



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en diferenciación celular y cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Laboratorio No. 6, 2do piso, UMIEZ

Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del Acetato
de Cacalol en líneas celulares de cáncer de cérvix

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Limón de la Rosa Nathaly Mónica

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández

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.

Science and everyday life cannot and should not be separated
-Rosalind Franklin

El presente trabajo fue realizado con apoyo de los proyectos CONACyT 258156, PAPIIT IN226420 y PAPIIT IN216718.

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de iniciar mi vida académica.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por proporcionarme las herramientas necesarias para desarrollar mis habilidades como científica.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por la paciencia brindada durante el tiempo que estuve bajo su mentoría y por su pasión por la ciencia que continúa inspirándome.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por incluirme en su equipo de trabajo, darme su confianza y acercarme al campo de la investigación.

Al Dr. Hugo López Muñoz, cuyas lecciones y consejos contribuyeron a este trabajo y mejoraron mi formación académica y personal.

Al Dr. Fernando Flores Guzmán, por ser una guía durante todo este trayecto y por el tiempo que invirtió en mi formación académica.

Al M. en C José Misael Vicente Hernández Vázquez, por su amabilidad y observaciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Dra. María de Lourdes Mora García, por el tiempo invertido en las observaciones y comentarios a este trabajo.

Dedicatorias

A mis padres, Mónica y Manuel porque siempre alentarme a perseguir mis sueños. Por su apoyo y cariño a lo largo de los años. Este logro es por y para ustedes. Los amo infinito.

A mi hermana, Karla, que, sin su buen sentido del humor y apoyo durante los años, mi trayecto universitario no hubiera sido tan divertido.

A Helena y Beatriz, por las risas y los momentos especiales que compartimos, porque fuimos y seguiremos siendo un increíble cancer-team. Gracias por hacer de este trayecto toda una aventura.

A mis compañeros de laboratorio, Braulio, Jorge, Uriel, Ulises, Fernando, Helena y Beatriz, porque fuimos un gran equipo.

A Fernando Flores porque sin sus consejos y pláticas, nada de esto hubiera sido posible. Me diste el empujón que necesitaba para encontrar mi camino en la ciencia, por eso y más, gracias.

Índice

1. Resumen	7
2. Marco teórico	8
2.1 Homeostasis celular	8
2.2 Cáncer	8
2.3 Ciclo celular	8
2.4 Muerte celular	10
2.5 Cáncer cervicouterino (CaCu)	13
2.6 Tratamientos	15
2.7 Compuestos de origen natural	16
2.8 Acetato de Cacalol (AC) por Acetilación	17
2.9 Antecedentes	18
4. Planteamiento del problema	19
5. Justificación	20
6. Hipótesis	21
7. Objetivos	22
8. Material y métodos	23
9. Resultados	29
9.1 Actividad antiproliferativa del AC en células tumorales (HeLa y CaSki).	29
9.2 Actividad necrótica del AC en células tumorales CaCu	30
9.3 Evaluación de la actividad apoptótica del AC por microscopía de fluorescencia e Inmunodetección de Caspasa-3 activa	31
9.4 Cuantificación de células positivas a la caspasa-3 activa por medio de citometría de flujo	34
9.5 Actividad antiproliferativa y necrótica del AC en cultivos de células linfocíticas humanas.	36
10. Discusión de resultados	39
11. Conclusiones	42
12. Referencias	43
13. Apéndice	47

1. Resumen

El cáncer es de las principales causas de muerte a nivel mundial y nacional, lo que lo convierte en un problema de salud pública. Para el término del 2019, el cáncer cérvicouterino (CaCu) ocupó el segundo lugar en muertes en el país. Esta enfermedad está altamente ligada a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) que se transmite vía sexual. Actualmente se cuentan con terapias para el tratamiento de esta patología pero resultan poco eficientes debido a los efectos secundarios en células con altas tasas de división celular, lo que disminuye la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, existe un fuerte interés en la implementación de compuestos de origen natural y sus derivados, debido a sus múltiples aplicaciones terapéuticas, en específico sus propiedades antitumorales. El Acetato de cacalol (AC) es un sesquiterpeno químicamente modificado cuyo precursor es el Cacalol, el cual posee actividad antiproliferativa y apoptótica en células de cáncer de mama. En el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del AC en células de CaCu (HeLa y CaSki). Los resultados indican que el compuesto afecta el potencial proliferativo de las células tumorales de una manera dosis dependiente, con una IC_{50} de 26.53 y 23.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La baja actividad de la enzima LDH determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares indica que a dichas concentraciones el compuesto no presenta actividad necrótica, sin embargo, si induce una morfología apoptótica en células tumorales; concluyendo que el AC elimina a las células tumorales mediante el proceso apoptótico. Además, las concentraciones de IC_{50} de AC obtenidas para los cultivos de células tumorales no afectaron el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas ni desencadenaron un proceso necrótico, estableciendo que el AC es un compuesto con actividad antiproliferativa en células tumorales, de baja o nula actividad necrótica en estas condiciones experimentales, inductor de muerte apoptótica y de acción selectiva. Por lo anterior, es un digno candidato para ser evaluado como un agente antitumoral con potencial terapéutico contra el cáncer cérvicouterino en modelos *in vivo*.

2. Marco teórico

2.1 Homeostasis celular

La célula es la unidad básica, funcional y estructural de todo organismo vivo, capaz de desarrollarse de forma autónoma (Cooper, 2009); contiene la maquinaria necesaria para llevar a cabo procesos esenciales como: proliferación, diferenciación, muerte o supervivencia (Alberts *et al.*, 2010). Dichos procesos celulares implican una serie de señales que están mediadas por la acción de moléculas de origen diverso, que bien pueden ser secretadas por células vecinas o la matriz extracelular (Alberts *et al.*, 2010). El mantenimiento de las propiedades básicas de una célula, como el medio interno en condiciones relativamente constantes, se conoce como homeostasis. Si las condiciones del medio interno son favorables, cada célula se mantiene viva y por lo tanto su aportación funcional es adecuada para el tejido del que forma parte. Sin embargo, las células pueden sufrir ciertas alteraciones que ponen en riesgo su supervivencia y depende del organismo restituir las condiciones necesarias para que las células puedan cumplir sus funciones. Si los mecanismos homeostáticos no son capaces de restablecer dichas condiciones, no es posible mantener un apropiado equilibrio entre procesos esenciales como proliferación y muerte celular, y por tanto se pueden originar una serie de enfermedades entre las cuáles se encuentra el cáncer.

2.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que es el resultado de la acumulación de mutaciones en el genoma de las células, así como de cambios epigenéticos, donde se ven afectadas las diversas funciones a nivel molecular, celular, tisular y sistémico, dando lugar a un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células (Pérez *et al.*, 2017; NIH, 2015). Se han identificado propiedades específicas que caracterizan una enfermedad neoplásica, estos llamados sellos distintivos (del inglés hallmarks) incluyen mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.3 Ciclo celular

Este proceso se caracteriza por el aumento del porcentaje de moléculas y orgánulos, duplicación del material genético, y la obtención de dos células hijas (Marure, 2003). Está formado por cuatro fases morfológicamente poco diferenciadas: G1, S, G2 y M (**Fig.1**). La fase G1 es un periodo de

crecimiento general y duplicación de organelos citoplasmáticos, resultado de la transcripción y traducción de genes. Durante este proceso existen puntos de control encargados de cerciorarse si las condiciones son aptas para la progresión del ciclo, el punto de control G_1/S es aquel donde la célula verifica que se han generado los factores de crecimiento, volumen celular y nutrientes necesarios para continuar a la síntesis de ADN (Muñoz, 2004), si la célula no obtiene las señales de aprobación del punto de control G_1 , puede activar los mecanismos de reparación para posteriormente progresar con el ciclo celular o enviar señales inductoras de muerte. En la fase S, la célula sintetiza una copia de todo su ADN, una vez que se dispone del ADN duplicado y hay una dotación extra completa del material genético. La célula entra en la fase G_2 , donde condensa y organiza el material genético y se prepara para la división celular. El punto de control G_2/M tiene como función el verificar la integridad del ADN, si se detecta algún error o daño, el ciclo será detenido brevemente para permitir que se realicen reparaciones, si el daño es irreparable la célula puede recibir señales para inducir una muerte celular programada; este mecanismo de autodestrucción asegura que el ADN dañado no se transmita a las células hijas y es importante para la prevención del cáncer. El siguiente paso es la fase M, donde además de tener lugar la mitosis, la célula reparte las dos copias de su material genético entre sus dos células hijas. Después de haber completado la fase M, se obtienen dos células (Vermeulen *et al.*, 2003).

El descontrol de este proceso puede dar lugar a una proliferación celular exacerbada, raíz de procesos originarios de cáncer (Muñoz, 2004). Sin embargo, la célula posee una serie de mecanismos conformados por proteínas y factores, que se encargan de detectar si ésta posee algún daño, y en caso de existir, tratan de repararlo. Si el daño es irreversible, la célula es guiada a un proceso de muerte celular denominado apoptosis.

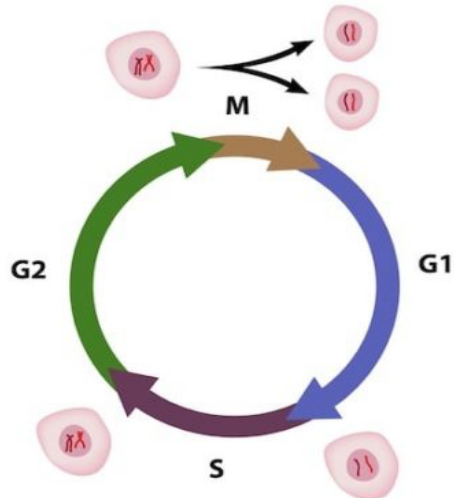


Fig. 1 Las fases del ciclo celular en células eucariotas (tomado de “The Cell Cycle” en University of Leicester)

2.4 Muerte celular

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo. Existen diferentes tipos de muerte celular, como la necrosis y apoptosis. Las células que presentan estos tipos de muerte muestran diferencias morfológicas y moleculares. La muerte por necrosis está asociada con el daño a los tejidos y al proceso inflamatorio, mientras que la apoptosis es un proceso inducido por señales y requiere la expresión de genes (Cáceres, 2003).

Necrosis

El término necrosis reúne procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas, se caracteriza por la pérdida de la regulación y función celular, que culmina en la lisis de la membrana celular y posterior liberación del contenido citoplasmático. Este último fenómeno conduce a las células vecinas hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, por lo que se origina una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (Jordán, 2003).

Apoptosis

La apoptosis es un proceso que ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, reconocido como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares en los tejidos. La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa en reacciones inmunes ante agentes nocivos o patógenos (Norbury y Hickson, 2001). Aunque existe una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células morirán necesariamente en respuesta al mismo estímulo. Durante un proceso apoptótico, se reconocen características morfológicas típicas como la condensación, el desarme de la envoltura nuclear y la fragmentación del ADN, así como la alteración de la superficie celular (Kerr *et al.*, 1972); al mostrar dichas cualidades facilitan que la célula sea fagocitada, ya sea por una célula vecina o por un macrófago, y permite que los componentes orgánicos de la célula muerta sean reciclados por la célula que la ingiere. Por lo anterior, la apoptosis es considerada como el tipo de muerte que se lleva a cabo de manera ordenada (Alberts *et al.*, 2010). Existen dos vías de activación de apoptosis:

Vía extrínseca

Mediada por la activación de receptores, como la unión de un ligando de muerte (FAS/TNF/TRAIL) a su receptor específico en la superficie celular (**Fig. 2**) La unión ligando-receptor recluta factores citosólicos, tales como FADD y caspasa 8, formando el complejo DISC. La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras como caspasa-8, la cual posteriormente activa a la caspasa efectora, caspasa-3 (Rojas *et al.*, 2009). La caspasa-8 puede también activar a un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 denominado Bid, el cual en su forma inactiva se encuentra en el citosol. Al ser activado, Bid-truncado (tBid) se transloca a la mitocondria y transduce las señales apoptóticas de la membrana citoplasmática a las mitocondrias (Li *et al.*, 1998). tBid induce la liberación de citocromo c y posteriormente la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (García, M & Vecino, E., 2003).

Vía intrínseca

Es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes, daño del ADN, ROS, etc. Es mediada en la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio

intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma (**Fig. 2**). El citocromo C juega un papel crucial al unirse y activar a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que funciona como mediador para la activación autocatalítica de caspasa 9, y ésta a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa 3 (Rojas *et al.*, 2009). La inactivación de esta vía es generalmente llevada a cabo como un sello del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

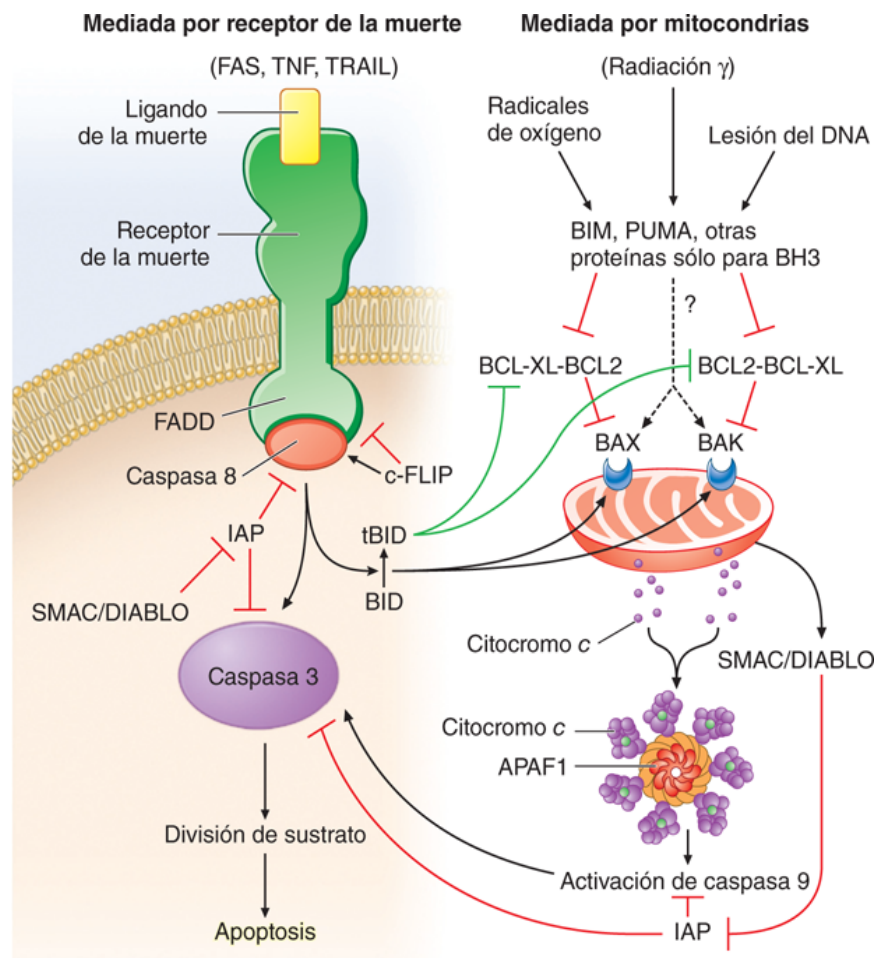


Fig. 2 Vías de activación de la apoptosis. Vía extrínseca mediada por receptores de muerte (izquierda). Vía intrínseca o mitocondrial mediada por estímulos celulares (derecha) (tomado y modificado de Longo y Cols: Principios de Medicina Interna)

2.5 Cáncer cervicouterino (CaCu)

El CaCu es un tipo de cáncer que se produce en las células del cuello del útero (**Fig.3**), principalmente en las células de la zona de transformación (ACS, 2018), donde coinciden el endocérvix y el exocérvix.

El CaCu se clasifica según el aspecto que presentan las regiones afectadas al ser observadas al microscopio. Los dos tipos más comunes de CaCu son el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma (Eifel *et al.*, 2011).

- Los carcinomas de células escamosas se originan de células en el exocérvix y las células cancerosas tienen características de las células escamosas cuando se observan al microscopio. Se originan con mayor frecuencia en la zona de transformación, sitio de unión del exocérvix y endocérvix (ACS, 2018).
- Los adenocarcinomas se originan a partir de células glandulares, particularmente en las glándulas productoras de mucosidad del endocérvix (ACS, 2018).

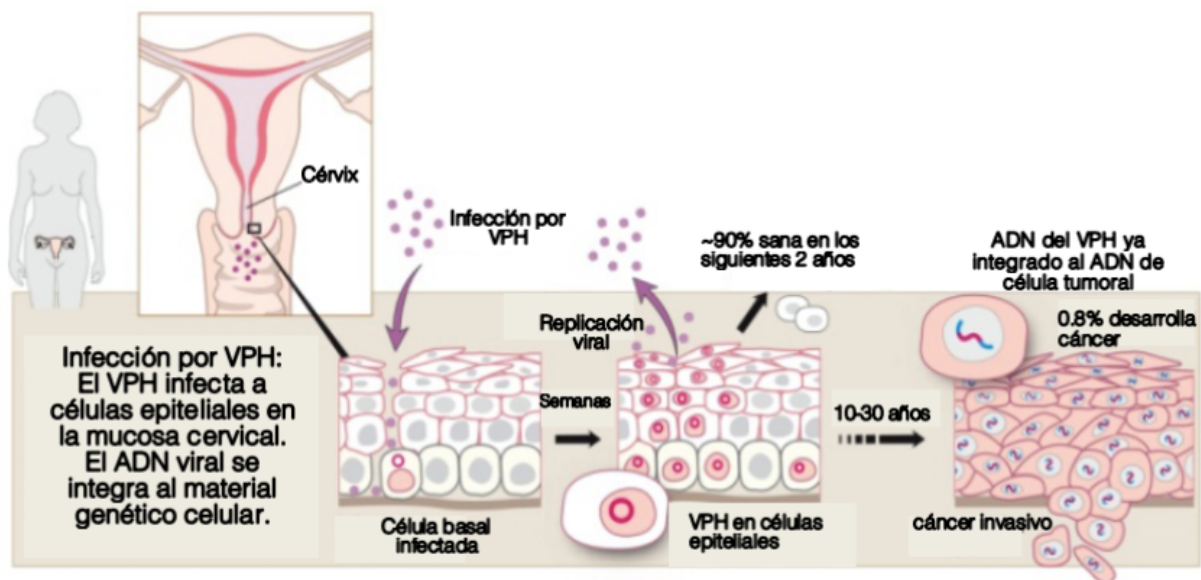


Fig.3 Infección por VPH (tomado y modificado de Annika Röhl para The Nobel Committee for Physiology or Medicine, 2008)

Con menor frecuencia, el CaCu tiene características tanto de los carcinomas de células escamosas como de los adenocarcinomas. Estos tumores se llaman carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos.

Factores de riesgo

Dentro de la etiología del CaCu, uno de los factores de riesgo más importantes es la infección por VPH. Al ser expuesto al VPH, el sistema inmune de la mujer normalmente impide que el virus produzca algún daño. Sin embargo, en un pequeño grupo de mujeres, el virus sobrevive durante años, lo que contribuye al proceso que provoca que algunas células de la superficie del cuello uterino se transformen en células cancerígenas (Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2018). El VPH es capaz de transformar las células que infecta mediante la acción directa de los productos de dos genes de expresión temprana: E6 y E7. Las proteínas E6 y E7 son capaces de interactuar con moléculas importantes para la regulación del crecimiento y replicación celular, así como para la reparación de daños sufridos por el ADN de las células sanas (Sánchez *et al.*, 2005, Annika Rohl, 2018).

Existen otros factores de riesgo en el desarrollo del CaCu:

- Numerosas parejas sexuales.
- Tabaquismo.
- Relaciones sexuales a temprana edad.
- Sistema inmune débil.
- Otras infecciones de transmisión sexual.

(Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2018)

2.6 Tratamientos

Hay diversos tipos de tratamiento para el CaCu y su administración depende, entre otras cosas, del estadio en que es detectado.

1. Tratamiento local: Aquel que se dirige a un órgano específico o un área limitada del cuerpo, usado en estadios tempranos del cáncer. Algunos ejemplos de tratamiento local son la cirugía y radioterapia.
2. Tratamiento sistémico: Tratamiento para el que se administran sustancias que viajan por el torrente sanguíneo, que llegan y afectan a las células de todo el cuerpo. Algunos ejemplos de tratamiento sistémico son la quimioterapia e inmunoterapia (National Cancer Institute, 2018).

Muchas veces las mujeres a las cuales se les diagnostica CaCu se encuentran en etapas avanzadas, por lo cual requieren del tipo de tratamiento sistémico, particularmente quimioterapia.

Quimioterapia

1. Este tipo de tratamientos consiste en detener la proliferación de células cancerígenas por medio de la administración de fármacos, denominados citostáticos o citotóxicos. El mecanismo de acción consiste en provocar una alteración en distintos procesos celulares como división celular, síntesis de ácidos nucleicos y síntesis de proteínas (National Cancer Institute, 2018).

Efectos negativos de la quimioterapia

Los tratamientos quimioterapéuticos actualmente empleados resultan ser poco selectivos, afectando a células normales (en constante división); aunado a lo anterior, uno de los principales efectos de los quimioterapéuticos es la necrosis. Por lo tanto, surge la necesidad de explorar alternativas terapéuticas con menores efectos secundarios, a partir de compuestos de origen natural.

2.7 Compuestos de origen natural

Los productos naturales han sido la fuente más representativa en la obtención de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y en sus principales contribuciones se destaca el descubrimiento de nuevas moléculas citotóxicas cuyos mecanismos de acción se caracterizan en su gran mayoría por ser agentes antimetabólicos (Muñoz, 2004). Dentro de estos compuestos de origen natural, existen diferentes tipos como los sesquiterpenos.

Sesquiterpenos

Amplio grupo de terpenos que presenta más de 200 estructuras cíclicas diferentes, caracterizados por estar distribuidos en una gran variedad de plantas, hongos e insectos (Bosco & Golsteyn, 2017). Se clasifican de acuerdo al tipo de núcleo y grupo funcional que presentan (**Fig. 4**) (Manitto & Sammes, 1981). A su vez, dentro de los sesquiterpenos existe un subgrupo de compuestos conocido como furanoeremofilanos, los cuales constituyen el grupo más numeroso y contienen un anillo furánico, encontrándose ampliamente distribuidos en plantas de varios géneros pertenecientes a la familia *Asteraceae*. Dentro de los sesquiterpenos del tipo furanoeremofilano de reciente estudio se encuentra un compuesto con potenciales propiedades como agente antitumoral conocido como Cacalol.

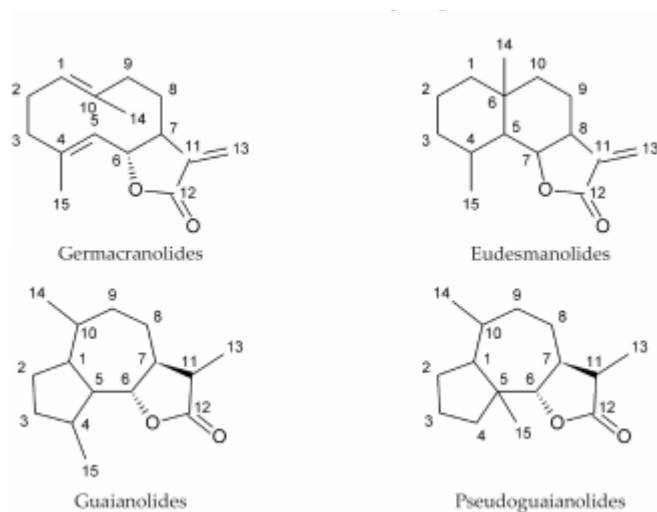


Fig 4. Clasificación de los Sesquiterpenos (recuperado de Bosco & Goldsteyn, 2017).

Cacalol

El Cacalol (*5S*)-3,4,5-trimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[*f*][1]benzofuran-9-ol (**Fig.5**) es un sesquiterpeno del tipo furanoeremofilano aislado de las raíces de *P. decompositum* (Rodríguez *et al.*, 1968); constituye uno de los metabolitos secundarios más abundantes del extracto hexánico y se obtiene de su fuente natural en forma de cristales ligeramente amarillos con un punto de fusión 92-94 °C. Se distingue por la presencia del anillo del furano unido al tetrahidronaftaleno junto con tres grupos metilos.

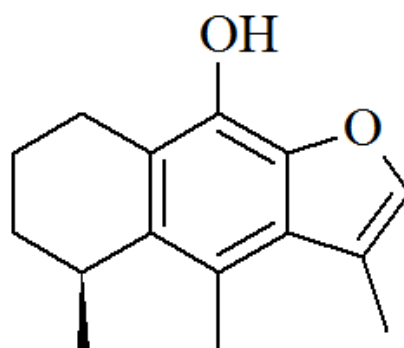


Fig. 5 Estructura química del Cacalol (tomado de <https://glosarios.servidor-alicante.com/quimica/cacalol>)

Modificaciones estructurales: Acetato de Cacalol (AC)

Una estrategia para potencializar el efecto que tienen ciertos compuestos como el Cacalol, es generar modificaciones en su estructura. Por ello, en el laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM, a cargo del Dr. Manuel Jiménez Estrada, se sintetizó este nuevo compuesto a partir del Cacalol, el cual aún no ha sido probado en líneas celulares de cáncer.

2.8 Acetato de Cacalol (AC) por Acetilación

El sesquiterpeno Cacalol fue modificado al introducirse un grupo acetilo en el C9, dando como resultado el AC (**Fig. 6**). La acetilación es una reacción que introduce un grupo funcional acetilo en un compuesto químico. El proceso de introducción de un grupo acetilo da como resultado un grupo acetoxi, reacción que implica la sustitución del átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo con un grupo acetilo (C₂H₃O), lo que produce un éster específico, el acetato (Fieser & Fieser, 1985).

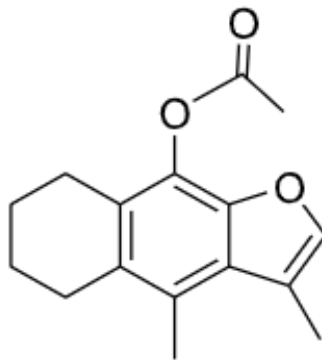


Fig. 6 Estructura química del Acetato de Cacalol.

2.9 Antecedentes

Sulbarán y cols. (2018) demuestran que la acetilación realizada al almidón de millo, produce mejoras en sus propiedades como el perfil de viscosidad y disminución de su temperatura de gelatinización, lo que los convierte en una opción para la elaboración de geles con mayor estabilidad con aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética.

Gómez-Vidales y cols. (2014) reportan al AC como un antioxidante eficaz en sistemas *in vitro*. Identificándolo como inhibidor, lo que lo convierte en opción para la aplicación de terapia fotodinámica y otros tratamientos de enfermedades que involucran la proliferación celular descontrolada. Así mismo, reportan que el AC es capaz de producir singletes de oxígeno bajo radiación UV-vis y muestran su capacidad para atrapar los radicales hidroxilo, alquilo y peroxilo.

Liu y cols. (2011) reportaron los efectos antiproliferativos del Cacalol en modelos *in vitro* con células de cáncer de mama y modelos animales. Reportan la activación de una vía pro-apoptótica e identifican su papel en la modulación de la expresión del gen FAS, que resultó en un proceso apoptótico a través de la activación de DAPK2 y caspasa 3.

Finalmente, Mora (2016) observó que el AC reduce la inflamación a través de la modulación de citocinas inflamatorias, suprimiendo las proinflamatorias y aumentando las antiinflamatorias.

4. Planteamiento del problema

El tipo de tratamiento para el cáncer depende principalmente de su etapa y localización. En el cáncer cervicouterino se han implementado tres diferentes tipos de tratamiento: cirugía, radioterapia y quimioterapia. El último ha sido reportado que afecta no solo a células cancerígenas sino a aquellas con alta tasa de replicación, ocasionando severos efectos secundarios que merman la vida de las pacientes (Widakowich *et al.*, 2007). Se ha identificado que las células más afectadas por el efecto citotóxico de la quimioterapia son aquellas que comparten características con las células tumorales, especialmente la multiplicación celular a gran velocidad, como son las de los folículos pilosos, de la médula ósea, el tubo digestivo y el sistema reproductor (Blasco & Caballero, 2019), por lo que sigue la necesidad de identificar nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad.

Actualmente los derivados de compuestos naturales han tomado esencial importancia en la industria farmacológica, principalmente aquellos con posible actividad antitumoral. En este sentido, los sesquiterpenos se han estudiado por sus propiedades citotóxicas en células tumorales pero sus derivados aún no han sido explorados como posible tratamiento para el cáncer, por lo que en el presente se pretende estudiar el efecto antiproliferativo y apoptótico, así como la baja o nula actividad necrótica del AC en las líneas celulares de CaCu: HeLa y CaSki, así como su actividad selectiva en células no tumorales.

5. Justificación

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, en 2018 se atribuyeron a esta enfermedad 9 555 023 de defunciones. A nivel mundial, el cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en mujeres de 20 a 64 años. Para el 2018, en México fueron diagnosticados 6,050 nuevos casos y se reportaron 2, 607 defunciones por CaCu, identificándolo como un problema de salud pública en la población femenina mexicana.

A pesar de los avances en la investigación, los fármacos empleados en el tratamiento para el cáncer cervicouterino resultan poco efectivos en etapas avanzadas de la enfermedad, además de ser poco selectivos y provocar efectos secundarios que deterioran la vida del paciente, por lo que se tiene la necesidad de extender la investigación acerca de compuestos emergentes con posibles propiedades antitumorales. En este sentido se ha encontrado que los sesquiterpenos, como el AC, pueden presentar actividad antiproliferativa en células tumorales, por lo que su investigación es de sumo interés.

6. Hipótesis

Se ha demostrado que el sesquiterpeno Cacalol presenta actividad biológica de relevancia en el campo médico, ya que ha demostrado tener actividad antitumoral en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama. Por lo que se espera que su derivado acetilado presente actividad antiproliferativa y apoptótica en las líneas celulares HeLa y CaSki.

7. Objetivos

General

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del AC en líneas celulares de cáncer de cérvix.

Particulares

1. Determinar la actividad antiproliferativa del AC en cultivos de las líneas tumorales de CaCu (HeLa y CaSki), expresada como la concentración requerida para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}), mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.
2. Evaluar si el AC induce una muerte necrótica en las líneas celulares de CaCu a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
3. Determinar si el AC induce una muerte apoptótica en las líneas celulares de CaCu mediante la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas y la presencia de caspasa 3 activa, observadas por microscopía de campo claro y fluorescencia, así como la cuantificación de células positivas a la caspasa 3 activa determinadas por citometría de flujo.
4. Determinar el efecto de las IC_{50} obtenidas en las células tumorales, en el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, por medio de la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CFSE).
5. Determinar si el AC induce una muerte necrótica en células linfocíticas a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

8. Material y métodos

Preparación del compuesto

En una balanza analítica se pesó 1 mg del compuesto Acetato de Cacalol y fue solubilizado en 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) en un tubo cónico de 1.6 mL (Eppendorf, USA).

Cultivo de las líneas tumorales

Con las líneas celulares de carcinoma epidermoide de cuello uterino (HeLa y CaSki) se establecieron cultivos celulares en cajas Petri de 100 mm de diámetro, con 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina, rojo fenol y bencilpenicilina, a 5% de suero neonato bovino (SNB) previamente desactivado a 57°C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 5% de CO₂, temperatura de 37°C y una atmósfera húmeda saturante.

La línea celular HeLa positiva a VPH-18 corresponde a células humanas provenientes de un adenocarcinoma del cérvix (ATCC, 2020). La línea celular CaSki proveniente de un carcinoma epidermoide de cérvix, es positiva a VPH-16 y fue establecida de células metastásicas del mesenterio del intestino delgado (ATCC, 2020).

Evaluación de la actividad antiproliferativa a través de la incorporación de cristal violeta

Las líneas celulares HeLa y CaSki se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 6,000 células/pozo con 100 μ L de RPMI al 5% SNB, incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio de cultivo y las células fueron estimuladas con: un control testigo, al que solo se le añadió medio de cultivo y un control vehículo, empleado en la solubilización del compuesto (DMSO) y diferentes concentraciones de AC (20 μ g/mL a 29 μ g/mL) y fueron incubadas por 24 horas. Transcurrido el tiempo de estímulo, se evaluó la actividad antiproliferativa del compuesto AC por medio de la incorporación de cristal violeta. Se retiró el medio y se fijaron las células con 50 μ L/pozo de glutaraldehído al 1.1% (SIGMA-Aldric, USA) durante 20 minutos en agitación constante, posteriormente la placa fue lavada y secada al aire. Posteriormente se añadieron 50

μL /pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA-Aldric, USA) pH 6.0 y se mantuvieron durante 20 minutos en agitación constante. Después de la tinción, se eliminó el exceso de colorante lavando la placa al chorro de agua y secando al aire. Finalmente, se añadieron 50 μL /pozo de ácido acético al 10% y se dejó en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente con la intención de solubilizar el colorante incorporado, cumplido el tiempo, se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas (Awareness Technology INC, Chromate 4300, USA) a 590 nm. Con las absorbancias registradas, se realizó una curva dosis-respuesta en el programa Microsoft Excel 2010. Posteriormente, los datos fueron linealizados y mediante la ecuación de la recta, se determinó la concentración a la cual se disminuye en un 50% la población celular (IC_{50}).

Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH)

Las líneas celulares HeLa y CaSki se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 6,000 células/pozo con 100 μl de RPMI al 5% SNB, incubadas a 37°C, 5% de CO_2 y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio de cultivo y las células fueron estimuladas con: un control testigo, al que solo se le añadió medio de cultivo, un control vehículo, empleado en la solubilización del compuesto (DMSO), un control positivo (Tritón X-100, Sigma-Aldrich, USA, al 9%) y la IC_{50} respectiva para cada línea celular. Transcurridas las 24 horas de tratamiento, se recuperó el sobrenadante y se colocó en una placa de fondo cónico (Corning, USA). Los sobrenadantes fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 min a 4°C, posteriormente fueron transferidos 40 μl /pozo del sobrenadante centrifugado a una placa de fondo plano (Corning, USA), a los cuales se le adicionaron 40 μl del reactivo LDH (LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit, BioVision, USA) y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Awareness Technology INC, Chromate 4300, USA). Los datos obtenidos fueron analizados en Microsoft Excel 2010 y el porcentaje de muerte necrótica fue determinado. El control positivo Tritón X-100 fue tomado como el 100% de actividad.

Evaluación de la morfología apoptótica en células tumorales por tinción DAPI e inmunodetección de caspasa-3 activa mediante microscopía de fluorescencia

Las líneas celulares HeLa y CaSki se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 6,000 células/pozo con 100 µl de RPMI al 5% SNB, incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio de cultivo y se añadieron las siguientes condiciones: Control testigo (medio de cultivo), vehículo (DMSO), control positivo para muerte por apoptosis (campotecina 15 µg/mL solubilizada en RPMI para la línea CaSki y 12 µg/mL para la línea HeLa), y las concentraciones previamente identificadas IC₅₀. Al transcurrir las 24 horas, el medio de cultivo fue desechado y las células fueron fijadas con 50 µl de la mezcla paraformaldehído 4%- glutaraldehído 2.5% (Sigma-Aldrich, USA durante 1.5 horas, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS filtrado estéril, 100 µl por pozo (pH 7.3). Las células fueron permeabilizadas con 30 µl de Tritón X-100 al 1 % (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 min, al término se realizaron tres lavados con PBS filtrado estéril a cada condición (pH 7.3). Posteriormente se agregó 30 µl de anticuerpo primario anticaspasa-3 activa (1:1000 en PBS) hecho en conejo (Sigma-Aldrich, USA) y se dejó en agitación constante a 4 °C durante una noche. Se lavó tres veces con PBS filtrado estéril para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Al término, se añadieron 30 µl de anticuerpo secundario anticonejo hecho en cabra acoplado al fluorocromo FIT-C (1:1000 en PBS) (Sigma-Aldrich, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente, agitación constante y en condiciones de oscuridad. Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS filtrado estéril, se agregó 3 µl del fluorocromo DAPI al PBS del último lavado y se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS filtrado estéril y por último se añadió 50 µl de PBS para su observación a través de un microscopio de contraste de fases y epifluorescencia (NIKON ECLIPSE TS2R-FL, Japón). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cuantificación de células positivas a caspasa-3 activa mediante citometría de flujo (FACS)

Las células se cultivaron a una densidad de 250,000 células por pozo en una placa de 6 pozos de fondo plano (Corning, USA) en 2.5 mL de RPMI-1640 suplementado para las líneas celulares HeLa y CaSki dejándolas incubar por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se estimularon con las siguientes condiciones: Control (medio de cultivo), vehículo (DMSO), anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (1:1000 en PBS) (Sigma-Aldrich, USA), anticuerpo secundario anticonejo acoplado al fluorocromo FIT-C (1:1000 en PBS) (Sigma-Aldrich, USA), control positivo (campotecina 15 µg/mL y 12 µg/mL) y las concentraciones previamente identificadas de IC₅₀. Transcurridas las 24 horas, se recuperaron tanto las células adheridas como las células en suspensión de cada condición y se fijaron con etanol al 70% en PBS por 30 minutos a 4 °C. Al término del tiempo, las células fueron lavadas tres veces con 1 mL de PBS filtrado por centrifugación (1800 rpm y 5 min). Al término de los lavados, se agregó 50 µl de Anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (1:1000 en PBS) (Sigma-Aldrich, USA), y se incubó toda la noche a 4 °C. Posterior a las 24 horas, las muestras fueron lavadas con PBS filtrado (1 mL) y centrifugadas a 1800 rpm durante 5 min, proceso repetido tres veces para eliminar el anticuerpo primario excedente. Al término de los lavados se agregó 50 µl de Anticuerpo secundario anticonejo acoplado al fluorocromo FIT-C (1:1000 en PBS). Las muestras se mantuvieron protegidas de la luz durante dos horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS filtrado (1 mL) y centrifugadas a 1800 rpm durante 5 min, proceso repetido tres veces. Se añadieron 500 µl de PBS filtrado y las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo FACS Aria-II. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo (Becton Dickinson, ([BD] Biosciences).

Evaluación del efecto antiproliferativo del AC en linfocitos de sangre periférica

De un sujeto clínicamente sano, se obtuvieron 20-30 ml de sangre periférica en tubos BD-Vacutainer® con EDTA (10.8mg/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 sin suero por tubo, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo en 5 ml de RPMI sin suero. Posteriormente se realizó un conteo con ayuda de una cámara de Neubauer.

Los linfocitos se marcaron con 2 μ M de CSFE. Para ello, se agregaron 50 μ L de 200 μ M de CSFE en 5 ml de RPMI 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 con 5% de SFB (suero fetal bovino), para eliminar el exceso de CSFE. Se cultivaron en una placa de 96 pozos por quintuplicado 200,000 linfocitos por pozo en 200 μ l de RPMI con 20% de SFB con los siguientes controles: control -/- (sin CSFE y sin fitohemaglutinina PHA), +/- (con CSFE y sin PHA), control -/+ (sin CSFE y con 20 μ l/ml de PHA) y control +/+ (con CSFE y con 20 μ l/ml de PHA). Los pozos con linfocitos para determinar el efecto de las respectivas IC₅₀ se mantuvieron con CSFE y con 20 μ l/mL de PHA. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas (37°C, 5% CO₂, atmosfera punto de rocío).

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se procedió a retirar 100 μ l/ pozo de los controles. A los controles -/- (sin CSFE y sin PHA) y +/- (con CSFE y sin PHA) se les agregó 100 μ l/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco, mientras que a los controles -/+ (sin CSFE y con PHA) y +/+ (con CSFE y con PHA) se les agregó 100 μ L/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco con 20 μ l/ml de PHA. Asimismo, para probar las IC₅₀ obtenidas en las líneas tumorales, también se les retiró 100 μ l/ pozo y se agregaron 100 μ L de las respectivas de IC₅₀ a una concentración 2X de la IC₅₀ CaSki (23.8 μ g/mL) y 2X de la IC₅₀ de HeLa (26.53 μ g/mL). El mismo procedimiento se efectuó para el vehículo, el cual consistió de 5 μ l/ml de DMSO en RPMI al 20% de SFB y con 20 μ l/ml de PHA y se mantuvieron en condiciones de cultivo por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas (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 500 μ l/tubo de verseno frío (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 μ l de PBS adicionado con 5% de SFB. Se procedió a

capturar 10,000 células en la población 1, en un citómetro de flujo FACS Aria-II. Los datos fueron analizados en el programa FlowJo (Becton Dickinson, ([BD] Biosciences).

Determinación de muerte celular por necrosis en linfocitos humanos mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa

Se sembró por quintuplicado 200,000 linfocitos por pozo en 200 μ l de RPMI al 20% de SFB y 20 μ g/ml de PHA, en una placa de 96 pozos. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas (37°C, 5% CO₂, atmosfera punto de rocío). Al cabo de este tiempo, se retiraron 100 μ l de medio de cultivo en todos los pozos de la placa de 96 pozos, el cual fue sustituido por 100 μ l de medio (RPMI 20% al SFB y 20 μ l/ml de PHA) al 2X (el doble de concentración de las IC₅₀) de cada una de las respectivas condiciones: Al blanco, el control positivo y el control sin tratamiento, se les agregó 100 μ l/pozo de medio de cultivo. El vehículo se agregó con 5 μ l/ml-pozo de DMSO. Los tratamientos con AC consistieron de 2X de la IC₅₀ de CaSki (23.8 μ g/mL) y 2X de la IC₅₀ de HeLa (26.53 μ g/mL). La placa se incubó en condiciones de cultivo por 24 horas adicionales. Una hora previa a la cosecha, al control positivo se le agregaron 10 μ L de tritón X-100 al 10%, con el objetivo de lisar las células y así liberar la enzima LDH al medio. Al cabo de 72 horas totales de cultivo, se recolectaron 60 μ L de los medios a una placa de fondo cónico en donde se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C, se pasaron 40 μ L a una placa de 96 pozos de fondo plano a los cuales se les agregaron 40 μ L de la mezcla de reacción de LDH (LDH-Citotoxicity Assay kit Biovision: NO CatK311-400). Se incubaron por 20 minutos en condiciones de oscuridad y se evaluó la absorbancia a 490nm en un lector de placas (Awareness Technology INC, Chromate 4300, USA). El porcentaje de muerte necrótica fue calculado en Microsoft Office Excel 2010, tomando como el 100% al control positivo tratado con tritón X-100.

9. Resultados

9.1 Actividad antiproliferativa del AC en células tumorales (HeLa y CaSki).

Para la determinación de la actividad antiproliferativa del AC en cultivos de las líneas celulares HeLa y CaSki, éstos fueron tratados con diferentes concentraciones (20 $\mu\text{g/mL}$ a 29 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas. El número celular fue evaluado mediante la técnica de incorporación de cristal violeta (**Fig. 7**), para posteriormente determinar la concentración inhibitoria media máxima fue calculada (IC_{50}) (**Tabla 1**).

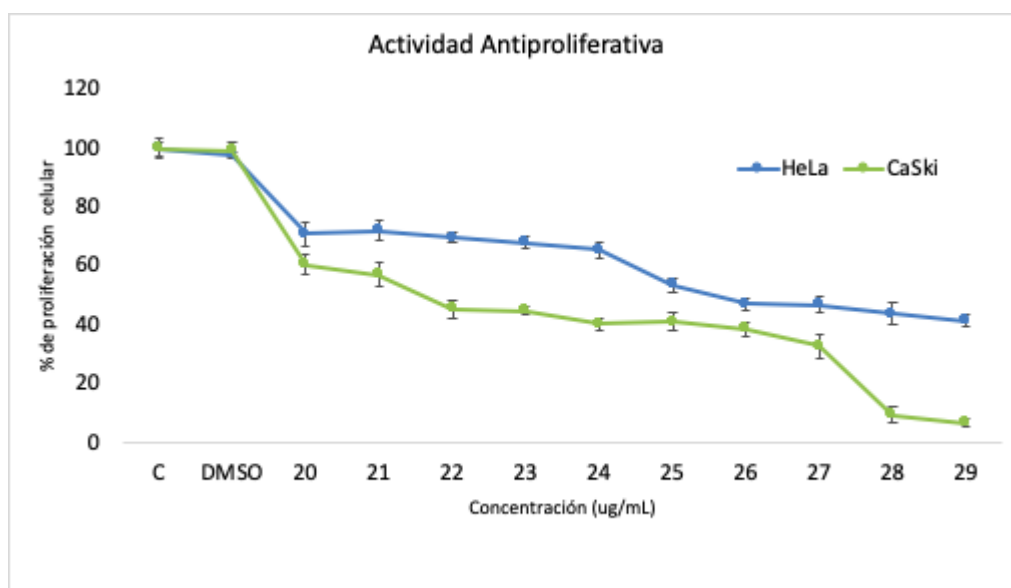


Fig.7 Efecto inhibitorio del AC en las líneas HeLa y CaSki. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, analizados mediante una prueba ANDEVA ($p < 0.05$ vs control).

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) de AC para las líneas celulares HeLa y CaSki, expresados en $\mu\text{g/mL}$ y μM .

Líneas celulares	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IC_{50} μM
HeLa	26.53	102.72
Caski	23.8	92.13

Los resultados obtenidos en la figura 7 establecen que el AC afecta el potencial proliferativo de ambas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración, es decir, conforme se incrementa la concentración, la densidad celular disminuye. La tabla 1 muestra la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de AC para las líneas HeLa y CaSki.

9.2 Actividad necrótica del AC en células tumorales CaCu

Para determinar si el AC induce una muerte necrótica en células CaCu, se evaluó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos (HeLa y CaSki) (**Fig. 8 y tabla 2**).

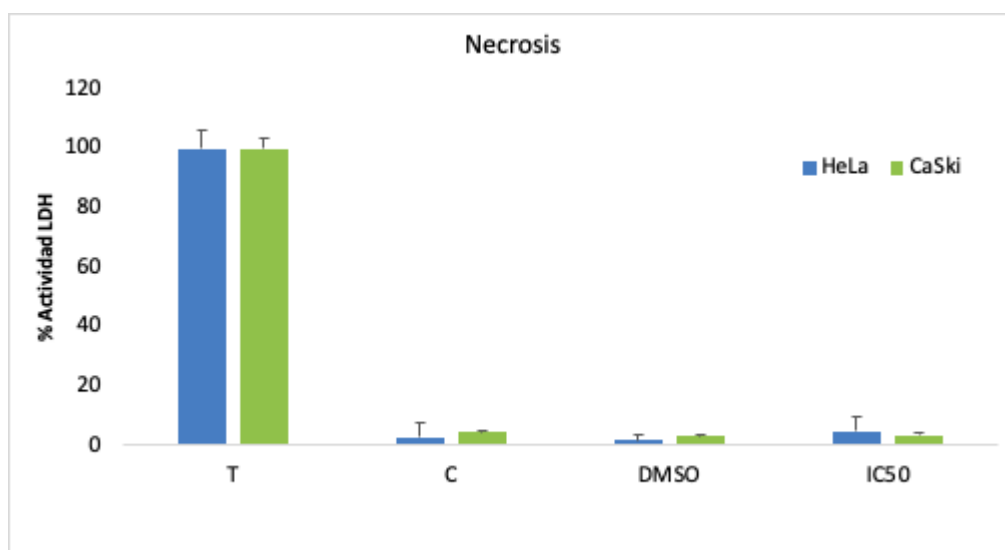


Fig. 8 Efecto necrótico del AC. Actividad de LDH en células tumorales (HeLa y CaSki) tratadas con AC. Los cultivos de HeLa y CaSki fueron tratados con las concentraciones de IC₅₀ respectivas para cada línea celular y se tomó como control positivo el Tritón X-100. La actividad de la enzima LDH fue registrada por el Kit CytoTox 96. Los datos mostrados son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANDEVA ($p < 0.05$ vs control).

Tabla 2. Porcentaje de muerte necrótica en células tumorales CaCu (HeLa y CaSki) posterior a los tratamientos con la IC₅₀ correspondiente.

Líneas celulares	% LDH
HeLa	4.7
Caski	3.22

9.3 Evaluación de la actividad apoptótica del AC por microscopía de fluorescencia e Inmunodetección de Caspasa-3 activa

La muerte apoptótica se caracteriza morfológicamente por la reducción del tamaño celular, pérdida de la adherencia, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, entre otros. Para la evaluación de la inducción apoptótica del AC, los cultivos celulares de HeLa y CaSki fueron sometidos a los estímulos de la IC_{50} correspondiente, posteriormente fueron teñidas por el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-fenyl-indol) y la morfología celular fue evaluada por microscopía de fluorescencia. Así mismo, se utilizó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-caspasa 3 activa y el anticuerpo secundario anticonejo acoplado a FIT-C para la detección de caspasa-3 activa en los cultivos celulares (Fig. 9-11).

CaSki

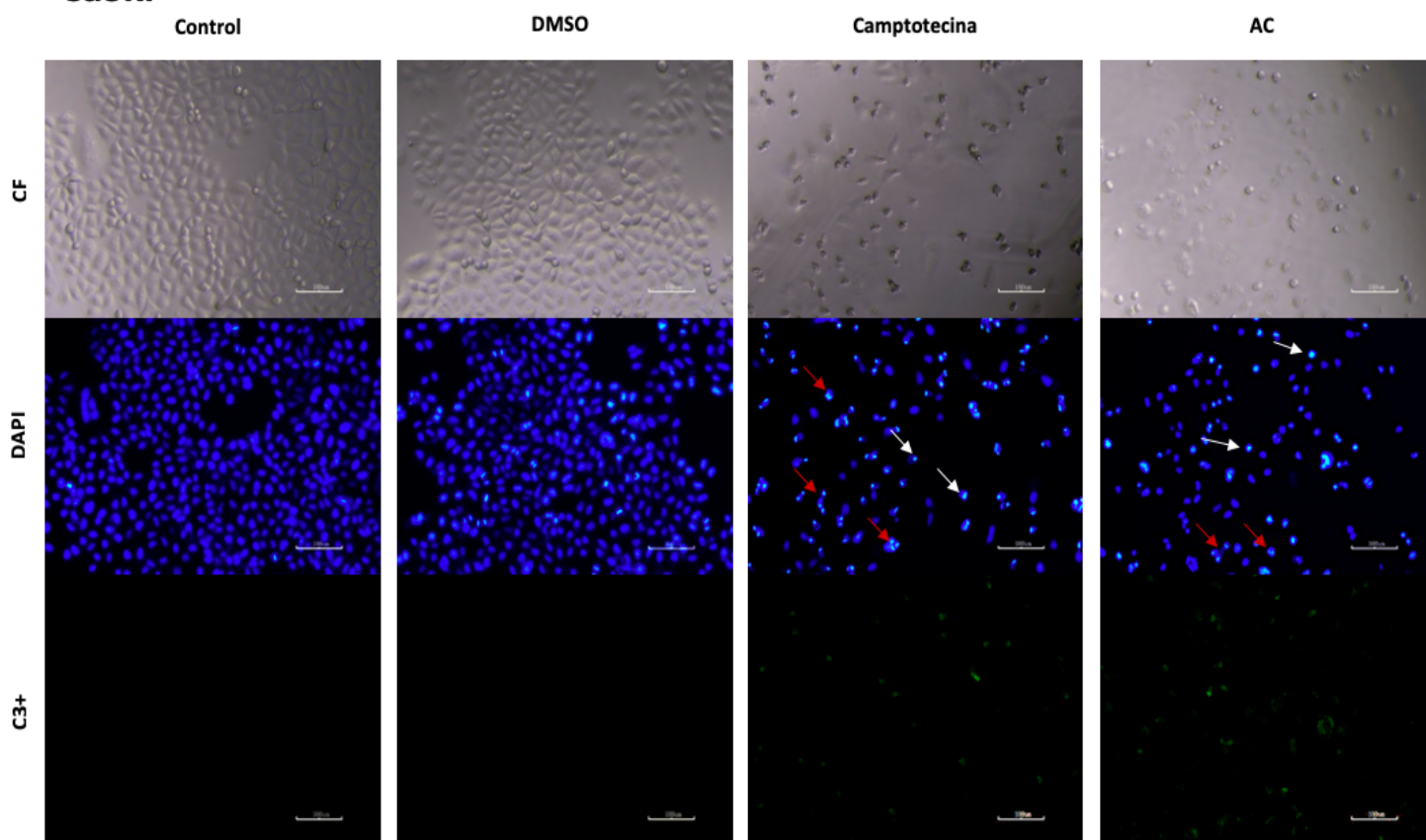


Fig.9 Efecto del AC en la morfología nuclear de la línea celular CaSki. Control, células sin tratamiento. DMSO, células tratadas con el disolvente del compuesto (2.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Camptotecina, células tratadas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al 0.005%. AC, células tratadas con 23.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del compuesto durante 24 horas, se observa la fragmentación nuclear (flechas rojas) y condensación de la cromatina (flechas blancas). Se observa la

presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (camptotecina) y en el AC. Ensayo representativo de tres repeticiones.

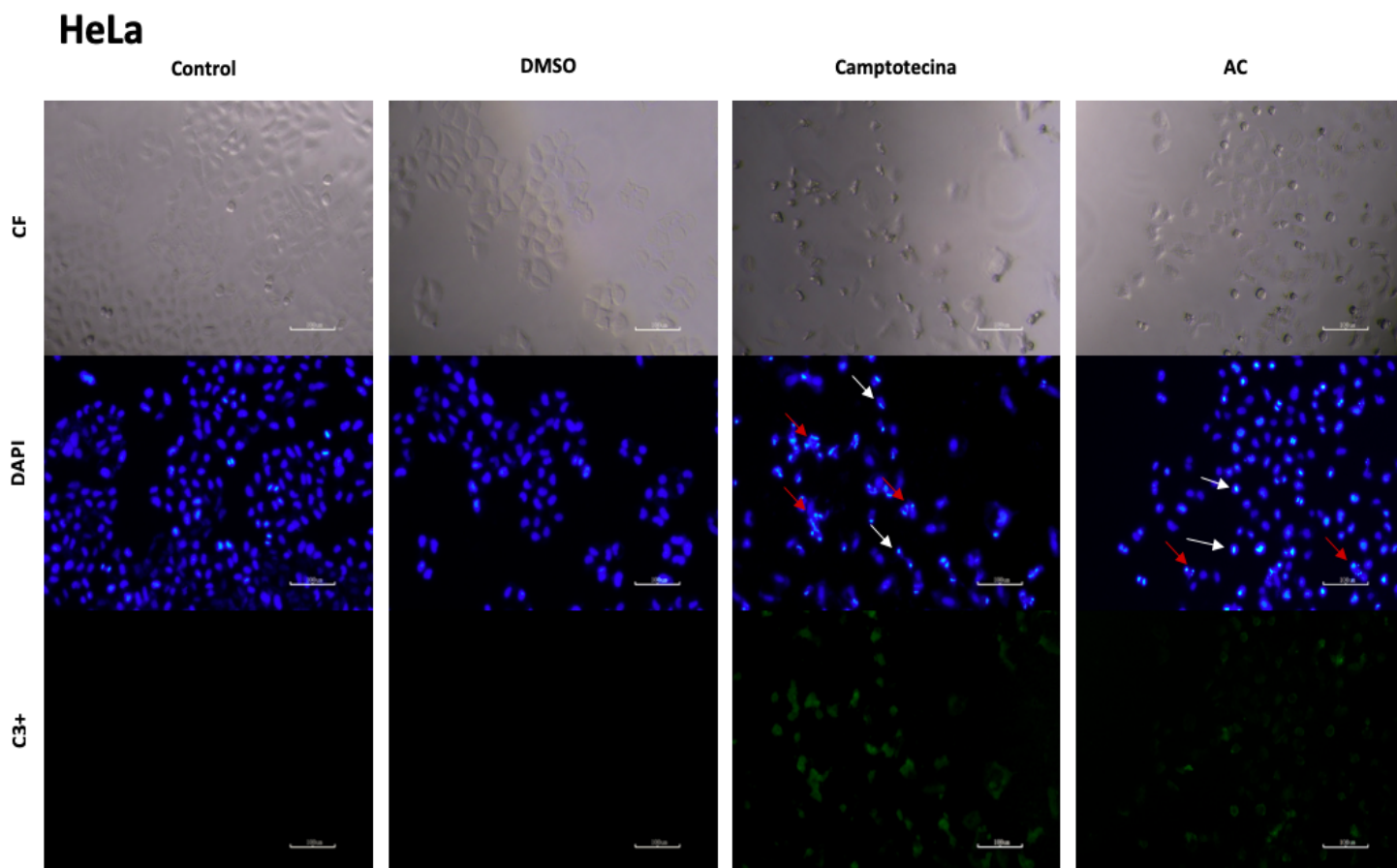


Fig.10 Efecto del AC en la morfología nuclear de la línea celular HeLa. Control, células sin tratamiento. DMSO, células tratadas con el disolvente del compuesto (2.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Camptotecina, células tratadas con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al 0.005%. AC, células tratadas con 26.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del compuesto durante 24 horas, se observa la fragmentación nuclear (flechas rojas) y condensación de la cromatina (flechas blancas). Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (camptotecina) y en el AC. Ensayo representativo de tres repeticiones.

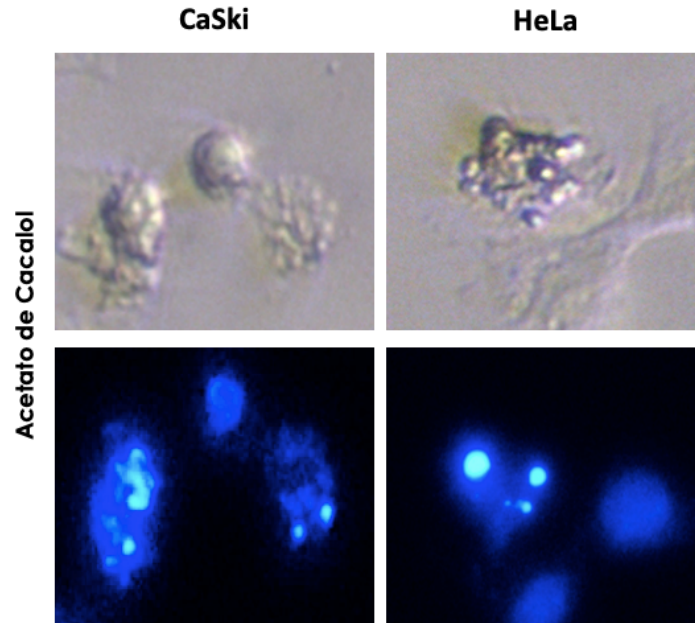


Figura 11. Efecto del AC sobre la morfología de las líneas celulares CaSki y HeLa. Las células fueron tratadas con 23.8 y 26.53 $\mu\text{g/mL}$ de AC durante 24 horas. Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y observadas por microscopía de epifluorescencia.

Las **figuras 9 y 10** muestran que las células control y DMSO en el control de fases (CF) se encuentran adheridas a la superficie de la placa, con morfología poliédrica y conservan las proyecciones citoplasmáticas; por otro lado, en las células tratadas con camptotecina y AC se observa pérdida de la adherencia, reducción en el tamaño celular y presencia de cuerpos apoptóticos. En el marcaje con DAPI, tanto en el control positivo (camptotecina) como en el AC, se observa fragmentación nuclear y condensación de la cromatina, sugiriendo que el AC induce una muerte apoptótica en las líneas tumorales CaSki y HeLa. La **figura 11** muestra el efecto del AC sobre la morfología de ambas líneas celulares, se observan cambios en la membrana y tinción DAPI en los núcleos compactos. Sin embargo, se necesita una confirmar cuantitativamente la positividad de las células a caspasa-3 activa.

9.4 Cuantificación de células positivas a la caspasa-3 activa por medio de citometría de flujo

Con el propósito de corroborar si el AC induce muerte apoptótica, las células tumorales de CaCu (HeLa y CaSki) fueron tratadas con la IC_{50} correspondiente y las células positivas a la Caspasa-3 activa fueron cuantificadas por medio de citometría de flujo.

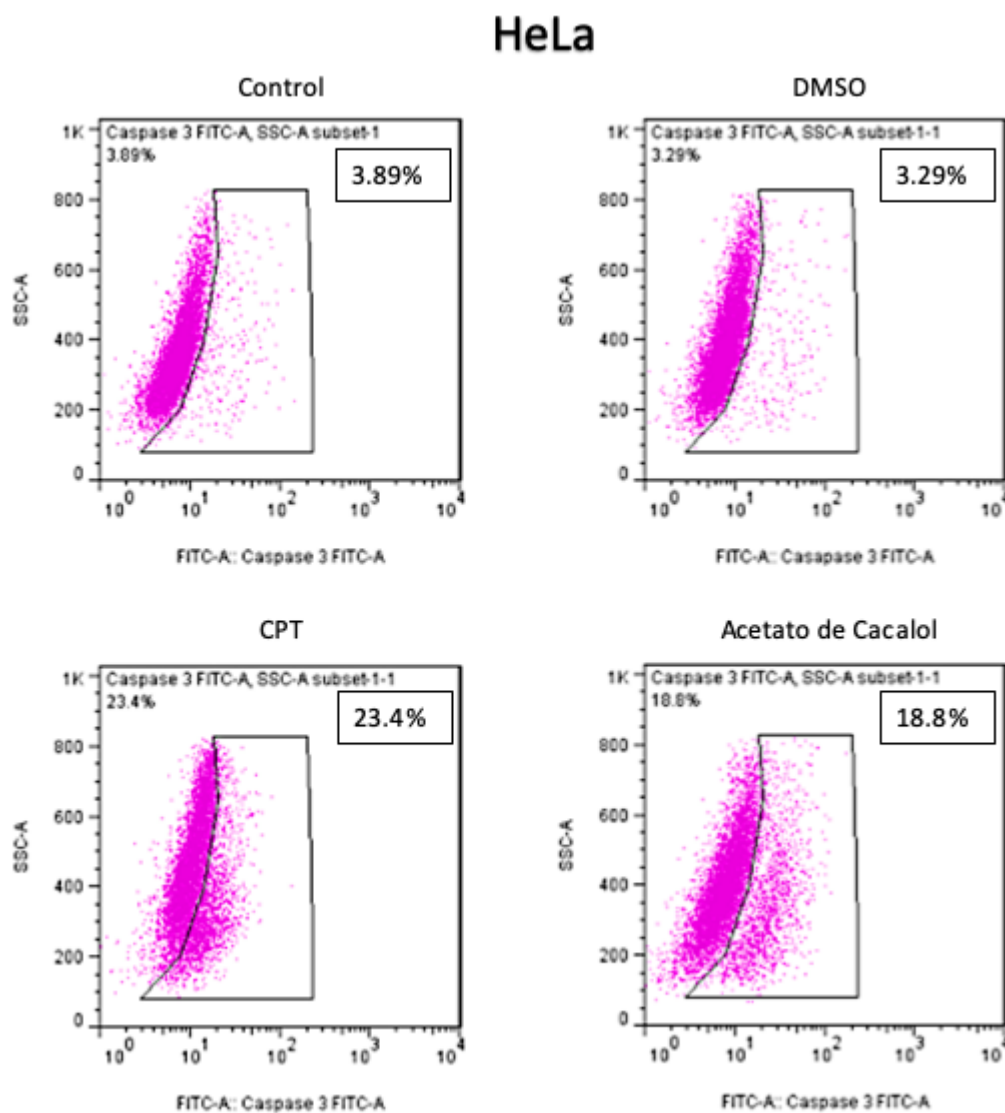


Fig. 12 Cuantificación de células positivas a caspasa-3 activa en cultivos de HeLa previamente tratadas con la IC_{50} reportada. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

CaSki

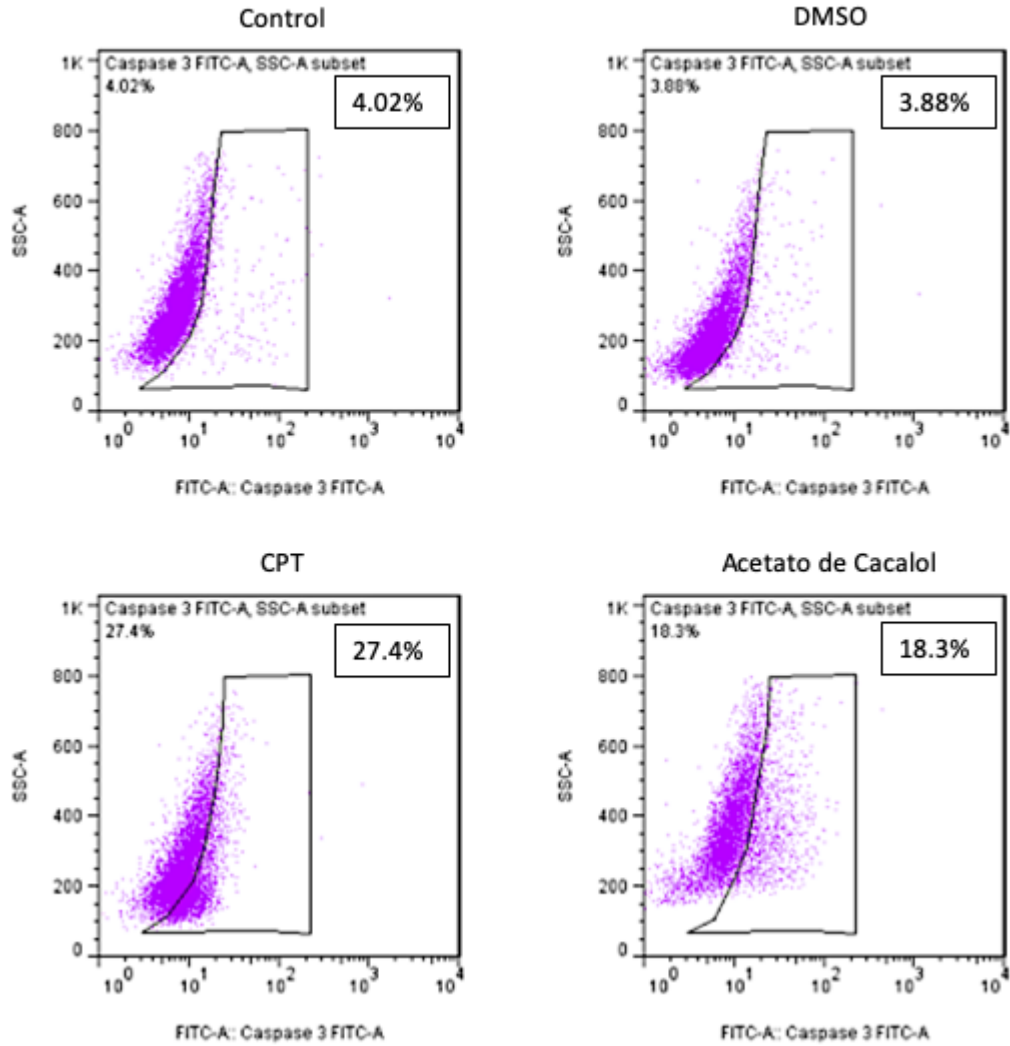


Fig. 13 Cuantificación de células positivas a caspasa-3 activa en cultivos de CaSki previamente tratados con la IC₅₀ reportada. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

Tabla 3. Porcentaje de células con presencia de caspasa 3 en las líneas celulares tumorales CaCu (HeLa y CaSki). Evaluado a las 24 horas después del tratamiento.

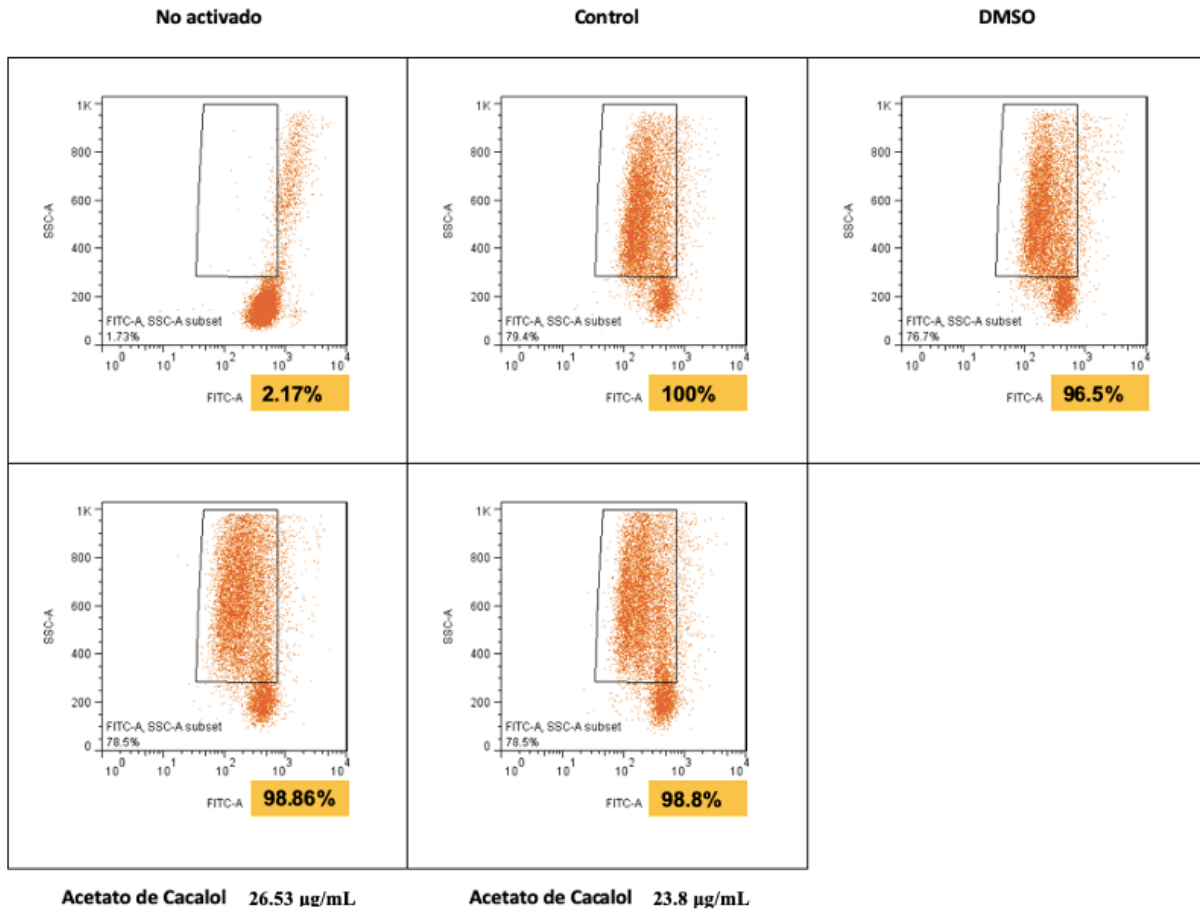
	HeLa	CaSki
Control	3.89%	4.02%
DMSO	3.29%	3.88%
CPT	23.4%	27.4%
Acetato de Cacalol (AC)	18.8%	18.3%

Los resultados mostrados en las **Fig.12** y **Fig. 13**, así como en la **tabla 3**, establecen que el compuesto induce una muerte apoptótica con la participación de caspasa-3 en las líneas celulares tumorales de CaCu.

9.5 Actividad antiproliferativa y necrótica del AC en cultivos de células linfocíticas humanas.

Debido a los efectos inhibitorios en la proliferación de células tumorales de CaCu, se evaluó al AC en cultivos de células linfocíticas humanas para determinar su selectividad. Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica humana y fueron tratados con las concentraciones de IC_{50} correspondiente a cada línea celular durante 24 horas, el efecto inhibitorio en la proliferación fue evaluado mediante el marcaje con carboxifluoresceína (CFSE) (**Fig. 14, tabla 4**).

Fig. 14 Efecto antiproliferativo del AC en células linfocíticas humanas, mediante la técnica de marcaje



con carboxifluoresceína evaluado por citometría de flujo. El polígono indica la región de células en proliferación. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.

Tabla 4. Porcentaje de proliferación de linfocitos después del tratamiento con AC.

Tratamiento	% Proliferación
Activado	100%
DMSO	96.5%
AC (26.53 µg/mL)	98.86%
AC (23.8 µg/mL)	98.8%

Los resultados mostrados en la **Fig.13** y **tabla 4** establecen que el AC a las concentraciones de 26.53 y 23.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas, sugiriendo que dicho compuesto podría actuar de una forma selectiva.

Para determinar la actividad necrótica del AC en células linfocíticas humanas, se evaluó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos (**Fig. 15**).

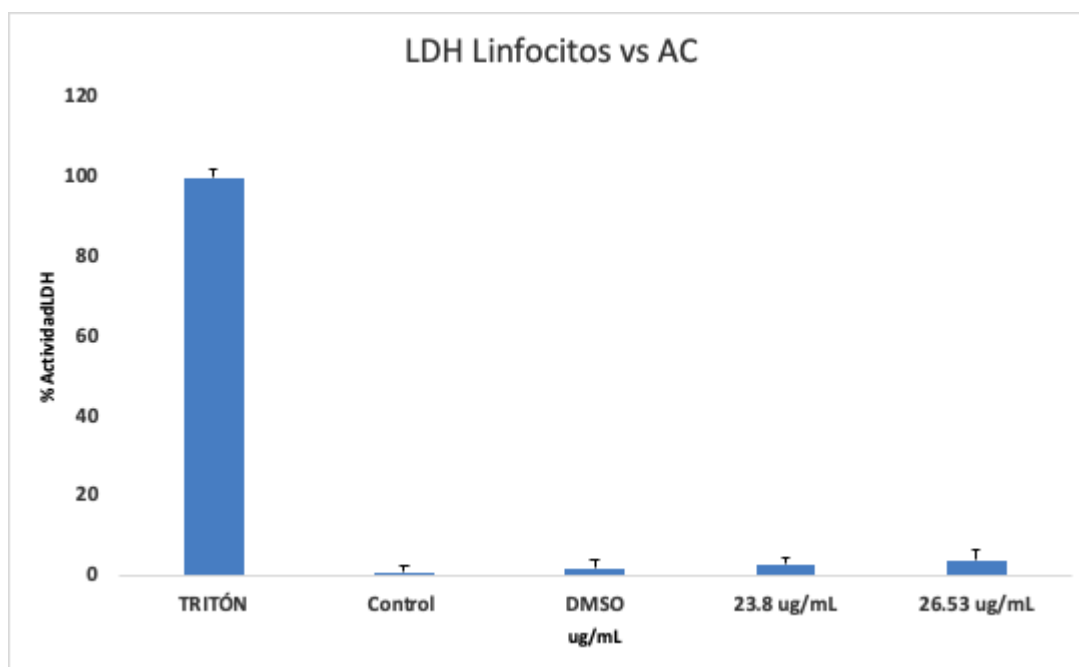


Fig. 15 Efecto necrótico del AC. Actividad de LDH en células linfocíticas humanas tratadas con AC. Los cultivos fueron tratados con las concentraciones de IC_{50} respectivas para cada línea celular de CaCu y se tomó como control positivo el Tritón X-100. La actividad de la enzima LDH fue registrada por el Kit Cyto Tox 96. Los datos mostrados son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANOVA, , seguido por una prueba Tukey ($p < 0.05$ vs control).

Los resultados muestran un bajo porcentaje de actividad de LDH, por lo que el AC no presenta un efecto necrótico en los cultivos de células linfocíticas humanas.

10. Discusión de resultados

A pesar del gran avance en la comprensión de los procesos biológicos que conducen al desarrollo del cáncer, aún existe la necesidad de encontrar mejores agentes terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad. Una de las estrategias más efectivas es el aislamiento y evaluación de productos de origen natural. La importancia de los productos naturales para el descubrimiento de nuevos fármacos ha sido cada vez más notoria ya que se han propuesto como indicadores para objetivos celulares que al modularse pueden tener un efecto nocivo en la supervivencia o proliferación de células tumorales (Sammar *et al.*, 2019). Los sesquiterpenos son una clase de moléculas naturales que han demostrado potencial terapéutico para disminuir la progresión del cáncer (Yi *et al.*, 2014), son compuestos isoprenoides de 15 carbonos que se encuentran típicamente en plantas y vida marina. Esta clase de compuestos con frecuencia ha proporcionado pistas alentadoras para la quimioterapia (Kim *et al.*, 1998). Se ha descrito que el sesquiterpeno Cacalol posee actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama, así como actividad antitumoral en un modelo animal sin mostrar toxicidad después de su administración oral e intraperitoneal (i.p) (Liu *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se evaluaron los efectos antiproliferativos y apoptóticos del Acetato de Cacalol en las líneas celulares de CaCu: HeLa y CaSki. Los resultados indican que éste posee propiedades antiproliferativas en ambas líneas celulares con una IC_{50} de 26.53 y 23.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, siendo la línea HeLa la más resistente al compuesto. Comparado con su precursor, el cual ha sido reportado inhibe la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB231) a una concentración de 8.06 $\mu\text{g/mL}$ (Liu *et al.*, 2011), se observa que hay variación entre la concentración de Acetato de Cacalol y Cacalol necesaria para inducir un decremento del 50% en la densidad celular, principalmente debido a que los compuestos fueron probados en distintas líneas celulares.

Con respecto a la actividad citotóxica, los resultados muestran que el AC no presenta actividad necrótica significativa en las líneas celulares de CaCu, mostrando así una ventaja sobre los fármacos utilizados actualmente como tratamiento, ya que éstos presentan un alto porcentaje de necrosis. Estudios previos, reportan que el Cisplatino, fármaco frecuentemente usado en el tratamiento del CaCu, provoca una muerte mayoritariamente por necrosis al obtener 57% y 26% de LDH en cultivos de HeLa y CaSki tratados con 5.99 μM y 5.66 μM , respectivamente (Laskar *et al.*, 2018). Así mismo, la evaluación de Taxol a una concentración de 25 μM en líneas celulares

de cáncer de mama mostró que los núcleos celulares se incrementaron en volumen y el contenido de ADN disminuyó gradualmente con el tiempo, lo cual indicaba necrosis (Yeung *et al.*, 1999). Dichos resultados al ser comparados con los obtenidos con el AC, muestran el bajo porcentaje de actividad de LDH que éste presenta; esta característica es de suma importancia ya que descarta la posibilidad de que el mecanismo de acción sea por medio de la activación de la respuesta inmune. Uno de los principales modos de acción de los fármacos quimioterapéuticos puede ser mediante la activación de la apoptosis, mecanismo que ofrece un enfoque novedoso para superar el problema clínico de la resistencia a los medicamentos actuales (Makin & Hickman, 2000). Se sabe que, al observar cambios en la morfología celular, se puede inferir que la célula está entrando en un proceso apoptótico, ya que se distingue una pérdida de la adherencia, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, reducción de tamaño y formación de cuerpos apoptóticos (Hengartner, 2000). Al tratar a las líneas celulares de CaCu se observó una morfología típica de células en un proceso de muerte apoptótica, lo que se corrobora de manera cuantitativa por citometría de flujo, obteniendo porcentajes de 18.8% y 18.3%, respectivamente. Por otro lado, nuestros resultados muestran que el AC induce a las células tumorales de CaCu a una muerte apoptótica, resultados que concuerdan con lo reportado para el Cacalol, el cual se ha descrito que a una concentración de 8.06 $\mu\text{g/mL}$ induce una muerte apoptótica, siendo corroborado por el ensayo TUNEL y la cuantificación de caspasa-3 activa en los lisados celulares (Liu *et al.*, 2011). La actividad del AC en contraste con su precursor, demuestra que la modificación de acetilación no mejora sus propiedades inductoras de apoptosis, sin embargo, las mantiene.

Los fármacos antineoplásicos han demostrado ser altamente citotóxicos principalmente al producir una muerte no selectiva entre la población de células normales y el tejido canceroso. La falta de selectividad en su mecanismo de acción ha generado un gran interés en encontrar nuevos fármacos que puedan explotar la diferencia bioquímica entre una célula normal y una neoplásica (Krishna *et al.*, 2009).

Con la finalidad de esclarecer los efectos citotóxicos del AC en células normales, se realizaron estudios dirigidos a la proliferación en linfocitos humanos, donde se registra que la inhibición de la proliferación fue del 1.01%, a la concentración más alta (26.53 $\mu\text{g/mL}$), que en conjunto con la evaluación de la actividad necrótica, establece que el AC no afecta el potencial proliferativo ni induce una muerte necrótica en linfocitos humanos.

Por lo tanto, se considera que el sesquiterpeno Acetato de Cacalol es un compuesto prometedor ya que posee actividades biológicas como el efecto antiproliferativo mediado por apoptosis y un efecto selectivo en células no tumorales, características importantes que lo posicionan como un buen agente terapéutico para el cáncer cervicouterino en modelos *in vivo*.

11. Conclusiones

1. El Acetato de Cacalol afecta el potencial proliferativo de las líneas celulares de CaCu (HeLa y CaSki) de manera dosis-dependiente con una IC_{50} de 26.53 y 23.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
2. La concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) no presenta un efecto necrótico en las líneas celulares de CaCu (HeLa y CaSki).
3. El Acetato de Cacalol induce una muerte apoptótica en ambas líneas celulares de CaCu (HeLa y CaSki).
4. El Acetato de Cacalol no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas ni presenta un efecto necrótico.

12. Referencias

- Alberts, B., Bray D., Hopkin, K., Jhonson, A., Lewis, J. (2010). *Biología Molecular de la Célula*. Nueva York: Omega.
- ACS (American Cancer Society). (2018). Cervical Cancer. Consultado el 26 de Noviembre del 2018. Sitio web: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
- Annika Rohl. (2008). Discovery of HPV, human papilloma virus, in cervical cancer. 2020, de The Nobel Prize Sitio web: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/illustrated-information/>
- ATCC. (2020). Characteristics and Specifications of the Cell Lines. 2020, de ATCC Sitio web: <https://www.atcc.org/products/all/CRM-CRL-1550.aspx#characteristics>
- Blasco, A. & Caballero, C.. (2019). Toxicidad de los tratamientos oncológicos. De Sociedad Española de Oncología Médica Sitio web: <https://seom.org/guia-actualizada-de-tratamientos/toxicidad-de-los-tratamientos-oncologicos>
- Bosco, A., & Golsteyn, R. (2017). Emerging Anti-Mitotic Activities and Other Bioactivities of Sesquiterpene Compounds upon Human Cells. *Molecules*, 22(3), 459.doi:10.3390/molecules22030459
- Cáceres, J. (2003). *Cáncer y Apoptosis*. México. UNAM: Vertientes
- Cooper G.M. (2009). *The Cell: A molecular approach*. Washington, D.C: ASM Press.
- Eifel PJ, Berek JS, Markman, M. (2011) Cancer of the cervix, vagina, and vulva. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins
- Fieser, L., & Fieser, M. (1985). *Química Orgánica Fundamental*. Barcelona: Reverté.
- García, M., & Vecino, E. (2003). INTRACELLULAR PATHWAYS LEADING TO APOPTOSIS OF RETINAL CELLS. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, vol.78 no.7, 49-57. Oct, 2019, De Elsevier Base de datos.
- Gómez-Vidales, V., Granados-Oliveros, G., Nieto-Camacho, A., Reyes-Solís, M., & Jiménez-Estrada, M. (2014). Cacalol and cacalol acetate as photoproducts of singlet oxygen and as free radical scavengers, evaluated by EPR spectroscopy and TBARS. *RSC Adv.*, 4(3), 1371–1377.doi:10.1039/c3ra42848f

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hengartner, M. O.. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 6805, 770-6. 2020, Enero, De Nature Base de datos.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*.26:239–57.
- Krishna, I. V., Vanaja, G., Kumar, N. S. K., & Suman, G. (2009). Cytotoxic studies of anti-neoplastic drugs on human lymphocytes – In vitro studies. *Cancer Biomarkers*, 5(6), 261–272. doi: 10.3233/cbm-2009-0111
- Makin, G., Hickman, J. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res* **301**, 143–152 (2000). <https://doi.org/10.1007/s004419900160>
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. España: Centro Regional de Investigaciones Biomédicas
- Kim, S. E. Kim, Y. H. Kim, Y. C. Lee, J. J.. (1998). Torilin, a sesquiterpene from *Torilis japonica*, reverses multidrug-resistance in cancer cells. *Planta Med*, 64, 332-4. 2020, Enero 29, De PUBMED Base de datos.
- Laskar, S. Sanchez-Sanchez, L. Flores, S. M. Lopez-Munoz, H. Escobar-Sanchez, M. L. Lopez-Ortiz, M. Hernandez-Rodriguez, M. Regla, I.. (2018). Identification of (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-dithiocarbamate-nitrostyrene hybrid as potent antiproliferative and apoptotic inducing agent against cervical cancer cell lines. *Eur J Med Chem*, 146, 621-635. 2020, Enero, De PUBMED Base de datos.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; 94: 491-501.
- Liu, W. Furuta, E. Shindo, K. Watabe, M. Xing, F. Pandey, P. R. Okuda, H. Pai, S. K. Murphy, L. L. Cao, D. Mo, Y. Y. Kobayashi, A. Iizumi, M. Fukuda, K. Xia, B. Watabe, K.. (2011). Cacalol, a natural sesquiterpene, induces apoptosis in breast cancer cells by modulating Akt-SREBP-FAS signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat*, 128, 57-68. 2020, Enero, De PUBMED Base de datos.
- Manitto, P & Sammes, G.. (1981). Biosynthesis of natural products. New York: Chichester:Ellis Horwood.
- Marure, R. (2003). La regulación del ciclo celular y el cáncer. México. UNAM: Vertientes.

- Mayo Foundation for Medical Education Research. (2018). Cervical Cancer. Noviembre 2018, de Mayo Clinic Sitio web: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cervical-cancer/symptoms-causes/syc-20352501>
- Mora, B. (2016). Actividad antiinflamatoria de compuestos sesquiterpénicos aislados de *Psacalium descompositum* (Gray) Rob. & Brett. en modelo de TPA en la línea celular de macrófagos RAW 264.7.
- Muñoz, A. (2004). *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Madrid: Editorial Hélice.
- NIH. (2015). What is Cancer?. Enero, 2019, de NIH Sitio web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- National Cancer Institute. (2018). Cancer treatments. Consultado el 27 de Noviembre del 2018. Sitio Web: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>
- Norbury CJ, Hickson ID. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41:367–401.
- Pérez, R., Cárdenas, E., Mondragón, P., Erazo, A. (2017). *Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología*. México: ISSSTE.
- Rojas, M., Salmen, S & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. (4)3, 92-106.
- Rodríguez-Hahn, L. & Guzmán, A. & Romo, J.. (1968). The constituents of *cacalia decomposita* A. Gray—IV. *Tetrahedron*. 24. 477–483. 10.1016/0040-4020(68)89046-5.
- Sammar, M. Abu-Farich, B. Rayan, I. Falah, M. Rayan, A.. (2019). Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. *Oncol Lett*, 18, 6563-6571. 2020, Enero 29, De PUBMED Base de datos.
- Sánchez, J., Huerta, M., Rivera, J., Rosales, M. (2005). *Infección por VPH y cáncer cervicouterino*. México: BUAP.
- Sulbarán, A., Matiz, G. E., & Baena, Y. (2018). Acetilación del almidón de millo (*Pennisetum glaucum*) y evaluación de su aplicación como posible excipiente. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 47(2), 255–276.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>

- Widakowich C, De Castro G, Azambuja E,, Dinh P, Awada. (2007). A Review: Side Effects of Approved Molecular Targeted Therapies in Solid Cancers. *Oncologist*; 12:1443-55
- Yi, M., Park, Y., & Chung, K. (2014). Sesquiterpene phytoestrogens isolated from hexanol extracts of *Cyperus rotundus* inhibited aromatase activity. *Natural Products Chemistry & Research*. doi: [.doi.org/10.4172/2329-6836.S1.004](https://doi.org/10.4172/2329-6836.S1.004)
- Yeung, T. K. Germond, C. Chen, X. Wang, Z. (1999). The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochem Biophys Res Commun*, 263, 398-404. 2020, Enero, De MEDLINE Base de Datos.

13. Apéndice

Preparación de reactivos

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42g
NaHCO ₃ (SIGMA, USA)	2g

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 de neonato de bovino (SNB), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. Se almacena a 4°C.

Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de bovino (SNB) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57°C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL para su mejor uso y manipulación.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1000mL de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (SIGMA, USA)	8.00g
Cloruro de potasio (SIGMA, USA)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA)	0.20g

Los reactivos 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 1000mL. Esta solución se filtra por medio de filtros de membrana con diámetro de 42 μ m, la solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Verseno

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

Etilen-diamen-tetra-acético EDTA (SIGMA, USA)	0.4g
Cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA, USA)	8g
Cloruro de potasio (KCl) (SIGMA, USA)	0.4g
Tris (SIGMA, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Solución cristal violeta (0.1%)

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

Hidróxido de sodio (NaOH) (SIGMA, USA)	1.98g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA)	2.14g
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	0.5g

Glutaraldehído (1.1 %)

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Camptotecina

Se disuelven 5 mg de camptotecina en 1mL de DMSO. Se almacena a temperatura ambiente.

Paraformaldehído/glutaraldehído

Calenta en baño maría a 60 °C 20mL de PBS y agregar 0.8 g de paraformaldehído, una vez disuelto, se coloca la solución el hielo. A la solución fría se le agrega 0.8mL de glutaraldehído y se mezcla.