold., Zipursky S., Lawrence., Matsudaira Paul., Baltimore David., Darnell James E. 2005. Biología celular y molecular. Buenos Aires: Médica Panamericana. ISBN 1974pp.
- Martínez M. 1969. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Mas Oliva J. 2004. Diagnósticos moleculares en medicina, 1ª ed., México: Manual moderno. 324p.
- Maton Anthea., Hopkins., Jean J., Susan LaHart., David Quon W., Maryanna Wright., Jill D. 1997. Cells Building Blocks of Life. New Jersey: Prentice Hall. ISBN 423-476.
- Matsueda S., Geissman T. A. 1967. Tetrahedron Letters 2013.
- Matsuoka M., Matsuura Y., Samba K., Nishimoto I. 2000. Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3) in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 273:2442-2447
- Mc Nab J. 1991. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer from: Paterson Symposium No.26 England 450pp
- Meraldi P., Lukas J., Fry A., Bartek J., 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell*. 1: 88-93.

- Merck Sharp & Dohme Copyright 2005 Merck Sharp & Dohme de España,. <http://www.msd.es/publicaciones/mmerck>
- Mesa V., Lomanto L., Ortiz O., Bretón C., Gómez A. 2003. El ciclo celular. *Med UNAB*. 16: 21-29.
- Moeller S.J., Sheaff R.J. 2006. G1 phase: components, conundrums, context. *Results Probl Cell Differ*. 42:1-29.
- Moyzis RK. 1997. El telómero humano. *Investig Ciencia*. 181:211-216
- Nashmyt K. 1996. Putting the cell cycle in order. *Science*. 277:2854-2880.
- O'Prey J., J. Brown., J. Fleming P., R. Harrison. 2003. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 66:2075-2088
- Ornelas, C. C. 2009 Determinación del efecto antiproliferativo de la lactona 7a-hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) en la proliferación, ciclo celular e inducción de apoptosis sobre líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México.
- Phelps W., Yee C., Munger K. 1988. Benignant human larynx lesions and human papilloma virus type 6. *cell* 53:539
- Po-Lin Kuo., Wen-Chiu Ni., Eing-Mei Tsai., Ya-Ling Hsu. 2009. Dehydrocostuslactone disrupts signal transducers and activators of transcription 3 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther*. 8:1328–39.
- Roa S. 2003. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. *Rev. Biomed*.195-199.
- Robles M., Aregullin M., West J., Rodriguez E. 1995. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Med*. 61:199-203.
- Romo de Vivar., A., Vázquez F., Zetina C., 1977. *Rev. Latinoam. Quím*. 8, 127pp.
- Rosen E., Fan S., Goldberg I., 1999. The molecular and cellular basis of radioresitivity: implications for understanding how normal tissues and tumor respond to therapeutic radiación. *Cancer Invest*. 17:1 56-72
- Rozenblata Sharon., Shlomo Grossmana., Margalit Bergmana., Hugo Gottlieb., Yigal Cohena., Sara Dovrata. 2007. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines *Biochem Pharmacol*. 75:369-382.

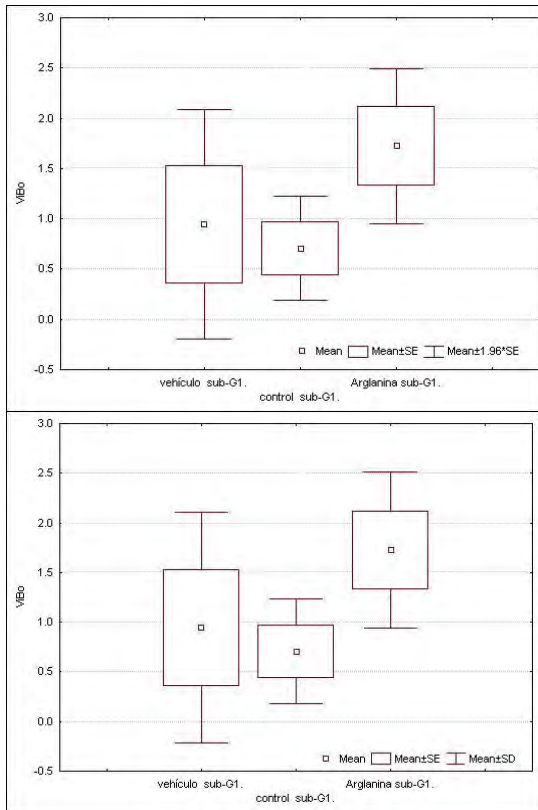
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 1997. Compositae. Tribu Anthemideae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 60. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Rubin Philip. 2003. Oncología clínica enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 8ª ed. Elsevier science Madrid España. 647pp.
- Rudoltz Ms., Kao G., Blank KR., Muschel RJ., McKenna WG.1996. Molecular Biology of the cell Cycle: potencial for Therapeutic Applications in Radiation Oncology. *Semin Radiat Oncol.* 6:284-294.
- Scotti T., Fernandes B., Ferreira P., Emerenciano P. 2007. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 15:2927-2934.
- Shackelford RE., Kaufmann WK., Paules RS. 1999. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect. Suppl.* 1:5-24.
- Sinclair W K., And Morton RA. 1966. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cell. *Radiat.* 29:450-474.
- Siyuan Zhang., Yen-KimWon., Con-Nam Ong., Han-Ming Shen. 2005. Anti-cancer Potencial of sesquiterpene lactones:Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr. Med. Chem.* 5: 239-249.
- Tavassoli. 1980. The cell theory: a foundation to the edifice of biology. *American Journal of Pathology January.* 1: 44-61
- Teja Chayeb., Salas Garcia., Salcedo Bargas. 1996. Bases moleculares de la carcinogénesis viral del papiloma y palioma. *Salud publica de México.* 38:47-57.
- Trejo J., Piriz M. V., Llorens-Martin A., Fernández M., Bolós D., LeRoith A., Núñez I., Torres-Aleman. 2007. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry.* 12:1118-28.
- Ventura G., Gómez E., Zentella D. 1999. Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. *BEB.* 18:153-165
- Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García, 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- Watson Christopher., Douglas A. Miller., Helen Chin-Sinex., Adam Losch., William Hughes., Christopher Sweeneyb., Marc S. Mendonca. 2009. Suppression of NF- κ B Activity by Parthenolide Induces X-Ray Sensitivity through Inhibition of Split-Dose Repair in TP53 Null Prostate Cancer Cells. *Radiation Research*. 171:389-396.
- Weinberg R.A. 1996. How cancer arises. *Scientific American*, 275: 62-70.
- Wen J., You K.R., Lee S. Y., Song C.H. Kim, D.G. 2002. Oxidative Stress-mediated Apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide *J. Biol. Chem*. 277:38954-38964
- Wu C., Chen F., Rushing JW., Wang X., Kim HJ., Huang G., Haley-Zitlin V, He G. 2006. Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines. *J Med Food. Spring*. 9:55-61.
- Zhang Pumin. 1995. The cellular and development: redundant of cell cycle regulators. *Curr. Opin. Cell biol*, 11:655-662

ANEXO

Resultados sometidos a un análisis estadístico de varianza ANDEVA, con una significancia de $p < 0.05$, seguida de una prueba de Tukey, realizado en el paquete StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7.

Células ViBo estimuladas con $9 \mu\text{g/ml}$ fijadas y procesadas después de 24h del estímulo.

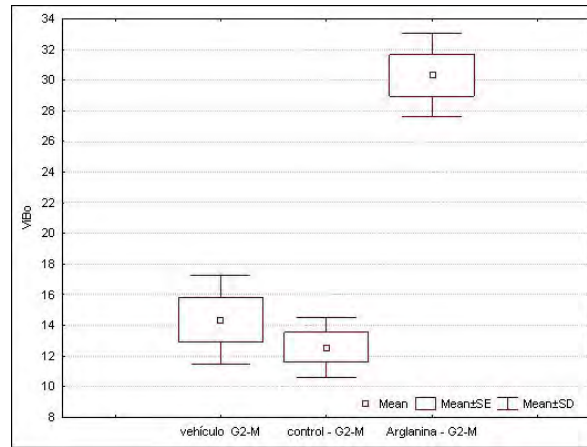


Tukey HSD test; Variable: ViBo (SUB-G1)
Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}
	M=.94500	M=.70500	M=1.7250
vehículo sub-G1{1}		0,919787	0,444137
control sub-G1{2}	0,919787		0,270275
Arglanina sub-G1{3}	0,444137	0,270275	

Tukey HSD test; Variable: ViBo (G1)
Marked differences are significant at $p < .05000$

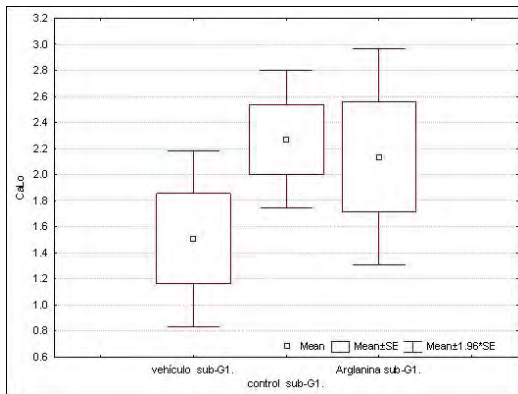
	{1}	{2}	{3}
	M=65.755	M=71.530	M=51.275
Vehículo G1{1}		0,461605	0,030732
Control G1{2}	0,461605		0,004874
Arglanina G1{3}	0,030732	0,004874	



Tukey HSD test; Variable: ViBo (G2-M)
 Marked differences are significant at $p < .05000$

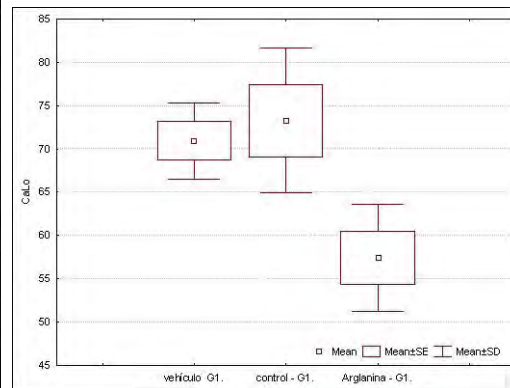
	{1}	{2}	{3}
	M=14.370	M=12.565	M=30.313
Vehículo G2-M {1}		0,593719	0,000196
Control G2-M {2}	0,593719		0,000187
ArglaninaG2-M {3}	0,000196	0,000187	

Células CaLo estimuladas con 5 g/ml, fijadas y procesadas después de 24h del estímulo.



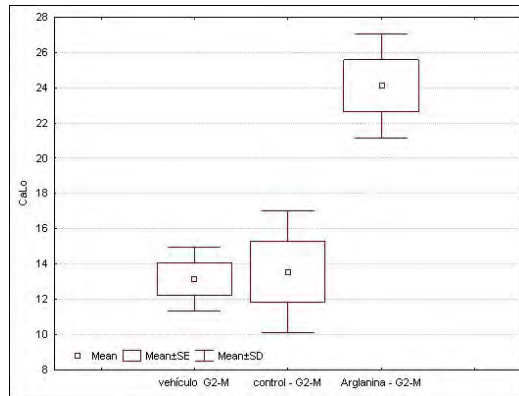
Tukey HSD test; Variable: CaLo (SUB-G1)
 Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}
	M=1.5100	M=2.2700	M=2.1350
Vehículo sub-G1{1}		0,322549	0,451039
Control sub-G1{2}	0,322549		0,960309
Arglanina sub-G1{3}	0,451039	0,960309	



Tukey HSD test; Variable: CaLo (G1)
 Marked differences are significant at $p < .05000$

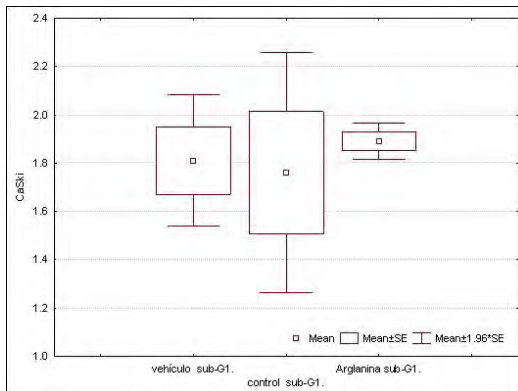
	{1}	{2}	{3}
	M=70.925	M=73.260	M=57.395
Vehículo G1{1}		0,870200	0,040171
Control G1{2}	0,870200		0,018391
Arglanina G1{3}	0,040171	0,018391	



Tukey HSD test; Variable: CaLo (G2-M)
Marked differences are significant at $p < .05000$

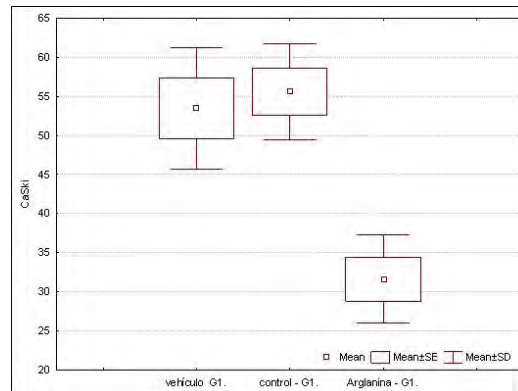
	{1}	{2}	{3}
	M=13.145	M=13.575	M=24.110
vehículo G2-M {1}		0,974684	0,001109
control G2-M {2}	0,974684		0,001415
Arglanina G2-M {3}	0,001109	0,001415	

Células CaSki estimuladas con 5 g/ml, fijadas y procesadas después de 24h del estímulo.



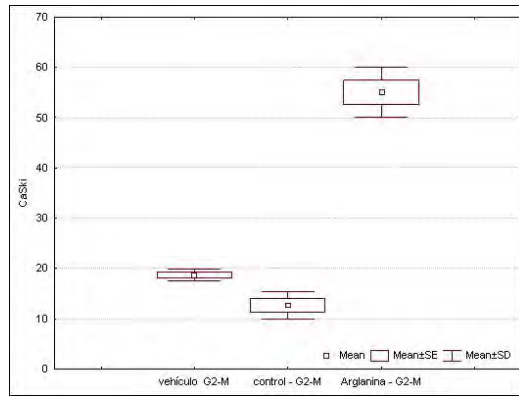
Tukey HSD test; Variable: CaSki (SUB-G1)
Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}
	M=1.8100	M=1.7600	M=1.8900
Vehículo sub-G1 {1}		0,976114	0,940094
Control sub-G1 {2}	0,976114		0,850950
Arglanina sub-G1 {3}	0,940094	0,850950	



Tukey HSD test; Variable: CaSki (G1)
Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}
	M=53.460	M=55.603	M=31.590
Vehículo G1{1}		0,890316	0,002932
Control G1{2}	0,890316		0,001636
Arglanina G1{3}	0,002932	0,001636	



Tukey HSD test; Variable: CaSki (G2-M)
 Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}
	M=18.698	M=12.653	M=55.042
vehículo G2-M {1}		0,070403	0,000183
control G2-M {2}	0,070403		0,000183
Arglanina G2-M{3}	0,000183	0,000183	

APÉNDICE

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

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

Amonoácidos

L- arginina	0.200000
L-aspargina	0.050000
L-ácido aspárgico	0.200000

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

Vitaminas

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

Verseno

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

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

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 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 las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio Co.U.S.A)	0.10 g (sigma chemical
Cloruro de calcio Co.U.S.A)	0.10 g (sigma chemical
Cloruro de sodio Co.U.S.A)	8.00 g (sigma chemical

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

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4° hasta el momento del uso.

Colorante Cristal Violeta

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

Desactivación del suero

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