

00345



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

5

Inducción de apoptosis en células HeLa por extractos
de *Cupressus lindleyi* Klotzsch.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA VEGETAL)

PRESENTA

Biól. LILIÁN GUADALUPE LÓPEZ CHÁVEZ

298226

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

MEXICO, D.F.

2001



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.

**Esta investigación está dedicada a
Diego Sebastián,
la criatura más hermosa, dulce y
amorosa que he conocido.**

Agradecimientos

Expreso mi gratitud en forma muy especial para Vilma Maldonado Lagunas por su estímulo amistoso durante muchos años y en particular por la dirección del trabajo de tesis.

Agradezco la cuidadosa revisión de la misma, por los sinodales: M. en C. Montserrat Gispert Cruells, Dra. María de Lourdes Segura Valdez, Dr. Jorge Meléndez Zajgla, M. en C. Josefina Herrera Santoyo, y M. en C. María Guadalupe Ortiz López.

Es grande también mi deuda de gratitud con Miguel Ángel Villavicencio por proporcionar los elementos académicos, base de esta investigación, con Diana González por su paciencia al enseñarme diferentes técnicas de biología molecular, con Jorge Saldívar por la edición del trabajo de tesis, con Jerónimo Reyes y Nelly Diego por su ayuda desinteresada en varias fases del trabajo y en especial a Jorge Meyrán García por su apoyo constante y su insistencia en la culminación de este trabajo.

Asimismo agradezco la hospitalidad brindada por el personal del laboratorio de Biología Molecular, de la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México.

De igual forma al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

El principio de prioridad del Código Internacional de Nomenclatura Botánica, establece que cuando dos o más nombres se aplican a la misma especie, el más antiguo válidamente publicado es el que permanece.

Por lo anterior el nombre correcto de la especie utilizada es *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica*. Siendo un sinónimo *Cupressus lindleyi* Klotzsch (40).

Resumen	5
Introducción	6
Apoptosis	6
La familia de Bcl-2.	11
Células HeLa	14
 <i>Cupressus lusitanica</i> Mill. var. <i>lusitanica</i>	
Antecedentes	15
Hipótesis	17
Objetivos	17
Material y métodos	18
-Preparación de extractos	18
-Cultivo celular	18
-Viabilidad celular.	18
-Análisis de núcleos con TUNEL	19
-Análisis de núcleos con bromuro de etidio	19
-Análisis de proteínas con "western blot"	19
Resultados	21
Discusión	30
Referencias	31

Resumen.

La muerte celular es un fenómeno fundamental de los organismos. La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción celular dirigido por activación de genes. Junto con el proceso de proliferación (mitosis), el proceso apoptótico es responsable de mantener la homeostasis en el número celular de los tejidos.

Pérez y Villavicencio (36), han realizado investigaciones etnobotánicas en el Estado de Hidalgo, encaminadas a conocer el uso de plantas medicinales entre los grupos étnicos del estado. Las investigaciones han arrojado un gran número de plantas medicinales con diferentes usos, entre los cuales se encuentran, desde antidiarreicos, antivirales, antimicrobianos, anticancerígenos, etc. Varias especies de plantas se han utilizado en forma empírica contra el cáncer cérvicouterino, (Villavicencio com. per. 1999) por tal motivo, se decidió analizar si los extractos de dichas plantas tenían algún efecto citotóxico *in vitro* sobre la línea celular HeLa (de cáncer cérvicouterino) utilizando técnicas de biología molecular (cristal-violeta, bromuro de etidio, western-blot, TUNEL)

Nuestros resultados sugieren que la adición del extracto etanólico de una de las especies *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* a un cultivo de células HeLa, ocasiono un mayor porcentaje de pérdida de la viabilidad de manera dependiente del tiempo y de la concentración. Esta pérdida de la viabilidad se debió a la inducción de apoptosis en células HeLa, como se comprobó al teñir los núcleos con bromuro de etidio y al detectar con la técnica de TUNEL la fragmentación de los mismos *in situ*. Así también se determinó que este proceso apoptótico involucra a la proteína bax, miembro de la familia de Bcl-2.

Introducción.

La apoptosis

La muerte celular (pérdida irreversible de la estructura y función vital celular) es un fenómeno fundamental de los organismos. Existen dos tipos principales de muerte celular: apoptosis y necrosis (1-4), esta última es un evento accidental y es el resultado de varios cambios muy drásticos en el ambiente de las células. Morfológicamente se observa un hinchamiento de los organelos, una degradación al azar de la cromatina (Cariolisis) que al analizarse en geles de agarosa presenta un patrón difuso y barrido. En el último estado de la necrosis, las membranas se rompen y las células se desintegran (Figura 1).

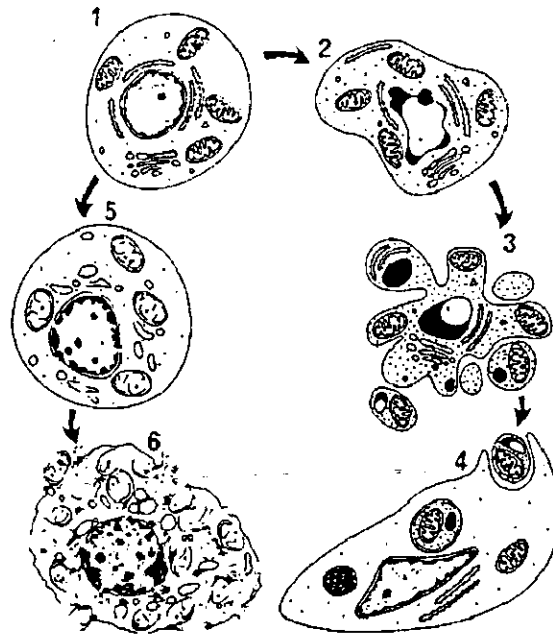


Figura 1. Los dos tipos principales de muerte celular, los pasos 2, 3 y 4 muestran el proceso apoptótico y los pasos 5 y 6 muestran el proceso necrótico (1).

El hinchamiento de una célula dañada se debe principalmente al daño de la membrana plasmática, al agotamiento del ATP y al desorden en la actividad de bombas de flujo de la membrana. La destrucción de la integridad de la membrana permite la liberación de las enzimas de los lisosomas, las cuales aceleran la desintegración celular. La necrosis en vivo generalmente se acompaña de un proceso inflamatorio en el organismo (1).

La apoptosis difiere fundamentalmente de la muerte degenerativa o necrosis en su naturaleza y significado biológico. Hay evidencia de que la apoptosis es un proceso activo de autodestrucción celular dirigido por activación de genes y en la mayoría de las circunstancias en la que ocurre es provechoso biológicamente (2), se considera el principal proceso responsable de muerte celular en eventos fisiológicos tales como la reconstitución del tejido embrionario y la diferenciación en células del adulto. Junto con el proceso de proliferación (mitosis), el proceso apoptótico es responsable de mantener la homeostasis en el número celular en los tejidos. En condiciones fisiopatológicas el índice apoptótico se encuentra alterado, por ejemplo en enfermedades como el Alzheimer, SIDA, y Parkinson el número de células apoptóticas aumenta, en el caso del cáncer el proceso apoptótico disminuye (4-5).

El programa de muerte celular por apoptosis parece estar presente virtualmente en todas las células de varios eucariontes unicelulares y pluricelulares, y puede ser inducido vía numerosos estímulos fisiológicos, bioquímicos y/o nocivos como hormonas, toxinas, antígenos, drogas quimioterapéuticas, carcinógenos, interacciones célula-célula, retiro de factores de crecimiento y traumas físicos (6-9).

El soporte para el concepto de apoptosis es dado por los estudios de la ultraestructura, bioquímica e incidencia de muerte celular. Morfológicamente, la

apoptosis se caracteriza por compactación y segregación de la cromatina en masas bien delineadas que descansan en la envoltura nuclear; condensación del citoplasma y una leve circunvolución del contorno celular y nuclear dándose finalmente el desarrollo de protuberancias, las que se separan y producen los llamados cuerpos apoptóticos rodeados de membrana, los cuales son fagocitados y digeridos por lisosomas de células adyacentes o macrófagos, sin que se presente una reacción inflamatoria, dichos cuerpos apoptóticos varían en tamaño y dentro de ellos se observa material citoplásmico con organelos celulares intactos y componentes nucleares (7-8).

Varias observaciones de las penúltimas dos décadas, sugieren un papel crítico para la inducción o activación de una endonucleasa durante la muerte celular e indican que está unida a los cambios en la morfología nuclear (10). Bioquímicamente uno de los eventos más estudiado en apoptosis involucra la degradación del DNA nuclear. De manera sincronizada la compactación de la cromatina y el corte de la doble hebra ocurren en las regiones internucleosomares para producir fragmentos que son múltiplos de 185 pares de bases (pb), estos fragmentos pueden ser observados por electroforesis en gel de agarosa con un patrón de "escalera" (11-13).

A pesar de la gran evidencia en favor del corte de DNA internucleosomal como una característica de la apoptosis, se han reportado varios acontecimientos de apoptosis en ausencia de este patrón de corte del DNA, por ejemplo en estudios de metamorfosis y muerte celular de embriones de insectos (14).

Otros tipos de fragmentación de DNA han sido reportados durante apoptosis, y son el corte del DNA en fragmentos mayores de 300 kpb y en fragmentos de 50 a 300 kpb. Estos eventos enzimáticos se asocian con estados de organización de

la cromatina(14). Así los fragmentos grandes se correlacionan bien con las asas ("loop") de cromatina del esqueleto nuclear, lo que implica que una enzima corta el DNA a un alto nivel de organización. Varios investigadores han propuesto que el corte del DNA en fragmentos largos, ocurre antes del corte del DNA internucleosomal y que estos grandes fragmentos de DNA sirven como precursores de los fragmentos pequeños de DNA (15).

La endonucleasa responsable del corte del DNA durante la apoptosis no se ha identificado. Varias candidatas se han propuesto y cada una de ellas tiene propiedades únicas, difieren en sus distribuciones en el tejido, en la dependencia iónica, el pH óptimo, sin embargo el involucramiento preciso de cada una de estas nucleasas en el proceso apoptótico es aún obscura, entre las candidatas están la DNAsa I que requiere Ca^{2+} y Mg^{2+} y es inhibida por zinc (16,17), la DNAsa II con un pH óptimo de 5.5 y puede funcionar independientemente de los cationes divalentes y genera 5' OH al final del DNA, características inconsistentes con las reportadas para apoptosis y NUC-18, endonucleasa inducida por dexametasona e ionofóros de calcio dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} e inhibida por zinc²⁺ y ácido aurintricarboxílico. El hecho de que diferentes tipos de fragmentación del DNA en apoptosis ocurran, ha llevado a la pregunta de si hay una o múltiples enzimas involucradas en el proceso apoptótico (16). Walker (18) propuso la DNAsa I para cortar DNA de alto y bajo peso molecular, ya que esta enzima modula su actividad y especificidad según la concentración de iones que estén presentes .

Recientemente se identificó otra enzima responsable de la fragmentación del DNA, denominada CAD (DNAasa activada por caspasas) la cual digiere el DNA en fragmentos discretos de tamaño específico y es activada por caspasas, enzimas de suma importancia en el proceso apoptótico (19, 20).

No se sabe aún con exactitud como se desarrolla la muerte celular programada, aunque ya se conocen las proteínas de algunos de los genes implicados, unos de ellos codifican para los miembros de la familia de proteínas conocidas como caspasas (21) se han identificado 14 (Figura 3) las cuales, una vez activadas inician una degradación proteolítica, cortando los péptidos después del ácido aspártico y así inactivan proteínas cruciales para el mantenimiento del citoesqueleto celular, reparación del DNA, transducción de señales y control del ciclo celular, por ejemplo la caspasa 3 corta a la poli (ADP ribosa) polimerasa, a la actina, fodrin y lamina, lo que resulta en la morfología apoptótica (22). Se ha logrado interrelacionar la activación de caspasas citosólicas y cambios nucleares apoptóticos. La caspasa CAD esta inactiva en el citosol, cuando está ligada con su inhibidor ICAD, la caspasa 3 puede cortar e inactivar a ICAD por lo que se libera CAD, que se transloca al núcleo e inicia la degradación cromosómica (23)

Basándose en las interacciones establecidas entre los mediadores conocidos de apoptosis, se han definido tres vías de transducción clásicas, de la señal apoptótica en células de mamíferos (24) Figura 2. El primero es iniciado por el retiro de factores de crecimiento y es regulado por la familia de proteínas Bcl-2. Esta vía da como resultado, la activación de Apaf-1 y la liberación del citocromo C de la mitocondria, el cual activa la caspasa 9, lo que origina la subsecuente cascada apoptótica. La segunda vía involucra el señalamiento de los receptores de muerte de la superficie celular, como TNF o Fas. los cuales a través de moléculas adaptadoras pueden reclutar y activar caspasas. La tercera vía, que es la menos caracterizada, es iniciada por el daño al DNA. Aunque en parte regulado, por proteínas como p53 y ATM, aún no se conoce como se activan las caspasas. Éstas últimas y la familia de proteínas de Bcl-2, juegan un papel clave en la regulación y ejecución del suicidio celular (24).

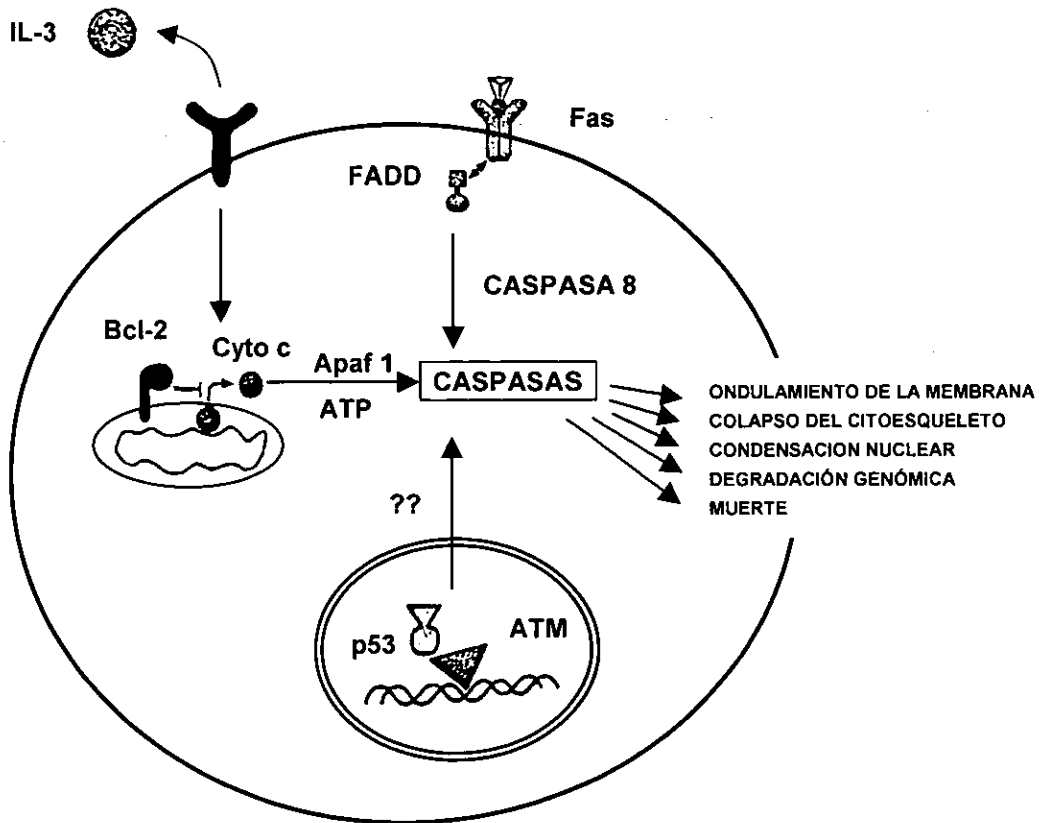


Figura 2. Las tres vías principales del proceso apoptótico (24).

La Familia de Bcl-2

Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2). Se identificó por su papel en el desarrollo de linfoma folicular humano, en el que sufre una translocación cromosomal $t(14;18)$ (25). En esta translocación el gen de Bcl-2 se mueve de su posición normal en 18q21 a la posición 14q32 quedando en posición contigua al locus de la cadena pesada de inmunoglobulinas (26). Esta translocación da por resultado la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 de 26 kDa en las células de este tipo de tumores (27).

El producto del gen Bcl-2 funciona como señal anti-apoptótica, suprime la apoptosis inducida por diversos estímulos, incluyendo drogas quimioterapéuticas y radiación gama (28-29). La proteína Bcl-2 fue el miembro fundador de una amplia familia de proteínas relacionadas con apoptosis, la cual incluye las proteínas codificadas por los genes de: bcl-xs y bax (ambos inducen apoptosis) y bcl-xl, mcl-1 y A1, que al igual que Bcl-2, inhiben la apoptosis. Esta familia de proteínas tienen en su extremo COOH una región hidrofóbica y dos regiones muy homólogas en su secuencia, las regiones denominadas BH1 y BH2 (30).

Se han identificado 19 proteínas de esta familia hasta la fecha, siete de ellas (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1, bcl-w, A1, ced-9) inhiben la muerte celular programada, mientras que otras 7, la promueven (Bax, Bid, Bad, Bik, Bid, Hrk, bcl-xs) y 5 son proteínas virales (E1B, BHRF1, ASFV 5HL, HBS ORF 16, HHV8-bcl-2) (Figura 3). En algunos escenarios apoptóticos la mitocondria tiene un papel crucial, sufre colapso del potencial transmembranal y el efecto de transición de poro que involucra la apertura del megacanal conocido como MPTP (mitochondrial permeability transition pore), la apertura de este canal permite la salida de factores importantes en el proceso apoptótico. La proteína Bcl-2 puede prevenir la apertura de este megacanal, por el contrario Bax induce su formación (31). Recientes estudios sostienen el papel central de la familia en la regulación de la integridad de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo C. La importancia de la mitocondria en apoptosis fue sugerida por estudios en un sistema libre de células en el cual se demostró que la condensación nuclear y fragmentación del DNA eran dependientes de la presencia de la mitocondria. De hecho muchas de las proteínas de la familia de Bcl-2 residen en la membrana exterior mitocondrial ancladas por un segmento

hidrofóbico de aminoácidos, localizado en su extremo carboxilo (COOH) terminal (32). Los niveles relativos de los diferentes miembros de la familia de Bcl-2 con actividad pro ó anti-apoptótica inducen la apoptosis de la célula. La función antagonista de algunos de los miembros de la familia se explica en parte por su habilidad para formar heterodímeros. Por ejemplo las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x1 forman heterodímeros con la proteína proapoptótica Bax. Un exceso de Bax promueve la muerte celular pero su coexpresión con Bcl-x1 o Bcl-2, puede neutralizar este efecto, inactivando factores que disparen la activación de caspasas. Bcl-x1 al interactuar con Apaf-1, evita que este active a la caspasa 9.

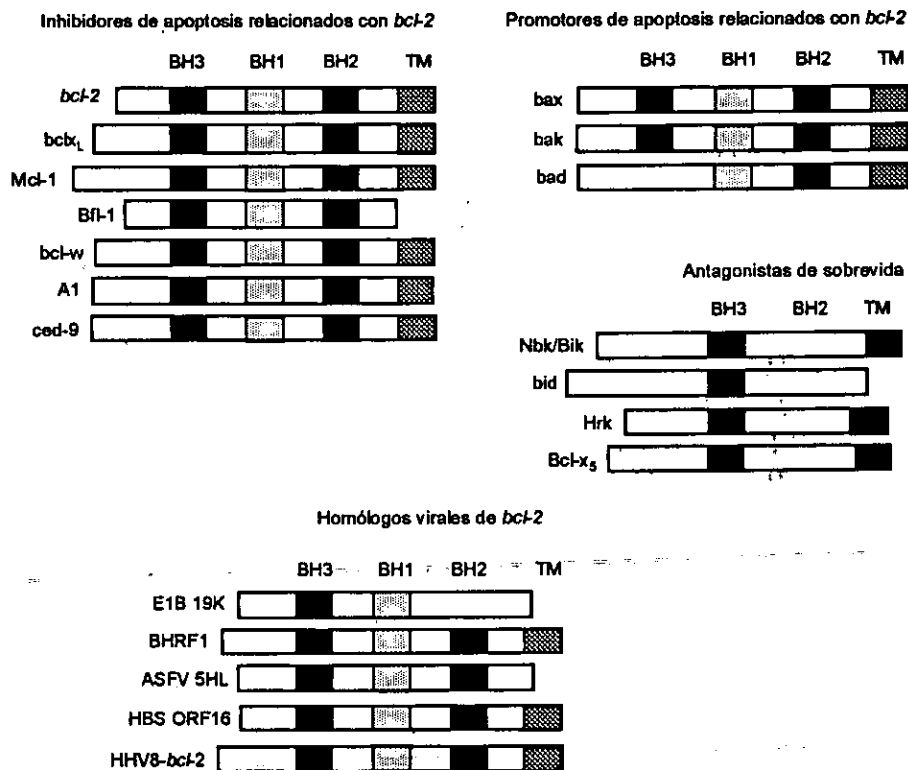
Reguladores de apoptosis relacionados con *bcl-2*

Figura 3. Familia de proteínas *Bcl-2* (39).

La sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xl, inhiben la liberación del citocromo C por la mitocondria, mientras que la sobreexpresión de Bax resulta en la disipación del potencial de membrana mitocondrial y libera citocromo C, este daño lo puede inducir aún cuando las caspasas son inactivadas, tales observaciones permiten pensar que hay un mecanismo independiente de caspasas que lleva a la muerte celular (33).

Aún no se sabe el mecanismo exacto de como funcionan todos los miembros de la familia de Bcl-2. Sin embargo, esta familia de proteínas, juega un papel clave en la regulación y ejecución del suicidio celular.

Células HeLa

La línea celular HeLa fue la primera estirpe epiteloidal y aneuploide derivada de un tejido humano y mantenida por un cultivo celular seriado. Fue aislado por Gey Coffman Kubicek en 1951, proveniente de carcinoma anaplásico de cérvix uterino (34).

Las células HeLa son un cultivo muy utilizado en numerosos laboratorios del mundo por su relativa facilidad para cultivarse en monocapa en condiciones de laboratorio y por su morfología conspicua, estos fueron los factores que motivaron la utilización de dicha célula como un modelo para estudiar la apoptosis.

Antecedentes.

Plantas medicinales

Las diferencias entre muchas plantas son invisibles, producen varios compuestos químicos distintos, llamados metabolitos secundarios, no son directamente indispensables para la supervivencia y la reproducción de las plantas, pero tienen un papel importante en su defensa frente a los hongos, animales y otros vegetales. Entre ellos se encuentran sustancias repelentes, toxinas, compuestos psicoactivos como los alcaloides del chicalote (*Argemone mexicana*), del huelle de noche (*Cestrum nocturnum*), del toloache (*Datura stramonium*) y venenos como el del panalillo (*Conium maculatum*). Se conocen miles de metabolitos secundarios, muchos de los cuales constituyen el material base en la manufactura de medicinas y drogas, como el ascaridol, compuesto de propiedades antihelmínticas, que se extrae del epazote (*Chenopodium ambrosioides*) (38).

El uso de tales compuestos, son producto de la experiencia de los grupos humanos, que se encuentran integrados a un determinado ecosistema, lo que les hace susceptibles de tener un profundo conocimiento, de las plantas y animales con los que han convivido generación tras generación, en ocasiones durante miles de años logrando discriminar cuales son aptos y cuales nocivos para el consumo humano, magnificándose su poder de resolución hasta el hecho de conocer plantas o animales que curan determinada enfermedad (39).

Basándose en estos hechos, Pérez y Villavicencio (1995). han realizado investigaciones etnobotánicas en el Estado de Hidalgo, encaminadas a conocer el uso de plantas medicinales entre los grupos étnicos. Las investigaciones han

arrojado un gran número de plantas medicinales con diferentes usos, se encuentran desde antidiarreicos, antivirales, antibacterianos, anticancerígenos, etc. Villavicencio (com. Pers. 1999), en los estudios etnobotánicos que ha continuado realizando, ha observado el uso de otras especies contra afecciones que los indígenas manejan como cáncer, entre ellas están *Oenothera rosea* L' Her. ex Ait. (Hierba del golpe), *Prunella vulgaris* L. (Hierba del cáncer), *Cuphea aequipetala* Cav. (Hierba del cáncer), *Helianthemum glomeratum* Lag. (Santa Martha) y *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* (Ciprés) (40).

Con estas plantas realizan infusiones, que son utilizadas principalmente por los nahuas de la región de la Huasteca Hidalguense. Desafortunadamente no ha habido un seguimiento de los casos y por lo tanto tampoco ha sido posible confirmar si las afecciones tratadas, en realidad son provocadas por algún tipo de cáncer. Los conocimientos empíricos mencionados, no han sido lo suficientemente sistematizados de manera multidisciplinaria, por lo que se consideró plantear este trabajo con el fin de verificar los efectos de dichas plantas mediante un método científico.

Hipótesis.

Comprobar si *O. rosea*, *P vulgaris*, *C. Aequipetala*, *H. glomeratum* y *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* tienen propiedades antineoplásicas, de ser así sus extractos producirán citotoxicidad en células cultivadas de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos.

1. Distinguir si los extractos de *O. rosea*, *P vulgaris*, *C. Aequipetala*, *H. glomeratum* y *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* inducen citotoxicidad en la línea celular HeLa (cáncer cérvicouterino).
2. Averiguar si esta citotoxicidad presenta características morfológicas y bioquímicas propias de la apoptosis
3. Examinar la condensación nuclear (técnica de bromuro de etidio) .
4. Observar la fragmentación del DNA (técnica de TUNEL).
5. Analizar los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax durante el proceso apoptótico inducido por los extractos en células HeLa expuestas a extractos de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica*

Hipótesis.

Comprobar si *O. rosea*, *P vulgaris*, *C. Aequipetala*, *H. glomeratum* y *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* tienen propiedades antineoplásicas, de ser así sus extractos producirán citotoxicidad en células cultivadas de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos.

1. Distinguir si los extractos de *O. rosea*, *P vulgaris*, *C. Aequipetala*, *H. glomeratum* y *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* inducen citotoxicidad en la línea celular HeLa (cáncer cérvicouterino).
2. Averiguar si esta citotoxicidad presenta características morfológicas y bioquímicas propias de la apoptosis
3. Examinar la condensación nuclear (técnica de bromuro de etidio) .
4. Observar la fragmentación del DNA (técnica de TUNEL).
5. Analizar los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax durante el proceso apoptótico inducido por los extractos en células HeLa expuestas a extractos de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica*

Material y métodos.

- Preparación de extractos. 0.2368 g (flores, tallos, hojas y frutos) de *O. rosea*; 0.1974 g (flores, hojas, tallos y raíz) de *P. vulgaris*; 0.2265 g (tallos, hojas y flores) de *C. aequipetala*; 0.2667 g (tallos y hojas) de *H. glomeratum*; 0.5709 g (hojas) de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica*. Se maceraron en 2.5 ml, 3 ml, 2 ml, 2.5 ml y 5 ml de agua respectivamente, después de centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 5 m, se recuperó la fase acuosa y se esterilizaron por filtración, se almacenaron a -70°C . Los botones se extrajeron en 1 ml de etanol absoluto (excepto en *C. aequipetala* y *H. glomeratum* donde se usaron 0.6 ml) y se agitaron vigorosamente con un vortex, las mezclas se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 m y la fase superior se almaceno a -70°C .
- Cultivo celular. Células HeLa (2000/pozo) se sembraron en placas de 96 pozos en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37°C . Se adicionaron 1-8 μl de cada extracto acuoso y etanólico, por cada 100 μl de medio (dilución 1/100 del extracto original), en el caso de los extractos solubles en etanol, se corrió paralelamente células testigo con 1-8 μl (dilución 1/100) de etanol/100 μl de medio.
- Viabilidad celular. Las células se sembraron en cajas de 96 pozos y se trataron con los extractos etanólicos (dilución 1/100) de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* a diferentes concentraciones (1-7 μl). A diferentes tiempos se estimó la viabilidad con la técnica de cristal violeta (35), las células se fijaron con etanol al 70% durante 5 m; se agregó a cada pozo cristal violeta al 5% durante 10 m. se

les agregó ácido acético al 33% y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA.

- Análisis de núcleos con la técnica de TUNEL. Se sembraron células HeLa (100,000/pozo) sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos y se pusieron en contacto, con 4 ml de extracto durante 24 h, se fijaron con etanol al 70% a -20 ° C durante 5 m. Se lavaron con PBS (Phosphate Buffer Saline) y se incubaron en una solución de permeabilización (0.1% tritón x-100 en 0.1% de citrato de sodio y 10 ml. de PBS 1x) por 2 m. sobre hielo, se lavaron con PBS 2 veces y se agregaron 50 µl de TUNEL (*in situ* Cell Death Detection Kit, POD). Se incubaron en una cámara húmeda por 60 m a 37°C. Los cubre-objetos se lavaron 3 veces con PBS y se observaron las muestras en un microscopio de fluorescencia, se fotografiaron con contraste de fases (15).
- Análisis de núcleos con bromuro de etidio. Se sembraron Células HeLa (100000/pozo) sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos y se pusieron en contacto con 4 ml de extracto durante 24 h, se fijaron con etanol al 70% a -20°C durante 5 m., después se lavaron con PBS y se incubaron 3 h con 10 µl de RNAsa (10 mg/ml) por cada mililitro de PBS a 37°C. Se incubaron con PBS conteniendo bromuro de etidio (10 mg/ml), 10 µl por cada mililitro de PBS) durante 10 m, se lavaron con PBS y se observaron en un microscopio de fluorescencia, y se fotografiaron (15).
- Análisis de proteínas por "western blot". Los extractos celulares se prepararon por lisis en buffer de RIPA. Las proteínas se cuantificaron usando un micrométodo de Bradford (37), por lo que se procedió a separar 40 µg de proteína en un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y reducidas Las proteínas

se transfirieron a membranas de nylon (Zeta-Probe), después de bloquearlas con leche descremada (Santa Cruz) se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-Bcl-2 o anti-BAX (Santa Cruz) se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario antiratón IgG-HRP, en una dilución 1:300 (Amersham), la detección se realizó mediante el uso de quimioluminiscencia, usando un kit comercial (ECL Western blotting detection system, Amersham-Pharmacia Biotech) y radiografías AR X-Omat (Kodak). Las radiografías fueron cuantificadas por densitometría.

Resultados

Se obtuvieron extractos acuosos y solubles en etanol de 5 plantas mexicanas.

Cultivos de Células HeLa (cáncer cérvicouterino) se expusieron a diferentes concentraciones de cada uno de estos extractos y las células se observaron diariamente en un microscopio invertido.

A las 24 horas los extractos de las 5 especies citadas provocaron citotoxicidad, principalmente con el extracto etanólico. *O. rosea* (hierba del golpe) indujo una mediana citotoxicidad a partir de los 6 $\mu\text{l}/1000 \mu\text{l}$ de medio (de una dilución 1/100 del extracto original), aunque la morfología celular mostró grandes vacuolas. Con *P. vulgaris* (hierba del cáncer) no se observó citotoxicidad, con *C. aequipetala* (hierba del cáncer) las células continuaron su crecimiento. Los extractos etanólicos de *H. glomeratum* (Santa Martha) indujeron una citotoxicidad mediana a partir de los 8 $\mu\text{l}/1000 \mu\text{l}$ de medio. Y los extractos de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* (ciprés) mostraron una fuerte citotoxicidad a partir de los 5 $\mu\text{l}/1000 \mu\text{l}$. Por tal motivo se decidió utilizar esta última especie para continuar con los objetivos del presente trabajo

Posteriormente se analizó con más detalle la citotoxicidad causada por el extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* (ciprés) en células HeLa, para esto se expusieron células a diversas concentraciones del extracto y se les midió la viabilidad a diferentes tiempos 24, 48 y 72 h, con la técnica de cristal violeta.

Como se muestra en las Figuras 4, 5, 6 y 7, el extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* causó una pérdida de viabilidad en células HeLa, esta pérdida de la viabilidad celular fue dependiente del tiempo y de la concentración.

Para el tratamiento de 24 horas se observa un decremento lineal a partir de los 2 μl hasta 4 μl , la viabilidad se estabiliza a un 40% en el rango de concentración mencionado y comparándolo con el crecimiento de células que no se pusieron en contacto con el extracto (células testigo). (Figura. 4).

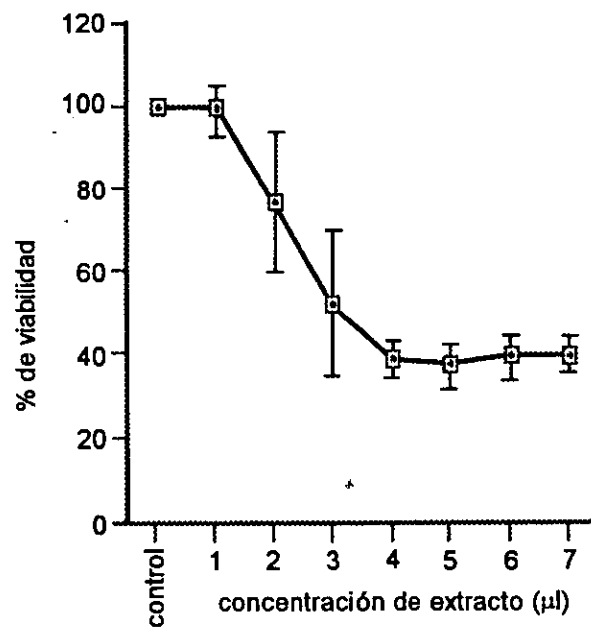


Figura 4. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* durante 24 horas (n = 4.)

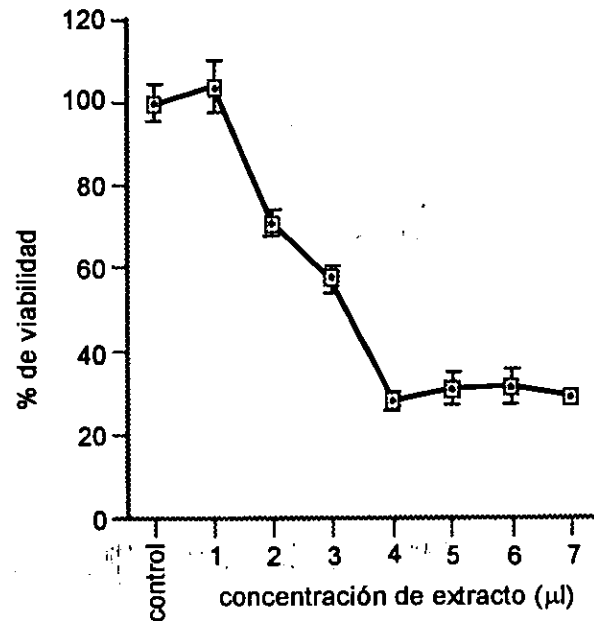


Figura 5. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* durante 48 horas. (n = 4)

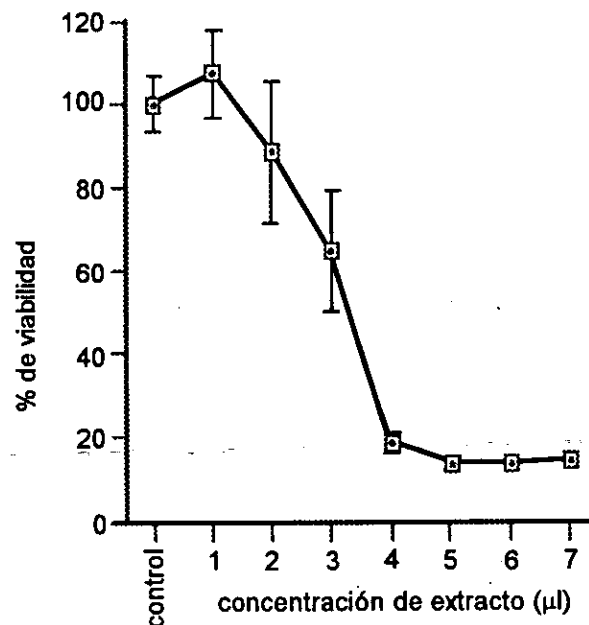


Figura 6. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* durante 72 horas. (n = 4)

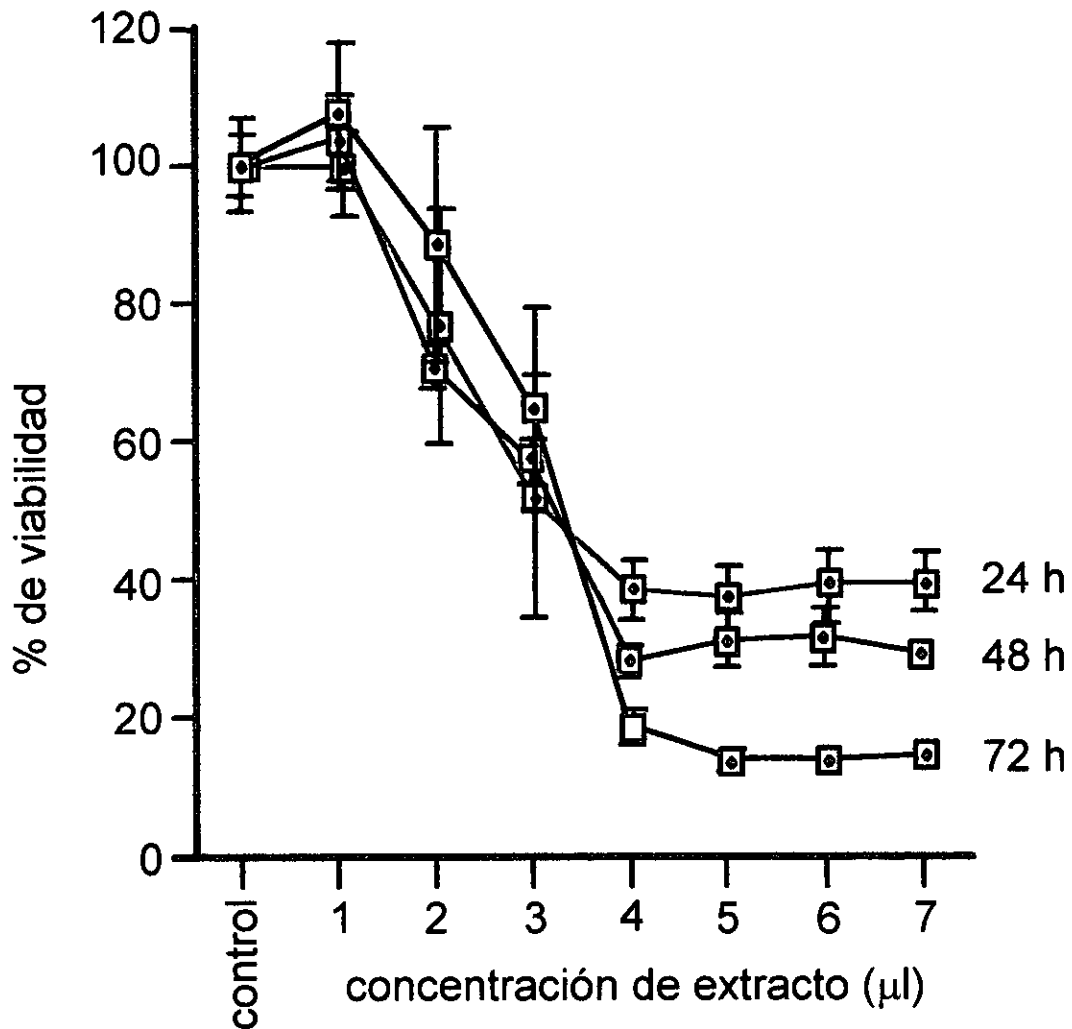


Figura 7. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* durante 24, 48 y 72 horas (n = 4).

De la misma manera, en los tratamientos de 48 y 72 h se observa un decremento linear de la viabilidad a partir de 2 μ l hasta 4 μ l. En el caso de 48 h con cantidades mayores de 4 μ l la viabilidad disminuye hasta un 30 % y en el caso del tratamiento por 72 h con estas cantidades la viabilidad disminuye hasta un 10 % (Figuras 5 y 6).

En la Figura 7 está representada una comparación de los tres tiempos, se observa que la estabilización es alcanzada a partir de los 4 μ l y se observa claramente que la citotoxicidad es dependiente del tiempo y de la concentración.

Para analizar si esta citotoxicidad involucra el proceso de muerte celular programada (apoptosis), como ocurre con otros fármacos antineoplásicos se decidió analizar esta pérdida de viabilidad bajo otros criterios. El primero que se usó fue la morfología del núcleo celular. El examen celular se hizo tiñiendo los núcleos con bromuro de etidio, utilizando células testigo y células expuestas al extracto etanólico (4 μ l/ml) por 24 h, como se muestra en la Figura 8, pánel A y B, son células testigo que presentan núcleos redondos y de tamaño normal, varios de ellos se encuentran en mitosis, principalmente metafases y telofases. En las células con tratamientos se pueden observar núcleos condensados y algunos de ellos fragmentados, esta morfología es típica de núcleos apoptóticos (Figura 8, pánels C y D).

El segundo criterio apoptótico fue confirmado por la detección de fragmentación del DNA *in situ* con la técnica de TUNEL, este procedimiento se basa en la habilidad de una transferasa terminal de incorporar nucleótidos marcados con fluoresceína en el extremo 3' del DNA que se detectan posteriormente con microscopía de fluorescencia. (Figura. 9). El tratamiento de

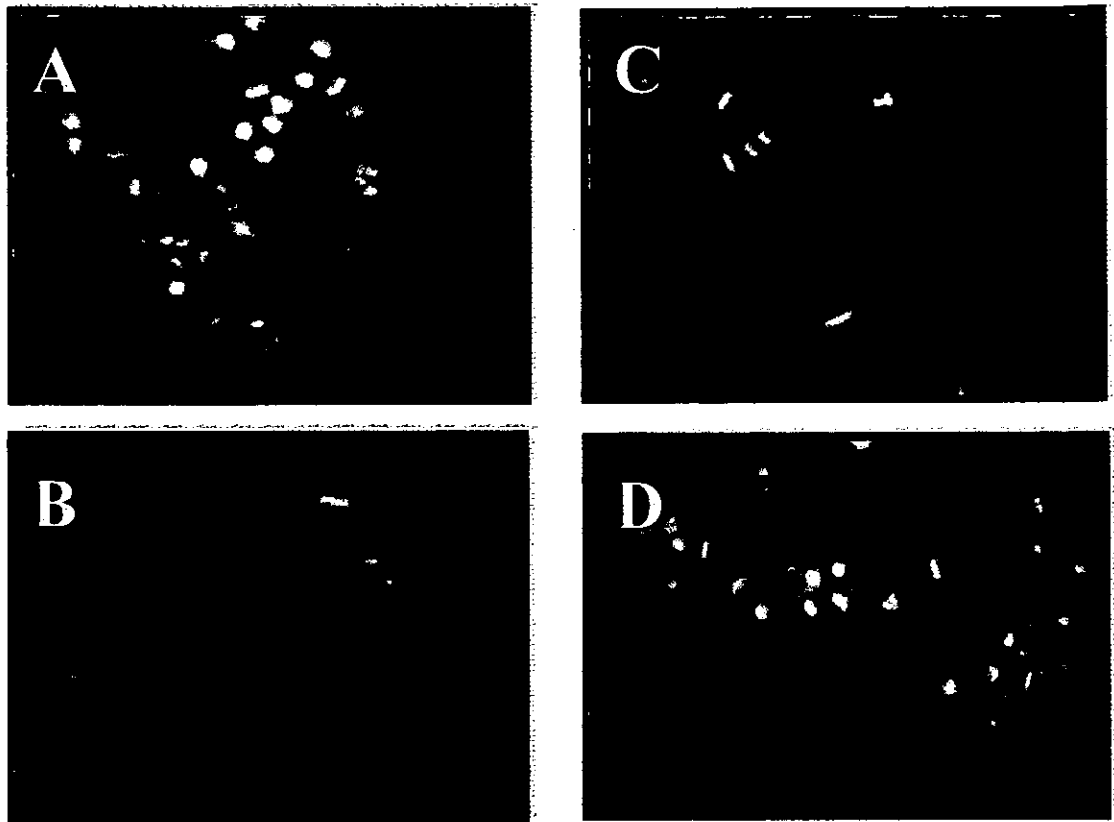


Figura 8. Núcleos de células HeLa expuestas con extracto etanólico. Los paneles A y B son células testigo. Los paneles C y D son células tratadas con extracto (4 μ l/ml) durante 24 horas. Los núcleos se tiñieron con bromuro de etidio.

las células HeLa dio como resultado un teñido positivo de los núcleos (Figura 9, paneles E y F), en las células no tratadas (testigo), se observó que ningún núcleo se había teñido (Figura 10, panel D).

Una vez comprobada la presencia de apoptosis en los cultivos celulares tratados con los extractos y con el fin de profundizar en el estudio del proceso apoptótico de este modelo, se decidió analizar los niveles de dos proteínas implicadas en diversos procesos apoptóticos: Bcl-2 y Bax por western blot, como se muestra en las Figuras 10 y 11.

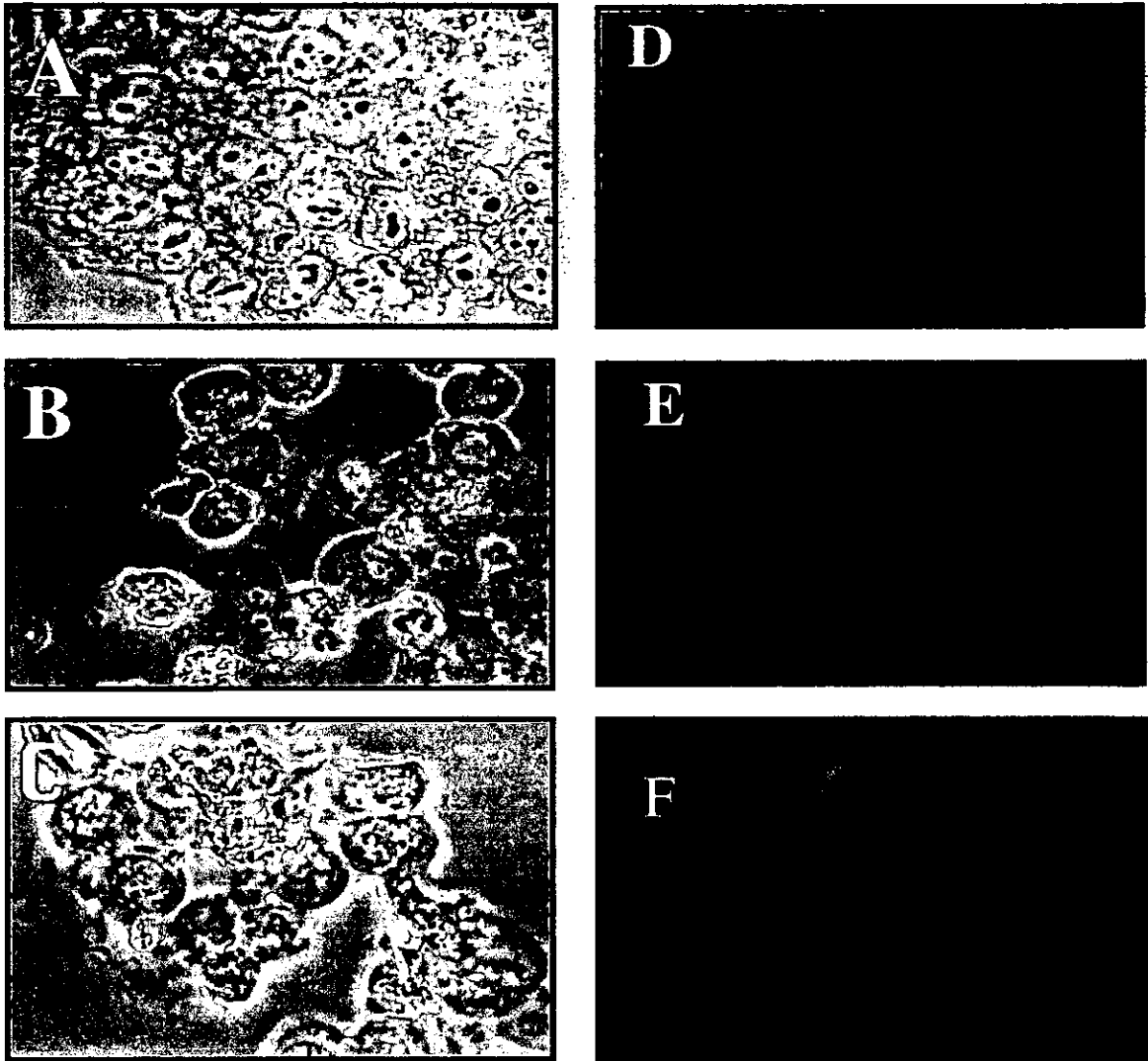


Figura 9. Detección de la fragmentación del DNA *in situ* con la técnica de TUNEL en células HeLa expuestas a extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica*. Los paneles D (células testigo), E y F (células con tratamiento) muestran la técnica de TUNEL. Los paneles A, B y C muestran el contraste de fases de las células.

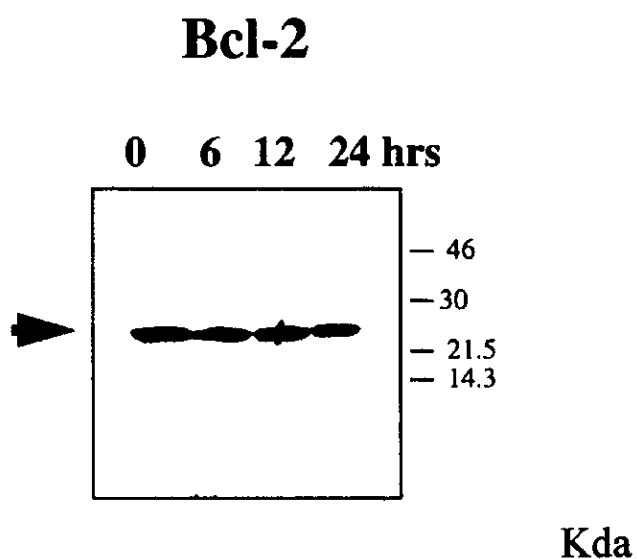


Figura 10. Niveles de expresión de la proteína Bcl-2 de células HeLa expuestas a extracto etanólico a una dilución de 1/100 con 30 μ gr.

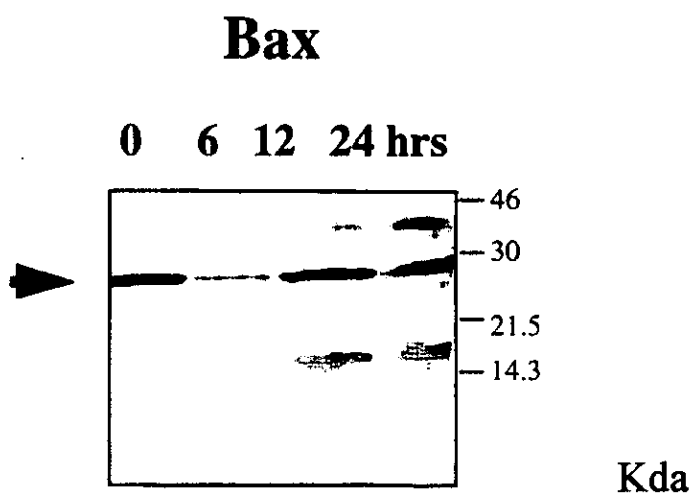


Figura 11. Niveles de expresión de la proteína Bax de células HeLa, expuestas a extracto etanólico a una dilución 1/100 con 30 μ gr.

En la Figura 10 se muestra que los niveles de la proteína Bcl-2 se mantienen constantes durante el curso temporal de células HeLa expuestas al extracto. Es interesante observar que los niveles de la proteína Bax, Figura (11), bajan ligeramente, específicamente la proteína Bax de 24 kDa (beta) si bien hay un aumento considerable en la forma epsilon de 15.7 Kda, después del tratamiento.

**ESTA TESIS NO SALIÓ
DE LA BIBLIOTECA**

Discusión

El extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* es citotóxico para la línea celular HeLa de cáncer cervicouterino. Esta citotoxicidad fue dependiente de la concentración y del tiempo. Después de la exposición de células HeLa con el extracto etanólico las células mostraron núcleos condensados y fragmentados característicos del proceso apoptótico. También se detectó fragmentación del DNA en células HeLa tratadas con el extracto etanólico con la técnica de TUNEL. Con estos resultados podemos concluir que el extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* produce apoptosis *in vitro* en una línea celular de cáncer cervicouterino. Este proceso apoptótico también fue dependiente de la familia de proteínas Bcl-2, aunque la proteína Bcl-2 específicamente no disminuyó, una isoforma de la proteína Bax aumentó sus niveles proteicos durante la exposición con el extracto etanólico. Bax puede dimerizar consigo misma o con Bcl-2 y se ha demostrado que cuando se sobreexpresa acelera el proceso apoptótico posiblemente contrarrestando el papel de Bcl-2, ya que cuando se sobreexpresa Bcl-2 predominan sus homodímeros y la célula se protege contra apoptosis; alternativamente, cuando Bax se sobreexpresa puede formar dímeros con Bcl-2 y así inducir el proceso apoptótico, por lo tanto la cantidad de Bcl-2/Bax en una célula es un "switch" que determina si una célula entra al proceso de muerte o sigue viviendo después de un estímulo determinado.

Es importante señalar que este trabajo es el inicio de un proyecto que está dirigido a estudiar las plantas que de forma empírica se utilizan para el cáncer. Es de gran importancia como siguiente paso, el aislar la sustancia activa de este extracto, y determinar si sería posible utilizarlo como droga antineoplásica y si tendría ventajas a nivel farmacológico, clínico y económico sobre otras drogas ya utilizadas en la actualidad.

Referencias

1. Kerr, J. F. R., and Curman, B. V. 1991. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp. 5-13
2. Bowen, I.D. 1993. Apoptosis or programmed cell death ?. *Cell Biology International* 17: 365-380.
3. Cory, S. 1998. Cell death throes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95:12077-12079.
4. Wyllie, A. H. 1992. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br. J. Cancer*. 67: 205-208.
5. Engeland, M. V., Kuijpers, H. J. H., Ramaekers, F. C. S., Reutelingsperger, C. P. M., and B. Schutte. 1997. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Experimental Cell Research*, 235: 421-430.
6. Ellisra, Y. J., and R. Horvitz. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7: 663-6698.
7. Wyllie, A.H., Kerr, J.R.F., Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-305
8. Kerr, J.R.F. 1994. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-26.
9. Raff, M.C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 356:397-400.
10. Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284: 555-556.
11. Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E. and J.A. Cidlowski 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. 5: 21-26
12. Compton, M. M. 1992. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome . *Cancer Metastasis Rev.* 11: 105-109.
13. Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T., Dinsdale, D. 1994. Formation of large molecular weight fragment of DNA is a key committed step of apoptosis in Thymocytes *J. Immunol.*, 153:507-516.

14. Bortner, C D., Oldenburg, N.B.E. y J. A. Cidlowski. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell Biology*, 5: 21-27.
15. Maldonado, V., Meléndez, J., González, H y A. Ortega. 1995. Internucleosomal DNA cleavage in HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochemistry and molecular biology international*. 37(4):691-696.
16. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. 1990. Apoptosis : the role of the endonuclease . 136: 593-608.
17. Barry, M.A., Eastman, A. 1992. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca^{2+} and pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 186: 782-789.
18. Walker, R. P., Pandey, S., and Sikorska, M. 1995. Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death and Differentiation*, 2:97-104, .
19. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391:96-99.
20. Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H., and Nagata, S. 1998. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:9123-9128.
21. Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, and Y Nagata. 1998. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 143: 1353-60
22. Searle, J.S., Kerr, J.F.R. and C.J. Bishop. 1982. Necrosis and apoptosis: Distinc modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu*. 17:229-232.
23. Enari, M, Sakahira, H, Yokoyama, H, Okawa, K, A. Iwamatsu. 1998. Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391: 43-50.
24. Dragovich, T., Rudin, Ch.M. y C.B. Thompson. 1998. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene*. 17:3207-3213.
25. Redd, J. C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol*. 124: 1-6
26. Adams, J. M., and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281:1322-1326.
27. Jacobson, M.D. 1997. Bcl-2- related proteins get connected. *Current Biology*. 7(5): 277-281.

28. Oliver, F.J., Marvel, J., Collins, M.K.L. and A. López-Rivas. 1993. Bcl-2 oncogene protects a bone marrow-derived pre-B cell line from 5'-fluor, 2'-doxyuridine-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1: 126-132.
29. Hsu, B., Marin, M. C., Brisbay, S., McConnell, K. and McDonnell, T.J. 1994. Expression of bcl-2 gene confers multidrug resistance to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Bull.* 46: 125-129
30. Boise, L.H., González, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., and C.B. Thompson 1993. Bcl-x a Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator os apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.
31. Nuñez, G. and Clarke, M.F. 1994. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell. Biol.* 4: 399-403
32. Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates prograded cell death. *Cell.* 74: 609-619.
33. Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahh, H., Butler, E., Selverstone, J., Ord, T. and D.E. Bredesen. 1993. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1277.
34. Hay, R. Caputo, J. Chen, T.R. Macy, M. McClintock, P. and Y. Reid. 1994. *ATCC Cell Lines and Hybridomas*. 8Th edition. American Type Culture Collection. 640 pp.
35. Denizot, F. and R. Lang. 1986. *Immunol. Methods.* 89: 271-276.
36. Pérez, E.B.E. y M.A. Villavicencio. 1995. *Lista de las Plantas medicinales del Estado de Hidalgo*. U.A.E.H. 45 pp.
37. Pande, S.V. y M.S.R. Murthy 1994. A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 220:424-426.
38. Margulis, L. And K.V. Schwartz. 1988. *Five Kingdoms* 2nd ed.. W.H. Freeman & Co., New York.
39. White, E. Overview of apoptosis. *Oncogene Research Products*. 1998.
40. Fonseca, R. M. 1994. *Cupressaceae y Taxodiaceae*. *Flora de Guerrero*. 3:3-7.