



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

LABORATORIO N° 2 DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ)

**“Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del
capsaicinoide 12-Fenilacetilrinvanil (12-FAR), en células de
cáncer cervicouterino”**

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:

DIANA CASANDRA RODRÍGUEZ BALLESTEROS

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA EL
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna RODRÍGUEZ BALLESTEROS DIANA CASANDRA, con número de cuenta 303227265, de la carrera de Biología se le ha fijado el día 25 del mes de septiembre de 2012 a las 14:00 hrs. para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES
VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
SECRETARIO M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
SUPLENTE BIOL. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ
SUPLENTE BIOL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del capsaicinoide 12-Fenilacetilirivanil (12-FAR), en células de cáncer cervicouterino.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 4 de septiembre de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
DR. CARLOS CASTILLO CRUZ
JEFE DE CARRERA

“Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría, y que obtiene la inteligencia; porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata, y sus frutos más que el oro fino.”

Proverbios 3:13-14

Estoy agradecida por muchas cosas. . .

Primero estoy agradecida con Dios por siempre acompañarme en el sendero de la vida, por las circunstancias, por todo lo bueno y lo malo y por nunca dejarme sola. Sería necesario escribir un tomo completamente aparte, para poder expresar lo agradecida que estoy con cada una de las personas que han formado parte fundamental de mi formación como ser humano a lo largo de toda mi vida, así que simplemente GRACIAS por cada alegría, cada sonrisa, cada historia compartida, cada enseñanza; porque sin duda este logro no habría sido posible sin la intervención de todos los que amo.

A mi familia, por ser el soporte y apoyo que se necesita en la vida.

A mi Papá, por aparecer justo en el momento preciso, por amarme y guiarme, por ser como un superhéroe con el que sé que mi mamá, mi hermano y yo contamos siempre. Papi, te amo, eres un ejemplo a seguir, un padre excepcional, soy la más feliz, afortunada y agradecida de ser tú hija. Gracias por el apoyo, por las risas, la diversión, los consejos y también los regaños. Gracias papi, te amo mucho mucho.

A mi Mamá, por ser más que una mejor amiga, por el amor que puedo ver todos los días, por ser una mujer que no se rinde y lograr que sonría en los momentos más difíciles. Mami te amo, y no cambiaría ni un día de nuestra historia juntas, no cambiaría el hecho de ser tu hija, tu compañera, tu amiga. Gracias mami por escucharme todos los días a todas horas, por las risas, por las largas platicas, por ver más allá en mí de lo que yo muchas veces pude ver. Te amo mamá.

A mi hermano Eduardo Josafat, por las risas, las peleas, las desveladas, las diversiones, la confianza. Eduardo, te amo por ser tan latoso y besucón, por inteligente y ocurrente. Esfuérzate y trabaja por conseguir lo que ya has soñado, y nunca olvides que, mientras viva, aquí voy a estar para apoyarte en todo momento, aconsejarte, y para festejar tus logros y alegrías. Te amo pequeño.

A toda mi familia en general. Abuelos, abuelas, tíos, tías, primos y primas por compartir su vida junto con la mía, por el camino que hemos recorrido juntos.

A mis amigos, las chicas, Valeria, Betzabe, Magaly y Gisela y a mi único mejor amigo hombre Luis por convertirse en mis hermanos, para sobrellevar los momentos difíciles y para disfrutar mis alegrías, gracias por todas las risas, lagrimas, abrazos, fotos, historias y risas.

Agradecimientos

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme trabajar en su laboratorio, por la orientación y enseñanza durante todo este trabajo y especialmente por siempre tener paciencia y disposición para resolver mis dudas. Innegablemente un profesor que además de instruir, inspira.

Al Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por brindarme su conocimiento y tiempo para realizar este trabajo, siempre de una manera amena y amable.

Al M. en C. Hugo López Muñoz y a la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por sus contribuciones en la parte experimental de este trabajo.

Al M. en C. Carlos Bautista Reyes, a la M. en C. Rosalva Rangel Corona y a la Biól. Reynalda Roldan Pérez, por sus aportaciones y observaciones a este trabajo.

Al Dr. Ignacio Regla y al Laboratorio de Síntesis Orgánica UMIEZ, por elaborar el compuesto con el que se realizó mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y de carrera Berenice, Alexis, Veverly, Javier, Humberto y Arturo, por hacer las horas cortas y las diversiones largas, por las pláticas interminables y todos los momentos que pasamos juntos.

Esta tesis fue realizada con apoyo del proyecto PAPIME: PE 206812

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	
La célula	5
Renovación celular	5
Muerte celular	11
Apoptosis	12
Necrosis	13
Cáncer	16
VPH	17
Cáncer cervicouterino	18
Tratamientos contra el cáncer	18
Capsaicina	19
12-FAR	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
METODOLOGÍA	26
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
CONCLUSIONES	48
LITERATURA CITADA	49
APÉNDICE	52

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es uno de los tipos de cáncer de alta incidencia, ocupando el segundo lugar en mujeres, tanto a nivel mundial como nacional. Esta enfermedad puede ser prevenida con detección y tratamiento oportunos; sin embargo, frecuentemente esta enfermedad es detectada en estadios avanzados. Los tratamientos existentes para combatir el cáncer cervicouterino son eficientes en estados tempranos de la enfermedad y/o en tumores únicos, sin embargo, en estadios avanzados o en pacientes con metástasis resultan ser ineficientes. Además, de ser agresivos y poco selectivos, generando efectos secundarios que son perjudiciales para el paciente al afectar células que son sanas. Por tal motivo, hoy en día se ha generado un fuerte interés por la búsqueda de nuevas alternativas contra esta patología que presenten una mayor selectividad entre células normales y células transformadas. Al respecto, la capsaicina es un compuesto proveniente de las plantas del género *Capsicum* y ha llamado la atención debido a la actividad antiproliferativa mostrada sobre líneas celulares tumorales, aunque posee ciertas desventajas debido a sus propiedades irritantes, su acción hiperalgésica, su alto costo y su bajo rendimiento, generando la necesidad de buscar un análogo de la capsaicina que conserve su actividad antiproliferativa y permita eliminar las desventajas anteriores. En 2005, el grupo de Appendino desarrolló análogos de la capsaicina, encontrando al 12-Fenilacetilrivanil (12-FAR), el cual presenta una afinidad a los receptores del dolor TRPV (receptor potencial transitorio), un canal catiónico, varias veces mayor que la capsaicina. Sin embargo, no existe información que establezca que este compuesto presente actividad antiproliferativa, actividad inductora de apoptosis o si es citotóxico, en particular en el cáncer cervicouterino. Por ello, en el presente trabajo se determinó la actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular por necrosis o apoptosis del capsaicinoide 12-FAR en este tipo de células tumorales. Al respecto se obtuvo que el 12-FAR afectó el potencial proliferativo de las células de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la dosis, obteniendo una IC_{50} de 121.83, 56.57 y 74.19 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Dicha actividad antiproliferativa se encontró relacionada

con el ciclo celular de las líneas HeLa y ViBo, en las cuales se observó una disminución en el número de células que se encuentra en la fase G1 con un incremento en el porcentaje de células que se encuentran en la región subG1 para HeLa y en la fase S para ViBo. Sin embargo, en la línea celular CaSki, la acción del 12-FAR fue independiente del ciclo celular, es decir, el compuesto no afectó ninguna de las fases del ciclo celular, indicando que 12-FAR en esta línea celular puede actuar en células que están ciclando o no. No obstante estos resultados en las líneas tumorales HeLa y CaSki 12-FAR indujo un incremento de células en la región subG1, sugiriendo que el 12 FAR induce a las células tumorales a una muerte celular. La cuantificación de la actividad de la enzima Lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con 12-FAR, muestran que este capsaicinoide induce una muerte por necrosis en las tres líneas tumorales, que va desde el 35.5% al 40.5%, con respecto al control. Además, en lo que respecta a la evaluación de muerte por apoptosis, se obtuvo que 12-FAR no induce la expresión de la caspasa-3 activa en ninguna de las tres líneas provenientes de cáncer cervicouterino ni induce fragmentación del ADN, indicando que 12-FAR es un capsaicinoide que induce necrosis y no apoptosis en estas líneas de cáncer cervicouterino.

Sorprendentemente, 12-FAR no afectó el potencial proliferativo de cultivos de linfocitos de sangre periférica humana ni fueron inducidos a una muerte celular necrótica, estableciendo una actividad antiproliferativa y citotóxica de acción selectiva de 12-FAR sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Estas características biológicas hacen a 12-FAR un digno candidato para ser evaluado en modelos *in vivo*, con la intención de establecer su potencial como agente anticancerígeno y terapéutico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7.6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). (OMS, 2008). Éste es el resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que producen la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. La incidencia del cáncer se relaciona directamente con la edad, ya que las personas están más tiempo expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones. Algunos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer son el consumo de tabaco, alcohol, la obesidad, las infecciones de transmisión sexual como el VPH y la inactividad física, entre muchos otros. Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer. La Secretaría de Salud (SSA) reporta que del ingreso hospitalario por cáncer en 2008, la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%), seguida del cáncer de mama (5.8%), de cuello de útero (3.3%) y ovario (2.1%). La leucemia afecta principalmente a los hombres (15.1%), mientras que el cáncer de mama a las mujeres (8.4%). Además del cáncer de mama, otra de las enfermedades mortales más frecuentes en la población femenina es el cáncer cervicouterino. En este caso, resultan de gran importancia los aspectos relacionados con la prevención y el autocuidado de la salud, ya que es una enfermedad prevenible con detección y tratamiento oportuno, en las etapas tempranas del padecimiento para la mayoría de los casos. En 2008, la incidencia de cáncer cervicouterino en México fue de 10.06% en las mujeres de 15 años y más. De acuerdo con la OMS, el cáncer podría disminuir casi en una tercera parte del total de casos, si la detección y el tratamiento fueran oportunos (INEGI, 2008).

La prueba citológica de Papanicolaou sigue dando la pauta para el diagnóstico de lesiones cervicales precancerosas y/o la detección del carcinoma invasor, al igual que técnicas complementarias como colposcopia, biopsia, tipificación viral e inmuno-histoquímica (Serman, 2002). Los tratamientos actualmente existentes para combatir esta enfermedad son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; desafortunadamente los últimos dos tienen efectos secundarios que son perjudiciales para el paciente en tratamiento al afectar células que son sanas. Es por ello que actualmente se busca nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad, que presenten una mayor selectividad entre células normales y células transformadas. La capsaicina es un compuesto proveniente de las plantas del género *Capsicum* y ha llamado la atención debido a la actividad antiproliferativa mostrada sobre líneas celulares tumorales de esófago, próstata, hígado, y leucemia; aunque posee ciertas desventajas debido a sus propiedades irritantes, su acción hiperalgésica, su obtención de alto costo y de bajo rendimiento (Castillo *et al*, 2008), generando la necesidad de buscar un análogo de la capsaicina que conserve su actividad antiproliferativa y elimine las desventajas que ésta posee. Al respecto, se ha sintetizado el análogo 12-FAR, que a diferencia de la capsaicina, no presenta propiedades irritantes y es de fácil manejo (Appendino *et al*, 2005b).

MARCO TEÓRICO

La célula

Todos los organismos vivos están formados por células, las cuales son unidades pequeñas rodeadas de una membrana que contiene una solución acuosa concentrada de sustancias químicas (Figura. 1), dotadas de la extraordinaria capacidad para crear copias de sí mismas mediante el crecimiento y la división en dos células.

Los organismos superiores, son comunidades de células que derivan del crecimiento y la división de una célula fundadora única. Las células, por lo tanto, son las unidades fundamentales de la vida. (Alberts *et al*, 2006).

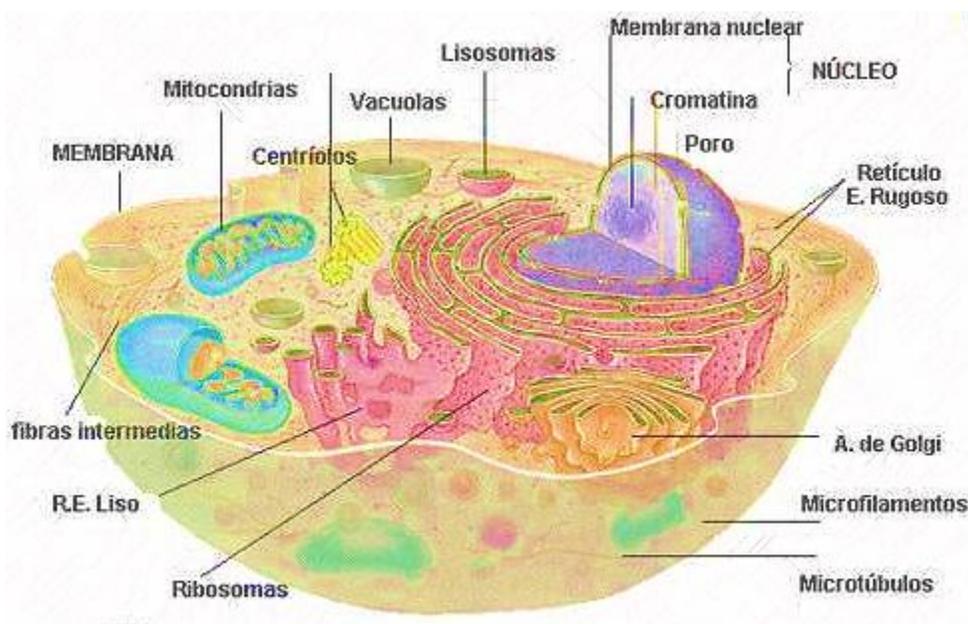


Figura. 1. Célula animal, donde se muestran los organelos (tomada y modificado de Nelson y Cox, 2005)

Renovación celular

Todas las células surgen de la división de una célula pre-existente. La vida de una célula desde que se genera por la división de una célula progenitora hasta que ella misma se divide recibe el nombre de ciclo de división celular o ciclo celular, este

proceso de división celular es cíclico y pasa unidireccionalmente a través de una serie de fases (Stephen & Bolsover, 2004). La “decisión” de una célula de dividirse o no, tiene una importancia crucial para el organismo. Cuando los mecanismos reguladores que limitan la división celular son defectuosos y las células experimentan una división incontrolada el resultado es catastrófico (Nelson & Cox *et al*, 2009)

La extensión del ciclo celular varía desde las 2 ó 3 horas de los organismos unicelulares, hasta de las 24 horas de las células humanas que crecen en una placa de cultivo. Durante este periodo la célula dobla su masa, duplica su genoma y orgánulos y los reparte en las dos nuevas células de la progenie. Todos estos procesos deben llevarse a cabo con gran precisión y en el orden correcto (Stephen & Bolsover, 2004).

El proceso de división celular debe estar controlado finamente tanto en términos de determinar qué células se tienen que dividir y cuándo, como en saber cuándo debe parar. Las células poseen genes de control del ciclo celular; la función correcta de estos genes no sólo determina nuestro tamaño, sino que también evita que las células se dividan incontroladamente y desarrollen un cáncer. Mediante la observación microscópica se pueden distinguir dos elementos del ciclo celular (Stephen & Bolsover, 2004).

1. LA INTERFASE. Ocupa cerca del 90% del ciclo celular y es el periodo de síntesis y crecimiento, durante el que la célula casi dobla su masa sin presentar ningún cambio morfológico destacado. Cuando se completa la interfase, la célula entra a la siguiente fase.
2. MITOSIS. Es un breve periodo de tiempo en el que se producen grandes cambios estructurales, uno de los aspectos más importantes de la mitosis es el comportamiento de los cromosomas.

La división celular tiene cuatro etapas bien definidas G1, S, G2 y M (Figura. 2). La fase G1 es la primera del ciclo celular, existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, e incremento del tamaño celular; tiene una duración de entre 6 y 12h, y durante este tiempo la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Es el periodo que más variación de tiempo presenta, pudiendo durar días, meses o años.

Fase S, es la fase de síntesis o replicación del ADN, y corresponde a la segunda fase del ciclo celular. Comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y el ATP necesario. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio de la división celular tenía. Tiene una duración de 6 a 8h.

Fase G2, es el tiempo que transcurre entre la duplicación del ADN y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía, la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP que proporcionara energía durante el proceso de mitosis. En esta fase continúa la duplicación de proteínas y ARN. Tiene una duración entre 3 y 4h (Sánchez & Trejo, 2006)

En la fase M, la cubierta nuclear se disgrega, los cromosomas alineados son dirigidos hacia los polos opuestos de la célula, cada conjunto de cromosomas hijos se rodea por una envoltura nuclear recién formada y la citocinesis divide la célula por la mitad produciendo dos células hijas. En el tejido embrionario o en un tejido que prolifera rápidamente cada célula hija se divide de nuevo empezando en G1, pero solo después de un período de espera. Después del paso por mitosis y la entrada en G1, la célula o bien continua otra división o bien cesa de dividirse, entrando en una fase de latencia G0 que puede durar horas, días o toda la vida de la célula (Nelson & Cox, 2009).

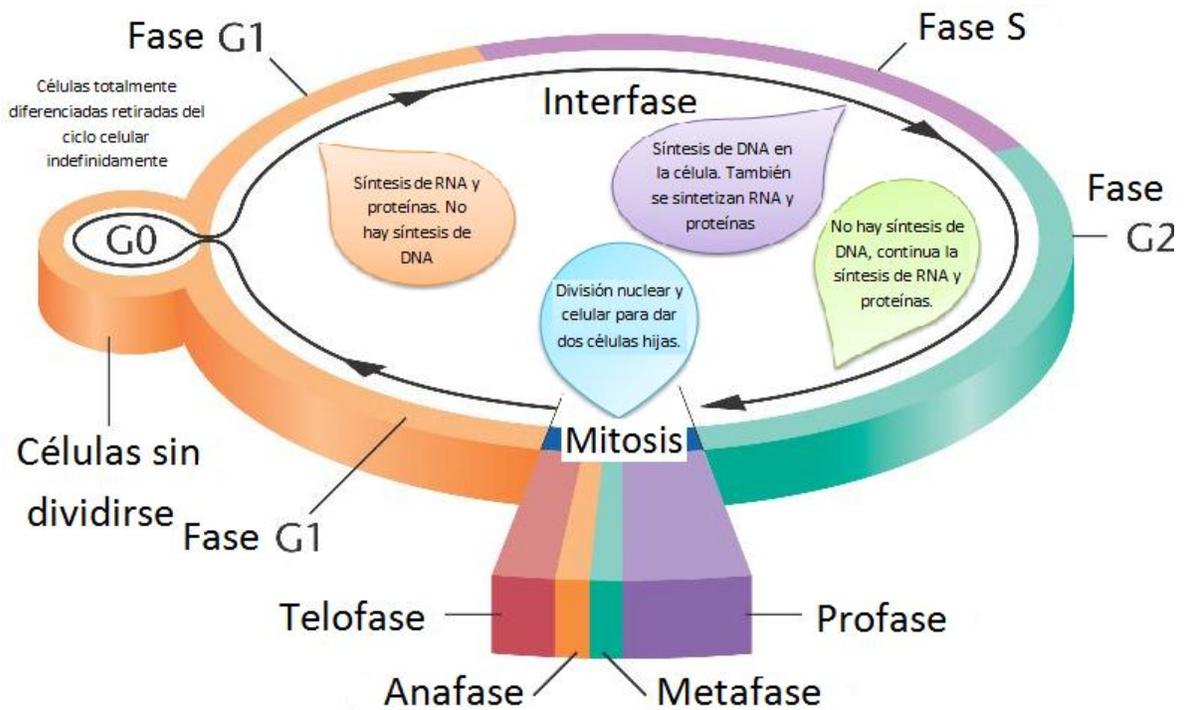


Figura 2. Ciclo celular, donde se muestra cada fase. Tomado y modificado de bio3400.nicerweb.com.

La finalidad de la mitosis es generar dos células hijas que contengan, cada una de ellas, un conjunto idéntico de los cromosomas de la célula progenitora. Para ello, los cromosomas ejecutan una secuencia de movimientos.

La mitosis se divide en cinco etapas, que se distinguen entre sí por el aspecto de los cromosomas y su organización respecto a una estructura celular, denominada huso mitótico responsable de su segregación (Stephen & Bolsover, 2004) (Figura. 3).

Etapas de la Mitosis

- Profase. En la mayoría de las células, la primera evidencia que indica que están entrando en mitosis es la compactación de las hebras de cromatina, presentes en la interfase.

- Prometáfase. La envoltura nuclear se disgrega y los cromosomas pueden interactuar con el huso mitótico, que todavía se está formando.
- Metafase. Este es el periodo más estable de la mitosis. En esta fase los cromosomas son insertados en el huso mitótico, migran al centro y se alinean al ecuador de la célula. Los microtúbulos de los polos y de los cinetocoros tiran de cada par de cromátidas hacia ambos lados del plano ecuatorial (Sánchez & Trejo, 2006).
- Anafase. Es la fase más corta de la mitosis. En la anafase se acortan los microtúbulos que sostienen los cromosomas, arrastrándolos hacia los polos del huso. Cuando los cromosomas alcanzan los polos, sus microtúbulos se despolarizan.
- Telofase. En esta fase se revierten la mayoría de los cambios ocurridos en la profase: los cromosomas se descondensan, se desarma el huso mitótico, se reconstruye la envoltura nuclear, se vuelven a formar el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático y reaparece el núcleo. Cada uno de los núcleos resultantes contiene una copia completa del genoma paterno y una copia del materno.
- Citocinesis. La célula se divide durante las últimas etapas de la telofase. En las células animales se forma un anillo contráctil, formado de actina y miosina que estrangula a la célula por el medio (Stephen & Bolsover, 2004).

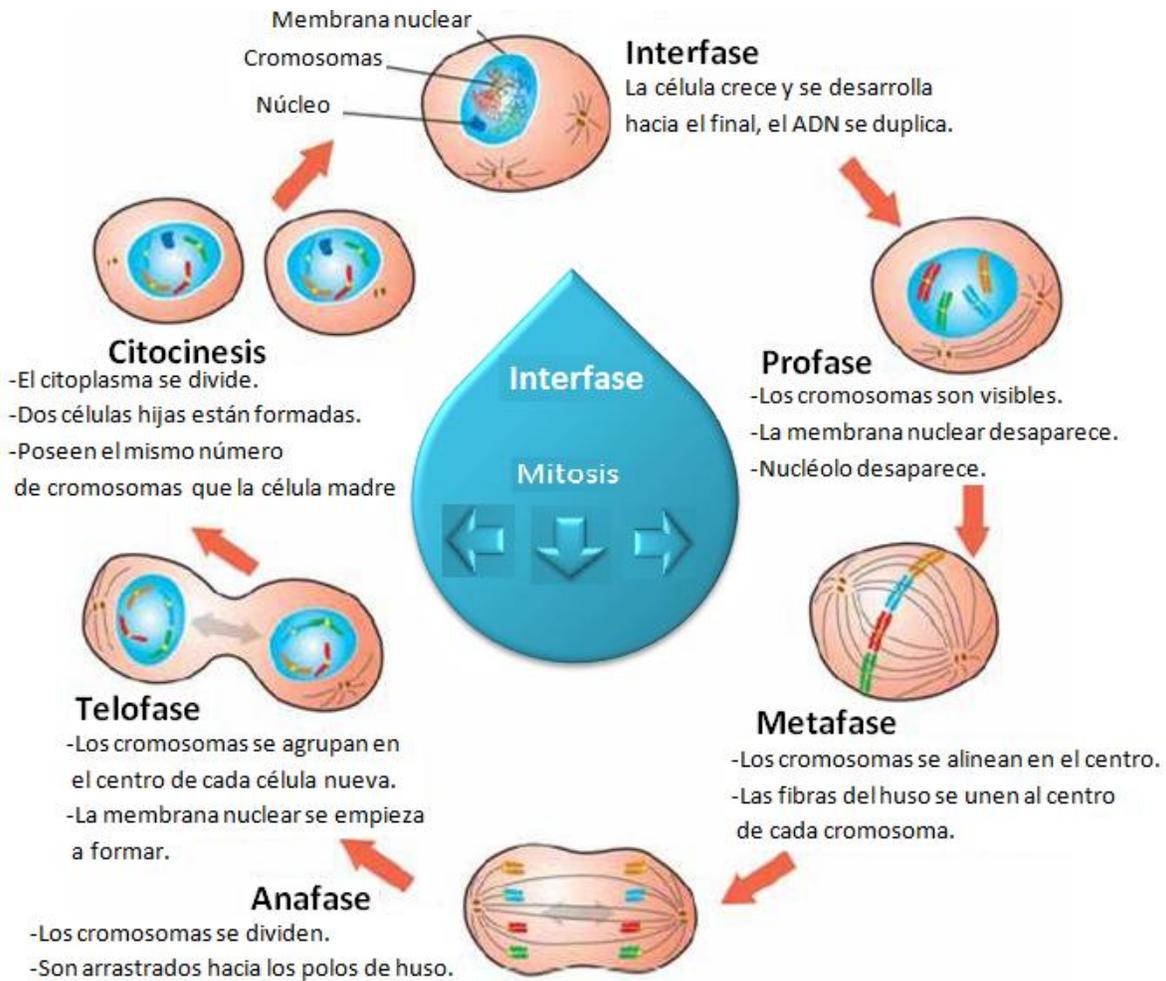


Figura 3. Ciclo celular donde se muestran los cambios en la estructura de los cromosomas durante el ciclo. Tomado y modificado de e2geneticswikid.com

En el ciclo celular existen puntos de control que impiden la continuación del ciclo celular si la célula tiene lesiones en el ADN, no ha alcanzado el tamaño adecuado, carece de nutrientes o recibe señales químicas externas. Estos puntos de restricción son:

- Punto de control G1. Comprueba que se ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN y, también que las condiciones ambientales son favorables (nutrientes, sales y temperatura adecuadas, etc)

- Punto de control G2-M. Se presenta al final de la fase G2 en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de proseguir: que ha duplicado la masa celular para dar lugar a dos células hijas y que ha completado la replicación del ADN una sola vez.
- Punto de control M. Ocurre en la mitosis. Solo permite continuar con la división celular si todos los cromosomas están alineados sobre el huso mitótico.

Muerte celular

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

Cada dos semanas generamos un conjunto completo de 3×10^{13} células. Sin embargo, los microorganismos multicelulares no crecen indefinidamente, porque la proliferación celular esta en equilibrio con la muerte celular. Las células pueden morir por dos razones distintas:

- 1) Accidental. Resultado de un daño mecánico o la exposición a un agente tóxico. A este tipo de muerte celular se le denomina necrosis.
- 2) Muerte deliberada. Apoptosis o muerte celular programada.

La muerte celular es un fenómeno conceptualmente independiente del control de la proliferación celular que contribuye al mantenimiento del equilibrio en el organismo. Basándose en diferencias distintivas de la morfología, cambios

químicos y moleculares de las células muertas, se describirán dos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis (Stephen & Bolsover, 2004).

Apoptosis

Durante el desarrollo de los organismos, se eliminan ciertas células, ya sea por haberse producido en exceso, o porque forman parte de estructuras transitorias durante la formación del organismo adulto; ocurre por un proceso que involucra muerte celular, donde la eliminación de los restos celulares se realiza por fagocitosis.

Esta muerte natural de las células está diseñada de tal forma que el contenido intracelular no se vierta al exterior, como ocurre en la muerte accidental de algunas células ante condiciones nocivas extremas, causando daño al tejido adyacente y, en el organismo adulto, inflamación (Jiménez & Merchant, 2003)

Si la replicación o la reparación del ADN o el ensamblaje de los cromosomas son aberrantes, la célula detiene su progresión por el ciclo celular hasta que se corrige esta condición. Esto reduce el número de mutaciones y de anomalías cromosómicas que se acumulan en las células en proliferación. Sin embargo, si el daño en el ADN o en los cromosomas es tan grave, que no se puede reparar, la célula puede iniciar, un proceso denominado apoptosis o muerte celular programada. (Klug *et al*, 2006).

La apoptosis se caracteriza por una deshidratación rápida, pérdida de la morfología normal y disminución de su tamaño. La condensación y pérdida de la estructura distintiva de la cromatina, seguida por la fragmentación nuclear. Los fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma, incluyendo organelos intactos son empacados en los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales, envueltos en la membrana plasmática, se separan de la célula muerta (Figura 4). También, se presenta la activación de algunos genes que son requeridos para que la

apoptosis ocurra. Cuando los estados de la apoptosis avanzan, la funcionalidad de la membrana celular, la mitocondria y lisosomas es preservada. Considerando todos los cambios que ocurren en la célula que experimentan apoptosis la característica más común de éste proceso es la participación activa de la célula en su muerte. La célula activa una cascada de eventos moleculares que resultan en una degradación ordenada de los constituyentes celulares con un impacto mínimo en las células vecinas (Studzinski, 1995).

Invariablemente los organelos se mantienen intactos dentro de los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas, ya que es condición esencial para que no cause daño al tejido. Frecuentemente las características bioquímicas se utilizan como un indicio de que posiblemente se activó un proceso de muerte celular apoptótica (Jiménez & Merchant, 2003).

Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas caspasas, las cuales reciben este nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contiene residuos de aspartato seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa (Sánchez & Trigo 2001). Las caspasas son producidas como precursores inactivos llamados procaspasas que son posteriormente hidrolizados para generar enzimas activas, frecuentemente por otras caspasas en una cascada proteolítica; una vez que se activan, las caspasas fragmentan otras proteínas dentro de las células, lo que produce la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan (Stephen & Bolsover, 2004).

Necrosis

Por otro lado, tenemos a la necrosis que 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 líticas y venenos, observándose que ciertos tipos celulares responden a concentraciones farmacológicas de algunos medicamentos (Bowen & Bowen, 1990).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental, y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. En la necrosis se observan numerosas células vecinas sometidas a este proceso, cubriendo una extensión variable con desintegración (Sánchez y Trejo, 2006).

Se caracteriza morfológicamente por un aumento en el volumen celular, hinchazón de orgánulos, la rotura de la membrana plasmática (Karp, 2006), la cromatina sufre una dispersión irregular, la permeabilidad de la membrana plasmática sufre cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana (Bowen & Bowen, 1990), picnosis (condensación del núcleo), cariólisis (disolución de la cromatina), cromatolisis (disolución de los cromosomas), cariorexis (fragmentación de la cromatina), la autólisis con la liberación de enzimas y, finalmente tiene lugar la degradación de las células muertas (Figura. 4) (Sánchez, 2001).

La necrosis es un fenómeno degenerativo, cuya consecuencia final es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria (Bowen & Bowen, 1990).

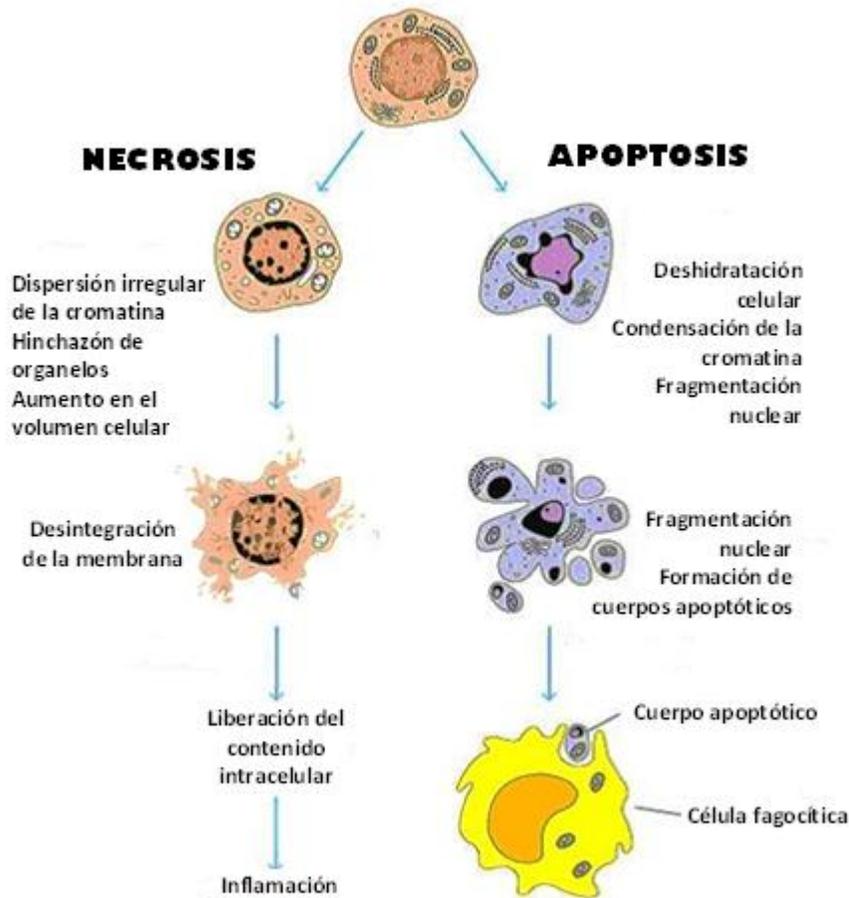


Figura 4. Diferencias entre la necrosis y apoptosis. Tomada y modificada de aibnsus.org

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones; corresponde a la categoría de las oxidoreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a lactato; está presente en el citoplasma y se libera al medio al romperse la membrana celular por lo que al ser detectada extracelularmente se comprueba que la célula murió por necrosis (Karp *et al*, 2006).

Cuando los mecanismos de control del ciclo celular y muerte celular programada se ven alterados dentro de un organismo ya sea por fallas en los puntos de regulación o por mutaciones en el material genético de la célula, aunado a la

pérdida de funcionalidad, y diferenciación se puede tener un crecimiento descontrolado de las células, transformándose el fenotipo original, se genera una enfermedad conocida como cáncer (Alberts *et al*, 1996).

Cáncer

El cáncer es un crecimiento y división incontrolada de células que han escapado de los mecanismos normales de regulación del ciclo celular. A este tipo de células se les conoce como células transformadas. Característicamente las células transformadas continúan dividiéndose bajo condiciones en donde las células normales se convertirían en quiescentes (inhibición por contacto o cuando los nutrientes o factores de crecimiento se han agotado del medio) (Norman & Lodwick, 2007).

Se dice que un cáncer es benigno cuando el crecimiento se localiza en el lugar de origen dentro de un tejido, sin invasión, y es maligno cuando las células tumorales pueden invadir los tejidos aledaños vascularizando, propagándose a sitios distantes, crecen ahí y forman tumores secundarios (metástasis) (Norman & Lodwick, 2007).

Las células malignas son el resultado final de una serie de transformaciones y cambios ocurridos a nivel de los tejidos normales preexistentes. El principio de esta evolución consiste en el paso de una célula sana (o grupo de ellas) a otra tumoral en potencia o biológicamente precancerosa, presentando en su núcleo ciertas modificaciones genéticas que adquieren pronto caracteres irreversibles, como expresión de su malignidad futura. Dicho estado persiste hasta que los elementos neoplásicos latentes o dormidos por efecto de un estímulo adicional, entran en rápida proliferación, dando lugar a una nueva estirpe de células, que son las que en realidad confieren importancia clínica. El proceso completo, esto es, la evolución desde un complejo celular sano hasta un tumor maligno totalmente desarrollado y gozando ya de propiedades biológicas nuevas, exige una sucesión de cambios nucleares específicos o mutaciones somáticas, cada una de las cuales trae como

consecuencia una mayor indiferenciación, que alcanza su máximo en las células tumorales de crecimiento autónomo (Balagueró, 1971)

Las mutaciones tumorigénicas con frecuencia son originadas a causa de imperfecciones en la replicación del ADN, deficiencias hereditarias en la reparación del ADN y la exposición a radiación, químicos carcinogénicos y agentes biológicos.

La infección viral de las células está asociada con varios tipos de cáncer humano. Todos los virus tumorales insertan su genoma dentro del hospedero para su replicación y después ser reproducidos en las células hijas. La tumorigénesis resulta además de la disrupción de la estructura y/o la expresión de protooncogenes, un proceso conocido como mutagénesis o de la expresión de genes virales, oncogenes, que son directamente responsables de la transformación de la célula (Norman & Lodwick, 2007).

VPH

El virus del papiloma humano es miembro de la familia *Papovaviridae*, a la que también pertenecen el papilomavirus y el virus simiano 40 (SV40).

Los papilomavirus se caracterizan por ser virus pequeños, con un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular, de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud, con un virión no envuelto que mide 45-55 nm de diámetro y una cápside proteica icosaédrica.

Actualmente se ha podido establecer un modelo de carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano con base en hallazgos epidemiológicos y moleculares. Los mecanismos conocidos implican una interacción de los productos genéticos del VPH que controlan estrechamente una intrincada red de oncogenes y genes que regulan la proliferación celular y la síntesis del ADN.

El virus infecta células basales, parabasales o de reserva, las cuales se pueden dividir y diferenciar en epitelio escamoso, glandular o neuroendocrino; en cuanto a

las células con diferenciación escamosa, su maduración se propaga y ordena a través del engrosamiento del epitelio, tanto morfológicamente como molecularmente; por ello, si el VPH infecta dichas células pueden ocurrir diferentes secuencias de eventos.

Lo más frecuente es que las células basales morfológicamente normales al ser infectadas por el VPH inhiban la expresión de los genes virales y sólo tengan un nivel mínimo de mantenimiento, lo cual permite la diferenciación celular con la subsiguiente pérdida de la capacidad de dividirse.

Por otra parte, la secuencia que posiblemente ocurre en las lesiones de alto grado se asocia con la infección por los tipos de alto riesgo del VPH, aunque no de forma exclusiva. Se considera que los responsables de la pérdida del control de la proliferación celular son los genes virales transformantes E6 y E7, la expresión de estos genes se ha observado usualmente en los tipos virales de alto riesgo, como 16 y 18, mientras que no se detecta en los tipos 6 y 11 de bajo riesgo (Alonso *et al*, 2005).

Cáncer cervicouterino

Latinoamérica es una de las regiones del mundo con alta incidencia de cáncer cervicouterino. Este tumor es el segundo carcinoma más común entre las mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer. Para el año 2000 se estimaron cerca de 76000 nuevos casos de cáncer cervicouterino y alrededor de 30000 muertes en toda la región, lo cual representa 16% y 13% de la carga mundial respectivamente (Alonso *et al*, 2005).

El cáncer cervicouterino, representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas (INEGI, 2008).

Tratamientos contra el cáncer

El tratamiento del cáncer cervicouterino varía según el estadio. Hoy en día, existen diferentes tratamientos. Los tratamientos más frecuentemente usados son:

cirugía, radioterapia y quimioterapia.

La cirugía es una opción para las mujeres con estadio I o II de cáncer cervical. Consiste en extirpar el tejido que puede contener células cancerosas.

El tratamiento por radioterapia consiste en someter al paciente en una serie de radiaciones ionizantes. Al atravesar la célula, la radiación induce modificaciones en las moléculas presentes. Cuando el impacto tiene lugar en el ADN puede impedir la división celular, y por tanto morirá por su bloqueo de su capacidad de proliferación. (*Tubiana, 1971*)

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas, los cuales afectan a las células de tres formas: dañando el ADN de modo que éstas ya no pueden reproducirse en la fase S, inhibiendo la síntesis de ADN nuevo y deteniendo el proceso mitótico (*Sen y D'Incalci, 1992*).

Lamentablemente en la mayoría de los casos se requiere de la combinación de los tratamientos para poder eliminar las células cancerosas, siendo los tratamientos de radioterapia y quimioterapia poco selectivos, dañando así a células no tumorales que se encuentren normalmente ciclando, generando efectos secundarios significativos en el paciente. Ante esta situación se buscan nuevos tratamientos que permitan la cura del paciente con una mejor calidad de vida.

Actualmente, existe un fuerte interés en moléculas de origen vegetal, para combatir el cáncer, como la Capsaicina a la cual se le ha atribuido actividad antiproliferativa y antitumoral.

Capsaicina

Se ha reportado que la capsaicina, compuesto presente en el chile y responsable del sabor picante, presenta un efecto inductor de apoptosis de células cancerosas gástricas y leucémicas, entre otras (*Apenndino et al, 2005b*); pese a esto

se ha distinguido por ser un compuesto sumamente citotóxico, carcinogénico, irritante y costoso. Sin embargo, aún no se sabe si este compuesto actúa de manera selectiva, es decir, que su acción antiproliferativa y/o apoptótica se dé solo en células tumorales y no en células normales. No obstante, a pesar de sus características indeseables, este compuesto podría servir de modelo estructural para sintetizar análogos o derivados que mantengan las propiedades antiproliferativas e inductoras de apoptosis, sin presentar las características indeseables. La elaboración de nuevos análogos de la capsaicina que se unen al receptor TRPV1 (receptor de potencial transitorio), con alta especificidad, pero que no presentan efectos colaterales derivados de la irritabilidad, puede conducir a drogas más efectivas para el tratamiento de desórdenes de la salud (Appendino *et al*, 2005b), tratando de generar en ellos un fuerte potencial selectivo, de tal manera que induzcan un fuerte daño a las células tumorales afectando en lo menos posible a las células normales. Al respecto, se ha sintetizado un análogo de la capsaicina para probar y describir su actividad antiproliferativa, se trata del 12-fenilacetilrinvanil (12-FAR); compuesto análogo considerado varias veces más afín al receptor TRPV1 que la capsaicina (Castillo *et al*, 2008).

La capsaicina tradicionalmente se ha dividido en tres fracciones, la región aromática, la región lipofílica y la amida enlazadora (Appendino *et al*, 2005a) (Figura. 5)

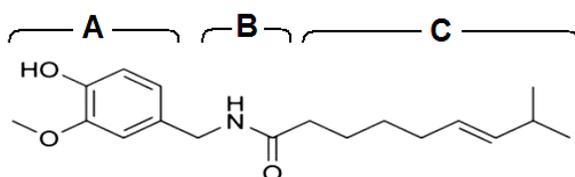


Figura 5. Estructura de la capsaicina donde se muestra la región aromática (A), la región lipofílica (C) y la amida enlazadora (B) (modificado de Appendino *et al*, 2005a).

12-fenilacetilrinvanil

Éste compuesto agonista de TRPV1, en términos de su afinidad por el receptor resulta ser similar al resiniferatoxin (un poderoso análogo de la capsaicina). Su estudio resulta interesante debido a que la alta afinidad de 12-FAR (Figura. 6) por el TRPV1 deriva de la fenilacetilación del grupo 12-hidroxil en rinvanil (Appendino *et al*, 2005b).

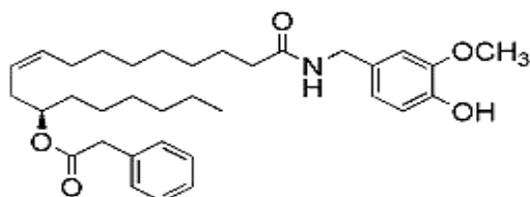


Figura. 6. Molécula de 12-fenilacetilrinvanil (Castillo *et al*, 2008).

La síntesis de los compuestos 12-FAR es reciente, sus propiedades biológicas se desconocen y en especial su poder anticancerígeno, generando la necesidad de seguir estudiando a esta molécula para conocer sus efectos sobre el cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y los tratamientos existentes, son agresivos y poco eficientes en estadios avanzados, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de ésta enfermedad. Dentro de las nuevas alternativas terapéuticas con fines orientados hacia el tratamiento del cáncer, está el uso de compuestos vegetales, muchos de los cuales han sido reportados con actividad antitumoral. La actividad que posee el análogo de la capsaicina 12-FAR, no es conocida, por lo cual, es necesaria la investigación acerca de la actividad que posee esta molécula, específicamente sobre líneas de cáncer cervicouterino.

JUSTIFICACIÓN

En México y el mundo, el cáncer cervicouterino, es la segunda causa de mortalidad en mujeres con cáncer. Según las cifras reportadas por el INEGI el 15.7% de las defunciones a causa del cáncer en mujeres se debió al cáncer cervicouterino. A pesar de las campañas de prevención y los tratamientos existentes, no se ha logrado disminuir la incidencia de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Debido a que la capsaicina está reportada con actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis y el 12-fenilacetilrinvanil (12-FAR) es un análogo de ésta, genera la posibilidad de que el 12-FAR presente estas mismas actividades.

OBJETIVO

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del 12-FAR, en líneas provenientes de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo, así como en células no tumorales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Desarrollar cultivos de las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo, así como de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.
2. Determinar el efecto antiproliferativo del 12-FAR, expresado como la concentración requerida de 12-FAR para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}), en cultivos de células de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo.
3. Evaluar el efecto del 12-FAR en el ciclo celular de células tumorales CaSki, HeLa y ViBo por citometría de flujo.
4. Evaluar la actividad necrótica del 12-FAR, mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática Lactato deshidrogenasa (LDH), en los sobrenadantes de las células CaSki, HeLa y ViBo, así como de células linfocíticas, provenientes de sangre periférica humana.
5. Determinar si el 12-FAR induce muerte por apoptosis en cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo a través de la evaluación de la expresión de la caspasa 3 activa y la fragmentación del ADN por citometría de flujo.

METODOLOGÍA

Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), rojo fenol y SNT (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5%, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5% CO₂ y a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuaire, USA). Para realizar las pruebas biológicas, las células se tomaron de cultivos a una densidad hasta de 70%. (Morgan y Darling, 1993).

Preparación del 12-Fenilactilrinvanil (12-FAR).

Se pesó 1 mg del compuesto 12-FAR y se disolvió con 0.5% de acetato de etilo.

Determinación de la IC₅₀.

Para establecer la IC₅₀ (concentración en la cual se disminuye en un 50% el número celular) de las líneas tumorales provenientes de cáncer cervicouterino, se sembraron 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100 µl de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SNT, durante 24 horas.

Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI-1640 al 5% de NSC con el compuesto 12-Fenilacetilrinvanil (12-FAR), a concentraciones de 125, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/ml. En el ensayo se utilizaron como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 5 µl de acetato de etilo. A las 24 horas se evaluó el número celular por la técnica de cristal violeta la cual consiste en: retirar el RPMI-1640 de los pozos de la placa y agregar el fijador glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1% el cual se mantuvo durante 15 min. Posteriormente se retiró el fijador y se dejó secar al aire, se lavó con agua

desionizada, luego se les agregó el colorante cristal violeta al 0.1% durante 10 min. Al término de éste tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada para retirar el exceso de colorante. Se dejó secar al aire. Por último, se solubilizó el colorante con una solución de ácido acético al 10% en agitación durante 20 min. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50% la población celular de las líneas tumorales de cáncer cervicouterino.

Obtención de la IC_{50} matemática.

Para calcular las IC_{50} , los datos arrojados por el espectrofotómetro se procesaron en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dependientes de la dosis, que muestren el efecto del compuesto sobre la población celular. A estas curvas se les aplicó regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, para cada una de las líneas celulares, de éste modo, en base a la ecuación obtenida de la recta, el valor de “Y” se sustituyó por 50 y el valor de $X = IC_{50}$ fue calculado, obteniendo así finalmente el valor de la IC_{50} respectiva.

Evaluación del 12-Fenilacetilrinvanil sobre el ciclo celular.

La distribución de la cantidad de ADN presente en las diferentes fases del ciclo celular de las células tumorales fue determinada mediante la técnica de citometría de flujo, la cual se describe a continuación. 1×10^6 células de las diferentes líneas celulares de CaCu fueron sembradas en cajas de Petri de 60 mm con 5 ml de RPMI-1640 al 5% de NSC. Después de 24 horas se retiró todo el medio y se trataron con RPMI-1640 al 5% NSC y con la IC_{50} obtenida para cada línea celular por 24 horas.

Para evaluar la distribución de ADN en el ciclo celular, se retiró el RPMI-1640 de las cajas de Petri y se le adicionó 3 ml de verseno por 3 minutos, para que las células HeLa y CaSki fueran despegadas. Las células ViBo fueron despegadas con tripsina al 0.05% en verseno. Posteriormente fueron centrifugadas, lavadas con un buffer salino de fosfatos (PBS), pH 7.3. Fueron centrifugadas nuevamente por 5 minutos a 1500 rpm. El botón celular se resuspendió y fijó en 1 ml de PBS al 50% de metanol, se dejaron reposar 20 minutos, posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y se lavaron con PBS.

El botón celular se resuspendió en 0.5 ml de ARNasa (100 mg/l) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 μ l de la solución de yoduro de propidio (200 mg/l). Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo (FACSAria II, USA) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH.

El ensayo de citotoxicidad se realizó con el kit de LDH (BioVision, USA). En la placa de 96 pozos (CORNING, USA) fueron sembradas 7,500 células por pozo y se incubaron en condiciones de incubadora, por 24 horas, posteriormente se colocó la IC₅₀ de FAR y se prepararon los controles, a los cuales se les hizo cambio por medio de cultivo fresco (basal, controles negativo y positivo), así como el control con 0.5 % de A.E. después de 24 horas se retiró el medio de cultivo y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Después se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a un pozo de una placa de 96, se añadieron 100 μ l de mezcla de reacción (250 μ l de solución catalítica y 11.25 ml de solución de marcado) a cada pozo y se incubaron durante 30 minutos, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = [(muestra – control negativo)/ (control positivo – control negativo)]*100.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Fueron sembradas 2×10^5 células de las líneas de cáncer cervicouterino en cajas de Petri de 5 ml con un volumen de 4 ml de RPMI-1640 al 5% de NSC. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con las IC_{50} de FAR con medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SNT por 24h más, y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 mediante la técnica de citometría de flujo, brevemente: se retiró el medio de cultivo y las células fueron fijadas a las 24 horas de cultivo, con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Después se permearon con tritón X-100 0.2% durante 5 minutos a 4 °C, posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS, se adicionó el bloqueador PBS-ASB (albúmina de suero bovino)-Tween 20, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y se retiró el bloqueador.

Inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa anticuerpo producido en conejo SIGMA 1:50 en PBS (CPP32 Ab4; Lab Vision, USA), durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda, al término del tiempo, las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo, anticuerpo de cabra antiGg de conejo con FITC 1:100 en PBS (Invitrogen, USA), en cámara húmeda en oscuridad durante 2 horas, se lavaron las células 3 veces con PBS. Posteriormente las células se analizaron en un citómetro de flujo (FACSAria II, USA) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

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

Para la técnica de TUNEL se utilizó el kit ApopTag (Chemicon International, USA). Fueron sembradas 2×10^5 células de las líneas de cáncer cervicouterino en cajas petri de 5 ml con un volumen de 4 ml de RPMI-1640 al 5% de NSC. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con las IC_{50} de FAR con medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SNT por 24h más, y se procedió a realizar la técnica de TUNEL. Al término de 24 horas del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al

2% en PBS durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Después se permearon con tritón X-100 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4 °C. Se lavaron con PBS 3 veces, inmediatamente se adicionó el buffer de equilibrio (20-30 μ l) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el buffer e inmediatamente se incubó por 1 hora con enzima Tdt (33 μ l de enzima Tdt más 77 μ l de buffer de reacción). La reacción fue detenida con buffer de paro (Chemicon international, USA) (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua bidestilada), agitando suavemente por 10 minutos. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS. Se incubó con antidigoxigenina acoplada a rodamina, 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (Chemicon international, USA) (68 μ l de solución bloqueó más 62 μ l de antidigoxigenina-rodamina). Se realizaron 3 lavados más con PBS. Posteriormente las células se analizaron en un citómetro de flujo (FACSAria II, USA) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CFSE).

En tubos vacutainer con EDTA, fueron obtenidos 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y colocados (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se cubrieron con aluminio y se centrifugaron (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendido en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB (el total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, y se incubaron durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo

cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para el ensayo de carboxifluoresceína; se agregó en cada tubo cónico de 1.6 ml tipo eppendorf la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 de células/ml de medio total. Para marcar con carboxifluoresceína (Zigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ l por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5% SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 1×10^6 de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con FAR se trataron las células con la IC_{50} de cada línea. Las células contenidas en cada tubo cónicos de plástico de 1.6 ml fueron sembradas en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l e incubadas hasta su evaluación. Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500 μ l de PBS (dos veces), y 500 μ l de paraformaldehído al 2%, para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se muestrearon como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 3 repeticiones. A los que se les realizó análisis de

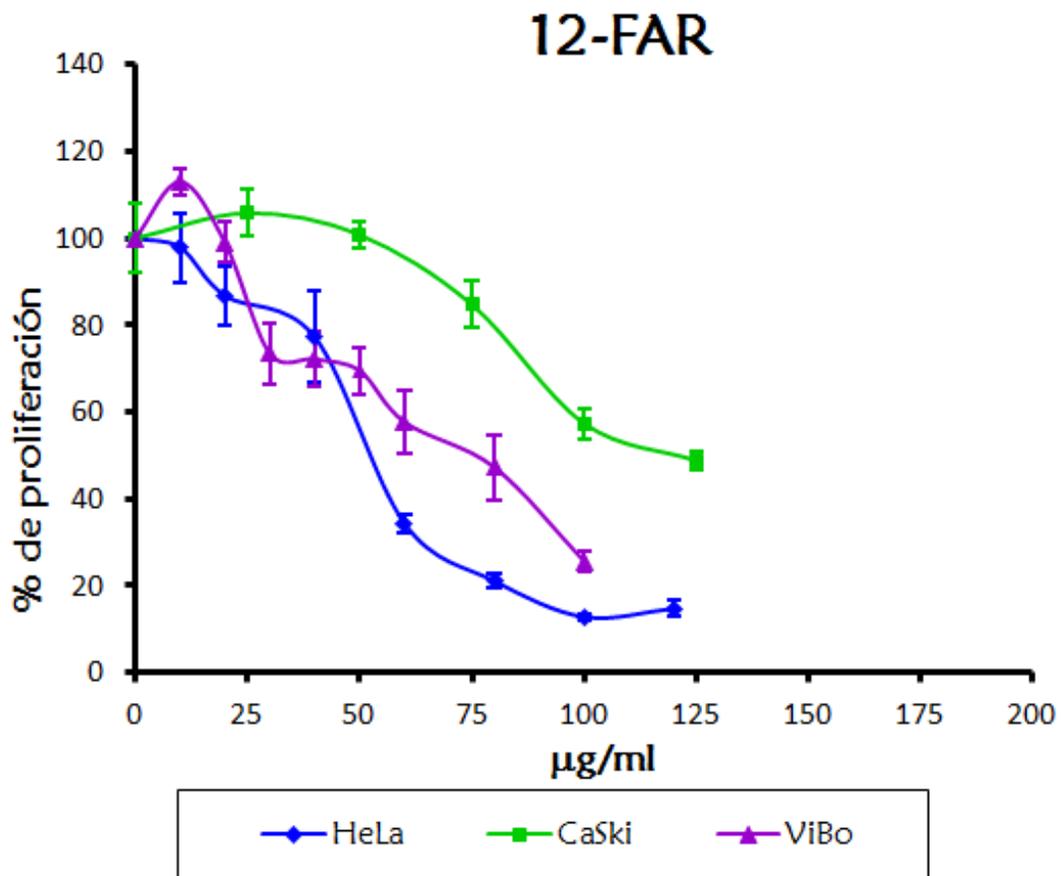
varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows 7 seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

ACTIVIDAD ANTIPROLIFARATIVA DEL 12-FAR EN CÉLULAS TUMORALES

Con el propósito de establecer el efecto antiproliferativo del 12-FAR en las células tumorales, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con diferentes concentraciones del compuesto y la concentración requerida del capsaicinoide que induce un decremento del 50% en la densidad celular (IC_{50}) fue determinada. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (Figura. 7)

El Acetato de Etilo, se utilizó en todos los experimentos para comprobar que el efecto obtenido en las diferentes pruebas, es debido al compuesto y no al vehículo en el que el compuesto es disuelto.



Línea celular	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μM/mL)
CaSki	121.83	221.20
HeLa	56.57	102.71
ViBo	74.19	134.70

Figura 7. Efecto del 12-FAR en el potencial proliferativo de células tumorales CaSki, HeLa y ViBo. El número celular fue determinado mediante la técnica de tinción con cristal violeta.

Como se puede apreciar en la figura 7, el 12-FAR afectó el potencial proliferativo de las células tumorales de una manera dependiente de la dosis, es decir conforme se incrementa la concentración, el número celular disminuye. Las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular fue de 121.83 μg/ml para Caski, 56.57 μg/ml para HeLa y 74.19 μg/ml para ViBo.

- **EFFECTO DEL 12-FAR EN EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS TUMORALES**

Con la finalidad de establecer si la disminución del número celular observado en los cultivos tratados con 12-FAR es dependiente o independiente del ciclo celular, los cultivos celulares de las líneas CaSki, HeLa y ViBo fueron tratados con las concentraciones de 12-FAR correspondientes a las IC50 obtenidas y la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue determinada mediante citometría de flujo (Figura.8).

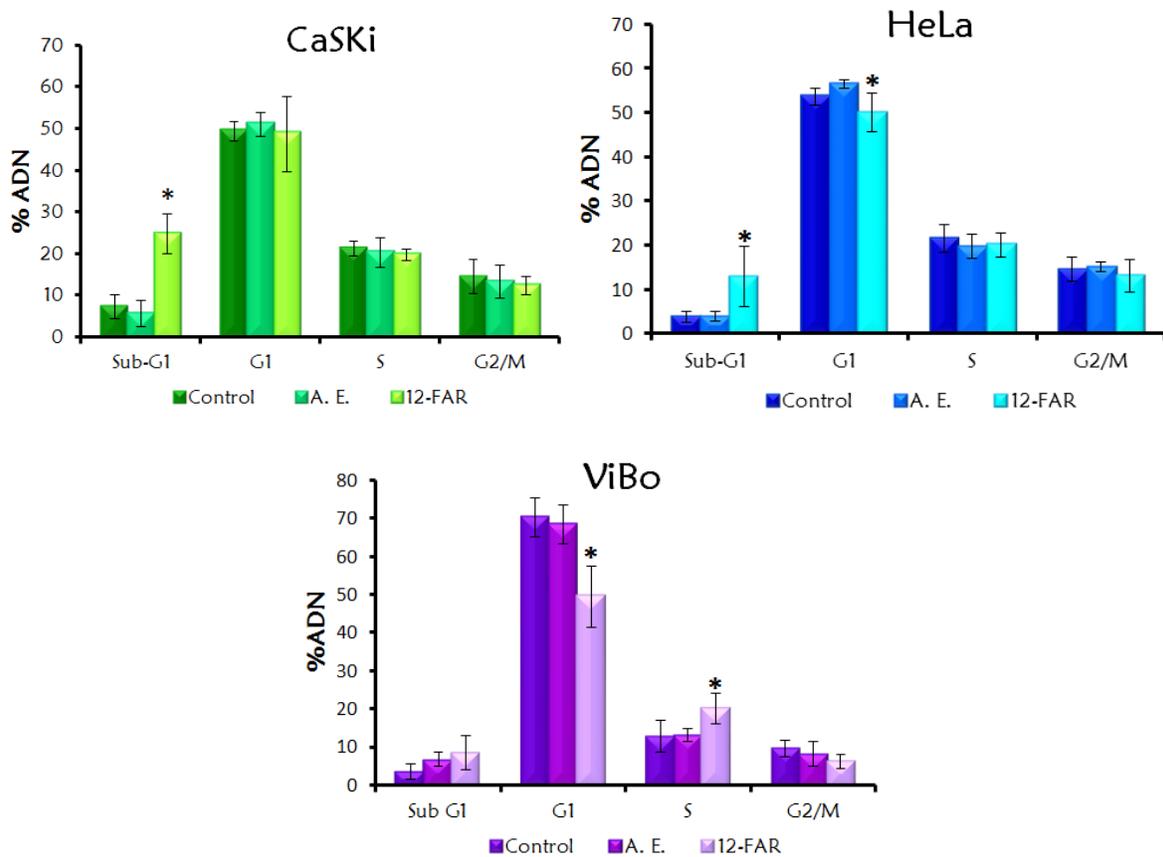


Figura 8. Efecto del 12-FAR en la distribución de la cantidad de ADN en las fases del ciclo celular de CaSki, HeLa y ViBo evaluado mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba ANDEVA seguida de la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Los datos estadísticamente significativos con respecto a los controles, están marcados con un asterisco.

Los resultados obtenidos en la figura 8 indican que el 12-FAR afecta la distribución del ADN en las líneas celulares HeLa y ViBo donde en las células HeLa, se observa una disminución en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G1 con un incremento en la región subG1, indicando que el 12-FAR disminuye la población en la fase G1 para enviarlas a una muerte celular. De igual manera, en la línea celular ViBo, se observó una disminución en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G1 y un aumento en el porcentaje de células que se encuentran en la fase S, indicando que el 12-FAR detiene a las células en la fase S. Estos resultados sugieren que el 12-FAR actúa de una manera dependiente de ciclo tanto en las células HeLa como en las ViBo. Sin embargo, en lo que respecta a la línea celular CaSki, el 12-FAR sólo indujo un incremento del porcentaje de células que se encuentran en fase subG1, indicando que la acción del 12-FAR induce algún tipo de muerte celular con acción independiente del ciclo.

- **EFFECTO NECRÓTICO EN CELULAS TUMORALES**

En base a los resultados obtenidos en la figura 8, donde el 12-FAR induce a las células tumorales a una muerte celular, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo se trataron con sus respectivas IC_{50} de 12-FAR y se determinó la cantidad de LDH liberada en el sobrenadante del cultivo como un indicador de muerte por necrosis. Para establecer el porcentaje de LDH liberada, se utilizó como control positivo células tratadas con el detergente Tritón X-100, el cual provocó un total rompimiento de las membranas plasmáticas de las células, liberando toda la LDH contenida en las células, por lo que se tomó al Tritón X-100 como el 100% de LDH (Figura. 9).

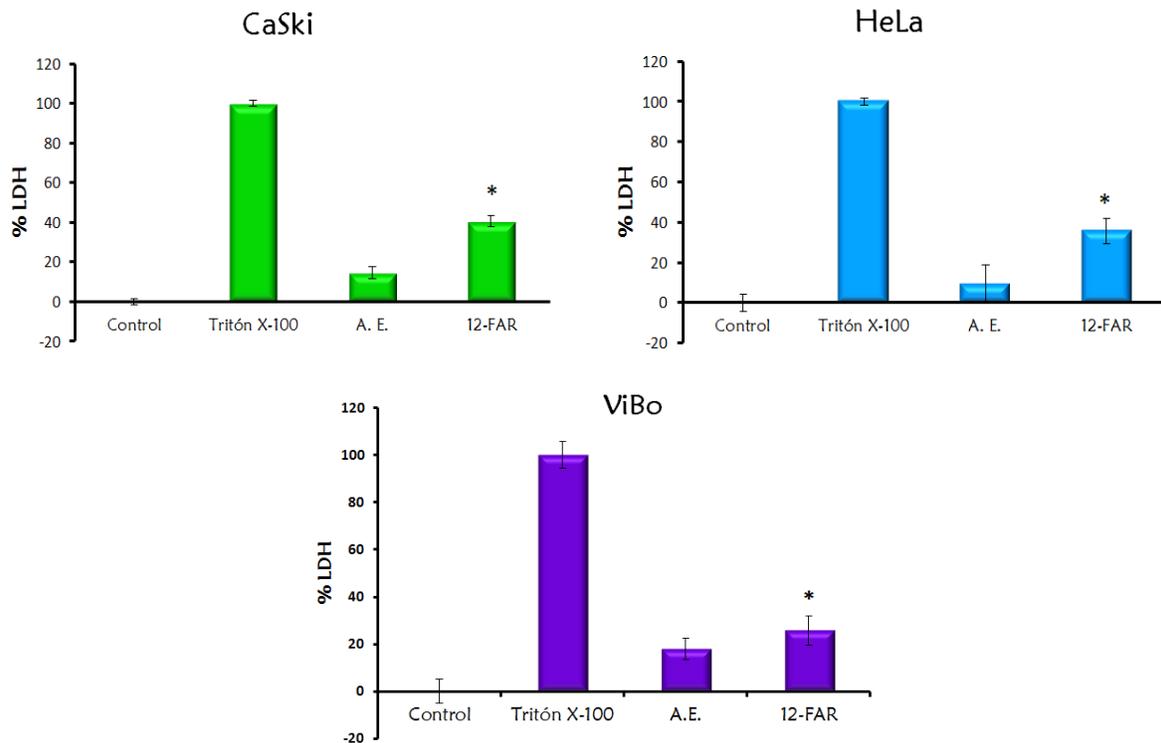


Figura 9. Evaluación de muerte mediante necrosis en líneas tumorales de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo a través de la cuantificación de LDH. . Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba ANDEVA seguida de la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Los datos estadísticamente significativos con respecto a los controles, están marcados con un asterisco.

Como se puede apreciar en la figura 9, el 12-FAR indujo una muerte por necrosis en las tres líneas tumorales, con un porcentaje de 40.5 para CaSki, 35.5 para HeLa y 37.6 para ViBo. No obstante estos resultados, en ninguna línea se registró un 50% de muerte necrótica, sugiriendo la posibilidad de la inducción de muerte celular diferente a la necrosis.

- **INDUCCIÓN DE MUERTE POR APOPTOSIS.**

Los resultados mostrados en la figura 9 indican que el 12-FAR induce a las células tumorales a una muerte necrótica, sin embargo, en ningún caso se observó un 50 % de necrosis, solo se observaron valores de 35.5 a 40.5 %, sugiriendo que otro tipo de muerte celular podría ser inducido en estas mismas células. Con el fin de establecer si el 12-FAR induce a las células a una muerte por apoptosis, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con las IC₅₀ correspondientes del compuesto y la detección de la caspasa-3 activa fue determinada por citometría de flujo como un indicador de apoptosis (Figura.10).

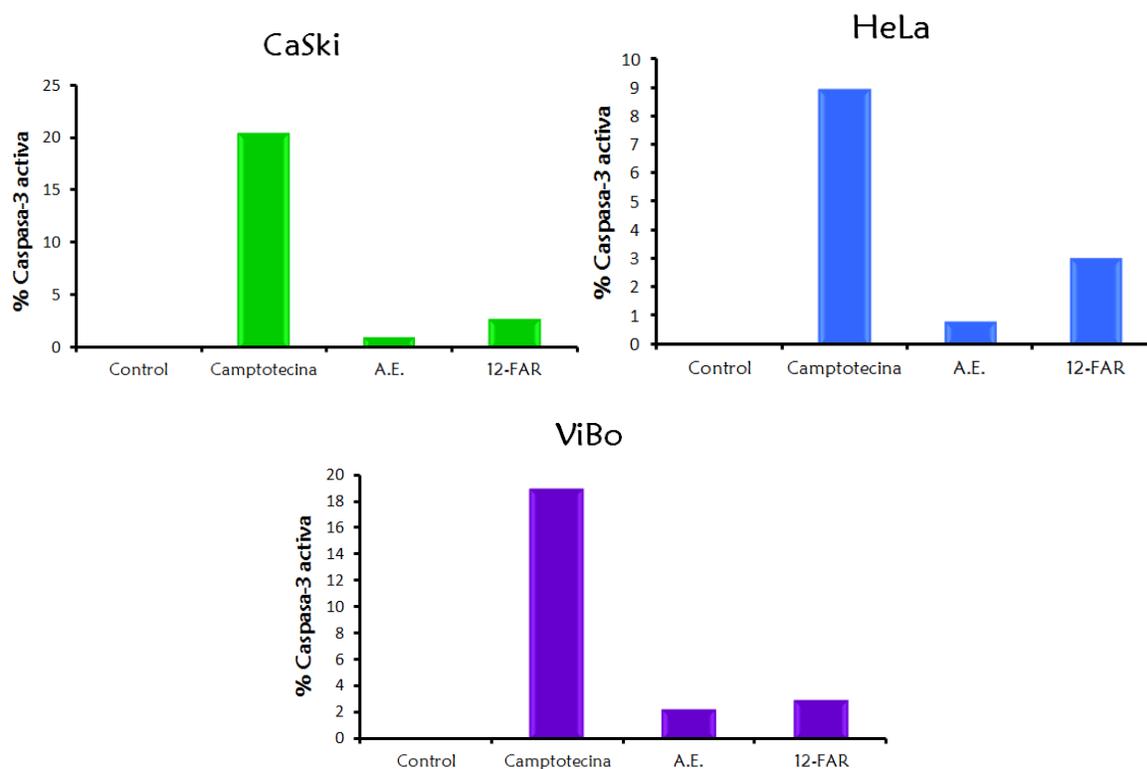


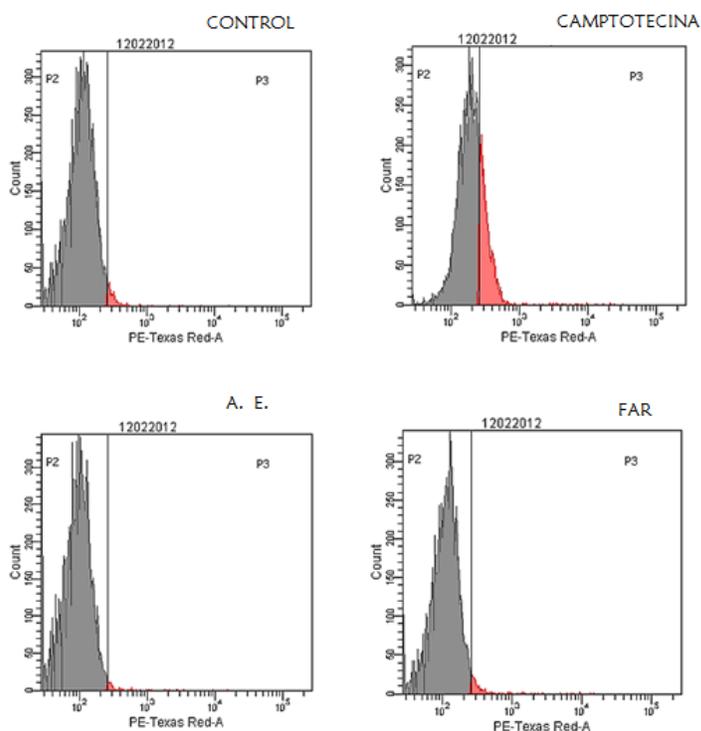
Figura 10. Efecto del 12-FAR sobre la expresión de la caspasa 3 activa en líneas tumorales de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo. La caspasa 3 activa fue evaluada por citometría de flujo.

Como se muestra en la figura 10, 12 FAR no afectó significativamente la expresión de la caspasa 3 activa en las tres líneas de cáncer cervicouterino,

indicando que este capsaicinoide no induce la expresión de esta caspasa en las células tumorales.

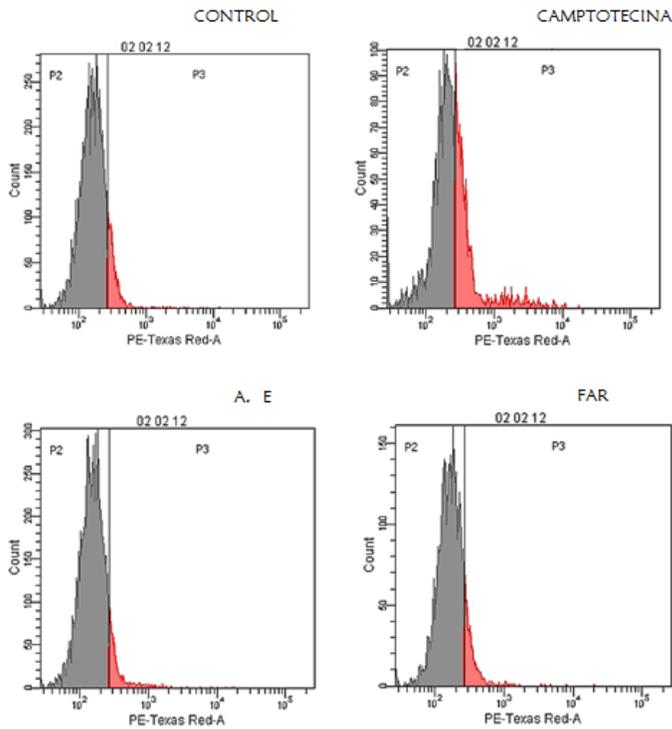
No obstante estos resultados, y tomando en consideración que el 12-FAR presentó un significativo aumento en el porcentaje de células que se encuentran en la región subG1 (Figura. 8), la cual indica la presencia de núcleos fragmentados y/o ADN fragmentado, se procedió a establecer si el 12-FAR induce fragmentación del ADN en las células tumorales. Al respecto, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de IC₅₀ respectivas y la fragmentación del ADN fue evaluada por la técnica de TUNEL (Figura. 11).

CaSki



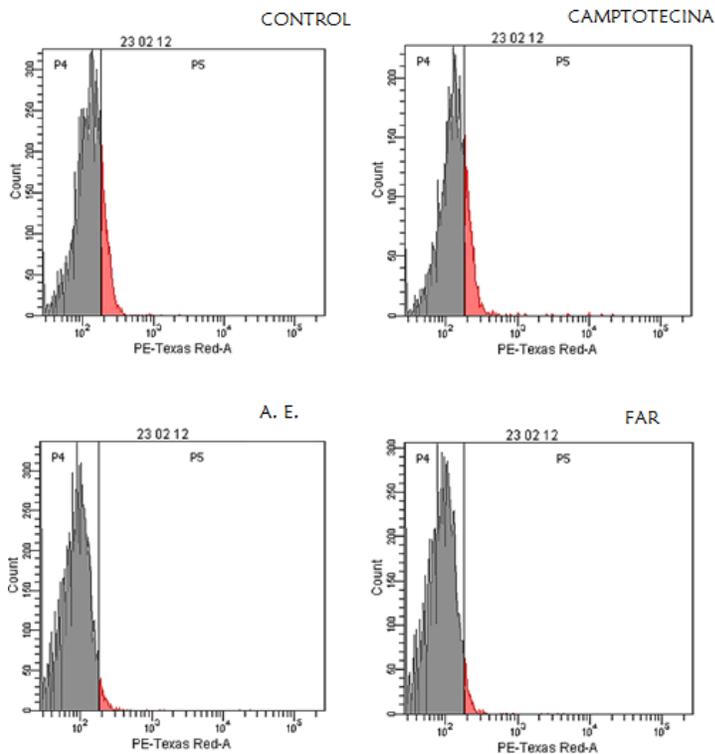
CaSki	% Fragmentación de ADN
Control	2%
Camptotecina	22%
A. E.	0.9%
12-FAR	2.3%

HeLa



HeLa	% Fragmentación de ADN
Control	11.5 %
Camptotecina	35.3%
A. E.	8.9 %
12-FAR	12.4 %

ViBo



ViBo	% Fragmentación de ADN
Control	16.6%
Camptotecina	18.9%
A. E.	2.7%
12-FAR	3.4%

Figura 11. Efecto del 12-FAR en la fragmentación del ADN de células tumorales de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo, a través de la técnica de TUNEL. Este ensayo es representativo de por lo menos dos experimentos con resultados similares.

Los resultados mostrados en la figura 11 establecen que el 12-FAR no induce fragmentación del ADN en las células tumorales de cáncer cervicouterino, que en conjunto con los resultados mostrados en la figura 10, donde se muestra que este compuesto no induce la expresión de la caspasa 3 activa sugieren que este capsaicinoide no induce muerte apoptótica en las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo.

- **EFEECTO NECRÓTICO EN LINFOCITOS**

Considerando que el 12-FAR induce una muerte necrótica en las células de cáncer cervicouterino a las concentraciones de IC_{50} correspondientes para cada una de las líneas celulares, surge la necesidad de establecer si este capsaicinoide induce necrosis en células no tumorales. Al respecto, cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana fueron estimulados con la IC_{50} mas alta obtenida para las células tumorales ($121.83 \mu\text{g/ml}$) y la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de estos cultivos como un indicador de muerte por necrosis. (Figura.12).

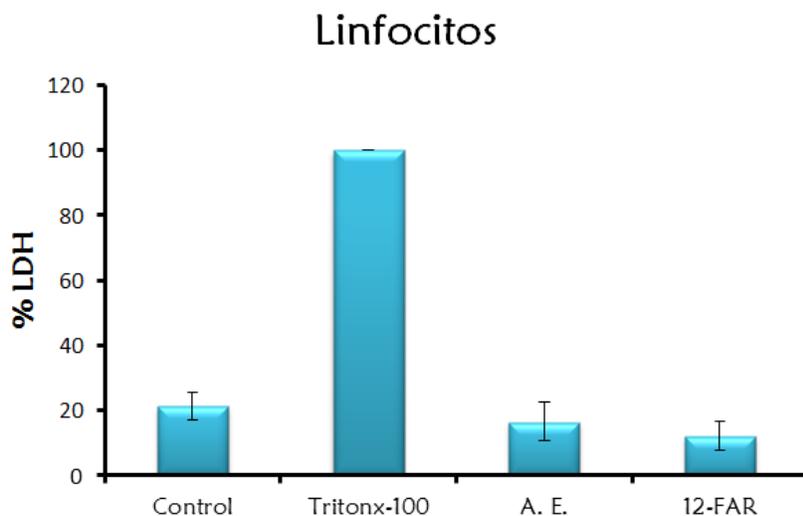


Figura 12. Cuantificación de LDH en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana tratados con el 12-FAR ($121.83 \mu\text{g/ml}$).

La nula diferencia observada entre los cultivos tratados con el 12-FAR y el control o tratada únicamente con Acetato de Etilo (A.E.) indica que el 12-FAR no induce a las células linfocíticas a una muerte por necrosis.

- **EFFECTO DEL 12-FAR EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS**

Con el objetivo de establecer si el 12-FAR afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica, fueron tratados con las IC_{50} correspondientes a las líneas celulares de cáncer cervicouterino y el porcentaje de proliferación en los cultivos fue determinado mediante el marcaje celular con carboxifluoresceína a través de citometría de flujo (Figura. 13).

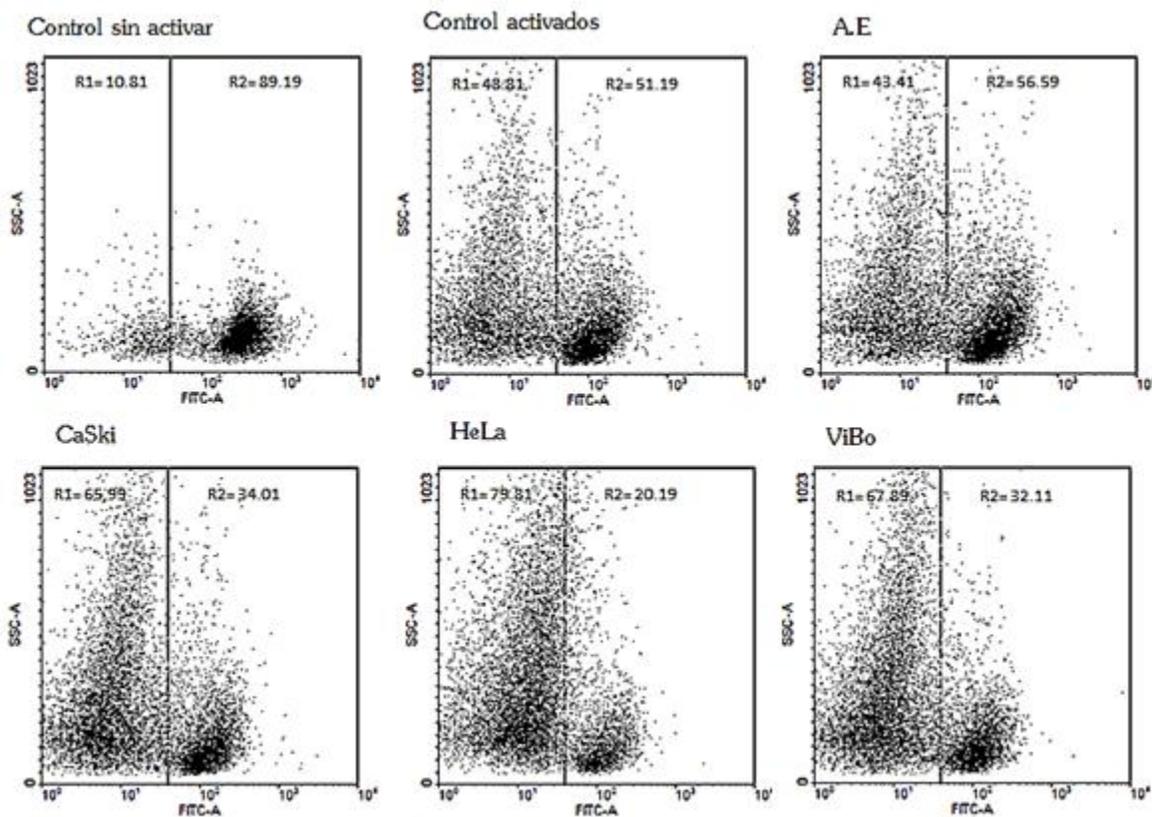


Figura 13. Efecto del 12-FAR en el potencial proliferativo de las células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.

Los resultados muestran que el 12-FAR no afecta la proliferación de las células linfocíticas de manera negativa, por el contrario, los resultados sugieren que este compuesto induce a estas células a proliferar.

DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino, es uno de los tipos de cáncer más frecuentes, ocupando el segundo lugar tanto a nivel mundial como nacional. Esta enfermedad puede ser prevenida con detección y tratamiento oportunos; sin embargo frecuentemente esta enfermedad es detectada en estadios avanzados, siendo los tratamientos correspondientes perjudiciales para el paciente, afectando células sanas. Por tal motivo es imperante la búsqueda de alternativas que presenten mayor selectividad entre células normales y sanas.

Se ha descrito que la capsaicina presenta una actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, cuya IC_{50} se encuentra en un rango de concentraciones que van de $50 \mu\text{M}$ a $200 \mu\text{M}$. (Hye-Seung *et al*, 2007). En lo que se refiere a 12-FAR, el rango de las IC_{50} obtenidas (Figura. 7) se encontró muy semejante al reportado para la capsaicina, sugiriendo que 12 FAR conserva la misma potencia. Algunos reportes han descrito a la capsaicina como un compuesto con acción citotóxica, mientras que otros la describen con actividad inductora de apoptosis. (Hye-Seung *et al*, 2007), (Justine, *et al* 2007). Con respecto a 12 FAR, éste induce cambios morfológicos en células tumorales, tales como pérdida de la adherencia, así como células con forma irregular, características de células en proceso de muerte. Por otro lado, los compuestos aplicados en la quimioterapia presentan una acción dependiente o independiente del ciclo celular. En el caso de la capsaicina, se ha descrito que induce un incremento en el porcentaje de células en la región subG1, indicando la inducción de la fragmentación nuclear. (Hye-Seung *et al*, 2007). En cuanto a 12-FAR, su acción fue dependiente o independiente del ciclo celular. En lo que se refiere a HeLa y ViBo el efecto que 12-FAR tiene es dependiente de ciclo, al disminuir en ambas líneas el porcentaje de células en fase G1; mientras que en HeLa se observa un claro aumento en la región subG1, en la línea celular ViBo las células son detenidas en la fase S. Con respecto a CaSki, observamos que el efecto no es dependiente del ciclo celular ya que, si observamos un aumento en la región subG1

ninguna fase del ciclo celular parece ser afectada; sugiriendo así que 12-FAR actúa de acuerdo a la línea celular (Figura.8).

De igual manera, las células mueren en respuesta a una variedad de estímulos. Sin tener en cuenta el tratamiento o tipo celular, una combinación de células apoptóticas y necróticas son encontradas ya sea *in vitro* o *in vivo* (Hye-Seung *et al*, 2007). Con respecto a la capsaicina, ésta se ha descrito como un compuesto inductor de muerte celular, especialmente de muerte apoptótica o muerte necrótica, dependiendo del tipo o línea celular. La necrosis es un tipo de muerte celular donde la pérdida de integridad de la membrana resulta en la liberación del contenido citoplasmático a los tejidos circundantes (Elmore, 2007). 12-FAR, indujo en las tres líneas tumorales de cáncer cervicouterino una muerte necrótica, ya que se detectó altos niveles de LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las células tumorales tratadas con 12-FAR (Figura. 9), sin embargo, en células no tumorales como los linfocitos humanos de sangre periférica, 12-FAR no ejerció un efecto necrótico (Figura. 12), estableciendo una diferencia de respuesta al compuesto entre las células tumorales y las no tumorales, diferencia que podría ser considerada para establecer un mecanismo de acción selectivo. Además, los resultados obtenidos con respecto a la inducción de muerte por apoptosis por 12-FAR en las células tumorales, apoyan este hecho, ya que los niveles de caspasa 3 activa así como de fragmentación del ADN fueron relativamente bajos (Figuras. 9 y 10). Estos resultados también sugieren que el cambio estructural en 12-FAR con respecto a la capsaicina, provoca que la actividad inductora de apoptosis presente en la capsaicina se vea fuertemente abatida en 12-FAR, propiciando principalmente una actividad necrótica. No obstante estos resultados, la actividad necrótica observada en los cultivos de células tumorales tratadas con 12-FAR, no alcanzaron el 50%, sugiriendo la existencia de otro tipo de muerte celular diferente a la necrosis y a la apoptosis. Es necesario resaltar, que la muerte necrótica generalmente induce una respuesta inflamatoria, implicando el desarrollo de efectos colaterales que podrían ser de baja o alta magnitud, dependiendo del tamaño del tumor.

Si bien el tipo de muerte celular que se presenta en células tumorales no es el más apropiado para el tratamiento del cáncer, resulta interesante que 12-FAR no afecte en lo más mínimo a las células no tumorales, es decir a los linfocitos (Figura. 13). Este hecho sugiere que la acción antiproliferativa e inductora de necrosis presentes en 12-FAR es selectiva. Cabe resaltar, que las células linfocíticas son fuertemente afectadas por los fármacos utilizados actualmente en la quimioterapia contra el cáncer, fenómeno que aparentemente 12-FAR no induciría ya que éste no afectó el potencial proliferativo de estas células ni indujo una muerte por necrosis.

Es necesario en un futuro cercano, evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de apoptosis de 12-FAR en diferentes líneas celulares de diferentes tipos de tumor, con la intención de establecer si la acción antitumoral del compuesto es específica para las células tumorales de cáncer cervicouterino o su acción es generalizada para cualquier tipo de cáncer. De igual manera, es necesario iniciar estudios en modelos In Vivo que permitan establecer el potencial terapéutico de 12-FAR.

CONCLUSIONES

- El compuesto 12-fenilacetilrivanil (12-FAR) reduce la densidad celular en un 50% de cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo a una concentración de 121.83 $\mu\text{g/ml}$, 56.57 $\mu\text{g/ml}$ y 74.19 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
- 12-FAR tiene un efecto dependiente de ciclo en las líneas celulares HeLa y ViBo, mientras que en la línea celular CaSki, el efecto es independiente del ciclo.
- 12-FAR induce muerte por necrosis en un 40.5% en CaSki, 35.5% en HeLa y 37.6% en ViBo.
- 12-FAR no induce la expresión de la caspasa-3 activa, ni fragmentación de ADN en células tumorales CaSki, HeLa y ViBo.
- 12-FAR no induce muerte por necrosis en células linfocíticas a una concentración de 121.83 $\mu\text{g/ml}$.
- 12-FAR no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas de sangre periférica a una concentración de 121.83 $\mu\text{g/ml}$.

LITERATURA CITADA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2006). Introducción a la biología celular. 2ª edición. Editorial Panamericana. España, 740 pp.
- Alonso P., Lazcano E., y Hernandez M. (2005). Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control. 2ª edición. Editorial Panamericana. México, 385pp.
- Appendino G., De Petrocellis L., Trevisani M., Minassi A., Daddario N., Moriello A. S., Gazzieri D., Ligresti A., Campi B., Fontana G., Pinna C., Geppetti P. y V. Di Marzo. (2005b). Development of the first ultra-potent “capsaicinoid” agonist at transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels, and its therapeutic potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 312: 561–570.
- Appendino G., Minassi A. y Nives D. (2005a). Hot cuisine as a source of anti-inflammatory drugs. *Phytochem Reviews*. 4: 3-10.
- Balgero Lladó. (1971). El carcinoma in situ del cuello uterino. Barcelona. 255 pp.
- Bolsover Stephen R., Hyams J.S., Shephard E.A., White H. A. y Widemann C.G. (2004). *Biología Celular*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New York.
- Bowen, I. & Bowen S. M. (1990). Programmed cell death in tumor and tissues. Chapman and Hall, London. pp 268.
- Castillo E., Regla I., Demare P., Luviano A. y A. López. (2008). Efficient chemoenzymatic Synthesis de phenylacetylirivanil: An ultrapotent capsaicinoid. *Synlet*; 18: 2869-2873
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programed Cell Death. *Toxicology Patology*. 35:495-516.

- Hye-Seung Jun, taesun Park, Chang Ki Lee, Mi Kyung Kang, Mi Sun Park, Ho Il Kang, Young-Joon Surch, Ok Hee Kim. (2007). Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2. *Food and Chemical Toxicology*; 45:708-715.
- INEGI (2008). Consulta interactiva de datos. Estadísticas y mortalidad. Consultada el 27 de febrero del 2012. Disponible en: www.inegi.com
- Jiménez L. F., y Merchant H. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial Prentice Hall. Mexico.
- Justine Chow, Manith Norng, Jing Zhang, Jianyuan Chai. (2007). TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells-Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773:565..576
- Karp G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill. México.
- Klug William S., Cummings M.R., y Spencer C.A. (2006). *Conceptos de Genética*. 8ª edición. Prentice Hall. Madrid.
- Morgan S. J. y Darling D. C. (1993). *Cultivo de las células animales*. Editorial Oxford University Press. EUA.
- Nelson D. L., y Cox M.M. (2005). *Principios de Bioquímica*. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona
- Norman., y Lodwick D. (2007). *Flesh and bones of medical cell biology*. Elsevier, Edimburgh, 124pp.
- OMS (2008.) Consulta interactiva de datos. Datos y estadísticas. Consultada el 27 de febrero del 2012. Disponible en: www.who.int/es
- Sánchez G. J., y Trejo B. I. (2006). *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial Alfil. México.
- Sánchez V. 2001. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica, *Revista Cubana Investigación Biomédica*; 20(4): pp 266-274.
- Sánchez V. y J. Trigo. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*; 20:266-274.

- Sen, S. y M. D'Incalci. (1992). Apoptosis: Biochemical Events and Relevance to Cancer Chemoterapy. *FEBS Letters*. 307:122-127
- Serman F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. perspectivas en prevención y tratamiento, *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*; 67(4): 318-323.
- Stephen R y Bolsover. (2007). Biología celular. Editorial Acriba. 2ª edición. Editorial Acriba. Zaragoza. 477pp.
- Studzinki G. (1995). Cell growth and apoptosis: A practical Approach. Oxford University Press, New York. Pp: 144, 145.
- Tubiana, M. (1971). The Kinetics of Tumour Cell Proliferation and Radiotherapy. *British Journal of Radiology*. 44:325-347
- Y. –J. Shurt, S. S. Lee. (1995). Short Review. Capsaicin in Hot Chili Pepper: Carcinogen, Co-carcinogen or Anticarcinogen?. *Pergamon*. 0278-69:00108-5
- Young-Gi Gil, Mi-Kyung kang. (2008). Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. *Life Sciences*. 82.997-1003

APÉNDICE

- Medio de cultivo

RPMI-1640 (GIBCO, USA) 10.42 g

NaHCO₃ (SIGMA, USA) 2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

- Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de ternera (NCS) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL. para su mejor uso y manipulación.

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de sodio (SIGMA, USA) 8.00 g

Cloruro de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA) 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 μ m, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

- Verseno

Ésta solución se empleó para despegar las células tumorales HeLa y ViBo adherentes, y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

EDTA (SIGMA, USA) 0.4 g

NaCl (SIGMA, USA) 8 g

KCl ((SIGMA, USA) 0.4 g

Tris (SIGMA, USA) 3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml. de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza en autoclave a 20 lbs durante 20 min.

- Solución Tripsina

Ésta solución se empleó para despegar las células ViBo, es preparada al 0.05% en Verseno.

- Solución cristal violeta (0.1 %)

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (SIGMA, USA) 3.96 g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA) 4.28 mL
Cristal violeta (SIGMA, USA) 1 g

- Colorante Cristal Violeta

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

- Glutaraldehído

A 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4 °C.

- Solución de ácido acético (10 %)

A 10 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker) se le agrega 90 mL de agua bidestilada.

- Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño María sin que la temperatura rebase los 60 °C. Se almacena a 4 °C.