



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN  
EXPERIMENTAL ZARAGOZA**

Unidad De Investigación En Diferenciación Celular y Cáncer  
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

“Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del Disulfuro de bis  
(2-[2’-(3”.4”-metilendioxfenil) acetamido] 2-metoxicarbonil) etilo  
(AZ-269) en líneas celulares provenientes de cáncer de mama  
(MDA-MB-231), próstata (PC-3) y pulmón (SK-LU-1).”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

**P R E S E N T A:**

EDSON AGUILLÓN SOLÍS



DIRECTOR DE TESIS: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

México, CDMX

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

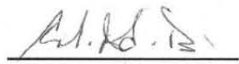

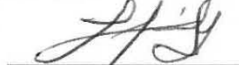
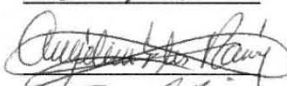
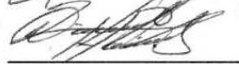
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **AGUILLÓN SOLÍS EDSON**, con número de cuenta **309063074**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **18 de octubre de 2016** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** M. en E.S. **MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ** 
- VOCAL** Dr. **HUGO LÓPEZ MUÑOZ** 
- SECRETARIO** M. en C. **LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ** 
- SUPLENTE** M. en IBSH. **ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ** 
- SUPLENTE** M. en C. **JOSÉ MISAEAL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ** 

El título de la tesis que presenta es: **Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del Disulfuro de bis (2-[2'-(3".4"-metilendioxfenil) acetamido] 2-metoxicarbonil) etilo (AZ-269) en líneas celulares provenientes de cáncer de mama (MDA-MB-231), próstata (PC-3) y pulmón (SK-LU-1).**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
 Ciudad de México, a 22 de septiembre de 2016

  
**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NUÑEZ**  
 DIRECTOR

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**ZARAGOZA**  
**DIRECCIÓN**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

## Agradecimientos

Al **Dr. Hugo López Muñoz**, quien con su experiencia me guió por el camino adecuado para poder concluir una etapa más en mi formación profesional, por su confianza y camaradería.

Al **M en C. José Misael Vicente Hernández**, por compartir su conocimiento, pieza fundamental en mi formación académica.

Al **M en C. Luis Sánchez Sánchez**, por permitirme incorporarme en su equipo de trabajo y proporcionar todo lo necesario para concluir este trabajo.

A la **M en E.S María Cristina Alvarado Domínguez** y a la **M en IBSH. Angélica Flores Ramírez** por las aportaciones y observaciones a este trabajo.

El presente trabajo fue realizado con apoyo de los proyectos PAPIIT IN220916, PAPIIT IN222114, CONACyT 255881 y CONACyT 253979.

Gracias a todos aquellos que hicieron el camino más fácil.

A mis viejos amigos: Julio, Ignacio, Alejandro y Francisco.

A mis camaradas: Pedro Fernando, Luis Alberto, Jennifer, Leticia,  
Ana Karina, Erandy, Estefanía y Samuel.

A Maribel por estar a mi lado todo este tiempo.

## **Dedicatoria**

A mis hermanos Cristina y Darwin, por alentarme a continuar en todo momento. A mis padres Emilio y Sara, por enseñarme que siempre me puedo esforzar un poco más. A mi familia por su apoyo incondicional.

Índice	pág.
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
La célula .....	3
Ciclo celular .....	3
Muerte celular .....	4
Necrosis .....	6
Apoptosis .....	6
Cáncer .....	14
Tratamientos contra el cáncer .....	24
Productos de origen natural .....	25
Compuestos fenólicos .....	27
Aminoácidos .....	29
Péptidos fenólicos .....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	32
JUSTIFICACIÓN .....	32
HIPÓTESIS .....	32
OBJETIVOS .....	33
Objetivo general .....	33
Objetivos Particulares .....	33
MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
Cultivo celular .....	34
Determinación de $CI_{50}$ .....	35
Técnica de incorporación de cristal violeta .....	35
Evaluación de la inducción de muerte por necrosis mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) .....	36
Evaluación de muerte por apoptosis mediante compactación de cromatina por tinción con DAPI .....	37
Evaluación de muerte por apoptosis mediante inmunodetección de la caspasa-3 activa .....	38
Efecto del HT y AZ-269 sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica .....	39

Evaluación de la inducción de muerte por necrosis mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en linfocitos de sangre periférica .....	41
Análisis estadístico .....	41
RESULTADOS .....	42
Actividad antiproliferativa en células tumorales .....	42
Inducción de muerte por necrosis en células tumorales .....	44
Inducción de muerte por apoptosis en células tumorales .....	46
Evaluación del HT y AZ-269 sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica .....	53
Inducción de muerte por necrosis en linfocitos humanos .....	55
DISCUSIÓN .....	56
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS.....	61
APÉNDICE .....	71



## RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, el cáncer de mama el más común entre las mujeres, representando aproximadamente el 25% de los cánceres femeninos; el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar de incidencia de cáncer en hombres a nivel mundial, en México se encuentra posicionado como primero, representando el 21% de los casos de cáncer en varones; el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar de incidencia de cáncer para hombres a nivel mundial y el segundo lugar en México.

En la actualidad las terapias empleadas con mayor frecuencia para combatir esta enfermedad son la quimioterapia y la radioterapia, sin embargo, ambas resultan ser ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad, además de generar una serie de efectos secundarios, que merman la calidad de vida del paciente. Por lo que es importante la búsqueda de compuestos con potencial antitumoral, que los efectos secundarios sean mínimos o nulos. En ese sentido, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del Hidroxitirosol (HT) y de un derivado sintético, el AZ-269, modificado mediante la adición de residuos de aminoácidos, sobre líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), próstata (PC-3) y pulmón (SK-LU-1) así como en linfocitos humanos de sangre periférica.

Los resultados muestran que el compuesto HT inhibe la proliferación celular en un 50% a concentraciones de 97.95 $\mu$ M para MDA-MB-231, 181.62 $\mu$ M para PC-3 y 183.57 $\mu$ M para SK-LU-1 y el AZ-269 con una  $CI_{50}$  de 462.33 $\mu$ M para MDA-MB-231, 195.90  $\mu$ M para PC-3 y 123.68 $\mu$ M para SK-LU-1. La actividad necrótica del HT solo fue evidente para la línea SK-LU-1; para el compuesto AZ-269, se observó una inducción de necrosis en las tres líneas celulares. La evaluación de la morfología y compactación de cromatina mediante microscopia indica que ambos compuestos inducen una muerte por apoptosis. La detección de la caspasa-3 activa para el compuesto HT fue de 5.32% para MDA-MB-231, de 3.85% para PC-3 y 12.09% para SK-LU-1, en comparación, el porcentaje generado por el compuesto AZ-269 fue de 1.27%, 0.00% y 10.67% respectivamente. El potencial proliferativo de

linfocitos humanos tratados con las  $CI_{50}$  obtenidas para HT se encontró que permite un porcentaje de proliferación entre 57.74% y 77.33%, en comparación con el AZ-269, el cual solo permitió un 8.09%, como porcentaje máximo de proliferación y un mínimo de 4.22%. Sin embargo, no inducen muerte por necrosis en éstos.

Se concluye que el compuesto HT posee mejor actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de mama y próstata, sin inducir muerte por necrosis en comparación con el AZ-269. Sin embargo, este último posee mejor actividad antiproliferativa en la línea de cáncer pulmonar, además de inducir una muerte por necrosis menor en comparación con el HT. Los compuestos HT y AZ-269 generan una morfología apoptótica acompañada de la compactación de cromatina en las tres líneas celulares, mostrando un incremento en la detección de la caspasa-3-activa solo en la línea celular SK-LU-1. El compuesto HT afecta en menor medida el potencial proliferativo de linfocitos humanos, en comparación con el AZ-269, ambos sin inducir una muerte por necrosis.

# INTRODUCCIÓN

## La célula

La célula es la unidad básica de la vida, de forma convencional se denomina como la unidad estructural y funcional de todos los seres vivos, es decir, todos los organismos o bien es una única célula o están formados por células (Wayne *et al.*, 2007). A pesar de la gran diversidad de organismos y la basta complejidad de los procesos bioquímicos que realizan, todas se caracterizan por su capacidad de crecer y reproducirse, así como por su habilidad para responder a estímulos y adaptarse a cambios en el medio ambiente (Alberts *et al.*, 2008). En organismos pluricelulares las células mantienen una estrecha relación entre sí, poseen una estructura jerarquizada y trabajan en conjunto para mantener un estado de homeostasis (Anthony & Thibodeau, 1991), parte importante de esta homeostasis se logra mediante el mantenimiento del número celular en el organismo e implica su regulación a través del ciclo celular.

## Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso altamente ordenado que culmina en la duplicación y transmisión de la información genética desde una generación celular a la siguiente, para lo cual el ADN debe ser replicado con precisión y las copias cromosómicas idénticas son distribuidas a dos células hijas. El ciclo celular se puede dividir en dos grandes etapas, la interfase y la fase de división (Figura 1). La interfase se puede dividir a su vez en fases discretas: la fase G1, donde la célula está sujeta a estímulos por mitógenos extracelulares y factores de crecimiento; en respuesta a estos estímulos, la célula aumenta de tamaño y presenta una alta tasa de síntesis de proteínas requeridas para la progresión en el ciclo, posteriormente se lleva a cabo la síntesis del ADN en la fase S, como resultado cada cromosoma se duplica quedando conformado por dos cromátides idénticas, en la fase G2 continua la síntesis de proteínas requeridas para la división, acompañada de un aumento en el tamaño celular. La fase de división celular o fase M se caracteriza por la generación

del huso mitótico, la segregación de las cromátidas hermanas y la división nuclear y citocinesis (Alberts *et al.*, 2008).

La regulación del ciclo celular debe asegurar que los acontecimientos de cada fase se completen antes de pasar a la siguiente, de tal forma que los puntos de control del ciclo celular sirven para monitorear que los procesos metabólicos a través del éste se desarrollen adecuadamente; al final de G1 se verifica que existan las condiciones necesarias para la duplicación del ADN, en el punto de control en la interfaz G2/M se previene la progresión y propagación de ADN mutado o células dañadas, finalmente en la fase M asegura la correcta alineación de los cromosomas en el uso mitótico (Lodish *et al.*, 2005).

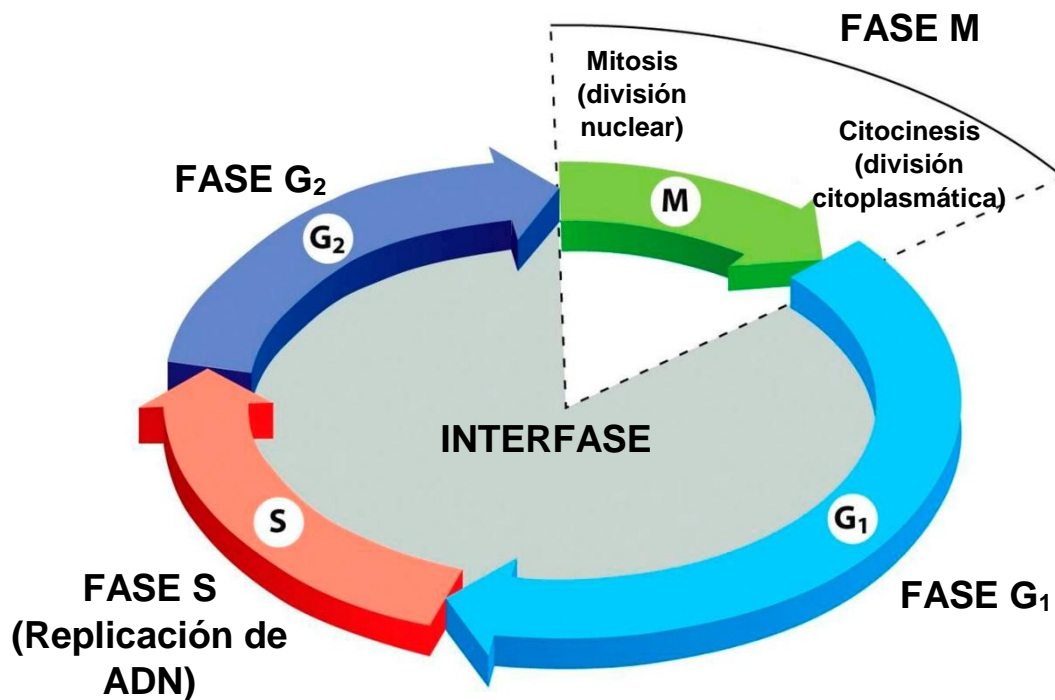


Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular. Tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2008.

### Muerte celular

Dentro de los organismos pluricelulares las células que no son necesarias, ya sea por causas lesivas, infección por algún microorganismo o virus, por acción de agentes químicos tóxicos, por la falta de nutrientes o por que forman parte de estructuras transitorias durante la formación del organismo adulto, son eliminadas.

Dicha eliminación ocurre por un proceso que involucra muerte celular y es fundamental en la homeostasis de cualquier organismo (Jiménez & Merchant, 2003).

Basándose en diferencias distintivas de la morfología, cambios químicos y moleculares de las células en proceso de muerte; se describirán dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis (Figura 2) (Bolsover, 2007).

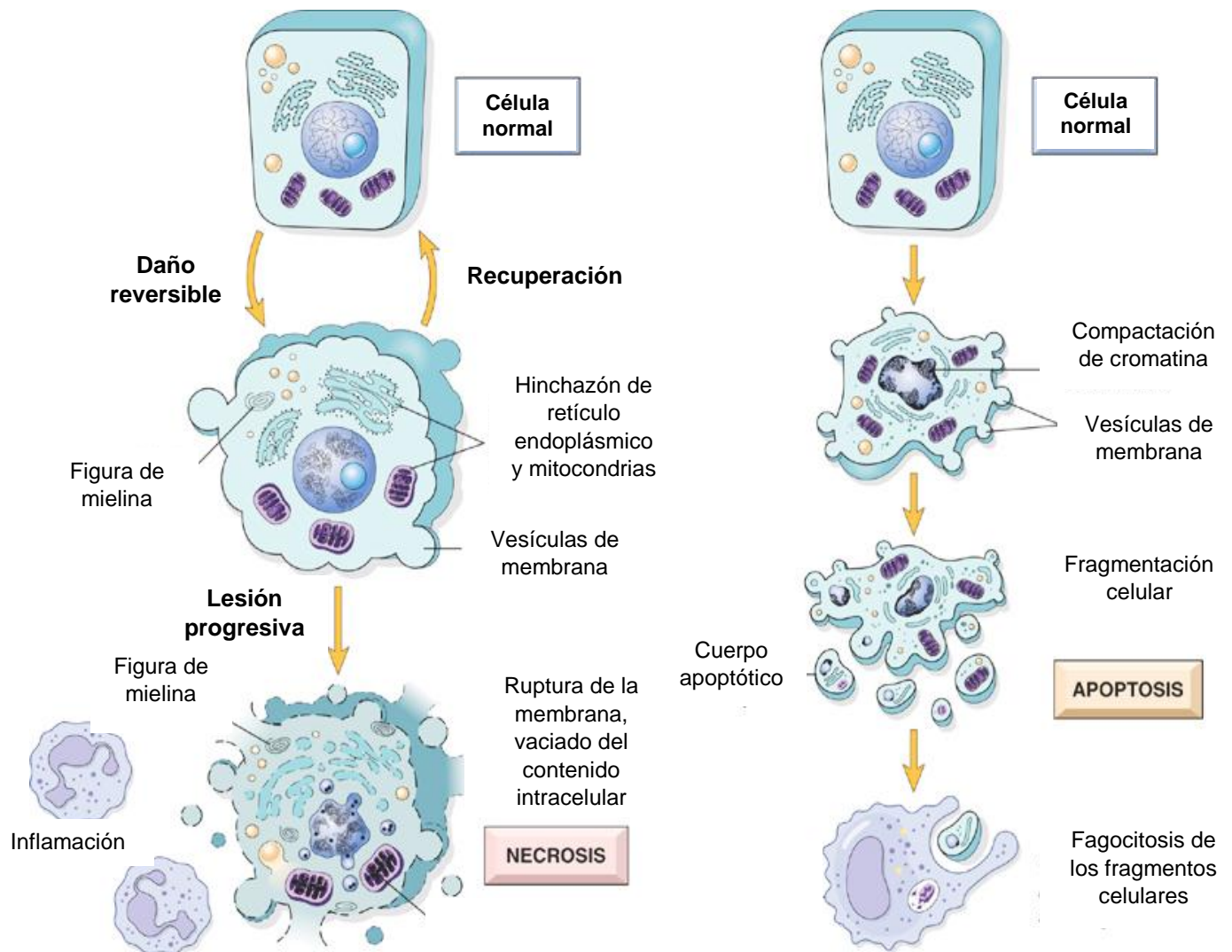


Figura 2. Tipos de muerte celular: Necrosis y Apoptosis. Tomado y modificado de: Kumar *et al.*, 2009.

## Necrosis

La necrosis (del griego *nekrós* “muerte”) es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica. Ésta se produce debido a agentes nocivos y condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), la falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a radiación ionizante o sustancias químicas (Lizarbe, 2007).

La necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo y accidental, consecuencia de la destrucción progresiva en su estructura con alteración de la función normal causada por un daño irreversible. En la necrosis se observan numerosas células adyacentes sometidas a este proceso, cubriendo una extensión variable, generando un daño colateral al tejido (Sánchez & Trejo, 2006).

Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento, la membrana plasmática se ve comprometida por cambios estructurales que afectan los poros y canales de membrana, alterando su permeabilidad, caracterizada morfológicamente por un aumento en el volumen celular, hinchazón de orgánulos, la cromatina sufre una dispersión irregular, cromatolisis (disolución de los cromosomas), cariolisis (disolución de la cromatina), cariorrexis (fragmentación del núcleo), la pérdida de la viabilidad se asocia con la ruptura de la membrana plasmática, su consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido intracelular; dañando el tejido adyacente y provocando reacciones inflamatorias (Sánchez, 2001; Karp, 2006; (Lizarbe, 2007).

## Apoptosis

En diferentes procesos como la embriogénesis, morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular, la eliminación de células que por diferentes razones ya no son requeridas por el organismo son eliminadas mediante una muerte celular programada genéticamente denominada apoptosis. Esta muerte natural de las células está diseñada de tal forma que el contenido intracelular no se vierta al exterior, como ocurre en la muerte accidental de algunas células ante condiciones

nocivas extremas, causando inflamación y daño al tejido adyacente (Jiménez & Merchant, 2003).

La apoptosis es considerada un proceso activo dependiente de energía, el cual puede iniciarse por una gran variedad de estímulos intracelulares o extracelulares, participando las células en su propia muerte de una forma organizada y eficiente (Alberts *et al.*, 2008).

Dentro de las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares destacan un grupo de proteasas denominadas caspasas, las cuales reciben este nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contiene residuos de aspartato seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa (Sánchez, 2001).

Todas las caspasas comparten similitudes en su secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato; son producidas como precursores inactivos llamados procaspasas (zimógenos inactivos que contienen tres dominios: el prodominio N-terminal y las subunidades enzimáticas grande y pequeña) que son posteriormente hidrolizados para generar enzimas activas, frecuentemente por otras caspasas en una cascada proteolítica; una vez que se activan, las caspasas fragmentan otras proteínas dentro de las células, lo que produce la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan (Bolsover, 2007).

Se han identificado once caspasas en la especie humana, de las cuales algunas se han implicado en el control de la inflamación y otras tienen un papel importante en desencadenar y ejecutar la apoptosis (alrededor de 7). Las caspasas se activan por una doble proteólisis: la primera divide la cadena en dos subunidades, una grande ( $\approx 20$  kDa) y una pequeña ( $\approx 10$  kDa) (las cuales se reconocen y asocian entre sí formando un monómero), y en el segundo corte se elimina el prodominio N-terminal; en comparación, la caspasa 9 es la excepción, ya que parece activarse por cambio conformacional. La caspasa activa se genera a partir de la interacción entre las subunidades pequeñas de dos monómeros de caspasa formando así un dímero,

conteniendo por tanto dos sitios activos de catálisis (véase Figura 3) (Shi, 2002; Riedl S & Shi, 2004).

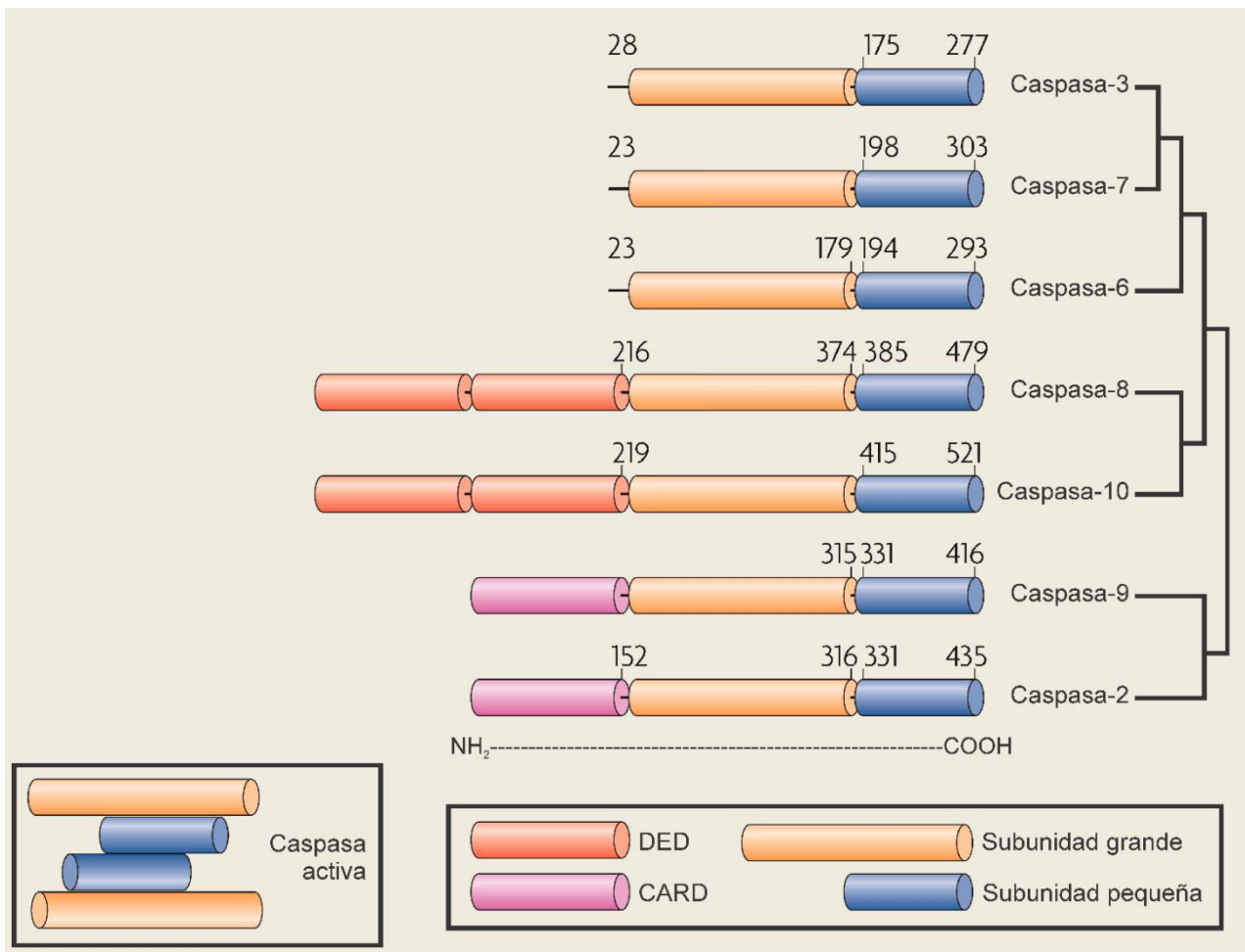


Figura 3. Representación de la conformación de caspasas implicadas en el proceso apoptótico. Tomado y modificado de: Taylor *et al.*, 2008.

Dentro del grupo de caspasas apoptóticas podemos distinguir dos tipos de caspasa:

- Caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), poseen un prodominio grande denominado CARD (Caspase Activation Recruitment Domain), o prodominios DED (Death Efector Domain) como las caspasas 8 y 10, el cual les permite interactuar con proteínas adaptadoras lo cual causa generalmente su activación por autoproteólisis.
- Caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7), poseen un prodominio pequeño y son los principales sustratos de las caspasas iniciadoras, una vez activadas regulan



la traslación de la fosfatidilserina en la superficie celular (funcionando como marcaje para células fagocíticas), ocasionan la ruptura controlada de proteínas y estructuras celulares, desmontan ordenadamente la célula, dando lugar al fenotipo apoptótico; específicamente la caspasa 3 rompe a la proteína inhibidora de CAD (DNasa Activada por Caspasas) con lo que CAD realiza la degradación oligonucleosomal del ADN (fragmentos de  $\approx 180$  pares de bases) típica de la apoptosis (Earnshaw *et al.*, 1999; Villamor, 2004).

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician este proceso, consiste en la condensación del citoplasma, acompañada de cambios en la estructura del núcleo, la cromatina se condensa y forma cúmulos densos, esto es seguido de modificaciones en la estructura de la envoltura nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina (Kroemer *et al.*, 2009). De igual manera, la membrana plasmática se fragmenta formando racimos de vesículas de tamaño variable que almacenan el contenido intracelular, estas vesículas se denominan cuerpos apoptóticos, los cuales son posteriormente fagocitados por células vecinas (Adams *et al.*, 2007).

Una de las características más relevantes es que el contenido intracelular no es liberado al espacio intersticial (Jiménez & Merchant, 2003).

El programa de apoptosis se desarrolla en varias etapas. En la primera, etapa iniciadora, la célula reacciona ante un estímulo determinado o ante su ausencia (señales de desarrollo, estrés celular, alteración del ciclo celular, etc.) decidiendo iniciar el proceso de apoptosis. En la etapa de ejecución, la célula sufre un conjunto de alteraciones moleculares que desencadenan la muerte celular, culminando con una fase de limpieza o eliminación de los cuerpos apoptóticos (Taylor *et al.*, 2008; Youle & Strasser, 2008).

Las rutas a través de las que se regula la apoptosis, así como las moléculas implicadas, se muestran en la Figura 4 y se describen a continuación.

### *Vía Extrínseca*

La vía extrínseca, también llamada vía de los receptores de muerte o apoptosis mediada por receptores, es inducida tras la unión de una proteína extracelular a su receptor, receptores pertenecientes a la superfamilia del receptor del TNF (Tumor Necrosis Factor) (Receptores que también participan en el control de otros procesos como la respuesta inmune e inflamatoria, la homeostasis ósea y el desarrollo y diferenciación de estructuras epiteliales), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y en el dominio intracelular, denominado dominio de muerte DD (Death Domain), posee una secuencia proteica necesaria para acoplar el receptor con la maquinaria apoptótica y generar la transmisión de la señal de muerte (Villamor, 2004; Lizarbe, 2007).

La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos (proteínas como FasL, TNF, etc.) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1, TRAILR1, etc.) (Danial & Korsmeyer, 2004). La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte DD de los receptores con los de las moléculas adaptadoras como la proteína FADD (Fas Associated Death Domain). Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DED capaces de interactuar con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte DISC (Death-Inducing Signaling Complex) que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 o 10. La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras, como son la caspasa 3 y caspasa 7 (Muzio *et al.*, 1996; Medema *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2008).

La activación de las caspasas 8 y 10 puede ser regulada por la proteína FLIP (Flice-like Inhibitory Protein), ésta contiene un dominio DED, lo que le permite unirse al prodominio de la procaspasa-8 bloqueando la interacción de dicha caspasa con los complejos receptor-proteína adaptadora e interfiriendo en el proceso apoptótico (Lizarbe, 2007).

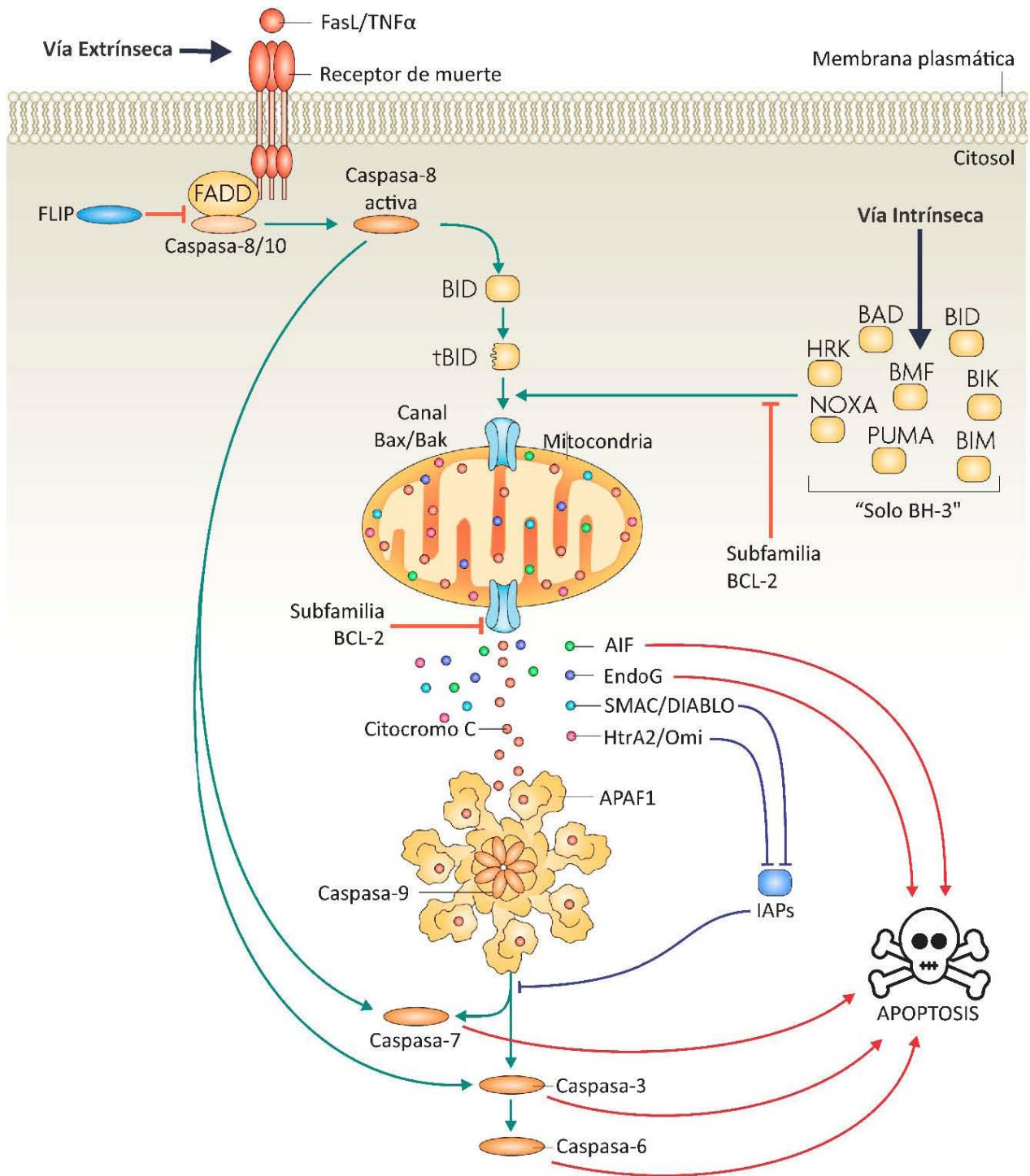


Figura 4. Rutas de activación de la apoptosis. Tomado y modificado de: Taylor *et al.*, 2008.

### *Vía Intrínseca*

También denominada vía mitocondrial, es la más conservada evolutivamente, donde desempeña un papel clave la mitocondria, es estrictamente controlada o regulada por miembros de la familia Bcl-2. Distintos agentes físicos o químicos que causan daño celular como fármacos quimioterapéuticos, radiaciones ionizantes, neurotoxinas, estrés térmico u oxidativo, funcionan como estímulos apoptóticos, que dan inicio a la cascada de señalización (Bras *et al.*, 2005).

El orgánulo mediador central de la vía es la mitocondria (la cual también puede ser mediador de la necrosis y autofagia), donde la permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por un poro complejo conocido como el megacanal mitocondrial o el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que mantiene la homeostasis de la matriz mitocondrial. La apertura de este canal conduce a un incremento en la permeabilidad de la membrana interna permitiendo la entrada o salida de diferentes moléculas (Orrenius, 2007; Lizarbe, 2007). Los componentes mínimos para la conformación del poro son:

- VDAC (Voltage-Dependent Anion Chanel), proteína de la membrana externa mitocondrial.
- Ciclofilina D, proteína que alberga en la matriz mitocondrial.
- ANT (Adenine Nucleotide Tanslocator), proteína de la membrana interna mitocondrial.

Algunos miembros de la familia Bcl-2 regulan la actividad de canal de las proteínas ANT y VDAC, como son las proteínas proapoptóticas multidominio, Bax y Bak, los cuales pueden actuar interaccionando con componentes del megacanal mitocondrial o bien pueden formar un canal oligomérico que conduce a un daño mitocondrial (Sharpe *et al.*, 2004; Gogvadze *et al.*, 2006; Orrenius, 2007), en este último modelo, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 que presentan un solo dominio BH3 juegan un papel clave, ya que se ha demostrado que Bid, en forma activa (tBid) se une rápidamente a la membrana, e interactúa con Bax, lo que desencadena la inserción de Bax en la membrana y la oligomerización, que culmina

en permeabilización de la membrana (Lovell *et al.*, 2008), independientemente de la naturaleza de la permeabilidad, una serie de proteínas son liberadas de las mitocondrias durante la apoptosis, que son esenciales para la correcta ejecución de dicho proceso (Wang & Youle, 2009), algunas son:

- Citocromo c
- El factor inductor de apoptosis (AIF)
- Endonucleasa G (Endo G)
- Smac/DIABLO (Smac: Second mitochondria-derived activator of caspases; DIABLO: Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point)
- Omi/HtrA2 (Oocyte Maturation Inhibitor/High temperatura requirement protein A2), una serín-proteasa.

La liberación del citocromo c es un evento crítico ya que éste interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) actuando como molécula adaptadora junto con dATP formando un complejo heptamérico que recluta a través de sus dominios CARD a la caspasa-9, causando un cambio conformacional lo que provoca su activación (apoptosoma), y marca el inicio de una serie de reacciones proteolíticas conocidas como “cascada de las caspasas”, rompiendo el prodominio de caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7, activándolas (Riedl & Salvesen, 2007; Youle & Strasser 2008).

Otras proteínas mitocondriales como Smac/Diablo y Omi/HtrA2 interaccionan con unas proteínas citosólicas llamadas IAP (Inhibitors of Apoptosis) que son inhibidores endógenos de las caspasas, los cuales se ha demostrado pueden inhibir a caspasa 3, 7 y 9 en su forma activa. Estas dos proteínas detienen la acción inhibidora de las IAP sobre las caspasas, permitiendo su activación y actividad (Villamor, 2004; Lizarbe, 2007).

Otra de las proteínas que se libera de la mitocondria es el Factor Inductor de Apoptosis (AIF), una oxidoreductasa de la membrana mitocondrial interna, la cual requiere un procesamiento proteolítico para producir una proteína AIF soluble; una

vez en el citoplasma se transloca al núcleo donde induce la condensación periférica de la cromatina y la hidrólisis del ADN en fragmentos, el mecanismo de acción de AIF es aún desconocido (ya que no tiene ninguna propiedad intrínseca de endonucleasa), aunque se sabe que su acción es independiente de caspasas y que podría colaborar con la Endonucleasa G, la cual parece ser liberada de las mitocondrias para facilitar la degradación de la cromatina nuclear (Wang & Youle, 2009)

La vía extrínseca queda interrelacionada con la intrínseca a través de la proteólisis de la proteína Bid por la caspasa-8. La forma activa de Bid (tBid) conecta entonces con la vía mitocondrial que produce la liberación de citocromo c y la activación de caspasas ejecutoras (Villamor, 2004), véase Figura 4.

La desregulación de la apoptosis desempeña un papel importante en el desarrollo de una variedad de patologías humanas, incluyendo enfermedades autoinmunes, trastornos neurodegenerativos y cáncer (Testa & Riccioni, 2007).

## Cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células anormales, puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo (OMS, 2014).

El proceso carcinogénico se puede definir como la serie de estadios a nivel celular a partir de los cuales se desarrollará una transformación cancerosa en un tejido. El primer evento desencadenante es la iniciación, causada por algún agente físico, químico o biológico (radiación ionizante, luz UV, hidrocarburos aromáticos policíclicos, aflotoxinas, etc.) que altere a la célula a nivel de genoma, es necesaria que esta modificación altere alguno de los procesos fundamentales de la célula, por ejemplo, los genes relacionados con el ciclo celular o muerte celular programada, el daño en estos genes provocaría una desregulación en la proliferación, la cual

promovería la progresión del ciclo celular cuando debería ser detenido (Alberts *et al.*, 2008).

La promoción es el segundo evento dentro del proceso carcinogénico, está dada por algún compuesto o molécula (hormonas o fármacos) que desencadene una compleja e intrincada ruta intracelular que conlleven al aumento en la proliferación celular, en esta etapa no se generan alteraciones estructurales directas al genoma y es reversible tanto a nivel de expresión genética como a nivel celular, sin embargo, la acumulación de mutaciones puede permitir a las células escapar de los controles o restricciones que existen dentro del cuerpo; las células cuyos genes promotores del crecimiento y división han mutado (oncogenes), así como aquellos genes de inhibición de crecimiento y división también han mutado (genes supresores de tumor) son aquellas que pueden generar un tumor (Pitot *et al.*, 1981).

La progresión en la carcinogénesis es el paso para que una célula en estado de promoción sea capaz de convertirse en una potencialmente maligna, las características morfológicas y biológicas de esta etapa se consideran irreversibles y es caracterizada por una inestabilidad cariotípica, el cambio cariotípico viene con un aumento en el índice de crecimiento, invasión y metástasis, así como una serie de alteraciones bioquímicas y la morfológicas (Pitot *et al.*, 1981).

De forma convencional se han empleado sinonimias para el término cáncer, como son: tumores malignos o neoplasias malignas. El término neoplasia se puede definir como: “crecimiento tisular relativamente autónomo”. Dentro de esta definición, el concepto autonomía relativa considera que el cáncer no está sujeto a las reglas y regulaciones que gobiernan a las células individuales y las interacciones celulares del organismo, el término crecimiento indica la velocidad de las divisiones celulares, puede ser extremadamente lenta, propia de tejidos normales, o extremadamente rápida similar al crecimiento del tejido embrionario y el uso del término tejido, indica que, según los conocimientos actuales, un cáncer o neoplasia es propio únicamente de organismos pluricelulares (Pitot, 1981).

De forma práctica se han clasificado las neoplasias en benignas y malignas, las características de cada una de ellas son las siguientes:

Benigno	Maligno
<ul style="list-style-type: none"><li>• Encapsulado</li><li>• No invasivo</li><li>• Muy diferenciado</li><li>• Mitosis poco frecuentes</li><li>• Crecimiento lento</li><li>• Anaplasia escasa o nula</li><li>• Sin metástasis</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• No encapsulado</li><li>• Invasivo</li><li>• Poco diferenciado</li><li>• Mitosis relativamente frecuentes</li><li>• Crecimiento rápido</li><li>• Anaplasia de grado variado</li><li>• Con metástasis</li></ul>

La diferencia más importante clínicamente entre ambos grupos es la capacidad de producir metástasis. La metástasis se puede definir como un crecimiento secundario de una neoplasia originada a partir del tumor primario en una localización distante de la neoplasia original (Wayne *et al.*, 2007).

Una estrategia para agrupar a los pacientes según el pronóstico es el establecimiento de sistemas de estadificación, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC) crearon el sistema TNM, el cual es actualmente el de mayor uso. La letra T se refiere al tamaño o extensión del tumor principal; la letra N se refiere a la extensión de cáncer que se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos y la letra M describe si el cáncer se ha diseminado desde el tumor primario a otras partes del cuerpo. Sin embargo, las combinaciones TNM se agrupan en cinco estadios. El estadio 0, donde hay células anormales presentes, pero no se han diseminado al tejido cercano; en los estadios I, II y III, conforme el estadio aumenta, mayor es el tumor y más se ha extendido en los tejidos cercanos y el estadio IV, el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo.



Según la OMS, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. En este mismo año, los cánceres diagnosticados con más frecuencia fueron:

Para el hombre	Para la mujer
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pulmón</li><li>• Próstata</li><li>• Colon y recto</li><li>• Estómago</li><li>• Hígado</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mama</li><li>• Colon y recto</li><li>• Pulmón</li><li>• Cuello uterino</li><li>• Estómago</li></ul>

### *Cáncer de mama*

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, ocupando el primer lugar en incidencia, representando aproximadamente 25% de todos los cánceres femeninos, ambos valores se conservan para México (GLOBOCAN, 2012). Existe un incremento global de aproximadamente 1.5% anual, sin embargo, en los países de economía emergente este incremento es alrededor de 5%. El grupo de edad más afectado se encuentra entre los 40 y los 59 años de edad (Arce *et al.*, 2011)

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos (Coleman *et al.*, 2008).

Según el National Cancer Institute (NCI) en el 2016, la edad avanzada es el factor de riesgo más importante para el cáncer de mama (tener 40 años o más), sin embargo, los principales factores de riesgo son:

- Antecedentes familiares.
- Susceptibilidad significativa a un factor hereditario.

- Mutaciones de la línea germinal en los genes BRCA1 y BRCA2 y otros genes que predisponen al cáncer de mama.
- Ingesta de alcohol.
- Densidad del tejido mamario (mamográfico).
- Estrógeno (endógeno):
  - Antecedentes menstruales (menarquía prematura o menopausia tardía).
  - Nuliparidad.
- Edad avanzada en el momento del primer parto.
- Antecedentes de tratamiento hormonal.
  - Terapia de remplazo hormonal (TRH) combinada de estrógeno más progesterona.
- Obesidad.
- Antecedentes personales de cáncer de mama.
- Antecedentes personales de formas proliferativas de enfermedad mamaria benigna.
- Exposición de la mama o el tórax a la radiación.

Algunas mutaciones, sobre todo en los genes BRCA1, BRCA2 y p53, se asocian a un riesgo muy elevado de ese tipo de cáncer. Sin embargo, esas mutaciones son raras y explican solo una pequeña parte de la carga total de cáncer mamario. El riesgo estimado de desarrollar cáncer de mama en las mujeres con mutaciones en BRCA1 y BRCA2 oscila entre 40 y 85 % (OMS, 2016).

De acuerdo con la AJCC el cáncer de mama se clasifica en función a la ubicación del tumor:

- Ductal
  - Intraductal (*in situ*)
  - Invasivo con componentes predominantes
  - Invasivo
  - Comedón
  - Inflamatorio

- Medular con infiltrado linfocítico
- Mucinoso (coloide)
- Papilar
- Cirroso
- Tubular
- Lobulillar
  - Invasivo con componente predominante *in situ*
  - Invasivo
- Pezón
  - Enfermedad de Paget
  - Enfermedad de Paget con carcinoma intraductal
  - Enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasivo
- Otros
  - Carcinoma indiferenciado
  - Metaplásico

El cáncer de mama ductal invasivo es el tipo histológico más frecuente y representa 70 a 80 % de todos los casos (NCI, 2016a).

El carcinoma de mama triple negativo se caracteriza por la ausencia de receptores de estrógeno y progesterona, así como la falta de sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2. Típicamente se asocia a mal pronóstico, dada la agresividad de los fenotipos tumorales y la respuesta parcial a la quimioterapia, sin que actualmente se disponga de dianas terapéuticas claramente establecidas. El porcentaje de estos tumores respecto al total de cánceres es variable en la bibliografía, según los diferentes criterios de clasificación, y varía entre el 6 y el 28% de todos los tumores de la mama (Podo *et al.*, 2010).

El AJCC designó una clasificación general de 5 estadios: 0, I (A, B), II (A, B), III (A, B, C) y IV.

### *Cáncer de próstata*

El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar de incidencia de cáncer en hombres a nivel mundial, sin embargo, en México se encuentra posicionado como primer lugar, representando el 21% de los casos por cáncer en varones, los datos indican una tasa de mortalidad de 11 defunciones por cada 100,000 hombres (GLOBOCAN, 2012).

Se han reportado muy pocos factores de riesgo (IMSS, 2015a), los cuales son:

- Tener 50 años o más.
- Antecedentes de cáncer de próstata en familiares cercanos

El cáncer de próstata se puede curar cuando está localizado y, con frecuencia, responde al tratamiento cuando está diseminado. Muchos pacientes, específicamente aquellos con tumores localizados, pueden morir por otras enfermedades sin haber sufrido siquiera de una discapacidad producida por el cáncer. 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, sin embargo, si esto sucede, los tratamientos actuales no serán eficientes (NCI, 2016b).

El AJCC designó un sistema de clasificación con 4 estadios: I, II (A, B), III, IV.

Más de 95 % de los cánceres de próstata primarios son adenocarcinomas. Los adenocarcinomas de próstata son, con frecuencia, multifocales y heterogéneos en sus modelos de diferenciación. La neoplasia intraepitelial prostática ([NIP] de células epiteliales atípicas no invasivas dentro de acinos de apariencia benigna) a menudo se presenta relacionada con un adenocarcinoma de próstata. Las NIP se subdividen en grado bajo y grado alto. La forma de grado alto puede ser precursora de un adenocarcinoma (Nelson, 2003).

## *Cáncer de pulmón*

El cáncer de pulmón ocupa el primer lugar de incidencia de cáncer para hombres a nivel mundial y segundo lugar en México, representando alrededor del 8% de los casos de cáncer en varones, ocupando el segundo lugar en tasa de defunción con 9 por cada 100,000 hombres, solo superado por el cáncer de próstata (GLOBOCAN, 2012).

Según una recopilación proporcionada por el NCI, los principales factores de riesgo son:

- Antecedentes o consumo actual de tabaco.
- Exposición pasiva a las sustancias causantes de cáncer del humo ambiental de tabaco.
- Exposición ocupacional al amianto, arsénico, cromo, berilio, níquel u otras sustancias.
- Exposición a cualquiera de las siguientes fuentes de radiación:
  - Radioterapia dirigida a la mama o el tórax.
  - Exposición al radón en el hogar o en el lugar de trabajo.
  - Pruebas médicas con imágenes, como las exploraciones por tomografía computarizada (TC).
- Residencia en un área con contaminación ambiental.
- Antecedentes familiares de cáncer de pulmón.
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.

El factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer de pulmón es fumar, para los fumadores, el riesgo en promedio es 10 veces más alto de por vida que para los no fumadores (definidos como personas que fumaron <100 cigarrillos durante toda su vida), este aumenta con la cantidad de cigarrillos, la duración y la edad en que se inició el hábito. El abandono del hábito de fumar resulta en una disminución de lesiones precancerosas y una reducción del riesgo de presentar cáncer de pulmón, sin embargo, siguen teniendo un riesgo elevado de cáncer de pulmón durante años después de dejar de fumar (Wingo *et al.*, 1999; NCI, 2016c).

Datos disponibles por el IMSS y el NCI, existen 2 tipos principales de cáncer de pulmón:

- Cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP): es el tipo más común de cáncer pulmonar, generalmente crece y se desarrolla más lentamente que el de células pequeñas. Los tipos más comunes son:
  - Carcinoma de células escamosas.
  - Adenocarcinoma.
  - Carcinoma de células grandes.

El CPCNP surge de las células epiteliales pulmonares del bronquio central al alveolo terminal. El tipo histológico de CPCNP se correlaciona con el sitio de origen, por lo general, el carcinoma de células escamosas se inicia cerca de un bronquio central, en comparación con el adenocarcinoma y el carcinoma bronquioalveolar habitualmente se originan en el tejido periférico del pulmón; aunque el CPCNP se relaciona con fumar, los adenocarcinomas se pueden presentar en pacientes que nunca han fumado, de forma general el CPCNP es relativamente insensible a la quimioterapia y la radioterapia en comparación con el CPCP (NCI, 2016c).

- Cáncer de pulmón microcítico o carcinoma microcítico de pulmón: es el cáncer generado por células pequeñas (CPCP). Constituye aproximadamente 15% de los carcinomas broncogénicos, este se divide en dos grupos: (NCI, 2016c)
  - Carcinoma de células pequeñas.
  - Carcinoma de células pequeñas combinado (es decir, CPCP combinado con componentes neoplásicos escamosos o glandulares)

Las características morfológicas de las células de CPCP son: escaso citoplasma, cromatina granular fina, nucléolos ausentes o inconspicuos, moldeado nuclear frecuente, así como recuento mitótico alto (Brambilla *et al.*, 2001).

Cifras proporcionadas por el GLOBOCAN para el año 2012 para los datos de incidencia y mortalidad por año, tanto para el mundo como para México son las siguientes:

Cáncer	MUNDO						MÉXICO					
	Incidencia			Mortalidad			Incidencia			Mortalidad		
	Casos	(%)	ASR (W)	Casos	(%)	ASR (W)	Casos	(%)	ASR (W)	Casos	(%)	ASR (W)
Próstata	1,094,916	14.8	30.7	307,481	6.6	7.8	14,016	21.4	27.3	6,367	16.5	11.3
Pulmón	1,241,601	16.8	34.2	1,098,702	23.6	30	5,471	8.3	10.5	4,945	12.8	9.5
Mama	1,671,149	25.1	43.1	521,907	14.7	12.9	20,444	24.8	35.4	5,680	14.2	9.7
Pulmón	583,100	8.8	13.6	491,223	13.8	11.1	2,968	3.6	4.9	2,663	6.6	4.3
Mama	1,671,149	11.9	43.1	521,907	6.4	12.9	20,444	13.8	35.4	5,680	7.2	9.7
Próstata	1,094,916	7.8	30.7	307,481	3.7	7.8	14,016	9.5	27.3	6,367	8.1	11.3
Pulmón	1,824,701	13	23.1	1,589,925	19.4	19.7	8,439	5.7	7.5	7,608	9.7	6.7

ASR (Tasa estandarizada por edad) es una medida resumen de la tasa que una población tendría si tuviera una estructura de edad estándar. El ASR es una media ponderada de las tasas específicas por edad; los pesos se toman de distribución de la población de la población estándar. La población de referencia más frecuente es la población estándar mundial (W). Esta es representada por cada 100,000.

● Hombres ● Mujeres ● Ambos sexos

## Tratamientos contra el cáncer

El tratamiento depende del tipo de cáncer y del grado de avance en el que se ha diagnosticado. De manera general se utilizan tres tratamientos: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Algunas personas solo reciben un tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría de las personas son tratadas con una combinación de tratamientos.

### *Cirugía*

La cirugía fue el primer tipo de tratamiento para combatir el cáncer y hasta la fecha es la opción más utilizada, es empleada para tumores sólidos que están contenidos en un sitio, funcionando como un tratamiento local. Algunas veces la cirugía será el único tratamiento empleado para eliminar el cáncer, aunque con más frecuencia se emplearan en conjunto otros tratamientos como son la quimioterapia y radioterapia (NCI, 2015).

### *Radioterapia*

La radioterapia es un tratamiento del cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores. En dosis altas, la radiación destruye células cancerosas o hace lento su crecimiento. La radioterapia no destruye de inmediato las células cancerosas. Se llevan días o semanas de tratamiento antes de que las células cancerosas empiecen a morir. Luego, las células cancerosas siguen muriéndose semanas o meses después de terminar la radioterapia (NCI, 2015).

### *Quimioterapia*

La quimioterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer que usa fármacos para detener o hacer más lento el crecimiento de las células cancerosas, las cuales crecen y se dividen con rapidez. La quimioterapia no solo destruye las células cancerosas que crecen con rapidez, sino también destruye o hace lento el crecimiento de células sanas que crecen y se dividen con rapidez como la médula ósea, mucosa gastrointestinal y los folículos pilosos (NCI, 2015).



Los tratamientos convencionales como la quimioterapia y radioterapia resultan ser eficientes cuando la enfermedad se encuentra en estadios iniciales, sin embargo, esta cualidad decae en estadios avanzados; además de generar una serie de efectos secundarios, debido a que afectan de forma general a todas las células con altos índices de división, incluyendo aquellas células sanas. Los efectos secundarios varían de una persona a otra, los efectos secundarios más comunes causados por el tratamiento del cáncer según el NCI son:

- Anemia
- Caída del pelo (alopecia)
- Cambios en la piel y en las uñas
- Diarrea o estreñimiento
- Edema
- Infección y neutropenia
- Linfedema
- Náuseas y vómitos
- Problemas de los nervios (neuropatía periférica)
- Problemas de memoria o de concentración
- Problemas en la boca y en la garganta (disgeusia, xerostomía, disfagia)
- Problemas sexuales y de fecundidad (disminución del deseo sexual, infecundidad)
- Sangrado y moretones (trombocitopenia)

### Productos de origen natural

En las últimas décadas, la industria farmacéutica se ha centrado principalmente en el repertorio de compuestos sintéticos como fuente de descubrimiento de fármacos. Sin embargo, al mismo tiempo, ha habido una tendencia a la disminución en el número de nuevos medicamentos que llegan al mercado, enfocando el interés científico a la tarea de descubrir fármacos a partir de fuentes naturales (Atanasov *et al.*, 2015).

Newman y Cragg en el 2016 han demostrado que los productos naturales desempeñan un papel fundamental en el descubrimiento de compuestos potenciales para desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de enfermedades

humanas, la contribución de los productos naturales en la expansión del arsenal terapéutico ha sido continua como se puede apreciar en las Figuras 5 y 6.

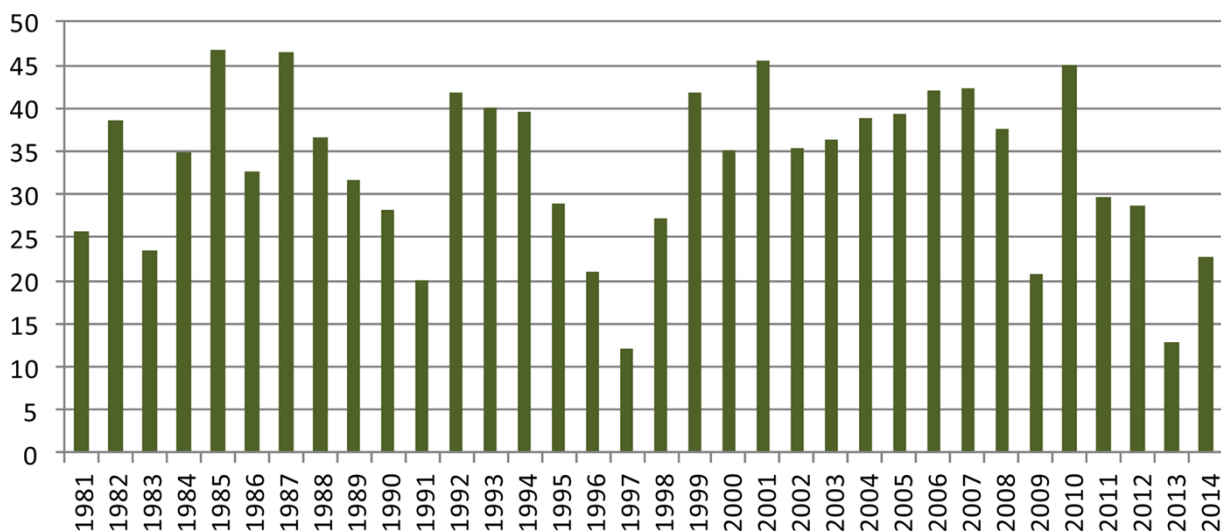


Figura 5. Porcentaje de fármacos aprobados con origen natural por año, desde 1981-2014. Tomado de: Newman & Cragg, 2016.

El empleo de productos naturales y/o sus estructuras novedosas, con la finalidad de descubrir y desarrollar un fármaco, sigue siendo una práctica habitual. Específicamente en el área del cáncer, tomando como intervalo de tiempo la década de 1940 hasta finales de 2014, aproximadamente el 50% de los compuestos aprobados, son en realidad de origen biológico, productos naturales o derivados directos de los mismos (Newman & Cragg, 2016).

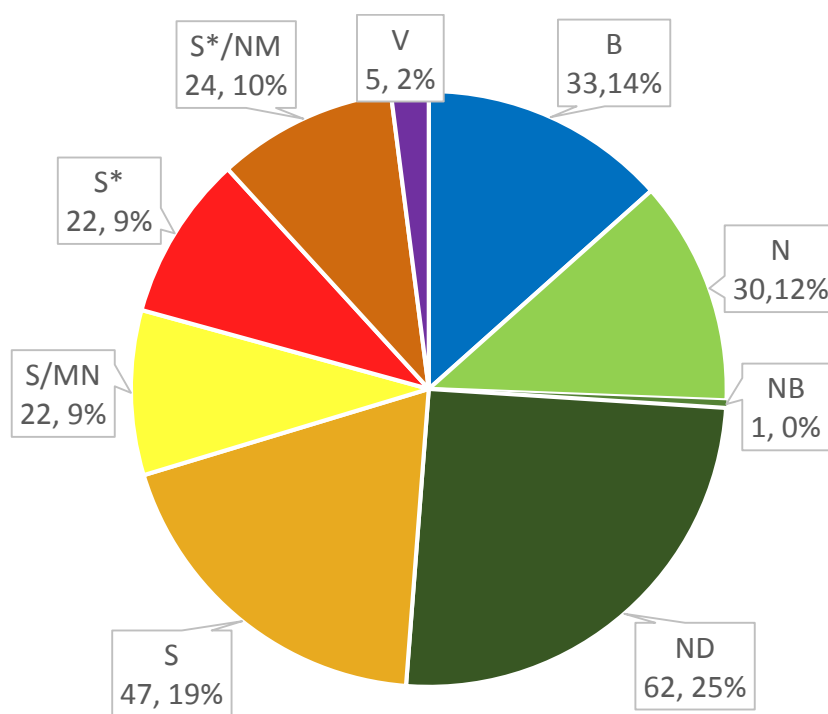


Figura 6. Todos los fármacos empleados como tratamiento contra el cáncer desde 1940-2014 según su origen; n = 246. Tomado y modificado de: Newman & Cragg, 2016. "B": Biológica, por lo general un gran tamaño (> 50 residuos) péptido o proteína, ya sea aislado de un organismo o producidos por medios biotecnológicos en un huésped sustitutivo. "N": Producto natural, inalterado en estructura, aunque podría ser semi o totalmente sintética. "NB": Producto natural "medicamento botánico". "ND": Derivado de un producto natural y es por lo general una modificación semisintético. "S": Totalmente sintéticas, a menudo se encuentran por azar de detección o modificación de un agente existente "S\*": Fabricado por síntesis total, pero el farmacóforo es o era de un producto natural "V": Vacuna. /NM Imita un producto natural (inhibidores competitivos directos del sustrato natural).

### Compuestos fenólicos

Dentro de los compuestos de origen natural, los compuestos fenólicos son un amplio grupo de moléculas que se encuentran en diferentes alimentos de consumo habitual como son: frutas y verduras, además de encontrarse en: el vino, té, cacao y aceite de oliva extra virgen, los cuales exhiben una fuerte actividad antioxidante al eliminar diferentes especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fernández-Bolaños *et al.*, 2012).

De todas las fuentes ricas en antioxidantes mencionadas anteriormente, destaca el aceite de oliva, un producto de la extracción mecánica del fruto de *Olea europaea* (Familia Oleaceae), está compuesto de una fracción saponificable que constituye aproximadamente el 90-99% y de una fracción no saponificable (0,4 -5%) (Tripoli *et al.*, 2005), esta última fracción consiste principalmente de hidrocarburos (escualeno, caroteno, luteína), compuestos terpénicos, esteroides, compuestos fenólicos, y alcoholes alifáticos, entre otros. Los compuestos fenólicos del aceite de oliva incluyen cuatro grupos diferentes: fenoles simples (hidroxitirosol y tirosol), polifenoles (flavonoides), secoiridoides (oleuropeína), y lignanos (Vilaplana-Pérez *et al.*, 2014).

Uno de los miembros más eficaces en términos de captación de radicales libres es el hidroxitirosol, también llamado 2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol, un fenol simple (conformado como metabolito de la oleuropeína) que se puede encontrar en las hojas y frutos de la planta de olivo (Fernández-Bolaños *et al.*, 2008).

Se han llevado a cabo numerosos 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 ERO generada (Omar, 2010).

Se ha descrito que el HT puede ejercer un amplio espectro de propiedades biológicas debido a su fuerte actividad antioxidante, un efecto proapoptótico y la modulación en la expresión de los genes implicados en la proliferación de células tumorales de promielocitos (células HL60) (Della Ragione *et al.*, 2002; Fabiani *et al.*, 2006, 2008, 2009, 2011). Por otra parte, se ha demostrado que inhibe la proliferación de células de cáncer de mama MDA (Rosignoli *et al.*, 2016), MCF-7 (Han *et al.*, 2009; Sirianni *et al.*, 2010; Bulotta *et al.*, 2011; Bouallagui *et al.*, 2011; Rosignoli *et al.*, 2016), SK-BR-3 (Elamin *et al.*, 2013), células de carcinoma de colon humano HT29 (Guichard *et al.*, 2006), Caco- 2(Corona *et al.*, 2009), SW480 y HCT116 (Rosignoli *et al.*, 2016), células de carcinoma hepático humano (Zhao *et*

*al.*, 2014) y células humanas de cáncer de próstata LNCap y PC-3 (Rosignoli *et al.*, 2016).

Este tipo de resultados explica, en parte, por qué en los últimos años la comunidad científica ha dedicado más atención a los compuestos fenólicos, evaluando propiedades biológicas observadas experimentalmente y recomendando su inclusión de forma abundante en la dieta. También se ha justificado su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional asociados a la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas como el cáncer.

### Aminoácidos

Por otro lado, los aminoácidos se han empleado en procesos de síntesis de compuestos novedosos con potencial uso en diversas áreas, esto con el objetivo de sacar provecho a la importancia biológica que presentan; ya que son requeridos en todos los sistemas biológicos (componentes necesarios para la síntesis de proteínas), además la existencia de mecanismos de transporte específicos en las células podría facilitar su absorción, como es el uso de aminoácidos sintéticos que contienen silicio para la generación de péptidos que mejoran la resistencia a la degradación y modulan de sus propiedades físicas y bioquímicas (Rémond *et al.*, 2016).

Otro ejemplo es la síntesis de Tiosemicarbazonas a partir de aminoácidos (leucina, metionina, fenilglicina, y triptófano), compuestos que han demostrado poseer una actividad antiviral capaz de interferir con la maquinaria de replicación del virus del dengue (Padmanabhan *et al.*, 2016), de igual manera en la búsqueda de tratamientos para otras infecciones, se han generado nucleótidos sintéticos, mediante la incorporación de ácido aspártico, ácido glutámico, histidina o prolina en el grupo fosfato, los cuales son capaces de interactuar con la retrotranscriptasa (RT) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), pudiendo ser empleados para la inhibición directa de la RT de VIH u otra polimerasa viral (Adelfinskaya & Herdewijn, 2007; Adelfinskaya *et al.*, 2007).

De igual manera en el estudio de los péptidos antimicrobianos, los cuales participan como parte del sistema inmune innato y poseen un amplio espectro de objetivos, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos, además de exhibir propiedades anticancerígenas, han sido modificados mediante la adición de residuos de diferentes aminoácidos, con la idea de aumentar dichas propiedades (Bahar & Ren, 2013; Hicks, 2016).

También se ha reportado la síntesis y caracterización de compuestos de Tributilestaño a partir de bases de Schiff derivadas de aminoácidos los cuales presentan un gran potencial en campos como la medicina y la biología (Lima *et al.*, 2015). En un trabajo similar se han empleado aminoácidos como son L-alanina, L-valina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-triptófano para la generación de derivados de Tributilestaño los cuales presentan efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer cervicouterino y una baja actividad necrótica (Camacho-Camacho *et al.*, 2016).

Dentro de los 20 aminoácidos requeridos en la maquinaria celular, la cisteína (Cys) es un aminoácido no esencial dentro de los mamíferos, del cual su precursor es el 3-fosfoglicerato. Es uno de los dos aminoácidos que conforma parte de la biomasa de seres vivos que contiene azufre, el otro aminoácido es la metionina, el cual aporta el azufre para su síntesis. La cisteína es el único aminoácido en poseer un grupo tiol (SH), el cual suele formar un puente disulfuro con otra cisteína mediante una oxidación de los grupos tiol formando un compuesto dimérico denominado cistina; el puente disulfuro cobra mucha importancia en las proteínas, ya que brinda estabilidad a la estructura o plegamiento (Voet & Voet, 2004; Müller- Esterl, 2008).

Y se ha demostrado que los cambios estructurales de diversas moléculas pueden mejorar sus propiedades químicas como la solubilidad en agua e incluso facilita su disposición por las células mejorando en muchos casos de forma notable su actividad biológica (Fernández- Herrera *et al.*, 2010; Fernández- Herrera *et al.*, 2011).

## Péptidos fenólicos

En ese sentido se realizó la síntesis de péptidos fenólicos adicionando a la estructura del HT, esteres de aminoácidos: L-glicina, L-fenilalanina, L-valina, L-serina, L-triptófano y L-cisteína. La síntesis se realizó por el grupo de trabajo del Dr. Oscar López de la Universidad de Sevilla, España, con el propósito de evaluar si estas nuevas moléculas presentan actividad biológica en células tumorales.

Datos anteriores obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Rangel, 2015) demostraron que de todos los péptidos sintetizados, aquellos derivados de la L-cisteína poseían la mejor actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCu) HeLa, CaSki y ViBo, sin inducción de muerte por necrosis mediante la detección de actividad de LDH en los sobrenadantes de los cultivos tratados. Uno de los péptidos formados con L-cisteína fue el AZ-269 (Figura 7), el cual mostro una actividad antiproliferativa a las 24 horas a concentraciones de 250-290 $\mu$ M y una inducción de muerte por necrosis inferior al 10%, por lo cual, el AZ-269 uno de los mejores candidatos para continuar su evaluación en otros tipos de cáncer y en modelos *in vivo*.

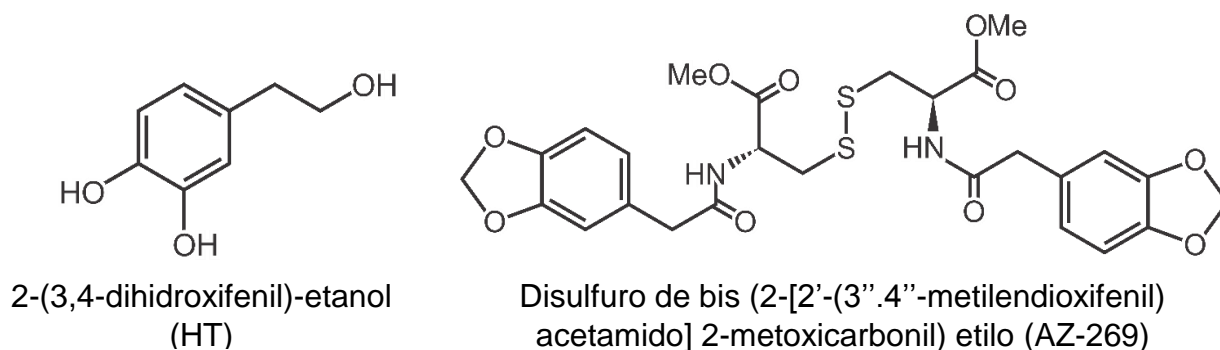


Figura 7. Estructuras de HT y AZ-269.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que algunos componentes del aceite de oliva pueden presentar actividad antiproliferativa en varios tipos de cáncer, dicha actividad ha sido atribuida a componentes fenólicos, del que destaca el hidroxitirosol; de igual manera se han empleado diversos aminoácidos para la síntesis de compuestos novedosos, con la intención de aprovechar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Por tal motivo a partir de la adición de residuos de cisteína al HT se realizó la síntesis del AZ-269 que mostró poseer actividad antiproliferativa no necrótica en líneas celulares de CaCu y se espera mantengan estas cualidades en las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1, además de inducir una muerte por apoptosis y mostrar actividad selectiva.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, referente a lo anterior, el cáncer de mama es el de mayor incidencia en mujeres tanto a nivel mundial como en México; el cáncer de próstata es el segundo más común a nivel mundial y el de mayor incidencia para hombres en México; el cáncer de pulmón el cual ocupa el primer lugar de incidencia de cáncer para hombres a nivel mundial y segundo lugar en México.

Desafortunadamente los tratamientos convencionales empleados para combatir el cáncer, como son, la quimioterapia y la radioterapia resultan ser ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad además de exhibir poca selectividad entre células cancerosas y células sanas deteriorando notablemente la calidad de vida del paciente, por lo que es pertinente la búsqueda de tratamientos alternativos para así ser empleados como agentes terapéuticos eficientes.

## HIPÓTESIS

Se sabe que algunos compuestos fenólicos provenientes del aceite de oliva exhiben actividad antiproliferativa y citotóxica en algunos tipos de cáncer, del mismo modo se ha reportado que la adición de residuos de aminoácido a diferentes moléculas



puede mejorar su actividad antitumoral, por lo que se espera que el péptido fenólico AZ-269 ejerza una actividad antiproliferativa no necrótica y apoptótica en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), próstata (PC-3) y pulmón (SK-LU-1) en comparación con el Hidroxitirosol (HT).

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del hidroxitirosol y su derivado el AZ-269 en cultivos de las líneas tumorales MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 provenientes de cáncer de mama, próstata y pulmón respectivamente, así como en cultivos de células linfocíticas humanas.

### Objetivos Particulares

- Realizar cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 provenientes de cáncer de mama, próstata y pulmón respectivamente.
- Determinar si los compuestos HT y AZ-269 presentan 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 ( $CI_{50}$ ), mediante la técnica de cristal violeta.
- Determinar la muerte por necrosis inducida por los compuestos HT y AZ-269 mediante la detección de la actividad enzimática de la Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de cultivos de células MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1.
- Determinar la actividad apoptótica de los compuestos HT y AZ-269 en las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 mediante la observación de la compactación de la cromatina por la técnica de DAPI y por inmunodetección y cuantificación de la caspasa-3 activa por cartometría de flujo.

- Determinar la actividad antiproliferativa del HT y el AZ-269 en linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica mediante la incorporación de carboxifluoresceína (CFSE) y su evaluación por citometría de flujo.
- Determinar la muerte por necrosis inducida por los compuestos HT y AZ-269 mediante la detección de la actividad enzimática de la Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos humanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular

Todas las líneas trabajadas fueron provistas por la American Type Culture Collection (ATCC, USA).

- La línea celular MDA-MB-231, la cual es un adenocarcinoma metastásico (efusión pleural), clasificado como un cáncer de mama triple negativo (similar a células de mesénquima), fue cultivada en medio D-MEM (Sigma, USA) de alta glucosa suplementado con L-glutamina, rojo de fenol y suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA) al 5%.
- La línea celular PC-3, originaria de un adenocarcinoma metastásico (hueso), fue cultivada en medio RPMI-1640 (Microlab, MEX) suplementado con L-glutamina, rojo fenol y SFB al 10%.
- La línea celular SK-LU-1, la cual fue aislada de un adenocarcinoma de pulmón se cultivó en RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, rojo fenol y suero de ternera neonata (STN) (Biowest, USA) al 5%.

El suero en todos los casos fue previamente desactivado a 56°C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuaire, USA) a una temperatura de 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub> en una atmosfera húmeda a saturación.

## Determinación de $CI_{50}$

Para establecer la  $CI_{50}$  (concentración en la cual se disminuye en un 50% el número celular) de las líneas celulares, se sembraron 5,000 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA) en 100 $\mu$ L de medio de cultivo correspondiente, y se dejaron en incubación durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionaron concentraciones decrecientes de los compuestos HT y AZ-269. Para el control testigo solo se realizó el cambio de medio de cultivo, el control para el solvente o vehículo contempló la máxima cantidad de metanol (Me-OH) empleada para diluir los compuestos. Pasadas las 24 horas, el número celular fue evaluado por el método de incorporación de cristal violeta descrito por Kueng y colaboradores en 1989.

## Técnica de incorporación de cristal violeta

Las células sembradas y tratadas en las condiciones anteriormente descritas se fijaron durante 15 minutos con glutaraldehído al 1.1% (Sigma, USA) en agua destilada; posteriormente se realizaron lavados y se dejaron secar al aire. Se añadieron 50 $\mu$ L/pozo del colorante cristal violeta (Sigma, USA) al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6.0 y se mantuvieron 20 minutos en agitación constante. Después de la tinción, las cajas de cultivo fueron lavadas con agua de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos y nuevamente se dejó secar al aire. Posteriormente, el colorante incorporado en los núcleos celulares fue solubilizado mediante la adición de 50 $\mu$ L de ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% y se dejó en agitación durante 20 minutos. Finalmente, se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas (ChroMate Awareness Technology Inc, USA) a 590nm. Cada uno de los tratamientos se realizó por sextuplicado. Los resultados fueron analizados por regresión lineal para la obtención de la concentración que abate el 50% de la población celular ( $CI_{50}$ ).

## Evaluación de la inducción de muerte por necrosis mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Un ensayo de evaluación de muerte celular versátil que se puede utilizar *in vitro* e *in vivo* es la medición de la liberación de la LDH (una proteína citoplasmática); la pérdida de integridad de la membrana plasmática conduce a su liberación manteniéndose como una proteína enzimáticamente activa en el sobrenadante. La liberación *in vitro* de LDH de las células proporciona una medida exacta de la integridad de la membrana celular (Vanden Berghe *et al.*, 2013).

Las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 se sembraron en placas de 96 pozos, en las condiciones anteriormente descritas, y se incubaron por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los tratamientos:

- Control negativo a LDH (medio de cultivo)
- Control positivo a LDH (medio de cultivo)
- Vehículo (concentración de Me-OH indicada para cada compuesto)
- $CI_{50}$  obtenidas para HT y AZ-269

A las 23 horas de tratamiento, al control positivo se le realizó un cambio de medio de cultivo por medio fresco al 1% de tritón X-100 y se incubó hasta completar las 24 horas de tratamiento.

Una vez terminado el tiempo se centrifugó la placa a 1500rpm por 15 minutos y se transfirieron 60 $\mu$ L/pozo, del sobrenadante de cada una de las condiciones a una placa de 96 pozos, para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit "Cyto Tox 96" (Promega, USA), del cual se emplearon 60 $\mu$ L/pozo de la mezcla de reacción, dejando incubar a temperatura ambiente en oscuridad por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia en un lector de placas (ChroMate Awareness Technology Inc, USA) a una longitud de onda de 490nm. Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

## Evaluación de muerte por apoptosis mediante compactación de cromatina por tinción con DAPI

La condensación y la fragmentación de los núcleos que se produce durante la apoptosis se detectan fácilmente bajo el microscopio usando un protocolo de tinción de forma rápida y fácil. Se puede emplear tintes fluorescentes tales como Hoechst, yoduro de propidio y DAPI, entre otros (Henry *et al.*, 2013).

Se cultivaron 70,000 células/mL de cada línea celular sobre portaobjetos para cultivo con pocillo de 6mm (Kimex, MEX), 30µL por pozo y se incubaron por 24 horas. Pasado el tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron los tratamientos:

- Control negativo (medio de cultivo)
- Control positivo (1µg/mL de colchicina)
- Vehículo (concentración de Me-OH empleada para disolver las  $CI_{50}$ )
- $CI_{50}$  correspondiente de HT y AZ-269.

Los cultivos anteriormente descritos se dejaron en condiciones de incubación por 24 horas. Concluido el tiempo, se retiró el medio de cultivo, se adicionó paraformaldehído al 2% y se dejó actuar por 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se realizaron lavados con PBS filtrado. Posteriormente se permearon las células con tritón al 0.2% en PBS frío por 5 minutos a 4°C, se realizaron dos lavados con PBS filtrado frío y se agregó el fluorocromo DAPI (Sigma, USA) 0.1µg/mL en PBS, se incubó por 1 minuto a 4°C, se realizaron lavados con PBS filtrado frío y finalmente las preparaciones fueron montadas con la adición de medio de montaje para fluorescencia "Vectashield" (Vector Laboratories, USA). Las preparaciones fueron evaluadas en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E600 (Nikon, USA) equipado con una cámara de alta resolución DXM1200F.

## Evaluación de muerte por apoptosis mediante inmunodetección de la caspasa-3 activa

Un importante evento bioquímico durante la apoptosis es el aumento de las caspasas ejecutoras (caspasa 3, 6 y 7) que participan en la escisión de sustratos, los cuales median algunas de las características morfológicas de apoptosis; estas proteínas pueden ser detectadas y cuantificados por diferentes métodos, por ejemplo, la citometría de flujo (Henry *et al.*, 2013).

Se sembraron  $3.5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 24 pozos (Corning, USA), en un volumen de 500 $\mu$ L de medio de cultivo específico para cada línea celular y se incubaron por 24 horas. Pasado el tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron los tratamientos:

- Control negativo (medio de cultivo),
- Control positivo (1 $\mu$ g/mL de colchicina),
- Vehículo (concentración de Me-OH empleada para disolver las  $CI_{50}$ ) y
- $CI_{50}$  correspondiente para HT y AZ-269

Los cultivos anteriormente descritos se dejaron en incubación 24 horas. Cumplido el tiempo, las células fueron cosechadas con ayuda de verseno y fijadas con Metanol al 50% en PBS por 1 hora, al término del tiempo se realizaron lavados con PBS (se adicionó 1mL de PBS, se centrifugó a 1500rpm y desecho el sobrenadante). Posteriormente fueron adicionados 50 $\mu$ L del anticuerpo primario (Biocare Medical, USA), anticaspasa-3 activa, anticuerpo producido en conejo, 1:250 en PBS durante 12 horas a 4°C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. A continuación, se aplicaron 50 $\mu$ L del anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (Invitrogen, USA), IgG anticonejo 1:500 en PBS, manteniendo las muestras en oscuridad durante 3 horas a una temperatura de 37°C. Finalmente se lavaron las muestras 2 veces con PBS y fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria II. Los datos se analizaron utilizando el programa Flowing Software versión 2.5.1.

## Efecto del HT y AZ-269 sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica

El desarrollo de la carboxifluoresceína (CFSE) se ha empleado para realizar un seguimiento de la división de diferentes tipos celulares, logrando incorporar estos datos a análisis cuantitativos (Hasbold *et al.*, 1999).

Con ayuda de tubos vacutainer con EDTA (BD, USA), se obtuvieron 20mL de sangre periférica de un voluntario aparentemente sano, en un tubo cónico de vidrio (Pirex, USA) se colocaron 5mL de Histopaque (Sigma, USA) y 5mL de sangre (se emplearon cuatro tubos para contener el volumen total de sangre) y se centrifugaron (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 $\mu$ L se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió con 10mL de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1mL de RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

El total de células quedó contenido en un tubo con un volumen total de 4mL. Se sembraron las células en una caja de Petri de 100mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10mL de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, y se incubaron durante 30 minutos en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugo la suspensión celular a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5mL de RPMI-1640 sin suero.

Para el marcaje de las células linfocíticas se empleó carboxifluoresceína (CFSE) (Sigma, USA) los linfocitos se resuspendieron en PBS con 10 $\mu$ L de CFSE (2 $\mu$ M de

solución) y se incubaron por 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS al 5% de SFB, se centrifugaron a 1500rpm (dos veces) y se resuspendieron en 5mL de RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (FHG) (Microlab, USA), los linfocitos se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 1.6mL a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL de RPMI-1640 al 20% de SFB y 1  $\mu\text{g/mL}$  de fitohemaglutinina.

Las condiciones sometidas para el tratamiento fueron las siguientes:

- Control negativo (medio de cultivo)
- Control positivo (medio de cultivo y FHG)
- Control para el vehículo (concentración de Me-OH indicada para cada compuesto)
- $CI_{50}$  obtenidas del HT y AZ-269 para cada línea celular

Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una paca de 96 pozos (Corning, USA) a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 $\mu\text{L}$  y se incubaron en condiciones de cultivo por 72 horas.

Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se centrifugó la muestra a 1500rpm por 5 minutos, retiro el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 1mL de verseno frio dejándolo actuar por 5 minutos a temperatura ambiente; pasado el tiempo se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos, se retiró el verseno. Finalmente, se resuspendió en 500 $\mu\text{L}$  de PBS y 500  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 2 %. Las células fueron evaluadas por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSAria II y los datos se analizaron utilizando el programa Flowing Software versión 2.5.1. El análisis se realizó mediante la comparación de las condiciones con respecto al control positivo para proliferación.



## Evaluación de la inducción de muerte por necrosis mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en linfocitos de sangre periférica

Para la evaluación de la LDH en linfocitos de sangre periférica, del ensayo anteriormente descrito, se sometieron las siguientes condiciones:

- Control negativo a LDH (con medio de cultivo y FHG)
- Control positivo a LDH (con medio de cultivo y FHG)
- Control para el vehículo (concentración de Me-OH indicada para cada compuesto)
- $CI_{50}$  obtenidas del HT y AZ-269 para cada línea celular

Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de 96 pozos (Corning, USA) a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 $\mu$ L y se incubaron en condiciones de cultivo por 72 horas.

Para la evaluación, a las 71 horas de tratamiento al control positivo se le agregaron 2 $\mu$ L/pozo de tritón X-100 y se homogenizaron pipeteando suavemente el medio de cultivo e incubo hasta cumplir las 72 horas. Trascurrido el tiempo se centrifugó la placa a 1500rpm por 5 minutos y se transfirieron 60 $\mu$ L/pozo, del sobrenadante de cada una de las condiciones a una placa de 96 pozos, para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit "Cyto Tox 96" (Promega, USA), del cual se emplearon 60 $\mu$ L/pozo de la mezcla de reacción, dejando incubar a temperatura ambiente en oscuridad por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia en un lector de placas (ChroMate Awareness Technology Inc, USA) a una longitud de onda de 490nm. Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

### Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

## RESULTADOS

### Actividad antiproliferativa en células tumorales

Para la determinación de la actividad antiproliferativa del HT y su derivado sintético AZ-269, cultivos de células tumorales de mama, próstata y pulmón (MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1) fueron tratados con diferentes concentraciones de los compuestos. La concentración requerida para abatir en un 50% el número celular ( $CI_{50}$ ) fue tomada como parámetro de actividad antiproliferativa (Figura 8, Tabla 1).

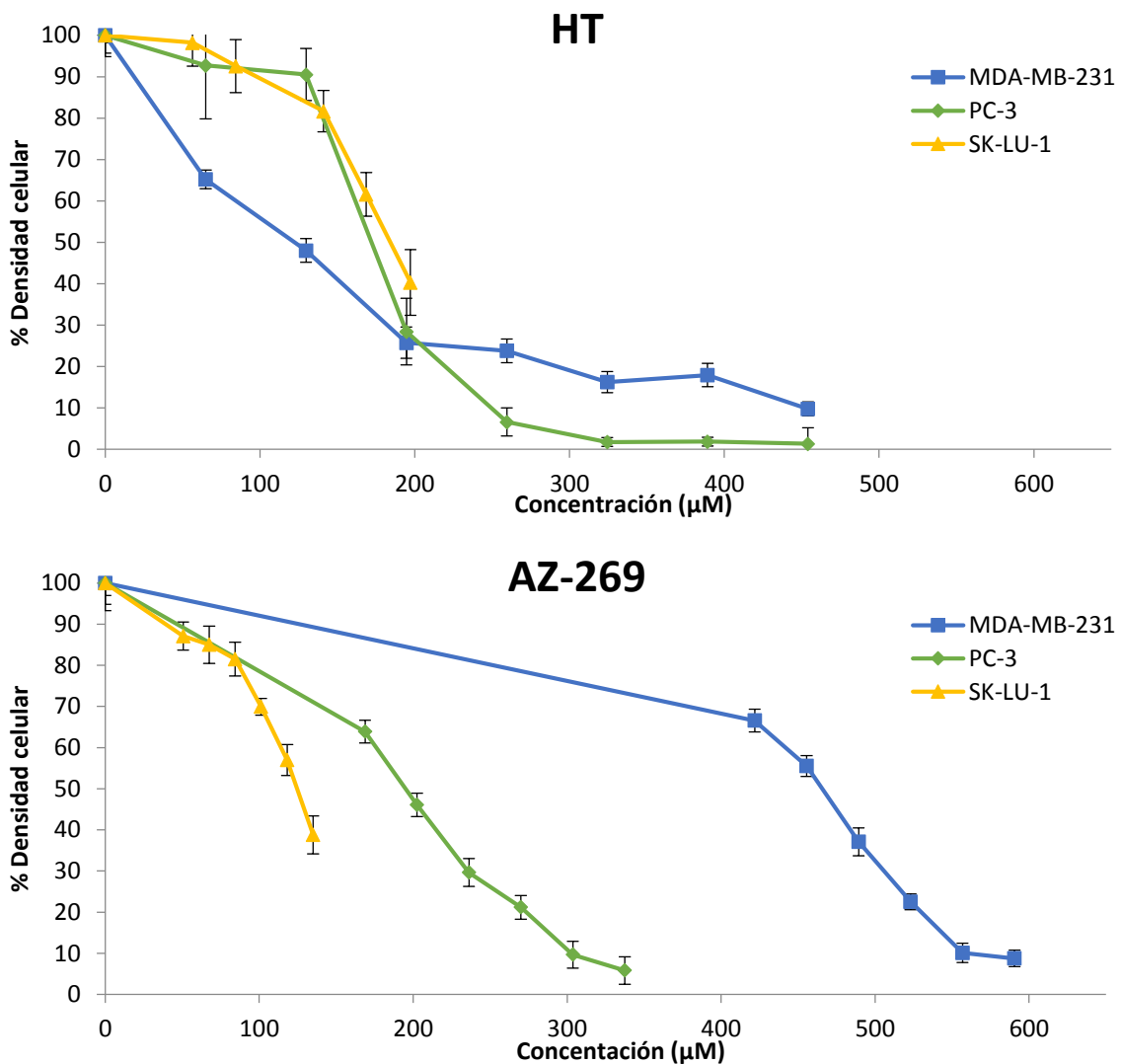


Figura 8. Actividad antiproliferativa del compuesto HT y AZ-269 en cultivos de líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1.

Los resultados obtenidos establecen que ambos compuestos fenólicos afectan la capacidad de proliferación de los cultivos celulares de una forma dependiente de la dosis, es decir, conforme aumenta la concentración del compuesto el número celular decrece. Posteriormente se procedió a calcular la dosis requerida de ambos compuestos para inhibir en un 50% la proliferación en las diferentes líneas celulares ( $CI_{50}$ ), mediante la linearización de los datos obtenidos y su cálculo de acuerdo con la ecuación de la recta, los cuales fueron corroborados de forma puntual (Tabla 1).

Se obtuvieron los siguientes datos:

Línea celular Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )		
	MDA-MB-231	PC-3	SK-LU-1
HT	97.95	181.62	183.57
AZ-269	462.33	195.90	123.68

Tabla 1.  $CI_{50}$  determinadas para cada uno de los compuestos en las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1.

Se observa que las líneas celulares de mama y próstata resultan ser más sensibles al compuesto HT, de las cuales, MDA-MB-231 es la línea celular que presenta una  $CI_{50}$  menor ( $97.95\mu M$ ), seguida de PC-3 ( $181.62\mu M$ ) y finalmente SK-LU-1 ( $183.57\mu M$ ), en comparación con el derivado sintético AZ-269 en el que SK-LU-1 fue la línea celular con una  $CI_{50}$  menor ( $123.68\mu M$ ), seguido de PC-3 ( $195.90\mu M$ ) y finalmente MDA-MB-231 ( $462.33\mu M$ ).

Los resultados obtenidos, indican que las células MDA-MB-231 son 4.7 veces más sensibles al HT en comparación con el AZ-269, mientras que las células SK-LU-1 son 1.5 más sensibles al AZ-269 en comparación con el HT. Sin embargo, las células PC-3 mostraron una sensibilidad similar para ambos compuestos.

## Inducción de muerte por necrosis en células tumorales

Para determinar si el abatimiento celular obtenido con las  $CI_{50}$  para ambos compuestos (HT y AZ-269) era mediante la inducción de muerte por necrosis en las líneas celulares de mama, próstata y pulmón (MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 respectivamente), se evaluó la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo y se empleó como parámetro de muerte por necrosis.

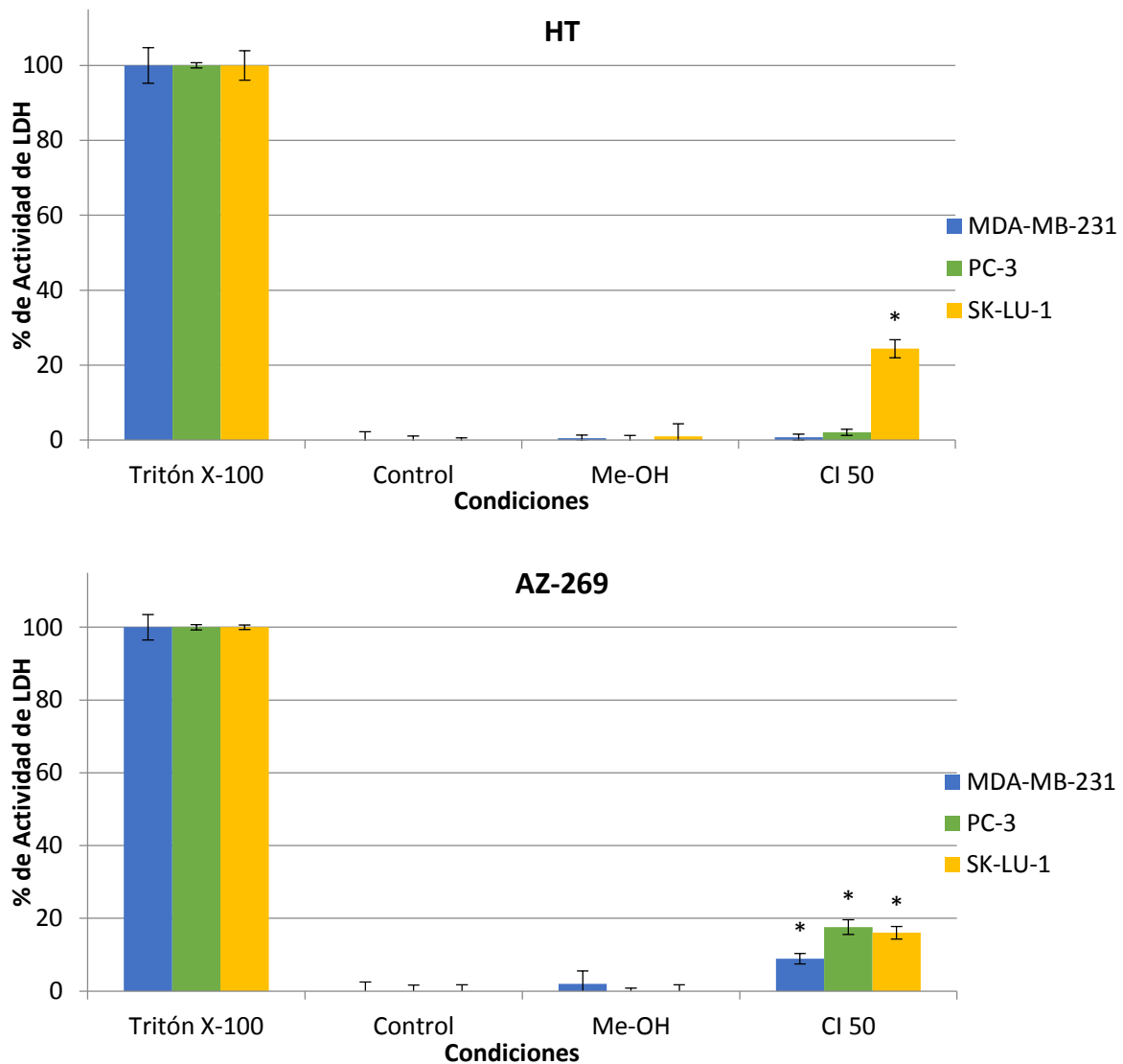


Figura 9. Evaluación de la muerte necrótica inducida por los compuestos HT y AZ-269 en cultivos de líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey: (\* $p < 0.05$  vs. Control)

% de actividad de LDH			
Línea celular	MDA-MB-231	PC-3	SK-LU-1
Compuesto (CI <sub>50</sub> )			
HT	0.29 ± 0.75	2.08 ± 0.83	23.40 ± 2.39
AZ-269	6.88 ± 1.42	17.59 ± 2.04	16.05 ± 1.74

Tabla 2. Porcentaje de actividad de la LDH con respecto a las CI<sub>50</sub> obtenidas para HT y AZ-269 en las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1.

Como se puede apreciar en la Figura 9 y Tabla 2, el compuesto HT induce la liberación de LDH en las tres líneas celulares con valores netos de actividad enzimática de 0.29% para MDA-MB-231, 2.08% para PC-3 y 23.40% para SK-LU-1; existiendo solo diferencias significativas en SK-LU-1 del porcentaje de actividad enzimática resultante para la CI<sub>50</sub> comparado con el Control, indicando que las células de pulmón SK-LU-1 son más sensibles al efecto inductor de muerte necrótica generada por el HT.

En comparación, el compuesto AZ-269 induce una liberación de LDH en las tres líneas celulares con valores netos de actividad enzimática de 6.88% para MDA-MB-231, 17.59% para PC-3 y 16.05% para SK-LU-1; existiendo diferencias significativas para las tres líneas del porcentaje de actividad enzimática resultante para la CI<sub>50</sub> comparados con el control, sugiriendo que las tres líneas tumorales son más sensibles al efecto inductor de muerte necrótica generada por el compuesto AZ-269.

No obstante que los compuestos HT y AZ-269 inducen la liberación de la enzima LDH, este porcentaje es relativamente bajo en la mayoría de las líneas celulares, sugiriendo que el decremento en el número celular inducido por los compuestos es debido a una causa diferente a la necrosis, por lo que se evaluó la inducción de muerte apoptótica de ambos compuestos en las tres líneas celulares.

## Inducción de muerte por apoptosis en células tumorales

Con el fin de dilucidar si los compuestos fenólicos HT y AZ-269 son capaces de inducir una muerte apoptótica, en cultivos de células tumorales de mama (MDA-MB-231), próstata (PC-3) y pulmón (SK-LU-1) tratadas con las  $CI_{50}$  correspondientes para ambos compuestos, se evaluó por medio de microscopía óptica la morfología celular, así como la compactación de cromatina mediante la tinción con DAPI y con ayuda de un microscopio de epifluorescencia.

En las microfotografías de contraste de fases se pueden apreciar que las células tratadas exhiben una serie de características comunes de la apoptosis como son: la contracción celular, formación de protrusiones en la membrana plasmática (blebbing). Con ayuda de la tinción con DAPI se puede apreciar la condensación nuclear y fragmentación del ADN (Figuras 10, 11 y 12).

Para corroborar la inducción de muerte por apoptosis se realizó la detección y cuantificación de la caspasa-3 activa (una caspasa ejecutora), el aumento de esta sirve como marcador bioquímico de la apoptosis. La caspasa-3 activa se evaluó por medio de inmunodetección y cuantificación por citometría de flujo (Figuras 13 y 14).

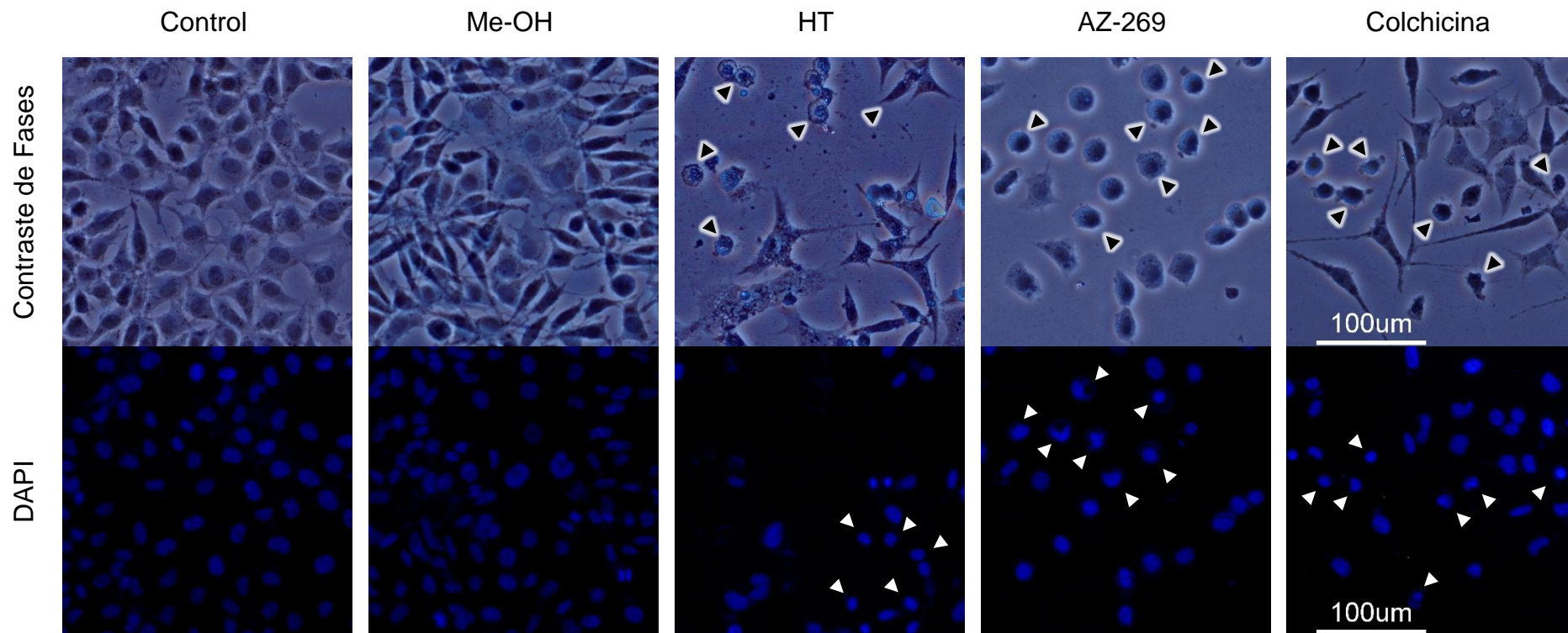


Figura 10. Micrografías de la línea celular MDA-MB-231 en las diferentes condiciones evaluadas: Control negativo (células con medio de cultivo), Vehículo (concentración de Me-OH empleada para disolver las  $CI_{50}$ ), los tratamientos con HT y AZ-269 con la concentración  $CI_{50}$  correspondiente y Control positivo (células con  $1\mu\text{g/mL}$  de colchicina) tratadas por 24 horas. En las imágenes superiores se puede apreciar la morfología celular sin tinción alguna; en las imágenes inferiores se muestran los núcleos teñidos con DAPI en color azul. Las flechas negras, señalan células con un cambio morfológico (células esféricas y con algunas protrusiones de la membrana plasmática); las flechas blancas señalan condensación de cromatina.

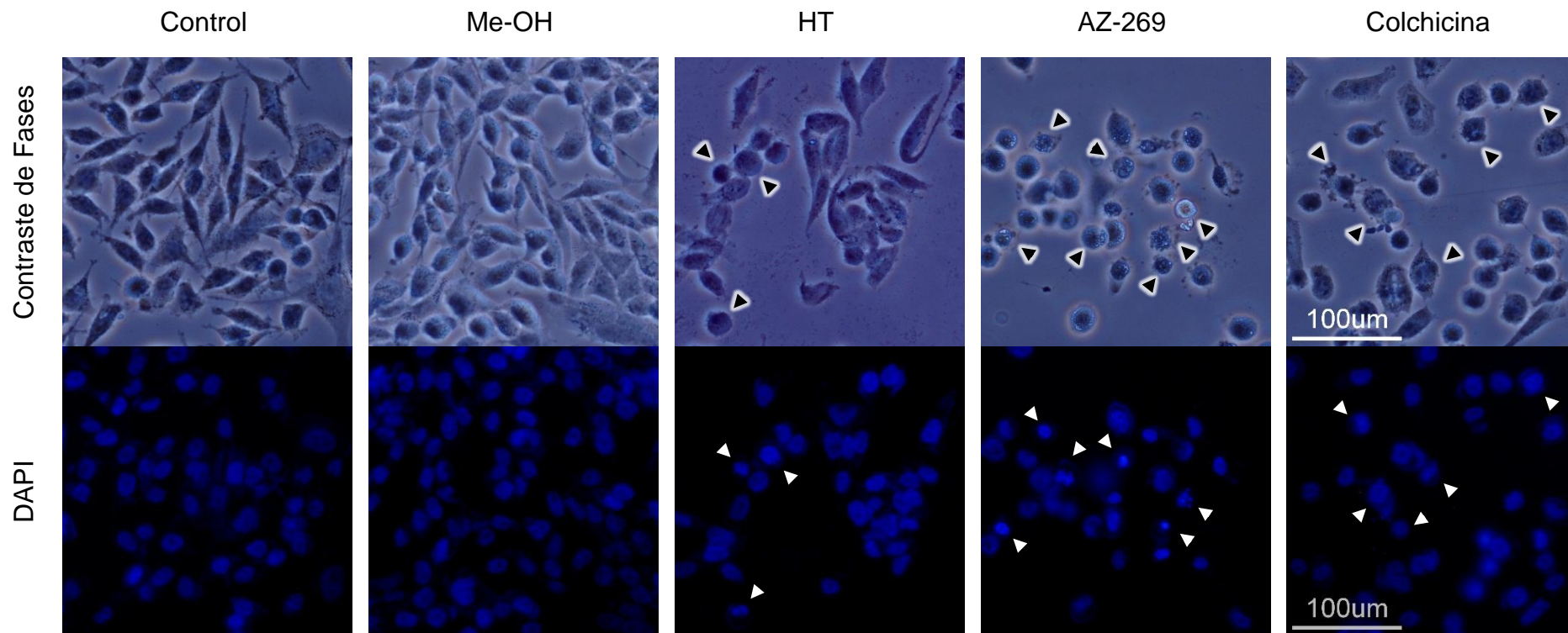


Figura 11. Micrografías de la línea celular PC-3 en las diferentes condiciones evaluadas: Control negativo (células con medio de cultivo), Vehículo (concentración de Me-OH empleada para disolver las  $CI_{50}$ ), los tratamientos con HT y AZ-269 con la concentración  $CI_{50}$  correspondiente y Control positivo (células con  $1\mu\text{g/mL}$  de colchicina) tratadas por 24 horas. En las imágenes superiores se puede apreciar la morfología celular sin tinción alguna; en las imágenes inferiores se muestran los núcleos teñidos con DAPI en color azul. Las flechas negras, señalan células con cambio morfológico (células esféricas y con algunas protrusiones de la membrana plasmática); las flechas blancas señalan condensación de cromatina.



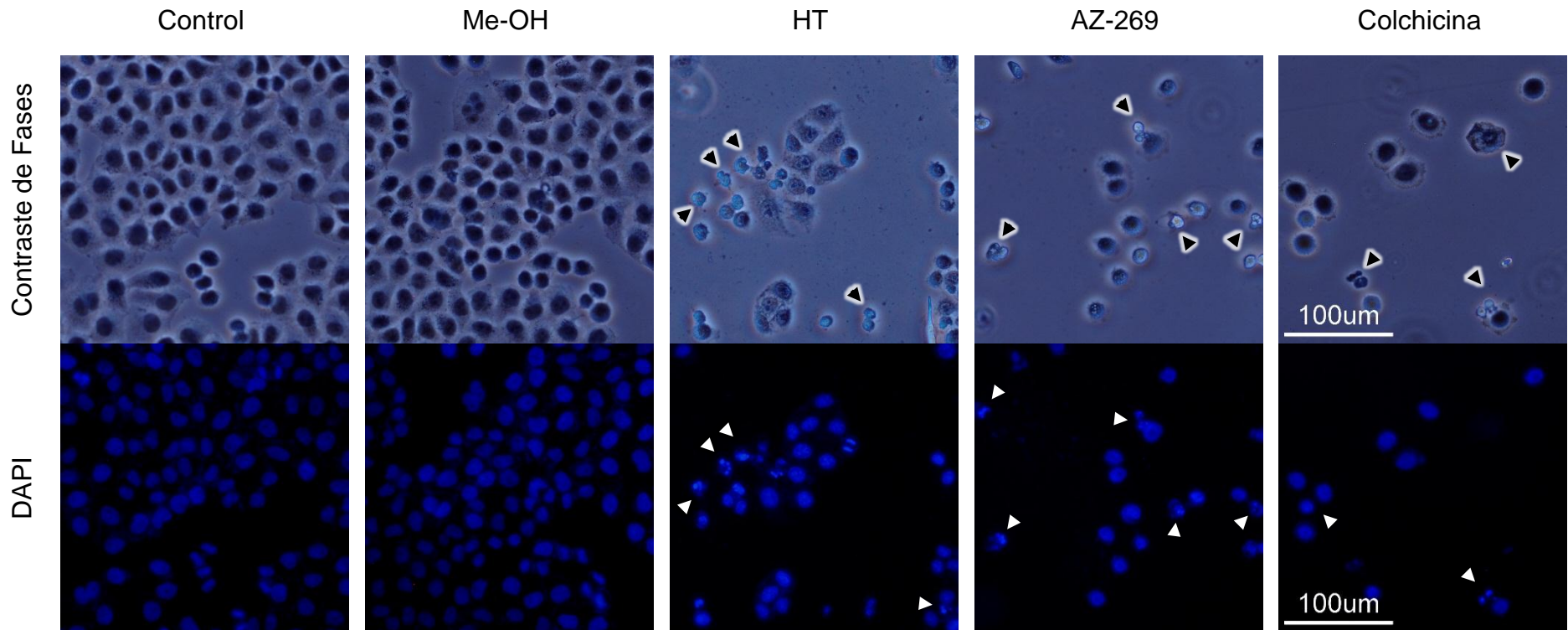


Figura 12. Micrográficas de la línea celular SK-LU-1 en las diferentes condiciones evaluadas: Control negativo (células con medio de cultivo), Vehículo (concentración de Me-OH empleada para disolver las  $CI_{50}$ ), los tratamientos con HT y AZ-269 con la concentración  $CI_{50}$  correspondiente y Control positivo (células con 1µg/mL de colchicina) tratadas por 24 horas. En las imágenes superiores se puede apreciar la morfología celular sin tinción alguna; en las imágenes inferiores se muestran los núcleos teñidos con DAPI en color azul. Las flechas negras, señalan células con cambio morfológico (células pequeñas, esféricas y con algunas protrusiones de la membrana plasmática); las flechas blancas señalan condensación de cromatina.

HT

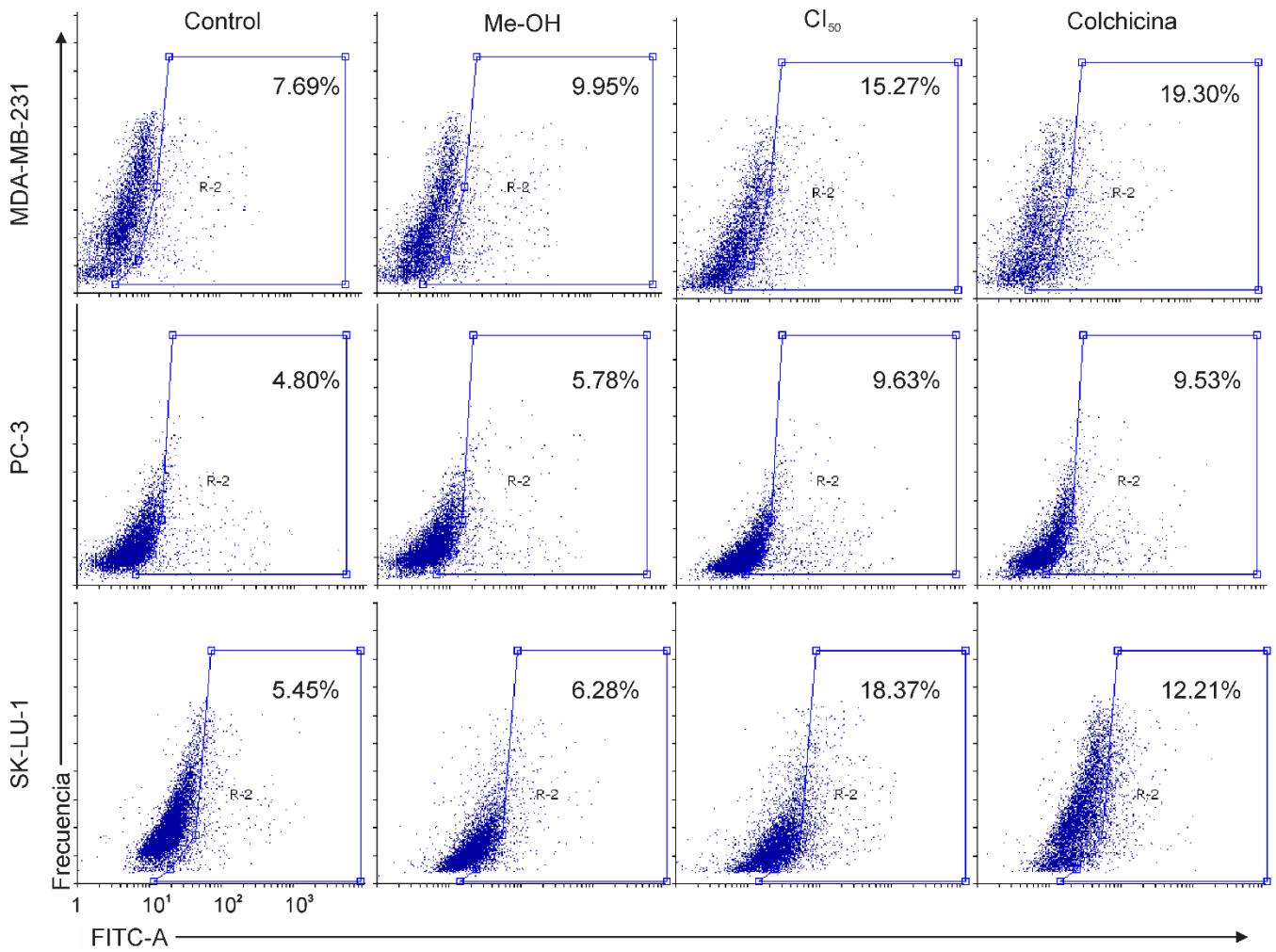


Figura 13. Efecto del compuesto HT sobre la inducción de muerte por apoptosis en las líneas MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1. El polígono marcado indica las células con aumento de caspasa-3 activa.

# AZ-269

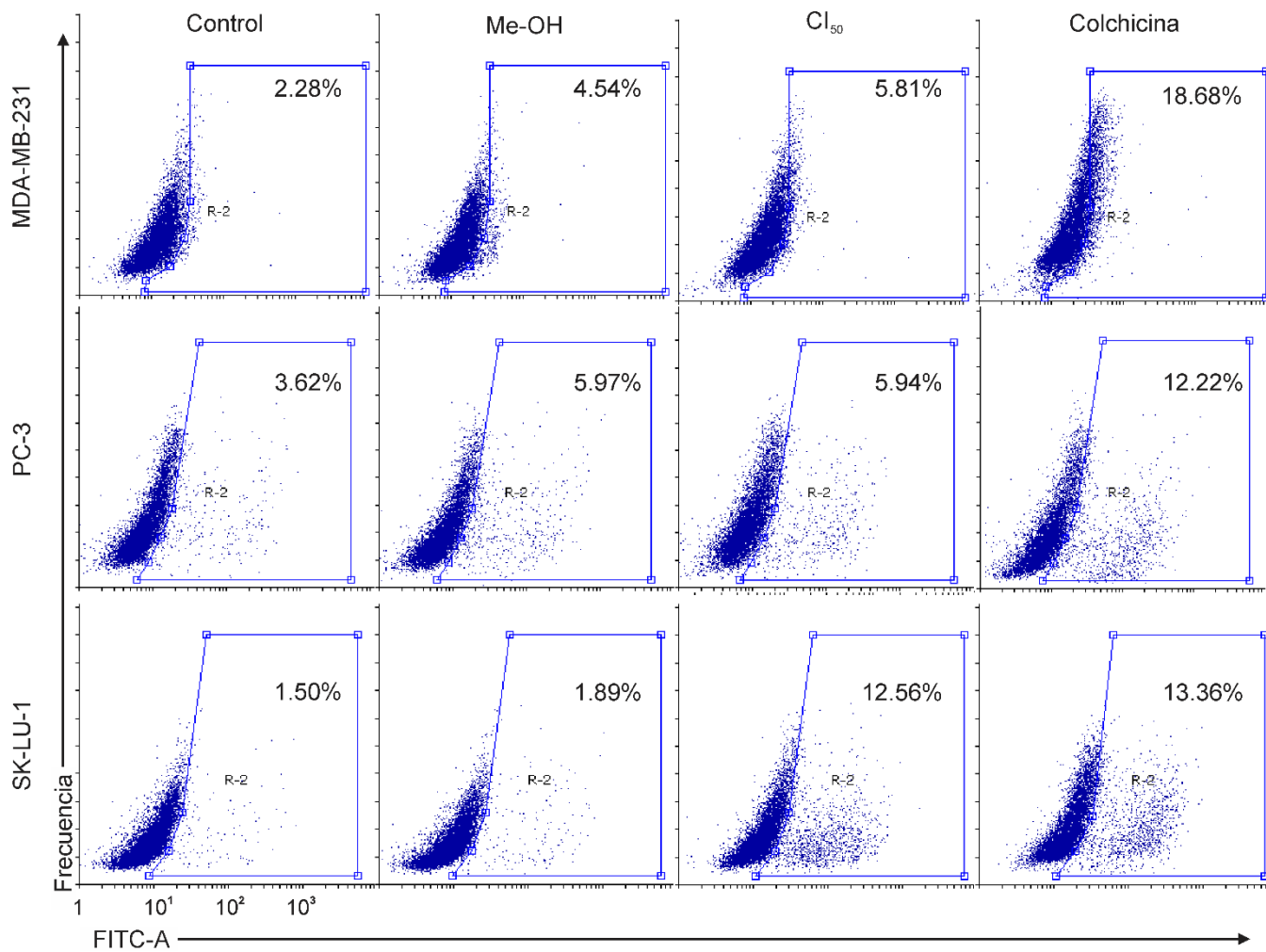


Figura 14. Efecto del compuesto AZ-269 sobre la inducción de muerte por apoptosis en las líneas MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1. El polígono marcado indica las células con aumento de caspasa-3 activa.

% de Caspasa-3 activa			
Línea celular Compuesto (CI <sub>50</sub> )	MDA-MB-231	PC-3	SK-LU-1
HT	5.32	3.85	12.09
AZ-269	1.27	0.00	10.67

Tabla 3. Porcentaje de incremento en la detección de caspasa-3 activa.

Los resultados mostrados en la Tabla 3 indican el porcentaje de caspasa-3 activa, para el con el compuesto HT fue de 5.32% para MDA-MB-231, de 3.85% para PC-3 y 12.09% para SK-LU-1, en comparación el porcentaje generado por el compuesto AZ-269 fue de 1.27%, 0.00% y 10.67% respectivamente.

Los compuestos HT y AZ-269 inducen un aumento de alrededor del 10% en los niveles de caspasa-3 activa para SK-LU-1 mientras que en el resto de las líneas celulares exhibe una menor cantidad.

## Evaluación del HT y AZ-269 sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica

Una vez establecida la inducción de muerte necrótica o apoptótica de los compuestos fenólicos HT y AZ-269 en células tumorales, se procedió a evaluar si éstos afectan de forma diferencial a células no tumorales, para ello linfocitos humanos procedentes de sangre periférica fueron marcados con CFSE, se trataron con las concentraciones correspondientes a las  $CI_{50}$  obtenidas para cada compuesto y se cuantificó el efecto en el potencial proliferativo por citometría de flujo (Figura 15 y 16).

HT

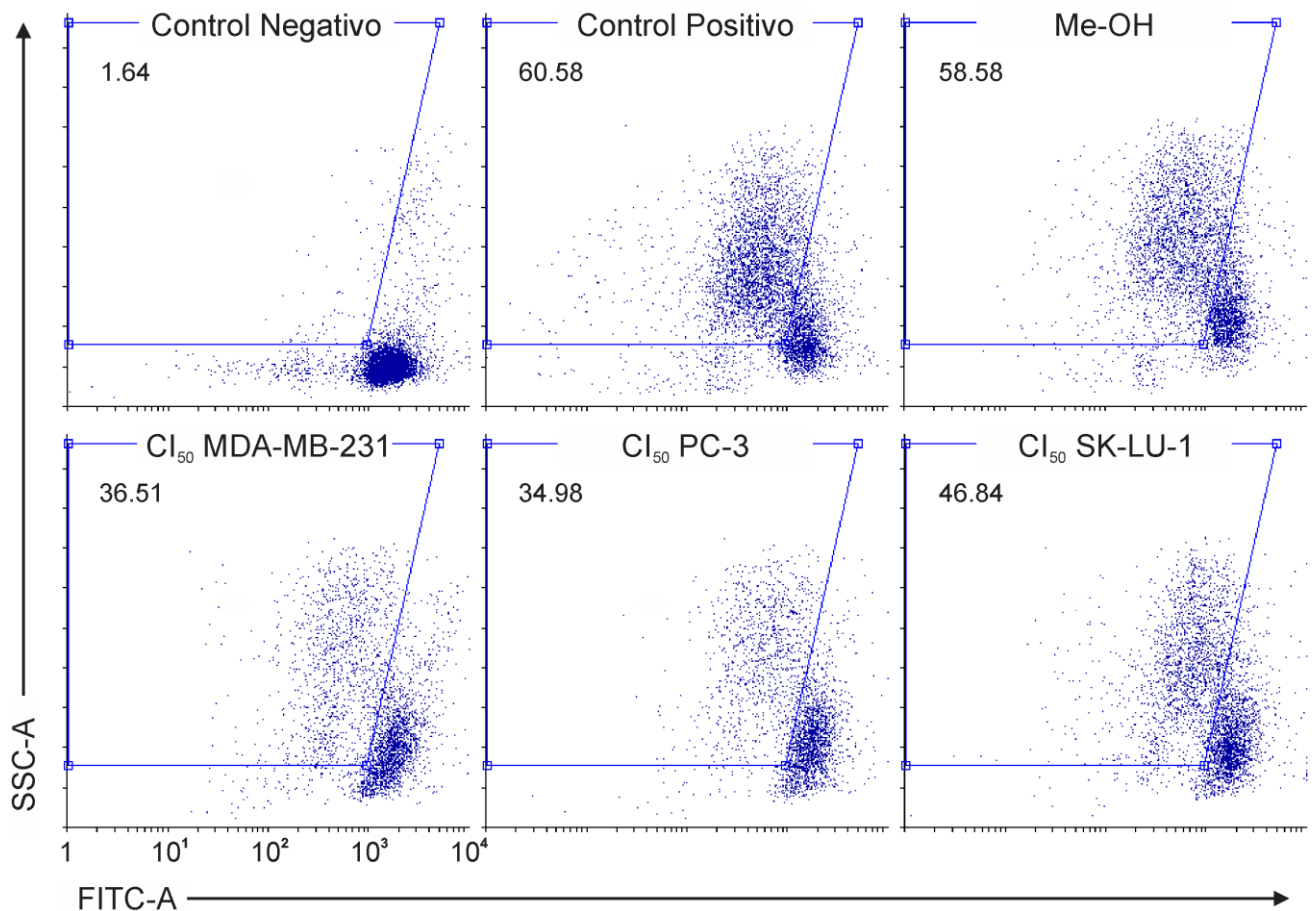


Figura 15. Efecto del HT sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. El polígono marcado indica las células en proliferación.

AZ-269

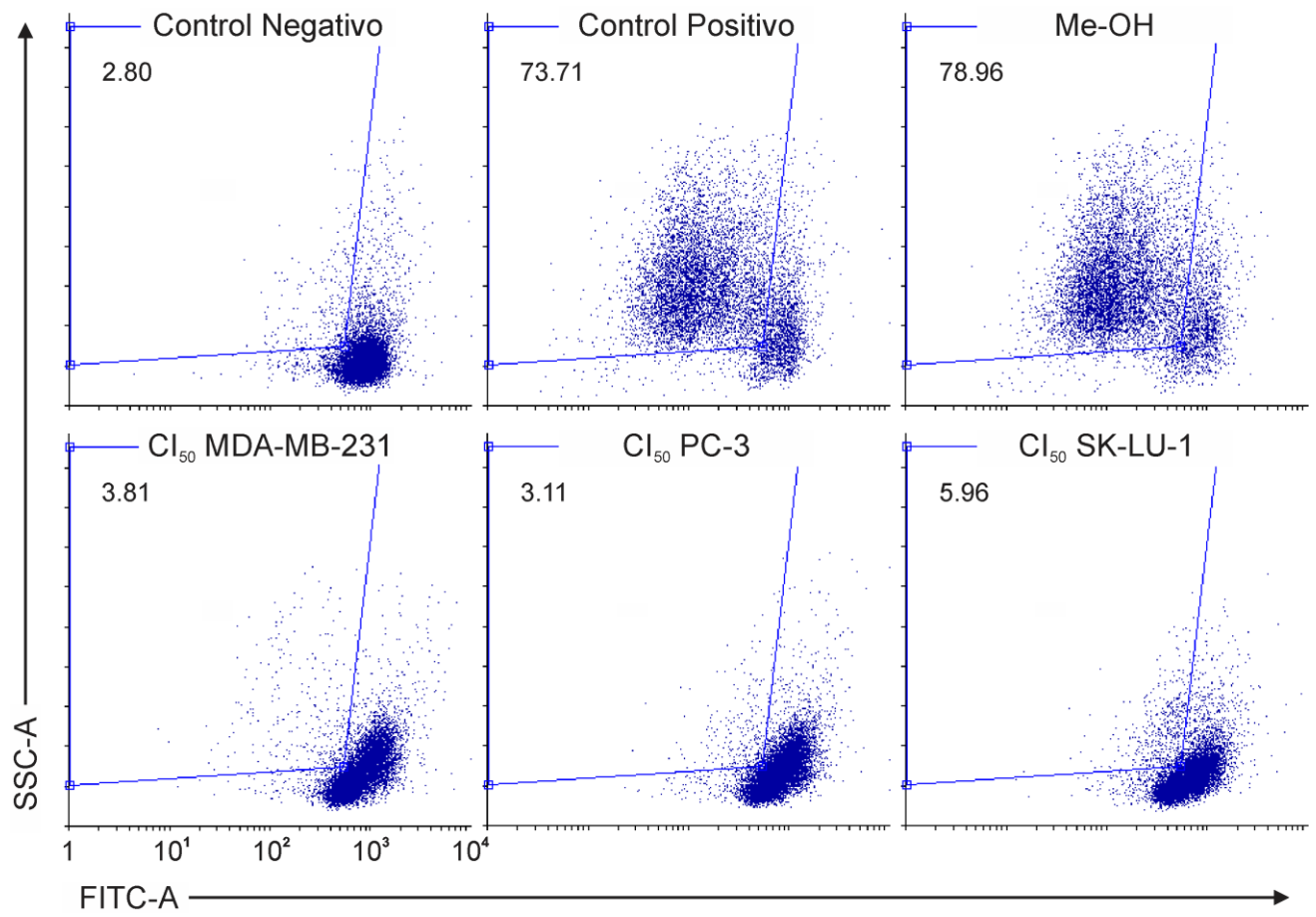


Figura 16. Efecto del AZ-269 sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. El polígono marcado indica las células en proliferación.

% de proliferación		
	HT	AZ-269
Control (-)	2.71	3.79
Control (+)	100.00	100.00
Me-OH	96.70	107.12
CI <sub>50</sub> MDA-MB-231	60.27	5.15
CI <sub>50</sub> PC-3	57.74	4.22
CI <sub>50</sub> SK-LU-1	77.33	8.09

Tabla 4. Porcentaje de proliferación de las células linfocíticas tratadas con las CI<sub>50</sub> de ambos compuestos determinadas para cada línea celular. El porcentaje de proliferación se determinó considerando como parámetro comparativo las células en proliferación del control positivo.

### Inducción de muerte por necrosis en linfocitos humanos

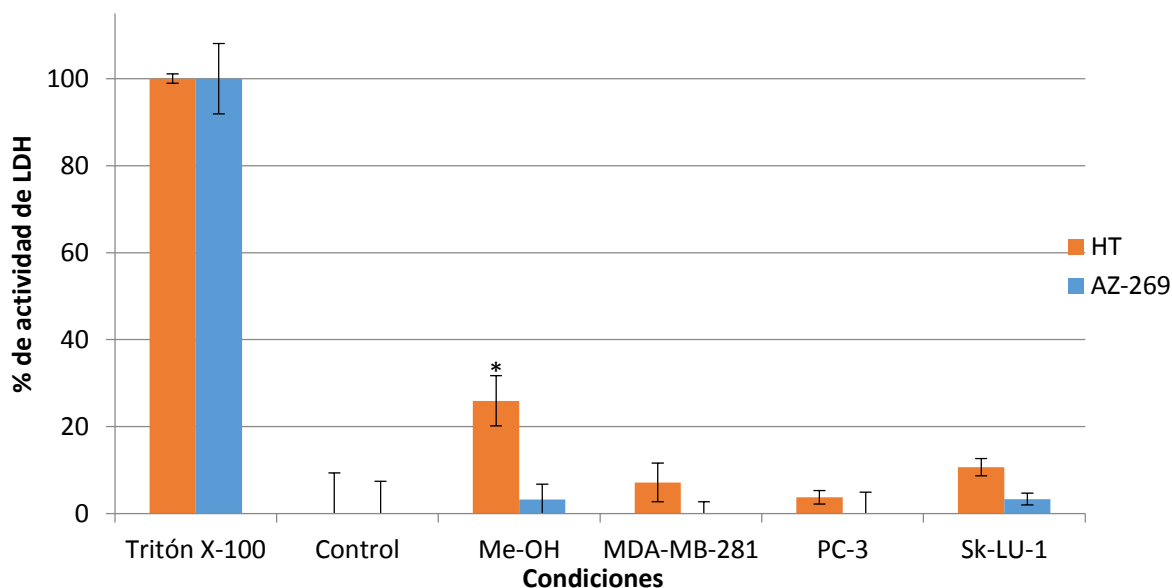


Figura 17. Evaluación de la muerte necrótica inducida por los compuestos HT y AZ-269 en células linfocíticas humanas. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey: (\*p<0.05 vs. Control).

Los resultados mostrados Tabla 4 y Figura 17 establecen que ambos compuestos afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas sin inducir en ellas muerte por necrosis.

## DISCUSIÓN

El cáncer, hoy en día es considerado como uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia tanto a nivel mundial como en el país, según datos de GLOBOCAN en el 2012. Solo en México el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia en mujeres, el cáncer de próstata ocupa el primer lugar en incidencia en hombres y finalmente el cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres y el séptimo en mujeres, sin embargo, éste posee una mortalidad muy elevada (alrededor del 90%), en este panorama la búsqueda de formas para la resolución de este problema es una prioridad para el país.

Actualmente investigadores alrededor del mundo han explorado formas de combatir el cáncer, ya sea descubriendo o caracterizando compuestos de origen natural mediante nuevas síntesis que posean actividad antiproliferativa e inductora de muerte, de tal manera que puedan ser empleados como tratamientos. En este ámbito, se ha reportado que el aceite de olivo o fracciones de este extracto, poseen propiedades antiinflamatorias, antimicóticas, bactericidas y antitumorales; atribuidas a compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentra la oleuropeína y el hidroxitirosol (Tripoli *et al.*, 2005; Fernández-Bolaños *et al.*, 2012). Por otro lado, los aminoácidos se han empleado en procesos de síntesis de compuestos novedosos con potencial uso en diversas áreas.

En ese sentido al evaluar el péptido fenólico AZ-269, al cual se le añadieron residuos de cisteína, encontramos que para disminuir en un 50% la proliferación en células tumorales MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1, se requieren concentraciones de 462.33, 195.90, 123.68  $\mu\text{M}$  respectivamente. Mientras que para el compuesto HT se requieren concentraciones de 97.95, 181.62 y 183.57  $\mu\text{M}$  para MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 respectivamente.

Con lo anterior se infiere que el cambio estructural realizado al AZ-269 no mejora su actividad antiproliferativa en las líneas celulares MDA-MB-231 y PC-3, requiriendo mayor concentración para abatir en un 50% la proliferación, no así para



la línea celular SK-LU-1 en donde es requiere una concentración menor del compuesto AZ-269 en comparación con HT.

Cabe destacar que la línea celular MDA-MB-231 ha sido empleada como modelo celular de triple negativo; este tipo de cáncer es de difícil detección y mal pronóstico, debido a que es sumamente agresivo y presenta una respuesta parcial a la quimioterapia (Podo *et al.*, 2010). Sin embargo, la  $CI_{50}$  obtenida por el compuesto HT en esta línea celular, es la más baja, siendo necesario casi 5 veces más del compuesto AZ-269 para tener el mismo efecto.

Rangel (2015) para el compuesto AZ-269 reporto  $CI_{50}$  de 250 a 290 $\mu$ M en líneas celulares de CaCu, en contraste, este estudio encontró  $CI_{50}$  inferiores para líneas tumorales de próstata (PC-3) y pulmón (SK-LU-1) (195.90 y 123.68 $\mu$ M respectivamente), y mayores para la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (462.33 $\mu$ M).

Una de las características que se busca en los compuestos con potencial antitumoral, independientemente de la dosis que se requiera para obtener una  $CI_{50}$ , es la baja actividad necrótica que pudiera inducir en las células tumorales, por lo cual, durante la evaluación de la actividad necrótica de ambos compuestos, se encontró que el HT induce la liberación de LDH únicamente en la línea de cáncer de pulmón (SK-LU-1), por lo cual se deduce que el compuesto induce una muerte de tipo necrótica, no así en las líneas tumorales de mama (MDA-MB-231) y próstata (PC-3).

Los cultivos celulares de MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1 tratados con el derivado sintético AZ-269 presentan una actividad de LDH significativa, por lo cual se deduce la inducción de una muerte de tipo necrótica; cabe resaltar que en el caso de la línea celular SK-LU-1, este resultado es menor en comparación con el obtenido para HT.

En la evaluación de muerte por apoptosis se encontró que ambos compuestos (HT y AZ-269) inducen un aumento de alrededor del 10% en los niveles de caspasa-3 activa a las 24 horas para SK-LU-1 mientras que el resto de las líneas celulares

exhiben una menor cantidad. No obstante, las imágenes obtenidas por microscopía muestran una marcada morfología apoptótica en las células tratadas con el compuesto AZ-269 lo que no se refleja en la detección de la caspasa-3 activa por lo que surge la posibilidad de que se esté llevando a cabo la ruta apoptótica independiente de caspasas (Wang & Youle, 2009; Kroemer *et al.*, 2009) o que esta caspasa no se encuentra participando en la inducción de muerte en estos tipos celulares.

Con la finalidad de determinar algún tipo de selectividad de los compuestos se evaluó su actividad sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos tratados con las  $CI_{50}$  obtenidas, se encontró que el compuesto HT permite un porcentaje de proliferación entre 57.74% y 77.33%, en comparación con el AZ-269, el cual solo permitió un 8.09%, como porcentaje máximo de proliferación y un mínimo de 5.13%, resultado equiparable con el control negativo a proliferación ocupado en los ensayos, lo que indica que la modificación con aminoácidos realizada al HT, afecta fuertemente la proliferación de linfocitos.

Las pruebas de actividad de LDH en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos tratados no muestran una inducción de muerte por necrosis de ambos compuestos, es probable que el compuesto AZ-269 afecte la proliferación de los linfocitos modulando la progresión del ciclo celular. Se ha reportado esta capacidad de algunos componentes fenólicos (Fabiani *et al.*, 2006; Sirianni *et al.*, 2010; Vilaplana-Pérez, 2014), sin embargo, es necesario realizar las evaluaciones correspondientes para aseverar esta suposición.

De forma independiente se ha generado un compuesto disulfuro a partir del Hidroxitirosol (Figura 18) y ha mostrado poseer actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en un modelo *in vitro* de leucemia quimiorresistente (HL60R) (Sepporta *et al.*, 2013).

Compuestos con estructura similar al AZ-269 como el ácido nordihidroguaiarético, también llamado masoprocol (Figura 18), es un antioxidante que posee actividades,

antiinflamatorias y antineoplásicas, que se ha empleado en el tratamiento tópico en lesiones cutáneas precancerosas como la queratosis actínica (NCBI, 2016a).

Un derivado sintético del masoprocol es el terameprocol (Figura 18), el cual es un inhibidor de la transcripción, brindándole características antiangiogénicas y antiproliferativas (NCBI, 2016b). El terameprocol ha sido empleado en ensayos clínicos con pacientes que presentan leucemias avanzadas, concluyendo que puede administrarse con seguridad observando actividad clínica y la modulación de los biomarcadores (Tibes *et al.*, 2015).

En sentido tal que por las características estructurales y biológicas que presenta el compuesto AZ-269 es un candidato idóneo para determinar su actividad biológica en leucemias y linfomas.

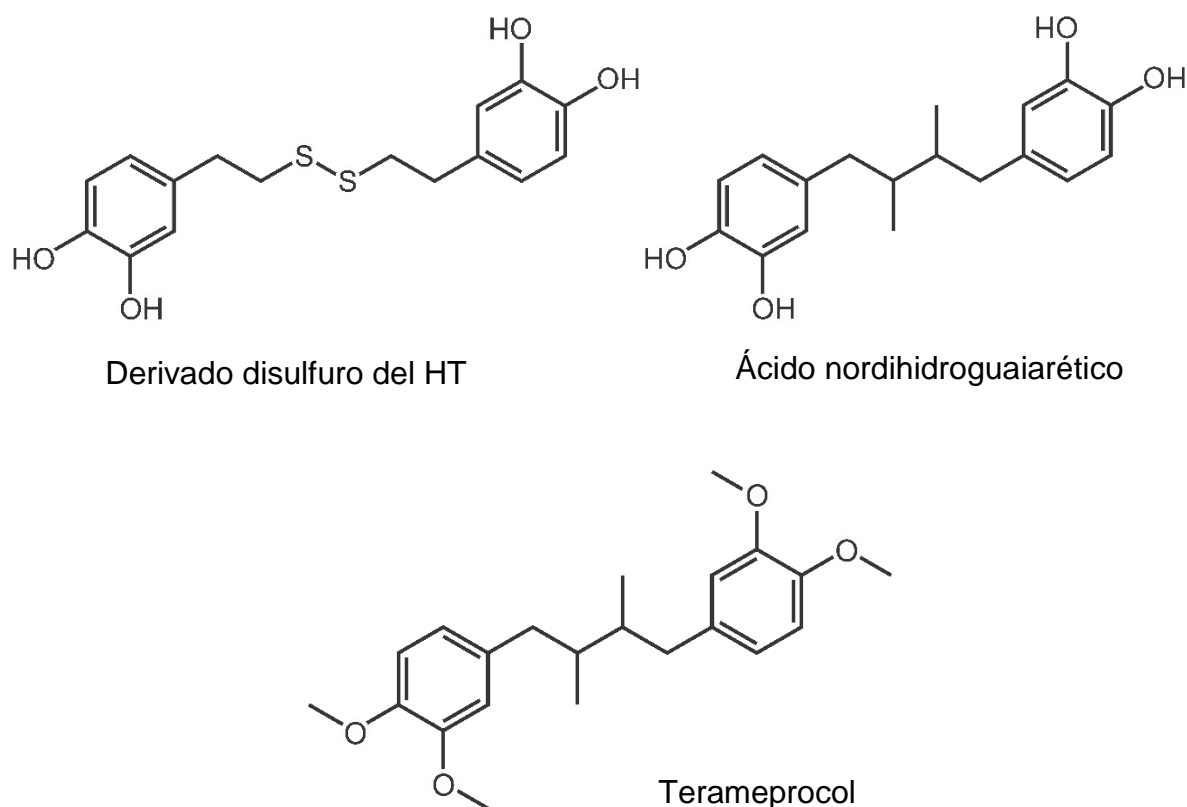


Figura 18. Estructuras similares al compuesto AZ-269. Tomado de: Sepporta *et al.*, 2013; NCBI, 2016a; NCBI 2016b.

## CONCLUSIONES

El compuesto HT posee mejor actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de mama y próstata, sin inducir muerte por necrosis en comparación con el AZ-269.

El compuesto AZ-269 posee mejor actividad antiproliferativa en la línea de cáncer pulmonar, además de inducir una muerte por necrosis menor en comparación con el HT.

Los compuestos HT y AZ-269 generan una morfología apoptótica acompañada de la compactación de cromatina en las líneas celulares MDA-MB-231, PC-3 y SK-LU-1, indicando una inducción de muerte por apoptosis, mostrando un incremento en la detección de la caspasa-3-activa solo en la línea celular SK-LU-1

El compuesto HT afecta en menor medida el potencial proliferativo de linfocitos humanos, en comparación con el AZ-269, ambos sin inducir una muerte por necrosis.

## REFERENCIAS

- Adams, J.M, Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26 (9):1324-1337.
- Adelfinskaya O & Herdewijn P. (2007). Amino acid phosphoramidate nucleotides as alternative substrates for HIV-1 reverse transcriptase. *Angew. Chem., Int.* 46(23): 4356–4358.
- Adelfinskaya O, Terrazas M, Froeyen M, Marliere P, Nauwelaerts K, Herdewijn P. (2007). Polymerase-catalyzed synthesis of DNA from phosphoramidate conjugates of deoxynucleotides and amino acids. *Nucleic Acids Res.* 35(15): 5060–5072.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5ta edición. Garland Science. NY. 1053-1130,1205-1250.
- Anthony C.P. & Thibodeau G.A. (1991). *Anatomía y fisiología*. 10a Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. Pp. 724.
- Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V y Villarreal P. (2011). Oncoguía: Cáncer de Mama. *Cancerología* 6: 77 – 86.
- Atanasov A.G, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E.M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss E.H, Rollinger J.M, Schuster D, Breuss J.M, Bochkov V, Mihovilovic M.D, Kopp B, Bauer R, Dirsch V.M, Stuppner H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*, 33(8):1582–1614.
- Bahar A.A & Ren D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 6(12): 1543–1575.
- Bolsover S.R. (2007). *Biología celular*. Editorial Acriba. 2ª edición. Editorial Acriba. Zaragoza. 477pp.
- Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 49(1):179–84.

- Brambilla E, Travis W.D, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. (2001). The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J.* 18 (6): 1059-1068.
- Bras M, Queenan B. y Susin S.A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry.* 70(2): 231-239.
- Bulotta S, Corradino R, Celano M, D'Agostino M, Maiuolo J, Oliverio M, Procopio A, Iannone M, Rotirota D, Russo D. (2011). Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chem* 127(4): 1609–1614.
- Camacho-Camacho C, Rojas-Oviedo I, Garza-Ortiza A, Toscano R. A, Sánchez-Sánchez L, Cardenas J y López-Muñoz H. (2016). Tributyltin(IV) Schiff base complexes with amino acid derivatives: synthesis, characterization and biological activity. *Appl. Organometal. Chem.* 30(4): 199-207.
- Coleman M.P, Quaresma M, Berrino F, Lutz J.M, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir H.K, Elwood J.M, Tsukuma H, Koifman S, E Silva G.A, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm H.H, Young J.L; CONCORD Working Group. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*, 9(8): 730–56.
- Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessí MA, Spencer JP. (2009). Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol Nutr Food Res.* 53(7):897–903.
- Danial N.N. & Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell.* 116(2): 205-219.
- Della Ragione F, Cucciolla V, Criniti V, Indaco S, Borriello A, Zappia V. (2002). Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett.* 532(3):289–294.
- Earnshaw W.C, Martins L.M y Kaufmann S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68, 383-424.

- Elamin MH, Hassan ZK, Omer SA, Daghestani MH, Al-Olayan EM, Virk P, Elobeid MA & Mohammed OB. (2013). Apoptotic and antiproliferative activity of olive oil hydroxytyrosol on breast cancer cells. *J MedPlantsRes.* 7(32):2420–8.
- Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro G.F, Di Saverio C, Morozzi G. (2006). Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* 136(3): 614–619.
- Fabiani R, Fuccelli R, Pieravanti F, De Bartolomeo A, & Morozzi G. (2009). Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol Nutr Food Res* 53(7): 887-896.
- Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, & Morozzi G. (2011). The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oilphenol compounds induce apoptosis on HL60 cells. *Food Chem* 125(4): 1249–1255.
- Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr* 138(8): 1411–1416.
- Fernández-Bolaños J.G, López O, Fernández-Bolanos J, y Rodríguez-Gutiérrez G. (2008). Hydroxytyrosol and derivatives: Isolation, synthesis, and biological properties. *Curr Org Chem* 12(6): 442–463.
- Fernández-Bolaños J.G, López O, López-García M.A. y Maset A. (2012). Capítulo 20. Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives en *Olive Oil: Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*; Editorial INTECH.
- Fernández-Herrera M.A, López-Muñoz H, Hernández-Vázquez J.M, López-Dávila M, Escobar-Sánchez M.L, Sánchez-Sánchez L, Pinto B.M, Sandoval-Ramírez J. (2010). Synthesis of 26-hydroxy-22 oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioor Med Chem.* 18(7):2474–2484.

- Fernández-Herrera M.A, López-Muñoz H, Hernández-Vázquez J.M, López-Dávila M, Mohan S, Escobar-Sánchez M.L, Sánchez-Sánchez L, Pinto B.M, Sandoval-Ramírez J. (2011). Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3b,16b-diacetoxy-22-oxocholest-5-en-26-yl  $\beta$ -D-glucopyranoside: A selective anticancer agent in cervicouterine cell lines. *Eur J Med Chem.* 46(9):3877-86.
- GLOBOCAN (2012). Population fact sheets. Consultada 01 Enero 2016. Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
- Gogvadze V, Orrenius S y Zhivotovsky B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.*1757(5):639-647pp.
- Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie J.C, Braut-Boucher F, Daniel F, Grodet A, Gougerot-Pocidaló M.A, Chastre E, Kotelevets L, Lizard G, Vandewalle A, Driss F, Ogier-Denis E. (2006). Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27(9): 1812–1827.
- Han J, Talorete T.P, Yamada P, Isoda H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 59(1) (1):45–53.
- Hasbold J, Gett A.V, Rush J.S, Deenick E, Avery D, Jun J, Hodgkin P.D. (1999). Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol.* 77(6):516-22.
- Henry C.M, Hollville E, Martin S.J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods.* 61(2):90-97.
- Hicks R.P. (2016). Antibacterial and anticancer activity of a series of novel peptides incorporating cyclic tetra-substituted C $\alpha$  amino acids. *Bioorg Med Chem.* 24(18):4056-4065.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (2015a) Cáncer de Próstata. Consultada el 5 de agosto del 2016. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>



- Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (2015b) Cáncer de pulmón. Consultada el 5 de agosto del 2016. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-pulmon>
- Jiménez L. F., & Merchant H. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial Prentice Hall. México, 595-611, 617 pp.
- Karp G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. 4ª edición McGraw-Hill. México, 900pp.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, El-Deiry W, Golstein P, Green D.R, Hengartner M, Knight R.A, Kumar S, Lipton S.A, Malorni W, Nuñez G, Peter M.E, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, y Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16(1), 3–11.
- Kueng W, Silver E. y Eppenverg U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical.* 182(1):16-19.
- Kumar V., Abbas K. A., Aster C. J. (2009). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Editorial. Elseiver. 8a edición.
- Lima V. S, Lemos S. S, Casagrande G. A (2015) Tributyltin (IV) complexes with amino acid-derived Schiff bases: X-ray and solution structures. *Polyhedron* 89: 85–90.
- Lizarbe M.A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.*, 101:1-33.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A., Krieger M., Scott Matthew P., Lawrence Zipursky S., Darnell J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. 5ta edición, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 886-890.
- Lovell J.F, Billen L.P, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B y Andrews D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135(6): 1074–1084.
- Medema J.P, Scaffidi C, Kischkel F.C, Shevchenko A, Mann M, Krammer P.H y Peter M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16(10): 2794-2804.

- Müller-Esterl W. (2008). Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. editorial reverte. España. Paginas consultadas: 595-596.
- Muzio M, Chinnaiyan A.M, Kischkel F.C, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz J.D, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer P.H, Peter ME y Dixit V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 85(6): 817-827.
- National Cancer Institute (NCI). (2015). Tratamiento del Cáncer. Consultada el 01 de Enero del 2016. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- National Cancer Institute (NCI). (2016a). Breast Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version. Consultada el 5 de agosto del 2016. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>
- National Cancer Institute (NCI). (2016b). Prostate Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version. Consultada el 5 de agosto del 2016. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-treatment-pdq>
- National Cancer Institute (NCI). (2016c). Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version. Consultada el 5 de agosto del 2016. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>
- National Center for Biotechnology Information. (NCBI). (2016b). Terameprocol. PubChem Compound Database; CID=476861. Consultado el 10 de Agosto del 2016. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/476861> (accessed Oct. 10, 2016).
- National Center for Biotechnology Information. (NCBI).(2016a). Masoprocol. PubChem Compound Database; CID=71398. Consultado el 10 de Agosto del 2016. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71398>.
- Nelson W.G, De Marzo A.M, Isaacs W.B. (2003). Prostate cancer. *N Engl J Med* 349 (4): 366-81.
- Newman D.J & Cragg G.M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 79(3): 629–661.

- Omar SH. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J.* 18(3): 111–121.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Cáncer. Consultada el 01 de Enero del 2016. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Cáncer de mama: prevención y control. Consultada el 5 de agosto del 2016. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
- Orrenius S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev.* 39(2): 443-455.
- Padmanabhan, P, Khaleefathullah, S, Kaveri, K, Palani, G, Ramanathan, G, Thennarasu, S, y Tirichurapalli Sivagnanam, U. (2016). Antiviral activity of Thiosemicarbazones derived from  $\alpha$ -amino acids against Dengue virus. *J Med Virol.* doi:10.1002/jmv.24655.
- Pérez-Jiménez F, Álvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio J.J, Garcia Luna P.P, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton P.M, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez M.A, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Perucho M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M.C, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriguer-Escofet F, de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro J.M, Villar-Ortiz J.R, Visioli F. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest.* 35(7): 421–424.
- Pitot, H.C. (1981). *Fundamentos de oncología.* Editorial Reverté. España.180pp.
- Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Moran, S. (1981). The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J Supramol Struct Cell Biochem.* 17(2):133-146.
- Podo F, Buydens L M, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS, Van Huffel S, van Laarhoven HW, Luts J, Monleon D, Postma GJ, Schneiderhan-Marra N, Santoro F, Wouters H, Russnes HG, Sørli T, Tagliabue E, Børresen-Dale AL.

- (2010). Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol.* 4(3):209-229.
- Rangel E. (2015). Efecto antiproliferativo y citotóxico de péptidos polifenólicos provenientes del aceite de olivo en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
  - Rémond E, Martin C, Martinez J, & Cavelier F. (2016). Silicon-Containing Amino Acids: Synthetic Aspects, Conformational Studies, and Applications to Bioactive Peptides. *Chem. Rev.* Article ASAP.
  - Riedl S.J & Salvesen G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(5): 405-413.
  - Riedl S.J & Shi Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11): 897-907.
  - Rosignoli P, Fuccelli R, Sepporta M.V, Fabiani R. (2016). In vitro chemopreventive activities of hydroxytyrosol: the main phenolic compound present in extra-virgin olive oil. *Food Funct.* 7(1):301-307.
  - Sánchez G. J., & Trejo B. I. (2006). *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial Alfil. México.
  - Sánchez V. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev Cubana Invest Bioméd;* 20(4): 266-274.
  - Sepporta M.V, López-García M.Á, Fabiani R, Maya I, Fernández-Bolaños J.G. (2013). Enhanced chemopreventive activity of hydroxytyrosol on HL60 and HL60R cells by chemical conversion into thio derivatives. *Eur J Pharm Sci.* 48(4-5):790-798.
  - Sharpe J.C, Arnoult D y Youle R.J. (2004). Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2): 107-113.
  - Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell* 9(3), 459–470.
  - Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Andò S, Maggiolini M, Pezzi V. (2010). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res* 54(6): 833–840.

- Taylor R.C, Cullen S.P & Martin S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3): 231-241.
- Testa U & Riccioni R. (2007). Deregulation Of Apoptosis In Acute Myeloid Leukemia. *Haematologica* 92(1): 81-94.
- Tibes R, McDonagh K.T, Lekakis L, Bogenberger J.M, Kim S, Frazer N, Mohrland S, Bassett D, Garcia R, Schroeder K, Shanmugam V, Carpten J, Hagelstrom R.T, Beaudry C, Von Hoff D, Shea T.C. (2015). Phase I study of the novel Cdc2/CDK1 and AKT inhibitor terameprocol in patients with advanced leukemias. *Invest New Drugs.* 33(2):389-96.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* 18(1), 98–112.
- Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko D.V, Takahashi N, Vandenabeele P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods.* 61(2):117-129.
- Vilaplana-Pérez, C., Auñón, D., García-Flores, L. A., & Gil-Izquierdo, A. (2014). Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Front Nutr.* 1: 18.
- Villamor N. (2004). Apoptosis: mecanismos celulares e implicaciones clínicas. *Haematologica*, 89:126-147.
- Voet D & Voet J. (2004). *Bioquímica*. 3ra edición. Editorial medica panamericana. Uruguay. Paginas consultadas: 75-76.
- Wang C. & Youle R.J. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet.* 43: 95-118.
- Wayne M. Becker, Lewis J. Kleinsmith, Jeff Hardin. (2007). *El mundo de la célula*. Ed. Pearson Educación, S.A. 7a edición. Madrid. Paginas consultadas: 1-20.
- Wingo P.A, Ries L.A, Giovino G.A, Miller D.S, Rosenberg H.M, Shopland D.R, Thun M.J, Edwards B.K. (1999). Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* 91(8): 675-690.

- Youle R.J & Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 47-59.
- Zhao B, Ma Y, Xu Z, Wang J, Wang F, Wang D, Pan S, Wu Y, Pan H, Xu D, Liu L, Jiang H. (2014). Hydroxytyrosol, a natural molecule from olive oil, suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells via inactivating AKT and nuclear factor-kappa B pathways. *Cancer Lett.* 347(1):79–87.

## APÉNDICE

### *Medio RPMI-1640*

Composición del medio Roswell Park Memorial Institute, este fue suplementado con 2.00 g de bicarbonato de sodio por litro.

Componentes	g/L		
<u>Sales inorgánicas</u>		L-Fenilalanina	0.015
Nitrato de Calcio•4 H <sub>2</sub> O	0.1	L-Prolina	0.02
Sulfato de Magnesio (Anhídrido)	0.04884	L-Serina	0.03
Cloruro de Potasio	0.4	L-Treonina	0.02
Cloruro de Sodio	6.0	L-Triptofano	0.005
Fosfato de Sodio Dibásico (Anhídrido)	0.8	L-Tirosina•2Na•2 H <sub>2</sub> O	0.02883
		L-Valina	0.02
<u>Aminoácidos</u>		<u>Vitaminas</u>	
L-Arginina	0.2	Biotina	0.0002
L-Asparagina (Anhídrido)	0.05	Cloruro de Colina	0.003
L-Acido Aspártico	0.02	Ácido Fólico	0.001
L-Cistine•2HCl	0.0652	myo-Inositol	0.035
L-Acido Glutámico	0.02	Niacinamida	0.001
L-Glutamina	0.3	D-Ácido Pantoténico	0.00025
Glicina	0.01	Ácido p-aminobenzoico	0.001
L-Histidina	0.015	Piridoxina•HCl	0.001
Hidroxi-L-Prolina	0.02	Riboflavina	0.0002
L-Isoleucina	0.05	Tiamina•HCl	0.001
L-Leucina	0.05	Vitamina B12	0.000005
L-Lisina•HCl	0.04	<u>Otros</u>	
L-Metionina	0.015	Glutación (Reducido)	0.001
		Rojo de Fenol•Na	0.0053

### *Medio D-MEM*

Composición del medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium, este fue suplementado con 3.70 g de bicarbonato de sodio por litro.

Componentes	g/L		
<u>Sales Inorgánicas</u>		L-Arginina•HCl	0.084
Cloruro de cálcico(Anhídrido)	0.2	L-Cistina•2HCl	0.0626
Nitrato Ferrico•9H <sub>2</sub> O	0.0001	L-Glutamine	0.584
Sulfato de Magnesio (Anhídrido)	0.09767	Glicina	0.03
Cloruro de Potasio	0.4	L-Histidina•HCl• H <sub>2</sub> O	0.042
Cloruro de Sodio	6.4	L-Isoleucina	0.105
Fosfato Monobásico Sodio (Anhídrido)	0.109	L-Leucina	0.105
		L-Lisina•HCl	0.146
<u>Aminoácidos</u>		L-Metionina	0.03
		L-Fenilalanina	0.066
		L-Serina	0.042

L-Treonina	0.095	Niacinamida	0.004
L-Triptófano	0.016	D-Ácido Pantoténico	0.004
L-Tirosina 2Na•2H <sub>2</sub> O	0.10379	Piridoxina•HCl	0.004
L-Valina	0.094	Riboflavina	0.0004
<u>Vitaminas</u>		Tiamina•HCl	0.004
Cloruro de Colina	0.004	<u>Otros</u>	
Ácido Fólico	0.004	Glucosa	4.5
myo-Inositol	0.0072	Rojo de Fenol•Na	0.0159

### *Verseno*

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

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

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 1.20Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 min. Se almacena a 4 °C.

### *Amortiguador salino de fosfatos (PBS)*

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

Cloruro de magnesio (Sigma, U.S.A)	0.10g
Cloruro de calcio (Sigma, U.S.A)	0.10g
Cloruro de sodio (Sigma, U.S.A)	8.00g
Cloruro de potasio (Sigma, U.S.A)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma, U.S.A)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (Sigma, U.S.A)	0.20g

El cloruro de magnesio y cloruro de calcio se disuelve en 100 mL de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 mL de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando



HCl 1M y se afora a 1000 mL. Se esteriliza usando filtro (Millipore) de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacena a 4 °C.

#### *Glutaraldehído*

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

#### *Solución de ácido acético (10 %)*

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

#### *Solución cristal violeta (0.1 %)*

Para prepara 500mL de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH=6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye muy bien y por último se filtra usando papel Whatman núm. 2. Se almacena a temperatura ambiente.

Cloruro de potasio (Sigma, U.S.A)	3.96g
Ácido fórmico (Sigma, U.S.A)	4.28mL
Cristal violeta (Sigma, U.S.A)	1.00g

#### *Solución de paraformaldehído (2 %)*

Se emplea como solución fijadora, mediante la formación de enlaces cruzados, manteniendo la morfología celular. Para la preparación de 100 mL se pesan 2.00 g de paraformaldehído (Sigma, U.S.A) y se disuelve en PBS en baño maría sin que la temperatura rebase los 60 °C. Se almacena a 4 °C.

#### *Desactivación de suero fetal bovino (SFB) o Suero de Ternera Neonata (STN)*

El SFB o STN es descongelado a temperatura ambiente, posteriormente es puesto a baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. Posteriormente se preparan alícuotas de 50 mL en tubos cónicos de plástico para su mejor manipulación.