



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y/O APOPTÓTICO DE LA
LACTONA ESFEROCEFALINA SOBRE LÍNEAS CELULARES
PROVENIENTES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

EDMUNDO OCTAVIO LOZADA GALLARDO



Asesor de tesis:

M. en C. Luís Sánchez Sánchez

México, D.F.

2013



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
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **LOZADA GALLARDO EDMUNDO OCTAVIO**, con número de cuenta **300295823**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **12** del mes de **noviembre** de 2013 a las **10:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO
- VOCAL** M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
- SECRETARIO** M. en C. ARTURO CANO FLORES
- SUPLENTE** M. en C. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
- SUPLENTE** BIÓL. J. MISAEEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto antiproliferativo y/o apoptótico de la lactona Esferocefalina sobre líneas celulares provenientes de Cáncer Cérvico-uterino.**

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 8 de octubre de 2013

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

*"Si he logrado ver más lejos,
ha sido porque he subido a hombros de gigantes."*

Isaac Newton

*"Después de todo ¿Qué es un científico?
Es un hombre curioso mirando a través del ojo de una
cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de
saber lo que está sucediendo"*

Jacques Yves Cousteau

Dedicatoria

A Dios porque siempre está presente en mi corazón, darme fuerza y paciencia para llevar a cabo este trabajo de tesis, y ser la luz que guía el comienzo de nuevos retos en mi crecimiento profesional y personal.

A mi mamá Rosa Carmina. Por darme la vida, ser el gran pilar de nuestra familia, por enseñarme perseverancia y constancia, darme grandes valores éticos y morales, por evitar que me deje vencer, y ser mi más fuerte apoyo en la vida.

A mi papá Edmundo Octavio. Por darme grandes lecciones a través de tus acciones, compartir sus experiencias de vida y demostrarme que la voluntad de una persona puede ser inquebrantable.

A mi hermana Lashmi. Porque a pesar de nuestras diferencias, podemos apoyarnos mutuamente, por enseñarme a ser más responsable, tener más paciencia y por estar presente en los grandes momentos de esta gran aventura que es la vida.

A mis grandes amigos Sergio, Carmina, Nayely, Sol, Edith, Christian, Dulce, Chío, Gaby y Amira. Por volverse parte de mi familia, celebrar conmigo los buenos momentos, brindar su apoyo incondicional en los malos y por las aventuras que seguiremos compartiendo.

A los instructores, amigos, compañeros y a los alumnos de Buceo. Gracias por enseñarme un nuevo mundo y compartir una de las más hermosas actividades que se pueden experimentar en esta vida, un deporte que me ha regalado muchas experiencias y gran crecimiento personal y profesional.

Y a todas aquellas personas que han entrado en mi vida; algunas se han ido, otras siguen conmigo, y otras tantas sé que a pesar de no frecuentarnos, seguimos unidos. De todos tengo grandes recuerdos.

¡Gracias por enriquecer mi vida!

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por su gran paciencia y aportar sus conocimientos y experiencia en la dirección de esta tesis.

A la Dra. María Luisa Escobar, por sus comentarios y apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por ser quien me explicó los procedimientos del laboratorio y enriquecer mi trabajo teórico y experimental con sus asesorías.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por su tiempo y dedicación en los comentarios vertidos para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Arturo Cano Flores, por elaborar el compuesto que se utilizó en ésta tesis y su apoyo al facilitarnos las características del compuesto.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano, Por incrementar mi entusiasmo y brindar con su experiencia el enriquecimiento de mi formación.

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

A cada uno de mis compañeros de laboratorio, gracias por su apoyo y por sus grandes aportaciones a este trabajo.

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo del PAPIME: 206812

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
III.	MARCO TEÓRICO.....	4
	a. Proliferación celular.....	4
	b. Ciclo celular.....	4
	c. Muerte celular.....	7
	i. Apoptosis.....	7
	ii. Necrosis.....	9
	d. La apoptosis como mecanismo natural del cuerpo.....	10
	e. Cáncer.....	11
	i. Cáncer cérvico-uterino.....	12
	ii. Tratamientos contra el cáncer.....	14
	1. Procesos Quirúrgicos.....	14
	2. Quimioterapia.....	15
	3. Radiación.....	16
	f. Lactonas.....	17
	g. Esferocefalina.....	18
IV.	ANTECEDENTES.....	20
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	22
VII.	HIPÓTESIS.....	23
VIII.	OBJETIVOS.....	24
IX.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	24

X.	MÉTODO	25
	a. Obtención y preparación del Stock de lactona esferocefalina	25
	b. Cultivo de la línea celular.....	25
	c. Obtención y procesamiento de células fibroblásticas de cérvix humano.	25
	d. Determinación de las IC₅₀	26
	i. Evaluación de proliferación por la técnica de la incorporación de cristal violeta	27
	ii. Determinación de la IC₅₀ matemática.	28
	e. Evaluación del ciclo celular.....	28
	i. Evaluación del ciclo celular por el método de citometría de flujo.....	29
	ii. Evaluación de muerte celular por pro-caspasa 3	29
	iii. Evaluación de la muerte celular mediante la detección de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL en cultivos celulares.	30
	iv. Evaluación de la expresión de pro-caspasa 3 en cultivos celulares tratados con Esferocefalina, a través de la cuantificación de luminosidad.	31
	f. Evaluación del efecto de la lactona esferocefalina en cultivos celulares no tumorales	31
	g. Análisis estadístico	32
XI.	RESULTADOS	33
XII.	DISCUSIÓN.....	40
XIII.	CONCLUSIÓN.....	44
XIV.	REFERENCIAS	45
XV.	APÉNDICE	52

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una colección de enfermedades con alta mortalidad en nuestro país, ocupando el segundo lugar, después del cáncer de mama. Dependiendo del estadio de la enfermedad existen distintos tratamientos. Los tratamientos actuales afectan tanto a células tumorales como a normales, además de ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y con efectos secundarios graves. Éste hecho genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial antitumoral. Actualmente se tiene un gran interés en alternativas basadas en compuestos de origen vegetal y especialmente en lactonas, ya que se les han adjudicado actividades biológicas diversas, entre las que se destaca su actividad antiproliferativa en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, como hepático, de colon, mama, entre otros. En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de la lactona Esferocefalina, así como su efecto en el ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis en las líneas de cáncer cérvico-uterino HeLa y CaSki. Al respecto, la IC_{50} en las células HeLa fue de 11.9 $\mu\text{g/ml}$ y en las células CaSki de 8.3 $\mu\text{g/ml}$. El análisis de la distribución de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de células HeLa y CaSki tratadas con Esferocefalina revela que ésta disminuye el porcentaje de células que están en G2/M, sugiriendo que la actividad antiproliferativa de la lactona es dependiente del ciclo celular. El incremento en la expresión de procaspasa 3, así como la observación de la fragmentación del ADN determinadas por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente, sugiere que la Esferocefalina induce muerte por apoptosis. La evaluación del efecto del compuesto en células no tumorales (fibroblastos humanos de cérvix), establece que la lactona no afecta el potencial proliferativo de estas células, indicando que este compuesto presenta una acción selectiva, que permite proponerlo como un agente con un fuerte potencial anticancerígeno con fuertes posibilidades de ser evaluado como un agente con potencial terapéutico.

INTRODUCCIÓN

La célula es una unidad mínima de un organismo capaz de actuar de manera autónoma. Todos los organismos vivos están formados por células, y en general se acepta que ningún organismo es un ser vivo si no consta al menos de una célula. Algunos organismos microscópicos, como bacterias y protozoos, son células únicas, mientras que los animales y plantas están formados por muchos millones de células organizadas en tejidos y órganos. Aunque los virus y los extractos acelulares realizan muchas de las funciones propias de la célula viva, carecen de vida independiente, capacidad de crecimiento y reproducción propias de las células y, por tanto, no se consideran seres vivos. La biología estudia las células en función de su constitución molecular y la forma en que cooperan entre sí para constituir organismos muy complejos, como el ser humano. Para poder comprender cómo funciona el cuerpo humano sano, cómo se desarrolla y envejece y qué falla en caso de enfermedad, es imprescindible conocer las células que lo constituyen. (Rogers, 2011)

Hay células de formas y tamaños muy variados. Algunas de las células bacterianas más pequeñas tienen forma cilíndrica de menos de una micra o μm ($1 \mu\text{m}$ es igual a una millonésima de metro) de longitud. En el extremo opuesto se encuentran las células nerviosas, corpúsculos de forma compleja con numerosas prolongaciones delgadas que pueden alcanzar varios metros de longitud (las del cuello de la jirafa constituyen un ejemplo espectacular). Casi todas las células vegetales tienen entre 20 y 30 μm de longitud, forma poligonal y pared celular rígida. Las células de los tejidos animales suelen ser compactas, entre 10 y 20 μm de diámetro y con una membrana superficial deformable y casi siempre muy plegada. (Panno, 2004)

Pese a las muchas diferencias de aspecto y función, todas las células están envueltas en una membrana plasmática que encierra el citoplasma, una sustancia rica en agua (fig. 1). En el interior de las células tienen lugar numerosas reacciones químicas que les permiten crecer, producir energía y eliminar residuos. El conjunto de estas reacciones se llama metabolismo. Todas las células contienen información hereditaria codificada en moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN); esta información dirige la actividad de la célula y asegura la reproducción y el paso de los caracteres a la descendencia. (Cooper, 2009)

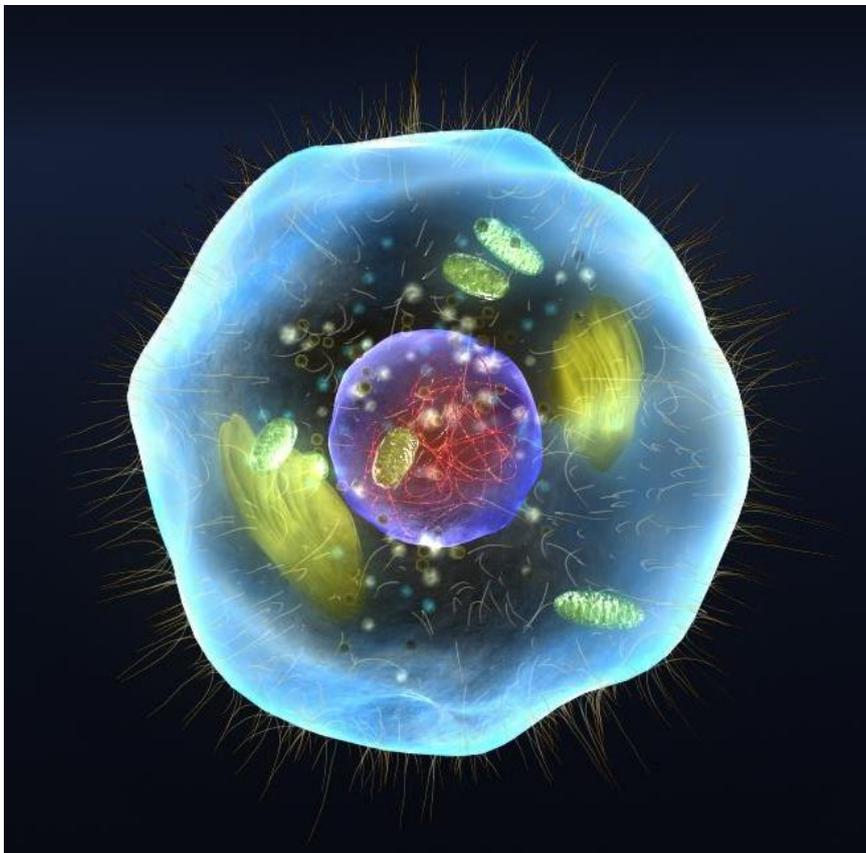


fig. 1 La imagen muestra el diseño tridimensional de la estructura de una célula. Imagen tomada de images google 2013 (<http://laughingmantis.com/category/3d-computer-animation/>).

MARCO TEÓRICO

Proliferación celular

La proliferación celular es un evento biológico que se regula mediante señales estimulantes que la activan o la inhiben. Las células presentan diferentes ritmos de proliferación lo cual depende del tejido del cual formen parte. Además de las células especializadas que no se dividen después de su diferenciación, se tienen a otras que se dividen de manera regular y a ritmo acelerado, entre estos dos extremos se encuentran aquellas que se dividen lentamente o que no se dividen, pero que pueden llegar a ser estimuladas por factores de crecimiento secretados por células vecinas o localizadas en tejidos u órganos distantes y que actúan de manera autócrina, parácrina o endócrina. (Berek, 2005).

Las células necesitan señales procedentes de otras células, no solamente para proliferar, sino también para sobrevivir. Si se les priva de tales factores de supervivencia, las células activan un programa intracelular de suicidio y mueren por un proceso denominado muerte programada (apoptosis). El hecho de necesitar señales procedentes de otras células para poder sobrevivir ayuda a garantizar que las células sobrevivan sólo cuándo y dónde son necesarias. Este control de la división celular es tan solo uno de los eventos que constituyen el ciclo celular. (Hall, 2004).

Ciclo celular

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los cuales duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división es conocido como ciclo celular, donde se encuentran los mecanismos esenciales mediante el cual todos los seres vivos se reproducen. (Lodish *et. al*, 2002). En las especies unicelulares, como las bacterias y levaduras, cada división celular genera un nuevo organismo completo. En las especies pluricelulares, para producir un organismo funcional se requieren secuencias de divisiones celulares largas y complejas.

Incluso en el adulto, la división celular es necesaria para remplazar las células que mueren. (Murray, 1993). De hecho cada uno de nosotros debe fabricar muchos millones de células cada segundo simplemente para sobrevivir: si todas las divisiones celulares se detuvieran por ejemplo, por la exposición a grandes dosis de rayos X, moriríamos al cabo de pocos días. (Hall, 2004).

Los pormenores del ciclo celular varían. Sin embargo, ciertas características son universales. El conjunto mínimo de procesos que una célula tiene que realizar son aquellos que le permiten llevar a cabo su tarea más importante: la transmisión de su información genética a la siguiente generación de células. (Carnero A., 2002). Para producir dos células hijas genéticamente idénticas, el ADN de cada cromosoma ha de ser replicado fielmente generando dos copias, el ADN de cada cromosoma replicado tiene que ser distribuido (segregados) con exactitud a las dos células hijas, de manera que cada célula reciba una copia del genoma completo (Anthony *et al*, 1991) como se muestra en la fig. 2

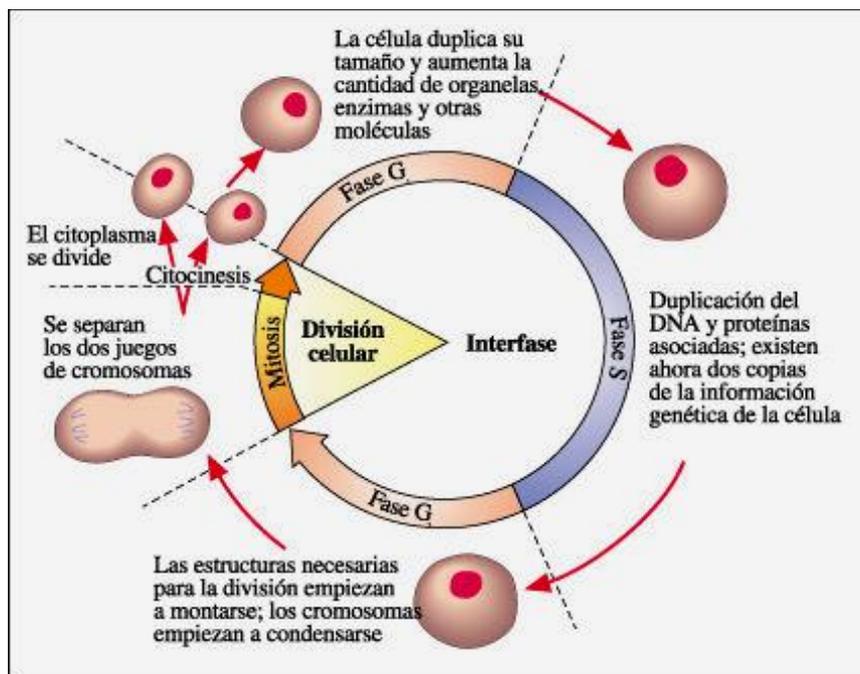


fig. 2 La imagen muestra la división hipotética de una célula eucariota con dos cromosomas para poder ilustrar cómo se forman dos células hijas genéticamente idénticas en cada ciclo. (Imagen tomada de Cancino, 2007)

Las células eucariotas han desarrollado una compleja red de proteínas reguladoras, conocida como sistema de control del ciclo celular, que gobierna la progresión a través del ciclo celular. El núcleo de este sistema es una serie ordenada de interruptores bioquímicos que controlan los principales acontecimientos del ciclo, incluyendo la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas replicados. En la mayoría de células, unos niveles adicionales de regulación aumentan la fidelidad de la división celular y permiten que el sistema de control responda a varias señales procedentes tanto del interior como del exterior de la célula. En el interior de la célula, el sistema de control comprueba la progresión a través del ciclo celular y retrasa los acontecimientos posteriores hasta que se hayan completado los acontecimientos previos. (Studzinski, 1995).

En la mayoría de los ciclos celulares, se intercalan fases de descanso que les permiten disponer de más tiempo para crecer –la fase G1 entre la fase M y la fase S y la fase G2 entre la fase S y la mitosis. Así el ciclo celular eucariota se divide tradicionalmente en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M, Al conjunto de las tres primeras fases se le denomina interfase, la cual puede tener una duración de unas 23 horas de las 24 horas del ciclo celular y una hora para que se realice la mitosis (Fase M), sólo por dar un ejemplo. (Belletti, 2005).

La fase G1 y G2 son mucho más que meros períodos de espera que permiten crecer a la célula. Proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo para así asegurarse de que las condiciones son adecuadas y de que se han completado los preparativos antes de la fase S y de la mitosis. La fase G1 es especialmente importante a este respecto. Su duración puede variar mucho dependiendo de las condiciones externas y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Por ejemplo, si las condiciones son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase G1 incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado G0 (G cero), en el cual pueden permanecer durante días, semanas, incluso años antes de volver a proliferar. (Belletti, 2005).

Este proceso (Ciclo celular) va de la mano con otro que tiene que ver con la muerte de las células existiendo en un perfecto equilibrio para la sobrevivencia del individuo y su correcto desarrollo. (Murray, 1993).

Muerte celular

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien por que la célula sufrió un daño irreversible y muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso. (Hughes *et al*, 2002).

Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo, tiene un significado biológico muy importante, que es opuesto al de la mitosis en la regulación del volumen tisular. (Alfaro, 2000). La apoptosis contribuye a dar forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autoreactivas, las células infectadas y las genéticamente dañadas, cuya existencia es potencialmente dañina para el huésped. (Studzinski, 1995). Se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos tales como, la fragmentación internucleosomal del ADN, condensación de la cromatina, encogimiento celular y la formación de cuerpos apoptóticos y la aparición de fosfatidilserina en la lámina externa de la membrana celular, entre otros. (Caballero A. 2002).

La muerte apoptótica es un proceso complejo que requiere de la activación de varias señales y mecanismos de regulación, los cuales involucran la participación de una serie de moléculas con acción proapoptótica como en el caso de los miembros de la familia de las caspasas, (Adrain *et al*, 2002) así como antiapoptóticas como algunos de los miembros de la familia del BCL-2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Se sabe que diferentes proteasas median muchos de los eventos bioquímicos que ocurren en la muerte apoptótica. Estas proteasas se conocen como caspasas y se sabe que su activación ocurre de manera secuencial y específica, (fig. 3) (Caballero A. 2002).

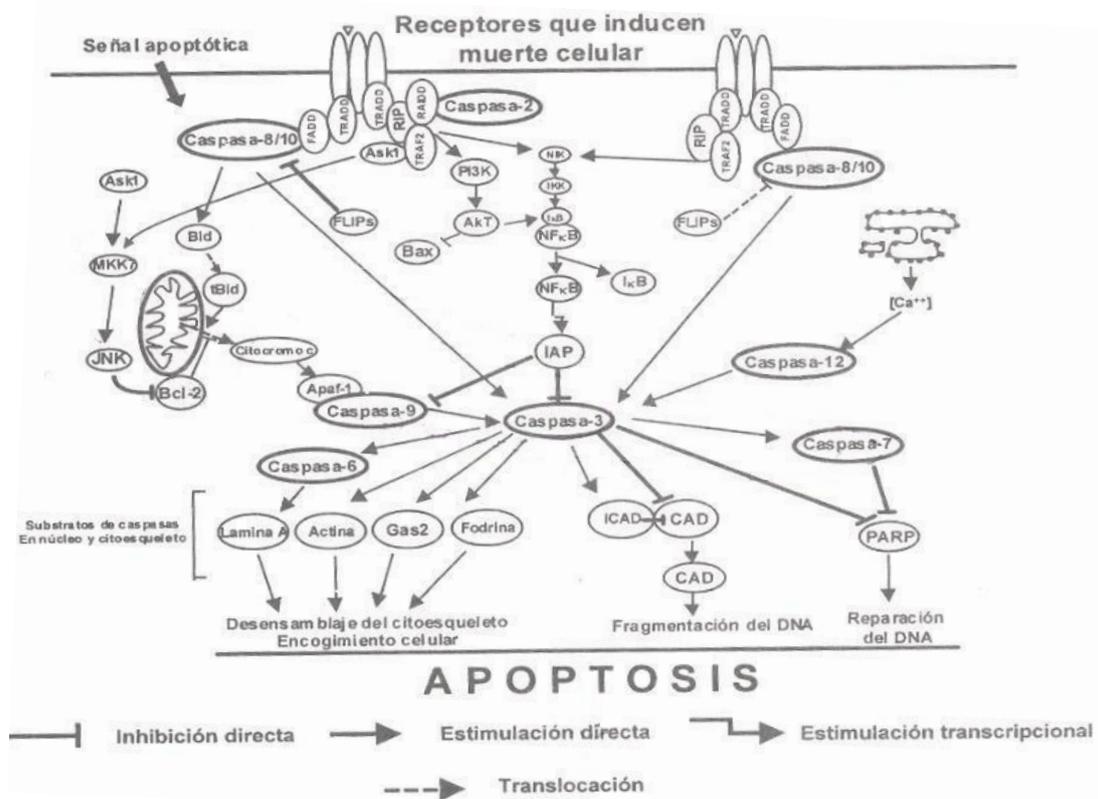


fig. 3 La imagen muestra la cascada de activación de caspasas y su posible regulación en células apoptóticas. El modelo sugiere que una señal proapoptótica induce la activación de vías de señalización en las que participan diferentes moléculas, entre ellas las caspasas. (Imagen tomada de Caballero, 2002).

Una gran variedad de eventos generados durante el proceso apoptótico se producen en la mitocondria, incluyendo alteraciones en el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, así como la liberación de moléculas proapoptóticas y su interacción con otras proteínas como algunos miembros de la familia del Bcl2. (Xiao-Ming, 2003).

Algunos estudios han demostrado que la activación de algunas caspasas depende de la liberación de citocromo C de la mitocondria al citosol. (Lui X, 1997). El citocromo C liberado forma, junto con Apaf-1 y la Procaspasa-9, un complejo multiproteico que se denomina apoptosoma y que es responsable del procesamiento de la Procaspasa-9 a su forma activa, la cual puede activar a su vez a otras caspasas. Bajo estas condiciones, el consumo de oxígeno y la producción de ATP derivadas de la fosforilación oxidativa podrían mantenerse sin abatirse, mientras que las caspasas activas podrían atacar proteolíticamente sustratos citosólicos y nucleares llevando a la célula a la muerte apoptótica (Renz A. 2001) (fig. 3).

Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. Este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos. (Alberts, 2004).

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

una apariencia densa y la membrana interna se contrae alejándose de la membrana externa (Studzinski, 1995) (fig. 4).

La apoptosis como mecanismo natural del cuerpo

Las vías de apoptosis son cruciales para la homeostasis del tejido y se inicia en respuesta a ciertas señales de desarrollo, tales como una disminución en la concentración local de un determinado tejido morfógeno o factor de crecimiento. Otros estímulos incluyen el estrés grave o daño a los componentes celulares vitales, que pueden ser causados por la radiación ionizante, golpe de calor, toxinas, el desprendimiento de células del tejido circundante, infecciones bacterianas o virales. (Ashkenazi A. *et al*, 2002).

La desregulación de la apoptosis está implicada en una multitud de estados de enfermedad. El aumento de la apoptosis patológicamente agrava muchas condiciones, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, isquemia cardíaca y daño renal. (Ashkenazi A. *et al*, 2008). Por otro lado, la apoptosis inadecuada conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes y el mal funcionamiento de la apoptosis es una característica clave del cáncer y es fundamental para el desarrollo del mismo y la supervivencia de células tumorales. (Faddeel *et al*, 2005).

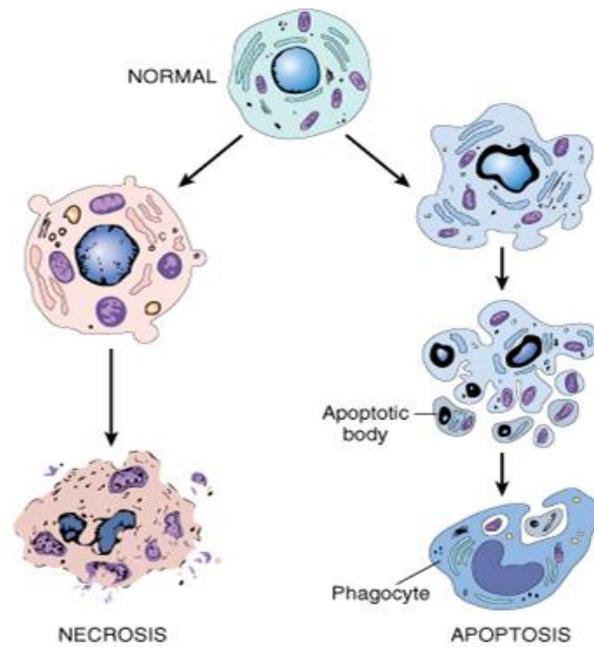


fig. 4 Esquemización de muerte por necrosis a la izquierda, en la cual podemos observar como la célula vierte todo su contenido hacia el exterior, provocando una respuesta inflamatoria. A la derecha, observamos la muerte por apoptosis en la cual podemos ver cómo es que se encapsula el contenido de la célula provocando lo que conocemos como cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados por los macrófagos. (Imagen tomada de Cancino D. 2007).

Cáncer

El cáncer es un crecimiento exacerbado a nivel tisular producido por la proliferación continua de una o varias células anormales que presentan alteraciones que han sido seleccionadas y transmitidas (Caer F, 1994), que además provocan un descontrol en el ritmo de la división celular, (Weinberg, 1996) así como una mejor adaptación a condiciones de bajas concentraciones en nutrientes y cambios en las características morfológicas debidas a una perturbación de los procesos de diferenciación, presentando así la capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, generar un tumor, y alterar la homeostasis del organismo. (ACS, 2010).

Puede originarse a partir de células con alto índice proliferativo en cualquier tejido corporal, y se clasifican en función del tejido y célula de origen (Evan *et al*, 2001), de este modo encontramos tres subtipos principales. Los sarcomas, que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y próstata. Las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. (Pardo, 1998).

La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año. En nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar. De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes. (WHO, 2010).

En 2008, la incidencia de cáncer cérvico-uterino en México fue de 10.06 % en las mujeres de 15 años y más, siendo las veracruzanas las que tienen la mayor incidencia (25.28%), seguidas de las residentes en Coahuila (19.56%) y Oaxaca (15.25%); por su parte, las mujeres que viven en Morelos (2.73%), Quintana Roo (2.74%) y Tabasco (3.55%) son las que presentan las incidencias más bajas (INEGI 2013).

Cáncer Cérvico-uterino (CaCu)

Es el carcinoma que tiene la mayor incidencia y es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas. (INEGI, 2013). El factor de riesgo más común es la exposición a ciertas variedades del virus de papiloma humano (VPH) (Muños y Bosch, 1997) que origina el 99 % de los casos y principalmente los tipos 16 y 18 con un 70 %. (Herrero *et al*, 2003). El cáncer cérvico-uterino suele crecer lentamente por un período de tiempo en años. Antes de que se encuentren células cancerosas en el cuello uterino, sus tejidos

experimentan cambios y empiezan a aparecer células anormales, proceso conocido como displasias o Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC) (Hazzard *et al*, 2005). Posteriormente, las células cancerosas comienzan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y en las áreas circundantes. (Pardo, 1998).

Dependiendo del grado de avance de las NIC se clasifican en:

NIC I: Probable lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

NIC II: Probable lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

NIC III: Probable lesión intraepitelial escamosa y glandular cáncer *in situ*.

NIC IV y V: Células escamosas atípicas sugerente de cáncer invasor. (ACCP, 2003).

Ya que en general no hay síntomas asociados con el CaCu el médico debe hacer una serie de pruebas para buscar el cáncer. La prueba más común es la de Papanicolaou, que se lleva a cabo usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula de madera pequeña para raspar suavemente el exterior del cuello uterino con el fin de recoger células. La paciente puede sentir algo de presión, pero generalmente no se siente dolor. (Glassman A. 2001).

La eficacia de la prueba del Papanicolaou se estima mediante la sensibilidad, que es la proporción de todos aquellos con la enfermedad a los cuales la prueba identifica correctamente como positivos; y la especificidad que es la proporción de todos aquellos sin la enfermedad a los cuales la prueba identifica correctamente como negativos.

Sensibilidad = 51% para NIC I o mayor Márgenes, de 37% a 84%.

Especificidad = 98% para NIC I o mayor Márgenes, de 86% a 100%. (ACCP, 2002).

Otras pruebas que pueden realizarse para el diagnóstico son: la colposcopia y la biopsia dirigida. La primera se realiza con un colposcopio. Se trata de un instrumento con una lente de aumento para visualizar imágenes del cuello uterino que se interpretan como normales y anormales. Mientras que la Biopsia dirigida se utiliza cuando existen imágenes anormales o sospechosas. Ambas con una eficacia similar a la del Papanicolaou. (Numen, 2010).

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. (PAHO, 2002).

Otros factores que propician el riesgo de infección de cáncer cérvico-uterino son. El comienzo de relaciones sexuales a temprana edad, Tener múltiples parejas sexuales o 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 y alcohol. (Alonso. 2000).

Tratamientos contra el cáncer

Los tratamientos actuales para combatir el cáncer cérvico-uterino se clasifican por su método de acción y encontramos tres principales tratamientos.

Procesos Quirúrgicos

Éstos varían según el lugar donde está localizado el cáncer y lo avanzada que esté la enfermedad. Puede implicar la extirpación de una sección focalizada del órgano o tejido. El proceso de recuperación varía según el tipo de cirugía que se requiera.

El cáncer cervical se puede extraer empleando algún tipo de operación como. La criocirugía, la cirugía con rayo láser, la conización que consiste en la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anomalía. Se emplea para biopsias, pero también para el

tratamiento de cánceres tempranos del cuello uterino o la histerectomía que es una operación en la cual se extraen todo el útero, incluyendo todo el cuello uterino, además del cáncer. (Berek, 2005).

Quimioterapia

Es un tratamiento que consiste en impedir la reproducción de las células cancerosas, a través del consumo de fármacos. Dichos fármacos se denominan medicamento citostáticos o citotóxicos. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se administre. Debido a su inespecificidad afecta a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa. Por tanto, la quimioterapia es la utilización de diversos fármacos que tiene la propiedad de interferir con el ciclo celular, ocasionando la destrucción de células. En algunas ocasiones la quimioterapia se utiliza en conjunto con tratamientos de radiación. (Chabner B. 1990).

Algunos de los efectos secundarios de este tratamiento incluyen:

- Nausea y vómito.
- Cansancio.
- Úlceras en la boca.
- Pérdida de cabello y uñas.
- Diarrea.

Radiación

El objetivo de la terapia con radiación es eliminar las células cancerosas, reducir el tamaño de un tumor para facilitar el proceso de extirpación y/o aliviar algunos de los síntomas relacionados al cáncer. A través de la administración de rayos gamma de gran potencia dentro del organismo atacando la zona específica del padecimiento, sin embargo esta terapia no es de carácter selectivo pues debido a la naturaleza de la radiación también pueden afectarse todas aquellas células que se encuentren en proliferación, tal es el caso de la piel, el cabello, uñas y las mucosas que revisten el tracto gástrico, debido a que el blanco de esta terapia es la descomposición o desnaturalización de la molécula de ADN, llevándolas a un proceso de muerte debido a la imposibilidad en la célula de poder repararse. (Berek, 2005).

Algunos de los efectos secundarios relacionados a la radiación incluyen:

- Diarrea.
- Sangrado rectal.
- Cansancio.
- Pérdida de apetito y náuseas.

Estos hechos, han generado un fuerte interés en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, ya sea en combinación con las terapias existentes o terapias cuyo mecanismo de acción está basado en nuevas drogas o compuestos con actividad antitumoral. Actualmente hay un gran interés en la utilización de compuestos de origen vegetal, y particularmente en las lactonas, dada su diversa actividad biológica, ya que se ha reportado que éstas presentan actividad antimicrobiana, fungicida, antiviral y antitumoral, entre otros. (Bhat *et al*, 2005).

Lactonas

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

Dentro de la familia *Compositae* se encuentran plantas de uso medicinal como son *Árnica montana*, *Artemisia annua* y *Tanacetum parthenium* las cuales contiene lactonas sesquiterpénicas (LsS), como sus principales componentes activos, muchos de estos compuestos se han aislado de la hoja y flores de estas plantas, donde pueden constituir cerca del 5 % del peso seco. (Heywood et al, 1997).

El prefijo “sesqui” indica que las LsS están formadas por 15 átomos de Carbono. De acuerdo con su esqueleto carbocíclico, las LsS pueden ser clasificadas en cuatro grupos principalmente; germacranólidas, eudesmanólidas, guayanólidas y pseudoguayanólidas. La estructura química de algunas lactonas sesquiterpénicas, se muestran en la fig. 5.

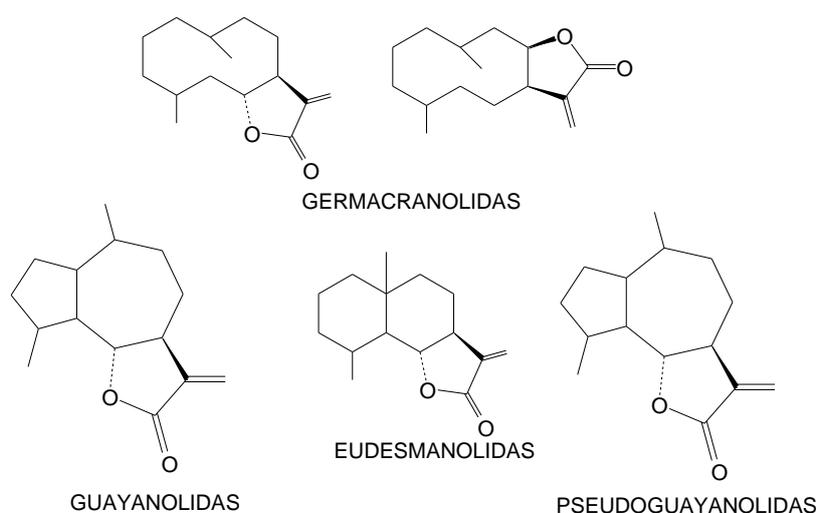


fig. 5 Esqueletos básicos de las lactonas sesquiterpénicas.

Dentro de las actividades farmacológicas descritas para las Lactonas Sesquiterpénicas (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).

Esferocefalina

Dentro de este tipo de compuestos (Lactonas) se encuentra la Esferocefalina, lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacranólida, aislada de las partes aéreas de *Viguiera sphaerocephala*, la cual fue colectada en el Estado de Morelos, sus descripción espectroscópica, se encuentra reseñada en la literatura especializada (Ortega, 1980), y cuya estructura se muestra en la fig. 6.

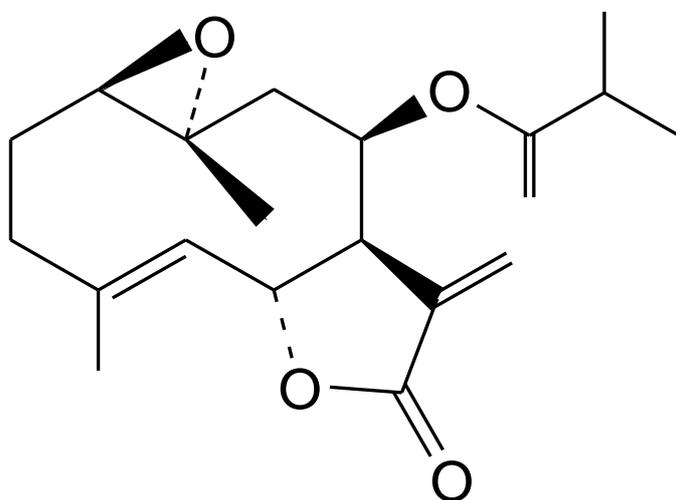


fig. 6 Estructura de la lactona sesquiterpénica Esferocefalina.

La gran cantidad de lactonas aisladas, así como la determinación de sus actividades biológicas, ha permitido generar modelos que explican su posible mecanismo de acción, tal es el caso de la partenolida, cuya estructura es similar a la de la Esferocefalina, y cuya acción se da sobre diferentes rutas metabólicas, como lo podemos observar en la fig. 7.

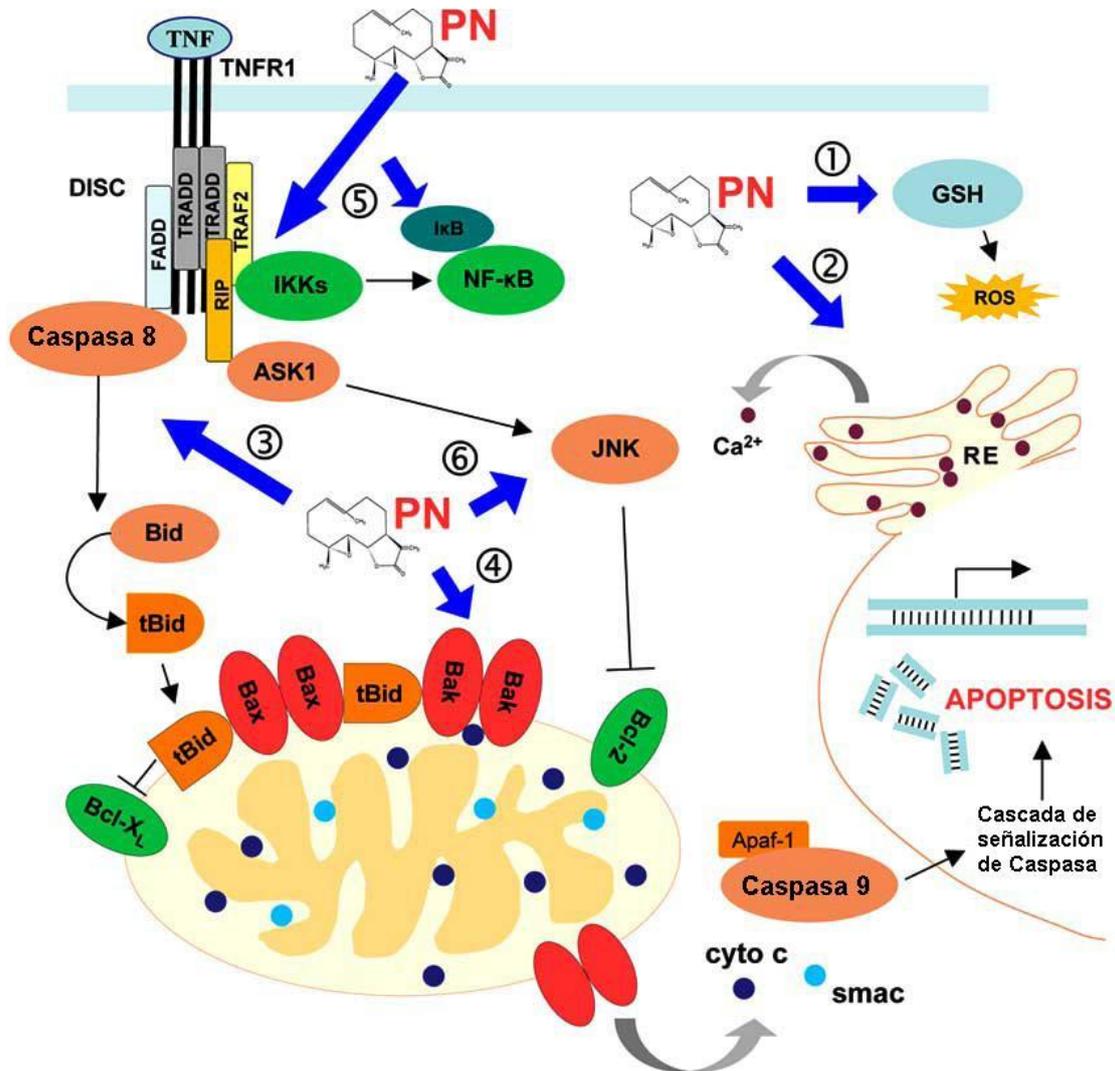


fig. 7 Vías por las cuales puede estar actuando la partenolida. Se puede observar que actúa agotando la proteína intracelular GSH y la perturbación del equilibrio REDOX (1); Promueve estrés del retículo endoplásmico que responde liberando Ca²⁺ al citosol (2); Aumento de la activación de la caspasa 8 y la división de Bid. Cambios proapoptóticos (3); acción sobre las proteínas Bcl-2 en la ruta de apoptosis vía mitocondria (4), Supresión de la ruta de señalización de NF-κB (5) y sostiene la activación de JNK (6). (Imagen tomada de Siyuan Zhang *et al*, 2005).

ANTECEDENTES

Las actividades biológicas descritas para las lactonas LsS comprenden actividades variadas que van desde actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral. En el mecanismo de acción de estas sustancias, es aceptada la unión covalente de las LsS a grupos sulfidros libres en proteínas, y la inactivación de 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. (Beekman *et al*, 1997).

- La Lactona Sesquiterpénica Partenólida detiene ciclo celular (G2/M) en líneas de hepatocarcinoma. (Siyuan Zhang, *et al*, 2005).
- La Lactona Sesquiterpénica Partenólida induce apoptosis en cáncer de colon y cáncer de mama. (Siyuan Zhang, *et al*, 2005).
- La Lactona Sesquiterpénica Partenólida induce apoptosis selectiva en células de linfocitos B de leucemia crónica *in vitro* (Steele, *et al*, 2006).
- La Lactona Sesquiterpénica Partenólida inhibe la proliferación en tres líneas de células tumorales humanas *in Vitro*: Carcinoma de pulmón (A 549), meduloblastoma (TE671) y adenocarcinoma de colon (HT-29). (Parada *et al*, 2007).

Y para el cáncer cérvico-uterino

- La lactona Skhuriolida tiene efecto selectivo de apoptosis en la línea celular de cáncer cérvico-uterino CaSki (Cancino, 2007)
- La lactona sesquiterpénica 7a-hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) presenta un efecto selectivo de apoptosis en la línea celulares de CaCu CaSki y HeLa. (Ornelas 2009).
- La lactona arglanina presenta efecto sobre el potencial proliferativo y ciclo celular de células tumorales de cérvix humano (ViBo, CaLo y CaSki) (Ortega, 2009)
- La lactona Desacetilconfertiflorina (DESA) presenta efecto antitumoral sobre células de cáncer cérvico-uterino CaSki y HeLa. (Medina, 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las estrategias para combatir el cáncer, en los últimos años se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos figuran las lactonas. (Siyuan Zhang, *et al* 2005). Estudios de la actividad biológica de las lactonas sobre líneas celulares carcinogénicas han mostrado que éstos compuestos pueden tener actividad antitumoral; sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado en la región cérvico-uterina, por lo que resulta de gran interés realizar una valoración de la actividad biológica de esta lactona Esferocefalina, en las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino HeLa y CaSki, de tal manera que aporte información que determine si esta lactona afecta el potencial proliferativo de estas células, e induce a una muerte por apoptosis, como parte de su mecanismo de acción.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es una de las principales causas de muerte en mujeres mexicanas siendo el responsable del 30% de las muertes por cáncer. El virus del papiloma humano, tipos 16 y 18 están asociados a un 70% de los casos, mantenido su incidencia en la población mexicana.

Además, el 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 quimioprevención del cáncer. Dentro de este grupo de compuestos encontramos a las lactonas, en especial a las lactonas sesquiterpénicas a las cuales se les ha atribuido un efecto citotóxico e inhibidor de la proliferación de células tumorales; sin embargo, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el carcinoma de cérvix, por lo cual es necesario generar información acerca de la actividad de las lactonas sesquiterpénicas sobre células tumorales de cáncer cérvico-uterino.

HIPÓTESIS

Dado que algunas lactonas pueden inducir muerte celular por apoptosis o detención del ciclo celular en líneas celulares de ciertos tipos de cáncer, como pulmón, colon, mama y líneas de hepatocarcinoma, se espera que la lactona Esferocefalina induzca detención en ciclo celular y/o muerte por apoptosis en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino HeLa y CaSki.

OBJETIVO

Determinar la actividad antiproliferativa y/o apoptótica de la lactona Esferocefalina, así como su efecto en el ciclo celular en las líneas tumorales HeLa y CaSki provenientes de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos particulares:

- Realizar cultivos de las líneas celulares HeLa y CaSki proveniente de cáncer cérvico-uterino.
- Determinar la concentración de lactona Esferocefalina que disminuye en un 50 % el número celular (IC_{50}) de las líneas celulares HeLa y CaSki, a través del conteo celular por la técnica de cristal violeta.
- Evaluar si el compuesto Esferocefalina ejerce su acción en alguna fase del ciclo celular en las células Hela y CaSki por citometría de flujo.
- Determinar si el compuesto Esferocefalina induce apoptosis en las líneas celulares HeLa y CaSki, a través de:
 - Determinar si Esferocefalina induce un aumento en la expresión de procaspasa 3 por inmunocitofluorescencia.
 - Determinar si Esferocefalina induce la fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL.
- Determinar si Esferocefalina afecta el potencial proliferativo de fibroblastos humanos no tumorales provenientes del cérvix.

MÉTODO

Obtención y preparación del Stock de lactona Esferocefalina

A partir de 31.2 mg de la lactona Esferocefalina proporcionados por el M. en C. Arturo Cano se pesaron 2.3 mg y se colocaron en un tubo cónico de plástico de 0.6 ml (EPPENDORFS, MEX) para solubilizarlos en 100 μ l de acetona, esta solución se almacenó a -20 °C para su posterior uso en la determinación de la IC₅₀.

Cultivo de la línea celular

Se tomaron células provenientes de las líneas celulares HeLa y CaSki, de cáncer cérvico-uterino del crioprecervador de la unidad de investigación, todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares provenientes de CaCu fueron sembradas en cajas 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 NCS (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 fueron tomadas de cultivos a una densidad del 70 % (Morgan y Darling, 1993).

Obtención y procesamiento de células fibroblásticas de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido de cérvix uterino de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes al CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, USA) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió en escindir el tejido en trozos pequeños (<5 mm) y someterlos a una disgregación enzimática con tripsina (SIGMA, USA) a 0.1 %. La cual se llevó a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pirex, USA) de 50 ml con 10 ml de tripsina a 37 ° C en un baño maría durante 15 minutos en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vertió a través de una malla de nylon que permitió sólo el paso del material disgregado.

El filtrado se centrifugó (DINAC, USA) por 5 minutos a 1,500 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón celular fue cultivado en cajas Petri de plástico (Corning, USA) de 5 ml donde se mantuvo en incubadora (Nuair, USA) al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado totalmente con el propósito de remover las células no adheridas y se añadió medio fresco suplementado con SFB al 10 % y mantenidas en condiciones de incubadora durante 48 a 72 horas. Los cultivos fueron supervisados durante una a dos semanas, cambiando el 50 % del medio de cultivo cada 3 días hasta obtener una densidad del 80 % de células fibroblásticas. Los cultivos con un 80 % de densidad celular fueron sembrados en cajas petri de 100 mm de diámetro y fueron consideradas como la R1. Las células fibroblásticas utilizadas para los ensayos experimentales fueron obtenidas de cultivos en segunda resiembra (R2) en fase de crecimiento exponencial.

Determinación de las IC₅₀

Para establecer la IC₅₀ (índice de concentración en la cual se disminuye en un 50 % el número celular) se tomaron la cantidad de volumen del stock necesaria para las concentraciones de 10, 8, 6, 4, y 2 µg/ml.

Cada tipo celular fue sembrado (7,500 por pozo) en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), con un volumen por pozo de 100 µl de RPMI al 5 % de SFB, durante 24 horas. Se dejaron transcurrir 24 horas y se trataron con las diferentes concentraciones del compuesto Esferocefalina de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo y se agregó cada uno de los siguientes tratamientos; al primero se le denominó control, el cual sólo contenía medio de RPMI al 5 % de SFB, el segundo fue llamado vehículo, y contenía la concentración máxima de acetona (< 1 %) que se utilizó en el ensayo; los demás tratamientos incluyen las diferentes concentraciones 10, 8, 6, 4, y 2 µg/ml, este procedimiento se llevó a cabo en una serie de seis repeticiones, se aplicaron los mismos volúmenes por pozo, 100 µl, y así se mantuvieron las condiciones por 24 horas más.

Evaluación de proliferación por la técnica de la incorporación de cristal violeta.

El colorante cristal violeta posee características alcalinas que le permiten incorporarse a los núcleos celulares. El número de núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida (Kueng, 1989).

Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (50 μ l/pozo) durante 10 minutos, para posteriormente ser lavadas con agua bidestilada y secadas al aire. A las placas se les agregó una solución de cristal violeta al 0.1 % (50 μ l/pozo), manteniéndose en agitación durante 10 minutos. Una vez concluido este tiempo las placas de cultivo se lavaron exhaustivamente con agua desionizada (de manera que el colorante no incorporado sea retirado), para posteriormente secarse al aire a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10 % (50 μ l/pozo), para solubilizar el colorante incorporado en los núcleos celulares, dejando en agitación durante 20 minutos. Posteriormente a esto, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (E1 800; Bio-Tek) a 570 nm y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje (%) de proliferación celular con respecto al control.

Determinación de la IC₅₀ matemática.

Para la determinación de la IC₅₀ matemática los datos obtenidos de concentración en μ g/ml fueron correlacionados con los respectivos valores de % celular. Los datos son linealizados y se realizó una intrapolación para calcular la disminución del 50% de la población celular (IC₅₀). Todo esto se realiza con la ayuda de un software específico (Excel 2003).

Evaluación del ciclo celular

Las células de cada línea celular (HeLa y CaSki) fueron sembradas con una densidad de 250 000 células en cajas Petri de plástico con capacidad de 2.5 ml en RPMI al 10 % de NCS (Suero de neonato). Se dejaron pasar 24 h para permitir su adherencia a la base de las cajas, después de lo cual se estimularon con la IC₅₀ de la lactona Esferocefalina previamente determinada para cada línea celular, la concentración fue preparada en medio fresco, RPMI al 10 % NCS y estas condiciones se mantuvieron en el cultivo por 24h. El grupo control contempló la cantidad de vehículo empleado en el IC₅₀ en RPMI al 10 % de NCS, un segundo control sin estímulo contempló RPMI al 10 % de NCS. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con verseno, centrifugadas y lavadas con un buffer salino de fosfatos, pH =7.2 (PBS). El botón celular fue fijado y resuspendido en 1 ml de metanol al 50 % en PBS, pasados 20 minutos se centrifugaron y se lavaron con PBS. El botón fue resuspendido en 200 µl de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 750 µl de una solución de yoduro de propidio (200 mg/l), se homogenizó y se incubaron en hielo por 15 minutos protegiendo los núcleos de la luz. Finalmente se analizaron las muestras en un FACS (Coulter, USA).

Evaluación del ciclo celular por el método de citometría de flujo.

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células pasen dentro de un capilar en el punto de incidencia de un rayo láser (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems; 1995). Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. Si la célula va marcada con un fluoróforo, como el yoduro de propidio, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro. Se analizaron 10,000 células y en los histogramas obtenidos se determinaron las regiones correspondientes a G1, S G2/M (Fluorescence Activated Cell Sorting). (Rieseberg *et al*, 2001; Salgado, 2002).

Evaluación de muerte celular por pro-caspasa 3

Una vez evaluado el ciclo celular se identificó si las células estimuladas con la lactona Esferocefalina presentan una muerte programada (apoptosis), por lo que se realizó su evaluación por la determinación de procaspasa 3, para ello se tomaron 50,000 células por cada línea celular (HeLa y CaSki) que fueron sembradas en cubreobjetos de 1 x 1 cm, en un volumen de 300 µl de RPMI al 5 % de NCS en cámara húmeda por 24 h. Al término de las 24 h se procedió a estimular a las células con la IC₅₀ obtenidas para cada línea celular, esto en medio de cultivo RPMI al 5 % de NCS por 24 h, posteriormente se realizó la detección de la procaspasa 3 por inmunocitoquímica. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 15 minutos, al término de el tiempo las muestras se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, posteriormente se permearon con tritón X-100 al 0.5 % durante 5 minutos a 4 °C, nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, después se adicionó el anticuerpo primario (antiprocaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:100 en PBS) durante un periodo de 2½ h en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ h, posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después aplicar el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de manera muy cuidadosa durante 30 segundos e inmediatamente se lavaron 3 veces con PBS para finalmente montar las muestra con medio de montaje antifolding y selladas con resina de nitrato de celulosa. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a realizar el análisis en un microscopio de epifluorescencia.

Evaluación de la muerte celular mediante la detección de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL en cultivos celulares.

Gavrieli *et al* 1992, desarrollaron la técnica del marcaje *in situ* denominada TUNEL (Transfer Uridin Nick-End Labelling), la cual consiste en la incorporación de nucleótidos en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de endonucleasas. Los nucleótidos marcados, son incorporados por la enzima TDT al extremo 3'OH del ADN fragmentado. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una fluorescencia roja (Colin-Valenzuela *et al*, 2010).

Para llevar a cabo la técnica 50,000 células fueron sembradas en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la caspasa-3. Al término del cultivo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % en PBS el cual debe ser preparado al momento. Se lavó 3 veces con PBS y se permeó con tritón X-100 al 0.5 % en PBS, durante 5 minutos a 4 °C. Se lavó con PBS 3 veces. Se adicionó inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30 µl) en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar.

Se incubó inmediatamente por 1 hora con enzima Tdt (33 µl de enzima más 77 µl de buffer de reacción) en cámara húmeda. Se detuvo la reacción con buffer de paro (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua desionizada), 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Se lavaron con PBS, se incubaron con anti-digoxigenina-rodamina (Chemicon international, USA) (68 µL de solución de bloqueo más 62 µL de anti-digoxigenina) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron los respectivos lavados con PBS en cámara húmeda. Se incubó con DAPI por 1 minuto. A continuación se lavaron las muestras con PBS. Las preparaciones fueron montadas con medio de montaje antifolding, se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

Evaluación de la expresión de pro-caspasa 3 en cultivos celulares tratados con Esferocefalina, a través de la cuantificación de luminosidad.

Una vez evaluada la pro-caspasa 3, se identificó si existe diferencia en la expresión de pro-caspasa 3 en los cultivos celulares estimulados con esferocefalina, para ello se tomaron fotografías representativas de cada condición de estímulo, evaluada con pro-caspasa 3 de por lo menos 5 ensayos independientes, y fueron sometidas a un tratamiento de análisis con el software Adobe Photoshop CS3, especializado en el procesamiento de fotografías, tomando como muestra 100 células por cada condición evaluada, para medir el diferencial presente en la luminosidad de la expresión de pro-caspasa 3 de los cultivos de las líneas celulares.

Evaluación del efecto de la lactona esferocefalina en cultivos celulares no tumorales

Cultivo de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano no tumoral fueron sembradas con una densidad de 250 000 células en cajas Petri de plástico con capacidad de 2.5 ml en RPMI al 10 % de NCS (Suero de neonato). Se dejaron pasar 24 h para permitir su adherencia a la base de las cajas, después de lo cual se estimularon con la IC_{50} más alta obtenida de lactona Esferocefalina, la cual fue preparada en medio fresco, RPMI al 10 % NCS y estas condiciones se mantuvieron en el cultivo por 24h. El grupo control contempló la cantidad de vehículo empleado en el IC_{50} en RPMI al 10 % de NCS, un segundo control sin estímulo contempló RPMI al 10 % de NCS. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con verseno, centrifugadas y lavadas con un buffer salino de fosfatos, pH =7.2 (PBS). El botón celular fue fijado y resuspendido en 1 ml de metanol al 50 % en PBS, pasados 20 minutos se centrifugaron y se lavaron con PBS. El botón fue resuspendido en 200 μ l de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 750 μ l de una solución de yoduro de propidio (200 mg/l), se homogenizó y se incubaron en hielo por 15 minutos protegiendo los núcleos de la luz. Finalmente se analizaron las muestras en un FACS (Coulter, USA).

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 Office Excel, de Microsoft Inc. (2007). Y el programa SPSS 14.0 para Windows 7 ed. 2010.

RESULTADOS

La búsqueda de fármacos y especialmente de compuestos de origen biológico con propiedades antitumorales, ha provocado un fuerte interés en la medicina. Con el propósito de saber si la lactona Esferocefalina afecta negativamente el potencial proliferativo de células tumorales, líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa y CaSki), fueron estimuladas con 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactona, y su densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta (fig. 8)

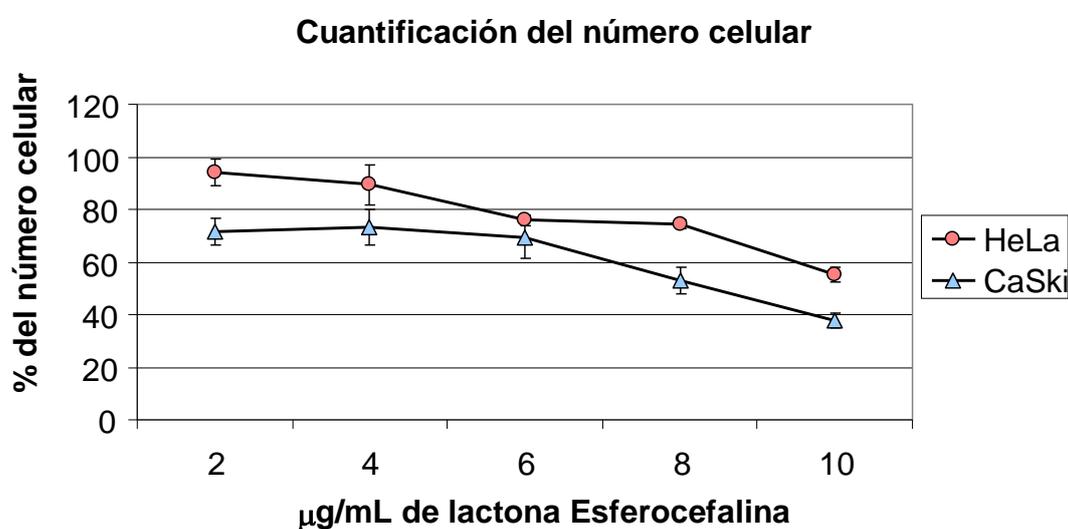


fig. 8 Efecto de la lactona Esferocefalina en el potencial proliferativo de células tumorales HeLa y CaSki. Cultivos de células HeLa y CaSki fueron estimuladas con 2, 4, 6, 8, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Esferocefalina durante 24 h y el número celular fue determinado a través de la técnica de tinción con cristal violeta. Los gráficos representan el promedio de un mínimo de seis ensayos independientes.

Los resultados muestran que el efecto de la lactona Esferocefalina sobre el potencial proliferativo de las células HeLa y CaSki es dependiente de la concentración, de tal manera que el número celular decae conforme se incrementa la concentración de lactona. La concentración de Esferocefalina que induce un decremento del 50 % en el número celular fue calculado, obteniendo una IC_{50} para la línea tumoral HeLa de 11.9 $\mu\text{g/ml}$ y de 8.3 $\mu\text{g/ml}$ para la línea celular CaSki.

De manera paralela, cultivos de células HeLa y CaSki tratadas con la Esferocefalina, fueron fotografiados con la intención de observar si la lactona afecta la morfología de estas células (fig. 9).

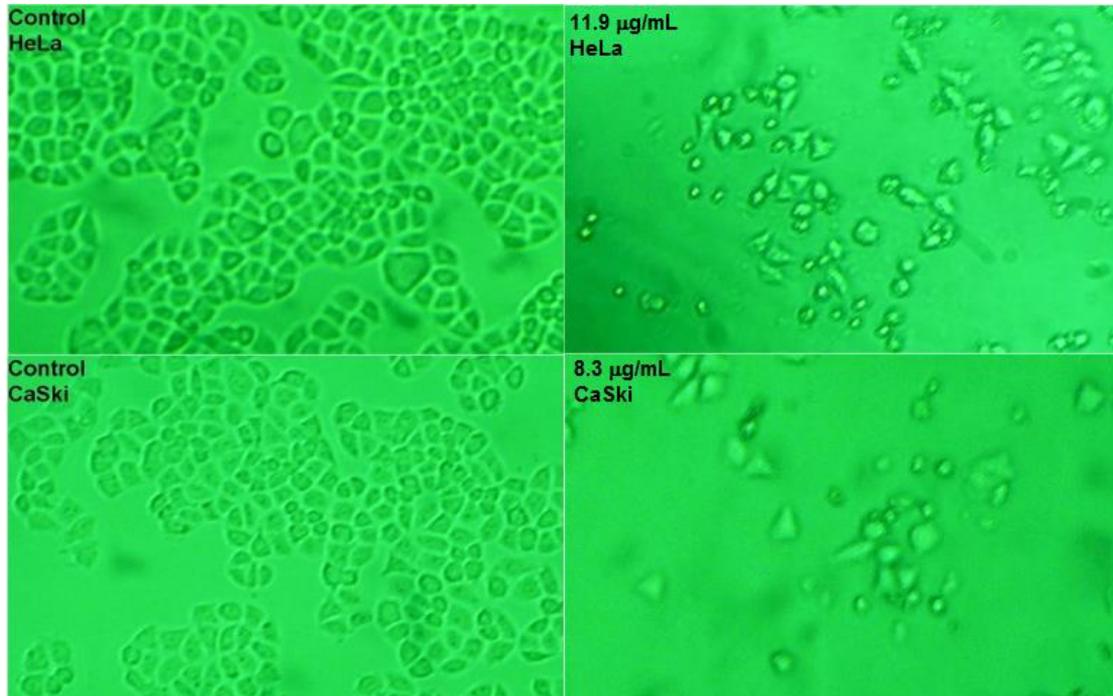


fig. 9 Efecto de la lactona Esferocefalina en la morfología de las células HeLa y CaSki. Fotografías de cultivos de células HeLa (Arriba) y CaSki (Abajo) en microscopio óptico a 10X creciendo en RPMI al 10% de CNS (Control), estimuladas durante 24 hrs. con 11.9 µg/ml de Esferocefalina para la línea celular HeLa y 8 µg/ml. de Esferocefalina para la línea celular CaSki.

Como se puede observar en la fig. 9, la lactona Esferocefalina afecta la morfología de las células HeLa y CaSki, induciendo a éstas a presentar una forma esférica, de menor tamaño, indicando un posible efecto de pérdida de adherencia celular.

Con el fin de saber si la lactona Esferocefalina afecta alguna fase del ciclo celular, cultivos de células HeLa y CaSki fueron estimuladas con su respectiva IC_{50} y la cantidad de ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada por tinción con ioduro de propidio y por citometría de flujo (fig. 10).

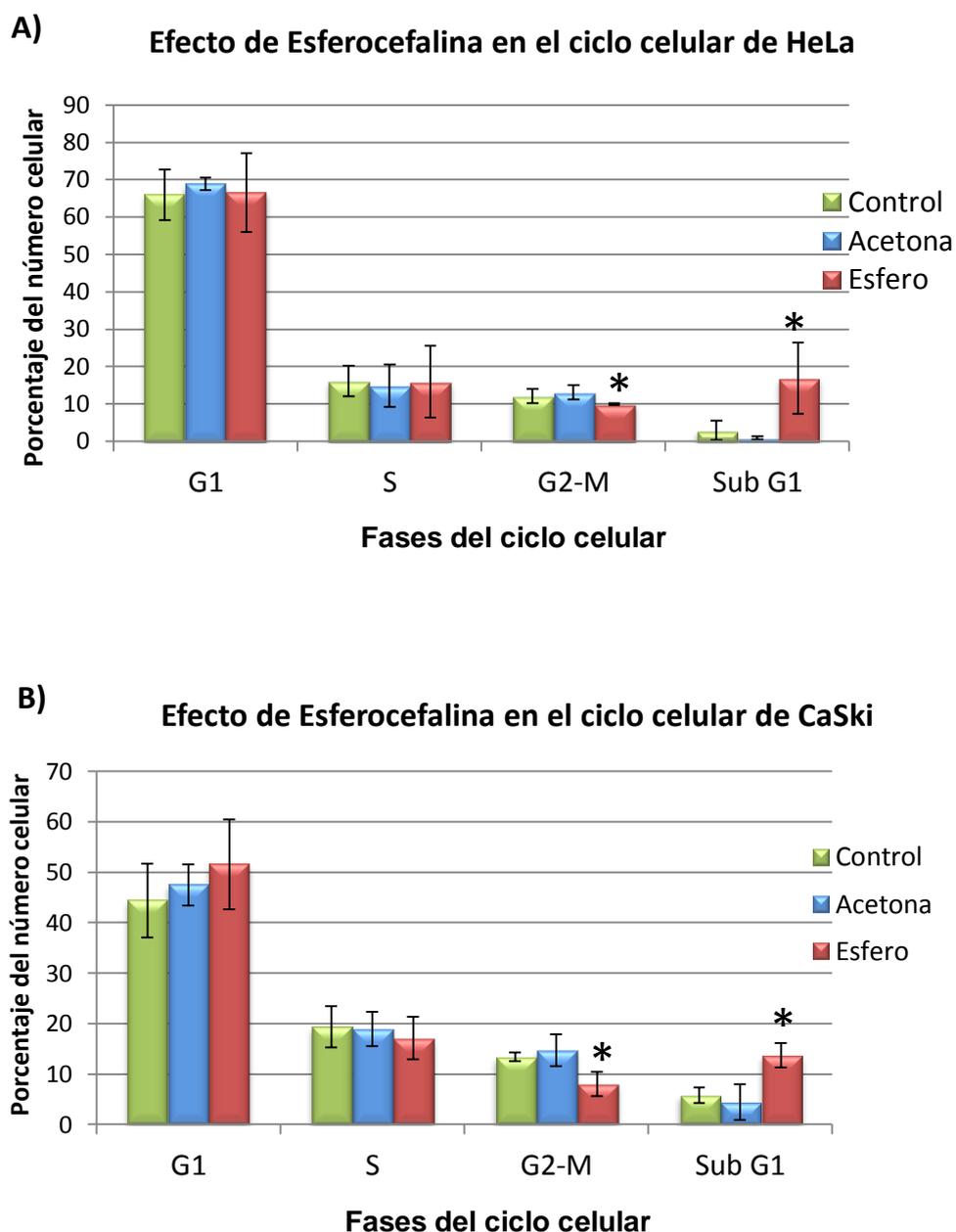


fig. 10 Efecto de la lactona Esferocefalina en el ciclo celular de las líneas tumorales de CaCu HeLa y CaSki. Cultivos de células HeLa y CaSki fueron tratadas a la concentración de su IC_{50} y el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular fue determinado mediante citometría de flujo. A) Células HeLa; B) células CaSki. Los gráficos representan el promedio de un mínimo de cuatro ensayos independientes con al menos tres repeticiones por ensayo. Las barras marcadas con asterisco indican una diferencia significativa (* $p < 0.05$) Vs. Acetona, (ANDEVA seguido de la prueba de Tukey).

Como se observa en la fig. 10 la lactona Esferocefalina induce un decremento en el porcentaje de células que se encuentran en G2/M, indicando que su efecto es dependiente de ciclo, induciendo a estas células a salir de la fase G2/M. Generalmente, las células que se encuentran detenidas en alguna fase del ciclo celular, tienen el propósito de reparar el daño sufrido en su ADN o de inducir a las células a una muerte por apoptosis. Para determinar si la lactona induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis y conociendo que una de las proteínas que participan en la muerte celular por apoptosis es la procaspasa 3, cultivos de células HeLa y CaSki fueron tratadas a la concentración de sus IC₅₀ y la detección y cuantificación de la procaspasa 3 fue determinada por inmunocitoquímica (figs.11 y 12).

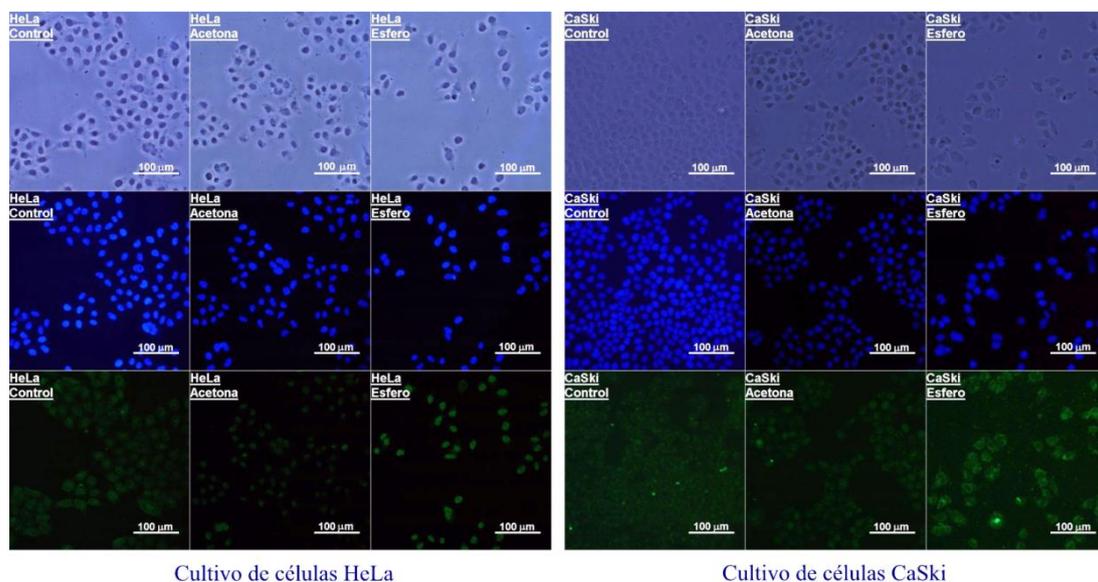


fig. 11 Efecto de la lactona Esferocefalina en la expresión de la procaspasa 3 en cultivos de células HeLa y CaSki. Las imágenes en contraste de fases (fila superior), muestran a las células en cultivo, las imágenes teñidas con DAPI (fila central), muestran los núcleos de las células en cultivo, las fotografías en la fila inferior, muestran la procaspasa 3 en las células HeLa y CaSki en cultivo. Las primeras dos columnas de cada línea celular muestran los controles mientras que la última columna para cada línea celular muestran los cultivos estimulados con lactona Esferocefalina.

Expresión de Pro caspasa 3 en cultivos de células HeLa y CaSki

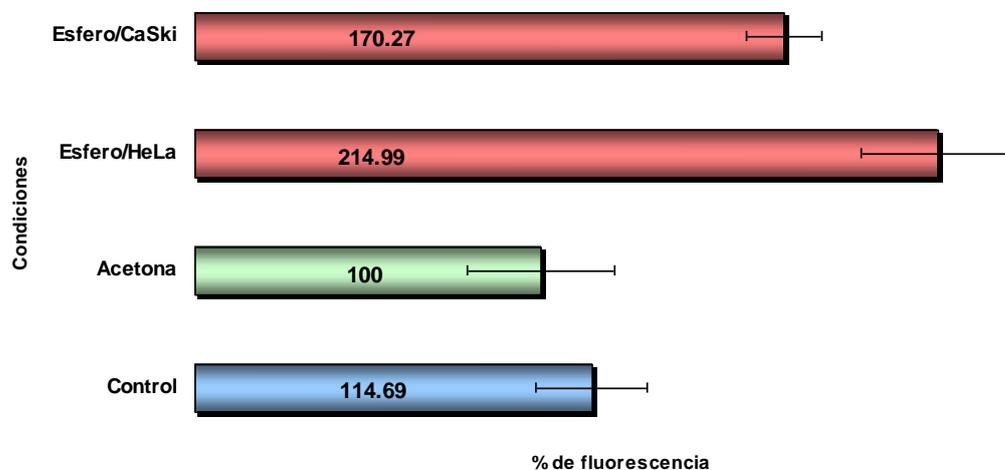


fig. 12 Expresión de procaspasa 3 en cultivos de células HeLa y CaSki tratadas con la lactona Esferocefalina. El gráfico representa el promedio de un mínimo de seis ensayos independientes.

Las Figs. 11 y 12 establecen que la Esferocefalina induce una sobreexpresión de la pro-caspasa 3 en las células HeLa y CaSki indicando que el proceso de apoptosis está activado. Con la finalidad de establecer si esta activación del proceso apoptótico llega a la degradación de ADN como un paso final de este evento biológico, cultivos de células HeLa y CaSki fueron tratados con la Esferocefalina a una concentración de 11.9 y 8.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y la fragmentación de ADN fue determinada mediante la técnica de TUNEL por inmunocitoquímica (fig. 13).

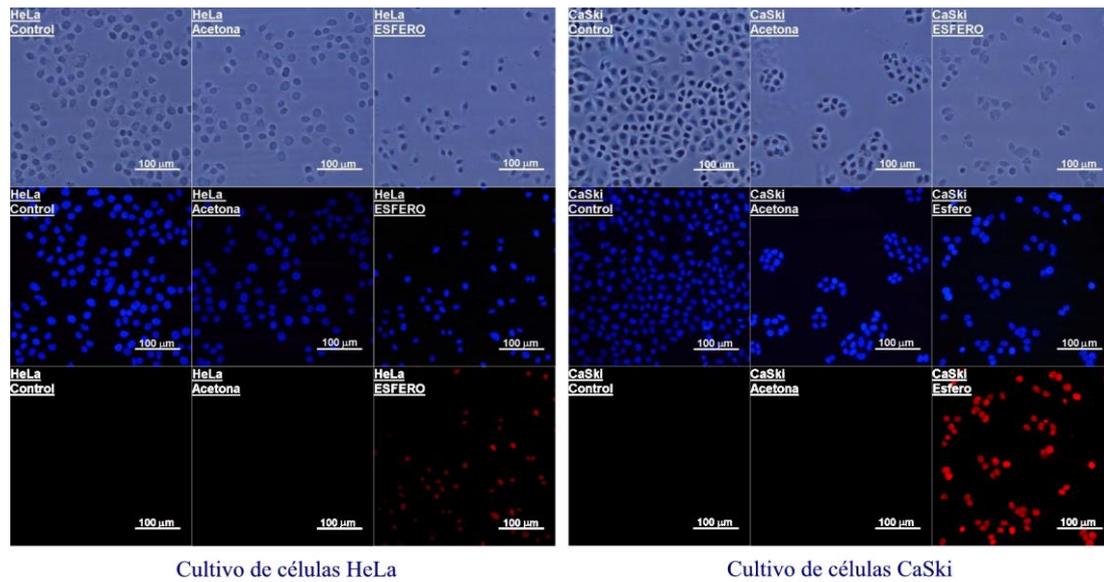


fig. 13 Determinación de la fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL en cultivos de células HeLa (Tres columnas de la izquierda) y CaSki (Tres columnas de la derecha). Las imágenes en contraste de fases (fila superior), muestran a las células en cultivo, las imágenes teñidas con DAPI (fila central), muestran los núcleos de las células en cultivo, las fotografías en la fila inferior, muestran la fragmentación de ADN en las células HeLa y CaSki en cultivo. Las primeras dos columnas de cada línea celular muestran los controles mientras que la última columna para cada línea celular muestran los cultivos estimulados con la Esferocefalina (HeLa 11.9 µg/ml y CaSki 8.3 µg/ml).

Los resultados obtenidos indican que la lactona Esferocefalina induce la fragmentación del DNA en cultivos de células HeLa y CasKi, sugiriendo que el proceso apoptótico se lleva a cabo hasta su etapa final.

Estos resultados sugieren que la lactona Esferocefalina ejerce una actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares HeLa y CaSki, que las induce a salir de ciclo y mandarlas a una muerte por apoptosis. Sin embargo, este hecho no descarta que la lactona afecte a células no tumorales, por lo que cultivos de fibroblastos de cérvix no tumorales fueron estimulados con 11.9 µg/ml de la lactona Esferocefalina, con el propósito de determinar si la lactona afecta el potencial proliferativo de células no tumorales (fig.14).

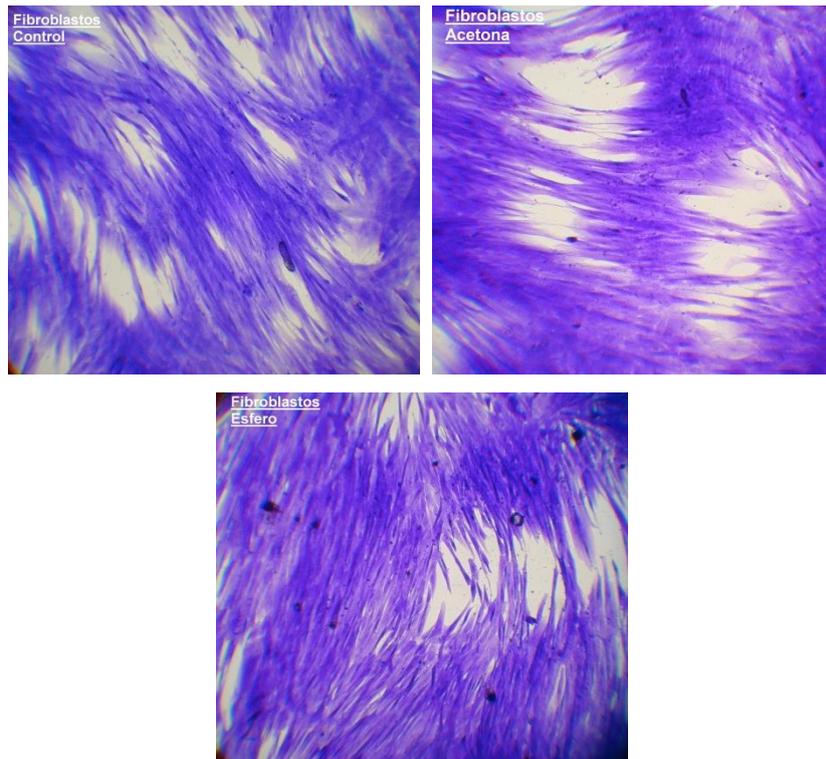


fig. 14 Efecto de la lactona Esferocefalina en cultivo de fibroblastos no tumorales provenientes del cérvix humano, teñidos con cristal violeta.

Efecto de la lactona Esferocefalina sobre cultivos de fibroblastos no tumorales

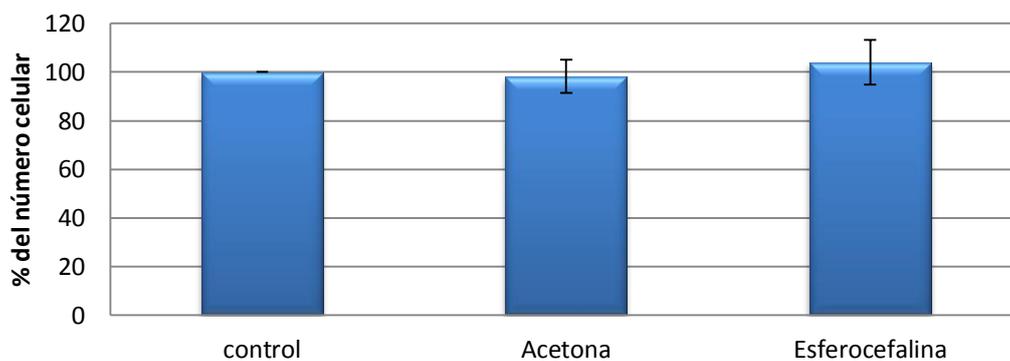


fig. 15. Porcentaje celular de cultivos de fibroblastos no tumorales estimulados con la lactona Esferocefalina. El gráfico representa el promedio de un mínimo de seis ensayos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que la Esferocefalina no afecta el potencial proliferativo de los fibroblastos no tumorales, sugiriendo que la actividad antiproliferativa de esta lactona es de acción selectiva (fig. 15).

DISCUSIÓN

México posee una larga tradición herbolaria. Las plantas medicinales usadas en el país ascienden a más de tres mil, y la efectividad de muchas de ellas aún no han sido probadas (Linares, 1999). Es por esto que en los últimos años, debido a la necesidad de encontrar alternativas naturales para la prevención y cura de algunas enfermedades, se ha observado que varios compuestos de ciertas plantas como es el caso de algunas lactonas, poseen un gran potencial quimiopreventivo de varios padecimientos neoplásicos.

De manera particular, las lactonas sesquiterpénicas se encuentran clasificadas en un grupo importante de productos de origen natural, que son extraídas de muchas especies de plantas medicinales, principalmente provenientes de la familia Asteracea (Compositae).

Investigaciones recientes sobre estudios de cáncer *in vitro* y modelos animales *in vivo*, han mostrado la capacidad que presentan diversos tipos de lactonas para ejecutar una respuesta anticancerígena, a través de la inhibición de respuestas inflamatorias, prevención de la metástasis e inducción de la apoptosis.

Los resultados obtenidos para la lactona Esferocefalina establecen que posee un efecto antiproliferativo, dependiente de la concentración sobre líneas de cáncer cérvico-uterino HeLa y CaSki. Las IC_{50} obtenidas para este compuesto en las líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino HeLa y CaSki, tienen una gran similitud con las concentraciones obtenidas para otro tipos de lactonas, como es el caso de los reportes para la lactona Dehidrocostus (DHE) con una IC_{50} de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$, determinadas en las líneas de cáncer de pulmón A549, NCI-H460 y NCI-H520 respectivamente (Hung *et al*, 2009), mientras que la lactona partenólida se probó en las líneas Hs605T, MCF-7, de cáncer de pulmón y la línea SiHa de cáncer cérvico-uterino, reportando IC_{50} de 2.6 $\mu\text{g/ml}$, 2.8 $\mu\text{g/ml}$, y 2.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. (Wu C. *et al*, 2006). Al igual que en la lactona Dehidrocostus, donde las líneas celulares provenientes de cáncer de pulmón de ratón, muestran una sensibilidad diferente, las células CaSki son

más sensibles que las células HeLa. Con el fin de explicar este fenómeno, es sensato tomar en cuenta que las líneas celulares provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino se encuentran infectadas con el virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 en la línea CaSki y tipo 18 en la línea HeLa (Phelps *et al*, 1988, Castellanos, 2003), lo cual abre la posibilidad de que esta sensibilidad esté vinculada al tipo de VPH que presenta cada línea. Sin embargo y con la intención de corroborar esta relación, es conveniente que en el futuro se realice un trabajo similar con la misma lactona en más líneas celulares infectadas con diferentes tipos de VPH y tomar en cuenta también a aquellas líneas que no se encuentren infectadas. Por otro lado, la acción de la Esferocefalina en la fase G2/M, y la posterior muerte celular por apoptosis, concuerda con los resultados reportados en otros trabajos de LsS, como es el caso de la Lactona tormentosín y la lactona Inuviscolide, las cuales detienen a las células SK-28 de Melanoma en la fase G2/M e inducción de apoptosis celular (Rozenblat *et al*, 2008). La lactona Dehidrocostus tiene el mismo efecto en células SK-OV3 de cáncer ovárico (Choi E, *et. al*, 2009). También, se encontró que la lactona Schuriolida produjo una disminución en el número de células que se encuentran en la fase G1, con aumento en el número células que se encuentran en la región Sub-G1, en la línea celular de cáncer cérvico-uterino CaSki (Cancino, 2007). De igual manera se reporta que la lactona Arglanina, induce una detención de las células de CaCu CaSki, CaLo y ViBo en la fase G2/M (Ortega, 2009). Mientras que la lactona CAFA induce muerte apoptótica en las líneas HeLa, CaSki y ViBo sin afectar el ciclo celular (Ornelas, 2009). Reportes que sugieren que la lactona Esferocefalina al igual que otras lactonas sesquiterpénicas posee efecto similar sobre líneas tumorales, confiriéndoles una acción conservativa y distintiva a este grupo de lactonas.

Se debe destacar que la evaluación de la mayoría de las lactonas que presentan actividad antitumoral, efecto citotóxico, antiproliferativos o inducción de apoptosis, sólo se ha realizado en líneas tumorales, careciendo de controles con células no tumorales o normales, otro tipo de control es el uso de células provenientes de ratón, sin embargo estas células pueden responder de manera diferente a como lo harían células provenientes de humano (Syuan *et al*, 2005).

Es por ello que se recomienda el uso de células humanas, de preferencia del mismo origen o estirpe para tener una mejor comparación de los efectos que se observen.

Para el caso de la lactona Esferocefalina, el efecto antiproliferativo fue evaluado en células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano, debido a que estas células pertenecen al microambiente tanto de cérvix normal como del tumoral, además de presentar un fuerte potencial proliferativo y aunque lo adecuado sería utilizar células epiteliales del cérvix, las células fibroblásticas poseen un mayor potencial de permanencia en cultivo *in vitro* sobre las células epiteliales, favoreciendo la realización de los ensayos a plazos de 24 horas o más; al respecto, el resultado observado después de estimular a las células fibroblásticas no tumorales con las concentraciones de IC₅₀ de lactona Esferocefalina obtenidas para HeLa y CaSki, muestra que tras 24 h de exposición a la lactona, no se altera significativamente el potencial proliferativo de las células fibroblásticas.

Este resultado le confiere a la lactona Esferocefalina un carácter de selectividad, que puede ser considerado para una posible aplicación terapéutica. Sin embargo, a pesar de que las condiciones de cultivo de los fibroblastos se realizan en cultivos asincrónicos, donde existen células en todas las fases del ciclo celular; éstos presentan un tiempo de duplicación mayor (56 h), generando la necesidad de probar el efecto antiproliferativo de la lactona Esferocefalina en un tiempo mayor a 24 y menor a 72 hrs, con el propósito de confirmar con mayor certeza la acción selectiva y antitumoral de la lactona Esferocefalina.

Finalmente, desde hace unos años el cáncer cérvico-uterino pasó de ser la primera causa a ser la segunda causa de muerte en mujeres en México, rebasado por el cáncer de mama (INEGI 2013), situación que se debe al incremento en la incidencia del cáncer de mama, atribuido a la falta de cultura de prevención de enfermedades por parte de la población mexicana en general, y a los prejuicios preexistentes en la sociedad frente a las

auscultaciones de rutina por parte de los médicos. Es por este motivo que instituciones como la Universidad Nacional Autónoma de México entre otras instituciones, han intentado combatir esta problemática realizando trabajos de investigación, enfocados a la prevención y/o tratamiento del cáncer cérvico-uterino, mediante la creación de nuevos fármacos o vacunas que pueden contribuir a disminuir de una manera más eficiente y contundente la incidencia de este tipo de patología que afectan a las mujeres de nuestro país.

CONCLUSIÓN

- La lactona Esferocefalina induce en las células HeLa un decremento en el número celular de un 50% a una concentración de 11.9 $\mu\text{g/ml}$.
- La lactona Esferocefalina induce en las células CaSki un decremento en el número celular de un 50% a una concentración de 8.3 $\mu\text{g/ml}$.
- La lactona Esferocefalina induce a las células HeLa y CaSki a salir de la fase G2/M del ciclo celular.
- La lactona Esferocefalina induce a las células HeLa y CaSki a una muerte apoptótica con la participación de la procaspasa 3 y fragmentación de ADN.
- La lactona Esferocefalina no presenta actividad en cultivos de células no tumorales. Lo que le confiere a la lactona un gran potencial terapéutico.

REFERENCIAS

- Adrain C., Creagh E. M., y Martin S. J. 2002. “Caspase Cascades in Apoptosis. Caspases-their role in cell death and cell survival”. Ed. Marek Los and Henning Walczak. Molecular Biology Intelligence Unit 24. New York. 51 pp.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Raberts K. y Watson J.D. 2004. “Molecular biology of the cell”. Garland Publishing Inc. New York. 1294 pp.
- Alfaro M. E., García C. C. y Dueñas G. A. 2000. “Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones”. Revista del Instituto Nacional de Cancerología. Vol. 46. Núm. 4. 280 pp.
- Alliance for Cervical Cancer Prevention (ACCP). “Pap smears: An important but imperfect method. Cervical Cancer Prevention Fact Sheet”. October 2002. Consulta electronica 2011. <http://www.alliance-cxca.org>
- Alliance for Cervical Cancer Prevention (ACCP). “Prevención del cáncer cérvico-uterino. 2003”. Consulta electrónica 2011. <http://www.alliance-cxca.org>
- Alonso P., Lazcano E. y Hernández M. 2000. “Cáncer cérvico-uterino: Diagnóstico, prevención y control”. Editorial Médica Panamericana. México. 254 pp.
- American Cancer Society (ACS) 2010. “Learn About Cancer” Consulta electrónica 2011 www.cancer.org
- Anthony C. P., Thibodeau G. A. 1991. “Anatomía y fisiología”. 10a Edición. Nueva editorial Interamericana. México. 724 pp.
- Ashkenazi A. 2002 “Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily”. Nat Rev Cancer. Vol. 2. 430 pp.

- Ashkenazi A. 2008. "Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists". *Nat Rev Drug Discov*. Vol. 7. 1012 pp.
- Bhat B.A., Dhar K.L., Puri S.C., Qurishi M.A., Khajuria A., Gupta A. y Qazi G.N. 2005 "Isolation, characterization and biological evaluation of datura lactones as potential inmunomodulators". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 13. 6677 pp.
- Beekman H. y Schmidt T. 1997. "Structure-Cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpen lactones". *J .Nat.Pord*. Vol. 60 257 pp.
- Belletti B., Nicoloso M. S., Schiappacassi M., Chimienti E., Berton S., Lovat F., Colombatti A. y Baldassarre G. 2005. "p27kip1 Functional Regulation in Human Cancer: A Potential Target for Therapeutic Designs". Bentham Science Publishers Ltd. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 12. 1605 pp.
- Berek Jonathan S. y Hacker Neville F. 2005. "Ginecología oncológica práctica". Mc Graw Hill. 4a ed. México. 908 pp.
- Caballero A. y Morán J. 2002. "Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica". *Revista de Educación Bioquímica*. Vol. 21 No. 4. México. 243 pp.
- Caer F. R. 1994. "Apoptosis: It's Significance in Cancer and Cancer Therapy". *Journal of Animal Science*. Vol. 73. 2026 pp.
- Cancino D. 2007 "Efecto antiproliferativo y apoptótico de la Lactona schkuhriolida en células provenientes de cáncer cérvico-uterino Caski". Tesis de licenciatura FES-Zaragoza UNAM. México. 44 pp.
- Carnero A. 2002. "Targeting the cell cycle for cancer therapy". *British Journal of Cancer*. 87. 133 pp.

- Chabner B. A. y Collins J. M. 1990, "Cancer Chemotherapy. Principles & Practice". ed. J.B. Lippincott Company Philadelphia. New York. 545 pp.
- Changqing W., Chen F., Rushing J. W., Wang X., Hyun-Jin K., Huang G., Haley-Zitlin V. y Guoqing H. 2006. "Antiproliferative Activities of Parthenolide and Golden Feverfew Extract Against Three Human Cancer Cell Lines". Journal of Medicinal Food. Vol. 9. 61 pp.
- Cooper G.M., Hausman R. E. 2009 "The cell: a molecular approach" Washington, D.C. : ASM Press ; Sunderland, Mass. : Sinauer Associates. 820 pp.
- Eun J. C. y Woong S. A., 2009. "Antiproliferative effects of dehydrocostuslactone through cell cycle arrest and apoptosis in human ovarian cancer SK-OV-3 cells". International Journal Of Molecular Medicine. Vol. 23 216 pp.
- Evan G.I. y Vousden K.H. 2001. "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer". Nature. Vol. 411 342 pp.
- Fadeel B. y Orrenius S. 2005. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease". J Intern Med. Vol. 258 517 pp.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992 "Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation". J Cell Biol; 119:493-501 pp.
- Glassman A., Levine R. E. y Schneidman M. 2001. "La salud de la mujer en América Latina y el Caribe". Ed. Inter American Development Bank. Latino America. 80 pp.
- Hall M. N., Raff M. y Thomas G., 2004. "Cell Growth. Control of cell size". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ney York. 100 pp.

- Hazzard R. W. 2005. “Principles of geriatric medicine and gerontology”. 4ta ed. Mc.Graw Hill. 187 pp.
- Herrero R., Castellsague X. y Pawlita M. 2003. “Human papillomavirus and oral cancer: The international agency for research on cancer multicenter study”. J Natl Cancer Inst. Vol. 95. 1783 pp.
- Heywood V.H., Harborne J.B. y Turner B. L. 1997. “The biology and chemistry of the compositae”. Academic Press. New York. Vol. I y II. 621 pp.
- Hughes D. y Mehmet H., 2002. “Cell Proliferation and Apoptosis”. Oxford University New York. 344 pp.
- Hung J. Y., Hsu Y. L., Ni W. C., Tsai Y. M., Yang C. J., Kuo P. L. y Huang M. S. 2010 “Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells”. Lung Cancer. Vol.68. 365 pp.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. “Día Mundial contra el cáncer (4 de febrero)”. Consulta interactiva datos nacionales www.inegi.org.mx
- Kueng W., Silver E., Eppnberg V. 1989. „Cuantificación de cell cultured on 96-wells plates”. Ed. Analytical biochemical. Vol.186 19 pp.
- Linares M., Bye R. A. y Flores B. 1999. “Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales”. ed. Instituto de Biología UNAM pp. 155
- Lodish H., Berk A., Zipursky S., L., Matsudaira P., Baltimore D. y Darnell J. E. 2002. “Molecular Cell Biology”. 5ta. Ed. WH Freeman and Company. New York. 973 pp.

- Lui X., Zou H., Slaughter C. y Wang X. 1997. “A Heterodimeric protein that functions downstream of Caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis”. Cell Vol. 89. 184 pp.
- Morgan S. J. y Darling D.C. 1993. “Cultivo de las células animales”. Ed. Acriba. España. 159 pp.
- Muños N. y Bosch X. 1997. “Cervical cancer and human papillomavirus Epidemiological evidence and perspectives for prevention”. Ed. Salud Pública México, Vol. 39. 282 pp.
- Murray A. y Hunt T. 1993. “The Cell Cycle an introduction”. Oxford University. New York. 11 pp.
- NUMEN. De la ciencia y la cultura Medicina. 2010. “Cáncer de cuello uterino” Dr. Damico A. Consulta electrónica. <http://revistanumen.blogspot.com/2010/05/medicina-en-numen-cancer-de-cuello.html>
- Ornelas C. 2009. “Determinación del efecto antiproliferativo de la lactona 7[alfa]-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. 62 pp.
- Ortega C. 2009. “Efecto de la lactona Arglanina sobre el potencial proliferativo Y ciclo celular de células tumorales de cérvix humano (ViBo, CaLo y CaSki)”. Tesis de licenciatura FES Zaragoza UNAM México. 68 pp.
- PAHO (Pan American Health Organization). 2002. “La salud en las Américas”. ed. Organización Mundial de la Salud. Washington D.C. 1128 pp. Consulta interactiva www.paho.org
- Panno J. 2004. “The cell: Evolution of the first organism”. New York : Infobase Pub. 209 pp.

- Parada-Turska J., Paduch R., Majdan M., Kandefer-Szerszeń M. y Rzeski W. 2007. "Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells". *Pharmacol Rep.* Vol. 59 233 pp.
- Pardo F. J. 1998. "Anatomía patología general y especial de las neoplasias". Editorial Científico- Médico. España. 335 pp.
- Renz A., Berdel W., Kreuter M., Belka C. y Schulze O. 2001. "Rapid extracellular release of cytochrome C is specific for apoptosis and marks cell death in vivo". *Blood* Vol. 98. 1548 pp.
- Rogers K. 2011. "The cell". New York, NY : Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services. 240 pp.
- Secretaría de Salud (SSA). 2002. "Programa de acción cáncer cérvico-uterino". México 62 pp. Consulta interactiva www.ssa.gob.mx
- Secretaría de Salud (SSA). 2011. "Programa de acción específico 2007 – 2012 Cáncer cérvico-uterino". México 56 pp. Consulta interactiva www.ssa.gob.mx
- Siyuan Z., Yen-Kim W., Con-Nam O. y Han-Ming S. 2005. "Anti-cancer Potencial of sesquiterpene lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms". Vol. 5 249 pp.
- Steele A. J., Jones D. T., Ganeshaguru K., Duke V. M., Yogashangary B. C., North J. M., Lowdell M. W., Kottaridis P. D., Mehta A. B., Prentice A. G., Hoffbrand A. V. y Wickremasinghe R. G. 2006. "The sesquiterpene lactone parthenolide induces selective apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro". *Leukemia Nature Publishing Group* Vol. 20. 1079 pp.
- Studzinski G. P. 1995. "Cell growth and apoptosis A Practical Approach". Oxford University Press. New York. 269 pp.

- Weinberg, R. A. 1996. "How cancer arises". Scientific American, Vol. 275. 70 pp.

- WHO (World Health International). 2011. "International Agency for Research on Cancer. World Cancer day 2010". Consulta electrónica. <http://www.who.int/en/> , <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/worldcancerday2010.php>

- Wu C., Chen F., Rushing J. W., Wang X., Kim H. J., Huang G., Haley-Zitlin V. y He G. 2006. "Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines". J Med Food. Spring Vol. 9 61 pp.

- Xiao-Ming Y. y Zheng D. 2003. "Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research". Totowa, N.J: Humana Press. New Jersey. 272 pp.

APÉNDICE

Datos de la planta *Viguiera Sphaerocephala* de la que se obtuvo el compuesto Esferocefalina.

Nombre en latín	<i>Viguiera sphaerocephala</i> (DC.) Hemsl.
Familia	Compositae
Distribución	SC North America (México: Michoacán)
Sinónimos	<i>Encelia squarrosa</i> Greenm. <i>Leighia sphaerocephala</i> DC.
Nombre Común en Español	-----
Nombre Común en Inglés	roundhead goldeneye
Nombre Común en Francés	viguiera à tête arrondie

Domínio: Eukaryota () - Whittaker & Margulis, 1978

Reino: Plantae () - Haeckel, 1866 - Plants

Subreino: Viridiaeplantae () - Cavalier-Smith, 1981

Filum: Tracheophyta () - Sinnott, 1935 Ex Cavalier-Smith, 1998 - Vascular Plants

Subfilum: Euphyllophytina ()

Infrafilum: Radiatopses () - Kenrick & Crane, 1997

Clase: Magnoliopsida () - Brongniart, 1843 - Dicotyledons

Subclase: Asteridae () - Takhtajan, 1967

Superorden: Asteranae () - Takhtajan, 1967

Orden: Asterales () - Lindley, 1833

Familia: Asteraceae () - Dumortier, 1822 - Sunflower Family

Género: *Viguiera* () - Kunth in A. von Humboldt et al., Nov. Gen. Sp. 4(fol.): 176. 1818; 4(qto.) - Goldeneye [For L. G. A. Viguier, 1790-1867, French physician]

Epíteto específico: *sphaerocephala* - (DC.) Hemsl.

Nombre botánico: - *Viguiera sphaerocephala* (DC.) Hemsl.



Viguiera sphaerocephala.

Imagen tomada del catálogo en línea del Instituto de Biología UNAM (<http://www.ib.unam.mx/>)

Líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu)

Las líneas celulares de CaCu que se utilizaron en este trabajo son: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18; y CaSky, células provenientes de carcinoma cérvico-uterino, establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16.

Tipificación de la línea celular HeLa

Humano, Negro, cuello del útero, carcinoma, epitelial.

Morfología: epitelial.

Especie: humano, Negro Mujer 31 años de edad; Tejido: cuello uterino.

Tumor: Carcinoma, epitelial.

Propiedades: prueba antitumoral; transformación; tumorigenicidad; citotoxicidad; biología celular; invasión bacteriana; virología; Susceptible a: adenovirus 3, el sarampión, virus de la polio 1, virus ECHO, vaccinia, arbovirus, virus sincitial respiratorio, reovirus 3, rinovirus, Cocksackie.

Disponible en los siguientes LABORATORIO:

Sumerja. Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università 'degli Studi (BGEBS, Brescia).

cultivo continuo, crecido como monocapa; MEM + 10% de FBS + 1 mM de piruvato de Na; 37 ° C, 5% de CO₂.

Más información

Medio de congelación: MEM + 10% FBS + 8% DMSO; micoplasma negativo, HOECHST.

Cariología: aneuploides.

tumorigénica en ratones desnudos.

Se han reportado para contener un virus integrado del papiloma humano 18 (VPH - 18).

Disponibilidad en los catálogos de líneas celulares: ATCC CCL 2, ECACC 85060701; IZSBS BS TCL20; DSMZ ACC 57; ICLC HTL95023.

Tipificación de la línea celular CaSki

Humana, Europeo, cuello uterino, carcinoma epidermoide, metastásica.

Morfología: epitelial.

Especie: humano, mujeres de raza caucásica de 40 años ; tejido : cuello uterino , tumor : Carcinoma epidermoide , del lugar de la metástasis ; Validado por HLA -DP beta : confirmados como humano por PCR.

Depositante: Dr. I. Bongarzone , Istituto Nazionale Tumori , Milán , Italia.

Propiedades: Las células han informado de secretar la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (hCG beta) y expresan el antígeno asociado al tumor.

Disponible en los siguientes LABORATORIO :

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro c / o CBA (ICLC , Genova)

cultivo continuo , crecido como monocapa ; RPMI 1640 + 10 % de FBS + 2 mM L - glutamina ; culturas divididas confluentes 01:03-01:06 utilizando tripsina / EDTA; semillas en 2 - 4x10 ⁴ células/cm² ; 37 ° C, 5 % de CO₂ Passages : 253.

Peligro: Manejar como potencialmente peligroso en virtud de seguridad biológica de nivel 2 de contención: células CaSki se han reportado contener un virus integrado del papiloma humano 16 (VPH - 16) genoma , aproximadamente 600 copias por célula.

Más información

Congelación medio : Medio de cultivo + 50 % + 10 % FBS DMSO; micoplasma negativo , Hoechst y PCR.

Disponibilidad en los catálogos de líneas celulares: ATCC CCL 2, ECACC 85060701; IZSBS BS TCL20; DSMZ ACC 57; ICLC HTL95023.

Medio de cultivo

RPMI–1640 (1640 Roswell Park Memorial Institute; Glibco, U.S.A.) 10.42 g
 NaCo₃ (Sigma – Aldrich, E.U.A.) 2g

Los reactivos se disuelven en 800 mL. De agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL. con agua bidestilada, se suplementa al 1% con Estreptomicina/Penicilina. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. y se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino (SFB) o 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 0.22 µm.

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

Sales inorgánicas	Cantidad (g/l)
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0.8
Aminoácidos	
L-Arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina • 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-leucina	0.05
L-Lisina • HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-serina	0.03
L-treonina	0.02
L-triptófano	0.005
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.02883
L-valina	0.02
Vitaminas	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
myo-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
ácido p-aminobenzoico	0.001
D-ácido pantoténico (hemicalcium)	0.00025
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005

Otros	
Glutación (reducido)	0.001
Rojo de fenol • Na	0.0053
Adicionar	
Bicarbonato de Sodio	2

Verseno

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

Tris base	3.04 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potássio	0.04 g (SIGMA, U.S.A)
Etilen – diamen- tetra- acético (EDTA)	0.40 g (SIGMA, U.S.A)

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

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de magnesio	0.10 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de calcio	0.10 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.20 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato mono ácido de sodio	2.16 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato di ácido de potasio	0.20 g (SIGMA, U.S.A)

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

Colorante Cristal Violeta

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

Desactivación del suero

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

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, Se almacena a 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% de PBS (preparado al momento, para disolverlo se calentó la solución a temperatura no mayor a 60°C, si rebasa esta temperatura el paraformaldehído polimeriza y la solución no sirve para fijar)

Catalizador liofilizado

1 vial y solución colorante 45 ml.

Reconstituir el catalizador en 1 ml de H₂O mili Q estéril por 10 minutos y mezclar completamente. Esta solución es estable varias semanas a 4 °C.

Descongelar la solución colorante, ésta es estable a 4 °C varias semanas. Evitar ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Preparación de la mezcla de reacción (Bio Vision, California): Para 100 ensayos mezclar 250 µl de la solución del catalizador con 11.25 ml de la solución colorante. Esta mezcla deberá prepararse inmediatamente antes de ser utilizada.