



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

**Evaluación de la actividad antiproliferativa, necrótica
y apoptótica de la lactona sesquiterpénica Helenalina
en cultivos de células tumorales**

TESIS

que para obtener el título de:

BIÓLOGO

presenta:

Victor Ulises Villafañe Hernandez

Director de tesis:

Dr. Luis Sánchez Sánchez



Ciudad de México, 2020



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.

“Visto a la luz de la evolución, la biología es, quizás la ciencia más satisfactoria e inspiradora”

-Theodosius Dobzhansky

“Casi todos los aspectos de la vida se organizan en el nivel molecular, y si no entendemos las moléculas nuestra comprensión de la vida misma será muy incompleta”

-Francis Crick

“Lo que plantea un desafío tan grande no es solo la complejidad de los organismos vivos, sino también el ingenio increíble que a menudo se manifiesta en su diseño. Es a nivel molecular donde se nota con más claridad su ingeniosa estructura biológica y la perfección de los propósitos alcanzados”

-Michael Denton

“Confrontar al cáncer es ponerse frente a una especie paralela, quizá aún más adaptada que nosotros a la supervivencia”

-Siddhartha Mukherjee

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios, la *Universidad Nacional Autónoma de México*, por la preparación académica que me ha brindado.

A la *Facultad de Estudios Superiores Zaragoza*, por ser un segundo hogar durante todo este tiempo.

Al Dr. *Luis Sánchez Sánchez*, por brindarme su espacio, atención, confianza y apoyo durante mi estancia en su equipo de trabajo, por acercarme a la investigación, por enseñarme que la investigación es constante.

Al Dr. *Hugo López Muñoz*, por ser una fuente de inspiración para adentrarme en la investigación biológica, porque sus conocimientos nunca dejan de sorprenderme, por enseñarme que la investigación es impredecible.

Al Dr. *Fernando Flores Guzmán*, por ampliar mi visión de la investigación biológica, por ser un guía fundamental en el desarrollo de este trabajo, por inspirarme a crecer académica y profesionalmente.

Al Dr. *Octavio Daniel Reyes Hernández*, por la motivación y apoyo constante, por enseñarme que la investigación no es uniforme.

Al Dr. *Alberto Monroy García*, por las observaciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. *Edelmiro Santiago Osorio*, por las observaciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de los proyectos:

PAPIIT IN-216718 y IN-226420

CONACyT 255881 y 253979

Dedicatorias

Esta tesis la dedico con todo mi amor y agradecimiento a las personas más importantes en mi vida, a quienes admiro y respeto con tanto anhelo. A mis padres, Norberto Victor Villafañe Mendoza y Josefina Hernandez Gaspar, ustedes son la base de lo soy y quiero llegar a ser, les agradezco todo el amor, confianza y apoyo incondicional que me han brindado. Este logro al igual que todos los que vienen no es mío sino nuestro.

Gracias por siempre estar a mi lado.

Esta tesis también la dedico con cariño y un gran agradecimiento a mi familia, amigos y profesores, quienes me han apoyado y han influido de diferentes formas a concluir este trabajo.

Índice

Resumen	8
Marco teórico.....	9
<i>La célula.....</i>	9
<i>Ciclo celular</i>	9
<i>Muerte celular</i>	10
<i>Necrosis</i>	10
<i>Apoptosis.....</i>	10
<i>Cáncer.....</i>	13
<i>Cáncer de pulmón.....</i>	14
<i>Cáncer de mama</i>	15
<i>Cáncer cervicouterino.....</i>	16
<i>Tratamientos contra el cáncer</i>	17
<i>Efectos secundarios de los quimioterapéuticos.....</i>	19
<i>Las plantas como fuente de nuevos compuestos quimioterapéuticos.....</i>	20
<i>Lactonas sesquiterpénicas (LS).....</i>	21
<i>Relación estructura-actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas</i>	22
<i>Actividad antitumoral de las lactonas sesquiterpénicas de tipo pseudoguayanólido</i>	24
<i>Helenalina.....</i>	26
Planteamiento del problema.....	31
Justificación.....	32
Hipótesis	33
Objetivos.....	34
<i>Objetivo general</i>	34
<i>Objetivos particulares</i>	34
Diseño metodológico	35
<i>Preparación del compuesto.....</i>	35
<i>Cultivo celular de las líneas tumorales.....</i>	35
<i>Evaluación de la actividad antiproliferativa por la técnica de incorporación de cristal violeta en cultivos de células tumorales.....</i>	35
<i>Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivos de células tumorales.....</i>	36
<i>Observación de morfología apoptótica por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia y detección de caspasa 3 activa por microscopía de epifluorescencia en cultivos de células tumorales</i>	37

<i>Cuantificación de células tumorales positivas a caspasa 3 activa por citometría de flujo (FACS)</i>	<i>37</i>
<i>Evaluación de la proliferación de linfocitos humanos mediante cuantificación de células marcadas con Carboxifluoresceína (CFSE) por citometría de flujo (FACS)</i>	<i>38</i>
<i>Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en linfocitos humanos.....</i>	<i>39</i>
<i>Análisis estadísticos.....</i>	<i>40</i>
Resultados	41
<i>Actividad antiproliferativa de la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231.....</i>	<i>41</i>
<i>Actividad necrótica de la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231.....</i>	<i>42</i>
<i>Morfología apoptótica y presencia de caspasa 3 activa inducida por la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231</i>	<i>43</i>
<i>Porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa inducida por la Helenalina en los cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231</i>	<i>47</i>
<i>Actividad antiproliferativa de la Helenalina en linfocitos humanos</i>	<i>49</i>
<i>Actividad necrótica de la Helenalina en linfocitos humanos.....</i>	<i>51</i>
Discusión de resultados.....	53
Conclusiones.....	57
Referencias.....	58
Apéndice	64

Resumen

El cáncer es una de las enfermedades con mayor relevancia debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial, en México es la tercera causa de muerte y entre los cánceres con mayor incidencia se encuentran el cáncer de pulmón, mama y cervicouterino. Las terapias actuales contra el cáncer están basadas en su actividad citotóxica (necrótica) y resultan no ser específicas al atacar a células normales que se encuentran en proliferación constante, lo que ocasiona efectos secundarios graves en los pacientes. Por esta razón, se continúa con la búsqueda de nuevos compuestos que además de poseer actividad antiproliferativa, tengan una baja o nula actividad necrótica y sean de acción selectiva. Entre éstos se encuentran las lactonas sesquiterpénicas (SL) y en particular el pseudoguayanólido Helenalina, cuya actividad antitumoral aún no ha sido establecida, por lo que, en este trabajo, fue evaluada *in vitro* la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de esta lactona en cultivos de células de las líneas tumorales SK-LU-1 de cáncer de pulmón, CaSki de cáncer cervicouterino y MDA-MB-231 de cáncer de mama. La actividad antiproliferativa fue evaluada mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta, obteniendo que la Helenalina posee un efecto dosis dependiente en las tres líneas tumorales con valores de IC_{50} de 0.221 $\mu\text{g/ml}$, 0.344 $\mu\text{g/ml}$ y 1.05 $\mu\text{g/m}$, respectivamente. La actividad necrótica se evaluó mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares, la cual tuvo porcentajes casi nulos que sugieren que a las concentraciones de IC_{50} determinadas, la Helenalina no induce este tipo de muerte. La actividad apoptótica fue determinada por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia, observando que a las concentraciones de IC_{50} determinadas, la Helenalina induce características morfológicas propias de células apoptóticas en las tres líneas tumorales, como la contracción celular, la formación de cuerpos apoptóticos, y la condensación y fragmentación de la cromatina, así como la presencia de caspasa 3 activa, sin embargo, al cuantificar el porcentaje de células positivas a esta molécula por citometría de flujo (FACS) se obtuvo que solo a la concentración de IC_{50} determinada para la línea de cáncer de mama, la Helenalina induce una apoptosis dependiente de caspasa 3 activa, por lo que se requiere estudiar el mecanismo por el cual induce apoptosis en las líneas de cáncer de pulmón y cervicouterino. Para evaluar si el compuesto posee selectividad, se evaluó si la Helenalina afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos por citometría de flujo (FACS), obteniendo que la Helenalina posee una aceptable selectividad a las concentraciones de IC_{50} determinadas para las líneas de cáncer de pulmón y cervicouterino, sin embargo, a la concentración determinada para cáncer de mama si afecta su proliferación hasta en un 24.32% con una actividad necrótica del 18.45%. No obstante, se requiere estudiar si es capaz de inducir otro tipo de muerte celular adicional en este tipo de células, así como su efecto sobre otro tipo de células normales, para confirmar su acción selectiva. Por estas razones, se concluye que la lactona sesquiterpénica de tipo pseudoguayanólido Helenalina es un potencial agente antitumoral que presenta actividad antiproliferativa con baja actividad necrótica y capacidad inductora de muerte celular apoptótica en las líneas celulares tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, con una aceptable selectividad que justifica su futuro estudio para ser probado en modelos *in vivo*.

Marco teórico

La célula

La célula es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos (**Lodish et al, 2005**). Todos los organismos vivos están formados por células: unidades pequeñas rodeadas de una membrana que contienen una solución acuosa concentrada de sustancias químicas. Estás requieren nutrimentos del exterior, eliminan sustancias de desecho procedentes de su metabolismo y mantienen su medio interno estable (**Reyes, 1973**).

Una célula individual es la forma de vida más simple, ya que los organismos superiores como el humano son comunidades de células que derivan del crecimiento y la división de una célula única fundadora, mediante un proceso complejo y cuidadosamente controlado, conocido como ciclo celular (**Alberts et al., 2011**).

Ciclo celular

El ciclo celular es una serie ordenada de eventos en donde la célula crece, duplica su material genético y se divide para dar lugar a dos células hijas (**López, 2003**). Este proceso tiene una duración variada entre los organismos (**Lagunas et al., 2014**).

Un ciclo celular típico se da en dos fases, la interfase que se subdivide en las fases G₁, S y G₂, y la mitosis que se subdivide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (**Figura 1**). En la Interfase, en G₁ la célula crece y puede responder al efecto de factores estimuladores o inhibidores de la proliferación, se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; la fase S se caracteriza por la replicación del ADN nuclear, y en G₂ la célula continúa creciendo y se prepara para la mitosis. El ciclo celular culmina con la mitosis, donde se divide la cromatina duplicada para que cada célula hija obtenga una copia del material genético, es decir, un cromosoma de cada tipo (**Lomanto et al., 2003**). Existe una fase fuera del ciclo celular llamada G₀ en donde las células se encuentran en un estado no proliferativo, pero mantienen su actividad metabólica (**López, 2003**).

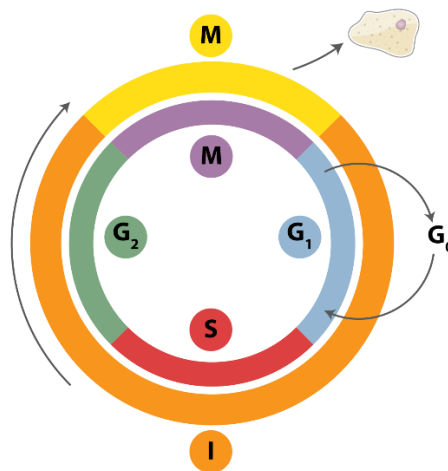


Figura 1. Esquemización de un ciclo celular típico, constituido por Interfase (I): Fase G₁ de crecimiento celular, Fase S de replicación del ADN, Fase G₂ de preparación para fase M; y la Fase M de división nuclear y celular. G₀ es un estado no proliferativo, fuera del ciclo celular (Tomado de <https://www.freepng.es/png-94ozde/>).

La progresión del ciclo celular está controlada por múltiples factores de crecimiento que afectan a las proteínas que lo regulan y determinan el comportamiento de la célula, incluyendo la capacidad de crecer, diferenciarse o morir. Entre las proteínas regulatorias más importantes se encuentran las ciclinas y las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) que forman los complejos ciclina-CDK, reguladores clave para la transición de una fase a otra en el ciclo celular **(López, 2003)**. De igual forma, las células tienen mecanismos capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre, ya sea para que éste sea reparado, o bien para inducir un proceso de muerte celular cuando el daño es muy extenso **(Burgués et al., 2005)**.

Muerte celular

La muerte celular puede ocurrir por medio de dos formas principales claramente distinguidas en su naturaleza: apoptosis y necrosis **(Zhivotovsky & Orrenius, 2001)**. La mayoría de las muertes celulares en los organismos multicelulares ocurren por apoptosis, un proceso fisiológico normal y clave en el desarrollo embrionario y de tejidos adultos **(Cooper & Hausman, 2014)**. Este proceso permite que el número celular permanezca constante en un organismo al ocurrir una sustitución de células regulada, ya que en un organismo el recambio de los tejidos requiere de un equilibrio entre proliferación y muerte celular (homeostasis), que garantice la población adecuada de células en un tejido **(Lizarbe, 2007)**. Sin embargo, las células también pueden morir como resultado de eventos traumáticos impredecibles, como la exposición a agentes químicos tóxicos, mediante un proceso llamado necrosis **(Cooper & Hausman, 2014)**.

Necrosis

La muerte celular se puede producir por necrosis, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo y se origina por una lesión aguda e irreversible **(Lizarbe, 2007)**. En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular **(Figura 2) (Ramírez & Rojas, 2010)**. Esto último conduce a las células vecinas hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado **(Jordán, 2003)**.

Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada se puede definir como “el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos” **(Lizarbe, 2007)**. Es esencial para el desarrollo y homeostasis de los tejidos, participa en la respuesta inmune y en general en todos los procesos fisiológicos. A diferencia de la necrosis, en la mayoría de los casos la apoptosis no desencadena una respuesta inflamatoria **(Ramírez & Rojas, 2010)**, por lo tanto es considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades **(Jordán, 2003)**.

Morfológicamente, la diferencia con la necrosis es que en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular (**Burgués et al., 2005**) dando origen a los cuerpos apoptóticos que contienen el material celular degradado, los cuales serán fagocitados por células del sistema inmune (**Figura 2**) (**Ramírez & Rojas, 2010**). Bioquímicamente, la característica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energía y con síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (**Burgués et al., 2005**).

Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis están mediados por “efectores de muerte celular” como las caspasas (proteasas cisteínas), ya que las señales apoptóticas tanto intra como extracelulares convergen para activar a las caspasas. La condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la rotura de la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos son consecuencias directas de la actividad de las caspasas. Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por rotura proteolítica mediante dos vías alternativas (**Burgués et al., 2005**).

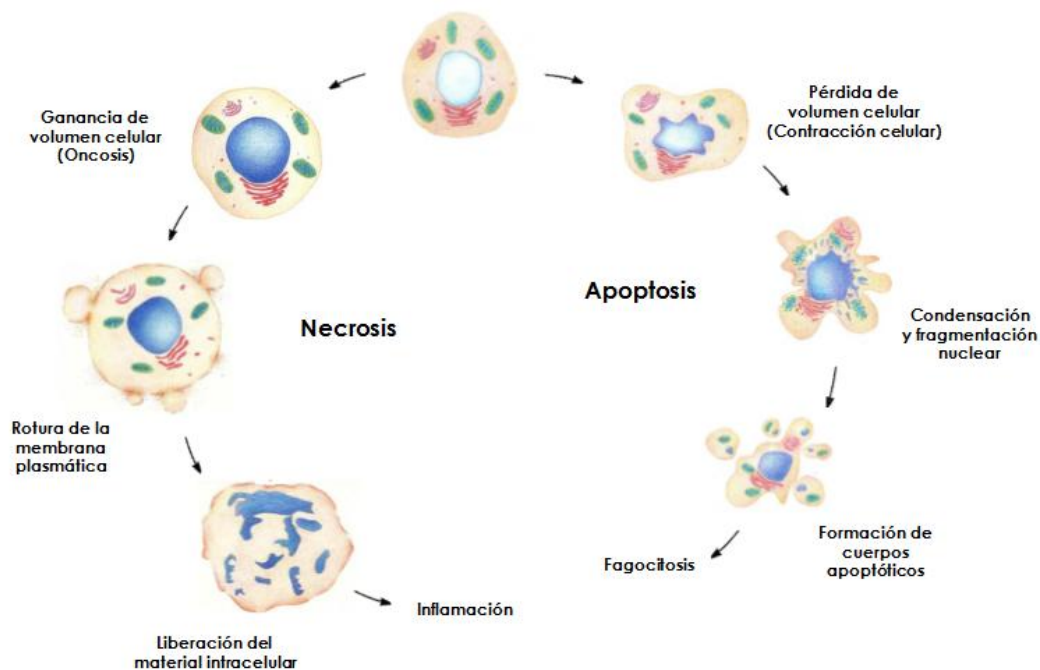


Figura 2. Características principales de los procesos de muerte celular necrótica (izquierda) y apoptótica (derecha), los cuales culminan con la activación de un proceso inflamatorio y la degradación de los cuerpos apoptóticos por fagocitosis, respectivamente (Tomado y modificado de www.scienceinschool.org/es/content/luchemos-juntos-contra-el-cáncer-con-cell-spotting).

Vía extrínseca o de los receptores de muerte

La unión de proteínas de señalización extracelulares a receptores de muerte de la superficie celular activa la vía extrínseca de la apoptosis. Los receptores de muerte son proteínas transmembranales que contienen un dominio extracelular de unión al ligando, rico en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio de muerte intracelular necesario para que los receptores activen el proceso apoptótico (**Alberts et al., 2008**).

La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos (citoquinas proapoptóticas y proinflamatorias como FasL, TNF, etc.) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1, TRAILR1, etc.). Siguiendo la ruta de señalización mediada por Fas, 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 (Death Domain) de los receptores, con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína FADD (Fas Associated Death Domain). Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DED (Death Effector Domain) capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así, se forma el complejo de señalización inductor de muerte DISC (Death Inducing Signaling Complex) que contiene a la proteína FADD y a las caspasas 8 o 10. La activación de la procaspasa-8 requiere de su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED. Una vez activada, la caspasa 8 rompe y activa caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, que constituyen la principal actividad caspasa en las células apoptóticas (**Figura 3**) (**Lizarbe, 2007**).

En el caso de los receptores del TNF (TNFR1 y el TNFR2), la molécula adaptadora que reclutan es TRADD (TNFR Associated Death Domain), que a su vez sirve de plataforma para el reclutamiento de otros adaptadores como FADD, TRAF-2 (TNFR Associated Factor-2) y RIP (Receptor Interactive Protein). El complejo formado finalmente activa las caspasas reguladoras y efectoras, como lo hace el receptor Fas (**Burgués et al., 2005**).

Vía intrínseca o mitocondrial

La vía mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la salida de citocromo c desde la mitocondria. Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo c se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial, sin embargo, algunos estímulos provocan la liberación de citocromo c al citosol, lo que se acompaña de pérdida del potencial de membrana y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (**García & Vecino, 2003**).

Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan esta liberación: los miembros anti-apoptóticos de la subfamilia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BCL2A1, BCL-B) bloquean la liberación del citocromo c, mientras que los miembros pro-apoptóticos de la subfamilia Bax (Bax, Bak, Bok) y la subfamilia BH3 (Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, BMF, HRK) la inducen. Cuando el citocromo c se libera se provoca el ensamblamiento de apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) con la procaspasa 9, formándose el complejo denominado apoptosoma. El apaf-1 tiene un dominio reclutador de caspasas denominado CARD (Caspase Recruiting Domain), que requiere ATP para la inducción de la ruptura autolítica de la procaspasa 9 en caspasa 9 activa. Esta última se libera del apoptosoma para activar a las caspasas 3, 6 y 7, que provocan la ruptura de diversos sustratos y la apoptosis (**Figura 3**) (**Burgués et al., 2005**).

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa 8, ésta es capaz de activar a la proteína Bid en tBid, provocando la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa 9 (**Figura 3**) (**Lizarbe, 2007**).

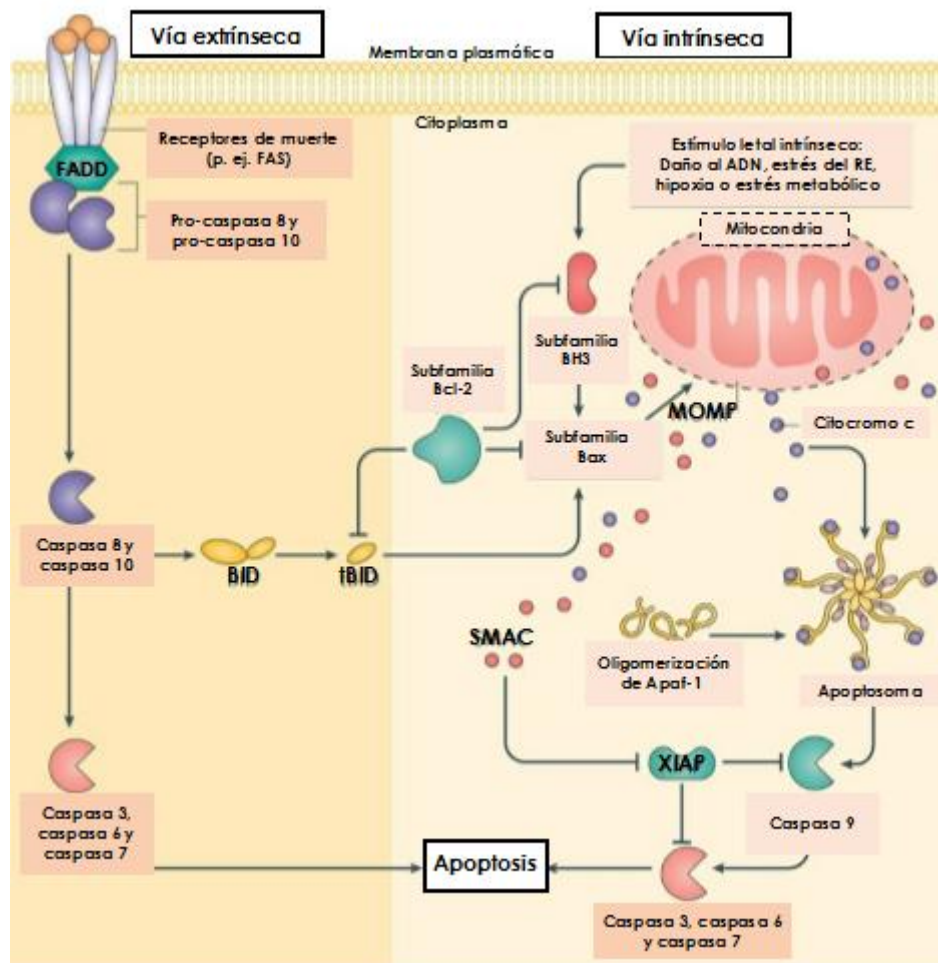


Figura 3. Vías de activación del proceso apoptótico. La vía intrínseca es activada mediante receptores de muerte que activan las caspasas 8 y 10 (izquierda). La vía extrínseca es activada por señales que inducen la liberación de citocromo c de la mitocondria, permitiendo la activación de la caspasa 9 (derecha). Ambas vías convergen en la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7, que desencadenan el proceso apoptótico (Tomado y modificado de Joshi & Metal, 2019).

Cáncer

Cuando una célula sufre un daño que genera una alteración en el ciclo celular y en la muerte celular, se da una multiplicación y proliferación descontrolada, que conlleva a un aumento en el número de células, un tumor (**Lodish et al., 2005**). Las neoplasias o tumores, son masas anormales de tejido que crecen de forma incontrolada, excesiva, autónoma e irreversible, superando a los tejidos normales en velocidad de crecimiento y que además adquieren rasgos funcionales y morfológicos diferentes a los de sus precursoras (**Soimout, 2008**). Mientras las células neoplásicas no se conviertan en invasoras, se dice que el tumor es benigno y en este estadio se puede conseguir la curación completa extrayendo quirúrgicamente la masa tumoral. Un tumor se considera canceroso solo si es maligno, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. La capacidad de invasión es una característica esencial de las células cancerosas. Les permite liberarse del tejido, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo. Cuanto más amplia sea la metástasis más difícil será erradicar el cáncer y son generalmente las metástasis las que matan al paciente (**Alberts et al., 2008**).

Por lo tanto, el cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad invasora y destrucción de otros tejidos. Este término es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo (**Soimout, 2008**), debido a que se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de 100 tipos distintos de cáncer que pueden diferir sustancialmente en su comportamiento y respuesta a un tratamiento (**Cooper & Hausman, 2014**).

El cáncer es un claro ejemplo de una enfermedad que se produce como consecuencia de una función celular anormal (**Becker et al., 2007**). Este se clasifica de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se origina (**Alberts et al., 2008**). Los carcinomas, que incluyen aproximadamente el 90% de los cánceres humanos, son alteraciones de las células epiteliales. Los sarcomas, que son raros en humanos, son tumores sólidos de tejidos conectivos, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso. Las leucemias y linfomas, que contabilizan aproximadamente el 8 % de los casos en humanos, surgen a partir de células hematopoyéticas y de las células del sistema inmune, respectivamente (**Cooper & Hausman, 2014**).

Actualmente el cáncer es una de las enfermedades con mayor relevancia debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad. En México, es la tercera causa de muerte pues 14 de cada 100 mexicanos fallecen por esta enfermedad y entre los cánceres más frecuentes se encuentran el cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, según lo indicado por el director general del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Abelardo Meneses García, durante el foro Cáncer, Desafíos en México y América Latina que se llevó a cabo en el Centro Médico Nacional Siglo XXI en 2017 (**Secretaría de Salud, 2017**).

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón (CP) es el tumor más frecuente y el que mayor mortalidad ocasiona en el mundo desarrollado (**Salvatierra et al., 2005**). Según la Organización Mundial de la Salud este agrupa todos los tumores epiteliales malignos del pulmón excluyendo los tumores pleomórficos, sarcomatoide, carcinoide y los derivados de las glándulas salivales (**Acosta et al., 2016**). Es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células, tanto pulmonares como bronquiales (**Moctezuma & Patiño, 2009**), y es mortal cuando se diagnostica en estadios clínicos avanzados (**Amorín, 2013**).

La Organización Mundial de la Salud establece dos grandes grupos histológicamente, considerando el origen y el comportamiento de las células cancerosas (**Amorín, 2013; Moctezuma & Patiño, 2009**):

- 1) ***Cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP)***: Es el más agresivo, con una tasa de crecimiento rápida y una tendencia a hacer metástasis tempranamente en mediastino y en los tejidos extratorácicos (**Salvatierra et al., 2005**). Representa aproximadamente el 25% de los cánceres pulmonares y muestra la mayor relación con el tabaquismo (**Moctezuma & Patiño, 2009**). En el 85% de los casos se origina en la submucosa de la vía aérea central e histológicamente se caracteriza por una proliferación de células de bordes mal definidos, citoplasma escaso, cromatina nuclear de gránulos finos y nucléolos ausentes o discretos, con un alto índice mitótico y tendencia a la necrosis (**Salvatierra et al., 2005**).

- 2) *Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)*: Constituye aproximadamente, el 75% de los tipos de cáncer pulmonar y se divide en tres subtipos:
- a) *Cáncer de células escamosas (epidermoide)*: Representa el 30% de todos los casos de cáncer de pulmón, muestra una fuerte relación con el tabaco y está asociado al mejor pronóstico **(Moctezuma & Patiño, 2009)**. Las células son delgadas y planas, las cuales se asemejan a escamas de pescado **(Ginsberg et al., 2007)**. Su crecimiento es relativamente lento y suele localizarse en la parte central de los pulmones **(Fernández, 2014)**.
 - b) *Adenocarcinoma*: Ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica (50%) y es también el tipo más común en pacientes no fumadores. Surge de células mucoproducidas, se clasifica en cuatro subtipos: acinar, papilar, bronquioloalveolar y variedad sólida secretora de mucina **(Moctezuma & Patiño, 2009)**, y suele localizarse en la periferia, afectando sobre todo la pleura y a la pared torácica **(Fernández, 2014)**.
 - c) *Carcinomas indiferenciados*: Ocupan el 5% de los casos, entre ellos el carcinoma de células grandes, que puede surgir en cualquier parte del pulmón, tiene pronóstico malo y también se asocia a tabaquismo **(Moctezuma & Patiño, 2009)**.

El humo del tabaco es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer de pulmón, ya que está demostrado que los fumadores tienen un riesgo mayor de padecer este tipo de cáncer. De igual forma, la exposición pasiva al humo del tabaco incrementa el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, en un 20 a 30% con respecto a la población no expuesta **(Salvatierra et al., 2005)**. Esto se debe a que el humo generado contiene más de 60 reconocidos cancerígenos, entre los más conocidos están las nitrosaminas, los benzopirenos y los radioisótopos del radón, todos ellos con la capacidad de alterar el ADN y, por consiguiente, contribuir en la carcinogénesis **(Amorín, 2013)**.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una grave amenaza para la salud de la mujer a nivel mundial y constituye una prioridad no reconocida en los países de ingresos medios **(Knaul et al., 2009)**. Este tipo de cáncer se debe a la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células de distintos tejidos de la glándula mamaria que forman un tumor que invade los tejidos vecinos y otros órganos distantes **(Sifuentes et al., 2015)**.

La clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se divide en no invasores (*in situ*), invasores y otros. Aproximadamente del 75 al 80% de este tipo de cáncer, son invasivos o infiltrantes, una característica que le da a las células la capacidad de penetrar alrededor de los canales linfáticos y vasculares, generando así metástasis. Dentro de éstos, el tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasor (70-80%), seguido por el carcinoma lobulillar invasor (5-10%), el cual es difícil de diagnosticar por su diseminación difusa (en vez de formar una masa), su tasa de multifocalidad y su alta bilateralidad. Otros tipos de cáncer menos comunes son el tubular, medular, mucinoso y papilar, entre otros **(Huicochea et al., 2009)**.

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial en la que los factores genéticos y ambientales contribuyen a su aparición. Los factores de riesgo incluyen factores reproductivos (nuliparidad, uso de anticonceptivos hormonales de alta dosis, menopausia tardía, terapia de reemplazo hormonal, etc.), ser mujer, aumento de la edad, alta densidad del tejido mamario y

una historia familiar de cáncer, especialmente cáncer de mama. Otros factores que modulan el riesgo de cáncer de mama incluyen factores nutricionales, actividad física, la historia y duración de la lactancia materna, la obesidad en la post-menopausia, etc. **(Dornelles et al., 2015)**.

Aproximadamente el 10% de estos cánceres es causado por mutaciones germinales que pueden ser transmitidas de padres a hijos. Las mutaciones germinales de al menos 2 genes supresores tumorales, los BRCA1 y BRCA2, producen aproximadamente el 85% de todos los cánceres de mama hereditarios. En familias con estas mutaciones es frecuente la aparición de cáncer de mama en los miembros de generaciones sucesivas, lo que hace necesario la identificación de las mismas con el propósito de lograr diagnósticos tempranos **(Sánchez & Verga, 2011)**.

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer en frecuencia en mujeres de todo el mundo. La mayoría de los casos ocurren en países en vías de desarrollo **(Záldivar et al., 2012)**. Este se produce por un crecimiento anormal de las células que se originan en los tejidos del cuello uterino, en la unión escamocolumnar (UEC) **(López & Lizano, 2006)**. La UEC es el punto donde convergen las células escamosas y columnares del cérvix. Esta unión se encuentra típicamente entre el ectocérvix central y el canal cervical inferior, pero la localización varía a lo largo de la vida de la mujer, por el desarrollo fetal y la menopausia. La unión escamocolumnar original es una zona de transformación. La transformación normal de un tipo celular maduro en otro es llamada metaplasia. Cuando la metaplasia ocurre, existe siempre un potencial neoplásico **(Chavaro et al., 2009)**. En las mujeres en edad reproductiva, la UEC se mueve hacia afuera por influencia hormonal. El pH ácido vaginal provoca irritación mecánica que induce el proceso de metaplasia escamosa, resultando una nueva UEC. Esta área entre la original y la nueva UEC es referida como la zona de transición. Las células escamosas inmaduras metaplásicas en esta zona de transformación son teóricamente las más vulnerables a neoplasia, por lo que la mayoría de los carcinomas cervicales se originan en la UEC **(Chavaro et al., 2009)**.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce dos tipos histológicos principales de cáncer cervicouterino invasivo, el carcinoma de células escamosas, que constituye cerca del 75% de todos los casos y el adenocarcinoma que constituye cerca del 15-25% de todos los casos. Otros tipos de carcinoma como el carcinoma adenoescamoso, carcinoma adenoide quístico y carcinoma metastásico constituyen el restante 3-5% de casos **(Chavaro et al., 2009)**.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocida como un factor etiológico para el desarrollo del CaCu **(Záldivar et al., 2012)**, ya que en el 80-90 % de los casos diagnosticados se ha identificado el ADN transcrito y los productos proteicos de este virus, el cual se encuentra clasificado en cepas de "alto y bajo riesgo," según el grado de transformación maligna que ocasiona en la célula infectada. Entre los más comunes de bajo riesgo se encuentran los tipos 6 y 11 que usualmente causan verrugas benignas y ocasionalmente lesiones invasivas; mientras que los tipos 16 y 18, pertenecen a los de alto riesgo por su gran potencial carcinogénico **(León & Faxas, 2004)**. Los tumores asociados a VPH-18 tienen un riesgo 2.4 veces más alto de muerte y los asociados a VPH-16 hasta 4.4 veces más alto que en pacientes con tumores asociados a otro tipo de virus.

El estudio del mecanismo por el cual este virus causa neoplasia ha mostrado énfasis en el rol de los genes E6 y E7 **(Chavaro et al., 2009)**. Estas moléculas son críticas en la replicación viral, pues inactivan funcionalmente los productos de dos genes supresores de tumores muy importantes,

el gen p53 y Rb, respectivamente. De esta forma, los oncogenes E6 y E7 inducen la proliferación, inmortalización y transformación maligna de las células infectadas (**Záldivar et al., 2012**).

Tratamientos contra el cáncer

En la actualidad existen muchos tipos de tratamiento para el cáncer. El tratamiento a recibir depende del tipo de cáncer y de lo avanzado que éste se encuentre. Algunas personas con cáncer solo reciben un tipo de tratamiento, sin embargo, el tratamiento del cáncer es multidisciplinar por lo que la mayoría recibe una combinación de tratamientos (**NCI, 2019**).

Algunos tratamientos son locales, lo que significa que tratan el tumor sin afectar al resto del cuerpo, como la cirugía y la radioterapia; mientras que en otros se usan medicamentos para tratarlo, siendo considerados tratamientos sistémicos ya que pueden alcanzar las células cancerosas en casi cualquier parte del cuerpo, como la inmunoterapia, la terapia dirigida y la quimioterapia (**American Cancer Society, 2019**).

Cirugía: Esta consiste en la extirpación física del tumor canceroso. La cirugía es eficiente solo cuando el tumor es pequeño y no está afectando estructuras vitales (**Euguino et al., 2013**). Existe el riesgo de sufrir efectos secundarios dependiendo de los medicamentos utilizados y la salud general del paciente. El más común es sentir dolor en la zona donde se realizó la cirugía, pero también está la posibilidad de infecciones, sangrado y de reacciones a los anestésicos locales (**American Cancer Society, 2019**).

Radioterapia: Este tratamiento usa radiación para destruir o dañar las células cancerosas, impidiendo así su crecimiento. Esta se aplica de dos formas, ya sea dirigiendo los rayos de alta energía desde una máquina (radiación externa) o mediante implantes que emiten radiación y se colocan dentro del cuerpo cerca del tumor (radiación interna) (**American Cancer Society, 2019**). El blanco de esta terapia es la desnaturalización del ADN que induce una muerte celular debido a la incapacidad de las células cancerosas de reparar dicho daño, es por ello que también afecta a todas las células que se encuentren en proliferación, causando así efectos secundarios como náuseas, diarrea, pérdida del apetito y cansancio (**Berek, 2005**).

Inmunoterapias o terapias biológicas: Estos tratamientos utilizan el sistema inmunológico para combatir el cáncer o para disminuir los efectos secundarios de otros tratamientos contra el cáncer. Esto mediante medicamentos que actúan de distintas maneras, ya que pueden detener o reducir el crecimiento de las células cancerosas, apoyar a las células inmunológicas saludables para controlar el cáncer o ayudar a reparar las células normales dañadas por otras formas de tratamiento (**American Cancer Society, 2019; NCI, 2019**). Los efectos secundarios más comunes son las reacciones de la piel en el sitio de la aguja como hinchazón, irritación y comezón, así como síntomas similares a los de una gripe (**NCI, 2019**).

Terapias dirigidas: Estas utilizan medicamentos que atacan cambios genéticos específicos que contribuyen al crecimiento, división y diseminación de las células cancerosas, alterando así su funcionamiento interno (**American Cancer Society, 2019**). Los efectos secundarios más comunes son diarrea y problemas en el hígado, pero se pueden incluir problemas de coagulación de la sangre y cicatrización de heridas, presión arterial alta, fatiga, etc. (**NCI, 2019**).

Quimioterapia: La quimioterapia es la administración de fármacos por vía intravenosa u oral, los cuales por medio de la circulación sanguínea matan a las células cancerosas por todo el cuerpo. Su objetivo es actuar en la fase de división de las células tumorales impidiendo su multiplicación,

y destruyéndolas con el fin de lograr una disminución o desaparición del tumor maligno. Para lograrlo se emplean una gran variedad de fármacos a los cuales se les denomina fármacos antineoplásicos, quimioterapéuticos, citostáticos o citotóxicos **(Euguino et al., 2013; AECC, 2018)**.

Los pacientes pueden recibir uno o varios de entre los más de cien fármacos de quimioterapia disponibles desde el momento inicial del diagnóstico del tumor y a lo largo de la enfermedad. Es el oncólogo quien decide si se debe administrar quimioterapia al paciente, cuándo y cómo en función del tipo de cáncer, su ubicación y el estadio en el que se encuentre el tumor. Por otro lado también se toma en cuenta el estado general del paciente y las patologías previas que haya tenido **(Instituto de Técnicas Avanzadas contra el Cáncer, 2016)**.

La quimioterapia puede clasificarse en varios tipos considerando el criterio a seleccionar, como:

1. El momento en el que se administra el tratamiento:
 - a) Neoadyuvante: Como primera opción de tratamiento para reducir el tamaño del tumor.
 - b) Adyuvante: Después de una intervención quirúrgica para eliminar las células cancerígenas restantes en el organismo.
 - c) Concomitante: Al mismo tiempo que otro tratamiento.
2. La vía por la que se suministraran los antineoplásicos:
 - a) Vía Intravenosa: Administración directa del tratamiento líquido al torrente sanguíneo por medio de una aguja o tubo (catéter) que se inserta en una vena.
 - b) Vía oral. Administración por vía bucal del tratamiento como tabletas, cápsulas, suspensiones, etc.
 - c) Vía regional: Administración directa del tratamiento líquido a la arteria que conduce hasta la parte del cuerpo con el tumor.
3. El modo en el que se aplicara:
 - a) Monoterapia: La implementación de un solo fármaco antineoplásico.
 - b) Poli quimioterapia: La administración combinada de varios antineoplásicos.

(Instituto de Técnicas Avanzadas contra el Cáncer, 2016).

4. Los agentes quimioterapéuticos:
 - a) Inhibidores de quinasa: Estos actúan sobre las quinasas, como lo indica su nombre, inhibiendo así la proliferación de células malignas y la angiogénesis, ya que existen 538 quinasas en el cuerpo humano, las cuales son una clase de enzimas que promueven la fosforilación de distintas proteínas implicadas en la apoptosis, proliferación y diferenciación, por lo que su desregulación contribuye a la formación de cáncer, convirtiéndose en un blanco clave en el tratamiento de esta enfermedad. De los 43 medicamentos aprobados por la FDA para el cáncer entre 2015 y 2018, 13 eran inhibidores de quinasas. Entre éstos se pueden encontrar inhibidores de tirosina quinasa como el Erlotinib (Tarceva), inhibidores de MEK como el Trametinib, e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas como el Abemaciclib (Verzenio).
 - b) Alcaloides de la vinca: Detienen la división celular e inducen la muerte celular al actuar como agentes objetivo de microtúbulos, ya que se unen a los bloques de construcción de la tubulina, inhibiendo su formación e impidiendo así que las células cancerosas se dividan con éxito. Actualmente se encuentran en uso clínico para el cáncer cuatro alcaloides principales de la vinca: Vinblastina, Vinorelbina, Vincristina y Vindesina.

- c) Agentes alquilantes: Actúan reaccionando con las proteínas que se unen para formar la doble hélice de la molécula del ADN, agregando un grupo alquilo a algunas o a todas ellas. Evitando así que las proteínas se unan como deberían, causando la rotura de las cadenas del ADN y, finalmente, la muerte de la célula. Esta reacción es esencialmente una mutación que elimina la capacidad de multiplicación de las células cancerosas. Entre éstas se encuentran mostazas nitrogenadas como la Ciclofosfamida y el Clorambucil, Nitrosoureas como la Carmustina, Triazinas como la Dacarbazina, Etileniminas como la Altretamina y otros compuestos como el Cisplatino.
- d) Antraciclinas: Actúan inhibiendo el cáncer a través de múltiples vías. Promueven la creación de radicales libres que destruyen los ácidos nucleicos y otras biomoléculas, inhiben la síntesis de ADN y algunas inhiben la enzima topoisomerasa II. La Daunorrubicina y la Doxorrubicina son los agentes quimioterapéuticos más representativos de esta clase
- e) Inhibidores de las topoisomerasas: Las topoisomerasas de ADN son enzimas que regulan el superenrollamiento del ADN para permitir su replicación o reparación. Las clases I rompen solo una hebra de la doble hélice y son importantes en la síntesis de ADN, y las clases II cortan ambas cadenas de ADN utilizando ATP. Por lo que al inhibir estas moléculas, se impide la división celular y se induce la muerte celular. Entre los inhibidores de la topoisomerasa I se incluyen la Camptotecina, Topotecan e Irinotecan, y entre los inhibidores de la topoisomerasa II se incluyen la Doxorrubicina, Etopósido y Mitoxantrona.
- f) Antimetabolitos: En general, inducen la muerte celular durante la fase S del crecimiento celular cuando se incorporan al ARN y al ADN o inhiben las enzimas necesarias para la producción de ácido nucleico. Algunos compuestos representativos son la Citarabina, el Metotrexato y la Azacitidina.
- g) Inhibidores de histona desacetilasa: Se utilizan para tratar los cánceres hematológicos, ya que inhiben la reparación del ADN al alterar la expresión génica y realizar modificaciones postraduccionales a proteínas implicadas en la proliferación y el ciclo celular. El Vorinostat es un ejemplo de estos compuestos, al ser aprobado por la FDA para el tratamiento del mieloma múltiple.

(WordPress, 2019)

Efectos secundarios de los quimioterapéuticos

Los efectos secundarios de la quimioterapia y los demás tratamientos sistémicos son debidos a que los antineoplásicos empleados para eliminar las células malignas en los pacientes, también son tóxicos para las células normales, especialmente para aquellas que se encuentran en proliferación constante, como las de la piel, el cabello, las uñas y las mucosas que revisten el tracto gástrico, ya que estos dañan el ADN o inhiben su replicación (**Cooper & Hausman, 2014; Euguino et al., 2013**).

Entre los principales efectos secundarios graves que pueden llegar a ocasionar se encuentran:

- Toxicidad hematológica: Los antineoplásicos afectan el sistema hematopoyético afectando directamente a la médula ósea o a su microambiente, al interactuar con las

células o los factores que regulan la hematopoyesis. Entre los compuestos más anemizantes se encuentran el Cisplatino y la Mitomicina C, mientras que las antraciclinas y los alcaloides de la vinca han demostrado tener un mayor grado de mielosupresión.

- Toxicidad digestiva: Los antineoplásicos afectan al tubo digestivo de forma reversible con el tiempo, pero contribuyen a deteriorar el estado nutricional de los pacientes y son una causa potencial del empeoramiento de la calidad de vida de los enfermos. El Cisplatino, la Dacarbazina y la Ciclofosfamida han demostrado ser los emetógenos más agresivos, ya que el 100% de los pacientes sufre de estos problemas.
- Toxicidad cardiaca: Las antraciclinas son los fármacos cardiotóxicos por excelencia, pudiendo producir como entidad más grave y característica la miocardiopatía. La insuficiencia cardiaca congestiva aparece en el 30% de los pacientes que reciben más de 550 mg/m² de Adriamicina, con dosis acumulativas de 1000 mg/m² aparece en el 50% de los casos.
- Toxicidad renal: El riñón es una de las principales vías de eliminación de los citostáticos y por ello fácilmente vulnerable. Si los productos de eliminación son muy reactivos o poco solubles, puede producirse nefrotoxicidad. Entre las principales afectaciones se encuentra una insuficiencia renal aguda. El Cisplatino y el Metotrexato son los antineoplásicos más nefrotóxicos.
- Toxicidad neurológica: Varios agentes antitumorales son potencialmente capaces de producir efectos neurotóxicos centrales o periféricos. Los alcaloides de la vinca, sobre todo la vincristina, produce afectación a nivel central, periférico y en el sistema parasimpático. El cisplatino induce neuropatía sensitiva y aparece platino por depósito en los nervios. El Paclitaxel y Docetaxel producen neuropatía periférica.

(Ferreiro *et al.*, 2003)

Aunque exista una gran colección de agentes quimioterapéuticos útiles como resultado de aproximadamente cinco décadas de descubrimiento y desarrollo de fármacos sistémicos, los diversos efectos secundarios que generan éstos en los pacientes, así como su baja selectividad, limitan su efectividad en el tratamiento del cáncer. Por esta razón, la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos con mayor eficacia y menos efectos adversos continúa, teniendo en cuenta que los compuestos de origen natural son perfectos candidatos para la obtención de nuevos tratamientos contra el cáncer, ya que muchas plantas han demostrado experimentalmente poseer efectos antitumorales y un gran número de fitoquímicos aislados de plantas medicinales han probado disminuir la proliferación celular, inducir la apoptosis, retrasar la metástasis e inhibir la angiogénesis (Desai *et al.*, 2008)

Las plantas como fuente de nuevos compuestos quimioterapéuticos

Desde hace 3,500 años el hombre ha empleado las plantas para el tratamiento del cáncer y son más de 3,000 especies de plantas las que se han reportado para el tratamiento de esta

enfermedad. Las plantas son una fuente importante de sustancias anticancerosas y es significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos de América aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural. Estos medicamentos se han clasificado como: productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural **(Vega et al., 2006)**.

La investigación científica comenzó en 1958 cuando se aisló la Vinblastina y como resultado de ello el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) inició diversas investigaciones acerca de las plantas con actividad antitumoral, lo que condujo al aislamiento y conocimiento del mecanismo de acción de distintos compuestos como las podofilotoxinas, los taxanos y las camptotecinas. En el 2006, el NCI ya había recolectado alrededor de 35,000 muestras de plantas de 20 países y había analizado aproximadamente 114,000 extractos para su efecto contra el cáncer, trabajando principalmente en determinar la actividad citotóxica de las plantas medicinales y su actividad antiproliferativa en células tumorales **(Sabira et al., 2014)**.

Además las plantas, especialmente las medicinales, han demostrado tener la capacidad de reducir o minimizar los efectos secundarios tóxicos de la quimioterapia debido a la gran cantidad de aplicaciones clínicas que poseen la variedad de metabolitos secundarios que poseen. En la actualidad, se considera que los productos naturales son símbolos de protección en comparación con los productos sintéticos que se consideran inseguros para la vida humana y el medio ambiente. Por lo tanto, las plantas medicinales aún tienen un gran potencial para proporcionar nuevos fármacos puesto que son un gran reservorio de compuestos químicos naturales **(Nema et al., 2013)**.

Distintos compuestos aislados de plantas ya se usan en el tratamiento del cáncer, pero aún quedan por analizar muchos otros compuestos presentes en éstas, los cuales han mostrado tener propiedades anticancerígenas prometedoras. Actualmente más de 200 compuestos de origen natural se encuentran en desarrollo preclínico o clínico, y dentro de esta gran variedad de compuestos, las lactonas sesquiterpénicas han tomado gran relevancia ya que 1500 publicaciones han reportado sus propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias, de las cuales más del 90% se han publicado desde 1990 **(Vega et al., 2006)**.

Lactonas sesquiterpénicas (LS)

Las lactonas sesquiterpénicas (LS) son metabolitos secundarios que se encuentran en numerosas especies o familias de plantas **(Ruiz & Suarez, 2015)**. La mayoría se encuentran como componentes activos y predominantes de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae (excepto en la tribu *Tageteae*). Algunas han sido aislados de hongos, hepáticas (hepaticofitas) y Cupresáceas y dentro de las Angiospermas también se encuentran en las familias *Acanthaceae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Aristolochiaceae*, *Burseraceae*, *Coriariaceae*, *Illiciaceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Polygonaceae*, *Winteraceae* y *Bombaceae* **(Picman, 1986)**.

Estos compuestos son fitoconstituyentes de bajo peso molecular, de carácter lipofílico, incoloros y amargos que se obtienen generalmente de la parte aérea de las plantas **(Negrín, 2013)**, pero la mayoría se han aislado de los brotes (principalmente hojas y flores) en los que pueden constituir hasta el 5% del peso seco total **(Picman, 1986)**.

Químicamente, las LS constituyen un grupo de terpenoides C 15 (sesquiterpenos) con un anillo lactónico cerrado en las posiciones C-6/C-7 o C-7/C-8, el grupo α -metileno- γ -lactona (α M γ L), una lactona de 5 miembros fusionados con un grupo metileno en la posición alfa. El sesquiterpeno de las LS es biosintetizado a partir de tres unidades de isopreno a través del pirofosfato de farnesilo (FPP) en el retículo endoplásmico. Este proceso da origen al catión germacradienilo a partir del cual surgen los esqueletos carbonados de las LS: germacrano, guayano, eudesmano, pseudoguayano, eremofilano y elemmano. Este catión da inicialmente origen a los sesquiterpenos germacranólidos mediante un proceso denominado lactonización en la cadena lateral 3C, más específicamente por la oxidación de C12 para formar la función carbonilo, seguido de la hidroxilación en C6 o C8, dando como resultado la formación del grupo α M γ L, mientras que los otros tipos de LS derivan del tipo germacranólido (**Ruiz & Suarez, 2015; Chadwick, et al., 2013**).

Considerando lo anterior, la clasificación de las LS se hace de acuerdo a su esqueleto carbocíclico y se consideran a las siguientes clases como las más representativas (**Figura 4**):

- Germacranólidos: Tienen un anillo de 10 miembros.
- Eudesmanólidos: Tienen dos anillos de 6 miembros cada uno.
- Guayanólidos: Tienen dos anillos de 7 y 5 miembros, y un grupo metilo en C-4.
- Pseudoguayanólidos: Tienen dos anillos de 7 y 5 miembros, y un grupo metilo en C-5.

(**Chadwick et al., 2013; Picman, 1986**).

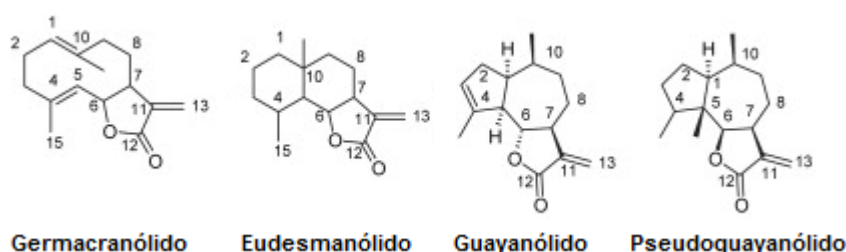


Figura 4. Estructura química general de las lactonas sesquiterpénicas más representativas. (Tomado y modificado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523408000056>)

Relación estructura-actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas

Las LS han llamado la atención de los científicos por el amplio espectro de actividades biológicas que presentan como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antimalárica, neurotóxica, alergénica, antibacteriana, fungicida y fitotóxica. Los estudios de relación estructura-actividad realizados a estas moléculas muestran características específicas en su estructura, que son las responsables de sus efectos (**Ruiz & Suarez, 2015**), como se verá a continuación.

La actividad biológica de las LS se atribuye de manera general al grupo α -metileno- γ -lactona (α M γ L), una estructura de anillo que contiene oxígeno con una función carbonilo, el cual es considerado esencial para la actividad antitumoral y citotóxica de estos compuestos (**Chadwick et al., 2013**). Esto debido a su poder de alquilación sobre agentes biológicos nucleófilos presentes en factores de transcripción y enzimas, principalmente sobre aquellas proteínas que contienen un grupo tiol es sus cisteínas, mediante una adición rápida de tipo Michael en la que se da la alquilación de los grupos tioles (**Figura 5**) (**Ruiz & Suarez, 2015**). Esto fue reportado por primera vez por **Hartwell y Abbott, 1969** al revisar el efecto citotóxico de más de 50 LS, y

posteriormente por **Kupchan *et al.*, 1971**, que aportaron pruebas adicionales sobre el mecanismo de acción al evaluar 37 LS en células de carcinoma nasofaríngeo.

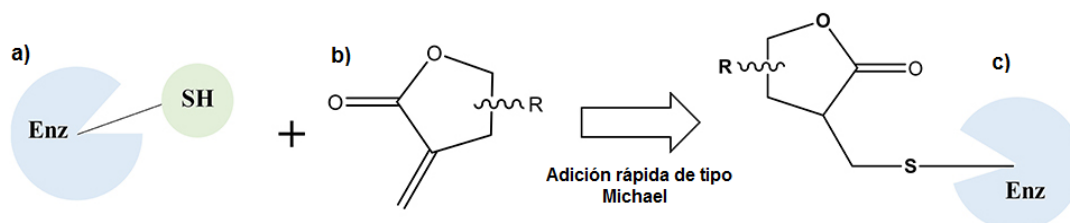


Figura 5. Esquemización del mecanismo de acción de las LS mediante una adición de tipo Michael entre **b)** el grupo tiol (SH) de la cisteína de una enzima y **a)** el grupo α MyL, que resulta en **c)** la alquilación de la enzima. (Tomado y modificado de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2018.00531/full?report=reader>)

Así, los grupos tiol de la cisteína parecen ser las dianas primarias de las LS, causando cambios estéricos y químicos en el objetivo que afectan su capacidad para funcionar adecuadamente, dando lugar a la reducción de la actividad enzimática y a la interrupción del metabolismo mediante la inhibición de diversas funciones celulares que conducen a las células a la apoptosis (**Chadwick *et al.*, 2013**). De esta manera las LS tienen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral por alquilación selectiva de macromoléculas biológicas reguladoras del crecimiento como las enzimas clave que controlan la división celular, o mediante la regulación de la expresión génica mediante la activación/desactivación de factores de transcripción que alteren las funciones de las células tumorales (**Ghantous *et al.*, 2010**).

Sin embargo, **Lee *et al.*, 1971** sugirieron que la unidad funcional de las LS es la fracción del carbonilo insaturado o enona ($O=C-C=CH_2$) y más específicamente el exometileno ($=CH_2$) que se encuentran dentro del grupo α MyL (**Figura 6**), y no la lactona en sí misma, basándose en la eficacia que tuvieron las LS que contienen ciclopentanonas α , β -insaturadas (**Figura 6**) en lugar de α MyL en relación con la inducción de muerte de células tumorales. Más tarde **Hall *et al.*, 1978** encontraron que la fracción $O=C-C=CH_2$ también se encuentra en otros grupos funcionales presentes en algunas LS, como ciclopentanonas α,β -insaturadas, epoxiciclopentenonas o ésteres como cadenas laterales, y que esta variedad de grupos aumentan la actividad antitumoral en carcinosarcomas y la actividad antiinflamatoria en artritis crónica adyuvante (**Chadwick *et al.*, 2013**).

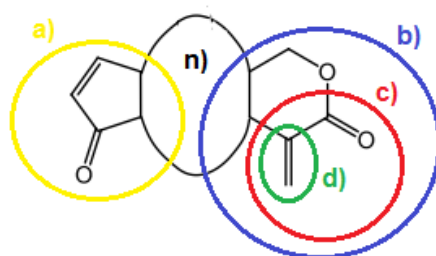


Figura 6. Grupos funcionales más comunes en la estructura de las lactonas sesquiterpénicas: **a)** Ciclopentanona α , β -insaturada, **b)** Grupo α MyL, **c)** Fracción del carbonilo insaturado o enona, **d)** Grupo exometileno. (Tomado y modificado de <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181238817002.pdf>)

Actualmente se considera que estos otros grupos funcionales en la estructura de las LS modifican la potencia del anillo de α MyL por influencias estéricas y químicas, mejorando la

actividad biológica de las LS, y que la relación entre la estructura-actividad biológica que presenta cada LS se atribuye a tres propiedades químicas de los grupos antes mencionados: 1) Reactividad del centro alquilante, 2) Lipofilia y cadena lateral y 3) Geometría molecular y características electrónicas. De entre estas propiedades la reactividad del centro alquilante se destaca, ya que se ha demostrado que es el número y tipo de centros alquilantes lo más importante para la actividad antitumoral (**Ghantous et al., 2010**), considerándose más potentes a aquellas LS que poseen los grupos α MyL o ciclopentanona α , β -insaturada (**Bruno et al., 2005**) y a aquellas que contienen dos centros alquilantes, las cuales son denominadas como bifuncionales (**Beekman et al., 1997**).

Actividad antitumoral de las lactonas sesquiterpénicas de tipo pseudoguayanólido

Actualmente se encuentran tres LS en ensayos clínicos contra el cáncer: el cadianólido Artemisinina de *Artemisia annua* L., el guayanólido Tapsigargina de *Thapsia* (Apiaceae) y el germacranólido Partenólido de *Tanacetum parthenium* (Matricaria) (**Ruiz & Suarez, 2015**). Sin embargo, la investigación llevada a cabo sobre la actividad antitumoral de la gran variedad de LS ha demostrado que las de tipo pseudoguayanólido tienen un mayor efecto citotóxico. **Fernandes et al., 2008** evaluaron las propiedades citotóxicas de 55 LS diferentes en células de carcinoma nasofaríngeo: 22 germacranólidos, 6 elemanólidos, 2 eudesmanólidos, 16 guayanólidos (y sus derivados) y 9 pseudoguayanólidos. Los resultados mostraron que los pseudoguayanólidos Partenina, Ambrosina, Aromaticina, Mexicanina I y Helenalina presentan una mayor actividad citotóxica con IC_{50} menores a 2 μ M (**Tabla 1, Tabla 2**), seguidos de los guayanólidos. De forma similar, **Cheng et al., 2012** evaluaron el efecto citotóxico de 30 LS que extrajeron de *Inula hookeri* C.B. Clarke, y encontraron que los pseudoguayanólidos Bigelovina y Aromaticina exhiben la mayor citotoxicidad contra las cuatro líneas celulares tumorales que examinaron (**Tabla 1**).

Un pseudoguayanólido que ha demostrado tener una amplia variedad de actividades biológicas y que destaca por su fuerte efecto citotóxico, es la Partenina. Sin embargo, **Vaidya et al., 1978** reportaron que esta tiene la capacidad de dañar los cromosomas causando roturas de cromátides e isocromátides principalmente en leucocitos humanos in vitro, e inducir la formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratones in vivo. Por esta razón, se han desarrollado diversos análogos semisintéticos de Partenina como P19 y P16, los cuales se han evaluado en distintas líneas tumorales (**Tabla 1**).

Otros estudios muestran el fuerte efecto citotóxico que poseen algunos pseudoguayanólidos, como los Athrolides C y D extraídos de *Athroisma proteiforme* (Humbert) Mattf. evaluados en células de cáncer de ovario por **Pan et al., 2011 (Tabla 1)**; la Paucina, evaluada en células de cáncer de laringe por **Lee et al., 1971 (Tabla 1)**; y la Ambrosina, un derivado semisintético de Damsina que fue extraída de *Ambrosia Arborescens*, y fue evaluada en células de cáncer de mama por **Soria et al., 2017 (Tabla 1)**. A continuación se muestra en la **Tabla 1** la actividad citotóxica y antiproliferativa reportada de distintos pseudoguayanólidos en distintas líneas celulares tumorales.

Tabla 1. Actividad citotóxica y antiproliferativa de LS de tipo pseudoguayanólido reportada como IC_{50} .

Lactona sesquiterpénica tipo pseudoguayanólido	Tipo de cáncer	Línea celular	IC_{50} (μ M)	Referencia
--	----------------	---------------	----------------------	------------

Paucina	Cáncer de laringe	HEp-2	0.4	Lee <i>et al.</i> , 1971
Damsina			9.38	
Mexicanina I	Cáncer de ascitis de Ehrlich-Lettre (EAC)	EN2	0.56	Beekman <i>et al.</i> , 1997
Arnifolina			4	
Chamissonolide			7.6	
Coronopilina	Cáncer nasofaríngeo	KB	5.49	Fernandes <i>et al.</i> , 2008
3-Hidroxidamsina			10	
Desacetilconfertiflorina			8.71	
Linfofina			2	
Partenina			1.3	
Ambrosina			1.83	
Aromaticina			1.38	
Mexicanina I	Cáncer de ovario	A2780	1.26	Pan <i>et al.</i> , 2011
Athrolide A			2.1	
Athrolide B			2.5	
Athrolide C			0.57	
Athrolide D			0.38	
Athrolide E	1.9			
P19 (análogo semisintético de Partenina)	Leucemia	HL-60	3.5	Kumar <i>et al.</i> , 2011
	Cáncer de mama	MCF-7	5	
	Cáncer cervicouterino	HeLa	12	
Bigelovina	Cáncer de hígado	Hep G2	2.8	Cheng <i>et al.</i> , 2012
	Cáncer cervicouterino	HeLa	5.5	
	Cáncer de próstata	PC-3	1.8	
	Cáncer de estómago	MGC-803	1.4	
Aromaticina	Cáncer de hígado	Hep G2	3	Cheng <i>et al.</i> , 2012
	Cáncer cervicouterino	HeLa	16.3	
	Cáncer de próstata	PC-3	1.6	
	Cáncer de estómago	MGC-803	1	
Ergolide	Cáncer de hígado	Hep G2	26.5	Cheng <i>et al.</i> , 2012
	Cáncer cervicouterino	HeLa	35.8	
	Cáncer de próstata	PC-3	13.5	
	Cáncer de estómago	MGC-803	6.5	
Carpesiolina	Cáncer de hígado	Hep G2	45.5	Cheng <i>et al.</i> , 2012
	Cáncer cervicouterino	HeLa	>50	
	Cáncer de próstata	PC-3	8.7	
	Cáncer de estómago	MGC-803	9.2	
P16 (análogo semisintético de Partenina)	Leucemia	MOLT-4	0.6	Goswami <i>et al.</i> , 2014
	Cáncer de pulmón	A549	4	
	Cáncer cervicouterino	HeLa	7	

	Cáncer de colon	COLO-205	8	
	Cáncer de próstata	PC-3	5	
	Cáncer de riñón	Caki-1	10	
Coronopilina	Cáncer de mama	MCF-10A	15	Soria <i>et al.</i> , 2017
		MCF-7	16	
		JIMT-1	5.5	
		HCC1937	16	
Damsina	Cáncer de mama	MCF 10A	8.1	
		MCF-7	3.7	
		JIMT-1	3.3	
		HCC1937	6.8	
Ambrosina	Cáncer de mama	MCF 10A	2.1	
		MCF 7	1.7	
		JIMT-1	1.4	
		HCC1937	4.1	
Dindol-01	Cáncer de mama	MCF 10A	37	
		MCF 7	16	
		JIMT-1	16	
		HCC1937	15	
Hymenina	Cancer cervicouterino	CaSki	8.65	Álvarez, 2019
	Cancer de mama	MDA-MB-231	8.88	
	Cancer de pulmón	SK-LU-1	7.66	

Helenalina

La Helenalina (**Figura 7**) es una SL de tipo pseudoguayanólido que se produce naturalmente y se extrae de flores de *Arnica montana* y de *Arnica chamissonis ssp. foliosa*, siendo considerada su principal principio activo, aunque también se encuentra en otras plantas, principalmente del genero *Asteraceae*, como *Helenium microcephalum*. Es un compuesto poco soluble en agua y con baja biodisponibilidad, por lo que se están realizando estudios de tecnología farmacéutica en orden a maximizar su eficacia (**Carretero & Ortega, 2015**).

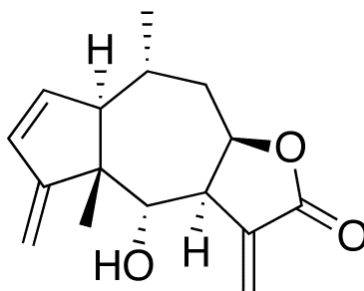


Figura 7. Estructura química de la Helenalina
(Tomado de <https://uniquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/helenalina-1535/>).

La Helenalina, al igual que otras LS, es altamente reactiva con nucleófilos, especialmente grupos sulfhidrilo por una adición de tipo Michael, por lo que presenta una variedad de actividades biológicas y farmacológicas (**Cañigüeral & Vanaclocha, 2003**). Posee actividad antifúngica, ya que inhibe el crecimiento de 16 especies de hongos en diferentes grados, con el efecto más

fuerte en *Microsporum cookei*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichothecium roseum* (Picman, 1983). Posee actividad insecticida, siendo un compuesto de particular interés en la perspectiva del manejo de las hormigas *Antiti* por su fuerte efecto (Boulogne et al., 2012). Posee actividad antibacteriana ya que disminuye la replicación de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) en condiciones inflamatorias (con TNF α) y no inflamatorias, y reduce la mastitis aguda provocada por esta bacteria en glándulas mamarias de ratones, posiblemente mediante la disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias o mediante la inhibición de NF- κ B, que altera la expresión de proteínas del huésped que son esenciales para la replicación intracelular de *S. aureus* (Boulanger et al., 2007).

La Helenalina también posee actividad antiparasitaria ante distintas especies de protozoarios. Actúa como antiplasmódico y antimalárico al alterar los estadios eritrocíticos asexuales de *Plasmodium falciparum*, siendo 2.7 veces más activa que la Neurolenina B, el principal constituyente de la planta antimalárica *Neurolaena lobata* (François & Passreiter, 2004). Es un potente agente tripanocida sobre la forma infecciosa de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, induciendo un efecto apoptótico en los parásitos por posibles daños irreversibles en su ADN (Jimenez et al., 2005). De forma similar, inhibe la proliferación e induce una vacuolización asociada con procesos autofágicos que conduce a la muerte de promastigotes de *Leishmania mexicana*, un parásito del género *Leishmania*, los cuales causan una enfermedad crónica llamada leishmaniosis cutánea. Además afecta la integridad del ADN del parásito, así como su capacidad de invasión (Barrera et al., 2008).

La actividad alérgica producida por ciertas especies del género *Arnica* y de la familia *Asteraceae* también se ve atribuida a LS como la Helanlina, ya que esta actúa como un sensibilizador responsable de la dermatitis de contacto siendo esencial el grupo α MyL para la reactividad cruzada responsable de su actividad (Hausen et al., 1978), además es cuatro veces más fuerte que su acetato ante las respuestas alérgicas en la piel (Herrmann et al., 1978) y podría estar implicada en la generación de "dermatitis por maleza", un patrón clínico inducido por especies de la familia *Asteraceae* (Rosas et al., 2012).

Por otra parte, se conoce que durante muchos años los extractos de alcohol que contienen Helenalina y sus derivados se han utilizado en la medicina herbaria tradicional como compuestos antiinflamatorios para tratar hematomas, contusiones, esguinces, enfermedades reumáticas e inflamaciones superficiales de la piel (Willuhn, 1981). Actualmente se sabe que el efecto antiinflamatorio de la Helenalina se produce a través de la inhibición del factor de transcripción NF- κ B, inhibiendo así la transcripción de citoquinas inflamatorias, lo que resulta en una disminución del reclutamiento de células T y B (Lyss et al., 1998). Además, la Helenalina actúa como un inmunosupresor afectando la proliferación de células T CD4⁺ humanas que son activadas por células dendríticas alogénicas ante respuestas inmunes indeseadas y sobreactivadas que se observan en enfermedades autoinmunes, el rechazo de aloinjertos y en el proceso de inflamación (Berges et al., 2019). La Helenalina también induce una disminución en la secreción de diferentes citoquinas por células mononucleares de sangre periférica (PBMC), e induce a las células a una glicólisis anaeróbica mediante el daño a proteínas pertenecientes al metabolismo de carbohidratos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que resulta en la formación de ácido láctico, el cual puede conducir a la inmunosupresión (Zwicker et al., 2017).

En cuanto a su actividad citotóxica, está resulta ser una de las más interesantes ya que se ha reportado que la Helenalina es la LS de tipo pseudoguayanólido que posee la mayor actividad citotóxica de un conjunto de 18 LS al evaluar su efecto sobre una línea celular tumoral de laringe

(Tabla 2) (Lee *et al.*, 1971). De forma similar, se ha demostrado que es la LS más citotóxica en células tumorales de ascitis de Ehrlich (EAC) (Tabla 2), entre un grupo de pseudoguayanólidos de tipo Helenanólido (10 α -metilpseudoguayanólido) y que su esterificación mejora su toxicidad (Beekman *et al.*, 1997). A continuación se muestra en la Tabla 2 la actividad citotóxica reportada de la Helenalina sobre distintas líneas celulares tumorales.

Tabla 2. Actividad citotóxica de la Helenalina reportada como IC₅₀.

IC50 (μ M)	IC50 (μ g/ml)	Tipo de cáncer	Línea celular	Referencia	Posible mecanismo
0.68	0.178	Cáncer de laringe	HEp-2	Lee <i>et al.</i> , 1971	
0.39	0.102	Cáncer de ascitis de Ehrlich-Lette (EAC)	EN2	Beekman <i>et al.</i> , 1997	
6	1.56	Leucemia	Jurkat T	Dirsch <i>et al.</i> , 2001	Apoptosis vía intrínseca
0.76	0.199	Cáncer nasofaríngeo	KB	Fernandes <i>et al.</i> , 2008	
1.08	0.282	Leucemia	THP-1	Zwicker <i>et al.</i> , 2017	Apoptosis vía intrínseca
1.16	0.302	Leucemia	Jurkat T		
15	3.9	Leucemia	HL-60	Liu <i>et al.</i> , 2019	

Dirsch *et al.*, 2001 encontraron que además de poseer actividad citotóxica, la Helenalina induce apoptosis en células de leucemia Jurkat T (Tabla 2) al permitir la liberación del citocromo c mediante la disminución del potencial de membrana mitocondrial que no se ve afectado por las proteínas antiapoptóticas Bcl-x y Bcl-2. Esto fue confirmado por Zwicker *et al.*, 2017, quienes determinaron que la Helenalina es citotóxica e induce apoptosis por vía intrínseca en células tumorales de leucemia Jurkat T (Tabla 2).

Zwicker *et al.*, 2017 también demostraron la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la Helenalina, lo cual fue confirmado por Jang *et al.*, 2013, quienes demostraron que la Helenalina induce una apoptosis en células tumorales renales Caki mediante la producción de ROS, que no se ve afectada por la sobreexpresión de Bcl-2. Además encontraron que aumenta el estrés en el retículo endoplásmico, pero que esto no está relacionado con la inducción de apoptosis. Un estudio reciente, demostró un mecanismo por el que la Helenalina induce una apoptosis vía intrínseca en PBMC, este consiste en la generación de ROS, los cuales inducen una despolarización de la membrana mitocondrial, que permite la liberación de AIF mitocondrial, lo cual genera la acumulación citoplasmática de p53 y la activación de la caspasa 9, lo que desencadena todo el proceso apoptótico (Berges *et al.*, 2019) (Tabla 3).

En cuanto al mecanismo de acción por el cual la Helenalina afecta a las células tumorales, se cree que ésta actúa selectivamente sobre el factor de transcripción NF- κ B y la telomerasa, ya que estas moléculas están implicadas en el mantenimiento de la proliferación de las células cancerosas (Huang *et al.*, 2005).

Varios estudios reportan que la actividad inhibitoria de NF- κ B por la Helenalina genera distintos efectos en las células. Como se mencionó anteriormente, Lyss *et al.*, 1998 reportaron que la

Helenalina inhibe a NF- κ B lo que inhibe la transcripción de citoquinas proinflamatorias. **Kim et al., 2005** reportaron que la Helenalina induce la diferenciación de células de leucemia HL-60 mieloides en granulocitos a través de la vía de señalización de PKC/ERK y la inhibición de NF- κ B, que inhibe las enzimas del citocromo P450, expresadas en líneas celulares de leucemia mieloide humana. **Lim et al., 2012** reportaron que la inhibición de NF- κ B por la Helenalina induce la escisión de caspasas y un aumento de los marcadores autofágicos Atg12 y LC3-B, lo que resulta en la inducción de una muerte celular autofágica y apoptótica.

El mecanismo por el que la Helenalina inhibe a NF- κ B aún no está claro, pero estudios como el de **Lyß et al., 1998**, **Büchle et al., 2010** y **Hoffmann et al., 2011** proponen que la Helenalina inhibe a NF- κ B interactuando con la subunidad p65 (RelA) y no con moléculas implicadas en su ruta de señalización, como IKKa o IKKb, moléculas que fosforilan a I κ B (el inhibidor de NF- κ B) para su ubiquitinización y posterior degradación por el proteosoma 26-S, lo que permite la translocación de NF- κ B al núcleo. **Widen et al., 2018** proponen que la Helenalina se dirige al residuo Cys38 dentro del dominio de unión al ADN de la subunidad p65 de NF- κ B, pero **García et al., 2001** demostraron que para que ocurra la inhibición de NF- κ B por una LS, se requiere la alquilación sucesiva de Cys38 y Cys120 en p65, lo que puede explicar el potente efecto de LS bifuncionales que tienen dos sitios de alquilación, como la Helenalina (**Tabla 3**).

Por otra parte, el efecto inhibitorio de la helenalina sobre la telomerasa fue reportado por primera vez por **Huang et al., 2005**, quienes observaron que la reducción de la actividad de la telomerasa puede ocurrir con bajas concentraciones de Helenalina, 2 y 4 μ M en células de leucemia Jurkat y HL60, respectivamente. Posteriormente, **Ghasemali et al., 2013** mostraron que la Helenalina y los complejos de Helenalina con nanopartículas de β -Ciclodextrina, usadas para mejorar la estabilidad y solubilidad de otras moléculas en los sistemas de administración de fármacos, inhiben la expresión de ARNm de hTERT en células de cáncer de mama T47D, siendo más efectivo el tratamiento con las nanopartículas. Esto fue confirmado por **Kordi et al., 2014**, quienes observaron que la expresión del gen hTERT disminuye con la exposición a la Helenalina y la Helenalina nanoencapsulada en nanopartículas de PLGA-PEG, cuando la concentración y el tiempo aumentan, lo que afecta la actividad de la telomerasa, ya que esta es un complejo de ribonucleoproteínas compuesto por un componente de ARN (hTER) que se utiliza como plantilla para la síntesis de los telómeros, la subunidad catalítica de la enzima con actividad de transcriptasa inversa (hTERT) y varias proteínas asociadas.

Zhang et al., 2014 demostraron finalmente el mecanismo por el cual la helenalina inhibe la actividad de la telomerasa por medio de simulaciones QM/MM. El mecanismo consiste en que la Helenalina lleva a cabo la alquilación del residuo CYS445 de la telomerasa por una reacción de tipo Michael, esto permite la formación de un enlace de hidrógeno entre la helenalina y el residuo LYS416, lo que interrumpe el reconocimiento de los telómeros en el sitio activo de la telomerasa, resultando en la inhibición de su actividad enzimática, ya que la cadena del lado hidrófilo del residuo LYS416 forma una unión de hidrógeno con las bases del ADN para facilitar la unión del sitio activo de la telomerasa con su sustrato del ADN en los telómeros (**Tabla 3**).

Tabla 3. Posibles mecanismos de acción de la Helenalina reportados.

Mecanismo reportado	Referencia
Inhibición de NF- κ B	García et al., 2001
Inhibición de la telomerasa	Zhang et al., 2014
Inducción de apoptosis vía intrínseca	Berges et al., 2019

No obstante, aún no está claro el papel de la Helenalina como agente antitumoral, ya que sus distintas propiedades atribuidas a un agente de este tipo (como la antiproliferativa y la apoptótica) han sido evaluadas de forma independiente y no de manera conjunta, por lo que resulta relevante estudiar su actividad antiproliferativa y apoptótica a la vez que se descarta la inducción de una muerte necrótica, y al mismo tiempo se evalúa si esta LS posee selectividad, otra de las características más importantes en los compuestos antitumorales. Por otra parte, también resulta relevante el evaluar estas propiedades en otras líneas celulares tumorales como aquellas pertenecientes a los tipos de cáncer con las mayores tasas de mortalidad en México, ya que esta ha sido evaluada principalmente en líneas celulares de leucemias. De esta forma, se podrá establecer una perspectiva que determine la potencial actividad antitumoral de la Helenalina para justificar su estudio en modelos *in vivo*.

Planteamiento del problema

En la actualidad la mayoría de los compuestos que son utilizados para el tratamiento del cáncer suelen ser necróticos y no selectivos, generando efectos secundarios en los pacientes. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, por lo que se continúa con la exploración de la actividad antitumoral de diversos compuestos, entre los que figuran las lactonas sesquiterpénicas (LS) por la actividad antiproliferativa y apoptótica que presentan en cultivos de células tumorales in vitro. Tomando lo anterior en consideración, en este trabajo se pretende evaluar si la Helenalina posee actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, con baja o nula actividad necrótica, en cultivos de células tumorales de cáncer de pulmón (SK-LU-1), cervicouterino (CaSki) y mama (MDA-MB-231), así como su acción selectiva en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana.

Justificación

El cáncer es una de las enfermedades con mayor relevancia debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial. En México, es la tercera causa de muerte pues 14 de cada 100 mexicanos fallecen por esta enfermedad y entre los cánceres más frecuentes y mortales se encuentran el cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino según lo indicado por el director general del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) (**Secretaría de Salud, 2017**). Esta situación manifiesta la importancia de continuar con la investigación de nuevas alternativas terapéuticas, destacando la búsqueda de compuestos que posean un mejor potencial antiproliferativo y apoptótico, con menor o nula actividad necrótica y de acción selectiva, con el propósito de disminuir los efectos secundarios asociados a los tratamientos ya existentes.

Hipótesis

Se ha reportado que las lactonas sesquiterpénicas de tipo pseudoguayanólido poseen actividad antiproliferativa en distintas líneas tumorales. En el caso de la Helenalina se ha reportado su efecto antiproliferativo sobre líneas tumorales de cáncer de ascitis de Ehrlich-Lette (EAC), cáncer laríngeo, nasofaríngeo y leucemias, así como su efecto inductor de muerte apoptótica. Esto sugiere la posibilidad de que la Helenalina tenga un efecto antiproliferativo y apoptótico en cultivos de las líneas tumorales de cáncer de pulmón SK-LU-1, de cáncer cervicouterino CaSki, y de cáncer de mama MDA-MB-231.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular necrótica y/o apoptótica de la lactona sesquiterpénica Helenalina en cultivos de células tumorales de pulmón (SK-LU-1), mama (MDA-MB-231) y cervicouterino (CaSki), así como en células linfocíticas no tumorales.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad antiproliferativa de la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki, expresada como la concentración requerida del compuesto (en $\mu\text{g/ml}$) para disminuir en un 50% el número celular (IC_{50}) mediante la técnica de tinción con cristal violeta.
- Determinar si la Helenalina induce una muerte necrótica en las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki, respectivamente, mediante la evaluación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Determinar si la Helenalina induce una muerte apoptótica en las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki, respectivamente, mediante la observación de características morfológicas típicas de células apoptóticas por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia, así como la presencia de la caspasa 3 activa mediante su detección por microscopía de epifluorescencia y su cuantificación por citometría de flujo (FACS).
- Evaluar si las IC_{50} obtenidas con la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki afectan la proliferación de linfocitos provenientes de sangre periférica humana, mediante la técnica de marcaje con Carboxifluoresceína (CFSE) por citometría de flujo (FACS).
- Determinar si las IC_{50} obtenidas con la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki, inducen una muerte necrótica en cultivos de linfocitos provenientes de sangre periférica humana, mediante la evaluación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Diseño metodológico

Preparación del compuesto

El compuesto Helenalina, fue sintetizado en el laboratorio del Dr. Manuel Jiménez Estrada, investigador del Instituto de Química de la UNAM. En una balanza analítica (Ohaus, USA) fue pesado 1 mg del compuesto en un tubo Eppendorf de fondo cónico de 1.5 ml y se solubilizó en 100 μl de Dimetilsulfóxido (DMSO; J. T. Baker, USA) para obtener una concentración inicial de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Stock 1). Posteriormente, se hizo una disolución con 10 μl del Stock 1 y 990 μl de RPMI-1640 (Laboratorio Microlab, MEX) suplementado con L-Glutamina, Bencilpenicilina y Rojo de fenol (Gruunenthal, MEX) al 5% de Suero fetal bovino (SFB; Biowest, USA) para obtener una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Stock 2), después se disolvieron 100 μl del stock 2 en 900 μl de RPMI-1640 al 5% de SFB para obtener una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Stock 3); y finalmente se disolvieron 100 μl del stock 3 en 900 μl de RPMI al 5% de SFB para obtener una concentración de 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Stock 4). Todas las disoluciones se mantuvieron en refrigeración y del stock 4 se tomaron los $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ necesarios para llevar a cabo los ensayos biológicos, en los cuales la concentración de DMSO empleada fue menor al 0.5%.

Cultivo celular de las líneas tumorales

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, manteniendo las condiciones óptimas de esterilidad. Las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y fueron cultivadas en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) en un volumen de 10 ml de medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, Bencilpenicilina y Rojo de fenol al 5 % de SFB, previamente desactivado a 57° C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C. Los cultivos celulares fueron utilizados para los ensayos biológicos cuando estos se encontraban en proliferación al 60 % de saturación. La línea celular SK-LU-1 corresponde a células epiteliales adherentes humanas de adenocarcinoma pulmonar (ATCC, 2020), la línea celular CaSki corresponde a células epiteliales adherentes humanas de carcinoma epidermoide cervicouterino positivas a VPH-16 derivadas del sitio metastásico en el mesenterio del intestino delgado (ATCC, 2020), y la línea celular MDA-MB-231 corresponde a células epiteliales adherentes humanas de adenocarcinoma de mama triple negativo derivadas del sitio metastásico en un derrame pleural (ATCC, 2020).

Evaluación de la actividad antiproliferativa por la técnica de incorporación de cristal violeta en cultivos de células tumorales

Se sembraron 3500 células por pozo de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 de manera independiente en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Incorporated, USA) en 100 μl de RPMI-1640 al 5% de SFB por 24h en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C. Transcurridas las 24 horas de adhesión celular, se determinaron las siguientes condiciones experimentales: un control testigo consistente de medio de cultivo y un control del vehículo al cual se le adicionó la concentración máxima de DMSO empleada en los tratamientos con el compuesto (0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Los tratamientos con el

compuesto consistieron en trece disoluciones de Helenalina previamente preparadas en tubos Eppendorf de fondo cónico de 1.5 ml con concentraciones de 1 a 13 $\mu\text{g/ml}$ de Helenalina. Cada condición se realizó por sextuplicado y se mantuvo en la incubadora con las mismas condiciones anteriormente descritas por 24 h. Una vez transcurridas las 24 h de tratamiento con el compuesto, el número celular fue determinado mediante el método de incorporación de cristal violeta descrito por **Kueng et al., 1989**. Para ello se retiró el medio de cultivo de cada pozo y las células fueron fijadas con 50 μl /pozo de Glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1% durante 20 minutos en agitación constante, posteriormente se lavó la placa 5 veces con agua de la llave y se dejó secar al aire. Una vez seca, se añadieron 50 μl /pozo del colorante Cristal violeta (Sigma-Aldrich, USA) al 0.1% en solución amortiguadora de Ácido fórmico pH 6.0, durante 20 minutos en agitación constante. Después se lavó la placa con agua de la llave hasta eliminar el exceso de colorante en los pozos. Se dejó secar al aire y se añadieron 50 μl /pozo de Ácido acético (J. T. Baker, USA) al 10% durante 20 minutos en agitación constante para solubilizar el colorante incorporado. Finalmente, se tomaron lecturas de la absorbancia a 590 nm con el lector de placas de ELISA (ChroMate Awareness Technology INC, USA), y el procesamiento de los datos se realizó en el programa de computadora Microsoft Office Excel 2010, se graficaron las lecturas obtenidas como el porcentaje de número celular contra la concentración de Helenalina empleada considerando al control testigo como el porcentaje celular normal (100%), se procesaron los datos para obtener la ecuación lineal y el coeficiente de correlación, y se determinó la concentración a la cual disminuye en un 50% la densidad celular (IC_{50}). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivos de células tumorales

Se sembraron 3500 células por pozo de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Incorporated, USA) en 100 μl de RPMI-1640 al 5% de SFB, dejando 6 pozos por placa sin células para que éstos funcionaran como la muestra blanco, y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO_2 a 37° C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión celular, se determinaron las siguientes condiciones experimentales: un control testigo y un control positivo a necrosis, a los cuales se les realizó un cambio de medio de cultivo, un control del vehículo al cual se le adicionó la concentración máxima de DMSO presente en las IC_{50} determinadas (0.5 $\mu\text{l/ml}$), y las correspondientes IC_{50} determinadas y confirmadas por triplicado para cada línea celular. Cada condición se realizó por sextuplicado y se mantuvo en la incubadora con las mismas condiciones anteriormente descritas por 24 h. Una hora antes de completar las 24 horas, se añadieron 10 μl de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 10 % al control positivo a necrosis. Al completarse las 24 horas, se recuperaron los sobrenadantes de cada condición experimental en una placa de 96 pozos de fondo cónico (Corning Incorporated, USA), la cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 10°C. La actividad necrótica se evaluó utilizando el Kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity (Promega, USA), para ello se transfirieron 40 μl /pozo del sobrenadante de cada condición a una placa de 96 pozos de fondo plano, se adicionaron 40 μl /pozo del reactivo de reacción para la LDH a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz por 25 minutos. Posteriormente, se añadieron 40 μl /pozo de la solución de paro y finalmente se tomaron lecturas de la absorbancia a 490 nm con el lector de placas de ELISA (ChroMate Awareness Technology INC, USA), y el procesamiento de los datos se realizó en el programa de computadora Microsoft Office Excel 2010, haciendo una comparación entre las IC_{50}

determinadas para cada línea celular y el control positivo a necrosis, el cual fue considerado como el 100% de actividad de la enzima LDH. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Observación de morfología apoptótica por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia y detección de caspasa 3 activa por microscopía de epifluorescencia en cultivos de células tumorales

Se sembraron 3500 células por pozo de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Incorporated, USA) en 100 μ l de RPMI-1640 al 5% de SFB y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión celular, se determinaron las siguientes condiciones experimentales: El control testigo al cual se le realizó un cambio de medio de cultivo, el control del vehículo al cual se le adicionó la concentración máxima de DMSO presente en las IC₅₀ determinadas (0.5 μ l/ml), el control positivo a apoptosis al cual se le adicionó 30 μ g/ml de Camptotecina y las correspondientes IC₅₀ determinadas y confirmadas por triplicado para cada línea celular. Cada condición se realizó por sextuplicado y se mantuvo en la incubadora con las mismas condiciones anteriormente descritas. Transcurridas las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con 50 μ l/pozo de una mezcla de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 4% y glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 2.5% en PBS por 2 horas en agitación constante. Posteriormente se realizaron 5 lavados con 100 μ l/pozo de PBS estéril y filtrado, y las células fueron permeadas con 50 μ l/pozo de Tritón X-100 al 0.5% en PBS a 4°C durante 30 minutos y se realizaron 5 lavados más con 100 μ l/pozo de PBS. En seguida, se adicionaron 30 μ l/pozo de Anticuerpo 1° anti-caspasa 3 activa (Abcam, USA) con proporción 1:1000 μ l de PBS, durante 24 horas en refrigeración. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron nuevamente 5 lavados con 100 μ l/pozo de PBS y se añadieron 30 μ l/pozo de Anticuerpo 2° anti-IgG acoplado al fluorocromo FIT-C (Sigma-Aldrich, USA) con proporción 1:1000 μ l de PBS, a temperatura ambiente y protegiendo de la luz durante 2 horas. Se lavó nuevamente 5 veces con 100 μ l/pozo de PBS y se agregaron 2 μ l del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) con 50 μ l de PBS. Inmediatamente la placa fue observada y fotografiada en un microscopio de epifluorescencia Eclipse TS2R-FL (Nikon, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Cuantificación de células tumorales positivas a caspasa 3 activa por citometría de flujo (FACS)

Se sembraron 400,000 células por pozo de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 en placas de 6 pozos de fondo plano (Corning Incorporated, USA) en 2.5 ml de RPMI-1640 al 5% de SFB y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión celular, se determinaron las siguientes condiciones experimentales: El control sin marca (sin anticuerpos), el control para el Anticuerpo 1° (sin anticuerpo 2°), el control para el Anticuerpo 2° (sin anticuerpo 1°) y el control testigo a los cuales se les realizó un cambio de medio de cultivo, el control del vehículo al cual se le adicionó la concentración máxima de DMSO presente en las IC₅₀ determinadas (0.5 μ l/ml), el control positivo a apoptosis al cual se le adicionó 30 μ g/ml de Camptotecina y las correspondientes IC₅₀ determinadas y confirmadas por triplicado para cada

línea celular. La placa se mantuvo en la incubadora con las mismas condiciones anteriormente descritas durante 24 h. Transcurridas 24 horas después de aplicar las condiciones experimentales, se recuperó el medio de cada condición en tubos para citometría y se añadió 1 ml/pozo de Verseno para despegar las células adheridas, el cual fue colectado posteriormente en el tubo en el que se recuperó su medio correspondiente. Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante por decantación para recuperar el botón celular. En seguida, las células fueron fijadas con 500 μ l/tubo de etanol al 70% en PBS (filtrado y estéril) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante por decantación, y se resuspendieron las células en 1 ml/tubo de PBS filtrado, esto último se realizó tres veces para lavar los restos del fijador. Al terminar el último lavado, se adiciono 50 μ l/tubo de Anticuerpo 1° anti-caspasa 3 activa (Abcam, USA) con proporción 1:1000 μ l de PBS, por condición (excepto al control si marca y al control del anticuerpo 2°) durante 24 horas a 4°C, posteriormente se lavaron las células 3 veces para retirar el exceso de Anticuerpo 1° agregando 1 ml de PBS filtrado y estéril, y centrifugando a 1500 rpm por 5 minutos. Al terminar el último lavado se adiciono 50 μ l de Anticuerpo 2° anti-IgG acoplado al fluorocromo FIT-C (Sigma-Aldrich, USA) con proporción 1:1000 μ l de PBS, por condición (excepto al control sin marca y al control de anticuerpo 1°) durante 2 horas a 37°C. Se realizaron dos últimos lavados con 1000 μ l/tubo de PBS y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos para retirar el exceso de anticuerpo 2°. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μ l/tubo de PBS filtrado y las muestras fueron procesadas en el citómetro de flujo FACS Aria III, capturando 10,000 eventos por condición en la población de interés, y los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo Software (BD Biosciences, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación de la proliferación de linfocitos humanos mediante cuantificación de células marcadas con Carboxifluoresceína (CFSE) por citometría de flujo (FACS)

De un sujeto clínicamente sano, se obtuvieron 20-30 ml de sangre periférica en tubos BD-Vacutainer® con EDTA (10.8 mg/tubo). Para separar los linfocitos del resto de la muestra, se vertió 5 ml de Ficoll-Hysopaque (Sigma-Aldrich, USA) y 5ml de la sangre (proporción 1:1) en tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA). Se centrifugaron inicialmente a una velocidad de 300 rpm por 5 minutos, aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 5 minutos), hasta alcanzar las 1500 rpm, en la cual se les mantuvo centrifugando por 20 minutos. Se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, transfiriendo el paquete celular que se obtuvo a tubos limpios. Se realizaron dos lavados con 10mL de RPMI-1640 sin suero por tubo centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Brevemente, los linfocitos se marcaron con 2 μ M de Carboxifluoresceína (CFSE). Para ello, se agregaron 50 μ l de 200 μ M de CFSE en 5 ml de RPMI-1640 sin suero (Sigma-Aldrich, USA) y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados agregando 5 ml de RPMI al 5% de SFB para eliminar el exceso de CFSE y se cultivaron 200,000 linfocitos por pozo en 200 μ l de RPMI al 20% de SFB en una placa de 96 pozos y se determinaron los siguientes controles por quintuplicado: -/- (sin CFSE y sin Fitohemaglutinina (PHA)), +/- (con CFSE y sin PHA), -/+ (sin CFSE y con 20 μ l/ml de PHA) y +/+ (con CFSE y con 20 μ l/ml de PHA). Por otra parte, los pozos con linfocitos para determinar el efecto de las IC₅₀ determinadas se mantuvieron con CFSE y con 20 μ l/ml de PHA. La placa se mantuvo en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C durante 48 horas. Transcurridas las 48 horas de incubación, se procedió

a retirar 100 µl por pozo y se determinaron las siguientes condiciones experimentales: a los controles -,- (sin CFSE y sin PHA) y +,- (con CFSE y sin PHA) se les agregó 100 µl/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco, mientras que a los controles -,+ (sin CFSE y con PHA) y +,+ (con CFSE y con PHA) se les agregó 100 µl/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco con 20 µl/ml de PHA, al control del vehículo se le adicionó la concentración máxima de DMSO presente en las IC₅₀ determinadas (0.5 µl/ml), y para probar las IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, se adicionaron 100 µl por pozo de las IC₅₀ a una concentración doble. La placa se mantuvo en la incubadora con las mismas condiciones anteriormente descritas durante 24 h. Transcurridas las 24 h después de aplicar las condiciones experimentales (72 horas de cultivo total), se cosecharon las células en tubos de citometría y se centrifugaron por 5 minutos a 1,500 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 500µl/tubo de verseno a 4°C por 5 minutos para deshacer las colonias celulares. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Finalmente, a cada uno de los tubos se les agregó 500 µl de PBS adicionado con 5% de SFB. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 µl/tubo de PBS adicionado con 5% de SFB y las muestras fueron procesadas en el citómetro de flujo FACS Aria-II, capturando 10,000 eventos por condición en la población de interés, y los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo Software (BD Biosciences, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en linfocitos humanos

Se sembraron 200,000 linfocitos por pozo en 200 µl de RPMI al 20% de SFB y 20 µg/ml de PHA en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning Incorporated, USA), dejando 6 pozos sin células para que éstos funcionaran como la muestra blanco, y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera húmeda a punto de rocío con 5% de CO₂ a 37° C durante 48 horas. Transcurridas las 48 horas de incubación, se retiraron 100 µl de medio de cultivo de todos los pozos y se determinaron las siguientes condiciones experimentales: El control testigo y control positivo a necrosis, a los cuales se les realizó un cambio de medio de cultivo, el control del vehículo al cual se le adicionó la concentración máxima de DMSO presente en las IC₅₀ determinadas (0.5 µl/ml), y para probar las IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, se adicionaron 100 µl por pozo de las IC₅₀ a una concentración doble. Cada condición se realizó por cuadruplicado y se mantuvo en la incubadora con las mismas condiciones anteriormente descritas por 24 h. Una hora antes de completar las 24 horas, se añadieron 10 µl de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 10 % al control positivo a necrosis. Al completarse las 72 horas de cultivo totales, se recolectaron 60 µl de los medios de cada condición experimental en una placa de 96 pozos de fondo cónico (Corning Incorporated, USA), la cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 10°C. La actividad necrótica se evaluó utilizando el Kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity (Promega, USA), para ello se transfirieron 40 µl/pozo del sobrenadante de cada condición a una placa de 96 pozos de fondo plano, se adicionaron 40 µl/pozo del reactivo de reacción para la LDH a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz por 25 minutos. Posteriormente, se añadieron 40 µl/pozo de la solución de paro y finalmente se tomaron lecturas de la absorbancia a 490 nm con el lector de placas de ELISA (ChroMate Awareness Technology INC, USA), y el procesamiento de los datos se realizó en el programa de computadora Microsoft Office Excel 2010, haciendo una comparación entre las IC₅₀ determinadas para cada línea celular y el control positivo a necrosis, el cual fue

considerado como el 100% de actividad de la enzima LDH. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadísticos

Todos los datos experimentales son representados como la media de al menos tres experimentos y fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparada con el control testigo y el control del vehículo.

Resultados

Actividad antiproliferativa de la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231

Con el fin de determinar si la lactona sesquiterpénica Helenalina posee actividad antiproliferativa en cultivos de células tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki, las tres líneas tumorales fueron estimuladas con un rango de concentraciones de cero a 1.1 $\mu\text{g/ml}$ y el número celular se determinó a las 24 horas mediante la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al.*, 1989 (Figura 8).

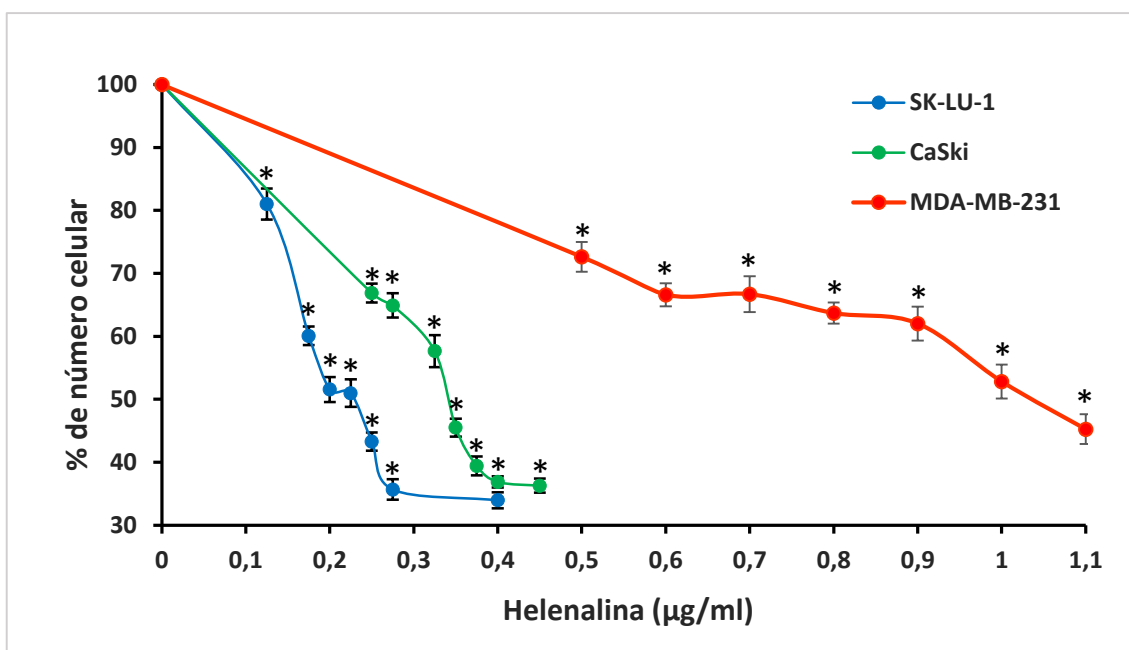


Figura 8. Actividad antiproliferativa de la Helenalina sobre las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 a las 24 horas. Los datos mostrados son resultado de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición, y fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control)

Los resultados muestran que la Helenalina posee actividad antiproliferativa sobre las tres líneas tumorales de manera dosis dependiente, ya que el número celular disminuyó conforme se incrementó la concentración del compuesto. Para determinar la concentración requerida del compuesto que disminuyó en un 50 % el número celular (IC_{50}) de las tres líneas tumorales, se realizó una linealización de los datos, obteniendo así las IC_{50} mostradas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Valores de IC_{50} de Helenalina determinados para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231.

Línea celular	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} (μM)
SK-LU-1	0.221	0.84
CaSki	0.344	1.31
MDA-MB-231	1.056	4.02

Actividad necrótica de la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231

Con el propósito de descartar que la Helenalina disminuyó el número celular mediante una muerte celular necrótica, se evaluó si las IC₅₀ de Helenalina determinadas anteriormente inducen necrosis en las células tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares a las 24 horas. La LDH fue considerada un marcador de muerte celular necrótica ya que su liberación al medio extracelular indica una pérdida de integridad de la membrana plasmática. Al respecto, las líneas tumorales fueron tratadas con sus respectivas concentraciones de IC₅₀ de Helenalina y el porcentaje de actividad de LDH se determinó en comparación con el control positivo a necrosis (Tritón X-100 al 10%) utilizando el Kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity (Figura 9).

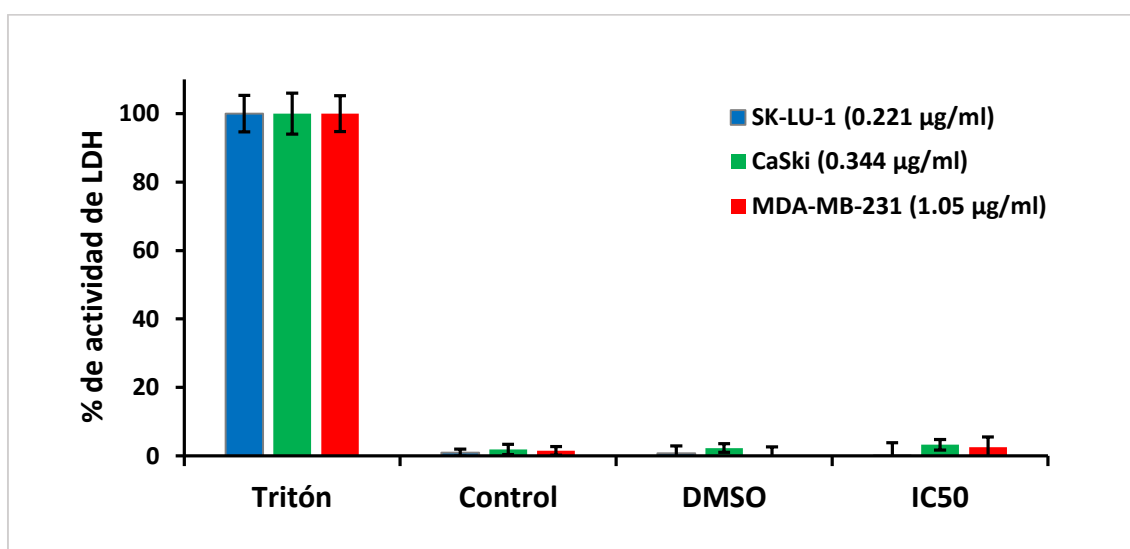


Figura 9. Actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA- MB-231, tratadas con las IC₅₀ de Helenalina correspondientes por 24 horas. Los datos mostrados son resultado de 3 ensayos independientes con 4 repeticiones por condición, y fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control).

Los resultados muestran que los sobrenadantes de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 tratadas con sus correspondientes IC₅₀ presentan un incremento en la actividad de la LDH del 0.05%, 3.24% y 2.51% respectivamente (Tabla 5). Sin embargo, mediante una prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$ vs control) se corroboró que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de actividad de LDH de las IC₅₀ con respecto al control y el DMSO, lo que indica que la LDH no fue liberada al medio extracelular y por lo tanto las células tumorales no perdieron la integridad de su membrana, sugiriendo que la Helenalina induce la disminución del número celular por otro mecanismo diferente a una muerte celular necrótica.

Tabla 5. Porcentaje y desviación estándar de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA- MB-231 con respecto al control positivo necrótico.

Línea celular	Tritón X-100	Control	DMSO	Helenalina (IC ₅₀)
SK-LU-1	100 ± 5.32	0.93 ± 1.02	0.74 ± 2.14	0.05 ± 3.82
CaSki	100 ± 5.97	1.85 ± 1.5	2.27 ± 1.26	3.24 ± 1.52
MDA-MB-231	100 ± 5.26	1.47 ± 1.23	0.003 ± 2.62	2.51 ± 3.05

Morfología apoptótica y presencia de caspasa 3 activa inducida por la Helenalina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231

Una vez descartado que la Helenalina no tiene un efecto necrótico sobre las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, se procedió a evaluar si el compuesto induce una muerte celular apoptótica. Para esto los cultivos de las tres líneas tumorales fueron tratados con sus respectivas

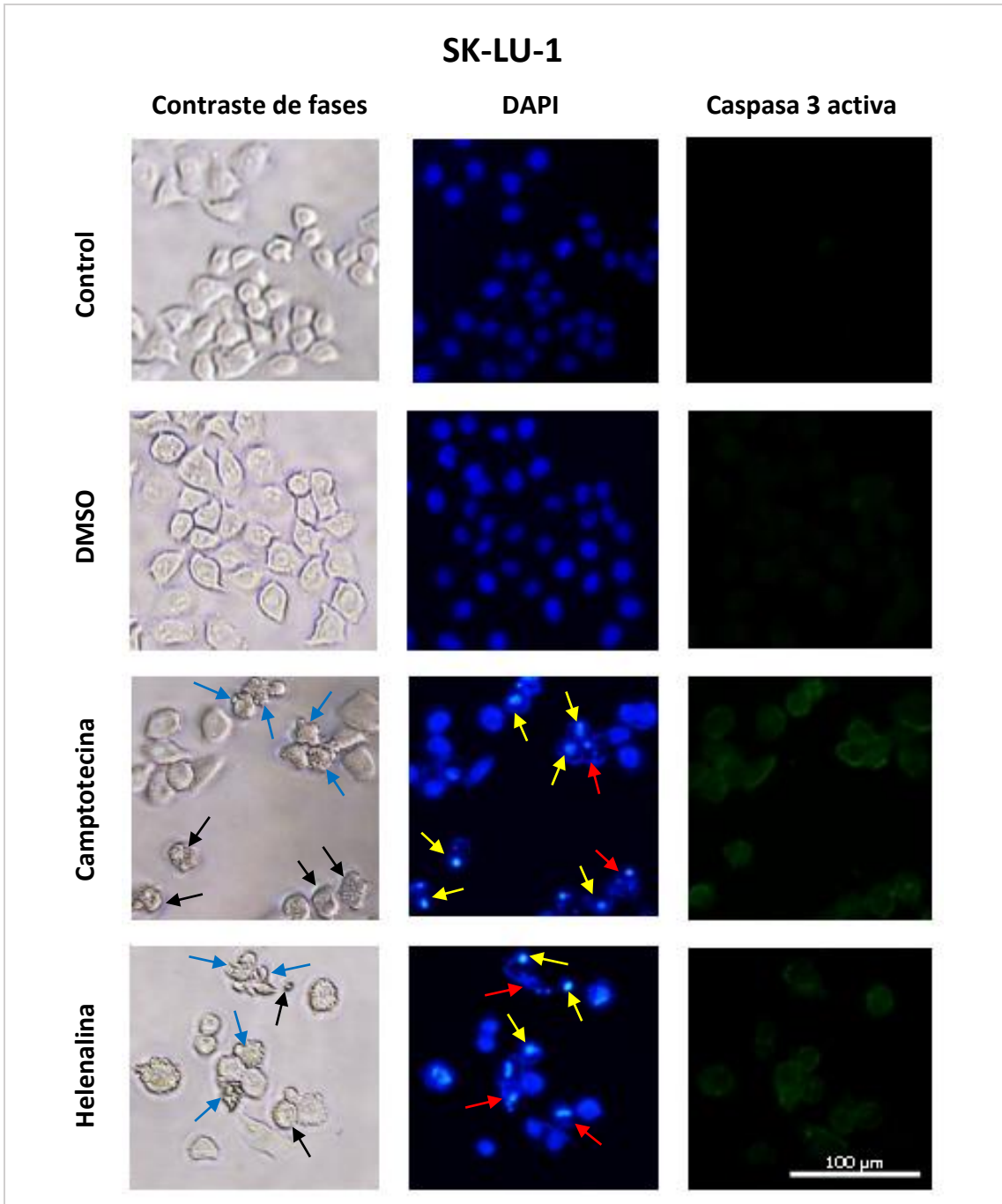


Figura 10. Efecto apoptótico de la IC_{50} de Helenalina sobre la línea tumoral SK-LU-1 a las 24 horas. A la izquierda se encuentran las distintas condiciones experimentales: Control (control testigo), DMSO (control vehículo, 0.5 μ l/ml), Camptotecina (control positivo a apoptosis, 30 μ g/ml) y Helenalina (IC_{50} = 0.221 μ g/ml). En la parte superior se encuentran las tres características observadas: Contraste de fases (Características morfológicas celulares) donde las flechas negras indican contracción celular y las flechas azules aparición de burbujeo o formación de cuerpos apoptóticos, DAPI (Características morfológicas nucleares) donde las flechas amarillas indican compactación de la cromatina y las flechas rojas su fragmentación; y Caspasa 3 activa (Inmunodetección de esta).

concentraciones de IC_{50} de Helenalina por 24 horas y fueron fotografiados para observar características morfológicas de este tipo de muerte e identificar la presencia de la caspasa 3 activa, como un marcador de apoptosis, en comparación con un control positivo para esta molécula (Camptotecina). Las características morfológicas celulares propias de este tipo de muerte como la contracción celular y la formación de cuerpos apoptóticos fueron observadas por microscopia de contraste de fases. Las características morfológicas nucleares propias de este

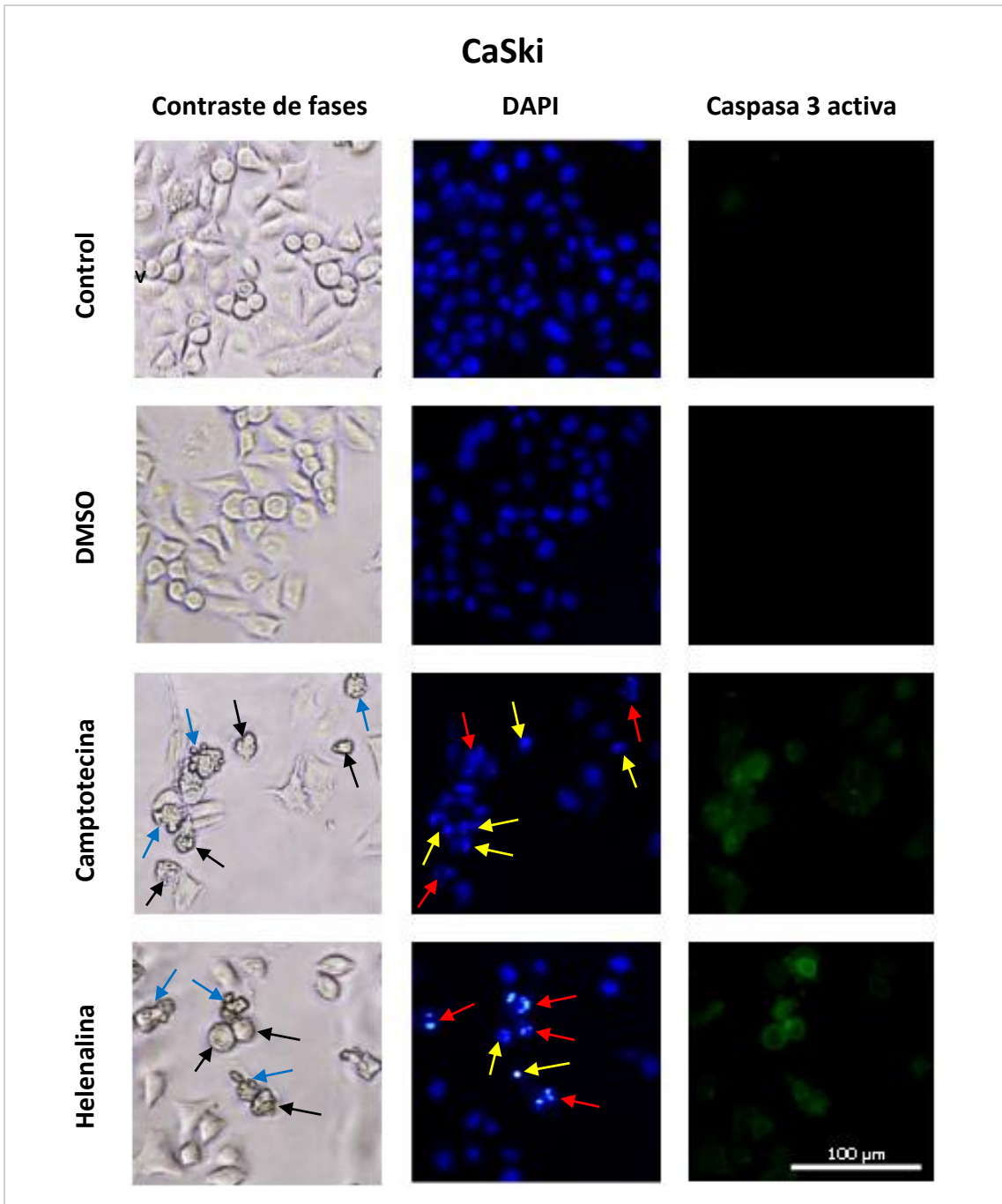


Figura 11. Efecto apoptótico de la IC_{50} de Helenalina sobre la línea tumoral CaSki a las 24 horas. A la izquierda se encuentran las distintas condiciones experimentales: Control (control testigo), DMSO (control vehículo, 0.5 μ l/ml), Camptotecina (control positivo a apoptosis, 30 μ g/ml) y Helenalina (IC_{50} = 0.344 μ g/ml). En la parte superior se encuentran las tres características observadas: Contraste de fases (Características morfológicas celulares) donde las flechas negras indican contracción celular y las flechas azules aparición de burbujeo o formación de cuerpos apoptóticos, DAPI (Características morfológicas nucleares) donde las flechas amarillas indican compactación de la cromatina y las flechas rojas su fragmentación; y Caspasa 3 activa (Inmunodetección de esta).

tipo de muerte como la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN fueron observadas por microscopía de epifluorescencia mediante la tinción nuclear de los cultivos de las tres líneas tumorales con el fluorocromo 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La detección de la casapasa 3 activa se llevó a cabo mediante su inmunodetección con anticuerpos y su observación por microscopía de epifluorescencia en los cultivos de las tres líneas tumorales (Figura 10, Figura 11 y Figura 12).

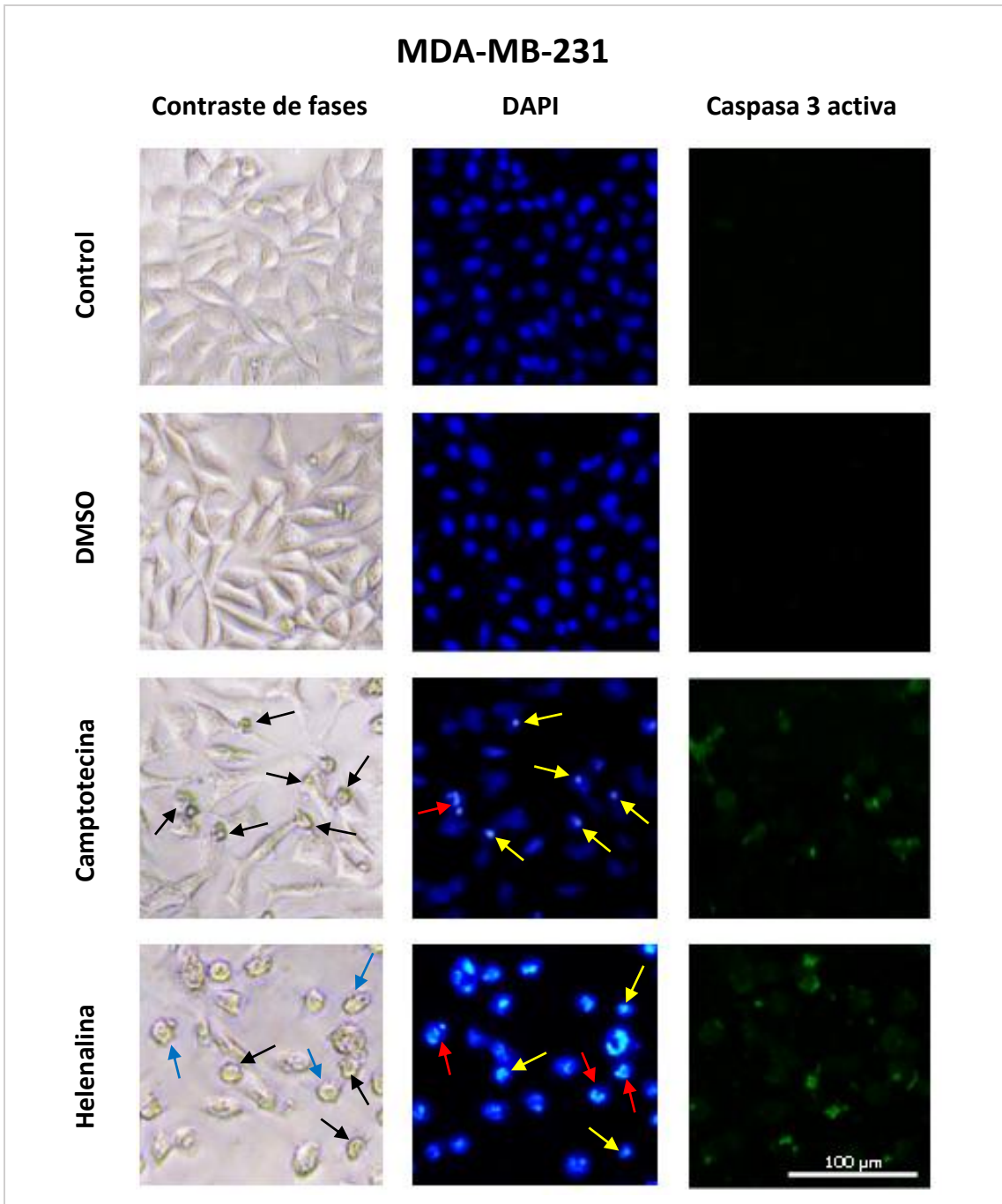


Figura 12. Efecto apoptótico de la IC_{50} de Helenalina sobre la línea tumoral MDA-MB-231 a las 24 horas. A la izquierda se encuentran las distintas condiciones experimentales: Control (control testigo), DMSO (control vehículo, 0.5 μ l/ml), Camptotecina (control positivo a apoptosis, 30 μ g/ml) y Helenalina (IC_{50} = 1.05 μ g/ml). En la parte superior se encuentran las tres características observadas: Contraste de fases (Características morfológicas celulares) donde las flechas negras indican contracción celular y las flechas azules aparición de burbujeo o formación de cuerpos apoptóticos, DAPI (Características morfológicas nucleares) donde las flechas amarillas indican compactación de la cromatina y las flechas rojas su fragmentación; y Caspasa 3 activa (Inmunodetección de esta).

Los resultados muestran que las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 presentaron un cambio en su morfología al ser tratadas con sus IC₅₀ de Helenalina correspondientes, y este cambio fue similar al observado con el control positivo a apoptosis (Camptotecina). Respecto a la morfología celular, en el control y el DMSO las células presentan una morfología poliédrica característica de cada tipo celular, con un citoplasma extendido y prolongaciones citoplasmáticas, mientras que las células tratadas con Helenalina y Camptotecina presentan una morfología esférica con tamaño reducido que indica un proceso de contracción celular y hay una pérdida de las proyecciones citoplasmáticas que sugieren una disminución en la adherencia celular (flechas negras). Además, en algunas células se puede observar la aparición de burbujeo y la formación de cuerpos apoptóticos (flechas azules) (**Figura 10, Figura 11 y Figura 12**).

Respecto a la tinción nuclear con DAPI de las tres líneas tumorales, se puede observar que en el control y el DMSO, los núcleos se encuentran bien definidos ya que sufrieron una tinción nuclear homogénea lo que indica que la cromatina está dispersa en el núcleo. Por otro lado en las células tratadas con Helenalina y Camptotecina, los núcleos se encuentran más compactos lo que indica una disminución del tamaño nuclear ya que la cromatina se encuentra condensada (flechas amarillas). Además se puede observar que los núcleos no se tiñeron homogéneamente ya que hay zonas dentro del núcleo donde hay una mayor concentración del colorante, lo que indica de igual forma la condensación de la cromatina (flechas amarillas). También, se puede observar la tinción de distintos cuerpos que coinciden con la aparición de burbujeo y la formación de cuerpos apoptóticos que se observan en las fotografías tomadas en contraste de fases, lo que indica que se está llevando a cabo la fragmentación del ADN (flechas rojas) (**Figura 10, Figura 11 y Figura 12**).

En cuanto a la inmunodetección de la caspasa 3 activa se encontró que tanto en el control como en el DMSO, no se observa presencia alguna de esta molécula característica del proceso apoptótico, sin embargo, en aquellas que fueron tratadas con las IC₅₀ de Helenalina correspondientes o con Camptotecina se observa una marcada presencia de ésta, lo que indica que la Helenalina induce la activación de la caspasa 3 activa en los cultivos de las tres líneas tumorales (**Figura 10, Figura 11 y Figura 12**). Sin embargo, aunque estos resultados indican que la Helenalina induce a un proceso de muerte celular apoptótica dependiente de caspasa 3 activa en los cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, siendo este el mecanismo por el que disminuye el número celular en los mismos, es necesario emplear otra técnica de detección de apoptosis para confirmar que se esté llevando a cabo este tipo de muerte.

Porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa inducida por la Helenalina en los cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231

Con el propósito de corroborar que la Helenalina induce una muerte celular apoptótica en los cultivos de células tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 mediante la activación de la caspasa

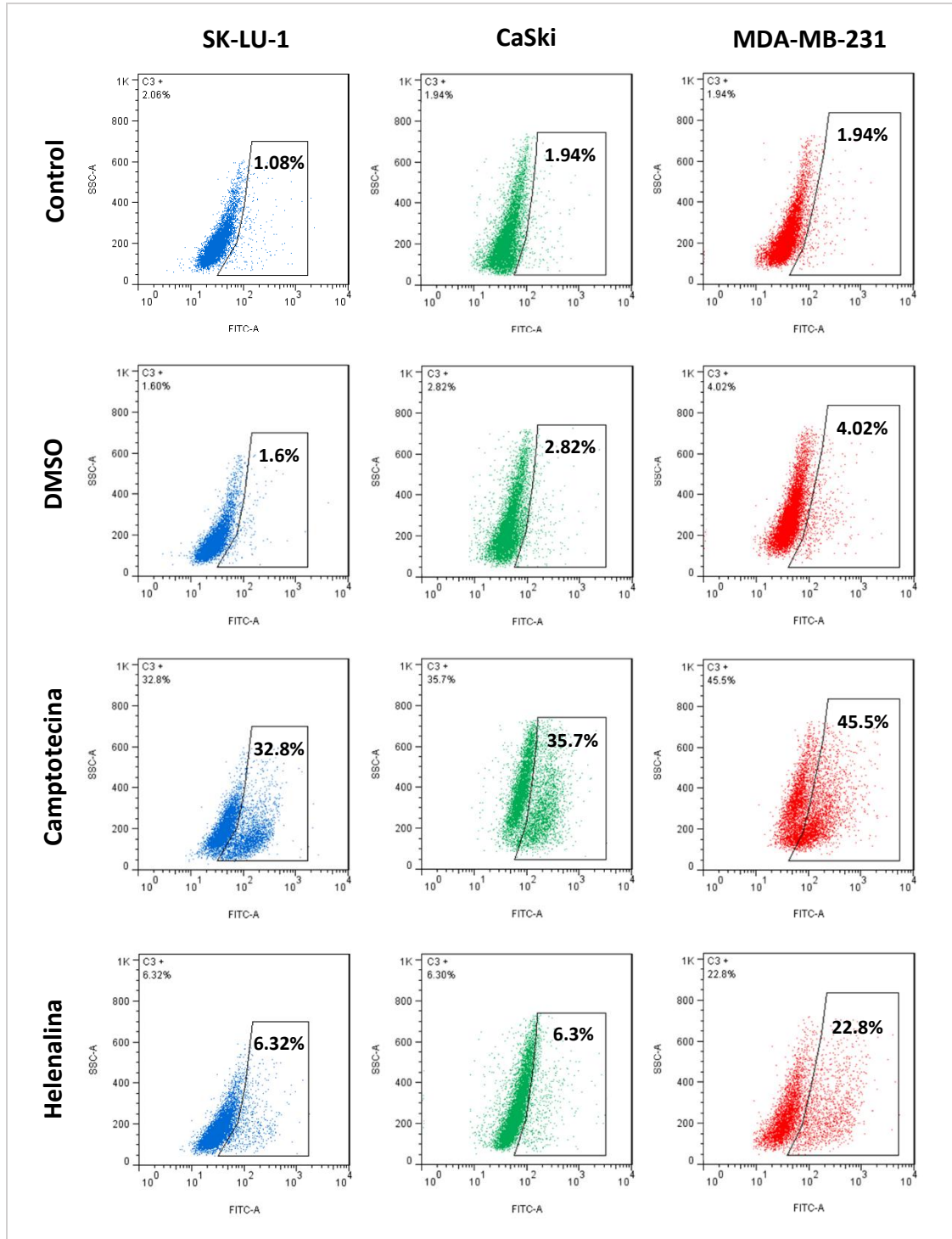


Figura 13. Cuantificación de células positivas a caspasa 3 activa por citometría de flujo en cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, tratadas con las IC₅₀ de Helenalina correspondientes. A la izquierda se encuentran las distintas condiciones experimentales: Control (control testigo), DMSO (control del vehículo, 0.5 µl/ml), Camptotecina (control positivo a apoptosis, 30 µg/ml) y Helenalina (IC₅₀ correspondiente). En la parte superior se encuentran las tres líneas tumorales evaluadas.

3, y de establecer el porcentaje de células que son positivas a esta caspasa, se procedió a cuantificar el porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa mediante su inmunodetección por citometría de flujo (FACS) en las tres líneas tumorales tratadas con sus respectivas concentraciones de IC₅₀ de Helenalina por 24 horas (**Figura 13**).

Tabla 6. Porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA- MB-231, tratadas con las IC₅₀ de Helenalina correspondientes.

Línea celular	Control	DMSO	Camptotecina	Helenalina (IC ₅₀)
SK-LU-1	1.08	1.6%	32.8%	6.32%
CaSki	1.94%	2.82%	35.7%	6.3%
MDA-MB-231	1.94%	4.02%	45.5%	22.8%

Los resultados obtenidos muestran que la Helenalina incrementa el número de células positivas a caspasa 3 activa en un 6.32%, 6.3% y 22.8% para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 respectivamente. Estos resultados indican que la Helenalina induce la activación de la caspasa 3 de forma dosis dependiente, sin embargo, este efecto es significativo solo a la concentración de 1.05 µg/ml (IC₅₀ para la línea tumoral MDA-MB-231), siendo el efecto similar al observado con el control positivo a apoptosis (Camptotecina), a diferencia del control y el DMSO que presentan valores basales (**Tabla 6**). Estos resultados en conjunto con los anteriores indican que la Helenalina disminuye el número celular mediante la inducción de una muerte celular apoptótica dependiente de caspasa 3 activa, de forma significativa en la línea tumoral MDA-MB-231, pero no en las líneas tumorales SK-LU-1 y CaSki donde la Helenalina induce la disminución del número celular por un proceso apoptótico que no es dependiente de caspasa 3 activa, ya que el proceso apoptótico puede darse mediante la activación de otras caspasas efectoras como la 6 o 7, por lo que resultaría de interés evaluarlas en un futuro trabajo.

Actividad antiproliferativa de la Helenalina en linfocitos humanos

Una vez establecido que la Helenalina tiene actividad antiproliferativa y apoptótica en cultivos de células tumorales, fue necesario establecer si este compuesto posee selectividad, otra característica buscada en los compuestos antitumorales. Con este propósito se procedió a determinar si la Helenalina afecta la proliferación de células no tumorales, específicamente en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. Para ello se realizaron cultivos de linfocitos humanos los cuales fueron activados con Fitohemaglutinina (PHA) y se trataron con las IC_{50} de Helenalina determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 por 24 horas. Para determinar si la Helenalina posee actividad antiproliferativa sobre cultivos de linfocitos humanos se utilizó la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CFSE) y las células en proliferación fueron cuantificadas por citometría de flujo (FACS) (Figura 14).

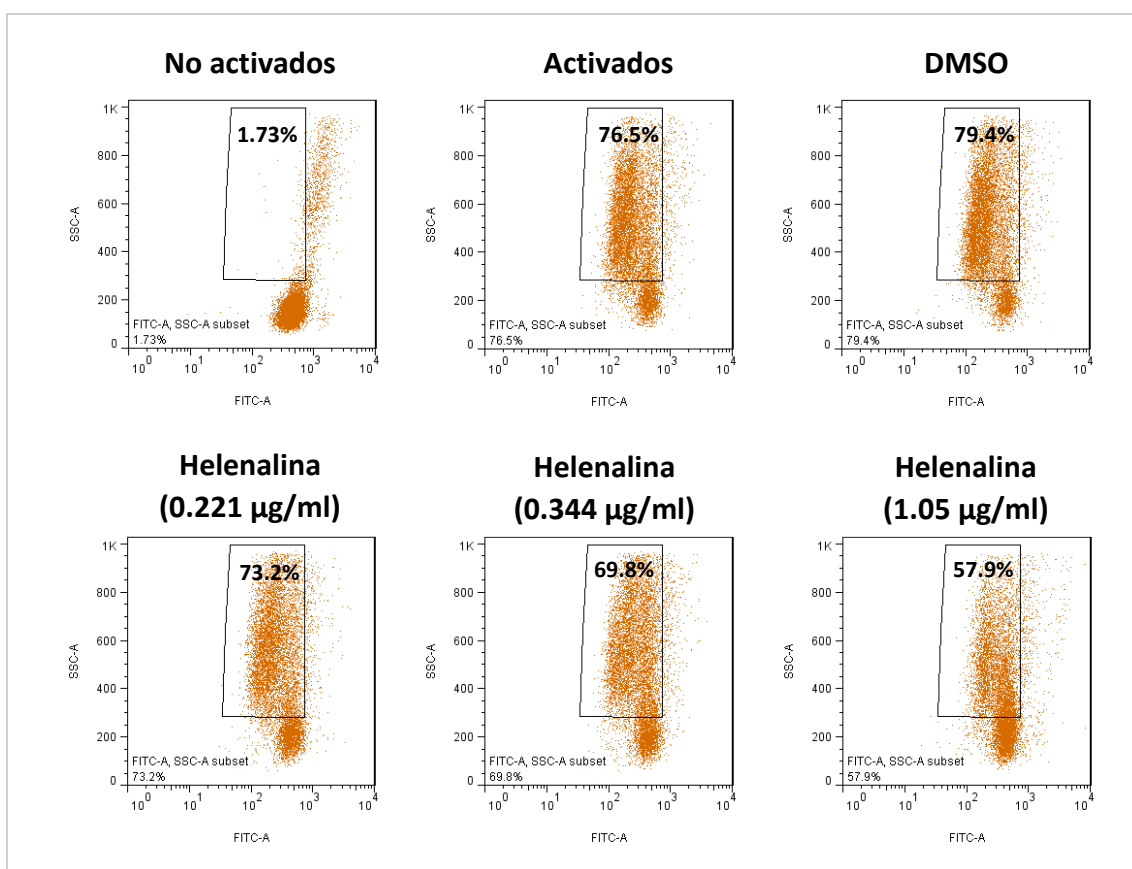


Figura 14. Efecto de la Helenalina sobre la proliferación de linfocitos humanos. Las células fueron marcadas con carboxifluoresceína (CFSE), activadas con fitohemaglutinina (PHA) y tratadas con las IC_{50} determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 por 24 horas. Las células en proliferación fueron cuantificadas por citometría de flujo, considerando al control como el 100% de proliferación en el cultivo. Las condiciones experimentales son: No activados (linfocitos sin PHA y con CFSE), Activados (control testigo: linfocitos con PHA y CFSE; 100% de proliferación), DMSO (control vehículo, <math><0.05 \mu\text{l/ml}</math>) y las concentraciones de IC_{50} determinadas para las tres líneas tumorales: 0.221 $\mu\text{g/ml}$, 0.344 $\mu\text{g/ml}$ y 1.05 $\mu\text{g/ml}$., respectivamente.

Los resultados muestran que la Helenalina afecta la proliferación de los linfocitos de manera dosis dependiente, ya que se observa una disminución en el número de células en proliferación, conforme se incrementa la concentración del compuesto. No obstante, este efecto resulta casi nulo a las concentraciones de 0.221 $\mu\text{g/ml}$ y 0.344 $\mu\text{g/ml}$, ya que poseen porcentajes similares al control (Activados), cuyo porcentaje se consideró como el 100% de proliferación en el cultivo. Por otro lado, la Helenalina afecta la proliferación de linfocitos humanos a la concentración de 1.05 $\mu\text{g/ml}$ en un 24.32% (Tabla 7). Esto sugiere que la Helenalina podría poseer selectividad en

la actividad antiproliferativa de células tumorales con concentraciones iguales o menores a 0.344 $\mu\text{g/ml}$, como las IC_{50} determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1 y CaSki, pero no a concentraciones iguales o mayores a 1.05 $\mu\text{g/ml}$, como la IC_{50} determinada para la línea tumoral MDA-MB-231.

Tabla 7. Porcentaje de linfocitos en proliferación a las concentraciones de IC_{50} determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA- MB-231, con respecto al control (100% de proliferación).

Linfocitos	Control	DMSO	Helenalina (IC_{50})		
			0.221 $\mu\text{g/ml}$	0.344 $\mu\text{g/ml}$	1.05 $\mu\text{g/ml}$
% de linfocitos en proliferación	100%	100%	95.6%	91.24%	75.68%

Actividad necrótica de la Helenalina en linfocitos humanos

Tomando en consideración que la Helenalina afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos, se procedió a determinar si el mecanismo por el que la Helenalina genera tal efecto es mediante la inducción de una muerte celular necrótica. Para ello se realizó la detección de la actividad de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos humanos. La LDH fue considerada un marcador de muerte celular necrótica ya que su liberación al medio extracelular indica una pérdida de integridad de la membrana plasmática. Al respecto, los cultivos de linfocitos humanos fueron tratados con las concentraciones de IC₅₀ de Helenalina determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 durante 24 horas y el porcentaje de actividad de LDH se determinó en comparación con el control positivo a necrosis (Tritón X-100 al 10%) utilizando el Kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity (**Figura 15**).

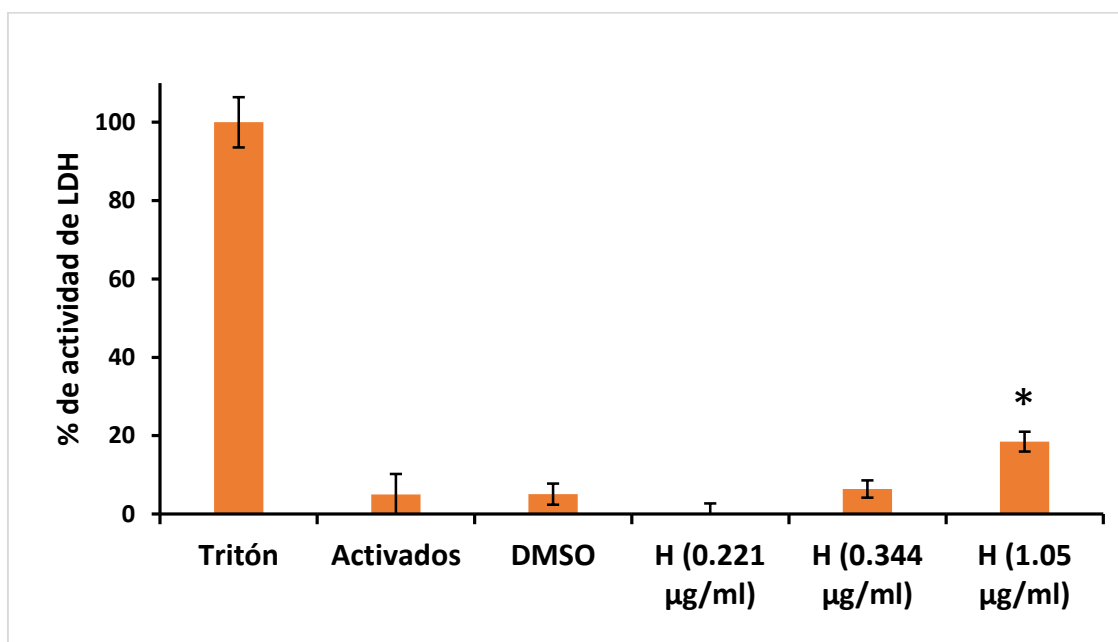


Figura 15. Actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos humanos tratados con las IC₅₀ de Helenalina determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 por 24 horas. Los datos mostrados son resultado de 3 ensayos independientes con 4 repeticiones por condición, y fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control (activados)).

Los resultados muestran que los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos humanos tratados con las IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 presentan un incremento en la actividad de la LDH del 0.08%, 6.39% y 18.45% respectivamente (**Tabla 8**). Al aplicar la prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$ vs control) se encontró que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de actividad de LDH de las concentraciones de 0.221 µg/ml y 0.344 µg/ml de Helenalina, con respecto al control y el DMSO. Sin embargo, el porcentaje de actividad de LDH de la concentración de 1.05 µg/ml de Helenalina si es estadísticamente diferente. Esto sugiere que con concentraciones iguales o menores a 0.344 µg/ml de Helenalina, como las IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1 y CaSki, la Helenalina no induce la liberación de la LDH al medio extracelular y por lo tanto los linfocitos no pierden la integridad de su membrana, pero a concentraciones iguales o mayores a 1.05

µg/ml, como la IC₅₀ determinada para la línea tumoral MDA-MB-231, la Helenalina si induce la liberación de la enzima, siendo capaz de inducir una muerte celular necrótica en un 18.45%.

Tabla 8. Porcentaje y desviación estándar de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos humanos tratados con las IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA- MB-231 con respecto al control positivo necrótico (Tritón X-100).

Tritón X-100	Activados (Control)	DMSO	SK-LU-1 0.221 µg/ml	CaSki 0.344 µg/ml	MDA-MB-231 1.05 µg/ml
100% ± 6.41	4.97% ± 5.28	5.08% ± 2.73	0.08% ± 2.62	6.39% ± 2.16	18.45% ± 2.53

Aunque estos resultados muestran que la Helenalina afecta el potencial proliferativo mediante la inducción de una muerte celular necrótica a la concentración de 1.05 µg/ml, el porcentaje obtenido no explica en su totalidad cómo es que la Helenalina afecta el potencial proliferativo de estas células, por lo que la Helenalina podría inducir este efecto por un mecanismo adicional como un proceso apoptótico o el arresto en alguna fase del ciclo celular.

Discusión de resultados

Actualmente la mayoría de los quimioterapéuticos suelen ser fuertemente necróticos en los pacientes (**American Cancer Society, 2019**), por lo que uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer es la búsqueda de nuevos compuestos que tengan efectos secundarios mínimos, además otra de las características buscadas en un quimioterapéutico es que este actúe selectivamente sobre las células tumorales sin dañar a las células normales (**Mann, 2002**). Por esta razón se continúa con la investigación de la actividad antitumoral de diversos compuestos de origen natural entre los que figuran las lactonas sesquiterpénicas (LS) por la variedad de actividades biológicas que presentan (**Lee et al., 1971**).

Con ese propósito, en el presente estudio se demostró que la lactona sesquiterpénica Helenalina posee actividad antiproliferativa dependiente de la dosis en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 con concentraciones de IC₅₀ de 0.84 μM, 1.31 μM y 4.02 μM, respectivamente. Estos resultados son relevantes ya que existen pocos trabajos que evalúen el efecto antiproliferativo de la Helenalina en líneas de cáncer de pulmón, cervicouterino y mama, ya que la mayoría de los estudios reportan su actividad antiproliferativa sobre líneas tumorales de leucemia. Esta reportado que la Helenalina posee actividad antiproliferativa dependiente de la dosis sobre la línea tumoral THP-1 de leucemia monocítica aguda con una IC₅₀ de 1.08 μM (**Zwicker et al., 2017**), igualmente sobre la línea tumoral Jurkat de leucemia aguda de células T con una IC₅₀ de 1.16 μM (**Zwicker et al., 2017**) y 6 μM (**Dirsch et al., 2001**), y sobre la línea tumoral HL-60 de leucemia promielocítica con una IC₅₀ de 15 μM (**Liu et al., 2019**). En cuanto al efecto antiproliferativo que la Helenalina posee sobre cultivos de células de tumores sólidos, esta reportado que posee actividad antiproliferativa sobre la línea tumoral EN2 de ascitis de Ehrlich (EAC) con una IC₅₀ de 0.39 μM (**Beekman et al., 1997**), de igual forma sobre la línea tumoral HEp-2 de carcinoma laríngeo con una IC₅₀ de 0.68 μM (**Lee et al., 1971**) y sobre la línea tumoral KB de carcinoma nasofaríngeo con una IC₅₀ de 0.76 μM (**Fernandes et al., 2008**).

Así, los valores de IC₅₀ reportados en este estudio demuestran que la Helenalina disminuye la proliferación de líneas tumorales de cáncer de pulmón, cervicouterino y mama con un efecto similar al reportado en líneas tumorales de cáncer de EAC, laríngeo, nasofaríngeo y leucemias, lo que manifiesta que el compuesto actúe con bajas concentraciones de IC₅₀, las cuales en su mayoría no son mayores a 2 μM, a diferencia de otras lactonas sesquiterpénicas de tipo pseudoguayanólido que han sido probadas en líneas tumorales pertenecientes a los tipos de cáncer aquí estudiados. Para cáncer de pulmón, se ha reportado que P16 (análogo semisintético de Partenina) posee una IC₅₀ de 4 μM para la línea tumoral A549 (**Goswami et al., 2014**) y que la Hymenina posee una IC₅₀ de 7.66 μM para la línea tumoral SK-LU-1 (**Álvarez, 2019**), mientras que la Helenalina posee una IC₅₀ de 0.84 μM para la línea tumoral SK-LU-1. Para cáncer cervicouterino se ha reportado que P16 y P19 (análogos semisintéticos de Partenina) poseen una IC₅₀ de 7 μM y 12 μM en células HeLa, respectivamente (**Goswami et al., 2014; Kumar et al., 2011**), también esta reportado que en la línea tumoral HeLa los pseudoguayanólidos Bigelovina, Aromaticina, Ergolide y Carpesiolina poseen unas IC₅₀ de 5.5 μM, 16.3 μM, 35.8 μM, y >50 μM, respectivamente (**Cheng et al., 2012**) y que la Hymenina posee una IC₅₀ de 8.65 μM para la línea tumoral CaSki (**Álvarez, 2019**), mientras que la Helenalina posee una IC₅₀ de 1.31 μM para la línea tumoral CaSki. Por último, para cáncer de mama se ha reportado que P19 (análogo semisintético de Partenina) posee una IC₅₀ de 5 μM para la línea tumoral MCF-7 (**Kumar et al., 2011**), también se ha reportado que para las líneas tumorales MCF-10A, MCF-7, JIMT-1 y HCC1937 los pseudoguayanólidos Coronopilina, Damsina, Ambrosina y Dindol-01 poseen unas IC₅₀ con rangos de 5.5 a 16 μM, 3.3 a 8.1 μM, 1.4 a 4.1 μM y 15 a 37 μM, respectivamente (**Soria**

et al., 2017) y que la Hymenina posee una IC₅₀ de 8.88 μM para la línea tumoral MDA-MB-231 (Álvarez, 2019), mientras que la Helenalina posee una IC₅₀ de 4.02 μM.

El hecho de que la Helenalina posea concentraciones de IC₅₀ más bajas en comparación con otras lactonas sesquiterpénicas de tipo pseudoguayanólido en líneas tumorales pertenecientes a cáncer de pulmón, cervicouterino y mama, puede deberse a que la Helenalina es una lactona sesquiterpénica bifuncional, es decir, que posee dos centros alquilantes, el grupo αMγL y una ciclopentanona α, β-insaturada (Beekman *et al.*, 1997), y dado que está demostrado que es el número y tipo de centros alquilantes lo más importante para la actividad antitumoral de las lactonas sesquiterpénicas (Ghantous *et al.*, 2010), es posible que la Helenalina sea capaz de reaccionar con dos agentes nucleófilos a la vez, mediante una adición rápida de tipo Michael en la que se dé la alquilación de los grupos tioles presentes en factores de transcripción y enzimas (Ruiz y Suarez, 2015), ejerciendo así su actividad antiproliferativa con concentraciones menores.

En cuanto al mecanismo por el que la Helenalina disminuye el número celular, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la Helenalina no induce un proceso de muerte celular necrótica en líneas tumorales de cáncer de pulmón, cervicouterino y mama, ya que el porcentaje máximo de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH; considerado como un marcador de necrosis) encontrado en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con Helenalina fue de 3.24%, porcentaje que no es estadísticamente diferente al encontrado en los cultivos sin Helenalina o con DMSO, compuesto en el que se disolvió la Helenalina, y por lo tanto se considera como un porcentaje de necrosis basal. Estos resultados son relevantes en primer lugar ya que existen pocos estudios que evalúen el efecto inductor de necrosis de la Helenalina en células tumorales, sin embargo, resultan aún más relevantes ya que le atribuyen a la Helenalina una de las características buscadas actualmente en los quimioterapéuticos, esperando que no genere efectos secundarios asociados con una muerte necrótica al ser administrada *in vivo*, como la activación de una respuesta inflamatoria (Mann, 2002; Rock & Kono, 2008).

Otra de las características buscadas en los quimioterapéuticos es la inducción de una muerte apoptótica, dado que la desregulación de este proceso se ve implicada en el desarrollo de las células tumorales (Kaufmann & Earnshaw, 2000). En ese sentido, se ha demostrado que las LS son capaces de inducir apoptosis con concentraciones micromolares en distintos tipos de células tumorales (Zhang *et al.*, 2005) y nuestros resultados muestran que la Helenalina no es la excepción, ya que induce características morfológicas propias de este tipo de muerte celular en las líneas tumorales de cáncer de pulmón, cervicouterino y mama, como la contracción celular, la formación de cuerpos apoptóticos, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. Sin embargo, al cuantificar las células que son positivas a caspasa 3 activa, una caspasa efectora de muerte celular apoptótica, se encontró que la Helenalina induce significativamente una muerte apoptótica dependiente de caspasa 3 activa, solo a la concentración de IC₅₀ de 4.02 μM para la línea tumoral MDA-MB-231 de cáncer de mama en un 22.8%, mientras que para las líneas tumorales de cáncer de pulmón y mama los porcentajes de activación fueron de 6.32% y 6.3%, respectivamente, sugiriendo que para estas líneas la Helenalina induce un proceso de muerte celular apoptótico que no es dependiente de caspasa 3 activa.

Estos resultados confirman el efecto inductor de apoptosis por la Helenalina, ya que está reportado que esta lactona sesquiterpénica induce apoptosis en células de leucemia Jurkat T al permitir la liberación del citocromo c mediante la disminución del potencial de membrana mitocondrial que no se ve afectado por las proteínas antiapoptóticas Bcl-x y Bcl-2 (Dirsch *et al.*, 2001), de igual forma está reportado para células Jurkat T que la Helenalina induce una apoptosis vía intrínseca mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zwicker

et al., 2017). La Helenalina también induce una apoptosis en células tumorales renales Caki mediante la producción de ROS, que no se ve afectada por la sobreexpresión de Bcl-2 (**Jang et al., 2013**) y también induce una apoptosis vía intrínseca en PBMC mediante la generación de ROS, los cuales inducen una despolarización de la membrana mitocondrial que permite la liberación de AIF mitocondrial, lo cual genera la acumulación citoplasmática de p53 y la activación de la caspasa 9, lo que desencadena todo el proceso apoptótico (**Berges et al., 2019**).

Nuestros resultados son relevantes ya que existen pocos estudios que demuestren que la Helenalina induce la activación de la caspasa 3. Por otro lado, el hecho de que la Helenalina no active la caspasa 3 en las líneas tumorales de cáncer de pulmón y cervicouterino, puede deberse a que sus concentraciones de IC₅₀ son menores a la utilizada en la línea de cáncer de mama, o a la activación de otras caspasas efectoras, ya que el proceso apoptótico puede darse mediante la activación de otras caspasas efectoras como la 6 o 7 (**Lizarbe, 2007**). Otra explicación posible es que la Helenalina induce un proceso de muerte celular adicional en estas líneas tumorales, como la autofagia, ya que se ha reportado que la Helenalina es capaz de aumentar los niveles de caspasas 3 y 9 cortadas y al mismo tiempo aumentar los niveles de Atg12 y LC3-B (biomarcadores indicativos de muerte celular autofágica) de forma dependiente de la dosis, en la línea tumoral A2780 de cáncer de ovario (**Lim et al., 2012**).

La selectividad es actualmente la característica más importante buscada en un quimioterapéutico, ya que se espera que el fármaco sea capaz de matar a las células tumorales sin dañar a las células normales (**Ortega, 2002**). Tomando como modelo de células normales a linfocitos de sangre periférica humana, nuestros resultados muestran que la Helenalina no afecta la proliferación de estas células a las concentraciones de IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales de cáncer de pulmón (0.84 μ M) y cervicouterino (1.31 μ M), sugiriendo que la Helenalina se de acción selectiva en estos dos tipos de cáncer. Sin embargo, con la concentración de IC₅₀ determinada para la línea tumoral de cáncer de mama (4.02 μ M), la Helenalina si afecta significativamente el potencial proliferativo hasta en un 24.32%. Tomando esto en cuenta se determinó si la Helenalina induce tal efecto mediante una muerte necrótica, encontrando que a la concentración de 4.02 μ M, la Helenalina induce actividad necrótica hasta en un 18.45%, sugiriendo que la Helenalina además de no ser selectiva, induce una muerte necrótica en linfocitos en la actividad antitumoral para cáncer de mama. El efecto negativo que tuvo la Helenalina sobre la proliferación de linfocitos humanos a la concentración de IC₅₀ determinada para cáncer de mama, puede deberse a sus propiedades antiinflamatorias ya que esta reportado que actúa como un inmunosupresor que afecta la proliferación de células T CD4+ humanas sobreactivadas en enfermedades autoinmunes o respuestas inflamatorias (**Berges et al., 2019**) de igual forma induce una disminución en la secreción de diferentes citoquinas por PBMC que conduce a su inmunosupresión (**Zwicker et al., 2017**) y mediante la inhibición del factor de transcripción NF- κ B, inhibe la transcripción de citoquinas inflamatorias, lo que resulta en una disminución del reclutamiento de células T y B (**Lyss et al., 1998**).

No obstante, los resultados obtenidos demuestran que la Helenalina posee una aceptable selectividad, inclusive a la concentración de IC₅₀ determinada para cáncer de mama, si se le compara con otras lactonas sesquiterpénicas, ya que estas no son generalmente consideradas como potenciales agentes antitumorales por su acción no selectiva (**Ren et al., 2016**), tal es el caso del pseudoguayanólido Partenina que ha demostrado afectar a leucocitos humanos *in vitro* y a eritrocitos policromáticos de ratones *in vivo* (**Vaidya et al., 1978**). Incluso, se ha reportado que el pseudoguayanólido Hymenina afecta la proliferación de linfocitos humanos hasta en un 57.8% a las concentraciones de IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y

MDA-MB-231 (**Álvarez, 2019**), mientras que la Helenalina solo la afecta hasta en un 24.32% a las concentraciones de IC_{50} determinadas para las mismas líneas tumorales. En cuanto a su efecto inductor de necrosis en linfocitos humanos, este resulta ser casi nulo o con un porcentaje relativamente bajo a la concentración de IC_{50} más alta aquí determinada, lo que no explica en su totalidad su efecto antiproliferativo en estas células, siendo necesario determinar si la Helenalina afecta la proliferación de los linfocitos por un mecanismo adicional, como un proceso apoptótico o el arresto en alguna fase del ciclo celular.

Tomando en consideración los resultados aquí expuestos, se demuestra que la Helenalina es una lactona sesquiterpénica con un gran potencial como agente quimioterapéutico, ya que afecta la proliferación, no induce una muerte necrótica e induce una muerte apoptótica en células de cáncer de pulmón, cervicouterino y mama, además de poseer una aceptable acción selectiva, lo que la hace un buen candidato para ser evaluado en modelos *in vivo* o para servir como una molécula madre para la generación de análogos que mejoren sus propiedades antitumorales.

Conclusiones

- La Helenalina posee actividad antiproliferativa de manera dosis dependiente en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, con concentraciones de IC₅₀ de 0.221 µg/ml, 0.344 µg/ml y 1.05 µg/ml, respectivamente.
- La Helenalina no induce un proceso de muerte celular necrótica a las concentraciones de IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231.
- La Helenalina induce características morfológicas de un proceso de muerte celular apoptótica a las concentraciones de IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, y la presencia de caspasa 3 activa a la concentración de IC₅₀ determinada para la línea tumoral MDA-MB-231 (1.05 µg/ml).
- La Helenalina afecta la proliferación de linfocitos humanos de manera dosis dependiente, siendo este efecto casi nulo a las concentraciones de IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1 (0.221 µg/ml) y Caski (0.344 µg/ml).
- La Helenalina no induce un proceso de muerte celular necrótica en linfocitos humanos a las concentraciones de IC₅₀ determinadas para las líneas tumorales SK-LU-1 (0.221 µg/ml) y Caski (0.344 µg/ml).

Referencias

1. AECC (2019) *Tratamientos contra el cáncer*. Recuperado el 22 de Agosto del 2019 de Asociación Española Contra el Cáncer, Sitio web: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tratamientos>
2. Acosta-Reynoso, I. M., Remón-Rodríguez, L., Segura-Peña, R., Ramírez-Ramírez, G. & Carralero-Rivas, A. (2016) *Factores de riesgo en el cáncer de pulmón*. Res. CCM., 20 (1): 42-55.
3. Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, j., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008) *Biología molecular de la célula (5ª edición)*. Barcelona, España: Ediciones Omega.
4. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2011) *Introducción a la biología celular (3ª edición)*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
5. ATCC (2020) *CaSki (ATCC® CRL-1550™)*. Recuperado el 26 de Enero del 2020 de ATCC, Sitio web: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1550.aspx>
6. ATCC (2020) *MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)*. Recuperado el 26 de Enero del 2020 de ATCC, Sitio web: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>
7. ATCC (2020) *SK-LU-1 (ATCC® HTB-57™)*. Recuperado el 26 de Enero del 2020 de ATCC, Sitio web: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-57.aspx>
8. Álvarez-Lara, D. V. (2019) *Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la lactona sesquiterpénica pseudoguayanólida Hymenina en las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 (Tesis de licenciatura)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Ciudad de México, México.
9. American Cancer Society (2019) *Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia*. Recuperado el 4 de mayo del 2019 de American Cancer Society, Sitio web: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>
10. American Cancer Society (2019). *Cáncer*. Recuperado el 22 de agosto del 2019 de American Cancer Society, Sitio web: <https://www.cancer.org/es.html>
11. Amorín-Kajatt, E. (2013) *Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas*. Rev. Perú Med. Exp. Salud pública, 30 (1): 85-92.
12. Barrera, P. A., Jimenez-Ortiz, V., Tonn, C., Giordano, O., Galanti, N., & Sosa, M. A. (2008). *Natural sesquiterpene lactones are active against Leishmania mexicana*. J. Parasitol. Res., 94 (5): 1143–1149.
13. Beekman, A. C., Woerdenbag, H. J., van Uden, W., Pras, N., Konings, A. W., Wikström, H. V. & Schmidt, T. J. (1997) *Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones*. J. Nat. Prod., 60 (3): 252-257.
14. Becker, W. M., Kleinsmith, L. J. & Hardin, J. (2007) *El mundo de la célula (6ª edición)*. Madrid, España: Pearson Educación.
15. Berges, C., Fuchs, D., Opelz, G., Daniel, V., & Naujokat, C. (2009). *Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms*. Mol. Immunol., 46 (15): 2892–2901.
16. Berek-Jonathan, S. & Hacker-Neville, F. (2005) *Ginecología oncológica práctica (4ª edición)*. México: Mc Graw Hill.
17. Blagosklonny, M. V. & Pardee, A. B. (2002) *The Restriction Point of the cell Cycle*. Cell Cycle, 1 (2): 103-110.

18. Boulanger, D., Brouillette, E., Jaspar, F., Malouin, F., Mainil, J., Bureau, F., & Lekeux, P. (2007). *Helénalin reduces Staphylococcus aureus infection in vitro and in vivo*. *Vet. Microbiol.*, 119(2-4): 330–338.
19. Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L. & Loranger-Merciris, G. (2012) *Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review*. *Environ. Chem. Lett.*, 10: 325–347.
20. Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, R. A., Bastow, K. F., Wu, C. C. & Lee, K. H. (2005) *Cytotoxic activity of some natural and synthetic sesquiterpene lactones*. *Planta. Med.*, 71 (12): 1176-1178.
21. Büchele, B., Zugmaier, W., Lunov, O., Syrovets, T., Merfort, I., & Simmet, T. (2010). *Surface plasmon resonance analysis of nuclear factor- κ B protein interactions with the sesquiterpene lactone helenalin*. *Anal. Biochem.*, 401 (1): 30–37.
22. Burgues-Gasion, J. P., Pontones-moreno, J. L., Vera-Danoso, C. D., Jimenez-Cruz, J. F. & Ozonas-Moragues, M. (2005) *Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga*. *Actas Urol. Esp.*, 29 (9):846-859.
23. Carretero, M. E. & Ortega, T. (2015) *Flores de Arnica montana: interés terapéutico*. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado el 22 de Diciembre del 2019, Sitio web: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2016/8/11/101363.pdf>
24. Castañeda-Gameros, P. & Eljore-Téllez, J. (2016) *El cáncer de piel, un problema actual*. *Rev. Fac. Med. (Méx.)*, 59 (2): 6-14.
25. Cañigüeral-folcara, S. & Vanaclocha, B. (2003) *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. Barcelona: Masson.
26. Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F. & Wagstaff, C. (2013) *Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People*. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 12780-12805
27. Chavaro-Vicuña, N., Arroyo-Hernández, G., Alcázar, L. F., Muruchi-Garrón, G. W. & Pérez-Zúñiga, I. (2009) *Cáncer cervicouterino*. *Anal. Radiol. Mex.*, 1: 61-79.
28. Cheng, X. R., Li, W. W., Ren, J., Zeng, Q., Zhang, S. D., Shen, Y. H., Yan, S. K., Ye, J., Jin, H. Z. & Zhang, W. D. (2012). *Sesquiterpene Lactones from Inula hookeri*. *Planta Med.*, 78 (05): 465–471.
29. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2014) *La célula (6ª edición)*. Madrid, España: Marbán.
30. Desai, A. G., Qazi, Q. N., Ganju, R. K., Tamer, M. E., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C. & Bhat, H. K. (2008) *Medicinal plants and cancer chemoprevention*. *Curr. Drug. Metab.*, 9 (7): 581-591.
31. Dirsch, V. M., Stuppner, H. & Vollmar, A. M. (2001) *Helénalin triggers a CD95 death receptor independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-xL or Bcl-2*. *Cancer Res.*, 61: 5817–5823.
32. Dornelles-Prolla, C. M., Santos-da Silva, P., Oliveira-Netto, C. B., Gpldim, J. R. & Asthon-Prolla, P. (2015) *Conocimientos del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público*. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 23 (1): 90-97.
33. Fernandes, M. B., Scotti, M. T., Ferreira, M. J. & Emerenciano, V. P. (2008) *Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones*. *Europ. J. Med. Chem.*, 43: 2197-2205.
34. Fernandez, H. (2014) *Tabaco as a Risk Fact in Lung Cancer*. Escuela Universitaria de Enfermería: Cantabria.
35. Ferreiro, J., García, L., Barceló, R. & Rubio, I. (2003) *Quimioterapia: Efectos secundarios*. *Gac. Med. Bilbao.*, 100: 69-74.

36. François, G., & Passreiter, C. M. (2004). *Pseudoguaianolide sesquiterpene lactones with high activities against the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Phytother. Res.*, 18 (2): 184–186.
37. García, M & Vecino, E. (2003) *Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina*. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, 78 (7): 351-364
38. García-Piñeres, A. J., Castro, V., Mora, G., Schmidt, T. J., Strunck, E., Pahl, H. L., & Merfort, I. (2001). *Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones*. *J. Biol. Chem.*, 276 (43): 39713–39720.
39. Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N. A. & Darwiche, N. (2010) *What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?*. *Drug Discov. Today*, 15 (15): 668-678.
40. Ghasemali, S., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Tafsiri, E., Zarghami, N., Rahmati-Yamchi, M., Alizadeh, E., Barkhordari, A., Tozihi, M. & Kordi, S. (2013) *Inhibitory effects of β -Cyclodextrin-Helenalin complexes on H-TERT gene expression in the T47D breast cancer cell line - results of real time quantitative PCR*. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 14 (11): 6949-6953.
41. Ginsberg, M. S., Grewal, R. K. & Heelan, R. T. (2007) *Lung Cancer*. *Radiol. Clin. North-Am.*, 45: 21-43.
42. Goswami, A., Shah, B. A., Kumar, A., Rizvi, M. A., Kumar, S., Bhushan, S., Malik, F. A., Batra, N., Joshi, A. & Singh, J. (2014). *Antiproliferative potential of a novel parthenin analog P16 as evident by apoptosis accompanied by down-regulation of PI3K/AKT and ERK pathways in human acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells*. *Chem-Biol. Interact.*, 222: 60–67.
43. Hall, I. H., Lee, K. H., Starnes, C. O., Egebaly, S. A., Ibka, T., Wu Y. S., Kimura, T., & Haruna, M. (1978) *Antitumor agents XXX: Evaluation of alpha-methylene-gamma-lactone containing agents for inhibition of tumor growth, respiration, and nucleic acid synthesis*. *J. Pharm. Sci.*, 67: 1235–1239.
44. Hartwell, J. L. & Abbott, B. J. (1969) *Antineoplastic principles in plants: recent developments in the field*. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 7: 117-209.
45. Hausen, B. M., Herrmann, H. D., & Willuhn, G. (1978). *The sensitizing capacity of Compositae plants I. Occupational contact dermatitis from Arnica longifolia Eaton*. *Contact Dermatitis*, 4 (1): 3–10.
46. Herrmann, H., Willuhn, G., & Hausen, B. (1978). *Helenalinmethacrylate, a new pseudoguaianolide from the flowers of Arnica montana L. and the sensitizing capacity of their sesquiterpene lactones*. *Planta Med.*, 34 (07): 299–304.
47. Hoffmann, R., Schwarzenberg, K., Lopez-Anton, N., Rudy, A., Wanner, G., Dirsch, V. M. & Vollmar, A. M. (2011) *Helenalin bypasses Bcl-2-mediated cell death resistance by inhibiting NF- κ B and promoting reactive oxygen species generation*. *Biochem. Pharmacol.*, 82: 453-463.
48. Huang, P.-R., Yeh, Y.-M., & Wang, T.-C. V. (2005). *Potent inhibition of human telomerase by helenalin*. *Cancer Lett.*, 227 (2): 169–174.
49. Huicochea-Castellanos, S., González-Balboa, P., Tovar-Calderón, I. L., Olarte-Casas, M. A. & Vázquez-La Madrid, J. (2009) *Cáncer de mama*. *Anal. Radiol. Mex.*, 1: 117-126.
50. Instituto de Técnicas Avanzadas contra el Cáncer (2016) *Quimioterapia neoadyuvante, adyuvante y concomitante*. Recuperado el 29 de Octubre del 2019, Sitio web: <https://itaccancer.es/es/noticias/quimioterapia-neoadyuvante-adyuvante-y-concomitante-que-son/>
51. Jang, J. H., Iqbal, T., Min, K., Kim, S., Park, J.-W., Son, E.-I., Lee, T.-J. & Kwon, T. K. (2013). *Helenalin-induced apoptosis is dependent on production of reactive oxygen species and independent of induction of endoplasmic reticulum stress in renal cell carcinoma*. *Toxicol. in Vitro*, 27(2), 588–596.

52. Jimenez-Ortiz, V., Brengio, S. D., Giordano, O., Tonn, C., Sánchez, M., Burgos, M. H., & Sosa, M. A. (2005). *The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes*. J. Parasitol., 91 (1) 170–174.
53. Jordán, J. (2003) *Apoptosis: muerte celular programada*. OFFARM, 22 (6): 100-106.
54. Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). *Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy*. Exp. Cell Res., 256(1), 42–49.
55. Kim, S. H., Oh, S. M., & Kim, T. S. (2005). *Induction of human leukemia HL-60 cell differentiation via a PKC/ERK pathway by helenalin, a pseudoguaienolide sesquiterpene lactone*. Europ. J. Pharmacol., 511 (2-3): 89–97.
56. Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A, & Frenk, J. (2009) *Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante*. Salud publica Mex., 51 (2): 335-344.
57. Kordi, S., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., Mohammad-Rahmati, Y., Ghasemali, S. & Tozihi, M. (2016) *A comparison of the inhibitory effect of nanoencapsulated helenalin and free helenalin on telomerase gene expression in the breast cancer cell line, by real-time PCR*. Artif. Cell Nanomed. B., 44: 695-703.
58. Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989) *Quantification of cells cultured on 96-well plates*. Anal. Biochem., 182: 16-19.
59. Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S., Shah, B. A., Taneja, S. C., Pal, H. C., Wani, Z. A., Mondhe, D. M., Kaur, J. & Singh, J. (2011). *A novel parthenin analog exhibits anti-cancer activity: Activation of apoptotic signaling events through robust NO formation in human leukemia HL-60 cells*. Chem-Biol. Interact., 193 (3): 204–215.
60. Kupchan, S. M., Eakin, M. A. & Thomas, A. M. (1971) *Tumor inhibitors. 69. Structure-Citotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones*. J. Med. Chem., 14 (12): 1147-1152.
61. Lagunas-Cruz, M. C., Valle-Mendiola, A. & Soto-Cruz, I. (2014) *Ciclo celular: mecanismos de regulación*. VERTIENTES Res., 17(2): 98-107
62. Lee, K. H., Huang, E. S., Piantadosi, C., Pagano, J. S. & Geissman, T. A. (1971) *Cytotoxicity of sesquiterpene lactones*. Cancer Res., 31: 1649–1654.
63. León-Cruz, G. & Faxas, M. E. (2004) *Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia*. Rev. Cubana Med., 43 (1): 1-8.
64. Lim, C. B., Fu, P. Y., Ky, N., Zhu, H. S., Feng, X. L., Li, J., Srinivasan, K. G., Hamza, M. S. & Zhao, Y. (2012) *NF- κ B p65 repression by the sesquiterpene lactone, Helenalin, contributes to the induction of autophagy cell death*. BMC Complem. Altern. Med., 12 (93): 1-12.
65. Liu, J., Zhao, Y., Shi, Z. & Bai, Y. (2019) *Antitumor effects of helenalin in doxorubicin-resistant leukemia cells are mediated via mitochondrial mediated apoptosis, loss of mitochondrial membrane potential, inhibition of cell migration and invasion and downregulation of PI3-kinase/ AKT/m-TOR signalling pathway*. JBUON, 24 (5): 2068-2074.
66. Lizarbe-Iracheta, M. A. (2007) *El suicidio y la muerte celular*. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat, 101 (2): 1-33.
67. Lomanto-Díaz, L. D., Ortiz-Cala, O. L., Breton-Pinto, C. O., Gómez-Lizcano, A. I. & Mesa-Cornejo, V. M. (2003) *El ciclo celular*. MEDUNAV, 6(16): 21-29.
68. López-Marure, R. (2003) *La regulación del ciclo celular y el cáncer*. VERTIENTES Res., 6 (1): 40-44.
69. Lodish, H., Berk, A., Lawrence-Zipurski, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. E. (2005) *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
70. Lyß, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L. & Merfort, I. (1998) *The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65*. J. Biol. Chem., 273: 33508-16.

71. Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L., & Merfort, I. (1998) *The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65*. J. Biol. Chem., 73: 33508–33516.
72. Mann, J. (2002). *Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future*. Nat. Rev. Cancer, 2(2), 143–148.
73. Moctezuma-Velasco, C. R. & Patiño-Zarco, M. (2009) *Cáncer de pulmón*. Anal. Radiol. Mex., 1: 33-45.
74. NCI (2019). *Tipos de tratamiento*. Recuperado el 22 de Agosto del 2019 de National Cancer Institute, Sitio web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
75. Negrín-Morales, G. (2013) *Lactonas sesquiterpénicas de origen natural que inducen apoptosis y la activación de la vía MAPK en líneas celulares tumorales humanas (Tesis doctoral)*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Gran Canaria, España.
76. Nema, R., Khare, S., Jain, P., Pradhan, A., Gupta, A. & Singh, D. (2013) *Natural Products Potential and Scope for Modern Cancer Research*. Am. J. Plant Sci., 4: 1270-1277.
77. Orofino-Kreuger, M. R., Grootjans, S., Biavatti, M. W., Vandenabeele, P., & D'Herde, K. (2012). *Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment*. Anti-Cancer Drugs, 1.
78. Ortega-Camarillo, C., Díaz-Flores, M., Avalos-Rodríguez, A., Vergara-Onofre, M. & Rosales-Torres, A. M. (2001) *La apoptosis y su importancia biomédica*. Gac. Méd. Méx., 137 (6): 563-577.
79. Pan, E., Gorka, A. P., Alumasa, J. N., Slobodnick, C., Harinantenaina, L., Brodie, P. J., Roepe, P. D., Randrianaivo, R., Birkinshaw, C. & Kingston, D. G. (2011) *Pseudoguaianólidos antiplasmodiales y antiproliferativos de Athroisma proteiforme del bosque seco de Madagascar*. J. Nat. Prod., 74 (10): 2174-2180.
80. Picman, A. K. (1983). *Antifungal activity of helenin and isohelenin*. Biochem. Syst. Ecol., 11 (3): 183–186.
81. Picman, A. K. (1986) *Biological Activities of Sesquiterpene Lactones*. Biochem. Syst. Ecol., 14 (3): 255-281
82. Ramírez-Agudelo, M. D. & Rojas-López, M. (2010) *La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular*. IATREIA, 23 (2): 166-177.
83. Ren, Y., Yu, J. & Kinghorn, A. D. (2016) *Development of Anticancer Agents from Plant-derived Sesquiterpene Lactones*. Curr. Med. Chem., 23 (23): 2397–2420.
84. Reyes-Méndez, J. J. (2011) *La célula: evolución y desarrollo de los sistemas celulares*. México: Editorial ST. 1-31
85. Rock, K. L. & Kono, H. (2008) *The inflammatory response to cell death*. Annu. Rev. Pathol., 3: 99–126.
86. Rozas-Muñoz, E., Lepoittevin, J. P., Pujol, R. M., & Giménez-Arnau, A. (2012). *Allergic contact dermatitis to plants: Understanding the chemistry will help our diagnostic approach*. Actas Dermo-Sifiliográf., 103 (6): 456–477
87. Ruiz-Reyes, E. & Suarez, M. (2015) *Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas*. Rev. CENIC, Ciencias Biológicas, 46 (1): 9-24.
88. Sabira, S. Hafiz-Muhammad, A., Hafiz-Muhammad, I. N., Akhtar, N., Rehman, J. U. & Rehman, R. U. (2014) *Medicinal plants combating against cancer - a green anticancer approach*. Asian Pac. J. Cancer Prev., 15 (11): 4385-4394.
89. Salvatierra-Velázquez, A., Algar-Algar, F. J. & Cerezo-Madueño, F. (2005) *Manual de diagnóstico y terapéutica en neumología*. Madrid, España: ERGON.
90. Sánchez-Portela, J. R. & Verga-Tirado, B. (2011) *Cáncer de mama: ¿Es posible prevenirlo?*. Rev. Ciencias Médicas, 15 (1): 14-28.

91. Secretaría de Salud (2017) *Cáncer, tercera causa de muerte en México*. Recuperado el 4 de Mayo del 2019 de Secretaría de Salud, Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
92. Sifuentes-Álvarez, A., Castañeda-Martínez, L. Y., Lugo-Nevarés, M. & reyes-Romero, M. A. (2015) *Factores de riesgo asociados con el cáncer de mama en mujeres del estado de Durango, México*. Ginecol. Obstet. Mex., 83: 662-669.
93. Soimout, F. (2007) *Neoplasias. Definiciones. Nomenclatura. Características*. Recuperado el 26 de Noviembre del 2018, Sitio web: <https://lookaside.fbsbx.com/file/Neoplasia>
94. Soria-Sotillo, W., Villagomez, R., Smiljanic, S., Huang, X., Malakpour, A., Kempengren, S., Rodrigo, G., Almanza, G., Sterner, O. & Oredsson, S. (2017) *Anti-cancer stem cell activity of a sesquiterpene lactone isolated from Ambrosia arborescens and of a synthetic derivative*. PLoS ONE, 12 (9): 1-16.
95. Vaidya, V. G., Kulkarni, I. & Nagasampagi, B. A. (1978) *In Vitro and In Vivo cytogenetic Effects of Sesquiterpene Lactone Parthenin derived from parthniium hysterophorous Linn Indian*. J. Exp. Biol., 16: 1117-1118.
96. Vega-Avila, E., Velasco-Lezama, R. & Jimenez-Estrada, M. (2006) *Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión*. Bioquímica, 31 (3): 97-111.
97. Widen, J. C., Kempema, A. M., Baur, J. W., Skopec, H. M., Edwards, J. T., Brown, T. J., Brown, D. A., Meece, F. A. & Harki, D. A. (2018) *Helénalin analogues targeting NF-κB p65: thiol reactivity and cellular potency studies of varied electrophiles*. Chem MedChem, 13: 303-311.
98. Willuhn, G. (1981) *Neue Ergebnisse der Arnikaforschung*. Pharm. Unserer Zeit. 10: 1-7.
99. WordPress (2019) *Types of Chemotherapy Agents and Regimens*. Consultado el 29 de Octubre del 2019 de WordPress, Sitio web: <https://chemoth.com/>
100. Zaldívar-Lelo, G., Martín-molina, F., Sosa-Ferreira, C. F., Ávila-Morales, J., Lloret-Rivas, M., Román-Lara, M. & Vega-Malagon, G. (2012) *Cáncer de cervicouterino y virus del papiloma humano*. Rev Chil. Obstet. Ginecol., 77 (4): 315-321.
101. Zhang, S., Won, Y.-K., Ong, C.-N., & Shen, H.-M. (2005). *Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms*. Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents, 5(3), 239–249.
102. Zhang, Z., Xu, L. & Cheung, H. Y. (2014) *The inhibitory effect of helenalin on telomerase activity is attributed to the alkylation of the CYS445 residue: Evidence from QM/MM simulations*. J. Mol. Graph., 51: 97-103.
103. Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2001) *Current Concept in Cell Death*. Curr. Protocol. Cell Biol., 11 (1): 1-18.
104. Zwicker, P., Schultze, N., Niehs, S., Albrecht, D., Methling, K., Wurster, M., & Haertel, B. (2017). *Differential effects of Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone, on the proteome, metabolome and the oxidative stress response in several immune cell types*. Toxicol. in Vitro, 40: 45–54.

Apéndice

Preparación de reactivos

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab, MEX).....10.42 g

Bicarbonato de sodio (NAHCO₃) (Sigma, USA).....2.00 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino (SFB), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. El medio se mantiene almacenado a 4°C.

Desactivación del suero

Una botella de suero fetal bovino (SFB) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca en baño María a 57°C durante 30 minutos. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml para un mejor uso y manipulación.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Esta solución se utilizó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

Cloruro de sodio (Sigma, USA).....8.00 g

Cloruro de potasio (Sigma, USA).....0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (Sigma, USA).....2.16 g

Fosfato diácido de potasio (Sigma, USA).....0.20 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 1N y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se filtra por medio de filtros de membrana con diámetro de 42 µm, la solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² y a una temperatura de 120°C durante 20 minutos. La solución se mantiene almacenada a 4°C.

Verseno

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales SK-LU-1 y CaSki, las cuales se adhieren al fondo de la placa de cultivo, funcionando como un agente quelante que secuestra iones de calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺) de las uniones celulares.

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma, USA).....0.40 g

Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, USA).....	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, USA).....	0.40g
Tris base $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (Sigma, USA).....	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1 N y afora a 100 ml de agua bidestilada. Las solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/ cm² y a una temperatura de 120° durante 20 minutos, La solución se mantiene almacenada a 4°C.

Tripsina (0.05%)

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales MDA-MB-231, las cuales se adhieren al fondo de la placa de cultivo, cumpliendo una función similar al verseno. Se prepara al 0.05% en verseno en condiciones de esterilidad.

Solución de cristal violeta (0.1%)

Hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma, USA).....	1.98 g
Ácido fórmico (Sigma, USA).....	2.14 g
Cristal violeta (Sigma, USA).....	0.50 g

Previamente se prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2 y se preparan así 500 ml de cristal violeta al 0.1%.

Glutaraldehído (1.1%)

A 98.43 ml de agua bidestilada se le agregan 1.57 ml de glutaraldehído (70% v/v). La solución se mantiene almacenada a 4°C.

Ácido acético (10%)

A 90 ml de agua bidestilada se le agregan 10 ml de ácido acético (J. T. Baker).

Camptotecina

Se disuelven 5 mg de camptotecina en 1 ml de DMSO. La solución se mantiene almacenada a temperatura ambiente.

Paraformaldehído/Glutaraldehído

Se calientan 20 ml de PBS a baño María a 60°C y se agregan 0.8 g de paraformaldehído, una vez disuelto, se coloca la solución en hielo, y una vez fría la solución se agregan 0.8 ml de glutaraldehído. La solución se mantiene almacenada a 4°C.