



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“Evaluación del efecto de isoindolonas sobre
la proliferación de células de cáncer
cervicouterino”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LENNIS BEATRIZ ORDUÑA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B Arturo Valle Mendiola

ASESORA DE TESIS: Dra. Isabel Soto Cruz

México, D.F, Febrero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la gran casa de estudios de mi país.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, pues me brindo los conocimientos y toda mi formación académica de licenciatura.

A la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, por brindarme las instalaciones y recursos necesarios para esta tesis.

A la Dra. Isabel Soto Cruz por brindarme un lugar en su laboratorio de investigación para poder realizar esta tesis, así como los conocimientos que me sirvieron de base para poder realizarla.

Al Q.F.B Arturo Valle Mendiola por instruirme en el campo de la biología molecular, en la prácticas de laboratorio, los conocimientos brindados, el apoyo y la paciencia total durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez quién proporcionó los compuestos químicos base que permitieron el desarrollo de este proyecto.

A Don José, por su apoyo técnico y paciencia para proporcionarme el material necesario y adecuado para realizar esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio 9 Planta Baja de Oncología Molecular de la UMIEZ, con especial agradecimiento a José Ricardo Bustos Rodríguez y Silvia Fernanda Urias Contreras, por todo el apoyo y consejos en los buenos y malos momentos que se viven como tesista en un laboratorio de oncología molecular.

DEDICATORIA

A mis padres, Esteban Orduña Nava y Mónica Castillo Jiménez, por todo el apoyo, consejos, mimos, regaños y desvelos que hemos vivido juntos. Me han brindado la fortaleza necesaria; y el punto hasta dónde he llegado ha sido gracias a ustedes, este logro es también suyo.

A mi abuelo Nazario Castillo y mis tíos Estefanía Orduña Nava y Antonio Bahena Nava, pues siempre me alientan y alentaron a cumplir mis metas, y aun cuando pierdo la fé en mi misma, mi abuelo y tía están ahí para devolvérmela.

A mi novio y mejor amigo, Sendi Rafael Adame García, quien me ha apoyado de manera incondicional. Mil gracias por todo, me ha enseñado que aún en la obscuridad siempre hay una pequeña luz, y me ha convencido de que la ciencia es un campo emocionante al cual no se le debe temer y en el que uno puede encontrar dicha.

A mis hermanas y amigas María Fernanda Orduña Castillo, Angélica Lucero Benitez y Lorena Carrillo González, pues estos años de amistad llenos de consejos, risas y pañuelos de lágrimas me han hecho muy feliz, las quiero mucho.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	
Definición y epidemiología del cáncer	8
Factores de riesgo para cáncer de cérvix	10
Estadios de la enfermedad	16
Tratamientos	19
Isoindolonas	26
Proteínas STAT's y MAPK's en células cancerígenas	30
Cinética de la proliferación celular	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	36
MATERIAL Y MÉTODOS	37
Cuantificación de proliferación celular por incorporación de Cristal Violeta	38
Análisis de proteínas por Western Blot	40
RESULTADOS	
Cinéticas de proliferación celular con los compuestos de isoindolonas	46
Determinación de IC ₅₀ con compuestos de isoindolonas C13 y C19	54
Análisis proteico por Western Blot	58
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
CONCLUSIÓN	65
PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS	68

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo; en 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que causó aproximadamente el 20% de las muertes a nivel mundial.^{1,2}

El cáncer cervicouterino (CaCu) se ha perfilado como la segunda causa de muerte femenina por cáncer en todo el mundo.²

Pese a que existen en la actualidad diversos tratamientos para tratar esta patología como lo son cirugías³, radioterapias y quimioterapias, estos implican en su mayoría importantes efectos adversos que repercuten negativamente en la salud de las pacientes.

Con respecto a las quimioterapias, se ha reportado que el efecto que estos poseen no es específico y atacan a las células de todo el organismo, lo que implica efectos indeseables y perjudiciales para las pacientes como supresión de medula ósea, problemas gastrointestinales, falla renal y algunas veces la ocurrencia de otro tipo de cáncer.⁴

Estas características adversas de los fármacos actuales impulsan el desarrollo e investigación de nuevos fármacos que puedan ser utilizados como parte de los esquemas antitumorales de CaCu.

Las isoindolonas son compuestos cuya estructura contiene al grupo farmacóforo, isoindolin-1-ona.

Actualmente se perfilan como moléculas bajo investigación, ya que se ha reportado son capaces de ejercer respuestas anestésicas, antiinflamatorias, antibacteriales, antihipertensivas, antitumorales, antivirales, entre otras.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14}

Se ha reportado que los grupos amidas de ciertos compuestos pueden funcionar como inhibidores de cinasas⁷, característica que poseen los compuestos de isoindolonas de esta investigación.

Se experimentó con cuatro compuestos de isoindolonas, que para fines prácticos se denominaron C10, C13, C16 y C19. El efecto de dichos compuestos se evaluó mediante cinéticas de proliferación celular, con las cuales se observó una disminución de la proliferación de dos líneas celulares de CaCu (CALO e INBL); y mediante las cuales se determinaron las IC₅₀ de los compuestos que mostraron mayor actividad; para el compuesto C13 se encontró en el rango de 2.76 y 4.89 µg/mL, mientras que para el compuesto C19 entre 2.21 y 3.81 µg/mL.

El análisis por Western Blot demostró que para la línea CALO, la incubación con el compuesto C13, condujo a un aumento en la fosforilación de la proteína ERK 1/2, y una disminución de la fosforilación de la proteína AKT. Este comportamiento puede deberse a una regulación de comunicación cruzada de tipo inhibitorio, que finalmente podría significar un arresto en el ciclo celular.

En la línea INBL, el comportamiento a nivel molecular es distinto en cuanto a la transducción de señales, fenómeno que impide ver un efecto de disminución sobre la actividad de AKT similar al de la línea CALO. Por lo que el efecto inhibitorio en

la proliferación celular sobre esta línea tras la estimulación con el compuesto C13 se debe a mecanismos y vías diferentes a las antes mencionadas.

En el análisis proteico por Western Blot tras la incubación de la línea INBL con el compuesto C19, se observó que la fosforilación en la proteína AKT disminuye y la fosforilación sobre ERK aumenta de manera significativa en un estímulo de concentración bajo, de 10 μM , por lo que parece ejercer un mecanismo de regulación de comunicación cruzada de tipo inhibitorio entre las proteínas mencionadas es decir que al activarse una de estas vías se genera un fenómeno de inhibición sobre la otra vía.

MARCO TEÓRICO

Definición y epidemiología del cáncer

El cáncer es un término genérico que refiere a un desorden generado por alteraciones en la estructura o secuencia del genoma¹⁵, sucede una vez que los genes de las células mutan, alterando la proliferación celular o la apoptosis.¹⁶

Las células que se encuentran en proliferación llevan a cabo lo que se denomina el ciclo celular, el cual, a grandes rasgos, es la replicación de todos los componentes de la célula, para que la célula pueda dividirse y formar dos células hijas idénticas. Sucede en una serie de acontecimientos secuenciales, conocidos como G1, S, G2 y M.¹⁷

Por otro lado, la apoptosis se refiere a un mecanismo mediante el cual ha de regularse el número de células de un organismo, destacando la participación de las caspasas en los eventos bioquímicos del mismo¹⁸ para controlar la propia muerte de la célula.¹⁹

Es importante resaltar el hecho de que una sola mutación en una célula, no implica que la misma actué sin restricción en cuanto a proliferación se refiere; si no que han de suceder al menos cinco eventos mutacionales en los genes para que suceda este fenómeno.¹⁶

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo; tan sólo en 2011 causó aproximadamente el 20 % de las muertes en todo el mundo.²

Se sabe que los cánceres causados por virus, tales como el virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por los papilomavirus humanos (VPH), son responsables de hasta un 20 % de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios.²

En México en el año 2010, los principales tumores malignos que afectaron a la población femenina de 20 años y más, fue el cáncer de mama (24.3 %), el cervicouterino (9.7 %) y el de colon (3.2 %).¹

El cáncer de cervicouterino (CaCu) es la causa más frecuente de morbi-mortalidad por cáncer ginecológico y la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, después del cáncer de mama.²⁰

Éste cáncer constituye un ejemplo del reflejo de inequidad en salud, ya que es una enfermedad prevenible con detección y tratamiento oportuno. Sin embargo, las mujeres mexicanas no cuentan con las mismas oportunidades de prevención y no se cuenta con una cultura adecuada de autocuidado.^{21, 22}

De acuerdo con los datos actuales, la tendencia de mortalidad CaCu en México se ha reducido significativamente, pero aún tiene una tasa de mortalidad de 5 muertes por cada 100 000 casos.²²

Factores de riesgo para cáncer de cérvix.

Existe una importante asociación entre el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el desarrollo de este cáncer.

El VPH es un adenovirus no envuelto que posee un diámetro aproximado de 52-55nm, rodeado por una cápside icosaédrica. Se compone de aproximadamente 8000 pares de bases dispuestas en círculo.^{23,24}

Actualmente se ha reportado que existen entre 180 y 200 tipos de VPH, y se espera identificar más en el futuro.^{23,25} Dentro de los tipos de VPH que se han reportado como carcinogénicos se encuentran los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68,²⁶ siendo los más frecuentemente encontrados en el desarrollo de carcinoma cervical invasivo el tipo 16 y el 18^{26,27}.

El genoma de este virus está dividido en 4 regiones (LCR o URR, región de proteínas de expresión temprana, región de proteínas de expresión tardía y una región pequeña altamente variable y no codificante NCR).²⁸ Consiste en 8 marcos de lectura abiertos, 6 genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), y 2 genes tardíos (L1 y L2, los cuales son los genes responsables de las proteínas de la cápside).²³

Los genes de expresión temprana se expresan en las células basales, suprabasales e intermedias del cérvix; mientras que los genes tardíos lo hacen en el estrato apical.²³

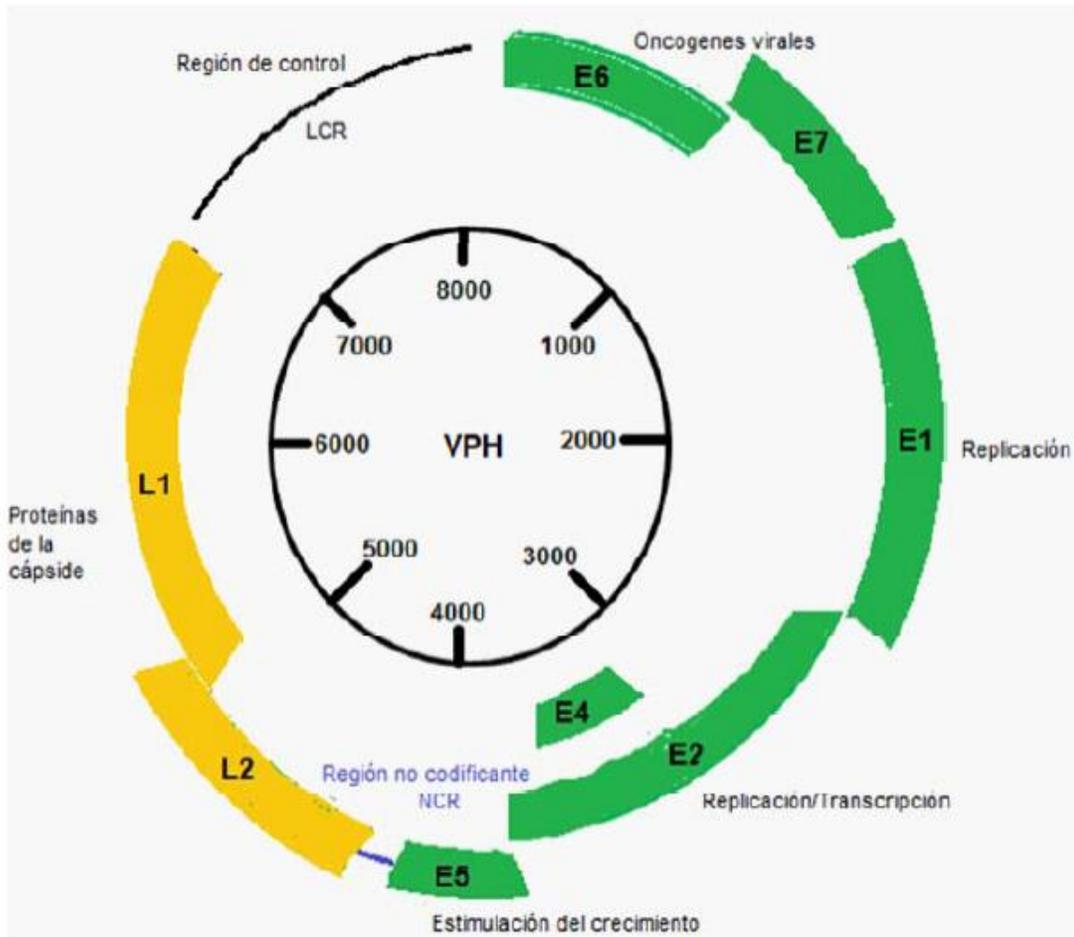


Figura 1. Mapa genético del VPH. Se denotan 8 marcos de lectura abierta.²⁸

La proteína E1 prepara al genoma viral para ser replicado por la maquinaria de la célula hospedera. E2 mantiene la forma episomal del genoma del virus y organiza su transcripción. La participación completa de la proteína E4 aún está por aclararse²³, aunque se propone su participación por empalme con la proteína E1, para formar un complejo denominado “E1[^]E4” que participa en la fase productiva de la replicación del virus, además de que desorganiza el citoesqueleto para facilitar la salida de los viriones.^{23,29} Algunos investigadores reportan la

participación de este complejo en el VPH16 y el VPH31, en la amplificación del genoma viral y el mantenimiento de las células diferenciadas en la fase S del ciclo celular.²⁹

E5, es una proteína que cuando está presente, modifica la función de los receptores a los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGFR), o el de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR).^{23,30}

Las principales herramientas oncogénicas del genoma viral, las constituyen las proteínas E6 y E7. En los tipos de virus de bajo riesgo carcinógeno, estas proteínas parecen inactivas o débilmente activas, no así en aquellos tipos de alto riesgo.²³ Dichas oncoproteínas son necesarias para la inmortalización y retención de las células en el ciclo celular, y para el mantenimiento extracromosomal del VPH en células basales no diferenciadas.²⁸

E6 se une mayoritariamente a la proteína supresora tumoral p53, la cual es una proteína que evita la transición de G1 a S ante el daño al ADN; si el daño es producido luego de la replicación del ADN (fase S), la célula se detiene en fase G2. Si el daño al ADN es irreparable, p53 lleva a la muerte celular por apoptosis. E6 inhibe la función de p53 por la vía de la ubiquitina con la participación de la proteína celular asociada (E6-AP).²⁸

Por tanto E6, arresta a la célula principalmente en la fase S del ciclo, inhibiendo así la apoptosis y mejorando la capacidad de transformación.²³ Se ha reportado que E6 inactiva al Interferón I (IFN), y a la señalización vía ríó abajo quimiotáctica que atrae y activa a subconjuntos específicos de leucocitos, células del linaje

monocitos/macrófagos, así como a la células natural killer.²⁷ Altera la transcripción de genes celulares mediante la interacción con p300 y CBP y el incremento de la vida celular por la sobreactivación de la telomerasa.²⁸

Por otro lado, E7 se une e inactiva a la familia supresora tumoral pRB provocando la tumorigenesis.²³ La proteína RB en forma hipofosforilada bloquea a los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3a, los cuales son esenciales para la expresión de genes que dan continuidad al ciclo celular; cuando esta proteína está fosforilada de manera parcial deja en libertad a los factores.²⁸ Además, E7 inhibe la función y translocación nuclear de p48 (ISGF3 γ), el cual es un componente del complejo trimérico del gen del factor 3 estimulador (ISGF3); al faltar p48, la vía de transcripción de los genes de regulación y su unión a los elementos de respuesta estimulados por IFN se suprimen.²⁷

Con respecto a los genes de expresión tardía, la proteína de cápside mayor, L1, tiene un peso de 55kDa y constituye la cápside vírica con 360 moléculas organizadas en 72 pentámeros; mientras que L2 (proteína de cápside menor) de 74kDa,²⁸ se localiza en la cavidad interna de la cápside que forma L1, con 12 a 72 moléculas.²⁴

El VPH infecta a las células epiteliales basales provocando lesiones benignas y malignas en piel y mucosas. La expresión está regulada por la diferenciación celular usando varios promotores. Este virus tiene 2 promotores principales P1 y P3.²⁸

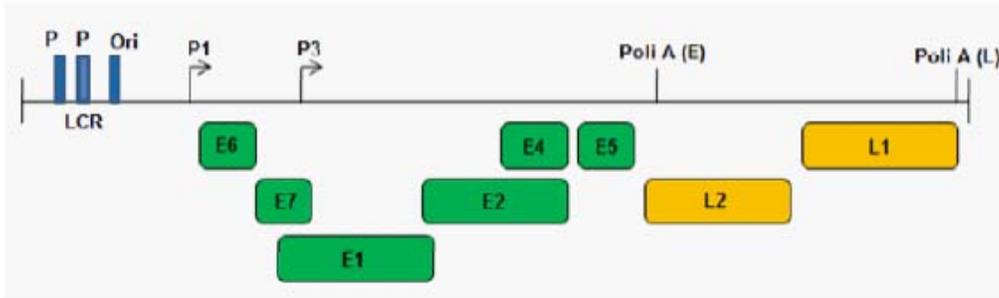


Figura 2. Genoma del VPH. P (potenciadores); P1 y P3 (promotores); PoliA (sitios de poliadenilación); LCR (región de control).²⁸

El promotor temprano, que en el VPH16 y VPH31 se conoce P₉₇, mientras que para el VPH18 es el P₁₀₅. Es el encargado de controlar la expresión en células no diferenciadas y dirige la iniciación de la transcripción en regiones río arriba del marco de lectura abierto (ORF) para el gen E6. La expresión a partir de este promotor genera transcritos policistrónicos que codifican, como su nombre lo indica, para las proteínas de expresión temprana, las cuales terminan en regiones de poliadenilación localizadas río abajo del ORF para E5. Su regulación depende de la unión de factores de transcripción, los cuales reconocen secuencias de inicio de la región reguladora (LCR).²⁸

P₇₄₂ es el promotor tardío, y dirige la expresión de los transcritos que codifican tanto para L1 y L2, como para E1, E4 y E5. Los transcritos se activan en diferentes regiones al rededor del nucleótido 742 en VPH31 durante la diferenciación. Se regula por medio de secuencias en la región E6/E7 así como en LCR.²⁸

El ciclo de vida de este virus encaja con el programa de diferenciación de los queratinocitos. Los pseudoviriones inicialmente se unen a la capa basal cervico-

vaginal, es entonces cuando la cápside experimenta un cambio conformacional debido a la proteasa furina que degrada la proteína L2, así el virus se une a los receptores de membrana (integrinas) de la lámina basal. Después de la infección, el genoma del virus se mantiene como un elemento extracromosomal (episomal) en el núcleo de las células. El número de episomas ha de incrementarse en las capas superiores del epitelio debido a las proteínas E6 y E7.²⁸

Las células de la capa basal, que son células madres, se dividen constantemente para dar origen a la región suprabasal. La infección de éstas células por el VPH lleva a la producción de 20 a 100 copias episomales del virus por célula infectada.²⁸

Tras la división de las células basales infectadas, los genomas virales pasan a las células hijas, las cuales migran hacia el estrato granuloso y experimentan una diferenciación. En condiciones normales, estas células salen del ciclo de división celular; sin embargo, una vez infectadas se mantienen activas en el ciclo celular debido a la acción de la proteína E7.²⁸

Es importante resaltar que el VPH no es el único factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de cérvix, ya que se han reportado ciertos factores tales como: el fumar tabaco, uso prolongado de anticonceptivos orales, coinfecciones de transmisión sexual, multiparidad, parto en edad temprana, enfermedades del sistema inmunológico, inicio temprano de vida sexual y promiscuidad, como causas asociados a esta patología.^{23,31,32,33,34}

Estadios de la enfermedad.

La estadificación es un proceso mediante el cual, una vez diagnosticado CaCu ya sea por la prueba de Papanicolau del cuello uterino, prueba del VPH, examen físico, examen pélvico, colposcopia, biopsia, entre otros, siendo para México como diagnóstico definitivo el examen histopatológico, se determina si las células cancerosas se han diseminado dentro del mismo cuello uterino o hacia otra parte del cuerpo.³

Las células cancerígenas pueden experimentar diseminación o metástasis ya sea por tejido, sistema linfático, o bien, por sangre.^{3,35}

La estadificación puede realizarse mediante una exploración por TAC (tomografía axial computarizada), exploración con TEP (exploración con tomografía por emisión de positrones), ecografía, citoscopia, laparoscopia, radiografía, o bien, mediante la estadificación quirúrgica pretratamiento.³

Su importancia radica en que de ésta depende la planificación del tratamiento.^{3,35}

Los estadios para CaCu son:

- Carcinoma in situ (Estadio 0).

Aparición de células anormales en el revestimiento más interno del cuello uterino. Las células pueden volverse anormales y diseminarse hacia el tejido cercano normal.³ Aún no se considera cáncer, debido a que no se ha invadido al cérvix.³⁵

- Estadio I

Las células cancerígenas se encuentran solamente en el cuello uterino. Se divide a su vez en IA y IB, de acuerdo con la cantidad de células cancerígenas.³

- Por su parte IA se divide en:

- IA1, cuando la región observada al microscopio no está a más de 3mm de profundidad y no mide más de 7 mm de ancho.³
- IA2, el cáncer está a más de 3 mm de profundidad, pero no a más de 5 mm; y su ancho no rebasa los 7mm.³

- Estadio IB

- IB1, el cáncer solo se puede ver con un microscopio y mide más de 5mm de profundidad y más de 7 mm de ancho. Otro criterio de este estadio es aquel en el que el cáncer se puede ver sin un microscopio y mide 4 cm aproximadamente.³
- IB2, el cáncer se puede ver sin un microscopio y mide más de 4 cm.³

- Estadio II

El cáncer se ha diseminado una tercera parte, hacia la parte superior de la vagina o a los ligamentos que sostienen el cérvix. Se divide en estadios IIA y IIB, según la distancia a la que el cáncer se diseminó.

- Estadio III

Las células se han diseminado al tercio inferior de la vagina, a la pared de la pelvis o a los riñones. El estadio III se divide en estadios IIIA y IIIB, según la distancia hasta la que el cáncer se diseminó.

- Estadio IV

El cáncer se ha vuelto metastásico y ha alcanzado la vejiga o el recto; o bien, se ha diseminado a lugares más alejados como los pulmones, intestino, ganglios linfáticos, hígado o hueso.^{3,35}

Tratamientos.

- En el estadio 0, el tratamiento puede incluir: Escisión electroquirúrgica con asa (LEEP), cirugía láser, conización, criocirugía, histerectomía o radioterapia interna.
- Estadio IA: Histerectomía total con salpingooforectomía bilateral o sin esta, conización, histerectomía radical modificada y extirpación de ganglios linfáticos y radioterapia interna.
- Estadio IB: Combinación de radioterapia interna y radioterapia externa, histerectomía radical así como extirpación de ganglios linfáticos y, radioterapia más quimioterapia.
- Estadio IIA: Combinación de radioterapia interna y radioterapia externa, más quimioterapia y la histerectomía radical y extirpación de ganglios linfáticos.
- Estadio IIB: Radioterapia sea interna y externa, combinada con quimioterapia.
- Estadio III: Radioterapia interna y radioterapia externa, combinada con quimioterapia.
- Estadio IVA: Radioterapia interna y externa, combinada con quimioterapia.
- Estadio IVB: Radioterapia y quimioterapia.³

Con respecto a los medicamentos empleados para prevenir el desarrollo del cáncer cervical, el grupo está constituido por vacunas contra el VPH.

Las dos vacunas más empleadas son la VPH4 (Gardasil) y la VPH2 (Cervarix), estas vacunas protegen contra los dos principales VPH que causan CaCu, aunque es necesario indicar que no cubren todo el espectro de los VPH que también pueden generar el desarrollo de esta enfermedad. Están indicadas en el periodo de vida que comprende entre los 9 y 26 años.^{3,36,37}

Sin embargo, algunos trabajos e investigaciones han indicado que la efectividad de las vacunas es mayor cuando las mujeres no han iniciado su vida sexual, con lo cual ante esta premisa, en México, las mujeres que reciben esta vacuna como parte de las campañas de prevención del sector público, oscilan entre los 10 y 13 años de edad.³⁶

Cuando el cáncer se ha confirmado y se requiere de la quimioterapia como parte del tratamiento, de acuerdo con la FDA, los fármacos indicados son:³

- Bleomicina.

Este fármaco pertenece al grupo de antibióticos citotóxicos al ser un glicopéptido aislado de *Streptomyces verticillus*.^{38, 39}

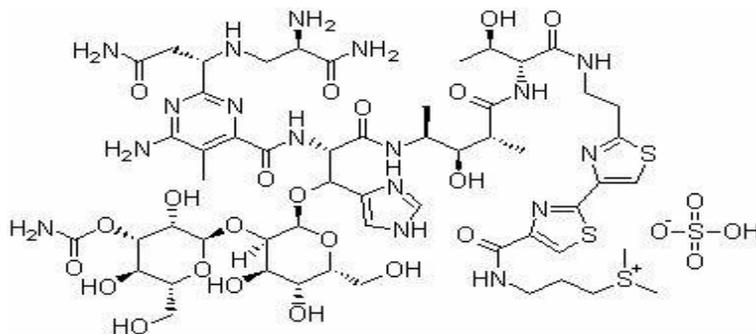


Figura 3. Estructura química de Bleomicina

Contiene tres dominios estructurales funcionales:

- Dominio de unión a metales: los átomos de Nitrógeno de este dominio interactúan con metales de transición tales como el Fe^{2+} y el Cu^{1+} , en presencia de oxígeno se cataliza el corte del ADN de cadena sencilla y doble al formar radicales libres, generando cambios globales en la morfología de los cromosomas. Además se ha reportado que estas especies reactivas reaccionan de manera inespecífica ya sea oxidando lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.
 - Dominio de unión al ADN: tanto la pirimidina y el grupo bitiazol del fármaco favorecen la unión de este al ADN. El grupo bitiazol aporta cargas positivas que favorecen la unión electrostática con el ADN ya sea por intercalación o mediante interacciones con el surco menor.
 - Carbohidratos: puede estar glicosilada con α -D-manosa y α -L-gulosa, los cuales se ha sugerido modulan la afinidad del fármaco por el ADN.³⁹
-
- Cisplatino.
Su mecanismo de acción aún no está completamente explicado. Sin embargo, comúnmente se acepta que el fármaco debe hidrolizarse en la célula y las especies hidratadas resultantes interactúan con el ADN, inhibiendo los procesos de replicación y transcripción. Siendo el principal producto tóxico el monoacuo cisplatino.⁴⁰

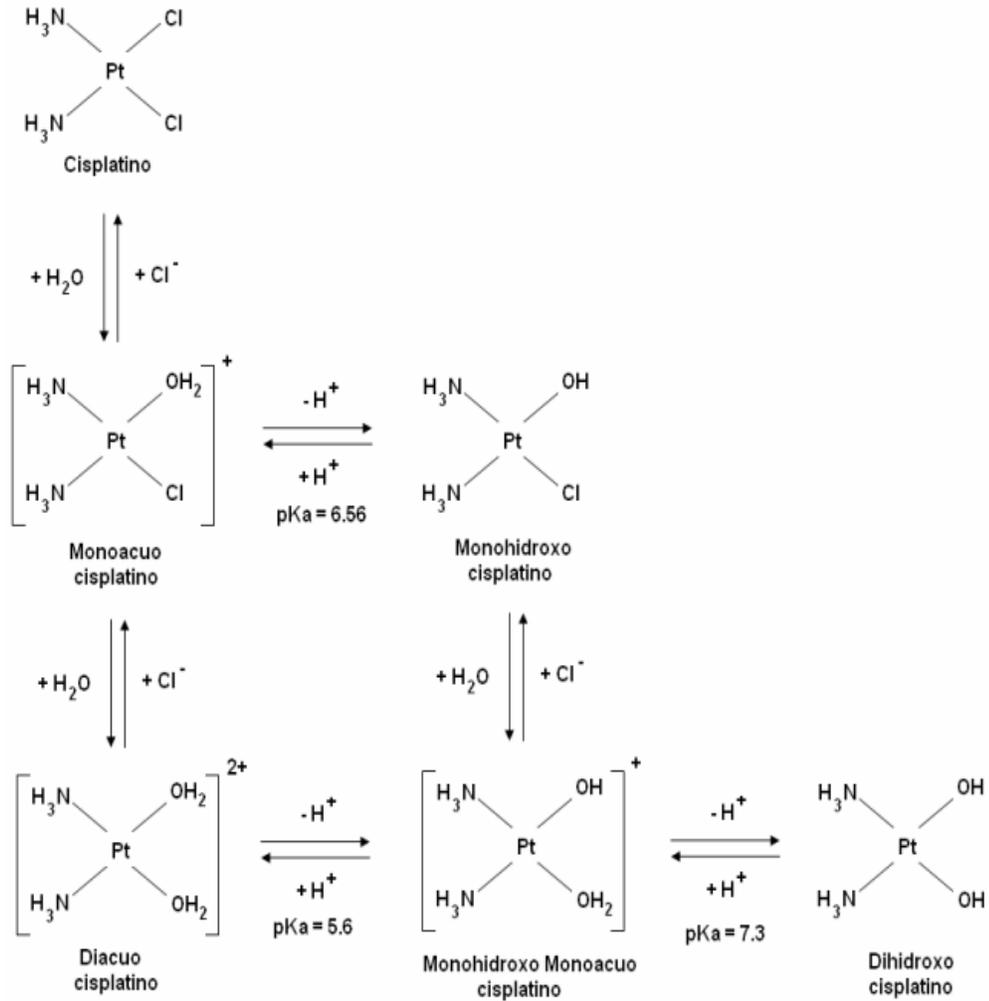


Figura 4. Hidrolisis de Cisplatino.⁴⁰

- Topotecán.

Análogo semisintético de la camptotecina. Es un inhibidor de la topoisomerasa-I, la cual es una enzima intracelular que disminuye la torsión inducida en el ADN por la replicación.

Este fármaco se une al complejo ADN-topoisomerasa I, de esta manera interfiere con el proceso de rotura y sellamiento del ADN.⁴¹

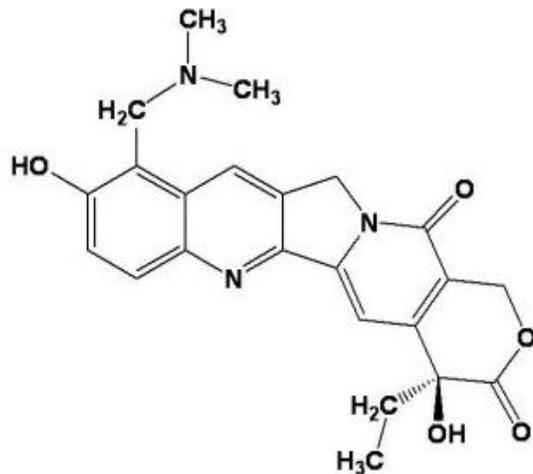


Figura 5. Estructura de Topotecán.

- Gemcitabina.

Es un fármaco análogo de la desoxicitidina, que inhibe a la subunidad grande R1 de la enzima ribonucleótido-reductasa, la cual es esencial en la síntesis *de novo* de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en las células, al convertir los ribonucleótidos a desoxinucleótidos.

El fármaco interactúa con esta subunidad con lo cual disminuye la producción de dNTPs. Además se ha reportado que puede ser modificado enzimáticamente por la célula a dFdCTP, para que este producto sea incorporado al recién replicado ADN con lo cual termina la cadena de ADN resultante.⁴²

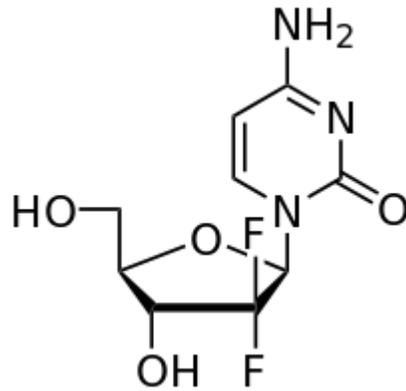


Figura 6. Estructura de Gemcitabina.

Estos fármacos en ocasiones no se administran de manera sola, sino que requieren de la administración neoadyuvante, concomitante o adyuvante.

De acuerdo con la FDA, la única combinación permitida para el tratamiento del cáncer cervical es la de Cisplatino-Gemcitabina.³

La quimioterapia es un procedimiento de carácter sistémico, es decir que el medicamento ha de administrarse por vía intravenosa, con ello, el fármaco se distribuye en todo el cuerpo y el efecto del principio activo se presenta tanto en células malignas como en células sanas, pues no tiene la capacidad de discernir entre unas células y otras, provenientes de un mismo organismo.⁴³

La quimioterapia es una herramienta muy efectiva contra diferentes tipos de cáncer, sin embargo los efectos adversos que su uso conlleva motivan la búsqueda científica por opciones terapéuticas que no generen numerosos efectos indeseables y perjudiciales para la salud que comprometan de manera negativa y en gran medida la calidad de vida de los pacientes.

Con estos argumentos, se propone que los fármacos a desarrollar deben enfocarse en atacar un comportamiento y no una diana exclusiva, el cual debe residir en el ritmo de división celular.⁴³

Isoindolonas.

Actualmente ciertos compuestos, conocidos como isoindolonas, han sido de interés científico pues se ha encontrado una amplia gama de actividades farmacológicas.⁵

Su estructura base está constituida por una pirrolidona fusionada con un anillo de benceno, nombrada isoindolin-1-ona.⁵

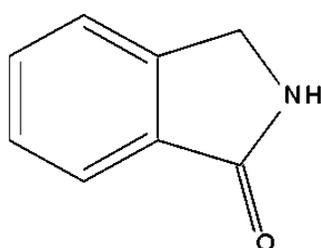


Figura 7. Estructura de Isoindolin-1-ona.⁵

La síntesis de estos compuestos con fines farmacológicos se ha realizado desde el año 1963 de acuerdo con la base de datos de NCBI, como antihipertensivo.³⁷

Para su estudio, estas isoindolonas se han dividido en tres grupos: las *N*-sustituidas, las sustituidas en el átomo de carbono 3 (3-sustituidas) y aquellas que se fusionan en el anillo de pirrolidona con un sistema cíclico.⁵

Se han identificado una gran variedad de isoindolonas fusionadas a través de extracciones realizadas en productos naturales, tal como las plantas del género *Berberis sp.*; aunque es necesario mencionar que su obtención también es posible mediante métodos sintéticos.⁵

Dentro las isoindolonas fusionadas con un anillo cíclico en el anillo de pirrolidona se tomaron en cuenta cuatro, debido a que en ensayo previo, se probaron otras moléculas de isoindolonas y se observó que la presencia de un grupo ciano disminuía en cierta medida la proliferación celular, de ahí que los compuestos de estudio que a continuación se mencionan, contenga dicho grupo funcional:

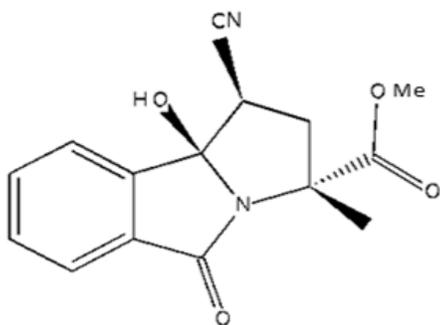


Figura 8. Estructura de (1*R**, 3*R**, 9*bR**)-1-Ciano-9*b*-hidroxi-3-metil-5-oxo-2,3,5,9*b*-tetrahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*a*]isoindol-3-carboxilato de metilo, el cual será denominado como Compuesto 10 (C10) en este proyecto.

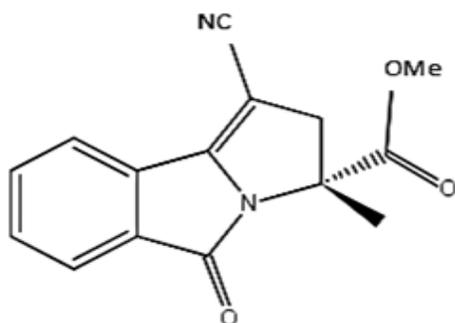


Figura 9. Estructura de (±)-1-Ciano-3-metil-5-oxo-3,5-dihidro-2*H*-pirrolo[2,1-*a*]isoindol-3-carboxilato de metilo, abreviado en el proyecto como Compuesto 13 (C13).

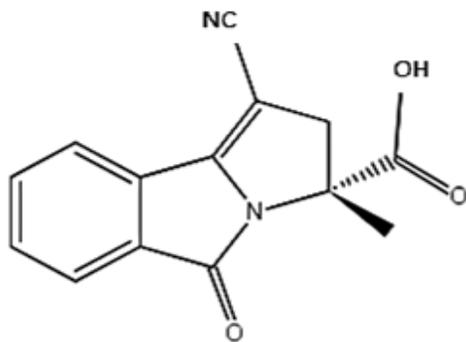


Figura 10. Estructura de Ácido (\pm)-1-Ciano-3-metil-5-oxo-3,5-dihidro-2*H*-pirrolo[2,1-*a*]isoindol-3-carboxílico, denominado como Compuesto 16 (C16).

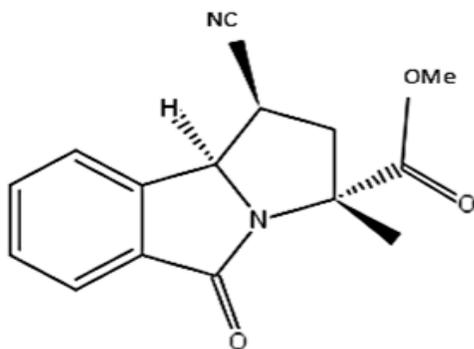


Figura 11. Estructura de ($1S^*,3R^*,9bR^*$)-1-Ciano-3-metil-5-oxo-2,3,5,9*b*-tetrahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*a*]isoindol-3-carboxilato de metilo, nombrado como Compuesto 19 (C19).

Los compuestos fueron sintetizados en el Laboratorio - 4 Planta Alta, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), el cual está a cargo del Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez.

Actualmente se desarrolla buena parte de investigación farmacológica de estos compuestos como ansiolíticos y antipsicóticos, pues se han descrito como antagonistas alostéricos del receptor metabotrópico de glutamato.^{3,12,13,14}

Sin embargo, al momento se ha reportado que los compuestos de isoindolonas son capaces de ejercer ciertos efectos farmacológicos tales como la anestesia, respuesta antiinflamatoria, antibacterial, antihipertensiva, nootrópica, y destacando para este trabajo, antitumoral y antiviral.^{5,6,7,8,9,10}

Los grupos amidas de ciertos compuestos pueden funcionar como inhibidores de cinasas,⁷ por lo que las isoindolonas, al poseer este grupo funcional, podrían inhibir la vía de supervivencia de las células tumorales.

Proteínas STAT's y MAPK's en células cancerígenas.

Algunos virus, tales como el Virus del Herpes Humano 8 (HHV-8) pueden activar constitutivamente a la cinasa regulada de manera extracelular ERK, la cual forma parte de la vía de las cinasas activadas por mitógenos MAP cinasas (MAPK); esta vía puede constituir un blanco farmacológico.⁶

La vía de las MAPK es una vía de transducción conservada en las células eucariotas que participa en procesos tales como el crecimiento y la diferenciación celular, la apoptosis, el arresto celular, la inflamación y de respuesta por estrés ambiental.⁴⁴

Existen 4 vías principales de MAPK: la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK, conocida como p42/p44 MAP cinasa), la vía JNK, la vía Big MAP cinasas (BMK) y la p38 MAPK (también conocida como SAPK2/RK).⁴⁴

En general ERK1 y ERK2 son transductores clave para señales de proliferación y son comúnmente activados por mitógenos. Mientras que la vía JNK y la p38 MAPK son difícilmente activados por mitógenos pero son fuertemente activados como respuesta a señales de estrés, factores de crecimiento y citocinas inflamatorias.⁴⁴

La señal de transducción RAS-RAF-MEK-ERK es un elemento importante en la supervivencia, crecimiento y proliferación celular. Las mutantes en la proteína B-RAF inducen la activación constitutiva de ésta vía y es crucial para el desarrollo de ciertos tumores, por lo que los inhibidores de la activación de la proteína RAF se

perfilan como potenciales fármacos en el tratamiento de enfermedades oncológicas.⁷

Por otro lado, se ha reportado que células tumorales de CaCu expresan al receptor para interleucina 2 (IL2-R), el cual se encuentra estrechamente asociado a proteínas tales como Janus kinasas (JAK) y Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STAT). Éstas últimas viajan del citoplasma al núcleo para transducir señales de proliferación.⁴⁵

Las STAT's constan de 7 factores identificados en mamíferos^{46,47} los cuales son STAT1-STAT6, con dos isoformas de STAT5, llamadas STAT5a y STAT5b, las cuales existen como dos genes altamente relacionados.⁴⁶

Estas proteínas ejercen efectos en la diferenciación celular, proliferación e inmunidad. Dado que las células de CaCu sobreexpresan estas proteínas, podría sugerirse que una molécula que inhiba la expresión de las mismas perfilaría como un fármaco en el tratamiento contra este tipo de cáncer.

Cinética de la proliferación celular.

El estudio de la proliferación celular comprende los cambios en la división celular, las características de las células transformadas, así como su crecimiento.⁴⁸

La variación de la duración de un ciclo celular es muy amplia, pues se sabe varía de entre 15 y 120 horas, con un valor modal de 48 horas.⁴⁸

Nuestro grupo de investigación considera que para las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL, el ciclo celular se cumple entre las 32 y 36 horas.

El ciclo celular de cualquier célula comprende dos fases principales, la interfase y la mitosis.

La primera comprende las fases G1, S y G2; y estas dan lugar a la fase de mitosis, la cual se caracteriza por las subfases: profase, metafase, anafase y telofase.¹⁵

De manera más detallada, G1 es la fase previa a la síntesis del ADN, es decir, cuando la célula se encuentra en crecimiento, por lo tanto abarca desde su nacimiento hasta la llegada a la fase S.¹⁵

El tiempo en el que la célula permanece en fase G1 es variable.¹⁵ En esta fase la célula comprueba si las condiciones externas e internas son favorables para continuar con el ciclo celular.⁴⁹

En la fase S, el ADN es replicado, por lo que la cantidad total de ADN dentro de la célula es el doble,^{15,50} además se duplican los centrosomas. Esta fase termina con el inicio de la fase G2, en la cual se acumulan e incrementa la síntesis de proteínas necesarias para llevar a cabo la mitosis. Además en esta fase se

comprueba que no se han cometido errores en la replicación del DNA y si la duplicación es completa. Durante la fase G2 es visible un aumento en el tamaño de la célula y los centrómeros.¹⁵

Finalmente se llega a la fase M, o también conocida como mitosis, dando lugar a la profase, donde el huso mitótico empieza a formarse y los centrómeros a condensarse.⁵¹

La metafase se caracteriza por la formación de la placa metafásica, en la cual los microtúbulos del huso capturan y alinean a los cromosomas.⁵¹

En la anafase las cromátidas hermanas se separan y son conducidas a los polos opuestos del huso, mientras que el alargamiento del huso aumenta la separación entre los polos. Finalmente en la telofase los cromosomas son transportados en el huso que sigue alargándose, y son liberados en los polos donde posteriormente se generan nuevas envolturas nucleares en torno a ellos.⁵¹

La citocinesis, es la etapa en la cual la célula se divide por el centro formando dos células, y es este proceso el final de la mitosis.⁵¹

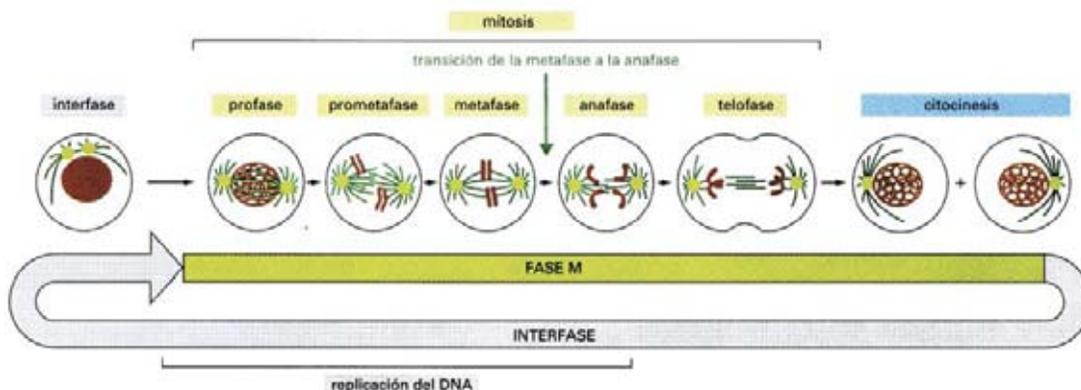


Figura 12. Esquema del ciclo celular de una célula somática.⁵¹

Junto con la realización de esta serie de procesos existe un sistema de control del ciclo celular, el cual coordina el ciclo en su totalidad. Está conformado por dos clases principales de proteínas, las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), las cuales fosforilan proteínas seleccionadas en serinas y treoninas, y las proteínas llamadas ciclinas, las cuales se unen a las Cdk para controlar su capacidad de fosforilar a las proteínas seleccionadas.⁵¹

Resumiendo, el ciclo celular es la serie de procesos que darán lugar a la formación de dos células hijas a partir de una célula madre, por lo tanto la viabilidad de células aumenta el doble por cada ciclo celular.

Si la viabilidad de las células disminuye, significa que existen factores intrínsecos de la célula o bien, en su medio, que no permiten el crecimiento adecuado de las mismas.

Es bajo esta premisa, que el estudio de la cinética de proliferación celular da una idea del efecto que puede poseer un fármaco sobre una cierta línea celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los agentes químicos utilizados en la terapia del cáncer de cérvix, así como los utilizados en otras terapias oncológicas, atacan células malignas y células normales.

Este mecanismo, conlleva importantes efectos adversos y un alto riesgo en la implementación y uso de las terapias actuales para los pacientes.

Es por ello que la búsqueda por nuevas opciones terapéuticas para tratar esta patología es constante.

Recientemente se ha reportado que los compuestos de isoindolonas poseen actividades antitumorales y antivirales, entre otras, por lo que se han convertido en farmacóforos que podrían ser potenciales moléculas para el tratamiento contra el CaCu.

Con ello surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Los compuestos de isoindolonas C10, C13, C16 y C19 suprimen el efecto proliferativo en dos líneas celulares de cáncer de cérvix (CALO e INBL)?

HIPÓTESIS

Los compuestos de isoindolonas disminuirán la proliferación de las líneas celulares de CaCu (CALO e INBL) de manera dosis dependiente.

OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto de isoindolonas sobre la proliferación de células de CaCu (CALO e INBL).

Específicos:

Determinar la IC_{50} de los compuestos de isoindolonas que muestren mayor actividad farmacológica sobre la proliferación celular.

Evaluar el efecto de las isoindolonas con mayor actividad sobre la fosforilación de proteínas involucradas en proliferación de células CALO e INBL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo experimental del presente proyecto, se trabajó con las líneas celulares de CALO e INBL.

Estas líneas celulares se establecieron a través de tumores quirúrgicos de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer cervical.⁵²

La línea INBL está compuesta por células metastásicas grandes no queratinizadas pertenecientes al estadio IVB de CaCu, mientras que la línea celular CALO se diferencia en que pertenecen a un estadio IIB.⁵²

Diseño de estudio: Estudio experimental prospectivo transversal comparativo.

Universo de estudio: Líneas celulares de CaCu (CALO e INBL).

Criterio de inclusión:

Líneas celulares CALO e INBL confluentes en medio RPMI suplementado con SFB.

Criterio de exclusión:

Células contaminadas.

Variables:

- **Dependiente:**

Efecto citostático o citolítico de las isoindolonas.

- **Independiente:**

Concentraciones 500, 400, 300, 200, 100, 10 y 1 μ M de isoindolonas.

Técnicas.

Soluciones de Fármacos.

Se prepararon soluciones 1 mM utilizando como disolvente 500 μ L de metanol, las cuales se protegieron de la luz debido a las características físico-químicas de las mismas.

Compuesto	Peso Molecular
C10	286 g/mol
C13	256 g/mol
C16	254 g/mol
C19	270 g/mol

Tabla 1. Pesos moleculares de los cuatro compuestos de isoindolonas probados en este proyecto.

Cuantificación de proliferación celular por incorporación de Cristal Violeta.

Se sembraron 5000 células por pozo de CaCu (CALO e INBL) en placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca), utilizando como medio RPMI-1640 (Microlab, México) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Invitrogen, E.U) al 10 %, 100 μ g/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 25 μ g/mL de anfotericina B a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂, esto para asegurar la supervivencia y crecimiento celular.

Se estimularon las dos líneas celulares de CaCu con los cuatro compuestos de isoindolonas a diferentes concentraciones, las cuales fueron 1, 10 y 100 μ M. El estímulo se realizó a los tiempos de 24 y 48 horas.

Transcurridos los tiempos, se retiró el medio y se fijaron las células con 50 μ L de glutaraldehído (SIGMA, E.U) al 1.1 % durante 10 minutos. Posteriormente se retiró

el glutaraldehído y se lavó con agua bidestilada, evitando desprender las células; se permitió el secado, y se agregaron 200 μ L de una solución de cristal violeta (SIGMA, E.U) al 0.1 %, hasta cubrir completamente a las células por un tiempo de 20 minutos

Se retiró el exceso de colorante con agua bidestilada y, una vez que las placas estuvieron secas, se añadieron 200 μ L de una solución de ácido acético al 10 % durante 20 minutos.

Tras este tiempo se leyó la placa de 96 pozos en un lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a 595 nm.

Las absorbancias obtenidas se graficaron para obtener cinéticas de proliferación celular que facilitaran la evaluación del efecto de las isoindolonas sobre las líneas de CaCu.

Además siguiendo la misma técnica, pero modificando las concentraciones de estímulo de isoindolonas a 1, 10, 100, 200, 300, 400 y 500 μ M, se determinó la IC_{50} .

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y en tres ensayos independientes.

Análisis de proteínas por Western Blot.

- **Extracción de proteínas**

Se sembraron 4×10^6 células de las líneas CALO e INBL en placas Petri de 100x 15 mm en un volumen de final de 5 mL con medio RPMI en las condiciones antes citadas.

Dichas células se estimularon con las isoindolonas C13 y C19, ajustando a las concentraciones de 10 y 100 μM .

Tras 24 horas de estímulo se decantó el medio y las células se lavaron con 1 mL de PBS frío, posteriormente se añadieron 500 μL de buffer de lisis con inhibidores (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH7.5, 1% Tritón X-100, 5 mM EDTA, 10 % aprotonina, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 μM leupeptina, 1 μM pepstatina y 100 μM ortovanadato de sodio).

Los lisados se colocaron en tubos eppendorf y se colocaron en hielo durante 15 minutos, después de este tiempo se centrifugaron en frío a 13000 rpm por 15 minutos.

El sobrenadante se recuperó; y la cantidad de proteínas se cuantificó por el método de Bradford, usando el kit de Bio-Rad Dc Protein Assay.

Se determinó el volumen de proteína requerido para las muestras y se precipitó con el doble de volumen de acetona fría.

Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos, después se desechó el sobrenadante y se permitió evaporar el exceso de acetona a temperatura ambiente.

Se añadieron 100 μ L de buffer de Laemmli 1X (1M Tris pH 6.8, SDS, azul de bromofenol, DTT y glicerol) a cada una de las muestras, y se llevaron a ebullición por 5 minutos.

Posteriormente las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

- **Electroforesis en gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y Transferencia de las proteínas.**

Se preparó un gel de poliacrilamida, el cual consta de un gel concentrador y un gel separador.

El gel concentrador, como su nombre lo indica, concentra las proteínas en el mismo punto de partida antes de la separación electroforética; mientras que el gel separador permite la separación de las proteínas con respecto al peso molecular.

La electroforesis SDS-PAGE se realizó siguiendo el método de Laemmli, sin embargo la concentración empleada en el gel concentrador fue de 4.5 %. Las concentraciones finales en el gel separador fueron 0.375 M Tris-HCl Ph 8.9 (Sigma, E.U) y 0.1 % p/v de SDS (Sigma, E.U); y las concentraciones de acrilamida (Invitrogen, E.U) fueron de 12.5 % y 10 % p/v.

Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05 % p/v de persulfato de amonio (Sigma, E.U) y tetrametilendiamina (TEMED: Sigma, E.U).

El buffer de corrida de pH 8.3 contenía 0.25 M de Tris, 0.192 M de glicina (Invitrogen, E.U). Se utilizaron marcadores de peso molecular (Gibco, E.U) en el rango de 200 a 16 kDa.

Se colocaron 25 μ L de las muestras en los pocillos del gel de poliacrilamida, y se corrieron en una cámara vertical (ATTO, Japón) a los voltajes de 88 A, para la corrida en el gel concentrador, y a 113 A, en la corrida del gel separador.

Las proteína separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa 0.45 μ m (Bio-Rad, E.U) según el método de Kyhse-Andersen en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 130 mA durante 1.5 horas desde el gel de poliacrilamida a dicha membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia.

De acuerdo con el peso molecular de las proteínas AKT (60KD) y ERK (37KD), se cortaron dos trozos de membrana.

Transcurrido el tiempo, las dos membranas de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloquearon con una solución de albúmina bovina en TBS-Tween al 3 % p/v durante toda la noche, en agitación y a 4 °C.

- **Incubación con los anticuerpos.**

Se desecha la solución de bloqueo, y se agrega una nueva solución de albúmina en TBS-Tween al 1 % con el primer anticuerpo durante un tiempo de 2 horas.

Primer Anticuerpo	Concentración	Segundo Anticuerpo	Concentración
anti-pAKT	1:1000	anti-mouse	1:3000
anti-pERK1/2	1:1000	anti-mouse	1:3000

Tabla 2. Anticuerpo utilizado en la primera incubación de las membranas de nitrocelulosa.

Se lavaron las membranas cinco veces por un tiempo de 3 minutos, los primeros tres lavados con una solución de TBS-Tween, y los dos últimos con TBS.

Posteriormente se incubaron las membranas con el segundo anticuerpo en una solución de albúmina al 3 % durante 1h, transcurrido el tiempo se realizaron lavados en la forma antes descrita.

- **Revelado para detección de la señal por bioluminiscencia.**

Procedió la detección de la señal por bioluminiscencia, empleando un kit.

El fundamento de esta técnica reside en que en la bioluminiscencia una enzima aumenta la eficiencia de una reacción quimioluminiscente, oxidando un sustrato específico, y presenta como ventajas su bajo límite de detección y su elevada especificidad y rapidez.⁵³

El anticuerpo secundario se encuentra conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que cataliza la oxidación del luminol o de algunos de sus derivados,

la reacción requiere de un oxidante fuerte, en este caso H_2O_2 , sólo entonces puede detectarse la señal por exposición a una película (autorradiografía), siendo la magnitud de la emisión proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana.^{53,54}

Se colocaron sobre las membranas de nitrocelulosa 550 μ L de luminol (Reactivo A) y 550 μ L de H_2O_2 (Reactivo B) y se agitó durante 5 minutos, tiempo suficiente para efectuar la reacción.

Posteriormente se secó el exceso de los reactivos del kit y se expusieron las membranas a películas de autorradiografía en tiempos de entre 5 minutos y 1 hora en un cassette de revelado en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad.

Finalmente las películas se revelaron, se enjuagaron en agua y se fijaron.

- **Elusión de anticuerpos.**

La técnica se emplea para probar diferentes anticuerpos sobre una misma membrana, para este experimento, se empleó para analizar a las proteínas totales AKT y ERK.

Primer Anticuerpo	Concentración	Segundo Anticuerpo	Concentración
anti-AKT	1:1000	anti-conejo	1:3000
anti-ERK	1:1000	anti-conejo	1:3000

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la segunda incubación de las membranas de nitrocelulosa.

Posteriormente al revelado, se lavan las membranas con TBS, se retira el mismo y se coloca buffer de elusión durante 1 h, éste último sistema se coloca en baño maría con ligero movimiento.

Se lavaron las membranas con TBS-Tween durante 15 minutos con agitación constante, seguido de dos lavados con TBS-Tween de 5 minutos cada uno. Finalmente se realizan tres lavados con TBS de cinco minutos cada uno, y bloquea las membranas con una solución de albúmina en TBS-Tween al 3 % p/v durante toda la noche a 4 °C.

Después de este procedimiento es posible probar otro anticuerpo sobre la membrana, el cual fue anti-AKT y anti-ERK.

RESULTADOS

Cinéticas de proliferación celular con los compuestos de isoindolonas.

Con el fin de evaluar el efecto que poseen los compuestos de estudio en esta investigación, se determinó la proliferación celular de las líneas CALO e INBL tras el estímulo con los compuestos a diferentes concentraciones en tiempos de 24 y 48 horas respectivamente.

- **Línea celular CALO**

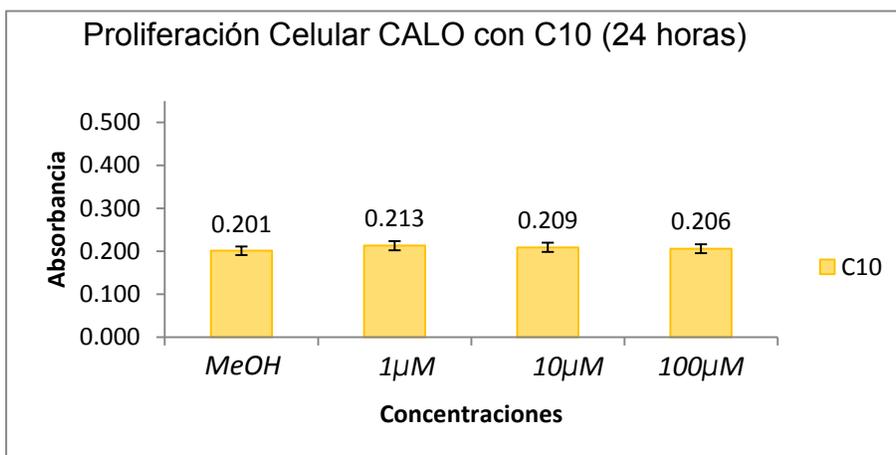


Figura 13. Efecto del compuesto C10 sobre células CALO.

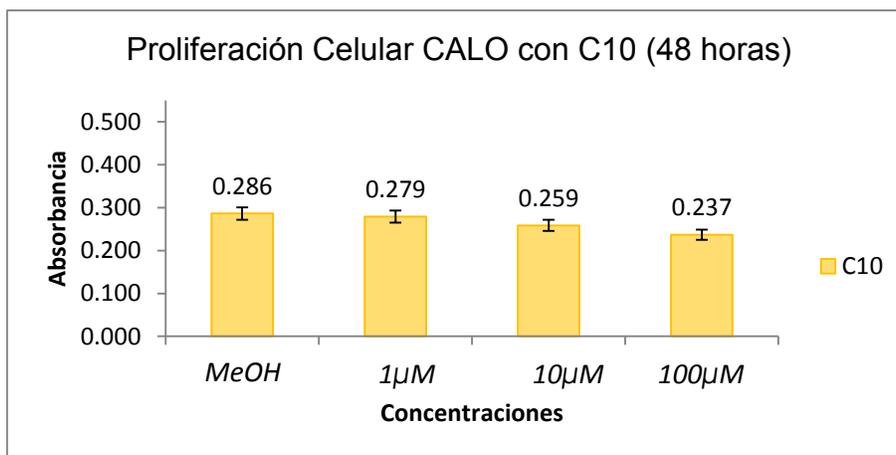


Figura 14. Línea CALO con estímulo C10 tras 48 h.

Se observa que para el compuesto C10 sobre la línea celular CALO, el efecto producido tras 24 horas de estímulo es insignificante aún a concentraciones mayores, tal como 100 μM .

Sin embargo, en el estímulo de 48 horas, el compuesto alcanza una inhibición de la proliferación celular de 17.1 % a concentraciones de 100 μM con respecto al control.

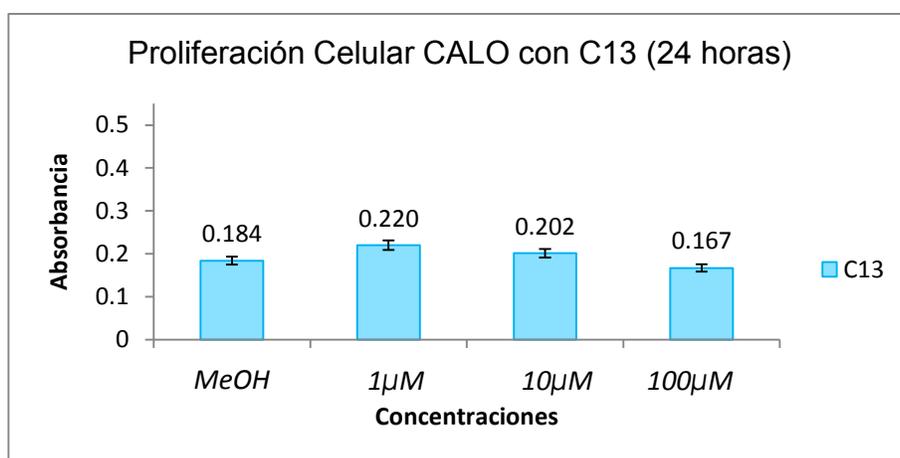


Figura 15. Línea CALO con estímulo C13 durante 24 h.

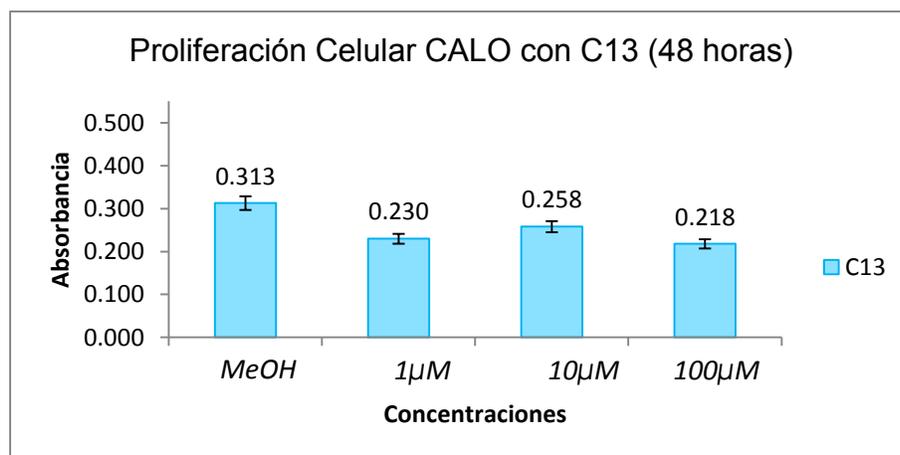


Figura 16. Línea CALO con estímulo C13 durante 48 h.

El efecto del compuesto C13 mostró una inhibición de 30.3 % tras 48 horas de estímulo sobre la línea celular CALO a una concentración de 100 μ M. Pese a que este efecto es el mayor observado en este compuesto, en un tiempo de 24 horas, también se observa una disminución de la proliferación de 9.2 %.

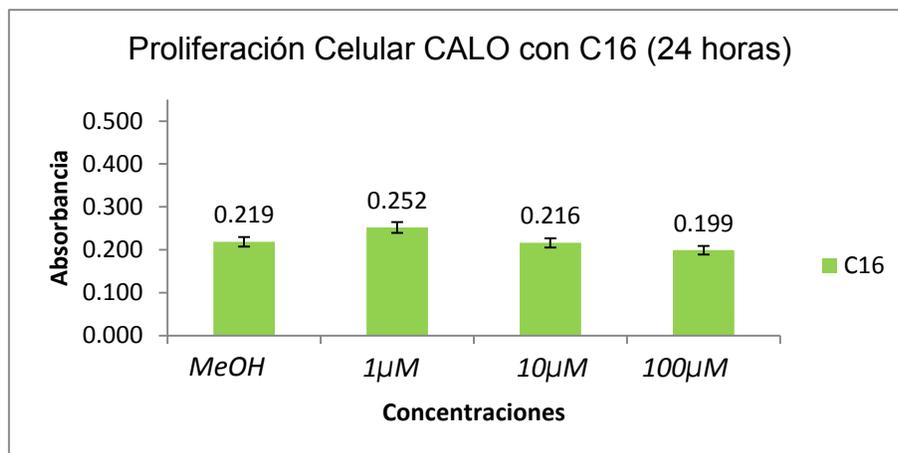


Figura 17. Línea CALO con estímulo C16 durante 24 h.

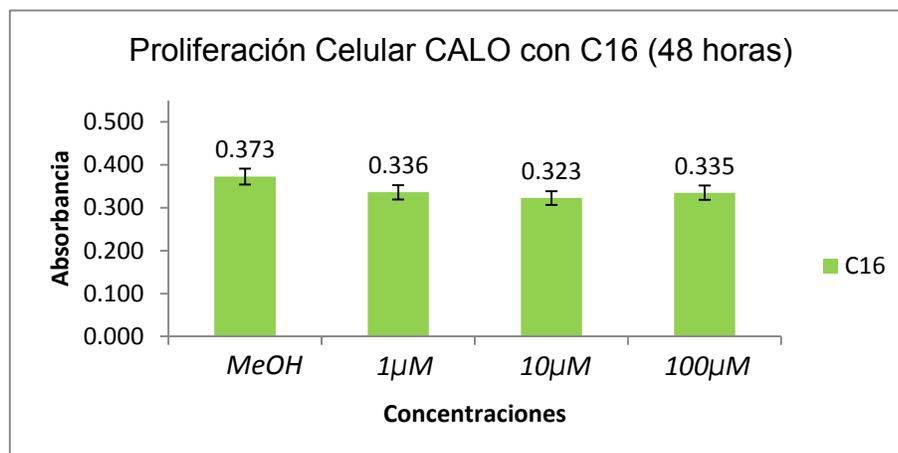


Figura 18. Línea CALO con estímulo C16 durante 48 h.

El compuesto denominado C16 mostró un efecto inhibitorio a una concentración de 100 μM sobre la proliferación de las células CALO en los dos tiempos de estudio, 9.1 y 10.2 % respectivamente.

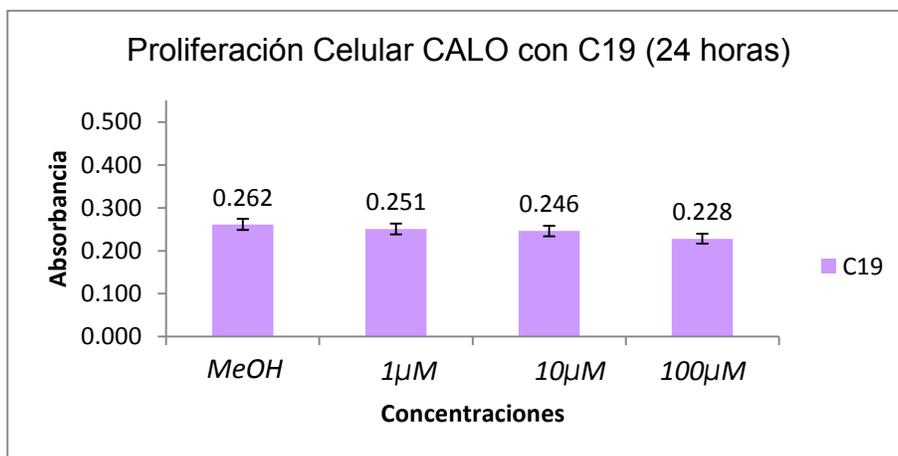


Figura 19. Línea CALO con estímulo C19 durante 24 h.

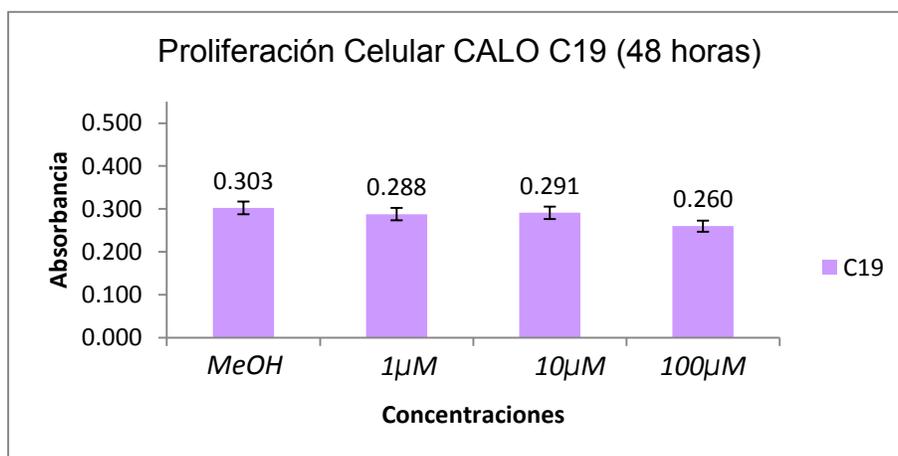


Figura 20. Línea CALO con estímulo C19 durante 48 h.

Al observar el efecto del compuesto C19 sobre la línea CALO, se observa un efecto inhibitorio similar en ambos tiempos, ya que para el tiempo de 24 horas, se reporta 13 %, mientras que para el tiempo de 48 horas 14.1 %.

- **Línea celular INBL**

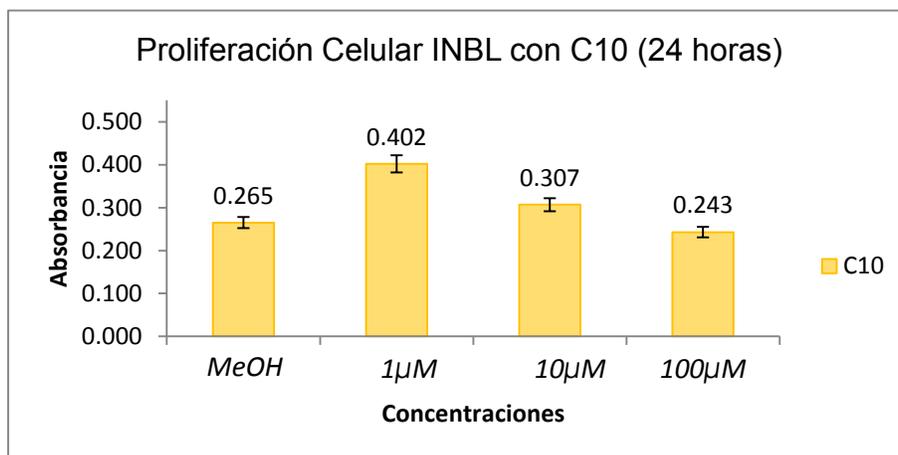


Figura 21. Línea INBL con estímulo C10 durante 24 h.

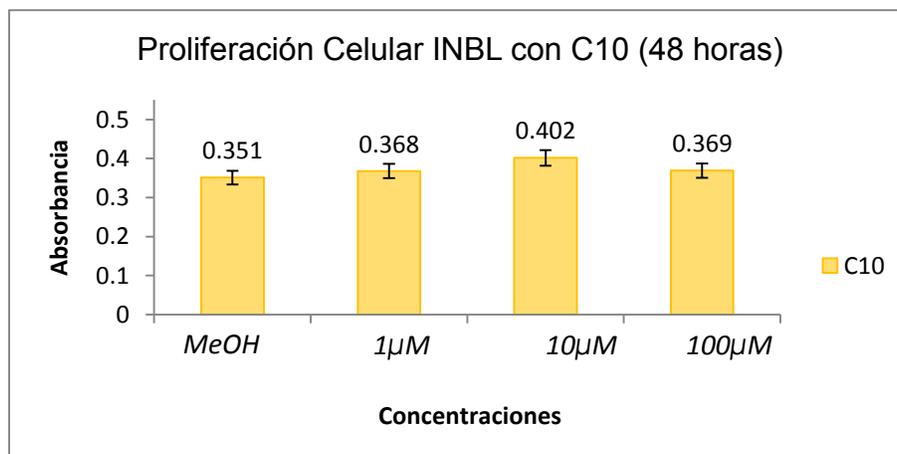


Figura 22. Línea INBL con estímulo C10 durante 48 h.

Cuando se estimuló a la línea celular INBL con el compuesto C10, se observó que no hay un efecto significativo inhibitorio de la proliferación celular. Resalta además

el hecho de que mostró un incremento de la proliferación en ambos tiempos a concentraciones tales como 1 y 10 μM . Este comportamiento y el efecto poco significativo que demostró poseer sobre la línea CALO, eliminaron del seguimiento de estudio a esta molécula.

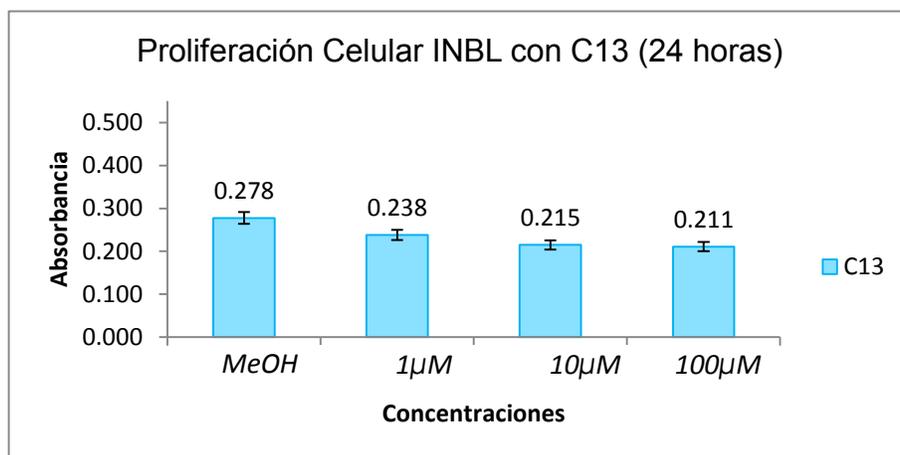


Figura 23. Línea INBL con estímulo C13 durante 24 h.

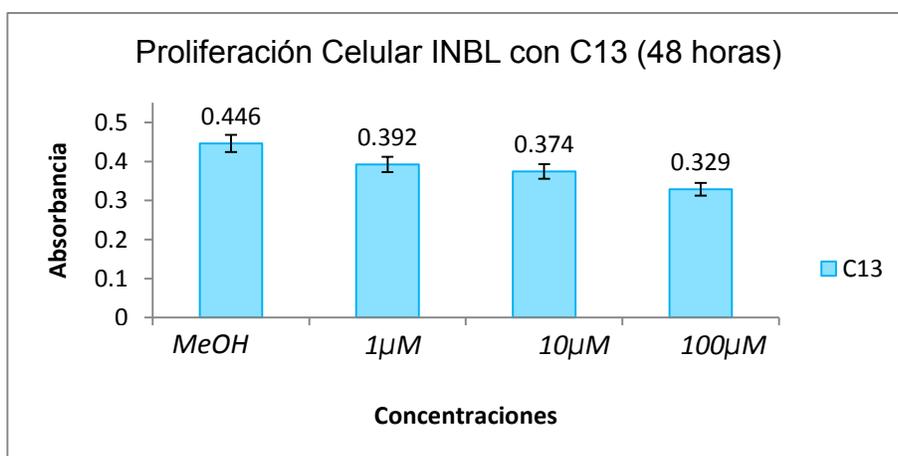


Figura 24. Línea INBL con estímulo C13 durante 48 h.

El comportamiento del compuesto C13 en la línea celular INBL fue inhibitorio en ambos tiempos. El mayor efecto se obtuvo a las concentraciones de 100 μM

respectivamente; para el tiempo de 24 horas se observó una disminución de 24.1 %, y para 48 horas de 26.2 %; aunque el efecto se observa desde la concentración analizada más baja, la cual es de 1 μ M. La molécula continuó estudiándose debido al efecto deseable que demostró tras las cinéticas de proliferación celular de ambas líneas.

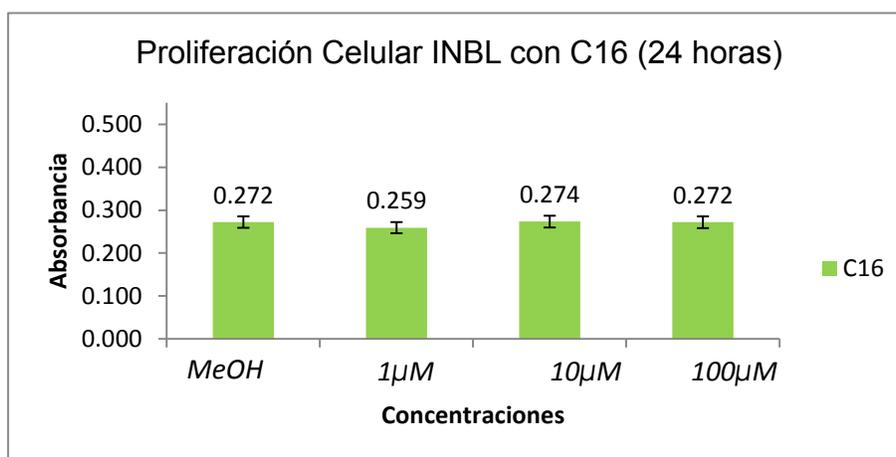


Figura 25. Línea INBL con estímulo C16 durante 24 h.

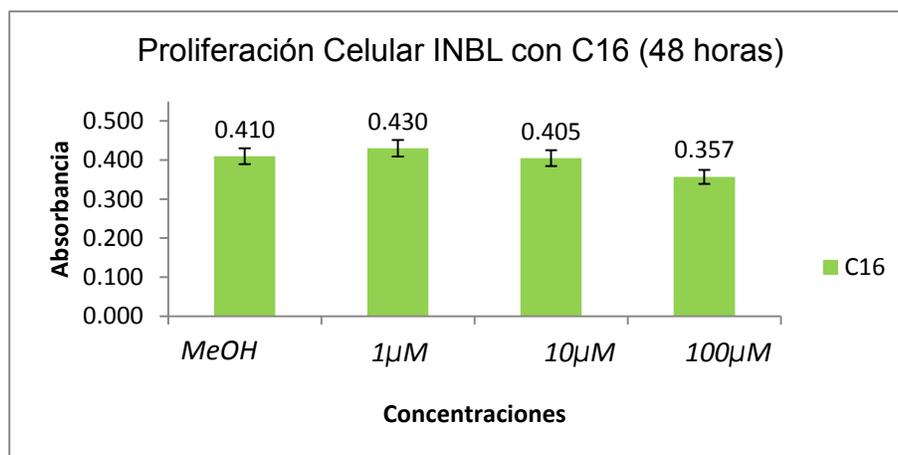


Figura 26. Línea INBL con estímulo C16 durante 48 h.

El compuesto denominado C16, nuevamente no demostró un efecto significativo en la proliferación de la línea INBL, al no variar considerablemente la absorbancia

determinada, por lo que el efecto inhibitorio de esta molécula es bajo y es debido a ello que se descartó el seguimiento de la molécula en el estudio.

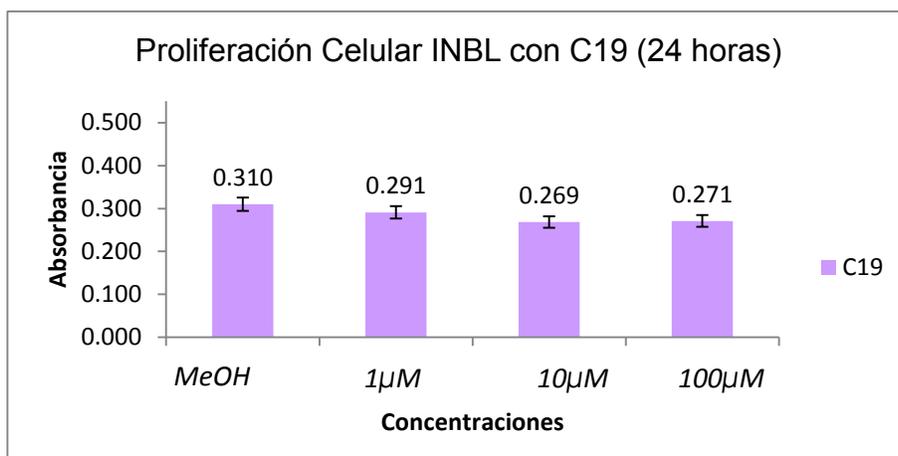


Figura 27. Línea INBL con estímulo C19 durante 24 h.

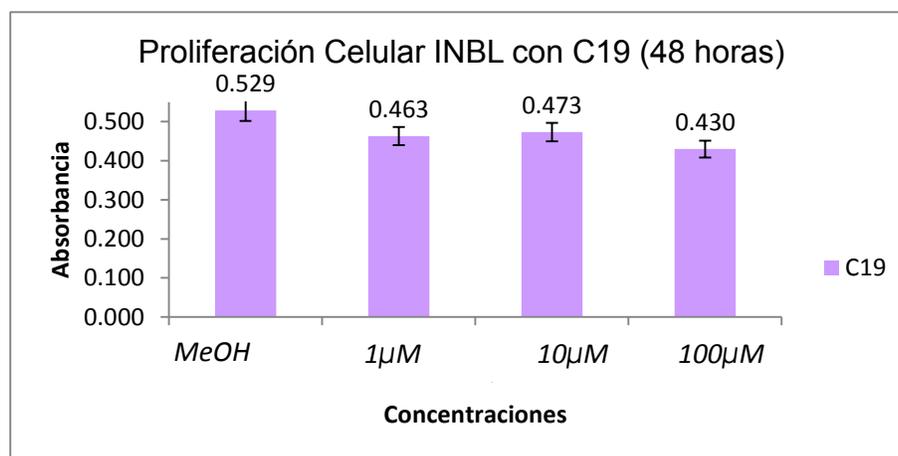


Figura 28. Línea INBL con estímulo C19 durante 48 h.

Finalmente, el compuesto C19 al ser analizado por la técnica de cinética de proliferación celular, mostró un efecto inhibitorio sobre la línea celular, lo cual es similar al comportamiento mostrado en la línea CALO.

En el tiempo de 24 horas se observa una disminución de 12.6 %, mientras que a 48 horas se observa en 19 %. Este compuesto fue el que presentó un mayor efecto inhibitorio en esta línea, pese a que no mostro la misma inhibición sobre la línea CALO, es una molécula de interés pues la línea INBL, es de un estadio más avanzado que la antes mencionada.

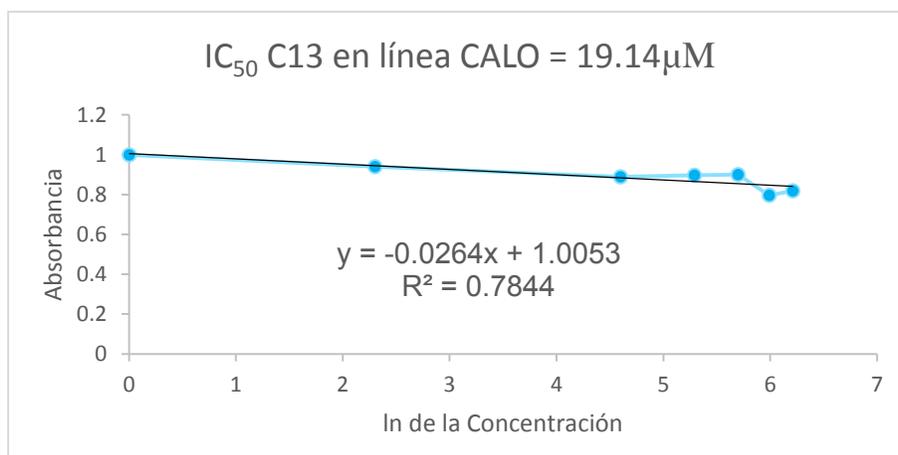
Determinación de IC₅₀ con compuestos de isoindolonas C13 y C19.

Existen varios métodos para la determinación del parámetro IC₅₀. Uno de ellos es mediante la linealización de los datos para obtener la ecuación general de la recta, cuya forma es:

$$y = mx + b$$

Posteriormente se determinó de la IC₅₀ por medio de la siguiente ecuación:

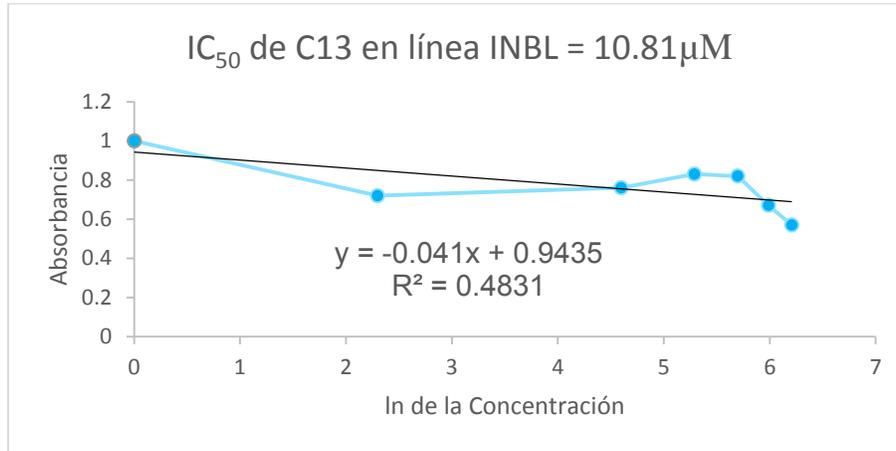
$$IC_{50} = \frac{(0.5 - b)}{m}$$



C13						
1µM	10µM	100µM	200µM	300µM	400µM	500µM
0	2.3	4.6	5.29	5.7	5.99	6.21

1	0.94	0.89	0.897	0.9	0.797	0.819
---	------	------	-------	-----	-------	-------

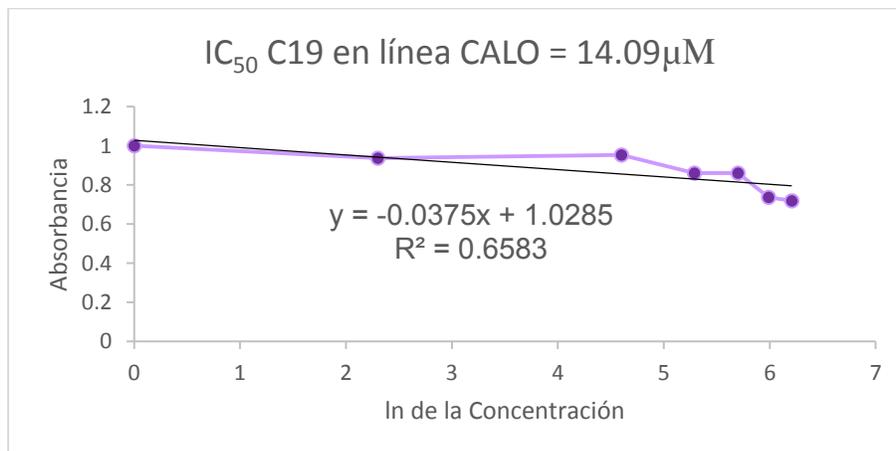
Figura 29. Dispersión lineal del efecto del compuesto C13 sobre CALO



C13						
1μM	10μM	100μM	200μM	300μM	400μM	500μM
0	2.3	4.6	5.29	5.7	5.99	6.21
1	0.72	0.76	0.83	0.82	0.67	0.57

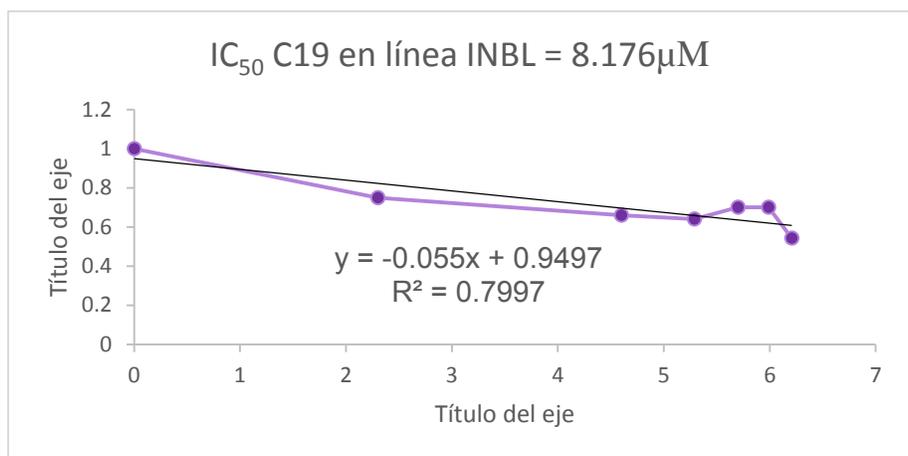
Figura 30. Efecto del compuesto C13 en la línea INBL.

Se observó que la IC₅₀ del compuesto C13 es menor en la línea metastásica INBL, esta indica la concentración máxima a la cual la mitad de la población se muestra inhibida, por lo que su efecto inhibitorio se alcanza en menor concentración.



C19						
1μM	10μM	100μM	200μM	300μM	400μM	500μM
0	2.3	4.6	5.29	5.7	5.99	6.21
1	0.938	0.953	0.861	0.861	0.738	0.72

Figura 31. Efecto del compuesto C19 sobre la línea celular CALO



C19						
1μM	10μM	100μM	200μM	300μM	400μM	500μM
0	2.3	4.6	5.29	5.7	5.99	6.21
1	0.75	0.66	0.64	0.7	0.7	0.543

Figura 32. Efecto del compuesto C19 en INBL.

Para el compuesto C19 la IC₅₀ determinada en la línea INBL fue menor que aquella para la línea CALO, esto indica una mayor sensibilidad de esta línea celular al compuesto de isoindolona.

Controles.

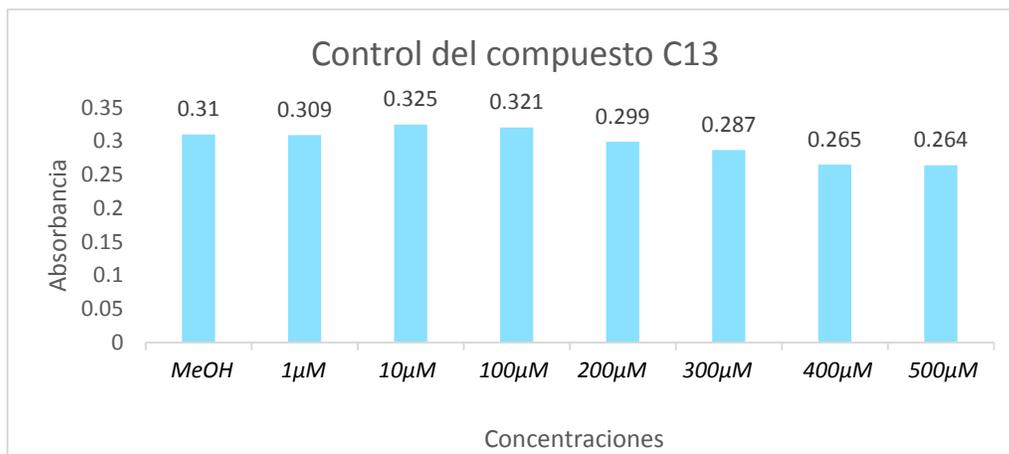


Figura 33. Cinética de Proliferación de Controles (linfocitos) con estímulo de IL-2 y el compuesto C13.

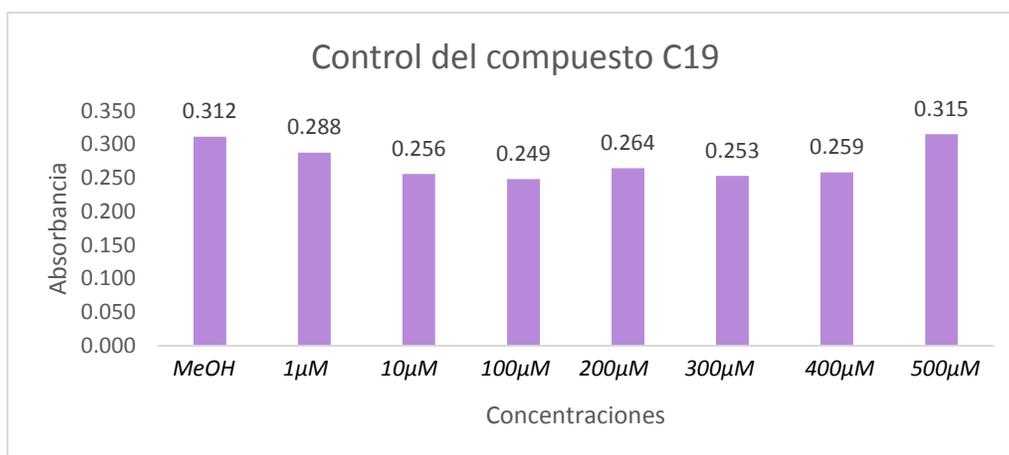


Figura 34. Cinética de Proliferación de Controles (linfocitos) con estímulo de IL-2 y el compuesto C14.

El efecto de los compuestos de isoindolonas que mostraron mayor actividad inhibitoria en la proliferación de células de CaCu, al probarse sobre células normales o control, tal como los linfocitos, parecen no afectar significativamente la

proliferación en comparación con las líneas de carcinoma estudiadas en este experimento.

Para el compuesto C13 en el rango en el que se encuentra la IC_{50} , el efecto sobre las células control no inhibe la proliferación celular.

Sin embargo, el compuesto C19 afecta la proliferación de estas células en las concentraciones entre 10 y 100 μM .

Análisis proteico por Western Blot.

La técnica de Western Blot permite el análisis y detección de proteínas provenientes de una muestra biológica compleja, separándolas de acuerdo a su peso molecular, detectándolas mediante anticuerpos que las reconocen de manera específica.

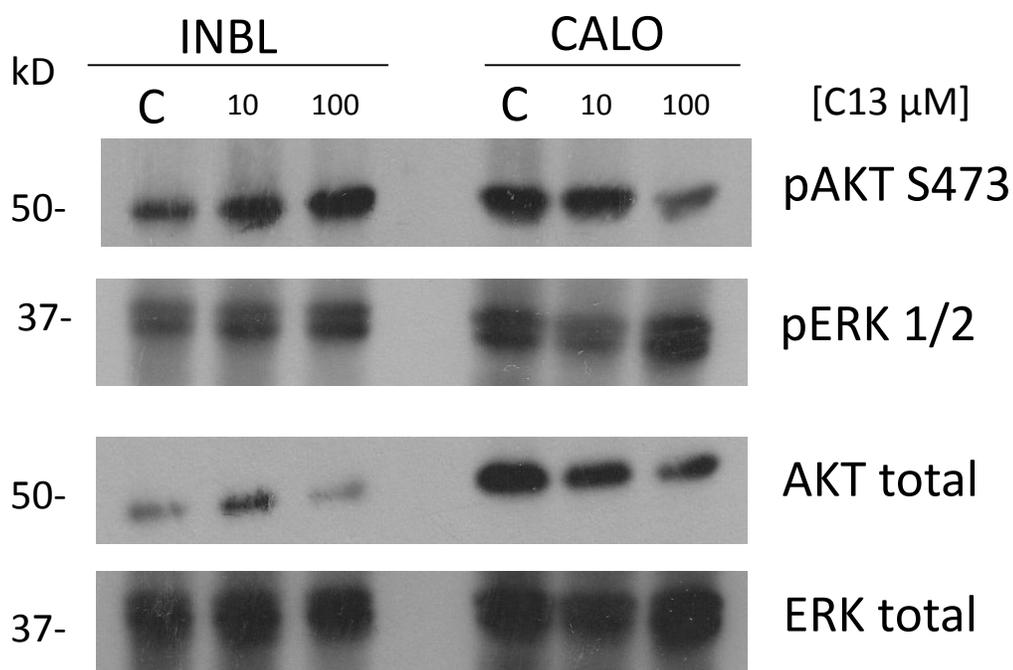


Figura 35. Western Blot contra pAKT/AKT y pERK/ERK para analizar el efecto del compuesto isoindolona C13 sobre células CALO e INBL tras 24 horas de incubación.

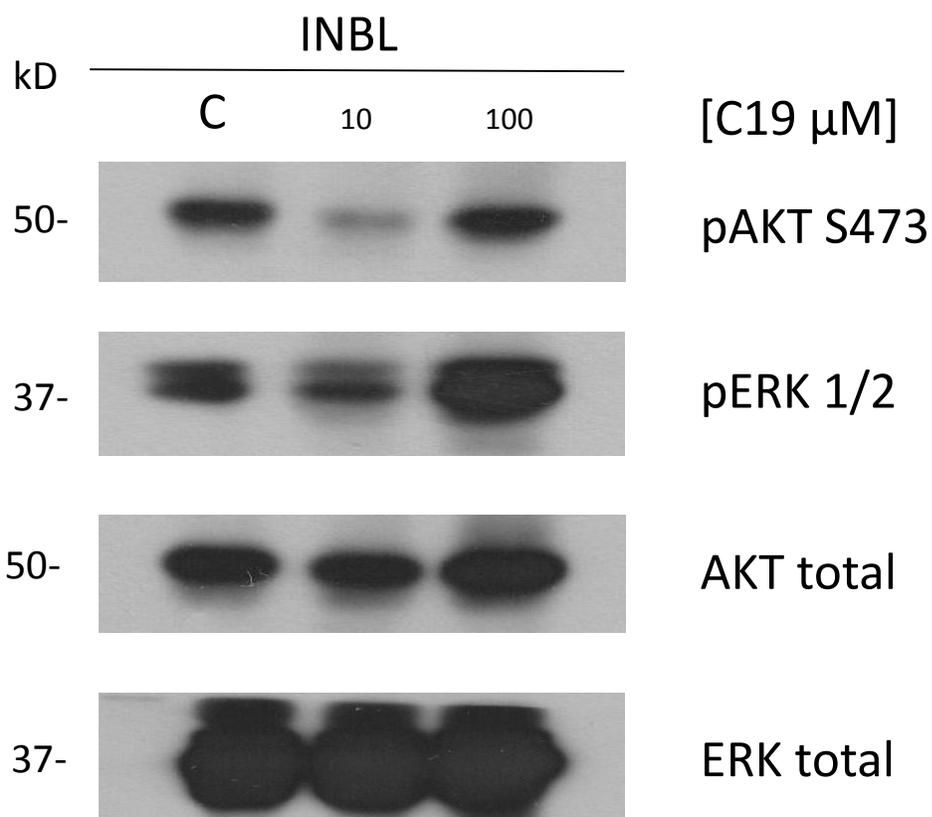


Figura 36. Western Blot contra pAKT/AKT y pERK/ERK para analizar el efecto del compuesto isoindolona C19 sobre células INBL incubadas por 24 horas con el compuesto C19.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que las isoindolonas son compuestos que poseen un amplia gama de actividades farmacológicas,^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14} destacando para esta investigación su actividad antiviral y antitumoral.

Las cinéticas de proliferación celular, como se había descrito con anterioridad, proporcionan una idea del efecto que posee una molécula sobre dicho comportamiento ya que puede alterar el valor de absorbancia esperada tras un análisis fotométrico, después de estimular a las células con el correspondiente fármaco.

Al estudiar las cinéticas de proliferación de las células CALO e INBL tras el estímulo con los cuatro compuestos de esta investigación, se observa que el mayor efecto de las moléculas se alcanza en el tiempo de 48 horas, ya que se observa una disminución de la absorbancia, lo cual indica una inhibición en la proliferación celular.

Sin embargo, el efecto inhibitorio de las isoindolonas sobre estas líneas celulares de CaCu, no es tan significativo como el alcanzado por otras sustancias tales como la camptotecina, el cual es un agente inductor de apoptosis con gran eficacia que utiliza concentraciones efectivas entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁵⁵, mientras que la isoindolona C13 ejerce su efecto entre los 2.76 y 4.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$; y el compuesto C19 en el rango de 2.21 y 3.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el análisis por Western Blot realizado a partir de la incubación con el compuesto isoindolona C13, sobre las líneas CALO e INBL, se observa un comportamiento diferente en la activación y expresión de AKT y ERK, proteínas relevantes en el proceso de proliferación y supervivencia celular.

La proteína ERK es un miembro de la familia de las MAPK, la cual se transloca al núcleo generalmente para dar lugar a la expresión de genes involucrados en la proliferación.⁴⁴

Por otro lado, la proteína AKT es una proteína que posee tres isoformas; como muchas proteínas interactúa con otras para dar distintas respuestas de activación o inhibición entre respuestas celulares de supervivencia, angiogénesis, crecimiento, proliferación, etcétera.⁵⁶

Para fines de esta investigación y con el efecto observado de la isoindolona C13 sobre la proliferación celular, se evaluó el efecto de la isoindolona C19 sobre las células INBL, dado que es una línea celular de estadio IVB de CaCu de tipo metastásico, y por lo tanto representa un riesgo mayor a la población en comparación con la línea CALO.

En la línea CALO, se observa que al aumentar la concentración de estímulo de la isoindolona C13, disminuye la fosforilación en la proteína AKT, a la vez que se aumenta la fosforilación en la proteína ERK. Estos resultados demuestran que de manera basal, se observa una mayor fosforilación en la proteína AKT que en la proteína ERK.

Interesantemente, en la línea celular INBL se observa que al aumentar la concentración de estímulo con el compuesto C13, se favorece la fosforilación de la proteína AKT en S473, mientras que la fosforilación de la proteína ERK, no muestra alteración.

La expresión de AKT1 se ve aumentada en la condición experimental de 10 μM de C13, y parece ser que disminuye dicha expresión a la concentración de 100 μM cuando se le compara con el control. Lo cual sugiere que el compuesto C13 tiene efecto no solo a nivel de la activación de AKT, sino también a nivel de la expresión de la cinasa. Se requieren más experimentos para elucidar si el comportamiento molecular de AKT observado en este proyecto correlaciona de manera directa con la disminución de la proliferación celular de INBL.

Por otro lado el efecto de C13 sobre AKT y ERK en la línea celular CALO parece ser un poco más prototípico, ya que la incubación con C13 disminuye los niveles de pERK y pAKT a 10 y 100 μM respectivamente. También se aprecia una disminución en la expresión de AKT aunque no tan marcada como la observada en INBL. Errores en la manipulación de la muestra son descartados ya que la expresión de ERK, utilizada como control de carga, permanece inalterada.

Se ha descrito que comúnmente la señalización extracelular resulta en la activación simultánea de las vías PI3K/AKT y las MAPK debido a la proteína c-Ras.⁵⁷

Sin embargo se ha reportado que la isoforma, AKT1, posee un efecto regulatorio cruzado sobre la proteína ERK;⁵⁶ dicho efecto es observado en la estimulación del compuesto C13 sobre las líneas celulares.

Se ha propuesto que AKT posee grados o matices de activación de acuerdo a las fosforilaciones que experimente con otras proteínas (las más conocidas son PDK1 (T308) y mTORC2 (S473)), y que esto se traduce en cambios de afinidad de AKT por diferentes sustratos.⁵⁸

AKT bloquea la señalización de ERK, a través de la inhibición de la proteína c-Raf, un miembro de las MAPK.⁵⁶

En estado basal c-Raf se encuentra regulado debido a la unión de dos proteínas 14-3-3 en los residuos de fosfotreonina 259 y 621 (T259, T621). Una vez que se forma el complejo Ras-GTP e interactúa con el N-terminal de c-Raf se induce un cambio conformacional en c-Raf, que rompe la asociación entre este último con las proteínas 14-3-3, por lo que se induce su activación.⁵⁹

Sin embargo, AKT puede fosforilar directamente a c-Raf en la Treonina 259 (T259), y esto conduce a un efecto inhibitorio sobre la señalización de ERK.⁵⁶

Denotando el aumento en la fosforilación de ERK 1/2 en la línea celular CALO, se conoce que dicha vía induce supervivencia y proliferación celular, sin embargo, también se ha reportado que en su activación dependiendo del tipo y contexto celular, la vía de las MAPK puede promover el arresto del ciclo celular en fase G1.^{58,60}

Por lo que el efecto de disminución de la proliferación celular de CALO por el compuesto C13, puede deberse a un arresto de las células en el ciclo celular en dicha fase.

Posiblemente la línea INBL posea diferencias en la transducción de señales a nivel de la activación de mTORC2 que impiden ver un efecto de disminución sobre la actividad de AKT, similar al de la línea CALO. Asimismo es posible que en esta línea celular no exista una comunicación cruzada antagónica de las vías de AKT y ERK.

En la estimulación de la línea INBL con compuesto C19, se observa un aumento en la fosforilación de las proteínas AKT y ERK a 100 μ M, no obstante, también se observa una disminución en la fosforilación de la proteína AKT y ERK a 10 μ M, mientras que la expresión de ambas proteínas permanece inalterada.

Al observar que el mayor efecto inhibitorio sobre las proteínas antes mencionadas se alcanza a una concentración de 10 μ M, se sugiere que el compuesto C19 posee propiedades farmacológicas con mayor potencial que el compuesto C13. No obstante es importante destacar que es necesario realizar más ensayos con este compuesto sobre la misma línea celular.

CONCLUSIÓN

Dos de los cuatro compuestos de isoindolonas iniciales de esta investigación, mostraron un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de manera consistente y significativa, los cuales se nombraron para fines prácticos de esta investigación como los compuestos C13 y C19.

El compuesto C13 inhibió en un 30.3 % la proliferación celular de la línea CALO, mientras que en la línea INBL, su efecto fue del 26.2 %, con un rango de concentración efectiva entre 2.76 y 4.89 $\mu\text{g/mL}$.

A nivel molecular se observó que pese a que ambas líneas celulares de estudio son de CaCu, se comportan de manera distinta. Para la línea CALO, la incubación con el compuesto C13, condujo a un aumento en la fosforilación de la proteína ERK 1/2, y una disminución de la fosforilación de la proteína AKT. Este comportamiento puede deberse a una regulación de comunicación cruzada de tipo inhibitorio, que finalmente podría significar un arresto en el ciclo celular.

En la línea INBL, el comportamiento a nivel molecular es distinto en cuanto a la transducción de señales, fenómeno que impide ver un efecto de disminución sobre la actividad de AKT similar al de la línea CALO. Por lo que el efecto inhibitorio en la proliferación celular sobre esta línea tras la estimulación con el compuesto C13 se debe a mecanismos y vías diferentes a las antes mencionadas.

El compuesto de isoindolona C19, mostró una inhibición en la proliferación celular del 14.1 y 19 % sobre las líneas CALO e INBL respectivamente, con concentraciones efectivas de entre 2.21 y 3.81 $\mu\text{g/mL}$.

En el análisis por Western Blot del compuesto C19 sobre la línea INBL, se observó que la fosforilación en la proteína AKT disminuye y la fosforilación sobre ERK aumenta de manera significativa en un estímulo de concentración bajo de 10 μM , por lo que parece ejercer un mecanismo de regulación de comunicación cruzada de tipo inhibitorio entre estas proteínas que podría traducirse en arresto del ciclo celular.

PERSPECTIVAS

Debido a que el análisis proteico por Western Blot de las líneas celulares CALO e INBL tras la estimulación con los compuestos de investigación de isoindolonas, mostró en la mayoría de los casos un efecto regulatorio cruzado de tipo inhibitorio entre las proteínas AKT/ERK, que sugiere un arresto en el ciclo celular en fase G1, por tanto se propone realizar un análisis del ciclo celular para comprobar esta nueva hipótesis.

Interesantemente, las moléculas que mostraron tener mayores efectos inhibitorios de la proliferación celular poseen una estructura química muy similar, ya que difieren únicamente en el grupo pirrol, pues en una molécula se encuentra un doble enlace o insaturación, y en la otra se encuentra la saturación. Es por ello que estas moléculas podrían servir como base en el diseño de nuevos fármacos de isoindolonas que sean capaces de inhibir la proliferación celular de células de CaCu, con mayor eficacia.

REFERENCIAS

1. INEGI [internet]. Aguascalientes: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2013 [actualizado Enero 2013; acceso 24 febrero 2014]. Disponible en: <https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.inegi.org.mx%2Finegi%2Fcontenidos%2Fespanol%2Fprensa%2FContenidos%2Festadisticas%2F2013%2Fcancer0.doc&ei=pzAMU4GzGenA2AWWilCgAw&usq=AFQjCNG3m4uSAhxHvRvZqHduZFDphhj3Q&bvm=bv.61725948,d.b2l>
2. OMS [internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1946 [actualizado 2013; acceso 28 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. NCI [internet]. E.U: Instituto Nacional del Cáncer; 1937 [actualizado 25 de Abril 2012; acceso 26 de Mayo 2014]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol>
4. Yaoxian W, Hui Y, Yunyan Z, Yanqin L, Xin G, Xiaoke W. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer Cell International* [Internet]. 2013 [acceso 26 Mayo 2014]. Disponible en: doi: 10.1186/1475-2867-13-71.
5. Aguilera CA. Síntesis de isoindolonas con potencial actividad relajante sobre músculo liso [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2012.
6. Khazak V, Golemis EA, Menon S, Weber L, inventors. Fox Chase Cancer Center, assignee. Isoindolone compounds, compositions containing the same, and methods of use thereof for the treatment of viral infections related to the etiology of cancer. US patent 7,705,021 B2. 2010 Apr 27.
7. Wang X, Salaski E, Berger DM, Powell D, Hu Y, Wojciechowicz D [et al.] Structure-based design of isoindoline-1,3-diones and 2,3-dihydroptalazine-1,4-diones as novel B-Raf inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [Internet]. 2011 [acceso 25 octubre 2013]. Disponible en: doi:10.1016/j.bmcl.2011.20.012
8. Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, Li D, Gu Q. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry* [Internet]. 2011 [acceso 20 Abril 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.014>

9. Chung CP, Hsu CY, Lin JH, Kuo YH, Chiang W, Lin YL. Antiproliferative lactams and spiroenone from adlay bran in human breast cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Internet]. 2011 [acceso 20 Abril 2014]. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf104088x>
10. Reyes A, Huerta L, Alfaro M, Navarrete A. Synthesis and Nootropic Activity of Some 2,3-Dihydro-1*H*-isoindol-1-one Derivatives Structurally Related with Piracetam. *Chemistry and Biodiversity* [Internet]. 2010 [acceso 20 Abril 2014]. Disponible en: DOI: 10.1002/cbdv.200900269
11. Trabanco AA, Cid JM, Lavreysen H, Macdonald GJ, Tresadern G. Progress in the development of positive allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor 2. *Current Medicinal Chem.* 2011; 18(1):47-68
12. Favor DA, Powers JJ, White AD, Fitzgerald LW, Groppi V, Serpa KA. 6-Alkoxyisoindolin-1-one based dopamine D2 partial agonists as potential antipsychotics. *Bioorg Med Chemistry Letters.* 2010; 20(19): 5666-9
13. Suzuki G, Satow A, Ohta H. Effect of CFMTI, an allosteric metabotropic glutamate receptor 1 antagonist with antipsychotic activity, on Fos expression in regions of the brain related to schizophrenia. *Neuroscience.* 2010; 168(3): 787-96
14. Hikichi H, Nishino M, Fukushima M, Satow A, Maehara S, Kawamoto H, Ohta H. Pharmacological effects of metabotropic glutamate receptor ligands on prepulse inhibition in DBA/2J mice. *European Journal of Pharmacology* [Internet]. 2010 [acceso 20 Abril 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.046>
15. Balbás P. De la biología molecular a la biotecnología. México: Trillas; 2010. p. 75
16. Valle MA, Weiss SB. Origen molecular del cáncer. *VERTIENTES.* 2003; 6(1):3-8
17. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang y Dale: Farmacología. Barcelona: Elsevier; 2008: 72-86
18. Reed JC, Green DR. Apoptosis: physiological and pathology. Cambridge: Cambridge University Press; 2011: 1
19. Potten C, Wilson J. Apoptosis: the life and death of cells. New York: Cambridge University Press; 2005
20. Dávila GHL, García VA, Álvarez CF. Cáncer de cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.* 2010; 36(4):603-612

21. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [Internet]. México: INEGI; 1983 [2011; 09 enero 2014]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?c=2781&ep=51>
22. Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, Lazcano PE, Herrero R. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud Pública de México*. 2010; 52:544-559
23. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, Creatsas G. HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* [Internet]. 2013 [acceso 28 agosto 2013]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/540850>
24. Ishii Y, Nakahara T, Kataoka M, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Takeuchi T, Kukimoto I. Identification of TRAPPC8 as a Host Factor Required for Human Papillomavirus Cell Entry. *PLOS ONE* [Internet]. 2013 [acceso 03 febrero 2014]. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0080297
25. Banik U, Uddin AMS, Rahman Z. High risk human papillomavirus type 16 and 18 infection in the cervical lesions of women with epithelial cell abnormality in Pap smear: A cytohistomorphologic association in Bangladeshi women. *Cytojournal* [Internet]. 2013; 10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748631/?report=reader>
26. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *BioMed Research International* [Internet]. 2013 [acceso 09 enero 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519619>
27. Niebler M, Qian X, Höfler D, Kogosov V, Kaewprag J, Kaufmann A, Ly R, Böhmer G, Zawatzky R, Rösl F, Rincon-Orozco B. Post-Translational Control of IL-1b via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 [acceso 28 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.plospathogens.org/article/fetchObject.action?uri=info%3AAdoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1003536&representation=PDF>
28. Álvarez AA, Sepúlveda AJ, Siller LF. Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *Investigaciones ANDINA (Colombia)*. 2012; 14(24): 438-456
29. Kajitani N, Satsuka A, Yoshida S, Sakai H. HPV18 E1^E4 is assembled into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins.

Frontiers in Microbiology [Internet]. 2013 [acceso 03 Febrero 2014]. Disponible en: doi: 10.3389/fmicb.2013.00251

30. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *Journal of Virology*. 2002; 76(1):220–231.

31. Siegel R, Naishadham D, Jema A. Cancer Statistics for Hispanics/Latinos, 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians [Internet]. 2012 [acceso 28 agosto 2013]. Disponible en: doi: 10.3322/caac.21153.

32. Deluca G, Basiletti J, González JV, Díaz-Vásquez N, Lucero RH, Picconi MA. Human papillomavirus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from northern Argentina. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 2012; 72(6): 461-466

33. Zhang B, Zhou AF, Zhu CC, Zhang L, Xiang B, Chen Z, Hu RH, Zhang YQ, Qiu L, Zhang YM, Xiong CD, Du YK, Shi YQ. Risk Factors for Cervical Cancer in Rural Areas of Wuhan China: a Matched Case-control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (Korea)*. 2013; 14(12): 7595-600

34. Kumar RV, Bhasker S. Potential opportunities to reduce cervical cancer by addressing risk factors other than HPV [Internet]. 2013 [acceso 04 Febrero 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3802/jgo.2013.24.4.295>

35. McCormick C, Giuntoli R. Patient's guide to cervical cancer. EU: The Johns Hopkins University; 2011

36. Gutiérrez-Delgado C, Báez-Mendoza C, González-Pier E, Prieto DA, Witlen R. Relación costo-efectividad de las intervenciones preventivas contra el cáncer cervical en mujeres mexicanas. *Salud pública Méx (México)*. 2008; 50(2): 107-118

37. MedlinePlus [base de datos en línea]. E.U: NIH; 1998. [acceso 26 de Mayo 2014]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/007436.htm>

38. Rodríguez MI, Valdés YC, Proveyer DS. Citostáticos: medicamentos riesgosos. *Rev cubana med (Cuba)*. 2004; 43(2-3).

39. Cabrera BS. Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex (México)*. 2006; 19(1): 53-61

40. Ramos RY, Hernández CC. Avances recientes en la determinación analítica del cisplatino y sus productos de hidrólisis. *Revista CENIC Ciencias Químicas (Cuba)*. 2009; 40(1): 3-10

41. Bookman M, Malmström H, Bolis G, Gordon A, Lissoni A, Krebs J, Fields S. Topotecan for the Treatment of Advanced Epithelial Ovarian Cancer: An Open-Label Phase II Study in Patients Treated After Prior Chemotherapy That Contained Cisplatin or Carboplatin and Paclitaxel. *Journal of Clinical Oncology (EU)*. 1998; 16(10): 3345-3352
42. Yu L, Zhao Y, Quan C, Ji W, Zhu J, Huang Y, Guan R, Sun D, Jin Y, Meng X, Zhang C, Yu Y, Bai J, Sun W, Fu S. Gemcitabine eliminates double minute chromosomes from human ovarian cancer cells. *PLOS ONE* [Internet]. 2013 [acceso 11 Febrero 2014]. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0071988
43. Díaz PF, Barasoain BI. Estudio y caracterización del mecanismo de acción bioquímico y celular de compuestos antitumorales dirigidos contra el citoesqueleto [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas; 2013
44. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors [Internet]. 2013 [acceso 18 Marzo 2014]. Disponible en: DOI: 10.1177/1947601913507951
45. Valle-Mendiola, Weiss-Steider B, Rocha-Zavaleta L. Soto-Cruz I. IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Investigation* [Internet]. 2014 [acceso 06 Febrero 2014]. Disponible en: DOI: 10.3109/07357907.2014.883526
46. Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I. Vía JAK-STAT: una visión general. *VERTIENTES*. 2005; 8(1-2): 14-25
47. Reich NC. STATs get their move on. *Landes Bioscience* [Internet]. 2013 [acceso 01 Abril 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4161/jkst.27080>
48. Celorio JA, Calero F, Armas A. Fundamentos de oncología ginecológica. Madrid: Díaz de Santos, S.A.; 1986: 24-25
49. Blomen VA, Boonstra J. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(23): 3084-104
50. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, et al. Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth Factor in Cervical Cancers and Leukemias. *Cancer Research (USA)*. 2001; 61: 6281-6289

51. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5^a ed. New York: Garland Science; 2008
52. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, et al. Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth Factor in Cervical Cancers and Leukemias. *Cancer Research (USA)*. 2001; 61: 6281-6289
53. Fuentes AX, Castiñeiras LM, Queraltó CJ. Bioquímica clínica y patología molecular. 2a ed. Barcelona: Reverté, S. A.; 1998: 252-253
54. Morchón GR. Mecanismos celulares y moleculares de la patología vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar. El papel de las filarias y de los endosimbiontes del género *Wolbachia* [Tesis]. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2009.
55. Li LH, Fraser TJ, Olin EJ, Bhuyan BK. Action of camptothecin on mammalian cells in culture. *Cancer Research (USA)*. 1972; 32(12): 2643-50
56. Manning B, Cantley L. Akt/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell (USA)*. 2007;129(7):1261-74.
57. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nuñez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science (USA)*. 1999; 286(5445):1738-41
58. Chen XG, Liu F, Song XF, Wang ZH, Dong ZQ, Hu ZQ, Lan RZ, Guan W, Zhou TG, Xu XM, Lei H, Ye ZQ, Peng EJ, Du LH, Zhuang QY. Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. [Internet]. 2010 [acceso 21 Septiembre 2014]. Disponible en: DOI: 10.1002/mc.20628
59. Lodish H [et al]. Biología Celular y Molecular. 5^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006: 594
60. Park JI. Growth arrest signaling of the Raf/MEK/ERK pathway in cancer. *Frontiers in Biology (Beijing)*. 2014; 9(2):95-103.