



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**CARRERA DE BIOLOGIA**

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental  
Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

**Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer**

**“ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, APOPTÓTICA Y  
NECRÓTICA DEL SESQUITERPENOS CACALOL EN  
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER  
CERVICOUTERINO”**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Aguilar Llanos Erick Fernando**

Director de Tesis: Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández



CDMX 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*“Nada en la vida es para ser temido,  
es solo para ser comprendido. Ahora  
es el momento de entender más, de  
modo que podamos temer menos.”*

*Marie Curie*

*“El talento es necesario, pero sin  
ilusión no se puede llegar realmente  
lejos.”*

*Fernando Trujillo.*

*A mi madre.*

*Por todo el amor que me has brindado y por siempre creer en mí, por nunca rendirse y por todos los sacrificios que hicieron que yo estuviera aquí. Gracias por estar a mi lado, siempre.*

*A mi padre.*

*Por enseñarme todo lo que se, por todos los valores y principios que me han formado como persona, yo no estaría en este punto sin tí y sin el esfuerzo y sacrificio que has dado por nuestra familia.*

*A mi familia*

*Por su infinito apoyo, cariño y confianza.*

*A Karla.*

*Gracias todo el amor y por ser siempre mi apoyo, por darme ánimos a seguir y ser mi compañera durante esta travesía y todo el tiempo que me has brindado de tu vida.*

*A mis amigos.*

*Jorge, Mario, Ricardo, Paloma, Gerardo. Por los momentos amenos y por siempre hacer que esta aventura fuera más increíble.*

## *Agradecimientos.*

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por sus valiosas aportaciones y por siempre hacer más amena esta experiencia. Gracias por apoyarme y brindarme su tiempo, y por siempre ser paciente, amable y alegre.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por aceptarme y darme un espacio en este proyecto, por sus aportaciones y por su tiempo. Muchas gracias por la confianza.

Al Dr. Fernando Flores Guzmán por brindarme todo su apoyo y conocimiento, por sus valiosas aportaciones y por enseñarme siempre un poco más. Gracias por todo el conocimiento y apoyo.

Al Dr. Hugo López Muñoz por su valioso conocimiento y contribuciones para este proyecto, por ser siempre amable y paciente y hacer mucho más amena esta experiencia. Muchas gracias por la confianza y su conocimiento.

A la Dra. Rosalva Rangel Corona por sus amables aportaciones a este trabajo. Muchas gracias.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de los proyectos: **PAPIIT IN-216718, PAPIIT IN-226420, PAPIIT IN-222321 CONACYT 255881 Y CONACYT 258156**

## Índice.

RESUMEN	6
MARCO TEORICO	7
CÉLULA	7
CICLO CELULAR	8
NECROSIS	10
APOPTOSIS	11
CÁNCER	13
CÁNCER CERVICOUTERINO	14
TRATAMIENTOS	17
TERPENOS	18
SESQUITERPENOS	19
CACALOL	20
PLANTEMINETO DEL PROBLEMA	23
JUSTIFICACIÓN	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	25
METODOLOGIA	26
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA	50
APÉNDICE	52

## Resumen.

El cáncer actualmente es un problema de salud pública a nivel nacional y mundial, causando la muerte de 8,8 millones de personas y es catalogada como la segunda causa de muerte a nivel mundial. En particular el Cáncer Cervicouterino presenta alta incidencia en países en vías de desarrollo como lo es México, en 2012 se registraron 528,000 casos y casi el 85% de estos se encontraban en países de este tipo, además de las 266,000 muertes por este tipo de cáncer el 87% se concentraron en dichos países. En México el cáncer es la tercera causa de muerte solo después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. A falta de una cultura de prevención en nuestro país el cáncer cervicouterino es el tercer en incidencia y la segunda causa de muerte en mujeres solo después del cáncer de mama. Es por ello que la investigación contra esta enfermedad se ha concentrado en buscar terapias alternativas y fármacos que puedan ayudar a frenar este problema de salud a nivel mundial. Los compuestos naturales siempre han destacado por ser un tipo de medicina alternativa tal es el caso del sesquiterpeno cacalol que ha demostrado tener acción antiinflamatoria, antioxidante, pero sobre todo actividad antitumoral en líneas de cáncer de mama sin embargo no existe información sobre la acción de este compuesto sobre otros tipos de cánceres entre ellos el cáncer cervicouterino. En este sentido se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de este compuesto en 2 líneas de cáncer cervicouterino (HeLa y CaSki). Los resultados obtenidos muestran el potencial antiproliferativo de manera dosis dependiente del cacalol con una  $IC_{50}$  para HeLa y CaSki de 16.19 y 16.04  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente sin generar una muerte necrótica de manera significativa al no liberar la enzima LDH al medio de cultivo. El análisis morfológico, así como la detección de la caspasa 3 activa arrojó que el sesquiterpeno inducía a el 37% y el 49.9% de las células de las líneas celulares HeLa y CaSki respectivamente a una muerte por apoptosis. Por último, un estudio del efecto del cacalol a células linfocíticas arrojó que este no detuvo o afectó la proliferación de estos. Los resultados hacen que el cacalol sea un candidato con potencial para ser un futuro tratamiento quimioterapéutico alternativo a los ya existentes.

## Marco Teórico.

### La célula.

La célula es la unidad mínima fundamental de todos los organismos, capacitada para actuar de manera autónoma y en conjunto con otras para generar tejidos y órganos en niveles de organización más complejos (Cassian, 2006). Ésta es capaz de metabolizar y generar sus propios constituyentes tomando elementos del medio extracelular y de responder a diversos estímulos tales como la proliferación, el crecimiento, la supervivencia y la muerte (Elena, 2002).

Aunque hay diferentes tipos de células éstas tienen características que comparten como:

- Delimitación del medio exterior por una membrana celular que controla el paso de sustancias del exterior hacia el interior y viceversa.
- Una “maquinaria” para la síntesis de elementos como proteínas, organelos, producción de energía etc.
- Un material genético con las instrucciones para el funcionamiento celular.
- Contienen un medio acuoso interno o citosol en donde se encuentran los organelos celulares (Campbell, 2007).

Una célula puede ser de dos tipos primordiales: procariota o eucariota. Las células eucariotas se caracterizan principalmente por tener una membrana que separa su material genético del resto de la célula llamada núcleo. Las células procariotas en cambio tienen un nucleóide el cual es una región donde se concentra el material genético, pero no está delimitada por una membrana como es el caso de las células eucariotas. Además, las células procariotas carecen de organelos específicos como es el caso de: centriolos, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas.

Las células eucariotas van a estar presentes en los organismos pluricelulares (Alberts, 2008)



Las células como un ser vivo puede reproducirse para generar nuevas células, la división de una célula conlleva a la distribución de material genético idéntico en dos células hijas mediante un proceso llamado ciclo celular. Lo más notable de este proceso es la fidelidad con la que este material genético pasa de una generación de células a otra. En resumen, una célula en división duplica su ADN para posteriormente trasladar las dos copias a polos opuestos y generar dos células hijas.

### **Ciclo Celular.**

El ciclo celular es un conjunto de eventos ordenados y regulados que culmina con el crecimiento de la célula y su división. Para que ocurra una apropiada división, toda célula eucariota debe seguir un correcto programa genético, la cual da lugar a la expresión de diversos genes específicos que deben ser expresados en un tiempo específico dentro del ciclo (Rodríguez, 2004).

El ciclo celular está dividido en dos partes diferentes: la interfase y la fase M.

#### **Interfase.**

Es la fase en la que no se presentan grandes cambios visibles en la estructura de la cromatina, sin embargo, la célula se encuentra en plena actividad de síntesis de todo tipo de sustancias, incluidas las necesarias para dividirse después de esta, es decir, está bien diferenciada molecularmente pero no morfológicamente. Está dividida en tres: la fase G1 donde la célula produce todas las proteínas necesarias para la síntesis de ADN y nuevo material citoplasmático. La fase S o de síntesis donde la célula duplica su ADN, al terminar esta fase la célula tiene el doble de ADN y proteínas nucleares la cual asegura que al final de la división cada una de las células hijas tenga una copia completa de ADN. La fase G2 es la segunda fase de crecimiento, se sigue sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y organelos que da lugar al aumento de tamaño de las células y cambios visibles en la estructura celular (Rodríguez, 2004).

## Fase M

Fase en la que se muestra un cambio visible en la célula además de presentarse cambios morfológicos bien diferenciados como la condensación de la cromatina, la cariocinesis y la citocinesis. La fase M a su vez está dividida en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase. En éstas la cromatina se condensa, formando cromosomas visibles que se disponen en la placa ecuatorial para que posteriormente cada cromátida hermana de cada cromosoma se separen a polos opuestos, se reorganice la estructura nuclear y así la célula culmine su ciclo de división en la citocinesis que es la división del citoplasma (Alberts, 2008).

Como ya se dijo anteriormente, el ciclo celular y sus eventos está regulado molecularmente. El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina). Las formas activas de los complejos CDK-ciclina están constituidas de dos proteínas (una cinasa y una ciclina). Las cinasas son enzimas que realizan la fosforilación de proteínas, y este evento es de gran importancia para la regulación del ciclo celular. Los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. Por lo tanto, la dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, entre otros muchos sucesos (Peralta, 1997).

Cuando en estos sucesos ordenados y perfectamente regulados ya mencionados anteriormente ocurre un error o bien la célula ha llegado a su límite de replicación y sobrevivencia ésta entra en un proceso muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de un organismo: La muerte celular.

### **Muerte celular.**

Las células dentro de un tejido mantienen un estricto orden, el equilibrio y la organización de este sistema están regulados estrictamente por la velocidad de división, así como la de muerte de las células que la conforman (Alberts, 2008)

Las células pueden entrar en un proceso de muerte gracias a la ausencia de factores de crecimiento o supervivencia o a señalización por receptores de muerte, también puede haber un daño en los múltiples mecanismos moleculares internos lo que desencadena la muerte de esta. La muerte celular es esencial en la homeostasis de un organismo.

Dentro de tipos de muerte celular los dos más estudiados son la necrosis y la apoptosis.

### **Necrosis.**

La necrosis es un tipo de muerte celular donde las células o un tejido mueren por causa de un daño mecánico o un agente nocivo, cabe destacar que este tipo de muerte no es programado.

La característica fundamental de una muerte necrótica que la diferencia de la apoptosis es la pérdida de los potenciales de membrana causadas principalmente por la pérdida de la energía celular, daño en los lípidos de la membrana y la pérdida de la función de las bombas iónicas que regulan la homeostasis de la célula. Durante ésta, las células se hinchan primero y luego la membrana plasmática se colapsa y las células se lisan rápidamente. Además, tiene cambios marcados en la célula como la dilatación en el retículo endoplasmático y las mitocondrias además de fragmentación de la cromatina. Las características bioquímicas de la apoptosis, como la activación de proteasas específicas (caspasas) y la fragmentación oligonucleosómica del ADN, suelen estar ausentes en las células necróticas (Sergey, 2002)

El ADN además es partido en fragmentos irregulares al azar. Debido también a la pérdida de la integridad de la membrana el contenido citoplasmático es volcado hacia el espacio extracelular provocando una respuesta inmune y una inflamación en el área, los restos de las células son fagocitados por células del sistema inmune (Adolfo. 2002).

## **Apoptosis.**

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, este tipo de definición es adoptada para diferenciarlas de las muertes celulares accidentales como la necrosis. En la apoptosis se activan diversos tipos de genes y actúan diferentes tipos de moléculas que desencadenarán una cascada de reacciones en el núcleo y el citoplasma que finalmente lleven a la muerte celular. Sin embargo, en muchos casos la puesta en marcha de este proceso también dependería de la supresión de ciertos factores que vienen del exterior (más específicamente inductores de proliferación o crecimiento celular) que mantienen vivas a las células.

Los cambios morfológicos que experimentan las células al entrar en un proceso apoptótico son característicos y son los siguientes:

- Se compacta la cromatina.
- Alteraciones en la conformación del citoesqueleto, derivando en la deformación de la célula (morfología esférica, pierden la morfología típica) y la pérdida de contacto con las células vecinas o la matriz extracelular.
- Las moléculas de ADN se fragmentan de manera ordenada debido a que son cortadas en varios puntos por las endonucleasas.
- El citosol y los organelos se condensan.
- Las proyecciones a medida que se desprenden de la superficie celular se convierten en cuerpos apoptóticos que contienen derivados nucleares y compuestos del citoplasma

Al final de este tipo de muerte los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos y células vecinas y contrario a la necrosis se produce sin que haya alteración en la arquitectura tisular ni inflamación.

Este tipo de muerte puede ocurrir incluso sin una fragmentación oligonucleosomal o activación de caspasas (De Toro, 2006)

La apoptosis está estrictamente regulada por diversos genes, tal como pasa con otros procesos celulares como la diferenciación o la proliferación. Algunos genes que participan en este proceso son: Proteínas derivadas de los genes bcl-2 que

pueden ser pro apoptóticas (Bad, Bax, Bix, Noxa, Puma) o reguladores negativos de la apoptosis (Bcl-2 y Bcl-xL). Las proteínas Myc derivada del gen myc promueven según las circunstancias la proliferación o la muerte celular. El gen p53, un gen supresor de tumor que estabiliza a la célula en la fase G1 del ciclo con el fin de controlar daños en el ADN, si existiera un daño el mismo gen p53 llevaría a la muerte apoptótica a la célula (Roberts, 2000).

La apoptosis entonces puede ser desencadenada principalmente por 2 vías: La vía intrínseca y la vía extrínseca.

### **Vía extrínseca**

También llamada vía por receptores de muerte, como su nombre lo indica comienza cuando los ligandos de muerte se unen a su receptor de muerte. Aunque se han descrito muchos receptores de muerte los más comunes o importantes son TNF tipo 1 y Fas con sus respectivos ligandos. Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta a proteínas adaptadoras tales como el dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD) y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como a cisteína-proteasas como las caspasas. La unión de un ligando de muerte a un receptor de muerte, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte). FADD presenta un dominio efector de muerte (DED) y por interacciones homologas recluta en el DISC a la pro-caspasa-8. La forma activa de esta enzima, la caspasa 8, es una caspasa iniciadora, que comienza la apoptosis reclutando otras caspasas ejecutoras río abajo (Sosa, 2012) tales como las caspasas 3, 6 y 7 que van a desencadenar los procesos de degradación del material genético y los procesos que caracterizan a este tipo de muerte celular.

### **Vía intrínseca**

Esta vía no requiere de receptores de muerte y se activa por diversos mecanismos internos de las células, desde el acortamiento de los telómeros, daño al ADN, estrés,

especies reactivas de oxígeno o simplemente por la ausencia de señales exteriores de crecimiento y desarrollo.

También es conocida como vía mitocondrial por el daño al citosol o núcleo, en ésta se activa la transcripción de varios genes, entre ellos los proapoptóticos de la familia Bcl-2: Bax, Bak, Bid (Elinos, 2003), éstos al ser activados propician la formación de poros en la membrana mitocondrial y la salida, de entre otros factores, del Citocromo C que se unirá a Apaf-1 y a la caspasa 9 para formar el apoptosoma que va a activar a las pro-caspasas ejecutoras (Caspasa 3, 6, 7) para llevar cabo todo el proceso apoptótico.

Otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembranal mitocondrial hacia el citoplasma incluyen al factor inductor de apoptosis (AIF), al segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smac), a la proteína de unión al IAP directo con bajo pH (DIABLO) y la proteína A de requerimiento de alta temperatura /Omi (HtrA2); éstos harán complejos que promoverán la activación de las caspasas al unirse al inhibidor de las proteínas de apoptosis (IAPs) que posteriormente lleva a la disrupción en la interacción de los IAPs con la caspasa 3 o 9 (Sosa, 2012).

Los mecanismos están estrictamente regulados y cualquier cambio en estos procesos producen cambios en la expresión génica las cuáles vuelven a las células más propensas de acumular y adquirir mutaciones que favorecen a la aparición de crecimientos malignos de células anormales llamado cáncer (Sánchez, 2013).

## **Cáncer**

El cáncer es una enfermedad provocada por el crecimiento sin control y de manera autónoma de un grupo de células invadiendo tejidos localmente y a distancia en un proceso llamado metástasis.

Datos del 2015 demuestran que el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo: ocasionó 8,8 millones de defunciones. Casi una de cada seis decesos en el mundo se debe a esta enfermedad. Además del impacto sobre la salud humana el cáncer tiene un impacto económico sustancial y va en aumento: Según las

estimaciones, el costo total atribuible a la enfermedad en 2010 ascendió a \$1,16 billones de dólares totales (OMS, 2015) Los cinco tipos de cáncer que tienen más alto nivel de incidencia a nivel mundial son: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y de Mama.

En México esta enfermedad es la tercera causa de muerte tan solo después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Además, los cánceres de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más incidentes en la población general en ambos sexos (SMeO, 2020). Para los hombres los cánceres más mortales son el de próstata, pulmón, colorrectal, hígado y gástrico; para las mujeres los más mortales son el de seno, cervicouterino, hígado, colorrectal y ovario en ese orden (OMS, 2020).

El cáncer tiene sellos distintivos o “Hallmarks”, que son características propias de esta enfermedad, y no necesariamente se deben presentar todas dentro de ésta. Dentro de estos sellos distintivos se encuentran: proliferación sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, activación de la invasión o metástasis, inducción de la angiogénesis, resistencia a la muerte e inmortalidad Replicativa (Hanahan, 2011).

Existen diversos factores de riesgo para contraer una enfermedad cancerígena, regularmente pueden ser ocasionadas por: agentes físicos (radiaciones ionizantes o ultravioleta), agentes químicos (humo del tabaco o el humo de leña), agentes biológicos (virus de la hepatitis B). También puede existir un desarrollo neoplásico por anomalías genéticas, por la participación de oncogenes (De la garza, 2011) o por mutaciones en genes supresores de tumores como las proteínas p53 y Rb.

### **Cáncer Cervicouterino.**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo tipo de cáncer en frecuencia en mujeres de todo el mundo y el tercero en México (OMS, 2015). La mayoría de los casos ocurren en países en vías de desarrollo. Existen diversos factores de riesgo

para contraer esta enfermedad sin embargo la infección por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocido como uno de los principales factores etiológicos para el desarrollo del CaCu (Zaldívar, 2012).

Se presenta con mayor frecuencia en mujeres que tienen numerosas parejas sexuales, que han comenzado su vida sexual activa precozmente o con embarazos a temprana edad. Además del VPH existen otros agentes infecciosos que también son un factor de riesgo entre ellos Herpes tipo II (HSV-2), y clamidia. Otros factores asociados son las deficiencias de vitaminas A, E y C, inmunodeficiencias y el hábito de fumar (León, 2004).

En el 80-90 % de los casos diagnosticados con CaCu se ha identificado el ADN transcrito y los productos proteicos del VPH. A partir de este virus se han aislado, secuenciados y clonados al menos 100 tipos y, de ellos, 50 están asociados al tracto genital femenino.

Dentro de los tipos de VPH los más agresivos son el VPH 16 y VPH 18 los cuales son considerados los de "alto riesgo" por su gran potencial carcinogénico que se diferencian, por ejemplo, del VPH 11 y 16 que usualmente causan solo verrugas benignas. El VPH-16 es el tipo que aparece, fundamentalmente, en los tumores invasivos y en los de alto grado de malignidad; el VPH-18 se relaciona con el carcinoma pobremente diferenciado y con un mayor compromiso de los ganglios linfáticos (León, 2004)

Durante el ciclo replicativo del VPH, la infección de células por éste conduce a la activación de una cascada de genes virales que provoca la producción de copias extracromosómicas del ADN viral.

Cuando la célula comienza su diferenciación y sale del ciclo celular hay una regulación positiva de la expresión de los genes virales en la que se observa una abundante expresión de los genes E6 y E7 (Montalvo, 2011), los cuales son considerados oncogenes y cuyos productos proteicos se unen a los supresores de tumores p53 promoviendo su degradación por el proteosoma e inhibiendo la



apoptosis y a pRb liberando el factor de transcripción E2F promoviendo la proliferación celular (Lizano, et al, 2009).

### Clasificación y diagnóstico.

Existen distintos estadios del cáncer cervicouterino según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO, por sus siglas en inglés) las cuales son las siguientes (Montalvo, 2011):

Etapa	Descripción
<b>I</b>	Tumor confinado al cuello uterino
	<b>IA</b> Tumor con invasión diagnosticada con una profundidad máxima de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
	<b>IA1</b> Invasión estromal menor o igual a 3 mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
	<b>IA2</b> Invasión estromal mayor a 3 mm pero menor a 5 mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
	<b>IB</b> Tumor visible confinado al cérvix
	<b>IB1</b> Lesión visible menor o igual a 4 cm en su dimensión mayor.
	<b>IB2</b> Lesión visible mayor a 4 cm en su dimensión mayor.
<b>II</b>	Tumor que se extiende más allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
	<b>IIA</b> Tumor que invade fondos del saco vaginal sin invasión parametrial.
	<b>IIA1</b> Tumor menor de 4 cm.
	<b>IIA2</b> Tumor mayor de 4 cm.
	<b>IIB</b> Tumor con invasión parametrial sin llegar a la pared pélvica.
<b>III</b>	Tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
	<b>IIIA</b> El tumor se extiende al tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
	<b>IIIB</b> El tumor se extiende a la pared pélvica, riñón excluido y/o disfunción renal.
<b>IV</b>	El tumor se extiende fuera de la pelvis o presente.
	<b>IVA</b> El tumor invade la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.
	<b>IVB</b> Metástasis a distancia.

Figura 1: Estadios del CaCu según FIGO (Modificado).

El CaCu está caracterizado por una fase premaligna bien definida, la cual puede ser detectada por examen citológico de células cervicales exfoliadas (prueba de Papanicolaou).

Los cambios premalignos cervicales se representan en 3: NIC 1 (Neoplasia cervical intraepitelial) (displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) y NIC 3 (displasia severa/carcinoma in situ), esta última se desarrolla hasta un cáncer invasivo (Zaldívar, 2012)

### **Tratamientos.**

Los esfuerzos para estudiar y analizar las bases moleculares del cáncer para así poder obtener un tratamiento clínico no son nuevos, estos se remontan desde la identificación de los primeros oncogenes y genes supresores de tumores en la década de los 70's, así como el descubrimiento de como éstos alteran el orden normal de las vías de traducción de señales en una célula en la década de los 90's.

Los tratamientos contra el CaCu se dividen en tratamientos localizados como son la cirugía y la radioterapia y tratamientos sistémicos como la quimioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia y el uso de uno y otro dependerá de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el tumor. En cuanto al tratamiento contra el cáncer cervicouterino se hacen diagnósticos precoces utilizando citología, colposcopia y biopsia dirigida por colposcopia. Para NIC de bajo grado varían ampliamente en el mundo, destaca la simple observación hasta terapias donde se hace una biopsia de la lesión.

En pacientes con un NIC de alto grado se recomienda curetaje endocervical que consiste en raspar el revestimiento del canal endocervical con un instrumento estrecho llamado cureta de no existir lesión visible en el ectocérvix. En toda paciente con NIC de alto grado confirmado por biopsia debe realizarse una cirugía que consiste en una biopsia en forma de cono (Conización). (Serman, 2002)

Existen cirugías mayores donde hay lesiones precancerosas y no hay interés de fertilidad o hay una progresión mayor del cáncer se recurre a la histerectomía (extracción del útero solo o con tejidos vecinos) por vía abdominal o vaginal.

En estado metastásico a órganos aledaños o a distancia se recurre a los tratamientos como quimioterapia. Una de las desventajas de la quimioterapia es que no son específicas ya que además de atacar células tumorales también se ven afectadas las células sanas con altas tasas de multiplicación, dando lugar a efectos secundarios adversos para los pacientes.

La primera generación de medicamentos contra el cáncer fueron los citotóxicos que todavía forman parte de la mayoría de los regímenes de tratamientos, muchos de estos descubiertos mediante la detección de compuestos que matan células tumorales bajo el concepto de que éstas replican su ADN y se dividen con mayor frecuencia que las sanas. Esta afirmación llevo al desarrollo de agentes que dañan ADN, no permiten la síntesis de éste o inhiben microtúbulo. Estos agentes han demostrado ser ineficaces y con múltiples efectos secundarios (Collins 2006).

La ineficiencia de estos tratamientos junto con su alta toxicidad ha provocado que se sigan buscando compuestos que puedan servir como terapias alternativas que no provoquen estos efectos secundarios negativos. En los últimos años se ha adoptado la biología molecular del cáncer y el conocimiento de compuestos con propiedades antitumorales para el descubrimiento de posibles terapias y fármacos que puedan ser alternativas a las actuales ya mencionadas. Destacan los compuestos de origen natural con propiedades antitumorales como los terpenos que están ampliamente distribuidos en aceites esenciales de organismos vegetales.

### **Terpenos.**

Los terpenos o isoprenoides son un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos más ampliamente distribuido. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono.

Los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales (López, 2012)

En las plantas los terpenos cumplen muchas funciones primarias: algunos pigmentos carotenoides son terpenos, también forman parte de la clorofila y las hormonas giberelina y ácido abscísico. Los terpenos también cumplen una función de aumentar la fijación de algunas proteínas a las membranas celulares, lo que es conocido como isoprenilación (Goodwin, 1971)

Los terpenos se clasifican en:

- Hemiterpenos: Terpenos pequeños con una sola unidad: isopreno.
- Monoterpenos: Terpenos de 10 carbonos.
- Sesquiterpenos: Terpenos de 15 carbonos.
- Diterpenos: terpenos de 20 carbonos.
- Sesteterpenoides: Terpenos de 25 carbonos.
- Triterpenos: Terpenos de 30 carbonos.
- Tetraterpenos: Terpenos de 40 carbonos.
- Politerpenos: Terpenos que contienen más de 8 unidades de isopreno.
- Meroterpenos: Metabolitos secundarios de las plantas que tienen orígenes sólo parcialmente derivados de terpenos.
- Esteroides: Triterpenos basados en el sistema de anillos ciclopentanoperhidrofenantreno.

Se ha demostrado que los terpenos tienen diversas propiedades que van desde las propiedades amebicidas, antiinflamatorias y antimicrobiana (Lanhers, 1992), (West, 2012) así como propiedades anticancerígenas y antioxidantes (Liu, 2011), (Shindo, 2004).

### **Sesquiterpenos.**

Los sesquiterpenos como ya se mencionó son terpenos que se componen de 15 carbonos.

Son terpenoides que presentan gran diversidad estructural y han sido aislados de numerosas fuentes naturales. Se conocen más de 200 tipos de sesquiterpenos, que

se corresponden con disposiciones diferentes de sus carbonos. En las plantas predominan los sesquiterpenoides con esqueleto de germacrano, eudesmano y guayano, sobre todo, en la familia de las Asteraceae (Ruiz, 2015).

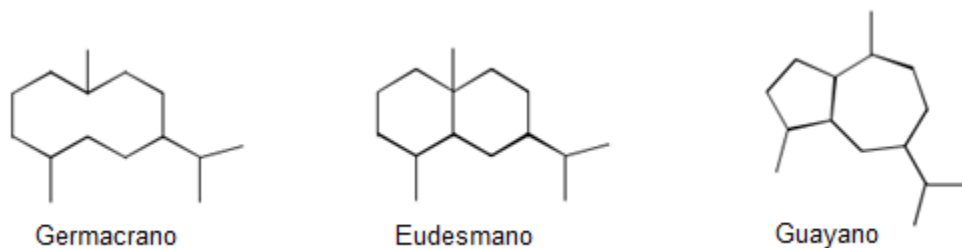


Figura 2: Esqueletos de los sesquiterpenos más predominantes. (Modificado)

### **Cacalol, generalidades y antecedentes.**

El Cacalol es un sesquiterpeno natural contenido en miembros del género *Cacalia*, perteneciente a la familia *Asteraceae*, esta familia se desarrolla principalmente en regiones templadas de todo el hemisferio norte, principalmente en Asia y Europa.

Se han descrito desde 1964 diferentes componentes de esta familia, Keizo Naya describió 12 sesquiterpenos en las plantas nativas de Japón: *Cacalia delphinifolia* y *Cacalia hastata* extraídos de la raíz y de la planta entera por cromatografía en columna, dentro de los compuestos encontrados estaba el Cacalol (Naya, 1976).

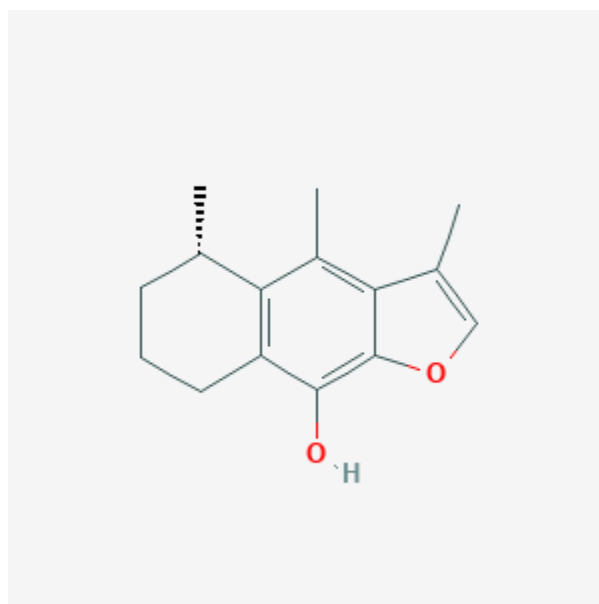


Figura 3: Estructura del cacalol

## **Propiedades terapéuticas.**

Este compuesto se ha caracterizado por mostrar propiedades biológicas y terapéuticas.

Se ha reportado que la planta *Cacalia decomposita* en la cual se encuentra en abundancia se utiliza tradicionalmente como remedio medicinal en el norte de México contra dolores, reumatismo, enfermedades renales, hepáticas, así como enfermedades gastrointestinales y como un tratamiento antidiabético. (Jiménez, 2006).

Jiménez y cols. (2006) obtuvieron un extracto de Cacalol a partir de hexano e inhibieron el edema, en un modelo murino donde se indujo un edema de oído, producido por carragenina (Compuesto químico de origen vegetal comúnmente usado en diversos productos comerciales) y TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), compuestos usados para la inducción de edemas en ratones, sin embargo, concluyeron que se necesitan de más experimentos para establecer que el Cacalol tiene un uso terapéutico potencial (Jiménez, 2006).

En este se extrajo con hexano de las raíces de la planta *Cacalia decomposita* en la cual se encuentra abundantemente. Se ha reportado que esta planta el compuesto se extrajo con éter de petróleo a temperatura ambiente.

El cacalol también ha demostrado tener una propiedad antioxidante por peroxidación lipídica en un homogenizado de cerebro de rata con una  $IC_{50}$  de 40 nM, 100 veces más efectivos que inhibidores tales como tocoferol ( $IC_{50}$  14M) y catequina ( $IC_{50}$  5.8M) además de poseer potente capacidad neuroprotectoras al proteger el hibridoma neural N18-RE-105 del compuesto L-glutamato que induce muerte celular neural; el cacalol inhibió la toxicidad de éste midiendo el porcentaje de supervivencia celular, se demostró que incluso a una concentración de 100M el cacalol no era citotóxico y que el porcentaje de supervivencia de 100% correspondía a una concentración de 0.8M (Shindo, 2004).

El Cacalol también mostro tener potencial para ser un agente utilizado en Terapia Fotodinámica (PDT). A pesar de que se ha reportado que éste tiene propiedades

antioxidantes lo cual contrarresta el efecto de las FDT se proporcionó evidencia de que el cacalol tiene propiedades prooxidantes en presencia de un fotosensibilizador como la Hematoporfirina. Mediante la prueba de Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR) donde 2,2,6,6-tetrametil-piperidina (TEMP) reacciona selectivamente con O<sub>2</sub> produciendo TEMPO estable bajo radiación de luz visible, se encontró que la foto producción de TEMPO aumenta al agregar 70µM de Cacalol. Además, se comprobó sus propiedades antioxidantes utilizando pruebas como Fenton y TBARS en las que se observó la acción de éste para capturar radicales ·OH, alquilo y peroxilo los cuales se caracterizan por su inestabilidad, reactividad y su alto potencial de oxidación. En conclusión, los estudios del cacalol como foto productor de oxígeno singlete y como “carroñeros” de radicales libres fueron demostradas efectivamente. El doble papel del Cacalol de producción/inhibición hace que éste sea una opción interesante para aplicaciones en terapia fotodinámica, la cual se puede usar para inducir un efecto citotóxico o modificador sobre enfermedades como el cáncer o algún tejido no deseado. (Gómez, et. al, 2014)

En cuanto a propiedades antitumorales del cacalol se ha reportado que tiene un efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB231 (IC<sub>50</sub> 17.5 µM) además de inducir apoptosis mediante la inhibición del gen Fas (Sintasa de ácido graso) que dio lugar a la apoptosis a través de la activación de DAPK2 y caspasa 3 además de la inhibición del Akt-esterol. Incluso se reporta que en conjunto con tratamientos quimioterapéuticos éste dio un resultado potenciado. Por otra parte, en modelos *in vivo* donde se indujo el desarrollo de tumores por vía intraperitoneal disminuía significativamente. Además, se suministró el sesquiterpeno antes de inducir los tumores cada dos días, en total 5 suministros, en los ratones y demostró tener propiedades quimiopreventivas al reducir el volumen de los tumores que posteriormente fueron inducidos y monitoreados por 3 semanas. (Liu, 2011).

Con base en lo anterior, el cacalol tiene diversas propiedades entre las que se destacan sus efectos antitumorales. El presente trabajo generará nueva información sobre este compuesto evaluando su potencial antiproliferativo y proapoptótico en un

modelo *in vitro* a través de uso de células de cáncer cervicouterino (HeLa, CaSki) que se ha convertido en un problema de salud pública a nivel nacional e internacional.



## **Planteamiento del Problema.**

Los actuales tratamientos contra el cáncer tienden a ser poco eficientes y no selectivos, además de que son poco efectivos contra estadios avanzados de una enfermedad neoplásica, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de tratamientos alternativos de origen natural que puedan tener un efecto antitumoral, que sea selectivo, eficaz y que contribuyan al tratamiento contra esta enfermedad. Los terpenos juegan un papel importante en la medicina tradicional y son ampliamente utilizados por sus propiedades biológicas, entre ellos se encuentran los sesquiterpenos tales como el cacalol, el cual ha demostrado propiedades antiproliferativas en células tumorales y podría tener potencial en el tratamiento de CaCu.

## **Justificación.**

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es la cuarta causa de muerte en mujeres en el mundo y la segunda en México. En nuestro país es el segundo tipo de cáncer de más frecuencia en mujeres con aproximadamente 7900 nuevos casos (7.5%). La distribución de esta enfermedad aumenta a partir de los 35 años de edad y el grupo más vulnerable es la que se encuentra entre los 40 y 50 años de edad, sin embargo, cada vez hay más registros de mujeres jóvenes que contraen esta enfermedad.

Debido a la alta incidencia y el alto grado de mortalidad de los casos de CaCu es necesario implementar nuevos tratamientos alternativos a los ya establecidos a través del uso de compuestos de origen natural que tengan potencial antitumoral y ayuden a contener este problema de salud pública.

Se ha demostrado que el Cacalol tiene actividad anticancerígena, sin embargo es poco el conocimiento que se tiene sobre las propiedades de este sesquiterpeno en CaCu y por tanto es necesario generar mayor información acerca de la acción de este sesquiterpeno para que puedan ser considerados como futuros agentes terapéuticos contra el cáncer cervicouterino.

## **Hipótesis.**

Se ha demostrado que el sesquiterpeno “Cacalol” tiene efecto antiproliferativo y además que índice muerte por apoptosis en líneas de cáncer de mama (MFC7 y MDA-MB231), por lo tanto, se espera que este tenga actividad antiproliferativa y que induzca un proceso apoptótico en líneas de cáncer cervicouterino.

## **Objetivos.**

Objetivo General:

-Evaluar la actividad antiproliferativa, apoptótica y necrótica del sesquiterpeno Cacalol en líneas celulares de Cáncer Cervicouterino.

Objetivos Particulares:

-Determinar la actividad antiproliferativa del cacalol expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% del número celular ( $IC_{50}$ ) mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.

-Evaluar la actividad necrótica del compuesto en cultivos de líneas celulares tumorales mediante la cuantificación de la actividad de la enzima Lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de dichos cultivos de líneas celulares de CaCu.

-Determinar la actividad apoptótica del cacalol a través de la observación de la morfología apoptótica en las líneas celulares de CaCu evaluada por microscopía de contraste de fases y de fluorescencia, así como la detección de caspasa 3 activa observada por microscopía de fluorescencia y cuantificada por citometría de flujo.

-Evaluar el efecto antiproliferativo del cacalol en cultivos de células no tumorales (linfocitos de sangre periférica) mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína.

-Evaluar la actividad de la enzima Lactatodeshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes provenientes de cultivos de células no tumorales expuestos al compuesto.

## **Método.**

### **Cultivo de líneas celulares.**

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva a VPH-18 (ATCC, USA) y CaSki, provenientes de carcinoma cervicouterino que fueron establecidas partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, positivas a VPH-16 (ATCC, USA) fueron cultivadas en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) con 10 ml de medio RPMI 1640 (Microlab, MEX) con L-glutamina rojo fenol y bencilpenicilina, a 5% de suero neonato de ternera (SNT) previamente desactivado a 57°C por 30 minutos.

Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuair, US) a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda saturante.

### **Preparación del compuesto.**

En una balanza analítica se pesaron 1mg de compuesto cacalol y se solubilizó en 100µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) y se mantuvo a una temperatura ambiente.

A esta solución se añadieron 900 µL de medio de cultivo RPMI 1640 (Microlab, MEX) al 5% de suero para obtener en esta solución una concentración final de 1µg/µL. De esta solución se tomaron los microgramos necesarios para llevar a cabo los ensayos experimentales.

### **Evaluación de la actividad antiproliferativa mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.**

Las líneas células HeLa y CasKi se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 6000 células/pozo en 100 µL de RPMI 1640 (Microlab, MEX) al 5% de suero de neonato de ternera (SNT) y se incubaron a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda saturante durante 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas se retiró el medio de la placa y las células se estimularon a diferentes concentraciones

Las concentraciones del compuesto se encontraban en RPMI-1640 (Microlab, MEX) al 5% de suero neonato de ternera (SNT) y se incubaron durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas del tratamiento se retiró el medio de cultivo e inmediatamente fueron fijadas con de glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 minutos en agitación constante. Al termino de lavo la placa con agua corriente y se dejó secar al aire. Posteriormente se añadió de colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6 con agitación constante por 20 minutos.

Se retiró y se eliminó el exceso de colorante lavando con chorro de agua corriente y se dejó secar al aire. Posteriormente se agregó ácido acético (J. T. Baker, USA) al 10% y se dejó en agitación constante durante 20 minutos con la intención de solubilizar el colorante retenido.

Transcurridos los 20 minutos de agitación constante finalmente la absorbancia fue determinada en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 590 nm.

Una vez obtenidas las absorbancias se procedió a realizar una curva de dosis respuesta. Los datos fueron linealizados y mediante la ecuación de la recta se determinó la concentración en la cual la concentración celular disminuía al 50% (IC<sub>50</sub>, concentración inhibitoria 50) así como el coeficiente de relación para dicha recta.

### **Determinación de la actividad necrótica mediante la evaluación de la actividad de la enzima lactato Deshidrogenasa (LDH).**

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 6000 células/ pozo en 100 µL de medio RPMI-1640 (Microlab, MEX) al 5% de SNT y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se realizaron las siguiente condiciones: Blanco, control basal con únicamente medio de cultivo RPMI-1640 al

5% SNT, un control con el vehículo usado en la experimentación (DMSO), un control positivo en el que las células fueron listadas durante una hora con 10  $\mu$ L de una solución al 2% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich USA) en RPMI-1640 y los tratamientos con las diferentes concentraciones del compuesto.

Pasadas las 24 horas los medios fueron retirados y pasados a una placa cónica de 96 pozos (Corning, USA) y se centrifugaron (Centrifuga Orto alresa, digicen 21 R) a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, posteriormente se recuperaron del sobrenadante 40  $\mu$ L y se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) y se agregaron 30  $\mu$ L de reacción del kit Cytotox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) a cada pozo.

La placa se mantuvo a temperatura ambiente protegida de la luz con papel aluminio durante 25 minutos. Finalmente se colocó solución de paro (Ácido Acético 1M) y se midió la absorbancia en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 490 nm. Una vez obtenidas las absorbancias se realizó el procesamiento de los datos correspondiente para la cuantificación de la enzima.

### **Observación de la morfología apoptótica mediante microscopia de fluorescencia con marcador DAPI e Inmunodetección de caspasa 3 activa mediante marcaje con FIT-C por inmunocitoquímica.**

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 6000 células por pozo en 100  $\mu$ L de medio RPMI-1640 (Microlab, MEX) al 5% de SNT y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmosfera saturante por 24 horas.

Posteriormente se cambió el medio al control por medio fresco, se adiciono un control vehículo de DMSO en medio de cultivo. Además, se agregó medio con camptotecina (7  $\mu$ g/mL). Se adiciono también un tratamiento del compuesto Cacalol en su concentración inhibitoria media y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmosfera saturante por 24 horas.

Pasadas las 24 horas se retiró cuidadosamente el medio de cultivo y las células fueron fijadas con 50  $\mu$ L de paraformaldehído-glutaraldehído durante 80 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 50  $\mu$ L de PBS en agitación suave durante 1 minuto cada uno y después las células fueron permeadas con una solución de tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 30 minutos a 4°C. Pasado el tiempo se lavaron 3 veces nuevamente con PBS y se adicionaron 30  $\mu$ L de anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3 humana (Sigma, USA) 1:1000 en PBS y se incubó toda la noche a 4°C.

Posteriormente se lavó nuevamente 3 veces con PBS en agitación suave y se le aplicó el anticuerpo secundario de cabra anticonejo con fluorocromo FIT-C acoplado (Sigma, USA) 1:1000 en PBS y se mantuvo a 37°C en oscuridad durante 2 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionó 10  $\mu$ L de fluorocromo DAPI con 15  $\mu$ L de PBS a las muestras por 1 minuto en agitación constante, se lavó nuevamente 3 veces con PBS y finalmente se agregaron 50  $\mu$ L de PBS a cada muestra. Estas se observaron en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E600 (Nikon, USA).

### **Detección de muerte apoptótica mediante la cuantificación de caspasa 3 activa en células tratadas con cacalol mediante marcaje con FIT-C por citometría de flujo.**

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 6 pozos (Corning, USA) a una densidad de 250,000 células por pozo en 2500  $\mu$ L de medio RPMI-1640 al 5% de SNT y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturante por 24 hrs.

Para el tratamiento al control testigo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco, se le adicionó además un control vehículo DMSO. Se agregó además 1  $\mu$ L/mL de Camptotecina en medio de cultivo y finalmente la concentración inhibitoria media del cacalol (IC<sub>50</sub>) por 24 horas.

Posteriormente las células se cosecharon para posteriormente ser fijadas en metanol 1:1 en PBS por 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo las células fueron lavadas 3 veces con 1000  $\mu$ L de PBS y centrifugadas a 1800 rpm en una centrífuga Sobat C-40 por 5 minutos para posteriormente agregar 50  $\mu$ L de anticuerpo primario

policlonal de conejo anticaspasa 3 humana (Sigma, USA) 1:1000 en PBS y se incubó toda la noche a 4°C

Transcurrido el tiempo las muestras se volvieron a lavar en 1000 µL de PBS 3 veces para después aplicar 50 µL de anticuerpo secundario de cabra anticonejo con fluorocromo FIT-C acoplado (Sigma, USA) 1:1000 en PBS y se mantuvieron a 37°C en oscuridad durante dos horas. Después se realizaron dos lavados con PBS y se adicionaron 500 µL de PBS a cada muestra. Estas fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria II.

### **Evaluación del efecto del cacalol sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CFSE)**

Se realizaron cultivos previos de linfocitos de sangre periférica humana. Los linfocitos obtenidos se resuspendieron en 4 ml de PBS y se marcaron con 10 µL de una solución de carboxifluoresceína (Sigma, USA) y se incubaron 15 minutos a oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS al 5% de SFB y se centrifugaron (Dinac, USA) 1500 rpm por 5 minutos, el botón obtenido se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo. Después del tratamiento los linfocitos se sembraron en una placa de 96 pozos con una densidad de 200000 células por pozo en 200 µL de medio de cultivo por 24 horas. Posteriormente fueron activados con 25 µl/mL de fitohemaglutinina (Microlab, USA) el volumen final de cada pozo fue de 200 µl. Para el tratamiento con cacalol las células se trataron con la IC<sub>50</sub> de cada línea celular.

Después la muestra se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se suspendió el botón celular en 1 mL de verseno frío. Después de 5 minutos se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el verseno. Por último, se resuspendió el botón celular en 500 µL de PBS y 500 µL de paraformaldehído al 2%. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSAria II.



## **Evaluación de la actividad necrótica sobre linfocitos humanos mediante la actividad de la enzima LDH**

En una placa de 96 pozos (Corning, USA) se sembraron 200,000 células/pozo con 200  $\mu$ L de medio de cultivo por 72 horas con las siguientes condiciones: Un control que únicamente contiene medio de cultivo, un control positivo que contiene solamente medio de cultivo, un control vehículo (DMSO) con la concentración empleada para preparar la IC<sub>50</sub> correspondiente a cada línea celular utilizada y el tratamiento con Cacalol con la concentración IC<sub>50</sub> correspondiente.

Transcurridas 71 horas de tratamiento se retiró el medio de cultivo del control positivo y se le adicionó medio fresco que contenía 1% de tritón X-100 por una hora más. Posterior a las 72 horas, la placa se centrifugó a 1500 rpm en frío. El sobrenadante fueron retirados y pasados a una placa cónica de 96 pozos (Corning, USA) y se centrifugaron (Centrífuga Orto alresa, digicen 21 R) a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, posteriormente del sobrenadante se recuperó 40  $\mu$ L y se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) y se agregaron 30  $\mu$ L de reacción del kit Cytotox 96® Non- Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) a cada pozo, la placa se mantuvo a temperatura ambiente protegida de la luz con papel aluminio durante 25 minutos. Finalmente se colocó solución de paro (Ácido Acético 1M) y se midió la absorbancia en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) 490 nm. Una vez obtenidas las absorbancias se realizó el análisis estadístico correspondiente para la cuantificación de la enzima.

### **Análisis estadístico.**

Los datos experimentales se presentaron como la media  $\pm$  S.D. de al menos tres experimentos independientes, con seis repeticiones y fueron analizados posteriormente usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba Tukey con una significancia de  $p < 0.05$  comparada con el vehículo en el que fue disuelto el compuesto.

## Resultados.

Se evaluó si el sesquiterpeno cacalol afecta el potencial proliferativo de dos líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa y CaSki, estas fueron tratadas a diferentes concentraciones del compuesto. Las curvas obtenidas se linealizaron mediante la ecuación de la recta y las concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) que fueron calculadas mediante regresión lineal fueron las siguientes (Tabla 1):

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µM)
HeLa (+VPH 16)	16.19	70.29
CaSki (+VPH18)	16.04	69.64

Tabla 1: Valores de IC<sub>50</sub> calculadas para cada línea celular de CaCu en µg/mL y µM

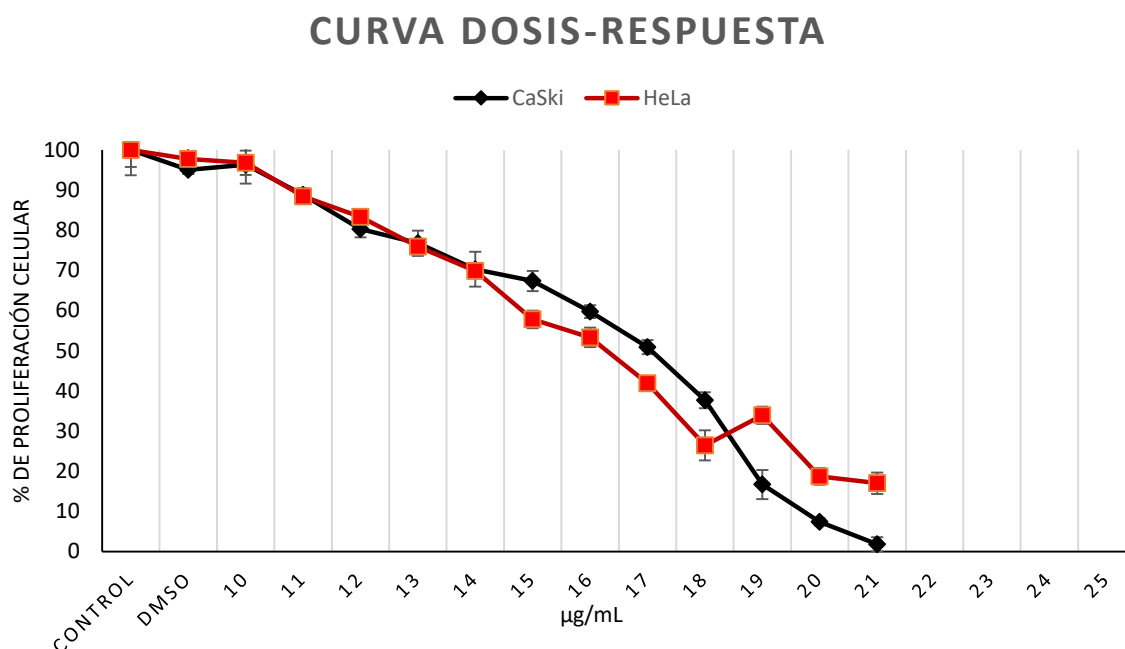


Figura 3: Curva dosis-respuesta donde se muestra la relación dosis respuesta. En el eje vertical ("y") se muestra el porcentaje de número celular transcurridas 24 horas después del estímulo mientras que en el eje horizontal ("x") se muestran las diferentes condiciones realizadas durante el experimento a una concentración de cacalol de µg/mL.

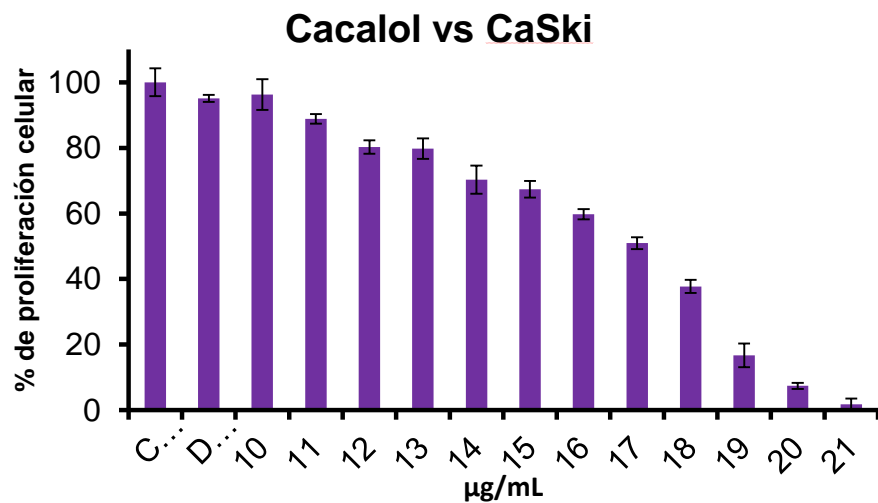
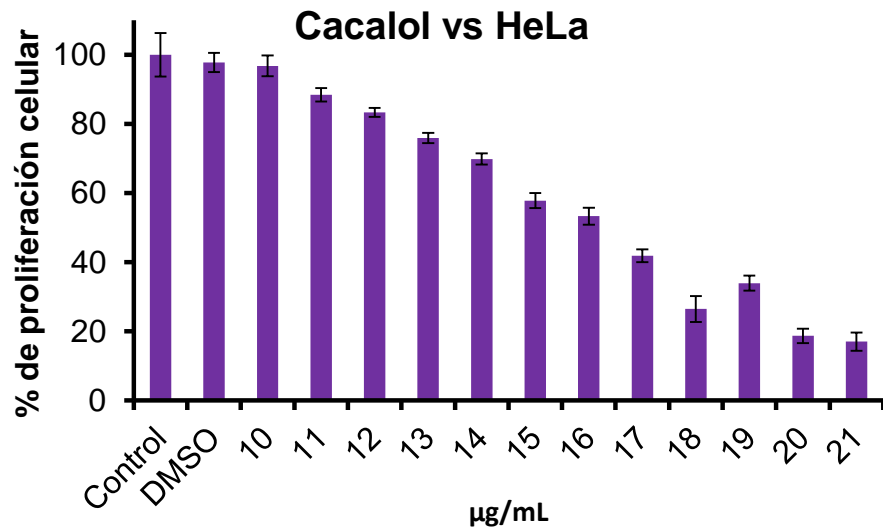


Figura 4: Graficas de barras donde se muestra la relación dosis respuesta por cada línea celular. En el eje vertical (“y”) se muestra el porcentaje de número celular transcurridas 24 horas después del estímulo mientras que en el eje horizontal (“x”) se muestran las diferentes condiciones realizadas durante el experimento a una concentración de cacalol de µg/mL

Los resultados obtenidos revelan que el sesquiterpeno cacalol afecto el potencial proliferativo de una manera dosis dependiente, es decir, mientras mas se incrementaba la concentración a la que eran sometidas las líneas celulares el número celular disminuía.

### Determinación de la actividad necrótica.

Con el fin de descartar que el decremento del número celular fue producto de un efecto citotóxico del compuesto, se cultivaron las líneas celulares ya mencionadas y la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares y ésta fue considerada como un marcador para evaluar una muerte necrótica.

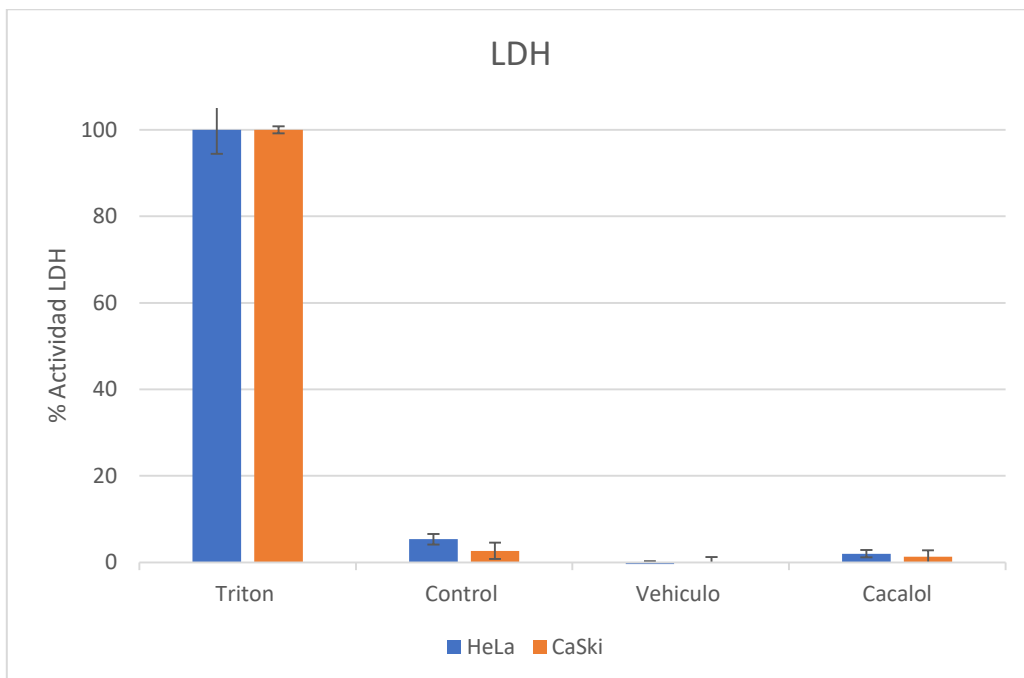


Figura 8: Cuantificación de la enzima LDH en las líneas celulares de HeLa y CaSki. En el eje vertical observamos el porcentaje de LDH. En la prueba colorimétrica el Tritón X fue considerado como el 100% de actividad. En el eje horizontal las condiciones en cultivo: el control basal, el vehículo y la concentración de IC<sub>50</sub> calculadas anteriormente. (ANDEVA, seguida de prueba Tukey p>0.05)

Los resultados expuestos anteriormente muestran que las líneas celulares CaSki y HeLa tratadas con el sesquiterpeno presentan una muy baja actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes recuperados, sugiriendo que el decremento en el número celular inducido por el cacalol no induce la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y por lo tanto no induce una muerte por necrosis en ambas líneas celulares de CaCu.

## **Observación de la morfología celular.**

Una vez que se determinó que el decremento del número celular no se veía relacionado con una muerte necrótica se hizo la observación de la morfología de las líneas después de su exposición al compuesto para comprobar que este tratamiento induce una muerte apoptótica. Para esto los cultivos de ambas líneas celulares tumorales fueron tratados con las  $IC_{50}$  correspondientes y se analizó por microscopia de contraste de fases y fluorescencia si este compuesto inducía una morfología apoptótica además de observar la presencia o ausencia de caspasa 3 activa, una caspasa efectora característica de un proceso de muerte programada avanzado y regularmente sin retorno, en dichos cultivos mediante una inmunodetección con anticuerpos y observándola mediante microscopía de epifluorescencia.

Cuando las células presentan una muerte celular programada se puede observar su morfología característica: las células pierden adherencia y su tamaño y forma típica, se condensa la cromatina y/o se fragmenta y se generan cuerpos apoptóticos. Además, actúan diversas enzimas proteasas y proteínas que actúan en dicho proceso, entre ellas las caspasas.

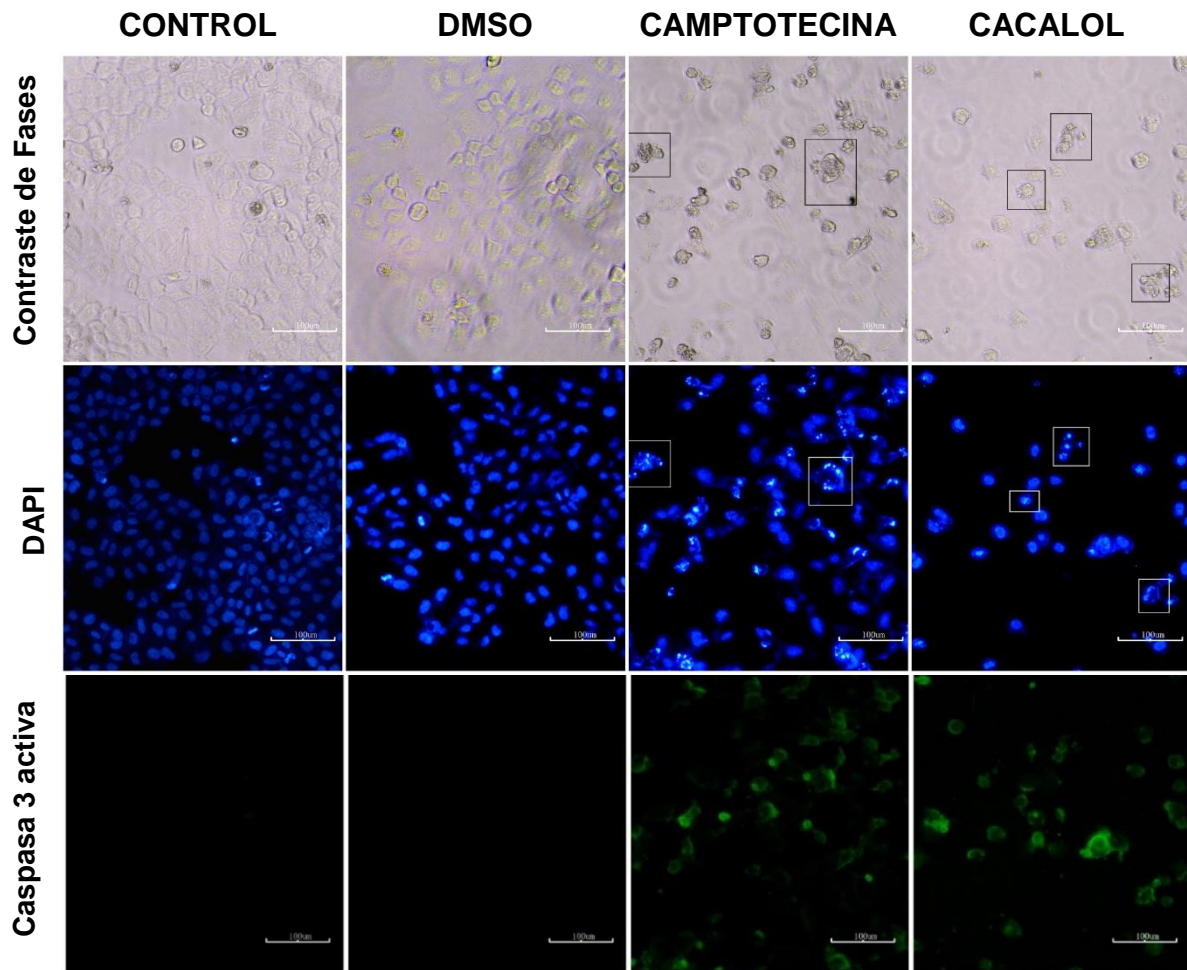


Figura 10: Efecto del Cacalol sobre cultivos de células HeLa. Se observa: control, células sin tratamiento. Células tratadas con DMSO (vehículo del compuesto. 2  $\mu$ l/ml), células tratadas con un control positivo de apoptosis (camptotecina al 0.005%, 7 $\mu$ l/ml) y células tratadas con cacalol. De arriba abajo: Fotografías tomadas con contraste de fases, marcador DAPI e inmunodetección de caspasa 3 activa.

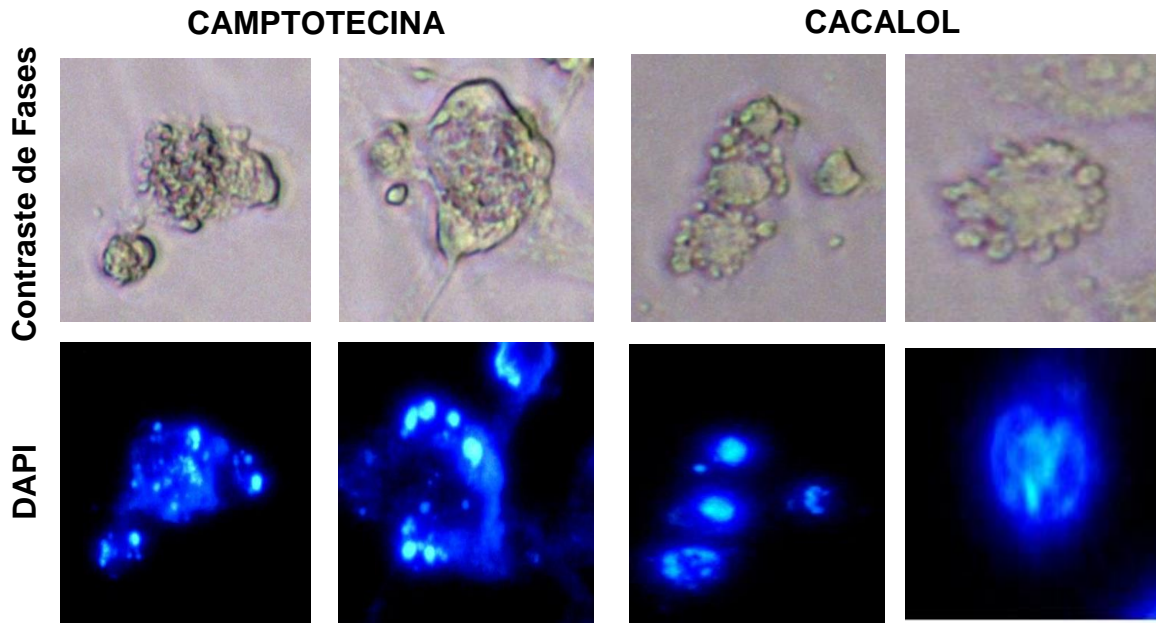


Figura 11: Efecto del Cacalol a cultivos de células HeLa con acercamiento. Se observa: Células tratadas con un control positivo de apoptosis (camptotecina) y células tratadas con el sesquiterpeno cacalol. De arriba abajo: Fotografías tomadas con contraste de fases y fotografías tomadas con microscopia de epifluorescencia, células teñidas con DAPI.

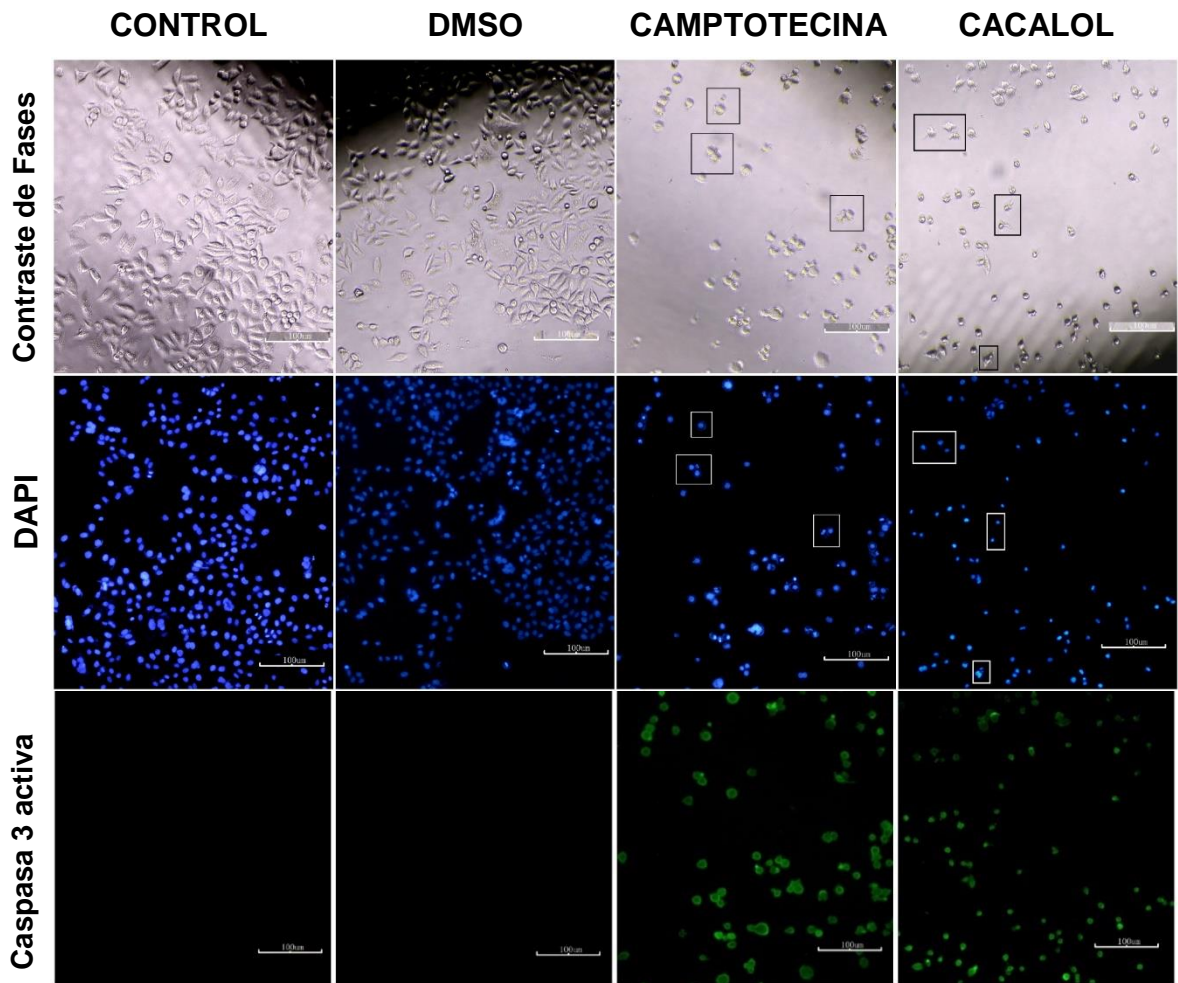


Figura 12: Efecto del Cacalol sobre cultivos de células CaSki. Se observa de izquierda a derecha: células sin tratamiento. Células tratadas con DMSO (vehículo del compuesto. 2  $\mu$ l/ml), células tratadas con un control positivo de apoptosis (camptotecina al 0.005%, 7 $\mu$ l/ml) y células tratadas con cacalol. De arriba abajo: Fotografías tomadas con contraste de fases, marcador DAPI e inmunodetección de caspasa 3 activa.



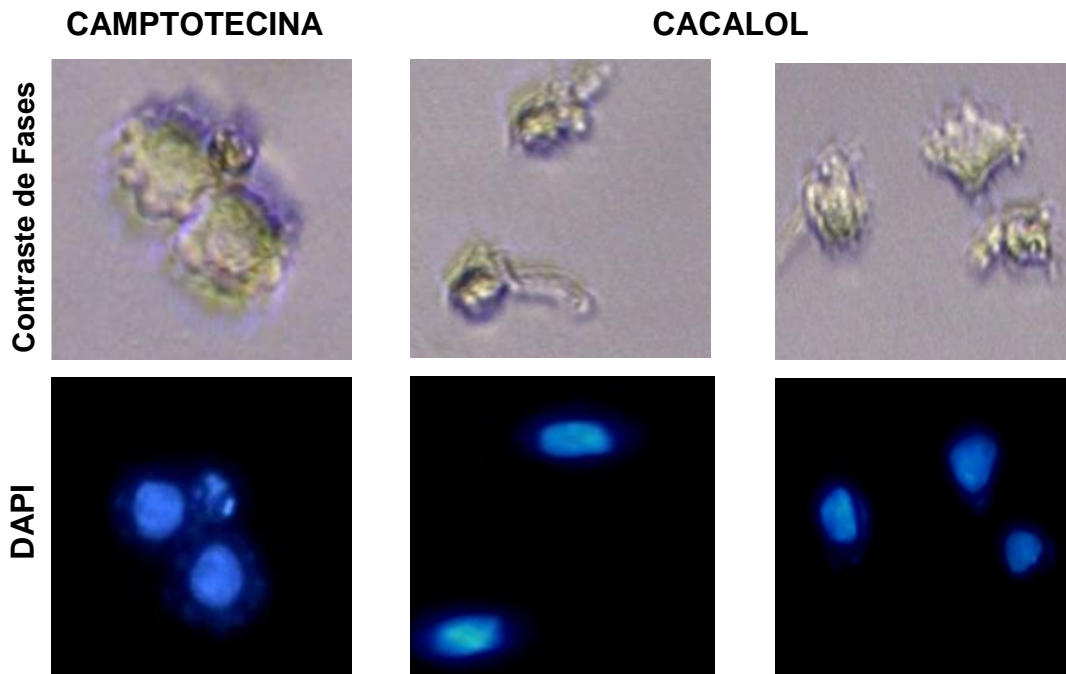


Figura 13: Efecto del Cacalol en cultivos de células CaSki con acercamiento. Se observa: A: Células tratadas con un control positivo de apoptosis (camptotecina). B y C: células tratadas con cacalol. De arriba hacia abajo: Fotografías tomadas con contraste de fases y fotografías tomadas con microscopía de epifluorescencia, células teñidas con DAPI.

Los resultados obtenidos en las figuras mostradas establecen que el cacalol afecta a los cultivos celulares de HeLa y CaSki observando en ellas morfología típica de una muerte apoptótica: pérdida de adherencia, morfología redonda y compactada con “burbujeo”, condensación y fragmentación de la cromatina, así como la formación de cuerpos apoptóticos. En las células no tratadas, así como en las tratadas con DMSO el cual corresponde al vehículo del compuesto se observaban células con morfología típica de la línea celular, poliédricas y adheridas, con proyecciones citoplasmáticas y núcleos redondos y homogéneos.

## Detección de la caspasa 3 activa mediante marcaje con FIT-C y evaluada por citometría de flujo.

Con el fin de determinar y cuantificar la presencia de caspasa 3 activa en los cultivos celulares se realizó una citometría de flujo con marcaje indirecto, un anticuerpo primario contra la caspasa 3 y un anticuerpo secundario acoplado con el fluorocromo FIT-C. Se cuantifico el porcentaje de células en cultivo que presentaban caspasa 3 activa.

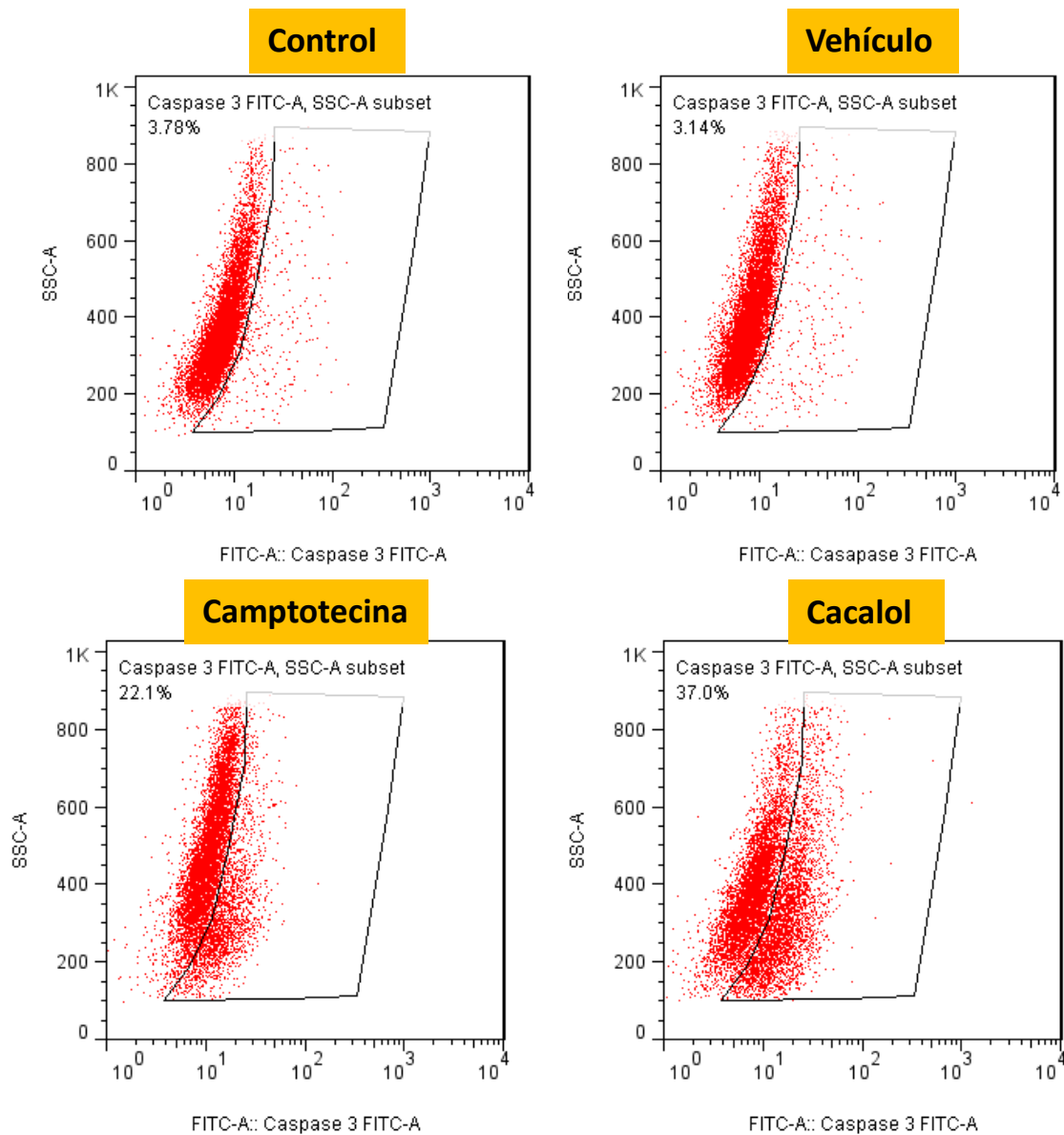


Figura 15: Efecto del Cacalol en la presencia de caspasa 3 activa en cultivos de las líneas celulares HeLa usando citometría de flujo. Se observa: A: Células sin tratamiento (Control), B: Células tratadas

con DMSO (Vehículo del compuesto), C: Células tratadas con un control positivo de apoptosis (camptotecina) y D: Células tratadas con Cacalol.

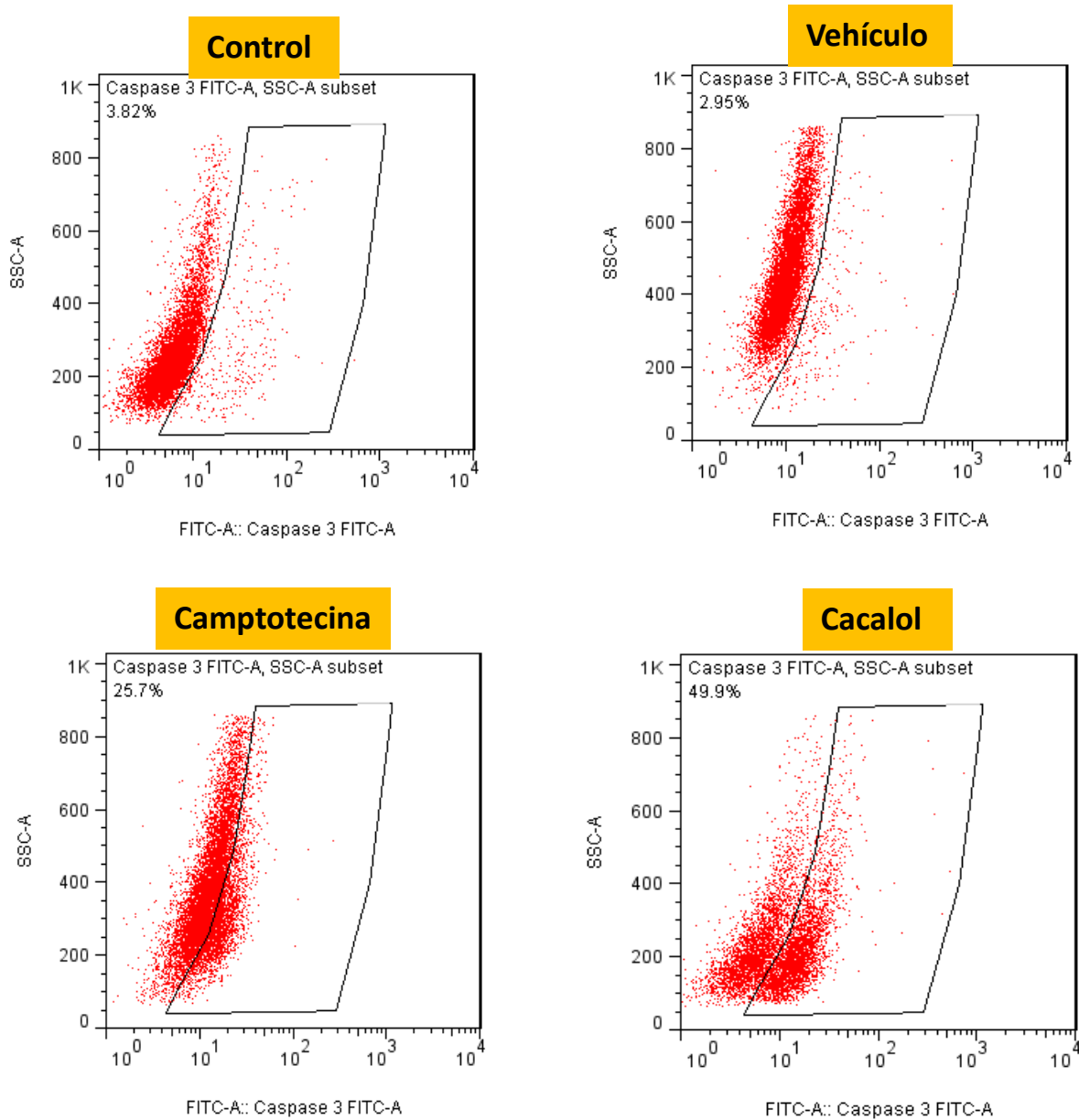


Figura 16: Efecto del Cacalol en la presencia de caspasa 3 activa en cultivos de las líneas celulares CaSki usando citometría de flujo. Se observa: A: Células sin tratamiento (Control), B: Células tratadas con DMSO (Vehículo del compuesto), C: Células tratadas con un control positivo de apoptosis (camptotecina) y D: Células tratadas con Cacalol.

Línea Celular	Control	DMSO	Camptotecina	Cacalol
HeLa	3.78%	3.14%	22.1%	37.0%
CaSki	3.82%	2.95%	25.7%	49.9%

Tabla 2: Porcentajes de expresión de caspasa 3 activa en líneas celulares de CaCu, un control positivo a caspasa 3 (Camptotecina) y un control basal sin tratamiento.

### Actividad antiproliferativa del Cacalol en linfocitos humanos.

Posterior a los ensayos en las líneas celulares de cáncer cervicouterino se hicieron ensayos en células no tumorales (linfocitos) para determinar el grado de selectividad excluyendo la posibilidad de que no afecte a células no tumorales. Se cultivaron linfocitos de sangre periférica humana con el método antes señalado para posteriormente exponerlos a cada IC<sub>50</sub> de compuesto obtenida para cada línea celular. El porcentaje de proliferación celular fue obtenido mediante citometría de flujo.

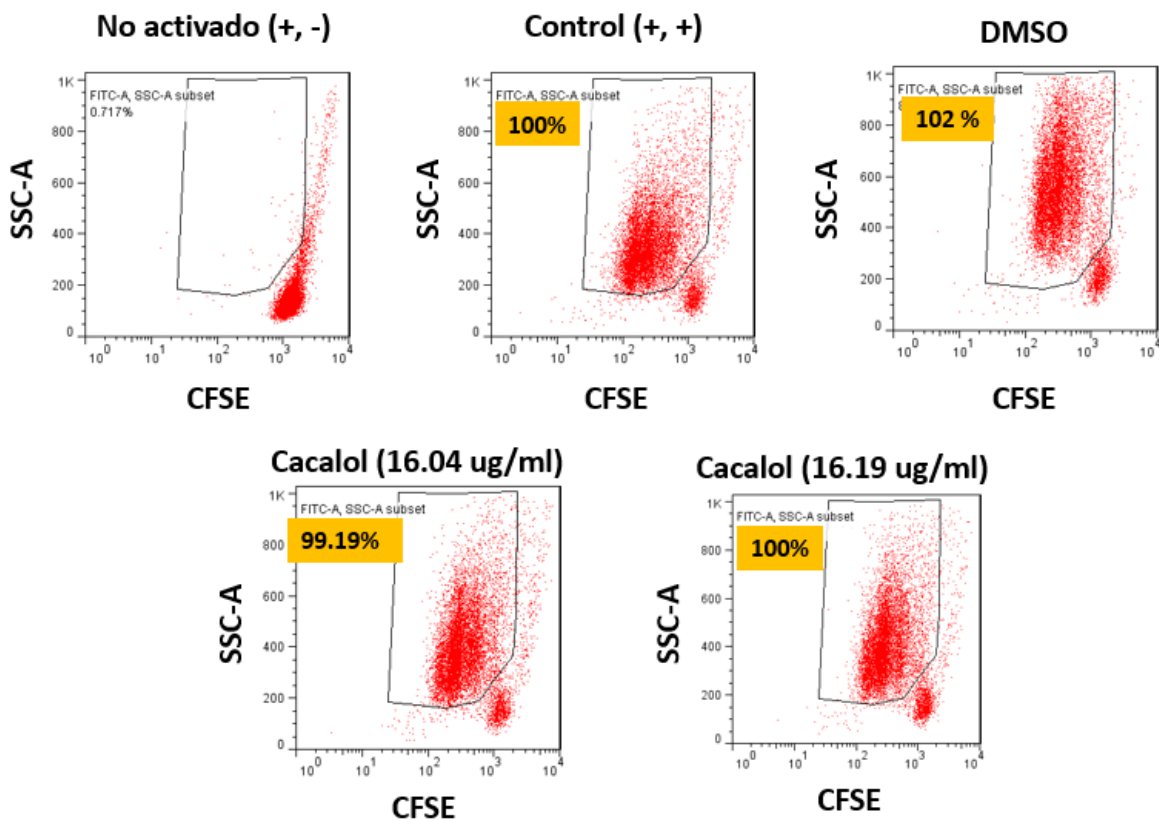


Figura 17: Efecto del Cacalol a distintas concentraciones en la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica. Estos fueron activados con fitohemaglutinina y marcados con carboxifluoresceína (CFSE).

Se observa que el cacalol tiene una acción prácticamente nula sobre la proliferación de linfocitos humanos lo que sugiere que éste tiene una acción dirigida sobre células tumorales de CaCu.

### Determinación de la actividad necrótica en linfocitos humanos mediante la actividad de la enzima LDH.

Con el fin de evaluar la actividad necrótica del compuesto cacalol se cultivaron células no tumorales (linfocitos humanos de sangre periférica) y se expusieron a las  $IC_{50}$  calculadas anteriormente para cada línea celular de CaCu. Se determinó la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa en sobrenadantes de los cultivos celulares.

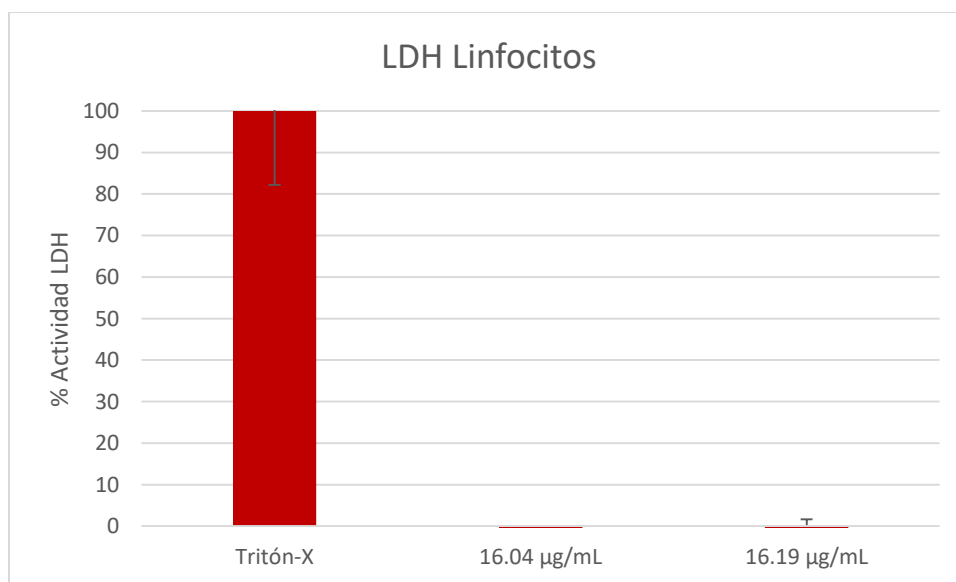


Figura 18: Cuantificación de la enzima LDH en células no tumorales (linfocitos humanos de sangre periférica). En el eje vertical observamos el porcentaje de LDH. En la prueba colorimétrica el Tritón X fue considerado como el 100% de actividad. En el eje horizontal las concentraciones de  $IC_{50}$  calculadas anteriormente para cada línea celular tumoral.

No se cuantificó una actividad elevada de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de los cultivos de células no tumorales sometidas al compuesto por lo que el cacalol no muestra un efecto necrótico citotóxico en este tipo de células.

## Discusión.

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, es la segunda causa de muerte en el mundo. Los tratamientos utilizados para esta enfermedad suelen tener éxito en las etapas más tempranas, cuando el tumor está localmente en un órgano y no ha iniciado un proceso de invasión. En estas etapas la radioterapia y las cirugías son consideradas la mejor opción para combatir esta enfermedad. Sin embargo, en pacientes donde la enfermedad es avanzada y ha comenzado un proceso de invasión llamado metástasis estos tratamientos suelen ser poco efectivos y dañar la calidad de vida de las personas que se someten a estos. En el caso de la quimioterapia donde se emplean sustancias citotóxicas poco selectivas que dañan no solo a las células tumorales sino a múltiples tejidos sometidos a división celular constante. Debido a estas circunstancias se ha comenzado la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural que tengan propiedades antiproliferativas, que tengan baja citotoxicidad necrótica y con una acción selectiva.

Los terpenos han sido objeto de estudio gracias a sus propiedades naturales múltiples tales como amebicidas, antiinflamatorias, antimicrobiana, anticancerígenas y antioxidantes. Por sí solos y por sus propiedades ya demuestran gran potencial para ser un tratamiento alternativo para este tipo de enfermedades y en los últimos años estos han tomado gran importancia y se han hecho diversos estudios para caracterizar sus propiedades entre los que se encuentran inhibir el crecimiento de células tumorales.

Dentro de los terpenos se encuentran los sesquiterpenos, terpenos de 15 carbonos que no quedan exentos de tener dichas propiedades. Tal es el caso del cacalol, un sesquiterpeno del cual se ha demostrado en el presente que tiene propiedades antiproliferativas, apoptóticas y de alta selectividad y que podría ser por tanto un potencial tratamiento alternativo a los comunes para el tratamiento del cáncer. Sin embargo y a pesar de la gran cantidad de información que se genera de los terpenos y sesquiterpenos en cuanto a sus propiedades antitumorales el cacalol no figura entre ellos y es por ellos que uno de los objetivos del presente es aportar nueva

información sobre el potencial que tiene este como una potencial terapia contra el cáncer.

Se ha reportado que el cacalol tiene diversas propiedades biológicas entre ellas las propiedades antiinflamatoria y antioxidante (Jiménez, 2006. Shindo, 2004.) además de propiedades antitumorales. Liu y col. 2011, demostraron que este compuesto tiene potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* en líneas tumorales de cáncer de mama (MCF7 Y MDA-MB-231) con una IC<sub>50</sub> de 17µM mediante la inhibición de Fas y apoptosis dependiente de caspasa 3 además de tener un mejor efecto cuando se combinaba con Taxol, un quimioterapéutico ampliamente utilizado en diversos tratamientos contra el cáncer. Por otra parte, en modelos *in vivo* mostro que inhibe el crecimiento de tumores inoculados además de funcionar como quimioprotector.

En el presente trabajo el cacalol se usó en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa y CaSki y se evaluó su efecto antiproliferativo donde se obtuvieron las IC<sub>50</sub> de 16.19 µg/mL y 16.04 µg/mL (70.29 µM y 69.64 µM) respectivamente con un comportamiento dosis dependiente. Estos resultados son primeros datos del cacalol aportados en CaCu y a comparación de los resultados obtenidos por Liu y col. 2011 en cáncer de mama, el cacalol muestra una menor potencia en el tratamiento de cáncer cervicouterino, pero no por ello se descarta su posible uso en el tratamiento de este.

El cacalol mostró un muy bajo o nulo efecto necrótico en las líneas celulares de CaCu ya mencionadas y esto junto con la actividad antiproliferativa llevaron a la conclusión de una muerte apoptótica de las líneas celulares tratadas. Lo anterior generaría la posibilidad de que los efectos colaterales de los tratamientos quimioterapéuticos podrían no ser nulos o tolerables en un hipotético tratamiento con este compuesto.

La muerte apoptótica de células tumorales ya ha sido comprobada por Liu, 2011 donde las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con cacalol e inducidas a apoptosis dependiente de caspasa 3, comprobado *in vivo* e *in vitro*. Sumado a esto el cacalol se probó en sinergia con otro agente quimioterapéutico (taxol) donde se potenciaron sus efectos, a su vez el



sesquiterpeno fue probado con una línea celular tumoral resistente al taxol (MDA-MB-231-TXL) y donde el cacalol indujo a muerte por apoptosis mucho mejor que el taxol en una dosis 10 $\mu$ M y 40  $\mu$ M *in vitro*.

El cacalol indujo a una muerte apoptótica a las líneas celulares de CaCu HeLa y CaSki observando características típicas de este tipo de muerte mediante microscopia de epifluorescencia y de contraste de fases (perdida de la adherencia y de la forma típica de la línea celular, reducción del citoplasma, compactación de la cromatina, así como su fragmentación, formación de cuerpos apoptóticos). Añadido a esto se observó la presencia de caspasa 3 activa en los cultivos celulares tratados con cacalol y por citometría de flujo se pudo cuantificar ese porcentaje de caspasa presente en las líneas celulares dando como resultado un 37.0% para HeLa y 49.9% para CaSki. Con las observaciones y datos obtenidos se confirmó que el cacalol induce un proceso de muerte apoptótica dependiente de caspasa 3 en las líneas celulares de CaCu conservando esta cualidad comparada a lo reportado por Liu y col, en cáncer de mama a pesar de que el cáncer tratado no es el mismo abriendo las puertas al cacalol como un potencial tratamiento alternativo.

Los quimioterapéuticos y fármacos que se utilizan para tratar esta enfermedad tienen la característica de atacar a células con altas tasas de división, sin embargo, las células tumorales no son las únicas que se dividen rápidamente, también hay células sanas que tienen esta tasa alta de división y que por lo tanto son afectadas en un tratamiento, por mencionar un ejemplo: células sanguíneas, pelo, piel. Lo mencionado anteriormente tiene como consecuencia los numerosos efectos secundarios que se presentan en los tratamientos tradicionales. Es por ello que se buscan compuestos de origen natural que sean efectivos y que reduzcan estos efectos secundarios para así mejorar la calidad de vida del paciente y a la vez nos ayuden a tratar este problema de salud.

Liu y col. 2011, encontraron que el cacalol no tenía potencial citotóxico al observar los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y bilirrubina total en ratones inoculados con tumores, los tratados con cacalol se encontraron en rangos normales.

Los datos obtenidos de los ensayos donde se estimuló linfocitos humanos de sangre periférica con cacalol muestran que este no afectó significativamente a la proliferación de estas células no tumorales. También se pudo comprobar que no induce una muerte necrótica a estos que fueron tratados a las concentraciones de las IC<sub>50</sub> ya mencionadas sugiriendo que este compuesto actúa de manera selectiva y no es agresiva con células no tumorales.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo son de gran importancia, ya que estos datos son los primeros que se aportan de este sesquiterpeno en CaCu, donde se deja en claro que este tiene un efecto antiproliferativo en células de cáncer cervical de diferentes características, etapa avanzada y positivas a las sepas de VPH que son consideradas más agresivas y de mayor probabilidad de derivar en un cáncer (HeLa positiva a VPH 18 derivadas de un adenocarcinoma metastásico estadio IV-B. CaSki positiva a VPH 16 derivadas de un carcinoma metastásico), con baja actividad necrótica tanto en las células tumorales como en las no tumorales y con una actividad apoptótica solo en células tumorales dependiente de caspasa 3 y que no interfiere en la proliferación linfocitos humanos de sangre periférica demostrando así cierta selectividad y que si se usara como posible fármaco disminuiría los efectos secundarios que provocan conservando su potencial terapéutico.

Estos resultados relevantes ya que postulan al cacalol como un blanco potencial de estudio además como un prometedor tratamiento alternativo contra el cáncer.

## Conclusiones.

- ❖ El sesquiterpeno cacalol presenta una actividad antiproliferativa dosis dependiente en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa y CaSki con una  $IC_{50}$  de 16.19  $\mu\text{g/mL}$  y 16.04  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.
- ❖ El sesquiterpeno cacalol a las concentraciones de  $IC_{50}$  tiene nula actividad necrótica en las líneas celulares de CaCu HeLa y Caski.
- ❖ Las concentraciones de  $IC_{50}$  del sesquiterpeno cacalol inducen a las líneas celulares de CaCu HeLa y CaSki a una muerte apoptótica dependiente de caspasa 3 activa.
- ❖ El sesquiterpeno cacalol no afecta la proliferación de linfocitos de sangre periférica tratados a las concentraciones de  $IC_{50}$ .
- ❖ Las concentraciones de  $IC_{50}$  del cacalol no producen una muerte necrótica en linfocitos de sangre periférica.

## Referencias

- Cassan, F. (2006). *Enciclopedia de la Ciencia*. México: Sol 90. Pp 14-15
- Alberts, B. (2008). *Introducción a la Biología Celular*. Buenos Aires: Panamericana. Pp 11-13, 28. 625
- Rodriguez, L. (2004) *El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer*. Biotecnología Aplicada Vol. 21. p. 11
- Peralta, O. (1997) *Regulación del Ciclo Celular y desarrollo de cáncer: Perspectivas terapéuticas*. Instituto Nacional de Salud Pública, México p. 1.
- Sergey Ya. Proskuryakov (2002) *Necrosis: A specific form of programmed cell death?* Experimental cell reserch Vol. 233 pp. 1-2
- Adolfo, G. (2002) *Mecanismos de Muerte Celular: Apoptosis y Necrosis*. Revista Argentina de Anestesiología Vol. 60 Num. 6 pp 392-393.
- De Toro, G. (2006) *Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular*. Actas Hispanoamericanas de Patología. 1(1). 2
- Campbell, Neil. (2007) *Biología*. 7ma edición. Buenos Aires: Medica Panamericana. 94.
- Robertis, E. (2000). *Biología Molecular y Celular*. Buenos Aires: El ateneo. Pp 442-443.
- Sosa, R. (2012). *Apoptosis*. Cátedra de Bioquímica. Argentina pp 4-5.
- Sanchez, C. (2013) *Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer*. Revista Médica Clínica Condes. Pp. 553-562
- Elinos, M. (2003) *Caspasas: Moléculas Inductoras de la Apoptosis*. Gaceta Médica de México Vol. 139 Num 5. pp 496.
- De la garza, J. (2014) *El Cáncer México*: Universidad Autónoma de Nuevo León. Pp 17, 40.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2015).
- Lizano, M. (2009) *Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis*. Ciudad de México: Cancerología 4. 205-216.
- International Agency For Research on Cancer (2018) OMS.
- Hanahan, D. (2011) *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell Vol 14. Num. 5.

- Zaldivar, G. (2012) *Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano*. Revista Chilena de Ginecología y Obstetricia Vol. 77 Num. 4 pp. 316-318.
- Leon, G. (2004) *Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia*. Revista Cubana de Medicina Vol. 43 Num.1 pp 1-2.
- Montalvo, E. (2011) *Oncoguía: Cancer Cervicouterino*. Cancerología Vol. 6 pp 62.
- Elena (2002). Mecanismos de muerte celular: Apoptosis y necrosis. Revista Argentina de Anestesiología, 391-401.
- Instituto Nacional del Cáncer (2018) *Tipos de Tratamientos contra el cáncer*.
- Serman, F. (2002) *Cáncer cervicouterino: Epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. Perspectivas de prevención y tratamiento*. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología Vol. 67 Núm. 4. pp 320.
- Collins, I., & Workman, P. (2006) *New approaches to molecular cancer therapeutics*. Nature Chemical Biology, 2(12), 690.
- Lopez, N. (2012) *Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud*. Nutrición clínica y dieta hospitalaria Vol. 32 Núm. 3 pp. 81-82.
- Goodwin, T.W. (1971). *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press.
- Lanhers, M. (1992) *Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of Harpagophytum procumbens*. Planta Med Vol. 58. pp 117–123.
- West, B (2012) *Antimicrobial Activity of an Iridoid Rich Extract from Morinda citrifolia Fruit*. Current Research Vol 4. pp 52-54.
- Liu, W. (2011) *Cacalol, a natural sesquiterpene, induces apoptosis in breast cancer cells by modulating Akt-SREBP-Fas signaling pathway*. Vol. 128. pp. 57-68.
- Shindo, K. (2004) *Potent antioxidative activity of Cacalol, a sesquiterpene contained in cacalia delphiniifolia sleb et zucc*. Bioscience, Biotechnology and biochemistry Vol. 68 Núm. 6 pp. 1393-1394.
- Ruiz, E. (2015) *Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas*. Revista CENIC Ciencias Biológicas Vol. 46 Núm. 1, pp.10
- Naya, K. (1976) *The sesquiterpenes of Cacalia species*. Chem Lett pp.73–76
- Jimenez, M. (2006) *Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from Psacalium decompositum*. Journal of Ethnopharmacology Vol.105 pp 34–38.
- Gómez, V. (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.

## Apéndice.

### Medio de cultivo RPMI-1640

<b>Sales inorgánicas</b>	
<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Nitrato de calcio tetrahidratado- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.1
Sulfato de Magnesio Anhidrido- $\text{SO}_4\text{Mg}$	0.4884
Cloruro de Potasio- $\text{KCl}$	0.4
Cloruro de Sodio- $\text{NaCl}$	6
Fosfato de Sodio Dibásico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.8
<b>Aminoácidos.</b>	
L-Arginina	0.2
L-Asparagina	0.05
L-Ácido Aspártico	0.02
L-Cisteína*2HCL	0.0652
L-Ácido Glutámico	0.02
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
L-Hidroxiprolina	0.02
L-Isoleucina	0.05
L-Leucina	0.05
L-Lisina*HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-Fenilalanina	0.015
L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03
L-Treonina	0.02
L-Triptofano	0.005
L-Triosina*2Na*2H <sub>2</sub> O	0.02883
L-Valina	0.02

<b>Vitaminas</b>	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido p-Aminobenzoico	0.001
Acido D-Pantetónico (Hemicálcica)	0.00025
Piridoxina*HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina*HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
<b>Otros</b>	
D-Glucosa	2
Glutation (reducido)	0.001
Rojo Fenol* Na	0.0053
<b>Adición</b>	
L-Glutamina	0.3

Para 1 L de medio de cultivo se agrega 10.34 g de medio RPMI-1640 y 2 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA) que es disuelto en 1 L de agua bidestilada suplementada con 1mg/mL de antibiótico Pengesod: bencilpenicilina con la finalidad de evitar el crecimiento de microorganismos en el medio. El pH fue ajustado a 7.2 con Ácido Clorhídrico (HCl, Sigma-Aldrich, USA) 10N o Hidróxido de Sodio (NaOH, Sigma-Aldrich, USA) al 1%. Finalmente es esterilizado por la técnica filtrado al vacío a través de una membrana (Millipore) y se almacena a 4°C.

### **Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)**

Mantiene a la célula en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. Los componentes se diluyen en un volumen final de 2 L de agua bidestilada.

16.0 g Cloruro de Sodio (NaCl, Sigma-Aldrich, USA).

0.40 g Cloruro de Potasio (KCl, Sigma-Aldrich, USA)

4.32 g Fosfato mono ácido de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma-Aldrich, USA)

0.40 g Fosfato di ácido de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich, USA)

Estos se diluyen en 100mL de agua bidestilada, se ajusta pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 8N y se afora finalmente a un volumen final de 2000 mL. Se filtra con filtros de membrana con diámetro de poro de 22  $\mu\text{m}$  y se almacena a 4°C

### **Verseno.**

Necesaria para el desprendimiento de las células tumorales adherentes como las usadas en el presente trabajo. Funciona como agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Los componentes son se diluyen en un volumen final de 2 L.

6.08 g Tris Base ( $[\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$ , Sigma-Aldrich, USA)

16.0 g Cloruro de Sodio (NaCl, Sigma-Aldrich, USA)

0.80 g Cloruro de Potasio (KCl, Sigma-Aldrich, USA)

0.80 g EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ , Sigma-Aldrich, USA).

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, el pH se ajusta a 7.7 con Ácido Clorhídrico 10N y se afora un volumen total de 2000 mL con agua bidestilada. La solución se esteriliza en una autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.



### **Colorante cristal violeta.**

Se prepara a 0.1% m/v en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM a pH 6.0. Se agrega 3.96 g de Hidróxido de Sodio (NaOH; Sigma-Aldrich, USA) y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500 mL de agua bidestilada. La solución posteriormente se filtra.

### **Desactivación del suero.**

Una botella de suero fetal bovino se coloca a baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a baño maría 57°C durante 30 minutos. Posteriormente es transvasado a alícuotas de 50 mL para su uso y manipulación.

### **Glutaraldehído (1.1%)**

A 1.57 mL de Glutaraldehído (70% v/v) se agrega a 98.43 mL de agua bidestilada. Finalmente es almacenado a 4°C.

### **Solución de Ácido Acético (10%)**

A 10 mL de Ácido Acético glacial (J. T. Baker) se le agregaron 90 mL de agua bidestilada.

### **Paraformaldehído. (2%).**

Paraformaldehído al 2% de PBS. Se calentó la solución a temperatura no mayor a 60°C.