



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, CITOTÓXICA Y APOPTÓTICA DEL COMPUESTO METIL (R, R)-3,3'-DITIOBIS{2-[2''-(3''',4'''-DIHIDROXIFENIL) ACETAMIDO] PROPANATO} (AZ-481B) SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA, PRÓSTATA Y PULMÓN, ASÍ COMO EN CULTIVOS NO TUMORALES.

TESIS DE LICENCIATURA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JOSÉ EMMANUEL CRUZ BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ



MÉXICO, D.F. 2016



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 **CRUZ BAUTISTA JOSÉ EMMANUEL**, con número de cuenta **309046213**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de mayo de 2016** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

Maria Lourdes Mora G.

VOCAL Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

Hugo Lopez Muñoz

SECRETARIO M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Luis Sanchez Sanchez

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

José Misael Vicente Hernández Vázquez

SUPLENTE M. en C. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

Yolanda Cordova G.

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de la actividad antiproliferativa citotóxica y apoptótica del compuesto Metil (R,R)-3,3'-Dithiobis{2-[2''-(3''',4''-Dihidroxifenil)Acetamido]Propanato} (AZ-481B) sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata y pulmón, así como en cultivos no tumorales.**

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 04 de mayo de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



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

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

*A todas las personas a quienes admiro y amo
por su esfuerzo y dedicación en todo momento.*

*A todos mis amigos, por lo que me aportan todos los días y que queda
gravado en la memoria del corazón.*

*A Angélica Suarez, Ma. Emilia Volazco S, Viridiana Rodríguez L,
quienes día a día me hacen tener presente que, los grandes momentos
en la vida van íntimamente ligados al recuerdo de personas que hacen
especial el paso del tiempo.*

A F.D.A.S por estar en el momento precisó.

AGRADECIMIENTOS

De primera instancia agradezco al **Dr. Hugo López**, por su dirección en este trabajo de tesis, ya que con sus conocimientos, interrogantes, dedicación y experiencia me ayudaron a disipar muchas dudas. Y con ello, brindarme parte de lo necesario para construir un peldaño más en mi formación profesional.

Al **M. en C. Luis Sánchez**, por sus enseñanzas y brindarme todo lo necesario para construir un peldaño más en la escalera de mi formación profesional.

Al **M. en C. Vicente Hernández Vázquez**, porque su enseñanza fue fundamental en mi aprendizaje.

A la **Dra. Ma. De Lourdes Mora García** y a la **M. en C. Yolanda Cordova Galaviz**, por sus aportaciones y observaciones a este trabajo.

La tesis fue realizada con apoyo de los proyectos PAPIIT IN220916 y PAPIIT IN222114 y de los proyectos CONACyT 255881 y CONACyT 253979.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucléico

APE: Antígeno prostático específico

ATP: Adenosintrifosfato

Az-481b: compuesto fenólico derivado del HT

CDK: Cinasas dependientes de ciclina

CF: Contraste de fases

CFSE: Carboxifluoresceína

DAPI: marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN.

DCIS: Carcinoma ductal *in situ*

E2F: Factor de transcripción

HBP: Hiperplasia benigna de próstata

HT: Hidroxitirosol

IDC: Carcinoma ductal invasivo

ILC: Carcinoma lobulillar invasivo

IMSS: Instituto Mexicano de Seguro Social

LDH: Lactato deshidrogenasa

MeOH: Metanol

NSCLC: Carcinoma pulmonar de células no pequeñas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución salina de fosfatos

PIN: Neoplasia intraepitelial prostática

RB: Proteína del rinoblastoma

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RTU: Resección transuretral

SCLC: Carcinoma de células pequeñas

SFB: Suero fetal bovino

STN: Suero de ternera neonata

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	
• Ciclo celular	9
• Muerte celular	12
○ Apoptosis	12
○ Necrosis	16
• Cáncer	18
○ Cáncer de mama	20
○ Cáncer de próstata	25
○ Cáncer de pulmón	28
○ Tratamientos	32
• Péptidos fenólicos	34
○ Actividad antitumoral	35
○ Az-481b	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
JUSTIFICACIÓN	39
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
APÉNDICE	67

RESUMEN

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Las terapias empleadas actualmente, tales como la quimioterapia y la radioterapia, son muy agresivas, de baja selectividad e ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad deteriorando notablemente la calidad de vida de los pacientes. Por lo que es importante implementar terapias alternativas a partir de compuestos de origen vegetal, tales como, los compuestos fenólicos del aceite de olivo quienes han mostrado buena actividad antitumoral; entre estos, el hidroxitirosol destaca por presentar actividad antiproliferativa sobre diferentes tipos de cáncer como leucemia promielocítica aguda HL60, cáncer de mama MCF-7, carcinoma de colon humano HT29, melanoma M14 y cáncer de próstata PC3, sin embargo, resulta ser necrótico y de bajo rendimiento en su síntesis, lo que limita su uso. Por tal motivo en el presente trabajo se sintetizó al compuesto Az-481b derivado del hidroxitirosol y se evaluó su actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica sobre líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-281), próstata (PC3) y pulmón (Sk.LU-1) así como en linfocitos de sangre periférica humana.

La evaluación de la proliferación de células tumorales se llevó a cabo por la técnica de incorporación de cristal violeta, la proliferación en cultivos de linfocitos se realizó por marcaje con caroxifluoresceína (CFSE) y evaluados por citometría de flujo. La toxicidad celular fue evaluada a través de la liberación de la enzima LDH a los medios de cultivo de las células tratadas con el compuesto Az-481b. La muerte por apoptosis fue evaluada mediante la actividad de la caspasa-3 activa, se determinó por inmunofluorescencia y se cuantificó evaluando la cantidad de luminiscencia emitida a través de citometría de flujo. Al evaluar el efecto del compuesto Az-481b sobre el potencial proliferativo de las células tumorales de cáncer de mama (MDA-MB-231), próstata (PC3) y pulmón (Sk-LU-1), se determinó que Az-481b abate su proliferación en un 50 % a concentraciones de 70, 81 y 37.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente e indujo una muerte necrótica en las células MDA-MB-231 y PC3 de forma significativa alcanzando un 13.2% y 9% ($p \leq 0.05$) respectivamente. Así mismo, al evaluar el efecto proapoptótico del compuesto Az-481b a las concentraciones de 70, 81 y 37.7 $\mu\text{g/ml}$ sobre las células tumorales de cáncer de mama (MDA-MB-231), próstata (PC3) y pulmón (Sk-LU-1), se determinó que exhibe una mejora del efecto proapoptótico en comparación con el HT (molécula de la que se derivó) en las células tumorales de próstata (PC3) y pulmón (Sk-LU-1) alcanzando un 40.54% y 48.91% respectivamente. Por último, al evaluar el efecto del compuesto Az-481b a las concentraciones de 70, 81 y 37.7 $\mu\text{g/ml}$ sobre

cultivos de linfocitos de sangre periférica se observó que no afecta su potencial proliferativo ni induce en ellos a una muerte celular necrótica.

El compuesto az-281b inhibe la proliferación de cultivos de células tumorales en un 50% a concentraciones de 70, 81 y 37.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente e induce una muerte por apoptosis; y si bien afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas humana, no genera en ellas una muerte por necrosis.

MARCO TEÓRICO

Ciclo celular

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases: en G₀ las células llevan a cabo todas sus actividades metabólicas, sin embargo permanecen sin dividirse y conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G₁ (gap 1), las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G₂ (gap 2), el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o mitosis. El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “detenidas” en G₀ durante años (Fig. 1) (Burgués *et al*, 2005).

Durante los intervalos G₁ y G₂, la célula monitorea los ambientes intracelulares y extracelulares para asegurar que las condiciones sean las apropiadas. En puntos determinados de G₁ y G₂ la célula debe decidir si pasa a la siguiente fase o efectúa una pausa que permita ganar tiempo y reparar daños o completar la preparación. La proliferación celular depende de nutrientes y de moléculas de señalización específica del medio extracelular, si las condiciones son desfavorables la célula puede retardar el proceso a través de G₁ e incluso puede ingresar a G₀. El punto de control G₂ garantiza que las células no ingresen en la fase de mitosis hasta que no se haya reparado el ADN y se complete su replicación (Alberts *et al*, 2002).

En la fase M se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. La fase M, para su estudio se divide en: 1) Profase: en esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromátidas hermanas) se condensan en el núcleo, mientras en el citoplasma se comienza a ensamblar el huso mitótico entre los centrosomas; 2) Metafase: Comienza con el rompimiento de la membrana nuclear, de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas éstos se alinean en el ecuador de la célula; 3) Anafase: Se produce la separación de las cromátidas hermanas, las cuales dan lugar a dos cromosomas

hijos, que migran hacia polos opuestos de la célula; 4) Telofase: Aquí ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil; 5) Citocinesis: Finalmente se divide la célula mediante el anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas cada una con un juego completo de cromosomas (Alberts *et al*, 2002).

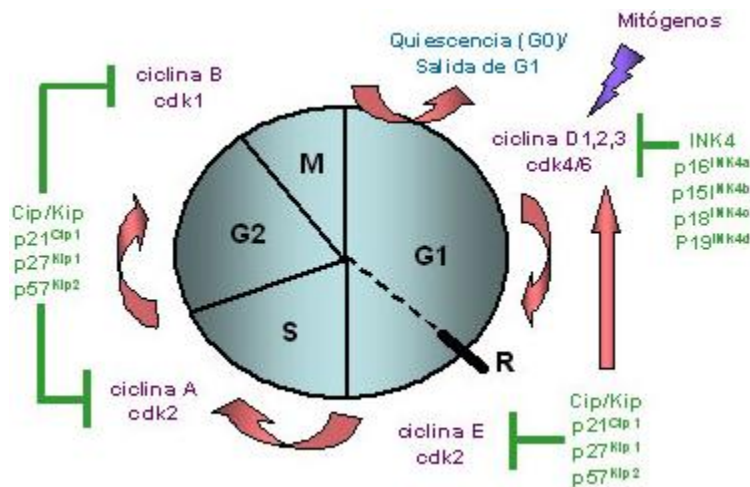


Fig. 1. Ciclo celular de una célula eucariota, esquema que permite ilustrar las cuatro fases sucesivas y las moléculas que intervienen en el ciclo celular (Tomada de www.quimicaviva.gb.fcen.uba.ar).

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estricta. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular. Primariamente el ciclo celular está catalizado por complejos que contienen cinasas dependientes de ciclinas (CDK, del inglés; cyclin-dependent kinases) y ciclinas. Las CDK son proteínas de cinasas con treonina/serina que son activadas en puntos específicos del ciclo celular, al menos son siete CDK en células de mamíferos y son críticas para la progresión a través del ciclo celular porque éstas también actúan en su inhibición. Las CDK son reguladas por varios procesos, uno de ellos es la fosforilación en residuos de treonina y tirosina. Las ciclinas realizan múltiples funciones de regulación y son necesarias para la

activación de las CDK; algunas CDK se unen a más de una ciclina y éstas están ligadas a las cdk y probablemente les provee especificidad a los sustratos (Schafer K., 1998). Estas proteínas actúan en diferentes espacios de tiempo, permitiendo o inhibiendo el progreso adecuado del ciclo celular (Fig. 1). Esta capacidad de orden, se debe principalmente, a que las proteínas (p. ej. las cíclicas), que ya han finalizado su función, son eliminadas por un complejo de degradación llamado ubiquitina-proteosoma.

Así el ciclo avanza por G1 con un incremento en la expresión de las ciclinas D, que se asocian con cdk4 y cdk6, resultando en su fosforilación y activación; éstos ya activados, fosforilan a la proteína RB (Retinoblastoma) que tiene un papel crítico en la regulación de la progresión del punto de restricción de G1. Los miembros de la familia RB son proteínas que retienen a las proteínas de transcripción E2F, evitando que formen complejos con el ADN. En estado hipofosforilado, RB puede capturar a E2F evitando su actividad transcripcional. Cuando RB es fosforilado por cdk4/6 se disocia de E2F y el ciclo continúa. Cuando la célula avanza por G1 tardía, hay también un aumento en la expresión de la ciclina E que es requerida acompañada con cdk2 para la transición de G1 a S; en esta transición, aumenta la expresión de la ciclina A y persiste durante S. La ciclina A es capturada por cdk2 y procede a la síntesis del ADN (Peralta *et al*, 1997; Israels y Israels, 2000).

En el punto de control G2, se monitorea que no exista daño en el ADN o que no se haya copiado completamente, en cuyo caso el ciclo es detenido hasta que el daño sea reparado o el ciclo sea abortado, en caso de que el daño exceda la capacidad de la célula para repararlo. Al final de G2, los complejos cdk1-ciclina A y ciclina B, se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico, además de asegurarse que los cromosomas se unan a éste. Se encarga además: de iniciar la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas, las cuales participan en el mecanismo que permite desensamblar la envoltura nuclear, la fosforilación de las láminas nucleares, el rearmado del citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Lodish *et al.*, 2000).

En condiciones fisiológicas, la homeostasis celular mantiene el estado de diferenciación de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación, su tiempo de supervivencia y su territorialidad, de acuerdo con las necesidades del organismo, así, las células mueren y son sustituidas ininterrumpidamente, gracias a un amplio sistema de regulación donde la muerte celular toma un papel fundamental (Schafer K, 1998).

Muerte celular

La muerte celular es un proceso fisiológico que conduce a la eliminación celular y que tiene una función esencial en la homeostasis de los tejidos. Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo las más habituales la necrosis y apoptosis (Raff M, 1998). Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia.

- Apoptosis

Tan importante como la división celular y migración celular, la muerte celular programada permite que el organismo tenga un control estricto en el número de células y por lo tanto en el tamaño de un tejido (Hengartner *et al*, 2000). En los organismos pluricelulares, la muerte celular ocurre como un proceso necesario de su desarrollo. Existen ejemplos clásicos de muerte celular como parte del desarrollo, muerte celular en el embrión como mecanismo de embriogénesis, para formar diferentes estructuras, muerte de neuronas incapaces de establecer una conexión intersticial adecuada (Sánchez–Socarrás V, 2001) y a menudo la necesidad de deshacerse de las células que están en exceso, o potencialmente peligrosas.

Las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación, ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto, considerada como una muerte natural fisiológica, que actúa de manera “silenciosa”, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Cohen *et al*, 1997; Jordan J, 2003).

La apoptosis está caracterizada por una serie de distintas alteraciones morfológicas y bioquímicas, y ocurre en dos fases: la primera es un compromiso de muerte celular seguida de una fase caracterizada por dramáticos cambios morfológicos estereotipados en la estructura de la célula; así ocurre una condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, compactación de los organelos, dilatación del retículo endoplásmico, un decremento en el volumen celular, formación de vesículas y fusión con la membrana plasmática, y alteración en la membrana plasmática donde hay una translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación (Fig.2) (Solary *et al*, 1996).

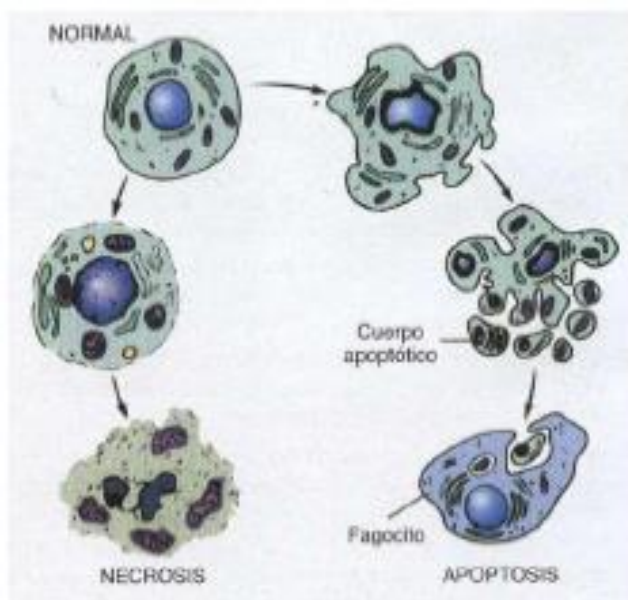


Fig. 2. Cambios ultra estructurales secuenciales que se observan en la necrosis (izquierda) y apoptosis (derecha) (Tomada de patologiabcom6.blogspot.com).

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis parece ser similar para todas las células animales. Esta maquinaria depende de una familia de proteasas que tienen en su sitio activo cisteína y se ancla a su proteína blanco con un ácido aspártico. Éstas son llamadas caspasas. Las caspasas son sintetizadas en la célula como precursores inactivos, o procaspasas, que son usualmente activadas por el clivaje de ácido aspártico por otras

caspasas. Una vez activada, la caspasa se ancla y así activa otra procaspasa, resultando en una amplificación de una cascada proteolítica, algunas de las caspasas activas se unen a proteínas claves por ejemplo a la laminina, causando el irreversible desglose de la membrana nuclear; otras se unen a proteínas que normalmente tienen una enzima que degrada el ADN (ADNasa) en forma inactiva, que se libera y corta el ADN dentro del núcleo de la célula, en este camino, la célula se desmantela así misma rápido y limpiamente, y los cuerpos son rápidamente fagocitados y digeridos por otras células (Alberts *et al*, 2002).

Para el estudio de las caspasas, éstas se clasifican en base al tamaño del dominio. Las caspasas con grandes dominios, como las caspasas-2, 8 y 9 funcionan como iniciadores de señales que se encuentran al principio de cascadas proteolíticas, mientras que las que presentan un dominio pequeño, como las caspasas-3, 6, y 7, se localizan debajo de las caspasas iniciadoras y funcionan como proteasas efectoras que rompen principalmente sustratos proteicos en núcleo y citoesqueleto (Burgués *et al*, 2005).

Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por ruptura proteolítica mediante dos vías alternativas:

1.- Vía del receptor de muerte celular: los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia génica de receptores del TNF (TNFR). Los mejores caracterizados son los receptores Fas, también conocido como CD95 (del inglés; cytotoxicity-dependent proteína 95) o APO-1 (del inglés; apoptosis-1 protein), y el receptor del TNF (TNFR). Tienen en común una secuencia homóloga denominada “dominio de muerte”, capaz de iniciar la cascada de eventos que lleva a la apoptosis (Fig. 3) (Burgués *et al*, 2005).

El receptor Fas activado recluta moléculas adaptadoras como el FADD/ MORT-1 (del inglés; Fas-associated death domain/mediator of receptor-induced toxicity-1), que contiene también un “dominio de muerte” (DD) que se une al análogo del receptor Fas y un “dominio efector de muerte” que se une a un dominio análogo a la procaspasa 8, que sufre una activación auto-catalítica al unirse al FADD convirtiéndose en la caspasa 8 activa. La caspasa 8 rompe y activa otras caspasas efectoras como la 3, la 6 y la 7 (Burgués *et al*, 2005).

2.- La vía mitocondrial: Se trata de una vía independiente de los receptores de muerte y es la que inducen los agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas del estrés (especies reactivas del oxígeno o nitrógeno). Las mitocondrias son organelos con dos compartimentos: la matriz, rodeada por la membrana interna (MI), y el espacio intermembranal, entre las membranas interna y externa (ME). En la MI está la ATP sintetasa y la cadena respiratoria y en el espacio intermembranal está el citocromo c, que al ser liberado al exterior de la mitocondria induce apoptosis, las proteínas de la familia Bcl-2 regulan esta liberación; los miembros anti-apoptóticos de esta familia (Bcl-2 y Bcl-xL) bloquean la liberación del citocromo c, mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) la inducen (Burgués *et al*, 2005). Cuando el citocromo c se libera, provoca el ensamble de APAF-1 (del inglés; apoptotic protease-activating factor) con la procaspasa 9, formándose el complejo denominado apoptosoma. El APAF-1 tiene un dominio reclutador de caspasas denominado CARD (del inglés; caspase recruiting domain), que requiere ATP para la inducción de la ruptura auto catalítica de la procaspasa 9 en caspasa 9 activa. Esta última se libera del apoptosoma para activar a las caspasas 3, 6 y 7, que provocan la ruptura de diversos sustratos y la apoptosis (Fig. 3) (Burgués *et al*, 2005).

En especial la caspasa-3, es crucial en la apoptosis porque se ancla y rompe o modifica la función de cientos de sustratos de proteínas y es un importante punto de convergencia de las rutas de apoptosis extrínseca (iniciado por receptores de muerte) e intrínseca (mitocondrial) (Fig. 3) (Porter G, 2006).

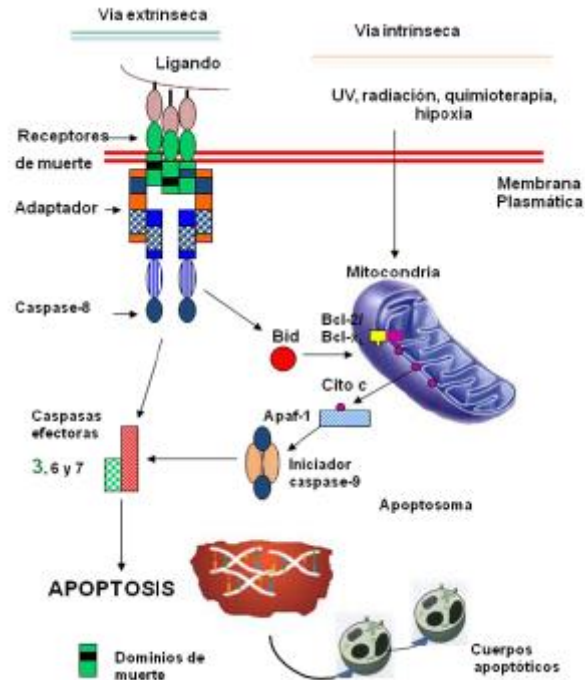


Fig.3. Vías, extrínseca e intrínseca de la muerte por apoptosis (Tomada y modificada de Grupta *et al*, 2006).

- Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular, se asocia con la pérdida temprana en la integridad de las membranas, lo que resulta en la salida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular. Al igual que ocurre en la apoptosis, en las células necróticas se suman cambios morfológicos que siguen a la muerte celular.

A diferencia de la apoptosis, las células necróticas sufren autólisis, con liberación de enzimas, y desencadenan así una reacción inflamatoria que atrae leucocitos y proteínas plasmáticas. Finalmente tiene lugar la degradación de las células muertas (Fig.2).

La muerte celular por necrosis se concreta en 2 etapas:

1. Autolisis.

Incluye todos los cambios que dependen de alteraciones en los componentes celulares, proceso que ocurre con un patrón morfológico en cierta medida característico y que consiste en cambios en el núcleo (disolución progresiva de la cromatina o cariólisis); cambios en el citoplasma (pérdida de la basófilia por esparcimiento de las ribonucleoproteínas); aspecto homogéneo del citoplasma (por pérdida de los compartimientos celulares); tumefacción de las mitocondrias.

2. Fagocitosis de los restos celulares por los macrófagos tisulares.

Todos estos cambios condenan a la célula a perder su función específica, y solamente forma parte de restos celulares que serán fagocitados por los macrófagos. La muerte de las células no siempre va seguida de la disolución inmediata de su armazón, puede seguir distintos caminos que originan distintos tipos morfológicos de necrosis, (Sánchez- Socarrás V, 2001).

Es así que el término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular (Jordán J, 2003).

Morfológicamente, la diferencia con la necrosis es que, en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular. Bioquímicamente, la característica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que

en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (De Toro G, 1996; Burgues *et al*, 2005).

Así el desarrollo de una apoptosis inapropiada está implicada en muchas enfermedades humanas, como el Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varias formas de cáncer (Burgues *et al*, 2005).

Cáncer

Los controles que regulan la multiplicación celular en raras ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre comienza a dividirse en forma descontrolada, al margen de las necesidades del organismo de más células de este tipo. Cuando esta célula tiene descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida, por último, este clon de células no deseadas forma una masa, denominado tumor. Así el cáncer es una enfermedad en la cual clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas, destruyendo finalmente toda la sociedad celular y se produce a una escala temporal de meses o años en una población de células del organismo (Fig. 4) (Schmitt *et al*, 2002).

Existen factores biológicos, químicos y físicos que contribuyen al desarrollo del cáncer. Dentro de los biológicos se encuentran los virus, bacterias, etc; en los químicos se puede mencionar sustancias cancerígenas como el benceno y dentro de los físicos se encuentra los rayos UV, todos muestran una propiedad común, provocan cambios en el genoma, sin embargo la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen. Existen dos diferencias claves entre el cáncer y otras enfermedades genéticas. La primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen, sobre todo en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en la línea germinativa; la segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino, más bien, de la acumulación de entre 3 y 20 mutaciones, en genes que regulan la multiplicación celular normal. Las células cancerosas se caracterizan

por dos propiedades hereditarias: ella y su progenie (1) se reproducen a pesar de las restricciones normales e (2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células. La combinación de estas características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso (Alberts *et al*, 2002).

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas. Estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico (Evan *et al*, 2001).

Las alteraciones más notables después de la transformación ocurren en los cromosomas. En general las células normales conservan su dotación cromosómica diploide normal conforme crecen y se dividen. Mientras que las células cancerosas con frecuencia presentan dotación cromosómica muy aberrante, alteración denominada aneuploidia. Los cambios morfológicos más notables ocurren en el citoplasma, casi siempre afectan al citoesqueleto. La célula normal por lo general tiene una red bien organizada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, el citoesqueleto de la célula cancerosa a menudo está reducido, desorganizado o ambas cosas. Las células cancerosas tienen una capacidad disminuida para responder a los estímulos que desencadenan la apoptosis. La mayoría de las células normales desarrollan una dependencia de factores ambientales específicos para mantener su viabilidad, por su parte las células tumorales desarrollan cierto grado de independencia de estos factores ambientales, aparentemente son inmortales en el sentido de que continúa dividiéndose de manera indefinida mientras las condiciones de nutrientes y de cultivo sean adecuadas para su sobrevivencia (Karp G, 2006).

Así, si la proliferación celular está fuera de control, producirá un tumor o neoplasia, una masa de células que crece de manera inexorable. Mientras las células neoplásicas permanezcan agrupadas en una masa única y encapsulada, se dice que el tumor es benigno, según el Instituto Nacional de Cancerología, usualmente se pueden remover y en

la mayoría de los casos no reincide. En la mayoría de los tumores benignos no se considera como una amenaza de muerte, sin embargo deben de ser observados y tratados adecuadamente. Un tumor se considera maligno solo si las células tienen capacidad de propagarse a otras regiones del organismo, lo cual se logra a través de dos mecanismos; la invasión y la metástasis. La invasión es la migración y la penetración directa por las células del cáncer en los tejidos vecinos. La metástasis es la capacidad de las células del cáncer de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través de la circulación sanguínea, y después crecer en un nuevo foco (metástasis) en tejidos normales de otra parte del cuerpo (Alberts *et al*, 2002).

- **Cáncer de mama**

El cáncer de seno (mama) es un tumor maligno que se origina en las células del seno. Esta enfermedad ocurre casi por completo en las mujeres, pero los hombres también la pueden padecer (American Cancer Society, 2013).

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo (OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004). Así mismo en México ocupa el primer lugar en las mujeres mayores de 25 años (Secretaria de Salud, 2007).

La mayoría de los cánceres de seno comienza en las células que recubren los conductos (cánceres ductales). Algunos cánceres de seno se originan en las células que recubren los lobulillos (cánceres lobulillares), mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos (American Cancer Society, 2013).

Tipos de cáncer de seno más comunes

Existen varios tipos de cáncer de seno, aunque algunos de ellos se presentan en pocas ocasiones. En algunos casos, un solo tumor del seno puede ser una combinación de estos tipos o ser una mezcla de *in situ* y cáncer invasivo (American Cancer Society, 2013).

➤ Carcinoma ductal *in situ*

El carcinoma ductal *in situ* (ductal carcinoma *in situ*, DCIS; también conocido como carcinoma intraductal) se considera cáncer de seno no invasivo o preinvasivo. DCIS significa que las células que cubren los conductos han cambiado y lucen como células cancerosas. La diferencia entre el DCIS y el cáncer invasivo consiste en que las células no se han propagado (invadido) a través de las paredes de los conductos hacia el tejido que rodea el seno. El DCIS se considera un precáncer porque en algunos casos se puede convertir en un cáncer invasivo. Sin embargo, actualmente, no existe una buena manera de saber con certeza cuáles casos se convertirán en cánceres invasivos y cuáles no (American Cancer Society, 2013).

Alrededor de uno de cinco casos nuevos de cáncer de seno serán DCIS. Casi todas las mujeres que son diagnosticadas en esta etapa temprana del cáncer de seno se pueden curar.

➤ Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante)

El carcinoma ductal invasivo o infiltrante (IDC, siglas en inglés) es el tipo más común de cáncer de seno. Este cáncer comienza en un conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo del seno. En este punto puede tener la capacidad de propagarse (hacer metástasis) hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. Aproximadamente ocho de 10 de los cánceres invasivos del seno son carcinomas ductales infiltrantes (American Cancer Society, 2013).

➤ Carcinoma lobulillar invasivo (o infiltrante)

El carcinoma lobulillar invasivo (invasive lobular carcinoma, ILC) comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). Al igual que el IDC, se puede propagar (hacer metástasis) a otras partes del cuerpo. De 10 casos de cáncer invasivo de seno, aproximadamente uno es ILC. El carcinoma lobulillar invasivo puede ser más difícil de detectar por mamograma que el carcinoma ductal invasivo (American Cancer Society, 2013).

Factores de riesgo del cáncer de seno

Los factores de riesgo no suministran toda la información. Si se tiene uno, o hasta varios factores de riesgo, no necesariamente significa que se padecerá la enfermedad. La mayoría de las mujeres que tienen uno o más factores de riesgo de cáncer de seno nunca padecen la enfermedad, mientras que muchas mujeres que la padecen no tienen factores de riesgo aparentes (excluyendo el ser mujer y de edad avanzada). Aun cuando una mujer con factores de riesgo padece cáncer de seno, resulta difícil saber cuánto pudieron haber contribuido estos factores (American Cancer Society, 2013).

- Incidencia según el sexo

El simple hecho de ser mujer es el principal riesgo de padecer cáncer de seno. Los hombres pueden padecer cáncer de seno, pero esta enfermedad es aproximadamente 100 veces más común entre las mujeres que en los hombres. Esto probablemente se debe a que los hombres tienen menos de las hormonas femeninas estrógeno y progesterona, lo que puede promover el crecimiento de células cancerosas de seno (American Cancer Society, 2013).

- Envejecimiento

Su riesgo de padecer cáncer de seno se incrementa conforme su edad aumenta. Aproximadamente uno de ocho cánceres de seno se detecta en mujeres menores de 45 años de edad, mientras que aproximadamente dos de tres cánceres invasivos del seno se encuentran en mujeres de 55 años o más (American Cancer Society, 2013).

- Factores de riesgo genéticos

Se cree que alrededor del 5 al 10 por ciento de los casos de cáncer de seno son hereditarios, lo que significa que se originan directamente de defectos genéticos (llamados mutaciones) heredados de uno de los padres (American Cancer Society, 2013).

- BRCA1 y BRCA2: la causa más común de cáncer de seno hereditario es una mutación hereditaria en los genes BRCA1 y BRCA2. En las células normales, estos genes ayudan a

prevenir el cáncer al producir proteínas que evitan el crecimiento anormal de las células (American Cancer Society, 2013).

Aunque en algunas familias con mutaciones BRCA1 el riesgo de padecer cáncer de seno durante la vida es tan alto como 80%, en promedio este riesgo parece estar entre 55 a 65%. Para las mutaciones BRCA2, el riesgo es menor, alrededor de 45% (American Cancer Society, 2013).

Los cánceres de seno asociados a estas mutaciones se presentan con más frecuencia en mujeres más jóvenes y con más frecuencia afectan a ambos senos en comparación con cánceres no asociados a estas mutaciones. Las mujeres con estas mutaciones hereditarias también tienen un riesgo aumentado de padecer otros tipos de cánceres, particularmente cáncer de ovario (American Cancer Society, 2013).

- ATM: el gen ATM ayuda normalmente a reparar el ADN dañado. Heredar dos copias anormales de este gen causa la enfermedad ataxia-telangiectasia. Por otro lado, heredar una copia mutada de este gen ha sido asociado con una alta tasa de cáncer de seno en algunas familias (American Cancer Society, 2013).

- TP53: el gen TP53 provee instrucciones para producir una proteína llamada p53 que ayuda a detener el crecimiento de las células anormales. Las mutaciones hereditarias de este gen causan el síndrome de Li-Fraumeni (que lleva el nombre de los dos investigadores que primero lo describieron). Las personas con este síndrome tienen un riesgo aumentado de padecer cáncer de seno, al igual que otros cánceres, como leucemia, tumores encefálicos y sarcomas (cáncer en los huesos o en el tejido conectivo). Ésta es una causa poco común de cáncer de seno (American Cancer Society, 2013).

- Raza y origen étnico

En general, las mujeres de raza blanca tienen una probabilidad ligeramente mayor de padecer cáncer de seno que las mujeres de raza negra, aunque éstas últimas tienen una mayor probabilidad de morir de este cáncer. Sin embargo, en las mujeres menores de 45 años de edad, el cáncer de seno es más común que en las mujeres de raza negra. Las

mujeres asiáticas, hispanas e indias americanas tienen un menor riesgo de padecer y morir de cáncer de seno (American Cancer Society, 2013).

- Tener hijos

Las mujeres que no han tenido hijos o que tuvieron su primer hijo después de los 30 años tienen un riesgo de cáncer de seno ligeramente mayor. Los embarazos múltiples y quedar embarazada cuando la mujer es joven reducen el riesgo del cáncer de seno. El embarazo reduce el número total de ciclos menstruales en la vida de una mujer, lo cual puede que sea una razón de este efecto (American Cancer Society, 2013).

- Sobrepeso u obesidad

El sobrepeso o la obesidad después de la menopausia aumentan el riesgo de cáncer de seno. Antes de la menopausia, sus ovarios producen la mayor cantidad de estrógeno, y el tejido adiposo produce una pequeña cantidad de estrógeno. Por otro lado, después de la menopausia (cuando los ovarios dejan de producir estrógeno), la mayor parte del estrógeno de una mujer proviene del tejido adiposo. Un exceso de tejido adiposo después de la menopausia puede aumentar su probabilidad de padecer cáncer de seno al aumentar los niveles de estrógeno. Además, las mujeres que tienen sobrepeso tienden a presentar niveles de insulina en la sangre más elevados. Los niveles de insulina más elevados también están asociados a algunos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de seno (American Cancer Society, 2013).

Pero la relación entre el peso y el riesgo de cáncer de seno es compleja. Por ejemplo, el riesgo parece aumentar en las mujeres que suben de peso en su vida adulta, pero es posible que no aumente en aquellas mujeres que han tenido exceso de peso desde la infancia. Además, un exceso de grasa en el área de la cintura afecta el riesgo más que la misma cantidad de grasa en las caderas y en los muslos. Los investigadores creen que las células grasas de varias partes del cuerpo tienen diferencias sutiles que pueden explicar esta observación (American Cancer Society, 2013).

Recomendaciones de la Sociedad Americana Contra El Cáncer sobre la detección temprana del cáncer de seno (American Cancer Society, 2013).

- Las mujeres de 40 años en adelante deben hacerse un mamograma de detección al año, y deben continuar haciéndose este examen mientras estén en buen estado de salud.
- Las mujeres de 20 a 39 años de edad deben someterse a un examen clínico de los senos por parte de un profesional de la salud, como parte del examen periódico de salud, al menos cada tres años. A partir de los 40, las mujeres deben someterse a un examen del seno por parte de un profesional de la salud todos los años.
- El autoexamen de los senos es una opción para las mujeres a partir de los 20 años de edad. Se debe orientar a las mujeres sobre los beneficios y las limitaciones del autoexamen de los senos. Las mujeres deben reportar a sus médicos o enfermeras cualquier cambio en sus senos lo antes posible.
- Las mujeres que están en alto riesgo de cáncer de seno basado en ciertos factores deben someterse a una imagen de resonancia magnética (MRI) y a un mamograma cada año.

- **Cáncer de próstata**

El carcinoma de próstata es un tumor que predomina en hombres de edad avanzada: la mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 72 años (Howlader N *et al*, 2011). El cáncer de próstata se puede curar cuando está localizado y, con frecuencia, responde al tratamiento cuando está diseminado. La tasa de crecimiento tumoral oscila entre muy lento a moderadamente rápido y, algunos pacientes pueden tener una supervivencia prolongada incluso después de que el cáncer haya hecho metástasis hasta sitios distantes, como los huesos. La tasa de supervivencia relativa a 5 años para los hombres diagnosticados de 2001 a 2007 con enfermedad local o regional fue de 100%; la tasa de enfermedad a distancia fue de 28,7%; se observó una tasa de supervivencia de 99% para todos los estadios combinados (American Cancer Society, 2012).

Muchos pacientes —en especial, aquellos con tumores localizados— pueden morir por otras enfermedades sin haber sufrido siquiera de una discapacidad producida por el cáncer, incluso si se utilizó un tratamiento conservador sin intención curativa (Albertsen PC., 2011). En parte, estos desenlaces favorables pueden ser el resultado del uso generalizado de exámenes de detección con la prueba del antígeno prostático específico (APE), con la que se puede identificar a pacientes con tumores asintomáticos con potencial mortal mínimo o nulo (Welch HG & Albertsen PC, 2011).

Anatomía patológica

Aunque la próstata está formada por muchos tipos de células diferentes, más del 99% de los cánceres de próstata se desarrollan sobre células glandulares. Las células glandulares producen el líquido seminal que se secreta por la próstata. El término médico del cáncer que se origina en las células glandulares se denomina adenocarcinoma. Debido a que los otros tipos de cáncer de próstata son muy raros, cuando se habla de cáncer de próstata, lo más probable es que se refiera a un adenocarcinoma. Es raro encontrar sarcomas, carcinoma de células transicionales, de células pequeñas, epidermoide o escamosos. La próstata puede ser asiento de metástasis, de cáncer de vejiga, colon, pulmón, melanoma, linfoma u otras neoplasias (Nelson WG *et al.*, 2003).

La mayoría de los cánceres de próstata crecen muy lentamente y persisten durante mucho tiempo sin causar síntomas importantes. Los estudios de series de autopsias muestran que la mayoría de los hombres mayores que mueren por otras enfermedades, también tienen un cáncer de próstata que nadie había diagnosticado antes. Sólo alrededor de un tercio de los casos que se descubren en necropsia, se han manifestado clínicamente. Se desconoce igualmente si los tumores pueden volverse más malignos con el tiempo (Nelson WG *et al.*, 2003).

Neoplasia intraepitelial prostática

Algunos médicos creen que el cáncer de próstata procede de una lesión llamada neoplasia intraepitelial prostática (PIN). La PIN comienza a aparecer en los hombres a partir de los

20 años. Casi el 50% de los hombres que tienen PIN alcanzan los 50 años. En esta situación hay cambios de apariencia microscópica (tamaño, superficie, etc.) de las células de la glándula prostática. Estos cambios son clasificados como de bajo grado, lo que significa que se parecen bastante a las células normales, o de alto grado, lo que significa que son células muy alteradas y diferentes de las células normales. Si se diagnostica un PIN de alto grado por biopsia, existe de un 30 a 50% de posibilidades de padecer también un cáncer de próstata. Por esta razón, los varones diagnosticados de un PIN de alto grado, son seguidos muy de cerca con biopsias de próstata periódicamente (Nelson WG *et al.*, 2003).

El cáncer de próstata tiende a ser multifocal y con frecuencia afecta a la cápsula glandular. Al contrario de la hipertrofia benigna de próstata (HBP), el cáncer de próstata predomina en la periferia de la próstata. Ambas características (multifocal y periférico) hacen que la resección transuretral (RTU) no sea una forma de terapia curativa (Nelson WG *et al.*, 2003).

Presentación clínica

La mayoría de los cánceres de próstata se diagnostican como resultado de exámenes de detección; en consecuencia, los síntomas de cáncer son poco frecuentes en el momento del diagnóstico (Zelevsky MJ *et al.*, 2011). No obstante, el crecimiento local del tumor puede producir síntomas de obstrucción urinaria como los siguientes:

- Disminución del flujo urinario.
- Urgencia.
- Vacilación.
- Nocturia.
- Vaciado vesical incompleto.

Estos síntomas son inespecíficos y más indicativos de hiperplasia prostática benigna que de cáncer.

Aunque poco frecuente en la época actual de exámenes de detección generalizados, el cáncer de próstata también se puede presentar con síntomas de metástasis, como dolor óseo, fracturas patológicas o síntomas causados por el compromiso de la médula ósea.

Evaluación diagnóstica

La biopsia con aguja es el método más común para diagnosticar el cáncer de próstata. La mayoría de los urólogos realizan ahora una biopsia transrectal con una pistola bióptica guiada por ecografía. Con el paso de los años, ha habido una tendencia hacia la toma de 8 a 10 muestras de biopsia de varias áreas de la próstata con un aumento consiguiente de detección del cáncer después de una prueba de APE en sangre (Zelevsky MJ *et al.*, 2011). Con menor frecuencia, se puede usar un abordaje transperineal guiado por ecografía para pacientes que pueden tener un aumento de riesgo de complicaciones causadas por el uso de un abordaje transrectal (Webb JA, *et al.*, 1993).

A menudo se utilizan antibióticos profilácticos, en particular fluoroquinolonas, antes de realizar biopsias con agujas transrectales. Hay informes de un aumento de tasas de septicemia, en particular en presencia de *E. coli* resistente a la fluoroquinolona y de hospitalización después del procedimiento (Nam RK *et al.* 2010; Liss MA *et al.*, 2011). En consecuencia, se deberá informar a los hombres sometidos a biopsia transrectal que busquen atención médica inmediata si presentan fiebre después de una biopsia.

- **Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es un conjunto de enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio, en particular del tejido pulmonar, y uno de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial. El cáncer de pulmón suele originarse a partir de células epiteliales, y puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo. Se excluye del cáncer de pulmón aquellas neoplasias que hacen metástasis en el pulmón provenientes de tumores de otras partes del cuerpo (Arias J, 2000).

Los síntomas más frecuentes suelen ser dificultad respiratoria, tos —incluyendo tos sanguinolenta— y pérdida de peso (Minna JD, 2004), así como dolor torácico, ronquera e hinchazón en el cuello y la cara.

El cáncer de pulmón es clasificado en dos tipos principales en función del tamaño y apariencia de las células malignas: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico). Esta distinción condiciona el tratamiento y así, mientras el primero por lo general es tratado con quimioterapia y radiación, el segundo tiende a serlo además mediante cirugía y láser (Vaporciyan AA, *et al.* 2000).

Cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC)

Los carcinomas pulmonares de células no pequeñas se agrupan por razón de que su pronóstico y tratamiento son muy similares (INC, 2008). Existen tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas de pulmón, los adenocarcinomas y el carcinoma pulmonar de células grandes.

Cerca de un 31% de todos los carcinomas de pulmón se corresponde con un carcinoma de células escamosas que (Travis LB *et al.*, 1995.), por lo general, comienza cerca de un bronquio central. Comúnmente se ve necrosis y cavitación en el centro del tumor. Aquellos tumores de células escamosas bien diferenciadas a menudo crecen más lentamente que los otros tipos de cáncer (Vaporciyan AA *et al.*, 2000).

Los adenocarcinomas representan un 29.4% de todos los tipos de cáncer de pulmón. Por lo general se originan del tejido pulmonar periférico (Netter Frank H *et al.*, 2006). La mayoría de los casos de adenocarcinoma de pulmón están asociados al hábito de fumar cigarrillos y en pacientes con enfermedades pulmonares previas (Travis WD, *et al.*, 1995). Sin embargo, entre aquellos que nunca han fumado, los adenocarcinomas son la forma más frecuente de cáncer de pulmón (Subramanian J & Govindan R, 2007). Uno de los subtipos de adenocarcinomas, el carcinoma bronquiolo alveolar, se ve con más frecuencia entre mujeres que nunca han fumado y generalmente muestra respuestas diferentes al tratamiento de un individuo al otro (Raz, DJ, *et al.*, 2006).

Los carcinomas de células gigantes representan un 10.7% de todas las formas de cáncer de pulmón. Son tumores que crecen con rapidez y cerca de la superficie del pulmón (Veronesi G *et al*, 2006). A menudo son células pobremente diferenciadas y tienden a generar metástasis pronto (Vaporciyan AA *et al*, 2000).

Carcinoma de células pequeñas (SCLC)

Cerca de un 15% de todos los carcinomas de pulmón se corresponden con un cáncer de pulmón de células pequeñas, también llamado carcinoma de células de avena. Tiende a aparecer en las vías aéreas de mayor calibre—como en los bronquios primarios y secundarios—y crece rápidamente llegando a tener un gran tamaño (Collins LG *et al*, 2007). La célula de avena contiene densos gránulos neurosecretorios, es decir, vesículas que contienen hormonas neuroendocrinas, que le da una asociación con un síndrome endocrino o paraneoplásico, es decir, caracterizado por síntomas no relacionados con el efecto del tumor local (Rosti G *et al*, 2006). Aunque es un tipo de cáncer que inicialmente resulta más sensible a la quimioterapia, conlleva un peor pronóstico y se disemina mucho más rápidamente que el cáncer pulmonar de células no pequeñas. Los tumores de pulmón de células pequeñas se dividen en una etapa limitada y una etapa avanzada o diseminada. Este tipo de cáncer está igualmente asociado al tabaquismo (Barbone F *et al*, 1997).

Localización del cáncer de pulmón.

Desde el punto de vista topográfico predomina la localización en el pulmón derecho (relación 6:4), en los lóbulos superiores y, dentro de éstos, el segmento anterior. En segundo lugar se localiza en los lóbulos inferiores y en tercer lugar en el lóbulo medio y língula. El tumor de Pancoast es el tumor maligno situado en el ápex pulmonar, que aparece en el 4% de los casos y no es una variedad histopatológica (Clavero R *et al*, 2008). Según la localización, el cáncer de pulmón se clasifica en:

Cáncer de pulmón central: aparece a nivel de bronquios principales, lobares y segmentarios (primera, segunda y tercera generación respectivamente), hasta los de cuarta generación, es decir preferentemente en y alrededor del hilio pulmonar (Irfan

Maghfoor *et al*, 2006). El origen tráqueal es raro, cerca del 1%. Se inicia con sintomatología bronquial y son accesibles con el broncoscopio. Representan el 75% de los casos. Son cánceres centrales las variedades epidermoide (células escamosas) y el carcinoma indiferenciado de células pequeñas (Kane Madeleine A. & Paul A Bunn. 1998).

Cáncer de pulmón periférico: aparece a partir de los bronquios de quinta generación. Se inicia con clínica extra bronquial y no son accesibles con el broncoscopio. El adenocarcinoma es un ejemplo, que suele localizarse en áreas muy alejadas, junto a la pleura (Terasaki H. y *col*. 2003).

Aspecto macroscópico

En su desarrollo, el carcinoma pulmonar comienza como un área de atipia citológica *in situ*, que durante un periodo de tiempo no conocido produce una zona de engrosamiento de la mucosa bronquial. A partir de aquí puede seguir uno de varios patrones:

1. Ulceración tumoral de la mucosa: el pequeño foco, generalmente de menos de 1 cm de diámetro, al progresar adquiere el aspecto de una excrecencia verrugosa que eleva y erosiona el revestimiento epitelial. Tiene bordes mamelonados de contorno irregular.
2. Tumor intrabronquial: forma una prominencia que ocupa la mayor parte de la luz del bronquio (Tuleski MJ *et al*, 2000).
3. Infiltración circular estenosante: de crecimiento predominantemente submucoso, aunque suele acabar ulcerándose.
4. Infiltración peribronquial: el tumor penetra rápidamente en la pared bronquial e infiltra el tejido peribronquial, hacia la carina o mediastino (Bernal-Bernal R *et al*, 2008).

Causas del cáncer de pulmón

La causa más común de cáncer de pulmón es el tabaquismo, siendo el 95 % de pacientes con cáncer de pulmón, fumadores y exfumadores. En las personas no fumadoras, la aparición del cáncer de pulmón es resultado de una combinación de factores genéticos

(Gorlova OY *et al*, 2007.), exposición al gas radón, asbesto, y contaminación atmosférica, incluyendo humo secundario (fumadores pasivos) (Department of Health and Human Services., 2006).

El diagnóstico temprano del cáncer de pulmón es el principal condicionante para el éxito en su tratamiento. En estadios tempranos, el cáncer de pulmón puede, en alrededor del 20% de los casos, ser tratado mediante resección quirúrgica con éxito de curación (Pilar Garrido, 2004). Sin embargo, debido a su agresividad y a la dificultad para su detección precoz, en la mayoría de los casos de diagnóstico donde ya ocurre metástasis; el cáncer de pulmón presenta, junto con el cáncer de hígado, páncreas y esófago los peores pronósticos, con una esperanza de vida promedio de aproximadamente 8 meses (Katzung Bertram G, 2007).

Tratamientos

Los tres tratamientos principales del cáncer son: cirugía, radioterapia y quimioterapia y se aplican de forma separada o conjunta. Estas técnicas se usan para curar o prevenir que el tumor crezca y/o paliar los síntomas cuando la enfermedad está muy avanzada.

- La cirugía:

Este tratamiento implica una operación quirúrgica para quitar el tumor o los tumores. Sin embargo si hay metástasis este tratamiento es ineficaz.

La cirugía es la forma más antigua de tratamiento del cáncer. Además, la biopsia quirúrgica tiene una participación importante en el diagnóstico de la mayor parte de los procesos malignos. El desarrollo de modalidades terapéuticas más modernas, como la quimioterapia y la radioterapia, ha llevado a reducir la indicación de procedimientos quirúrgicos radicales, pero la cirugía continúa siendo el único tratamiento potencialmente curativo para muchos pacientes con cáncer (Cameron R, 1995).

- Radiación:

El tratamiento con radiación utiliza rayos X o partículas de alta energía para destruir células cancerosas o aminorar su crecimiento.

La potencia y la precisión de las radiaciones emitida por los aparatos de alta energía obligan a un rigor extremo en la conducta del tratamiento, por ello es necesario: Definir muy bien el área específica que representa la zona enferma que debe irradiarse. Elegir las condiciones de irradiación que permiten proporcionar una dosis máxima a nivel del tumor y mínima a nivel de los tejidos sanos de la vecindad. Controlar las constantes físicas del aparato (cantidad y calidad de las radiaciones emitidas).

Al irradiar las células con enormes cantidades de partículas de energía, provocan modificaciones profundas, fundamentalmente a nivel del núcleo de la célula. De ello resultan perturbaciones que pueden destruirlas o hacerlas incapaces de reproducirse.

Su mecanismo de acción se basa en el daño directo e indirecto del ADN a través de radicales libres (Cameron R, 1995), es por ello que se tiene que las células son más sensibles en la fase S del ciclo celular, así como en la mitosis.

El problema de la radioterapia como tratamiento es que se lesionan todas las células que se encuentren en el haz, sin distinción entre células normales o malignas. Por otra parte, cualesquiera que sean las precauciones tomadas durante la radioterapia, no puede evitarse la irradiación de los tejidos sanos al mismo tiempo que se realiza la irradiación del cáncer (Khoury & Dasmin, 1981; Johns & Cunningham, 1981).

- Quimioterapia.

La quimioterapia utiliza medicamentos para reducir los tumores y minimizar el riesgo de que el cáncer se extienda a otras partes del organismo y el riesgo de que el cáncer vuelva a desarrollarse. De esta manera la apoptosis ocurre en muchos tipos de células del cáncer cuando se expone a una variedad de drogas quimioterapéuticas, que incluyen a los anti-metabolitos, inhibidores de la síntesis de deoxinucleótidos, los inhibidores de la

topoisomerasa de ADN, agentes que interfieren con los microtúbulos, y agentes alquilantes entre otros (Miyashita *et al*, 1993).

En cualquier tejido y también en los tumores existe un equilibrio entre las células que se encuentran en fase G1 con las que están en reposo en G0. Las células en G0 son relativamente inactivas con respecto a la síntesis de macromoléculas y en consecuencia, insensibles a muchos de los antineoplásicos, particularmente a los que afectan a esta síntesis. Los agentes quimioterapéuticos que actúan sobre las células en división más que sobre las células en G0 se denominan “específicos del ciclo celular”, mientras que aquellos que actúan también sobre las células en G0 reciben el nombre de “no específicos del ciclo celular”. A su vez, los específicos del ciclo celular pueden ser “fase específicos” si actúan sólo sobre alguna de las fases, o “no fase específicos” si actúan en cualquier fase del ciclo celular (Burgués *et al*, 2005).

A pesar de los indudables beneficios que cualquiera de estos dos tratamientos aportan en la lucha contra el cáncer, sus efectos secundarios son de consideración, caída del pelo, mucositis, disfagia, vómito o náuseas, por lo cual la calidad de vida del paciente se ve disminuida drásticamente. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial terapéutico. Actualmente existe un fuerte interés en probar compuestos de origen vegetal y en particular en compuestos fenólicos, a los cuales se les han atribuido diferentes actividades biológicas, entre las que se destacan la actividad antioxidante y antitumoral.

Péptidos fenólicos

El aceite de oliva, un producto de la extracción mecánica del fruto de *Olea europea* L. (familia *Oleaceae*), está compuesto de una fracción de glicerol, que constituye aproximadamente el 90-99%, y de una fracción no saponificable (0.4-5%) (Keys, 1995).

Es la principal fuente de grasa de la dieta mediterránea y los efectos saludables, en particular, puede atribuirse no solo a la alta relación entre ácidos grasos insaturados y

saturados en el aceite de olivo, sino también a la propiedad antioxidante de los compuestos fenólicos (Keys, 1995).

Los polifenoles son una amplia familia de compuestos que se encuentran en las frutas y hortalizas, como en vino, té, cacao y aceite de oliva extra virgen, que presentan una fuerte actividad antioxidante al eliminar diferentes familias de especies reactivas del oxígeno (ROS). Uno de los miembros más eficaces de la familia de los polifenoles en términos de captación de radicales libres es el hidroxitirosol (HT) o 2(3,4-dihidroxifenil) etanol (Fig.4) (Fernández-Bolaños *et al*, 2008).

El hidroxitirosol (HT) se puede encontrar en las hojas y frutos de *Olea europea* L. (Fernández-Bolaños *et al*, 2008; Sabatini, 2010), y se produce como metabolito de la oleuropeína (Fig.4), un importante componente fenólico del aceite de olivo, ambos dan al aceite de oliva su sabor amargo y picante característico (Omar, 2010).

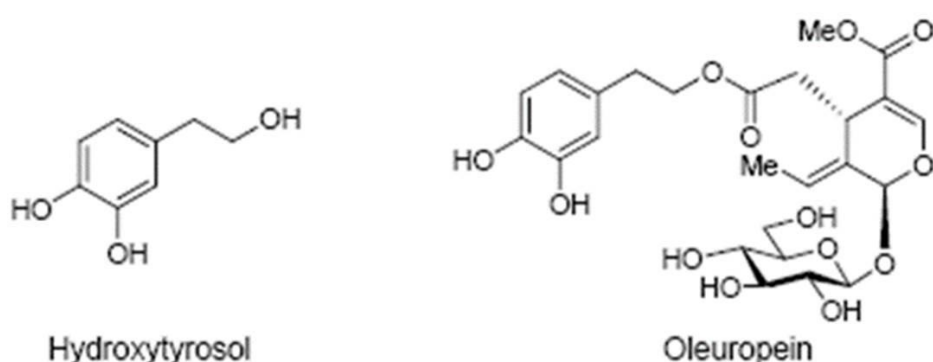


Fig. 4. Estructuras químicas del Hidroxitirosol y Oleuropeína

- Actividad antitumoral

Se han realizado estudios entre la relación en el consumo del aceite de oliva y la prevención del cáncer (Pérez-Jiménez *et al*, 2005). En ese sentido, se ha encontrado que

los compuestos antioxidantes suministrados en la dieta pueden reducir al mínimo el daño en el ADN, la peroxidación de lípidos y la cantidad de ROS generada (Omar SH, 2010).

Se ha descrito que el HT puede ejercer un amplio espectro de propiedades biológicas en función de su fuerte actividad antioxidante, así como, un importante efecto pro-apoptótico mediante la modulación de la expresión de los genes implicados en la proliferación de células tumorales de leucemia promielocítica aguda (células HL60), aunque estos datos aun no son concluyentes (Fabiani *et al*, 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que inhibe la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 (Siriani *et al*, 2010; Bullota *et al*, 2011), células HT29 de carcinoma de colon humano (Guichard *et al*, 2006), células humanas de melanoma M14 y células humanas de próstata PC3 (Quiles *et al*, 2002; D'Angelo *et al*, 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que un pretratamiento de las células HepG2 con hidroxitirasol puede prevenir daños en las células, debido al hecho de que el HT produce defensas antioxidantes en el sistema contra condiciones de estrés oxidativo (Goya *et al*, 2007), lo cual indica que puede utilizarse como tratamiento preventivo contra el cáncer.

Este tipo de resultados explica, en parte, porque en los últimos años la comunidad científica ha dedicado mayor atención a los compuestos fenólicos, evaluando propiedades biológicas observadas experimentalmente y recomendando su inclusión en la dieta de forma importante. Por tal motivo se ha justificado así su presencia en remedios de la medicina tradicional asociada a enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, y se ha demostrado que la modificación estructural de diferentes moléculas con actividad biológica positiva pudo mejorar propiedades como la solubilidad e incluso facilitar su disposición para las células, mejorando así, en muchos casos de forma considerable su actividad biológica (Fernández *et al*, 2010).

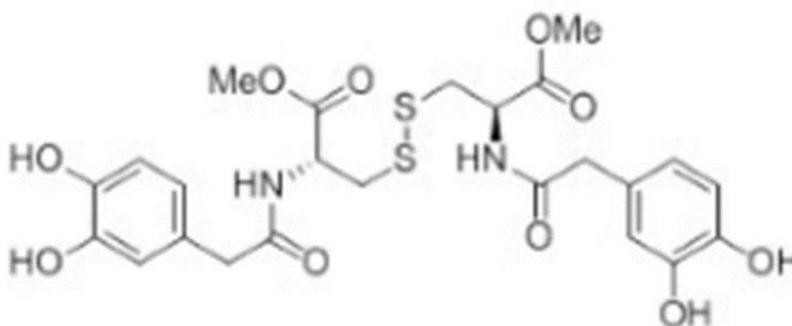
Por ejemplo, en el caso de los capsaicinoides, en particular la capsaicina. A lo largo de la investigación que se ha realizado en la capsaicina, se ha modificado la fracción aromática y la fracción amida. Sin embargo, las modificaciones en la fracción acilo son nuevas

(Appendino *et al*, 2002). Para ello fue desarrollada una síntesis común y simple de vanilamidas, empleada para investigar grupos de ácidos grasos e isoprenoides, propuestos como análogos de la capsaicina con nuevas fracciones acilo de relevancia biológica.

El descubrimiento de nuevos análogos de la capsaicina que no presentan efectos colaterales derivados de la irritabilidad, puede conducir a drogas más efectivas para el tratamiento de desórdenes de la salud como hiperalgesia inflamatoria, hiperactividad de la vejiga, vómito, crecimiento canceroso, dolor e inmovilidad y ha dado como resultado el desarrollo de rinvanil, compuesto considerado análogo ultra potente, varias veces más afín al receptor TRPV1 que la capsaicina (Appendino *et al*, 2005).

- Az-481b

Tal es el caso particular del compuesto fenólico denominado Az-481b (Fig.5), el cual fue obtenido a partir de la modificación del HT por el grupo de trabajo del Dr. Oscar López de la Universidad de Sevilla, España. En el compuesto fenólico Az-481b, tal modificación fue realizada con el propósito de evaluar si el cambio estructural afecta de forma positiva acrecentando la actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica en células tumorales.



Metil (R,R)-3,3'-Ditiobis{2-[2''-(3''',4'''-dihidroxifenil) acetamido] propanato}

Fig. 5. Estructura química del compuesto fenólico Az-481b

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Actualmente se ha generado un fuerte interés en el estudio de compuestos fenólicos de origen vegetal con actividad antitumoral y en particular el Hidroxitirosol (HT), el cual presenta características antioxidantes, antiinflamatorias e importante potencial antitumoral. Sin embargo no presenta las características óptimas para ser implementado como tratamiento, tales como, limitada solubilidad, biodisponibilidad y selectividad entre otras, por lo que se ha generado la necesidad de realizar modificaciones estructurales a esta molécula con la intención de potenciar su biodisponibilidad y actividad antitumoral para convertirlo en un mejor candidato para ser utilizados en la clínica.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente en nuestro país y en el mundo, el cáncer es la principal causa de mortalidad, siendo el cáncer de mama el más común entre las mujeres en todo el mundo (OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004), y en México (Secretaría de Salud; 2007); el cáncer de próstata a nivel mundial es el segundo más común entre hombres (IMSS; 2015), y en México, es el principal tipo de cáncer que afecta a hombres (Secretaría de Salud; 2013). Por otra parte, el cáncer de pulmón es el segundo más mortal para hombres, después del de próstata, y el cuarto más mortal para mujeres (Secretaría de Salud; 2013).

Las terapias empleadas actualmente, tales como la quimioterapia y la radioterapia, son muy agresivas, de baja selectividad e ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad deteriorando notablemente la calidad de vida de los pacientes. Por lo que es importante implementar terapias alternativas a partir de compuestos de origen vegetal, tales como, los compuestos fenólicos del aceite de olivo extra virgen de los cuales se ha reportado una actividad antiproliferativa y citotóxica sobre diferentes líneas de cáncer, siendo posible su uso como alternativas terapéuticas contra el cáncer.

HIPÓTESIS

Se ha descrito que el hidroxitirosol obtenido del aceite de olivo presenta actividad antitumoral sobre diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, éste resulta ser citotóxico y de bajo rendimiento en su síntesis. También se sabe que la modificación estructural de algunas moléculas puede acrecentar su actividad biológica, por lo que se espera que el Az-481b derivado del hidroxitirosol, exhiba un mejor efecto antiproliferativo y apoptótico sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata y pulmón.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto fenólico Az-481b sintetizado a partir del hidroxitiroso (HT) en cultivos de células de cáncer de mama, próstata y pulmón (MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1 respectivamente), así como en cultivos primarios de linfocitos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES-

- Determinar si el péptido fenólico Az-481b presenta actividad antiproliferativa en las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1, expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular (IC50), mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar si las IC50 obtenidas para las líneas tumorales afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.
- Determinar la actividad necrótica del péptido fenólico mediante la detección de la actividad enzimática de la Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos de células MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1, así como en linfocitos humanos.
- Determinar si la concentración IC50 del Az-481b induce la formación de cuerpos apoptóticos así como la expresión de la Caspasa-3 activa en cultivos de células MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1 por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cultivos celulares tumorales de mama, próstata y pulmón así como de linfocitos de sangre periférica

Se utilizaron tres líneas celulares provenientes de cáncer de mama, próstata y pulmón, MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1 (apéndice), respectivamente, que fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD). Se cultivaron las líneas de cáncer en cajas Petri de cristal de 10 mm (Pírex USA), con 10 ml de RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y con rojo de fenol, suplementado con 5% de suero de ternera neonata (STN) (bio west U.S) desactivado a 56 °C por 30 minutos. Se mantuvieron los cultivos incubados a 37° C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow).

Obtención de linfocitos humanos

Los cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana se realizaron a partir de 15 ml de sangre obtenida con una jeringa heparinizada (Heparina 5000 UI/ml, PiSA, México). En un tubo de fondo cónico de vidrio, se depositó 5 ml de Ficoll-Hypaque (densidad de 1.077, +/- 0.001, Sigma, U.S.). Inmediatamente se agregó lentamente por la pared la sangre, de tal forma que la proporción de ficoll-sangre fue de 1:1. Se centrifugó el tubo a 750 rpm/5 min. Al término del tiempo se aumentó la velocidad a 1500 rpm/25 min más. De esta manera, las células mononucleadas se separaron al centrifugarlas por gradiente de densidad. Se colectó el anillo de linfocitos con una micropipeta de 5 ml (evitando extraer la fase Ficoll) y depositó en un tubo cónico de vidrio y lavó con 10 ml de RPMI. Se centrifugó a 1500 rpm/5 min, se retiró el líquido por decantación y volvió a lavar con RPMI y centrifugó a 1500 rpm/5 min.

Posteriormente se resuspendió el botón celular con RPMI suplementado con 20% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Bio West U.S) y vertió a una caja Petri de 100 mm y se incubó a

37° C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación por 1 h (con esto se adhirieron al fondo de la caja los monocitos, permaneciendo en suspensión los linfocitos). Al término de este tiempo se colectó el medio, el cual contenía los linfocitos que se usaron para los ensayos biológicos.

- Evaluación de la proliferación celular por la técnica de incorporación de cristal violeta

Se sembraron en cajas de 96 pozos 8000 células/pozo de las líneas tumorales MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 en 100 µl de RPMI al 5% de STN, y se incubó a 37° C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación. Tras 24 horas, se trataron las células con los compuestos fenólicos (Az-481b y HT, 1 mg en 100 µl de MeOH) proveniente de aceite de olivo partiendo de una concentración de 30 µg/ml a 100 µg/ml, rango de concentración que concuerda con evaluaciones realizadas a diferentes compuestos fenólicos (L. Fan *et al*, 2014; J. Anter *et al*, 2014). Pasadas 24 horas, se fijaron las células durante 20 minutos con 50 µl/pozo de glutaraldehído al 1.1% (Sigma Chemical Co.); posteriormente se lavó las placas con agua corriente y secaron al aire. Se Añadió 50 µl/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma Chemical Co.) en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6.0 y mantuvo durante 20 minutos en agitación constante. Después de la tinción, las cajas de cultivo se lavaron tres veces con agua desionizada (Milli-Q plus Millipore) de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos. Posteriormente se añadió 100 µl de ácido acético (J. T. Baker) al 10% y dejó en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente, para solubilizar el colorante incorporado por las células. Finalmente, se tomó la lectura de cada pozo en un lector de placas de ELISA a 570 nm, y graficó las densidades ópticas como porcentaje de proliferación celular con respecto al control. Posteriormente se realizó una linealización de los datos y las IC₅₀ se calcularon de acuerdo con las ecuaciones de la recta.

- Determinación de muerte celular por necrosis mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Se sembraron 50,000 células/pozo de las células tumorales MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 en placas de 24 pozos, con 500 µl de medio RPMI al 5% de STC, por 24 horas o 200,000 linfocitos/pozo en placas de 96 pozos en RPMI suplementado con 20% de SFB. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y adicionó la concentración de IC₅₀ obtenida en RPMI al 5% de STN o 20% SFB para linfocitos, contemplando lo siguiente: control negativo (células con medio y suero al 5% de STN), control positivo (células con Tritón X100) y vehículo (células con medio al 5% de STN y 1 µl/ml de metanol) cada uno por triplicado. Se mantuvo el cultivo de células tumorales por 24h más y el de linfocitos por 72h. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y centrifugó a 1500 rpm (conservando el sobrenadante), y transfirieron 40 µL/pozo, del sobrenadante de cada uno de los controles y del tratamiento a una placa de 96 pozos, para posteriormente adicionarle 40 µl de la mezcla de reacción del kit Cyto Tox 96® Non-Radio. Cytotoxicity Assay (Promesa Corporation, USA) a cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 490 nm.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

% de citotoxicidad = $[(\text{muestra} - \text{control negativo}) / (\text{control positivo} - \text{control negativo})] * 100$.

- Determinación de muerte por apoptosis por medio de la caspasa-3 por citometría de flujo

Se sembraron 50,000 células/pozo de las células tumorales MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 en placas de 24 pozos, y se le agregó 500 µl de RPMI al 5% de STN por pozo, al término de 24 h se aplicó un estímulo teniendo un control “sin marca” al que solo se le agregó medio fresco, una concentración de metanol (1 µl/ml de MeOH), una concentración de Az-481b

y HT de acuerdo a lo obtenido en IC_{50} y un control positivo con colchicina al 1%. Después de 24 h, se recuperó el medio, despegó y pasaron las células a tubos de citometría y se centrifugaron a 1500-1800 rpm/5 min. Se desechó el sobrenadante con la micropipeta y se resuspendió el botón celular en 500 μ l de PBS, posteriormente se centrifugó y desechó el sobrenadante con la micropipeta (lavado). Inmediatamente después se fijaron las células con 250 μ l de metanol 50% en PBS, durante 30 min en el refrigerador, en seguida se centrifugaron las células a 1500-1800 rpm/5 min y desechó el sobrenadante con la micropipeta; se agregó 500 μ l de PBS y mantuvo a 4° C. Se tiñó con cristal violeta para rectificar IC_{50} y se procesaron los datos. Por otro lado se centrifugo a 1500-1800 rpm/5 min y desechó el sobrenadante con la micropipeta y adicionaron 50 μ l de anticuerpo 1° a 4° C (1 μ l de anticuerpo 1° anti-caspasa 3: 500 μ l de PBS). Después de 24 h, se agregaron 500 μ l PBS (lavado). Se centrifugó a 1500-1800 rpm/5 min y, desechó el sobrenadante con la micropipeta y se resuspendió con 50 μ l del anticuerpo 2° acoplado al fluorocromo FIT-C, durante 3 h a 37° C se guardó en la incubadora (1 μ l de anticuerpo 2°: 250 μ l de PBS). Posteriormente se agregaron 500 μ l PBS (lavado) y centrifugo a 1500-1800 rpm/5 min, se desechó el sobrenadante con la micropipeta. Se resuspendió el botón celular con 500 μ l de PBS. Finalmente se analizaron en el citómetro de flujo. Al término de la lectura, se procesaron los datos en el programa estadístico WinMDI2.9. Todo lo anterior se procedió a realizar en todas las muestras por triplicado.

- Detección de muerte por apoptosis mediante la caspasa-3 por microscopio de fluorescencia.

Se sembraron en cubreobjetos 50,000 células/pozo de las células tumorales MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 y, agregaron 500 μ l de RPMI al 5% de SNC, al término de 24 h se aplicó un estímulo teniendo un control “sin marca” al que solo se le agrega medio fresco, una concentración de metanol (Sigma-Aldrich, Mex.) de acuerdo a la IC_{50} obtenida, una concentración de Az-481b y HT de acuerdo a lo obtenido en IC_{50} y un control positivo con colchicina al 0.1%. Después de 24 h, se retiró el medio y agregaron 500 μ l de PBS (lavado),

se retiró el PBS y fijaron las células inmediatamente con etanol al 70% (Sigma-Aldrich, Mex.) en PBS filtrado, por 30 min. Se retiró el etanol y agregó PBS filtrado (lavado). Después se aplicó 5 μ l del fluorocromo DAPI (Sigma- Aldrich, USA) en condiciones de luz baja de manera muy cuidadosa sobre cada cubreobjetos y se dejó actuar durante 5 min e inmediatamente se lavó 2 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestras con medio de montaje. Las preparaciones, fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

- Análisis estadístico

Se presentaron los datos experimentales como la media \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes con seis repeticiones y se analizaron estadísticamente usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey con una significancia de $p \leq 0.05$ comparada con el vehículo (MeOH).

RESULTADOS:

El Az-481b es un compuesto fenólico derivado del hidroxitirosol (HT), al cual se le ha determinado la actividad antiproliferativa y citotóxica en varias líneas celulares tumorales; por lo que, para determinar el efecto antiproliferativo de este derivado, Az-481b, cultivos de líneas celulares de cáncer de mama, próstata y pulmón (MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1 respectivamente), fueron estimulados en un rango de concentración de 30 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 6) para obtener la concentración que disminuye la densidad celular de estos cultivos en un 50 %.

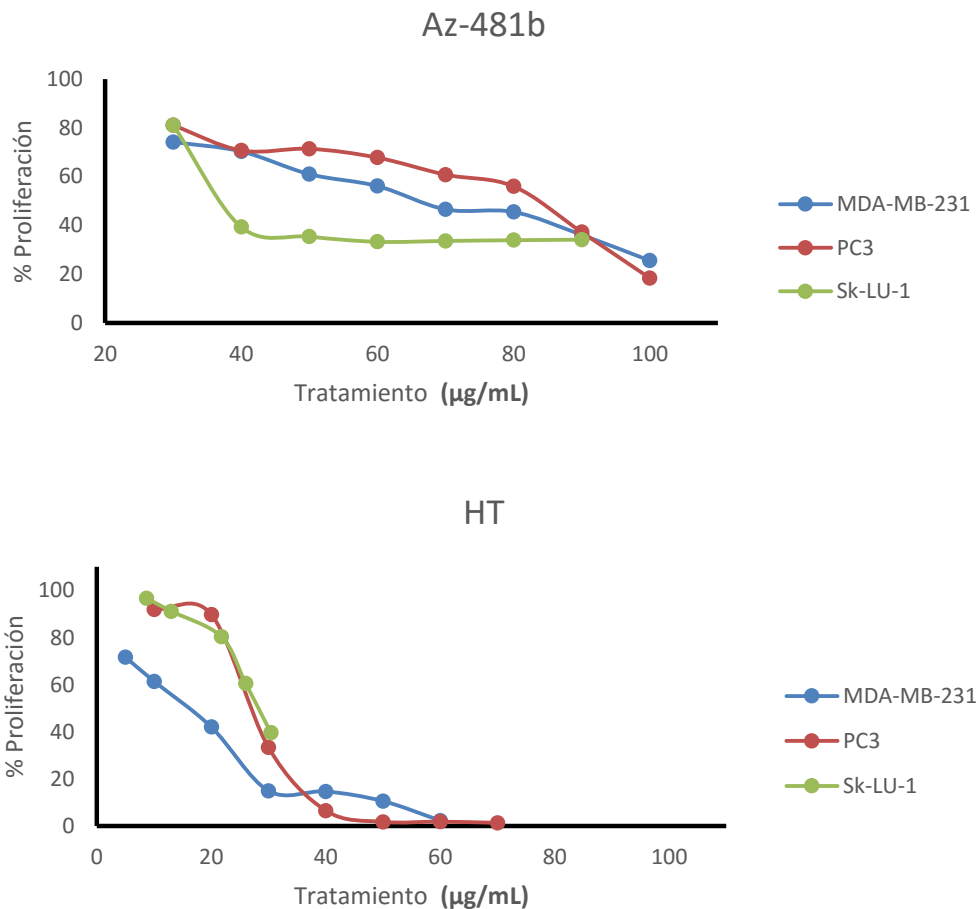


Fig. 6. Efecto antiproliferativo de Az-481b y HT sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1. 8000 células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos por 24 h y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de Az-481b y HT, de 30 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h. El número celular fue evaluado con la técnica de incorporación de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

Los resultados obtenidos indican que Az-481b tiene un efecto en el potencial proliferativo de células tumorales MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1, tal efecto negativo es dependiente de la concentración, ya que al incrementar la concentración el número celular disminuye (Fig. 6). Una vez demostrado este efecto, se procedió a calcular la concentración requerida para la cual los compuestos fenólicos Az-481b y HT inducen una disminución del 50 % en el número celular (IC_{50}), para ello, se realizó una linearización de los datos obtenidos y las IC_{50} se calcularon de acuerdo con la ecuación de la recta, obteniendo los siguientes resultados, en células MDA-MB-231 es de 70 y 15.15 $\mu\text{g/ml}$, en PC3 de 81 y 27.4 $\mu\text{g/ml}$ mientras que para Sk-LU-1 es de 37.7 y 28.2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabla 1).

Línea cel. / Compuesto	MDA-MB-231	PC3	Sk-LU-1
HT	15.15	27.4	28.2
Az-481b	70	81	37.7

Tabla 1. Concentración requerida (en $\mu\text{g/mL}$) de Az-481b y HT para inducir un 50 % de decremento en la densidad celular de cultivos de MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1.

Determinación de muerte celular

Necrosis

Para determinar si Az-481b induce muerte celular por necrosis, a los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y Sk-LU-1 estimulados con sus respectivas IC_{50} por 24 h, se determinó la actividad de la enzima LDH, ya que una célula que muere por necrosis, al perder la integridad de la membrana celular, libera al medio de cultivo su contenido citoplasmático, en el cual se encuentra la enzima LDH. Los resultados muestran que Az-481b induce muerte celular por necrosis en cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231 y PC3, con actividad de LDH de 13.2 % y 9 % respectivamente, mientras que para la línea Sk-LU-1 no induce una muerte por necrosis con actividad de LDH DE 1.2 %; sin embargo, HT induce un mayor porcentaje de muerte por necrosis en cultivos de las líneas celulares PC3 Y Sk-LU-1, con actividad de LDH de 3% y 20.3 % respectivamente, en el caso de la línea MDA-MB-231 no genera la liberación de la enzima LDH (Fig. 7, Tabla 2).

Citotoxicidad

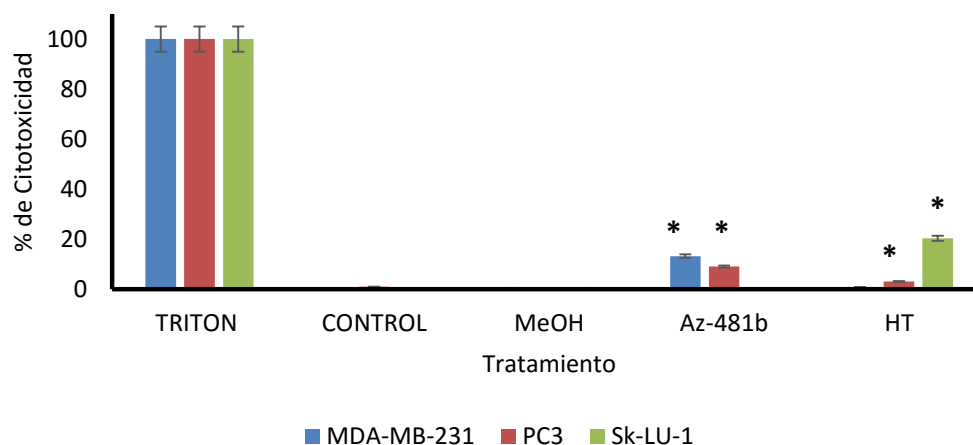


Fig. 7. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 (50,000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos), estimuladas con la IC₅₀ respectiva para cada línea celular por 24 h. La liberación máxima de LDH se determinó con la aplicación de tritón X-100 a las 47 h de cultivo de un tratamiento control, la actividad de la enzima liberada se tomó como el 100 % de actividad. La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado (*p<0.05 vs MeOH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Línea celular	Citotoxicidad (%)	
	Az-481b	HT
MDA-MB-231	13.2	0.8
PC3	9	3
Sk-LU-1	1.2	20.3

Tabla 2. Valores de actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 tratadas con sus respectivas IC₅₀ de los compuestos fenólicos Az-481b y HT.

Apoptosis

Los resultados obtenidos muestran que el compuesto Az-481b ejerce en un porcentaje de muerte por necrosis sobre los cultivos de MDA-MB-231 y PC3, así como el compuesto HT sobre los cultivos de PC3 y Sk-LU-1, sin embargo, no explica el decremento celular del 50%. Por lo que se procedió a evaluar si el compuesto induce una muerte por apoptosis en las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1.

Los núcleos de las células MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 fueron teñidas con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), para observar la condensación de la cromatina, característica típica de la muerte por apoptosis. En las células tratadas de las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 con las IC₅₀ de los compuestos Az-481b y HT, así como de un control positivo estimulado con colchicina al 0.1%, a las 24 horas se observó condensación de cromatina a diferencia de las células control y las células estimuladas con 1 µl de MeOH. Las figuras 8, 9 y 10 muestran con flechas blancas las condensaciones de cromatina de las células tratadas con el compuesto.

MDA-MB-281

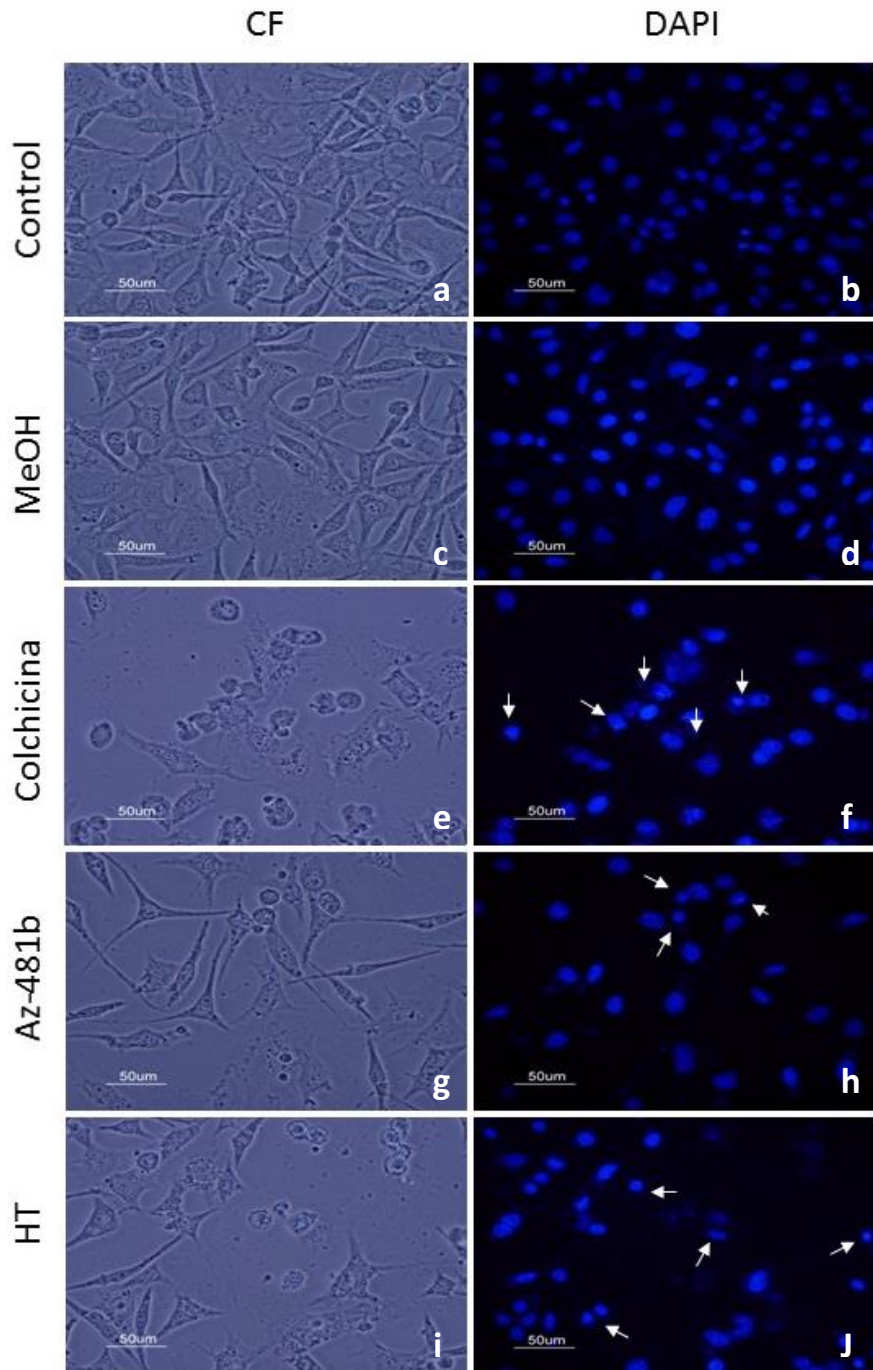


Fig. 8. Compactación de la cromatina en células MDA-MB-231 tratadas con la IC_{50} de los compuestos Az-481b y HT. 50,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm, con 2 ml de RPMI al 5% de STN y se trataron con las IC_{50} por 24 horas. Las micrografías muestran los núcleos marcados con DAPI en color azul, los controles, negativo (sin tratamiento) (a, b) y positivos (con colchicina al 0.1 %) (e, f), las células tratadas con 1 µl MeOH (c, d) y las células tratadas con Az-481b (g, h) y HT (i, j), donde las flechas blancas muestran condensaciones de cromatina.

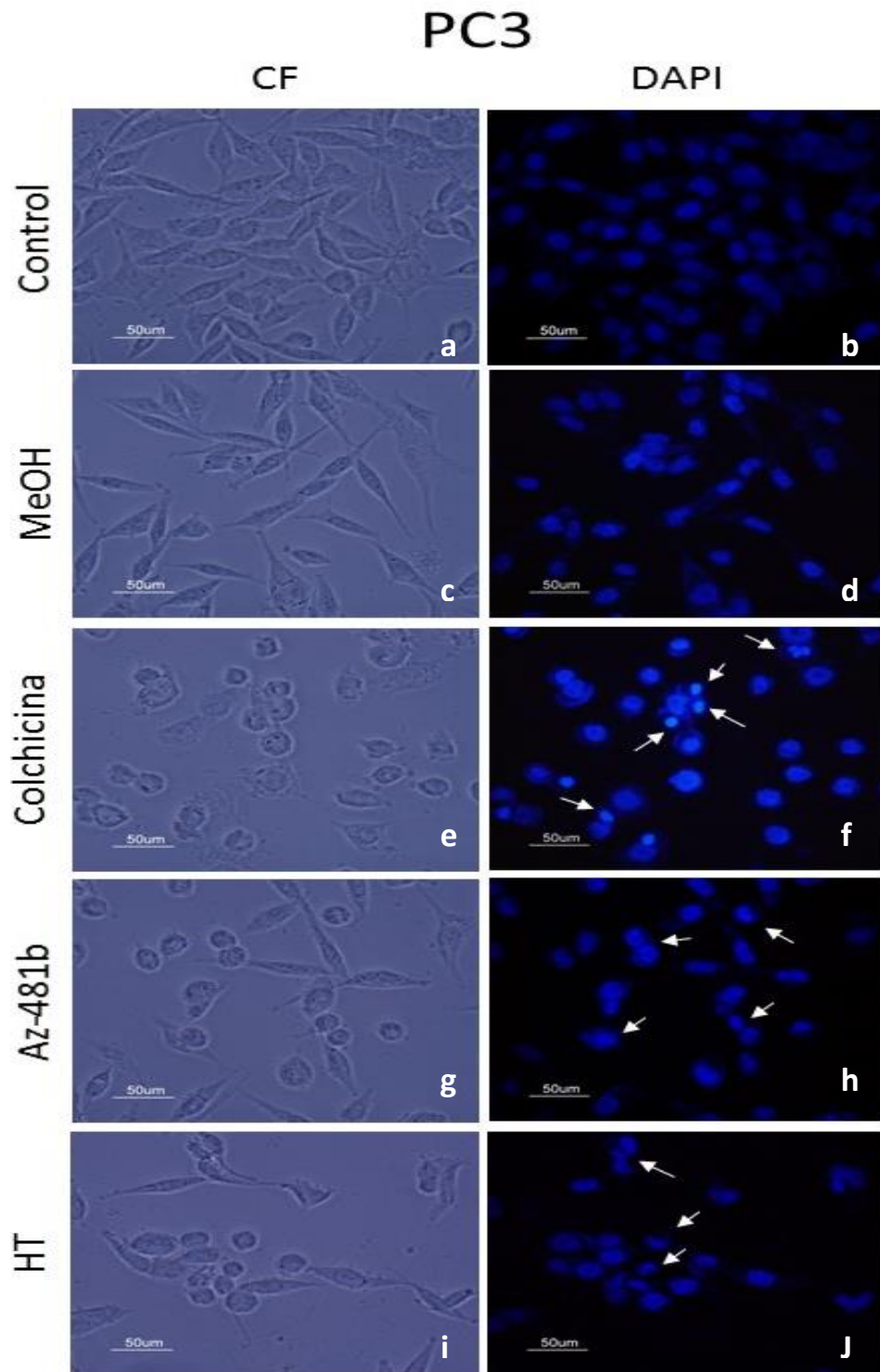


Fig. 9. Compactación de la cromatina en células PC3 tratadas con la IC_{50} de los compuestos Az-481b y HT. 50,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm, con 2 ml de RPMI al 5% de STN y se trataron con las IC_{50} por 24 horas. Las micrografías muestran los núcleos marcados con DAPI en color azul, los controles, negativo (sin tratamiento) (a, b) y positivos (con colchicina al 0.1 %) (e, f), las células tratadas con 1 μ l MeOH (c, d) y las células tratadas con Az-481b (g, h) y HT (i, j), donde las flechas blancas muestran condensaciones de cromatina.

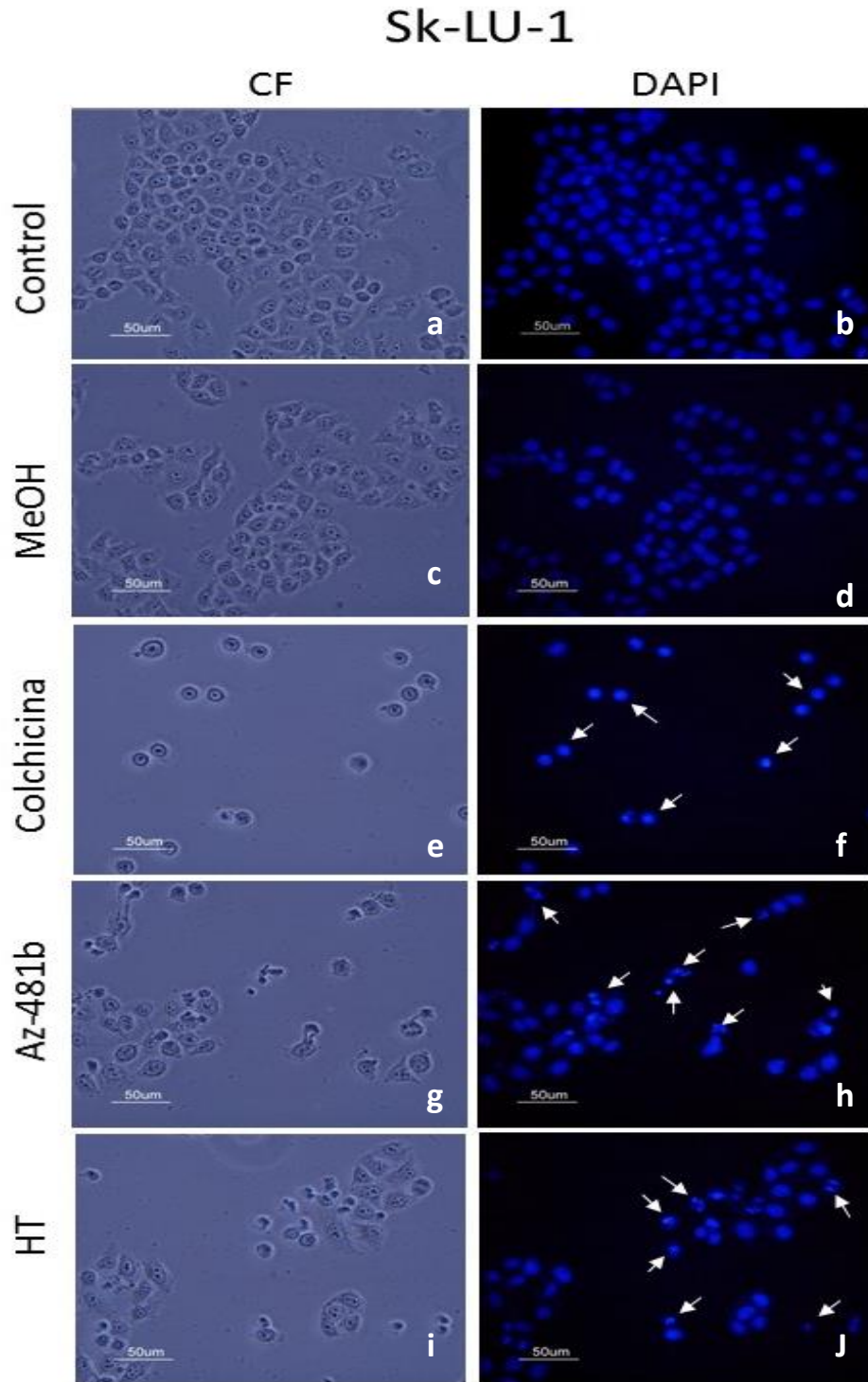


Fig. 10. Compactación de la cromatina en células Sk-LU-1 tratadas con la IC_{50} de los compuestos Az-481b y HT. 50,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm, con 2 ml de RPMI al 5% de STN y se trataron con las IC_{50} por 24 horas. Las micrografías muestran los núcleos marcados con DAPI en color azul, los controles, negativo (sin tratamiento) (a, b) y positivos (con colchicina al 0.1 %) (e, f), las células tratadas con 1 µl MeOH (c, d) y las células tratadas con Az-481b (g, h) y HT (i, j), donde las flechas blancas muestran condensaciones de cromatina.

Para determinar si los compuestos Az-481b y HT inducen una muerte apoptótica en las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1, se realizó citometría de flujo para evaluar el porcentaje de actividad de la caspasa 3 activa, (una caspasa ejecutora que se activa al final de la apoptosis). Los histogramas (Fig. 11) muestran que en las tres líneas celulares los compuesto fenólicos Az-481b y HT induce un incremento en la expresión de la caspasa 3 activa, lo que indica que el compuesto activa la muerte celular por apoptosis. El compuesto Az-481b en las líneas MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 induce la expresión de la caspas-3 activa en un 10.3%, 40.54% y 48.91% respectivamente, mientras que el compuesto HT induce un 21%, 33.37% y 20.35% la expresión de la caspasa 3 activa respectivamente (Tabla 3).

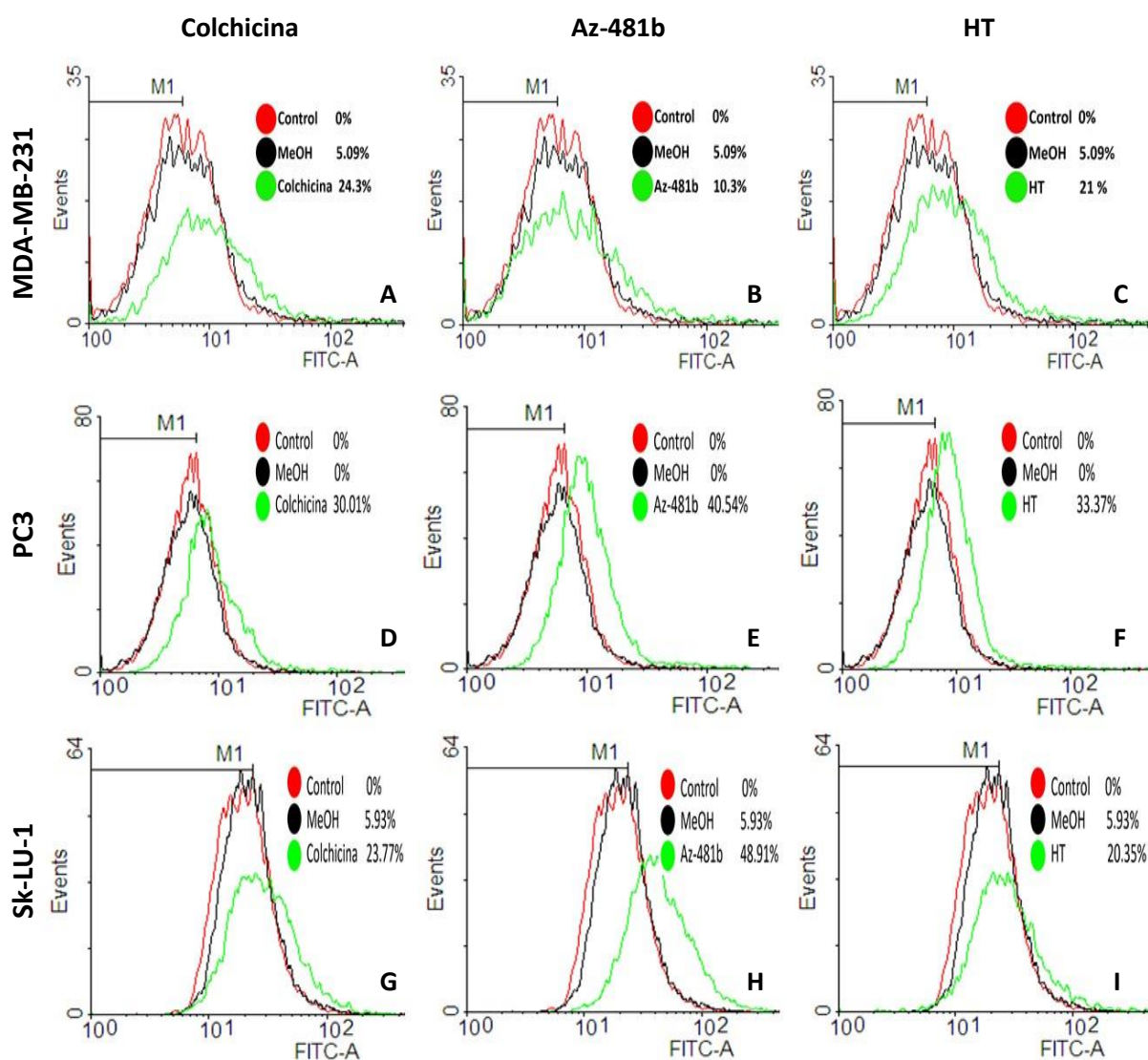


Fig. 11. Actividad de la enzima Casp-3 activa en cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 (5x10⁴ células/pozo en placas de 24 pozos) estimulados con sus respectivas IC₅₀ de los compuestos fenólicos Az-481b y HT.

Línea celular	Actividad de la Casp-3 activa (%)	
	Az-481b	HT
MDA-MB-231	10.3	21
PC3	40.54	33.37
Sk-LU-1	48.91	20.35

Tabla 3. Valores de actividad de la Casp-3 activa en las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 tratadas con sus respectivas IC₅₀ de los compuestos fenólicos Az-481b y HT.

Efecto de Az-481b sobre el potencial proliferativo de células no tumorales.

Con el propósito de determinar si Az-481b presenta actividad selectiva sobre líneas celulares de MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 sin afectar el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana, fueron cultivados en presencia de Az-481b y HT a concentraciones de 70, 81, 37.7 y 15.15, 27.4, 28.2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Los datos obtenidos indican que la concentración de Az-481b empleada, afecta negativamente el potencial proliferativo de cultivos primarios de linfocitos humanos extraídos de sangre periférica humana. Los cultivos estimulados con fitohemaglutinina desarrollaron un 87.86 % de proliferación, mientras que los tratados con MeOH un 85.26, Az-481b y HT, también en presencia de fitohemaglutinina, desarrollaron 34.78%, 34.14%, 29.89% y, 80.98%, 73.77%, 63.29% respectivamente (Fig. 12)

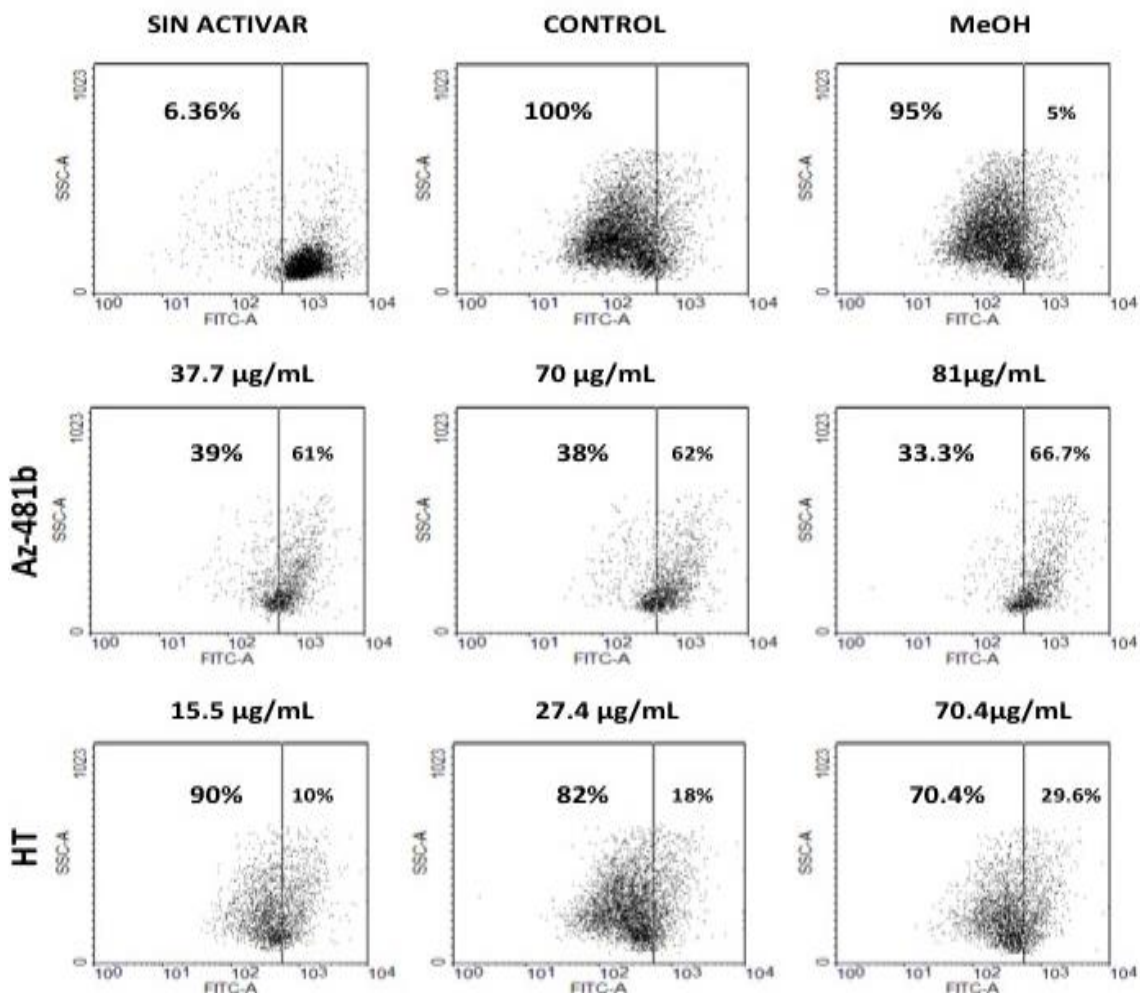


Fig. 12. Efecto de Az-481b y HT sobre cultivos de linfocitos humano estimulados por 72 h con la IC₅₀ correspondiente a las líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y SK-LU-1. Cultivos de 2X10⁵ células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con un volumen de 200 µl, marcados con CFS. La evaluación se realizó por citometría de flujo. La figura representa uno de tres ensayos independientes.

Como parámetro comparativo se determinó si los compuestos Az-481b y HT inducen muerte celular por necrosis en cultivos primarios de linfocitos humanos, para ello se realizó la misma prueba para medir actividad de la enzima LDH en los medios de cultivo de estas células, encontrando que en estos cultivos el compuesto Az-481b no induce una necrosis a las concentraciones de 70, 81 y 37.7 µg/ml de las IC₅₀, estas concentraciones solo indujeron actividad de LDH en un 7.88%, 13.15% y 0 % respectivamente, así mismo, las concentraciones de IC₅₀ del HT 15.15, 27.4 y 28.2 µg/ml no inducen muerte por necrosis, generando una actividad de la LDH en un 4.98%, 7.43% y 2.61% respectivamente, las cuales está por debajo de la actividad detectada en los cultivos controles (para ambos compuestos) (Fig. 13).

LDH vs Linfocitos

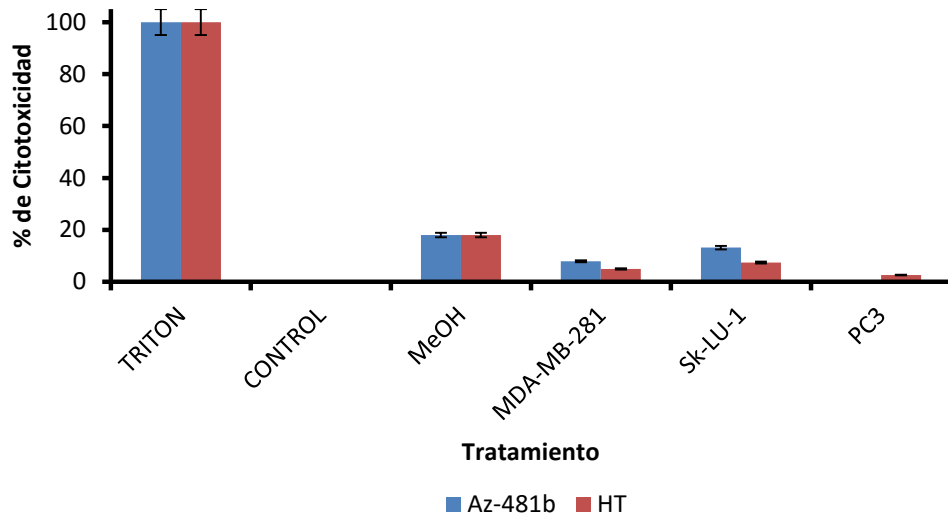


Fig. 13. Determinación de actividad de LDH en cultivos de linfocitos humanos (200,000 células por pozo, 200 ml por pozo en placas de cultivo de 96 pozos) estimulados con las IC50 de ambos compuestos para cada línea celular de cáncer. La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado (* $p < 0.05$ vs MeOH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

DISCUSIÓN

Actualmente en nuestro país y en el mundo, el cáncer es la principal causa de mortalidad. Siendo el cáncer de mama el más común entre las mujeres mayores de 25 años en todo el mundo, y en México; el cáncer de próstata a nivel mundial es el segundo más común entre hombres, siendo en México, el principal tipo de cáncer que afecta a hombres. Por otra parte, el cáncer de pulmón es el segundo más mortal para hombres, después del de próstata, y el cuarto más mortal para las mujeres. Actualmente, los tratamientos aplicados contra estos tipos de cáncer carecen de selectividad sobre células tumorales y carecen de éxito en estadios avanzados de esta enfermedad, además de provocar efectos secundarios graves que afectan la calidad de vida del paciente. Esta situación ha alentado un creciente interés en la búsqueda de nuevas sustancias antitumorales, con propiedades quimioterapéuticas que puedan inhibir y eliminar el proceso oncogénico y que sean de origen natural, especialmente de origen vegetal. Entre las familias de compuestos de origen vegetal más ampliamente estudiadas se encuentra la de compuestos fenólicos, cuyo miembro más representativo es el hidroxitirosol (HT) por su eficiencia en términos de captación de radicales libres. El HT se puede encontrar en las hojas y frutos de *Olea europea* L., y se produce como metabolito de la oleuropeína, al que se le han encontrado usos medicinales como antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral, no solo se ha explorado su papel como alimento, sino que actualmente se desea encontrar compuestos bioactivos, derivados, con propiedades quimioterapéuticas o quimiopreventivas que puedan inhibir el proceso oncogénico. Por ejemplo, se ha reportado que el hidroxitirosol inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Siriani et al, 2010; Bulotta et al, 2011), células HT29 de carcinoma de colon humano (Guichard et al, 2006), células humanas de melanoma M14 y células humanas de próstata PC3 (Quiles et al, 2002; D'Angelo et al, 2005). Sin embargo, pese a su prometedora aplicación farmacológica, su uso está en duda por su efecto de alta citotoxicidad al generar una muerte necrótica, lo que generó la necesidad de desarrollar moléculas derivadas que conserven o mejoren tal propiedad antitumoral.

En ese sentido, en el presente trabajo se evaluó el compuesto Az-481b el cual fue sintetizado a partir de la molécula de HT y se evaluó su actividad biológica en las líneas celulares de cáncer MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1, las cuales fueron tratadas con concentraciones de 30 a 100 µg/ml, rango de concentración que concuerda con evaluaciones realizadas a diferentes compuestos fenólicos (L. Fan et al, 2014; J. Anter et al, 2014). Las líneas celulares MDA-MB-231 y PC3 son

adenocarcinomas metastásicos. Las IC_{50} determinadas para estas dos líneas celulares de Az-481b son de 70 $\mu\text{g/ml}$ y 81 $\mu\text{g/ml}$ y, para HT de 15.15 $\mu\text{g/ml}$ y 27.4 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, sin embargo, la línea celular Sk-LU-1 presentó la concentración IC_{50} más baja, 37.7 $\mu\text{g/ml}$ para Az-481b, caso contrario para HT, donde presentó la concentración más alta, 28.2 $\mu\text{g/ml}$. Esta línea es un adenocarcinoma no metastásico.

Los tratamientos con Az-481b y HT en las tres líneas celulares MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 a concentraciones de sus correspondientes IC_{50} , indujeron alteraciones en las formas de las células, lo que indica un proceso de muerte.

Con el antecedente que compuestos de origen natural (Berhow, 2007) como las sapogeninas (Chun-Te C, *et al*, 2007) tienen propiedades hemolíticas, y para saber si el compuesto fenólico Az-481b afecta la integridad de la membrana plasmática de las células MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1, e induce en ellas muerte celular por necrosis, se evaluó la presencia de la enzima citoplasmática LDH en los medios sobrenadantes de los cultivos de estas líneas celulares, encontrando que las líneas MDA-MB-231 y PC3 presentan una diferencia significativa con respecto a su control MeOH, alcanzando un 13.2% y 9% ($p \leq 0.05$) respectivamente, mientras que en la línea Sk-LU-1 no genera una muerte por necrosis con un 1.2% de actividad de esta enzima, sin embargo, el HT generó significativamente la liberación de la enzima en las líneas PC3 y Sk-LU-1, en un 3% y 20.3% ($p \leq 0.05$) respectivamente, no así para la línea MDA-MB-231, con 0.8% de actividad de la enzima LDH. Tal actividad generada por Az-481b y HT no dan cuenta de la disminución del 50% en el número celular por lo que se evaluó muerte celular por apoptosis, pues se puede inferir que el Az-481b, inhibe la proliferación de las células por muerte celular apoptótica, propiedad conservada del HT, ya que se ha descrito que el HT puede ejercer un efecto pro-apoptótico mediante la modulación de la expresión de los genes implicados en la proliferación de células tumorales de colon humano (células DLD1), mediante la generación de ROS (Lijuan Sun, Cheng Luo & Jiankang Liu, 2014).

Se conocen procesos de muerte celular que ocurren de manera natural, con una acción silenciosa, sin generar un estado inflamatorio, entre los mecanismos de muerte celular más conocidos y estudiados se encuentran la muerte celular programada conocida como apoptosis (Hengartner, M.O., 2000). Las características morfológicas principales de la apoptosis son la condensación y la fragmentación nuclear, la reducción del volumen citoplásmico, la pérdida del contacto célula-célula y el desprendimiento de las células vecinas (en cultivos de células adherentes, las células se desprenden del sustrato y flotan en el medio de cultivo), formación de ampollas de la membrana

plasmática, la fragmentación de la célula en varios cuerpos apoptóticos y la fagocitosis de las células apoptóticas por los órganos/células vecinas o fagocitos profesionales. Una de las características importantes de la apoptosis es el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática con el fin de evitar una respuesta inflamatoria (James W. Wilson *et al*, 2000). De tal forma al realizar la tinción con DAPI tras estimular con las IC₅₀ respectivas de los compuestos fenólicos Az-481b y HT en los cultivos de las líneas tumorales MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1, se observó en las micrografías de contraste de fases, en comparación con los controles negativo (sin estímulo) y las células estimuladas con 1 µl de MeOH, que las células tienen pérdida de sus prolongaciones citoplásmicas (las cuales son características para cada línea celular), pérdida del volumen del citoplasma y por consiguiente la compactación de las células, las células se tornaron opacas y/o oscuras en comparación de las células de los controles donde las células se observan brillantes, así como fragmentación de las células; en las micrografías teñidas con DAPI, en las células tratadas con los compuestos fenólicos, se observa compactación de la cromatina.

Una manera de determinar la activación y ejecución de la apoptosis es mediante la evaluación de las proteínas implicadas en este mecanismo tan complejo. Las caspasas (hasta ahora sólo se conocen 14 tipos) son cruciales para este proceso. La caspasa-3 activada, es una proteasa de muerte, muy importante para los procesos de muerte celular y es esencial para algunos de los cambios característicos en la morfología celular y ciertos eventos bioquímicos asociados con la ejecución y buen término de la apoptosis (Thomberry N.A; Lazebnik Y., 1998). La expresión de la caspasa-3 activa se determinó por inmunofluorescencia y se cuantificó evaluando la cantidad de luminiscencia emitida a través de citometría de flujo. Al evaluar los compuestos fenólicos Az-481b y HT sobre las líneas celulares tumorales, se encontró que para la línea celular MDA-MB-231 el porcentaje de actividad de la caspasa 3 activa fue de 10.3% y 21% respectivamente, resultado que no exhibe una mejora en el potencial pro-apoptótico del compuesto Az-481 derivado del HT, no así en el caso de las líneas celulares PC3 y Sk-LU-1 donde los resultados fueron 40.54% y 48.91% para el Az-481b respectivamente y, 33.37% y 20.35% para el HT respectivamente.

Con los resultados anteriores podemos decir que el Az-481b exhibe un mayor potencial pro-apoptótico sobre las líneas celulares PC3 y Sk-LU-1 que el HT.

Los fármacos empleados en el tratamiento contra el cáncer afectan también a células normales que se encuentran en constante proliferación en el organismo, siendo así, que los

quimioterapéuticos afectan tanto a células anormales como normales, generando efectos secundarios adversos que comprometen la calidad de vida del paciente (Bronner, *et al*, 1998), así mismo el empleo sistémico de los quimioterapéuticos induce un decremento en el conteo de leucocitos en sangre (Ellis, *et al*, 2009). Al evaluar el efecto de Az-481b y HT sobre cultivos de linfocitos se encontró que las concentraciones de IC_{50} de MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1, afectan el potencial proliferativo de los linfocitos, sin embargo, no induce muerte celular por necrosis en cultivos estimulados por 72 h.

Los resultados anteriores, obtenidos de cultivos primarios de linfocitos humanos, indican que Az-481b es un compuesto derivado del hidroxitirosol (HT) con actividad antiproliferativa, bajo o nulo efecto citotóxico, importante efecto pro-apoptótico y considerable selectividad, lo cual lo coloca como un candidato a seguir su evaluación en modelos *in vivo*, y así se perfile a una posible aplicación terapéutica.

CONCLUSIONES

- El compuesto Az-481b inhibe la proliferación en las líneas celulares tumorales de mama (MDA-MB-231), próstata (PC3) y pulmón (Sk-LU-1) a concentraciones de 70 µg/ml, 81 µg/ml y 37.7 µg/ml respectivamente.
- El compuesto Az-481b induce un efecto necrótico en células tumorales MDA-MB-231 y PC3 en un 13.2% y 9% respectivamente, mientras que el HT induce un efecto necrótico sobre las células PC3 y Sk-LU-1 en un 3% y 20.3% respectivamente.
- Los compuestos fenólicos Az-481b y HT generan la compactación de la cromatina y la actividad de la caspasa-3 activa en un 10.27%, 40.54%, 48.91% y 21.02%, 33.37%, 20.35% respectivamente de las líneas MDA-MB-231, PC3 y Sk-LU-1 a las IC₅₀ correspondientes para cada línea.
- Los compuestos Az-481b y HT si afectan la proliferación de las células linfocíticas. Sin embargo, no induce en ellas una muerte por necrosis.

Bibliografía

- ❖ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K y Watson J., 2004. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª ed. Garland Publishing inc. New York. Pág. 1294.
- ❖ Albertsen PC, Moore DF, Shih W, et al. 2011. Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 29 (10): 1335-41.
- ❖ American Cancer Society. 2013. *Cáncer de seno (mama)*. Consultado el 10 de Abril de 2015. En: www.cancer.org/
- ❖ American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2012*. Atlanta, Ga: American Cancer Society,
- ❖ Appendino G., De Petrocellis L., Trevisani M., Minassi A., Daddario N., Moriello A. S., Gazzieri D., Ligresti A., Campi B., Fontana G., Pinna C., Geppetti P. y V. Di Marzo. 2005b. Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels, and its therapeutic potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 312: 561–570.
- ❖ Appendino G., Minassi A., Morello A., De Petrocellis L. y V. Di Marzo. 2002. N-acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*; 45: 3739-3745.
- ❖ Arias J. 2000. *Enfermería médico-quirúrgica, Volumen 1*. Editorial Tebar. p. 119.
- ❖ Barbone, F; Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. 1997. «Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men». *Chest (PDF) (American College of Chest Physicians)* 112 (6): 1474–1479.
- ❖ Berhow A. 2007. "Centro nacional de investigación de utilización agrícola". *Revista Carcinogenesis. Volumen 26*.
- ❖ Bernal Bernal R., León Jiménez A., Jaén Olasolo J. *et al.* 2008. Recidiva local tras la cirugía del cáncer de pulmón no microcítico: Factores pronósticos. *An. Med. Interna (Madrid)*. 25(2): 55-60.
- ❖ Bronner AK, Hood AF. 1983. Cutaneous complications of chemotherapeutic agents. *J Am Acad Dermatol* 9:645-663
- ❖ Bullota et al. 2011. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chem* 127: 1609-1614.
- ❖ Burgués J., Pontones J., Vera C., Jiménez J. y Ozonas M., 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol. Esp.* 29:846-859.
- ❖ Caballero A. y Moran J., 2002. Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte por apoptótica. *REB.* 21:235-244.
- ❖ Cameron R., 1995. *Oncología Práctica*. Ed Médica Panamericana. Pág. 5-24.
- ❖ Chun-Te C., Tzong-Der W., Shang-Jie T. & Jen-Kun L. 2007. "Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in her-overexpressing breast cancer cells through modulating gr-akt, m tor and jnk phosphorylation". *FEBS Letters* número 581.

- ❖ Clavero R, José M, Villanueva G, Pablo, Solovera R, María E *et al.* 2008. Tumor de Pancoast con lesión hipofisiaria sincrónica. *Rev. chil. enferm. Respir.* 23(3):197-202.
- ❖ Cohen G., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326:1-16.
- ❖ Collins, LG; Haines C, Perkel R, Enck RE. 2007. «Lung cancer: diagnosis and management». *American Family Physician (American Academy of Family Physicians)* 75 (1): 56–63.
- ❖ D'Angelo S., Ingrosso D., Migliardi V., Sorrentino A., Donnarumma G., Baroni A., et al. 2005. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 38: 908-919.
- ❖ De Toro G., 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosi-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas del 8° CVHAP.* 1:1-13.
- ❖ Department of Health and Human Services. 2006. "The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General". U.S.
- ❖ Ellis, L.M. y Reardon, D.A. 2009. Cancer: The nuances of therapy. *Nature* 458,290-292.
- ❖ Evan G. y Vousden K., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 411:342-348.
- ❖ Fabiani R., Rosignoli P., De Bartolomeo A., Fuccelli R., Servili M., & Morozzi G. 2001. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenol compounds induce apoptosis on HL60 cells. *Food Chem* 125:1249-1255.
- ❖ Fernández MA., López H., Hernández V., López M., Escobar L., Sánchez L., Pinto B., Sandoval J. 2010. Synthesis of 26-hydroxy-22 oxocholestanic frameworks from diogenin and hecogenin cervical cancer CaSki cells. *Bioor Med Chem.* 18: 2474-2484.
- ❖ Gorlova, OY; Weng SF, Zhang Y *et al.* 2007. «Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients». *International Journal of Cancer* 121 (1):111–18.
- ❖ Goya L., Mateos R., & Bravo L. 2007. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells protection against oxidative stress induced by tertbutylhydroperoxide. *Eur J Nutr* 46: 70-78.
- ❖ Guichard C., Pedruzzi E., Fay M., Marie JC., Braut-Boucher F., Daniel F., *et al.* 2006. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PPSA and promotes the endoplasmatic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27: 1812-1827.
- ❖ Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-6
- ❖ Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al., eds. 2011. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. Bethesda, Md: National Cancer Institute.
- ❖ Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS). 2015. Cáncer de próstata. En: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>. Consulta: 10 de Abril de 2015.
- ❖ Instituto Nacional del Cáncer (INC), 2008. «Clasificación celular del cáncer de pulmón de células no pequeñas». Consultado el 22 de febrero de 2015.
- ❖ Irfan Maghfoor y *col.* 2006. Lung Cancer, Oat Cell (Small Cell) (artículo completo disponible en inglés). eMedicine.com (WebMD): Oncología.
- ❖ Israels E., e Israels L., 2000. The cell cycle. *The Oncol. Fund. Can. Med.* 5:510-513.

- ❖ J. Anter, Inmaculada Tasset, Sebastián Demyda-Peyrás, Isidora Ranchal, Miguel Moreno-Millán, Magdalena Moreno-Jimenez, Jordi Muntané, María Dolores Luque de Castro, Andrés Muñoz-Serrano, Ángeles Alonso-Moraga. 2014. Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product “alperujo”, hydroxytyrosol, tyrosol and verboscoside. *Mutation Research*. 772:25-33.
- ❖ James W. Wilson, Catherine Booth & Christopher S. Potten. 2000. Apoptosis genes. Kluwer Academic Publishers. Pp. 3
- ❖ Johns H. y Conningham J., 1981. *The Physics of Radiology*. 3er ed. Chales e Thomas Publisher. USA. Pág. 695-701.
- ❖ Jordán J., 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*. 22:100-106.
- ❖ Kane Madeleine A. & Paul A Bunn. 1998. Biology of lung cancer (en inglés). Informa Health Care. p. 503.
- ❖ Karp G., 2006. *Biología Celular y Molecular*. 4ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. Pág. 899.
- ❖ Katzung, Bertram G. 2007. «Chapter 55. Cancer Chemotherapy». *Basic & Clinical Pharmacology*. 9ª ed. McGraw-Hill.
- ❖ Keys. 1995. Mediterranean diet and public Health: personal reflections. *American Journal of Clinical Nutrition* 61, 1321-1323.
- ❖ Khoury S., y Dasmin C., 1981. Cáncer: los grandes especialistas responden. Librería Hachette. España. Pág. 221-227.
- ❖ Li Fan, Yalin Ma, Ying Liu, Dongping Zheng, Guangrong Huang. 2014. Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 743: 79-88.
- ❖ Lijuan Sun, Cheng Luo & Jiankang Liu. 2014. hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cells through ROS generation. *The Royal Society of Chemistry, Food Funct*. 5:1909-14.
- ❖ Liss MA, Chang A, Santos R, *et al*. 2011. Prevalence and significance of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* in patients undergoing transrectal ultrasound guided prostate needle biopsy. *J Urol* 185 (4): 1283-8.
- ❖ Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D. y Damell J. 2000. *Biología celular y molecular*. Ed. Medica Panamericana. Madrid. Pág. 177-181.
- ❖ Minna JD. 2004. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill. pp. 506–516.
- ❖ Miyashita T. y Reed J. 1993. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*. 81:151-157.
- ❖ Nam RK, Saskin R, Lee Y, *et al*. 2010. Increasing hospital admission rates for urological complications after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *J Urol* 183 (3): 963-8.
- ❖ Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB., 2003. Prostate cancer. *N Engl J Med* 349 (4): 366-81, 2.
- ❖ Netter, Frank H.; Buja, Maximilian; Krueger, Gerhard. 2006. «Tumores pulmonares y pleurales». *Anatomía patológica*. Elsevier.
- ❖ Omar SH. 2010. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J* 18: 111-121.

- ❖ Peralta Z., Bahena R., Díaz B. y Madrid M. 1997. Relationship between cell cycle and cancer development: Therapeutically approaches. *Salud pública*. México.39:451-452.
- ❖ Pérez-Jiménez F., Álvarez de Cienfuegos G., Badimon L., Barja G., Battino M., Blanco A, *et al.* 2005. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 35: 421-424.
- ❖ Pilar Garrido. 2004. El Mundo del Siglo XXI, ed. «¿Qué porcentaje de casos de cáncer de pulmón se cura?». Consultado el 10 de abril de 2015.
- ❖ Porter G. 2006. Flipping the safety catch of procaspase-3. *Nat. Chem. Biol.* 2:509-510.
- ❖ Quiles JL., Farquharson AJ., Simpson DK., Grant I., & Wahle KWJ. 2002. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme Mrna in prostate cells. *Br J Nutr.* 88: 225-234.
- ❖ Raff M. 1998. Cell suicide for bebeginners. *Nat.* 396:119-122.
- ❖ Raz, DJ; He B, Rosell R, Jablons DM. 2006. «Bronchioloalveolar carcinoma: a review». *Clinical Lung Cancer (Cancer Information Group)* 7 (5): 313–322.
- ❖ Rosti, G; Bevilacqua G, Bidoli P *et al.* 2006. «Small cell lung cancer». *Annals of Oncology* 17 (Suppl. 2): 5–10.
- ❖ Sánchez-Socarrás V., 2001. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 20: 266-274.
- ❖ Schafer K., 1998. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.* 35:461-478.
- ❖ Schmitt C-, Fridman J., Yang M., Baranow E., Hoffman R. y Lowe S., 2002. Dissecting p53 tumor suppressor function in vivo. *Cancer Cell.* 1:289-292.
- ❖ Secretaría de Salud. 2007. Programa de acción: cáncer de mama. 2007-2012. México. p. 11
- ❖ Secretaria de Salud. 2013. Los 5 tipos de cáncer que afectan a mexicanos. México.
- ❖ Siriani R., Chimento A., De Luca A., Casaburi I., Rizza P., Onofrio A., *et al.* 2010. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res* 54: 833-840.
- ❖ Solary E., Dubrez L. y Eymin B., 1996. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J.* 9:1293-1305.
- ❖ Subramanian J. & Govindan R., 2007. «Lung cancer in never smokers: a review». *Journal of Clinical Oncology (American Society of Clinical Oncology)* 25 (5): 561–570.
- ❖ Terasaki H., Niki T y *col.* 2003. «Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization». *Am J Surg Pathol* 27 (7): 937–951.
- ❖ Thomberry NA; Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281: 1312-6
- ❖ Travis WD, Travis LB, DeVesa SS., 1995. Lung Cancer. *Cancer;* 75:191-202.
- ❖ Travis, WD; Travis LB, DeVesa SS., 1995. «Lung cancer». *Cancer* 75 (Suppl. 1): 191–202.
- ❖ Tuleski, M. J., Escuissato D. L. and Barros J A DE. 2000. Imagem por ressonância magnética em paciente jovem com hemoptise e radiografia de tórax normal. *J. Pneumologia.* 26(2):81-82.
- ❖ Vaporciyan, AA; Nesbitt JC, Lee JS *et al.* 2000. *Cancer Medicine.* B C Decker Inc. pp. 1227–1292.
- ❖ Veronesi G; Morandi U, Alloisio M *et al.* 2006. «Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a retrospective analysis of 144 surgical cases». *Lung Cancer* 53 (1): 111–115.

- ❖ Webb JA, Shanmuganathan K, McLean A., 1993. Complications of ultrasound-guided transperineal prostate biopsy. A prospective study. *Br J Urol* 72 (5 Pt 2): 775-7.
- ❖ Welch HG y Albertsen PC. 2011. Prostate cancer diagnosis and treatment after the introduction of prostate-specific antigen screening: 1986-2005. *J Natl Cancer Inst* 101 (19): 1325-9.
- ❖ Zelefsky MJ, Eastham JA, Sartor AO. 2011. Cancer of the prostate. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp 1220-71.

APÉNDICE

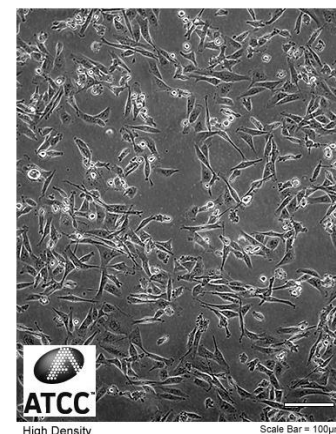
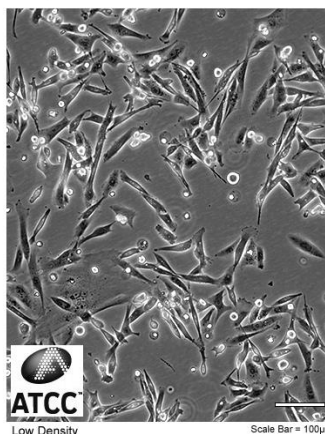
Descripción general de las líneas celulares tumorales empleadas. (ATCC: The Global Bioresource Center: www.atcc.org)

MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26™) (Cáncer de mama)

ATCC® Number: CRM-HTB-26™

- Organismo: Homo sapiens , humano
- Tipo de Célula : epitelial /adherentes
- Tejido : Glándula Mamaria/mama
- Derivado: MDA-MB-231 se inició a partir de una metástasis pleural de un adenocarcinoma de mama de una mujer caucásica de 51 años de edad
- Cariotipo: casi triploide con un número modal de 64 cromosomas
- La expresión del receptor: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF alfa) , expresado
- Oncogén: las células expresan el oncogén Wnt7b

ATCC Number: **HTB-26™**
Designation: **MDA-MB-231**

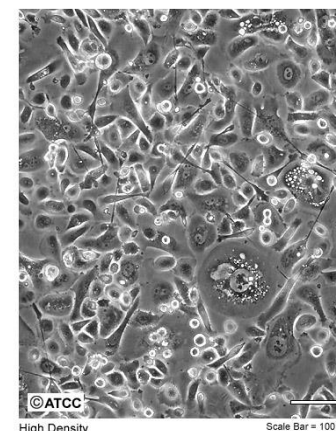
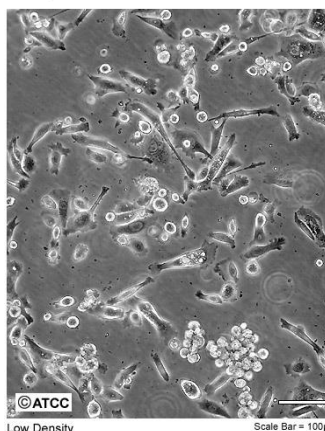


PC3 (ATCC® CRL-1435™) (Cáncer de próstata)

ATCC® Número: CRL-1435™

- Organismo: Homo sapiens , humano
- Tipo de célula: epitelial/adherente
- Tejido: próstata
- Derivado: PC3 se inició a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de grado IV de un hombre caucásico de 62 años de edad.
- Cariotipo: casi triploide con un número modal de 62 cromosomas
- Expresión del antígeno HLA A1, A9
- Los genes expresados HLA A1, A9
- Comentarios: las células presentan baja fosfatasa ácida y la actividad de la actividad de la testosterona-5-alfa reductasa

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**



SK-LU-1 (ATCC® HTB-57™) (Cáncer de pulmón)

ATCC® Número: HTB-57™

Organismo: Homo sapiens , humano

Tipo de Célula : epitelial /edherente

Tejido : pulmón

Derivado: SK-LU-1 se inició a partir de un adenocarcinoma de pulmonar de una mujer caucásica de 60 años de edad

Cariotipo: casi tetraploide

Comentarios: la contaminación por micoplasma se detectó y eliminó en 1971

