



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ)
LAB 2, P.B.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**“Determinación del efecto antiproliferativo de la lactona
7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) en la proliferación,
ciclo celular e inducción de apoptosis sobre líneas
celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

CARLA ORNELAS CADENA

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2009





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.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luís Sánchez Sánchez, por toda su paciencia, apoyo y orientación para el desarrollo de esta investigación.

A la M. en C. Ma. Luisa Escobar Sánchez por su cooperación y ayuda en todo lo que respecta a Microscopía Electrónica.

Al M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores por proporcionar la lactona con la cual se trabajo.

A los miembros del jurado:

M. en C. Carlos Bautista Reyes

M. en B. Enrique Mendieta Marquéz

M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores

M. en C. Luís Sánchez Sánchez

Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez

Por todos sus comentarios y sugerencias para la revisión y enriquecimiento de este trabajo.

Al M. en C. Hugo López Muñoz y nuevamente al Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez por todas sus enseñanzas y conocimientos brindados a lo largo de toda mi preparación, de verdad, mil gracias por enseñarme como se debe trabajar en un laboratorio.

DEDICATORIAS

A mis padres.

Por brindarme una buena formación, por su paciencia y cariño en los momentos mas difíciles y sobre todo por darme la oportunidad de estudiar una carrera.

A mis hermanos.

Por ser un poco comprensivos conmigo jaja.

A Richard (Mi gato).

Por estar siempre a mi lado, por ser lo que mas quiero en el mundo y por que a pesar de ser un pequeño animalillo, a veces sentía que me comprendías mas que nadie jaja.

A Jorge M.

Por darme tu amor, comprensión y cariño. Gracias por tu apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado.

A los compañeros que estuvieron trabajando conmigo: Carmina, Danahé, Edmundo, Jorge, Vicente, Hugo, Eliseo, Karla, Eli, Osva.

A todos mis amigos: Vero, Angel, Erick, Juan, Humberto, Veverly, Genaro, Eduardo, etc. Por todos los buenos momentos que pasamos juntos.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Marco teórico.....	4
• La célula.....	5
• Proliferación celular.....	6
• Ciclo celular.....	8
• Muerte Celular.....	9
• Apoptosis.....	14
• Necrosis.....	15
• Cáncer.....	18
• Cáncer cérvico-uterino.....	19
• CaCu y VPH.....	19
• Síntomas.....	19
• Diagnóstico.....	20
• Tratamiento.....	21
• Lactonas sesquiterpénicas.....	22
Planteamiento del problema.....	25
Justificación.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivo General.....	28
Objetivos Particulares.....	28
Método.....	29
• Cultivo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.....	29
• Aislamiento y purificación de la lactona CAFA.....	29
• Preparación del stock.....	30
• Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.....	30
• Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.....	31
• Evaluación de la procaspasa-3.....	31

• Determinación específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de Túnel.....	32
• Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.....	33
• Determinación de la IC ₅₀ matemática.....	34
• Cuantificación de la procaspasa-3 a través del Programa Adobe Photo Shop CS2.....	34
• Análisis estadístico.....	35
Resultados.....	36
Discusión de resultados.....	49
Conclusiones.....	53
Bibliografía.....	54
Apéndice.....	59

RESUMEN

El cáncer cervical se ubica como una de las principales causas de defunción en nuestro país, siendo el responsable de más de 450,000 muertes al año. Dentro de las nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de este tipo de enfermedad se ha contemplado el uso de compuestos vegetales orientados hacia el tratamiento del mismo. Entre este grupo de compuestos destacan las lactonas sesquiterpénicas a quienes se les han atribuido diversas actividades como: agentes antitumorales, antiinflamatorios y antivirales. Por ello, la obtención de nuevas lactonas a partir de su fuente natural o por transformación bioquímica, abre un panorama interesante en lo que se refiere a estudios de estructura y actividad para poder ser consideradas como posibles agentes terapéuticos. En el presente trabajo, se evaluó la actividad antitumoral de la lactona guayanólida CAFA (7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C), sobre líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino: HeLa, CaSki y ViBo. Los resultados demostraron que la lactona CAFA, disminuye el número celular en un 50% (IC₅₀) cuando los cultivos son tratados con las concentraciones de 1.55, 5.77 y 7.34 μ g/ml en células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. La disminución del número celular observada para células HeLa, CaSki y ViBo, no fue debida a una alteración en el ciclo celular, como lo demostró el análisis de distribución del ADN en cada una de las fases del ciclo, evaluado por citometría de flujo. Sin embargo, al evaluar la expresión de la procaspasa 3 y la fragmentación del ADN por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente, se encontró que la lactona CAFA induce a las tres líneas celulares a una muerte por apoptosis. En contraste, al tratar cultivos de fibroblastos de cérvix humano con las 3 concentraciones IC₅₀, solo se ve afectada la proliferación en un 60% con la dosis de 7.34 μ g/ml, correspondiente a las células ViBo, las cuales no se encuentran infectadas con el virus del papiloma humano (VPH), y representa a los tumores de cérvix no asociados al VPH mismos que tienen una muy baja incidencia. Sin embargo, lo relevante de los resultados, es que las otras concentraciones correspondientes a las IC₅₀s determinadas para las células HeLa y CaSki, infectadas con HPV-18 y HPV-16 respectivamente, y que representan entre las

dos líneas celulares, al 70% de incidencia de tumores cervicales, no afectan el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano obtenido de pacientes histerectomizadas por causas diferentes a cáncer cervical. Datos muy interesantes, que hacen de esta lactona, un fuerte candidato para ser estudiado como un agente con potencial terapéutico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico-uterino es el carcinoma de mayor incidencia a nivel mundial y es la primera causa de muerte (INEGI, 2008). Dentro de los factores de riesgo asociados con este padecimiento se encuentran: el inicio de relaciones sexuales a edad temprana, el número de parejas sexuales, el presentar un historial clínico con antecedentes de alguna infección por transmisión sexual, los hábitos de higiene, el consumo de tabaco, alcohol o uso de anticonceptivos, son las principales causas de la adquisición, manifestación y progresión de éste tipo de cáncer. Se ha informado que el 99% de todos los casos de carcinomas de cérvix es originado por la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) y que en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de estos casos, el resto presentan el VPH 31 y 45 (Muñoz & Bosch, 1997) y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cérvico-uterino es negativo al VPH. Pese a los esfuerzos encaminados a estudiar y combatir este tipo de cáncer, aún no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana. Por ello, en los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos vegetales como posibles agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos, destaca la presencia de lactonas sesquiterpénicas; las cuales, son un amplio y diverso grupo de productos naturales presentes en más de 100 familias, en su mayoría de la familia *Asteraceae* (*Compositae*), de las cuales, se han descrito al menos 3,000 estructuras (Siyuan Zhang *et al*, 2005). Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos cíclicos que poseen al menos un anillo de γ -lactona (es decir, que involucra un grupo carbonilo y un oxígeno). Se tienen informes de que algunas de estas estructuras ya han sido probadas en líneas celulares de cáncer de mama, piel y vejiga y han tenido un efecto antiproliferativo (Shyng-Shiouo F. *et al*, 2006), sin embargo, el continuo hallazgo de nuevas lactonas hace que estos compuestos se encuentren bajo constante estudio. Por ello, en el presente trabajo se describe la actividad antiproliferativa de una nueva lactona (CAFA) evaluada sobre líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino.

MARCO TEÓRICO

LA CÉLULA

Los organismos vivos se reproducen transmitiendo la información genética a su progenie. Cada célula es la unidad auto-reproductiva más pequeña y es el vehículo de transmisión de la información genética en todas las especies vivas. Esta redundancia genética ha permitido la diversificación y la especialización de genes para nuevas tareas, pero ha hecho más difícil la tarea de descifrar cada una de sus funciones (Alberts *et al*, 2004).

Así pues, las células de un organismo pluricelular están comprometidas a colaborar. Para coordinar su comportamiento, emiten, reciben, interpretan y elaboran conjuntos de señales que actúan como controles sociales. El resultado de este comportamiento es que cada célula actúa de una manera socialmente responsable, dividiéndose, manteniéndose quiescente, diferenciándose o muriendo cuando sea necesario para el bien del organismo. Cualquier comportamiento no altruista de una célula arriesga el funcionamiento del organismo.

El cuerpo humano, formado por más de 10^{14} células, miles de millones de células sufren mutaciones cada día, rompiendo potencialmente los controles sociales, lo cual les proporciona una ventaja selectiva, permitiendo que se dividan y crezcan más vigorosamente que sus vecinas, comprometiéndolo a que pueda desarrollar un tipo de cáncer (Alberts *et al*, 2004).

PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular es un evento biológico que tiene como objetivo que la célula se divida, dando origen a dos células genéticamente idénticas. Este evento se regula mediante señales químicas que la activan o la inhiben (Fig. 1). Las células presentan diferentes ritmos de proliferación lo cual depende del tejido del cual formen parte. Además de las células especializadas que no se dividen después de su diferenciación, se tienen a otras que se dividen de manera regular y a ritmo acelerado, entre estos dos extremos se encuentran aquellas que se dividen lentamente o que no se dividen, pero que pueden llegar a ser estimuladas por factores de crecimiento secretados por células vecinas o localizadas en tejidos u órganos distantes y que actúan de manera autocrina, paracrina o endocrina.

Las células necesitan señales procedentes de otras células, no solamente para proliferar, sino también para sobrevivir. Si se les priva de tales factores de supervivencia, las células activan un programa intracelular de suicidio y mueren por un proceso denominado muerte programada (apoptosis). El hecho de necesitar señales procedentes de otras células para poder sobrevivir ayuda a garantizar que las células sobrevivan sólo cuando y dónde son necesarias. Estos mecanismos de control y autocontrol, se mantienen regulados, gracias a la actividad del ciclo celular.

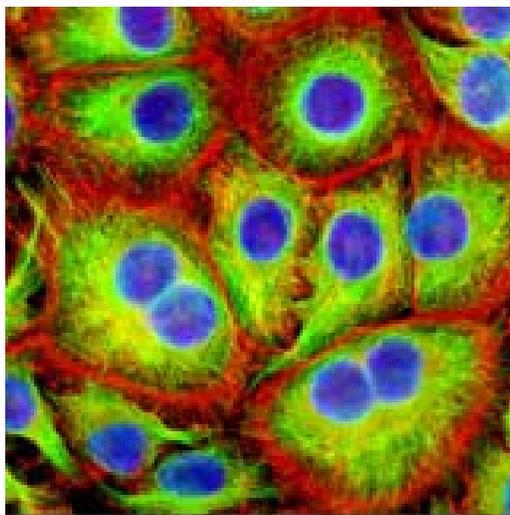


Fig. 1. La proliferación celular se inicia por un proceso de duplicación exacto del contenido de las mismas, que posteriormente culmina con la generación de dos células hijas idénticas a las progenitoras. Tomada de www.uibcongres.org

CICLO CELULAR

Como bien se sabe, una célula normal se reproduce y divide a través de un proceso conocido como el ciclo celular, el cual tiene como función principal duplicar con exactitud la gran cantidad de ADN de los cromosomas y luego segregar las copias con precisión en dos células hijas idénticas. Estos procesos definen las dos fases principales del ciclo celular. La duplicación del ADN sucede en la fase S (de síntesis), la cual requiere entre 10 y 12 h. y ocupa alrededor de la mitad del tiempo que dura el ciclo celular. Después de la fase S, la segregación de los cromosomas y la división celular ocurren en la fase M (de mitosis), la cual ocupa mucho menos tiempo (menos de una hora, en una célula de mamífero). La mayoría de las células tardan mucho más tiempo en crecer y duplicar su masa de proteínas y organelos que en replicar su ADN y dividirse. En el ciclo celular, se intercalan fases de descanso que le permiten a la célula disponer de más tiempo para crecer, uno entre la fase G_1 y otro entre la fase G_2 . Así, el ciclo celular eucariota se divide tradicionalmente en cuatro fases secuenciales: G_1 , S, G_2 y M, (Fig. 2). A las primeras tres fases (G_1 , S y G_2) se les denomina, en conjunto, interfase, y su duración puede variar entre unas 23 o 24 horas antes de que ocurra la mitosis (Alberts *et al*, 2004).

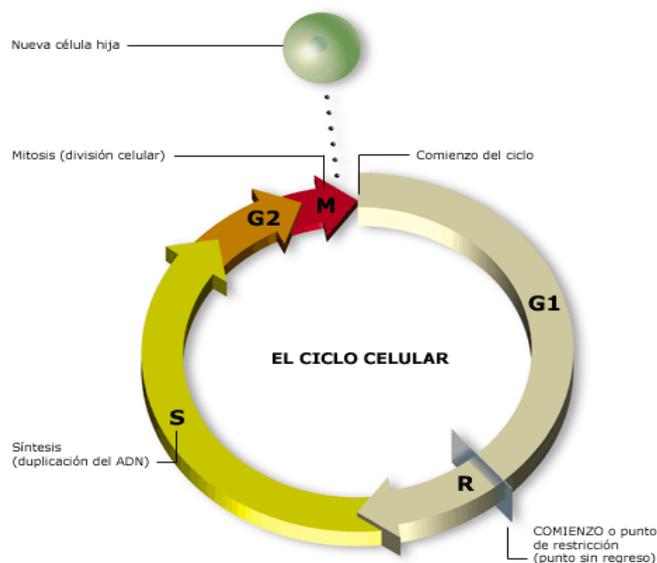


Fig. 2. El ciclo celular es una ordenada serie de eventos, que se requieren para la replicación celular. Se compone principalmente de cuatro fases: G_1 , S, G_2 (interfase) y una fase de división celular conocida como Mitosis. Tomada de www.cellsignal.com

Las fases G_1 y G_2 son mucho más que meros períodos de espera que permiten crecer a la célula, ya que proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo para asegurarse que las condiciones son adecuadas y de que han completado los preparativos antes de la fase S y la mitosis. La fase G_1 es especialmente importante al respecto. Su duración puede variar mucho dependiendo de las condiciones externas y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Por ejemplo, si las condiciones extracelulares son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase G_1 e incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado G_0 (G cero), en el cual pueden permanecer durante días, semanas, incluso años antes de volver a proliferar. En efecto, muchas células se mantienen permanentemente en G_0 hasta que ellas o el organismo mueren. Si las condiciones extracelulares son favorables y hay señales para crecer y dividirse, las células de G_0 se activan para entrar a ciclo celular y las que se encuentran en G_1 temprana reúnen los requerimientos necesarios para rebasar el punto de restricción que permite la entrada a la fase S. Superado este punto, las células quedan determinadas para replicar el ADN, incluso aunque desaparezcan las señales extracelulares que estimulan el crecimiento y la división celular (Lodish *et al*, 2004).

Sin embargo, durante el proceso de transformación que existe de las células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas. En este proceso se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como la segregación del material genético (Carnero A., 2002). Aunque las células normales tienen mecanismos que les permiten reparar las alteraciones que se pudieran presentar a nivel metabólico y/o genético, que alteren su progresión normal a través del ciclo celular, las células tumorales al respecto, han perdido esta capacidad (Cooper G. M., 2000).

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas.

Estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico (Evan *et al*, 2001).

Algunas de estas mutaciones afectan genes que codifican proteínas involucradas en los mecanismos de control del ciclo celular (puntos de control), las cuales determinan el orden de los eventos en dicho ciclo, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN. Tales mutaciones alteran también los mecanismos reguladores de la muerte celular, mismos que, cuando son alterados confieren a la célula tumoral la distinción de inmortalidad.

MUERTE CELULAR

En los organismos pluricelulares, cuando una célula ha dejado de ejercer su función o representa una amenaza para el organismo, es eliminada a través de un mecanismo suicida, que se conoce, como muerte celular programada. Dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis (Raff M., 1998) (Fig. 3).

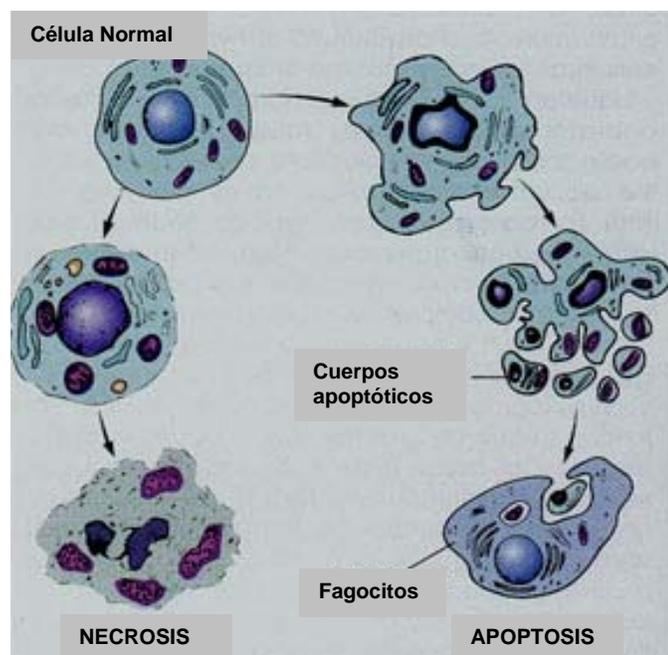


Fig. 3. Principales cambios morfológicos de los procesos de muerte celular necrótica y apoptótica. Tomada y modificada de www.cecs.cl

APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas (Johnstone *et al*, 2002). Morfológicamente, la diferencia con la necrosis es que en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular. Bioquímicamente, la característica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (Gupta S., 2000). En el proceso de apoptosis se distinguen varias fases: en la fase D1, se producen los mecanismos moleculares que inician el fenómeno; en la fase F, se fragmenta el ADN; en la fase D2, se produce la destrucción nuclear y citoplásmica, y los restos son fagocitados por macrófagos (Solé F. J. *et al*, 1995).

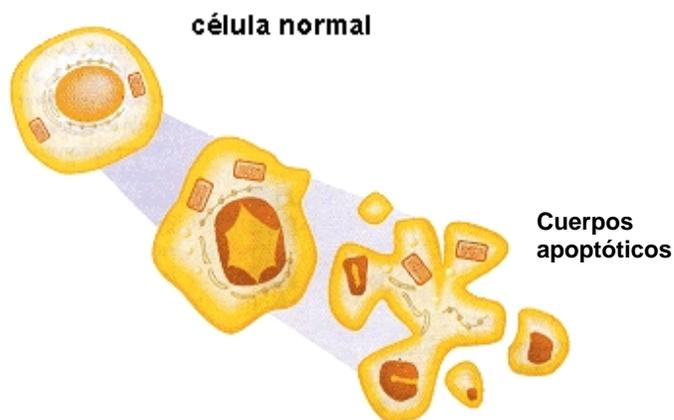


Fig. 4. En la apoptosis la célula se encoje, empiezan a aparecer vesículas y la cromatina se compacta, formando los llamados cuerpos apoptóticos. Tomada y modificada de www.geocities.com

Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis están mediados por “efectores de muerte celular” como las caspasas (proteasas cisteínicas). Pero para que estos efectores actúen es necesario que el balance

vida-muerte se rompa por las interacciones de los “activadores de muerte celular”, extracelulares o intracelulares (Caballero *et al*, 2002):

- *Activadores de muerte extracelulares*: la supervivencia celular depende de la recepción de señales extracelulares adecuadas, en ausencia de las cuales la célula se suicida por el mecanismo de la apoptosis. Algunos ejemplos son:

- *Integrinas*: son moléculas que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto celular. Pero además de su función estructural actúan como transductores de señales de supervivencia celular y de protección frente a la apoptosis cuando el contacto con la matriz extracelular es adecuado. La señalización asociada a integrinas es fundamental en el control de la supervivencia o muerte celular (entre otros procesos celulares). Por ejemplo, cuando una célula epitelial pierde contacto con su lámina basal, se inicia el proceso de apoptosis.

- *Factores de crecimiento*: la supervivencia celular también depende de una exposición apropiada a factores de crecimiento. La falta de factores del crecimiento puede ser un factor en el inicio de la apoptosis. En el embrión los factores de crecimiento maternos y embrionarios juegan un papel clave en el desarrollo. Esto se ha observado en embriones cultivados en medios suplementados con factores del crecimiento (TGF- α y IGF-I), mostrando una mejora en el desarrollo. Esto nos hace pensar que dicha suplementación incrementa el número celular y disminuye el número de células apoptóticas en el embrión.

- *Citocinas de muerte celular*: son capaces de iniciar directamente la muerte vía apoptosis. Es el caso del ligando Fas y del factor de necrosis tumoral (*tumoral necrosis factor* o TNF), producidos por los linfocitos T y las células *natural killer*.

- *Activadores de muerte intracelulares*: un ejemplo es la familia de proteínas Bcl-2, involucradas en el control de la apoptosis. Algunos miembros de la familia son anti-apoptóticos (Bcl-2 y Bcl-xL) y otros son pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y

Bak). Las señales apoptóticas, tanto intracelulares como extracelulares, convergen para activar a las caspasas. La condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la rotura de la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, son consecuencias directas de la actividad de las caspasas. Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por rotura proteolítica mediante dos vías alternativas (Adrain *et al*, 2002) (Fig. 5):

- **Vía del receptor de muerte celular:** los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia génica de receptores del TNF (TNFR). Los mejor caracterizados son el receptor Fas, también conocido como CD95 (*cytotoxicity-dependent protein95*) o APO-1 (*apoptosis-1 protein*), y el receptor del TNF (TNFR). Tienen en común una secuencia homóloga denominada “dominio de muerte” (*death domain* o DD), capaz de iniciar la cascada de eventos que llevan a la apoptosis. Los ligandos para estos receptores pertenecen a la familia del TNF, y son el ligando Fas y el TNF. Estos ligandos, que normalmente existen en forma trimérica, se unen a sus receptores induciendo también su trimerización y así activándolos. El receptor Fas activado recluta moléculas adaptadoras como el FADD / MORT-1 (*Fas-associated death domain / mediator of receptor-induced toxicity-1*), que contiene también un “dominio de muerte” (DD) que se une al análogo del receptor Fas y un “dominio efector de muerte” (DED) que se une a un dominio análogo de la procaspasa 8. Esta enzima, también conocida como FLICE (*FADDlike IL-1 β -converting enzyme*), sufre activación autocatalítica al unirse al FADD convirtiéndose en la caspasa 8 activa. El complejo que forman el Fas, el FADD y la FLICE se denomina DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*). La caspasa 8 rompe y activa otras caspasas efectoras como la 3, la 6 y la 7, que constituyen la principal actividad caspasa en las células apoptóticas. En el caso de los receptores del TNF (TNFR-I y el TNFR-II), la molécula adaptadora que reclutan es el TRADD (*TNFR-associated death domain*), que a su vez sirve de plataforma para el reclutamiento de otros adaptadores como el FADD, el TRAF-2 (*TNFRassociated factor-2*) y el RIP (*receptor interactive protein*). El complejo

formado finalmente activa las caspasas reguladoras y efectoras, al igual que lo hacía el receptor Fas (Csipo *et al*, 1998).

- **Vía mitocondrial:** se trata de una vía independiente de los receptores de muerte, y es la que inducen los agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas de estrés (especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno).

Las mitocondrias son organelos con dos compartimentos: la matriz, rodeada por la membrana interna (MI), y el espacio intermembranal, entre las membranas interna y externa (ME). En la MI está la ATP sintetasa y la cadena respiratoria y en el espacio intermembrana está el citocromo C, que si se libera al exterior de la mitocondria induce la apoptosis. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan esta liberación: los miembros anti-apoptóticos de esta familia (Bcl-2 y BclxL) bloquean la liberación del citocromo C, mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) la inducen. Cuando el citocromo C se libera, se provoca el ensamblamiento del apaf-1 (del inglés *apoptotic protease-activating factor*) con la procaspasa 9, formándose el complejo denominado apoptosoma. El apaf-1 tiene un dominio reclutador de caspasas denominado CARD (del inglés *caspase recruiting domain*), que requiere ATP para la inducción de la ruptura autolítica de la procaspasa 9 en caspasa 9 activa. Esta última se libera del apoptosoma para activar a las caspasas 3, 6 y 7 (caspasas efectoras) que provocan la degradación de varios sustratos (ICAD o CAD) que dan lugar a la apoptosis (Hague *et al*, 2004).

Las señales extracelulares de supervivencia inhiben la apoptosis por activación de una cinasa que fosforila a la proteína Bad haciendo que esta quede secuestrada en el citoplasma en lugar de ejercer su acción pro-apoptótica en la mitocondria. Por el contrario, las señales apoptóticas extracelulares traslocan a Bad y Bax al interior de la mitocondria, provocando así la liberación del citocromo C e induciendo la activación de las caspasas. La proteína Bid puede ser traslocada al interior de la mitocondria por la caspasa 8 (activada por el ligando

NECROSIS

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. Este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos.

Los cambios morfológicos que involucra son: hinchamiento de la mitocondria, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático al exterior, lo cual conduce a que se produzca una inflamación. A su vez comprende cambios en la membrana plasmática conduciendo a una pérdida en el balance de los iones Ca^{2+} y Na^+ , al tiempo que se presenta en una pérdida de K^+ , seguido por acidosis, trauma osmótico, condensación de cromatina y los patrones característicos de picnosis nuclear. En este estado la mitocondria pierde la matriz granulosa llegando a presentar una apariencia densa y la membrana interna se contrae alejándose de la membrana externa (Studzinski G. P., 1995) (Fig. 6).

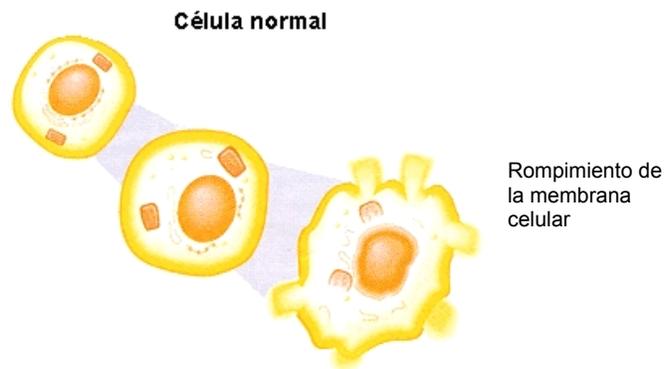


Figura 6. En la necrosis la célula y los orgánulos citoplasmáticos se hinchan, al tiempo que el núcleo se mantiene relativamente intacto, posteriormente la célula se revienta, liberando su contenido. Tomada y modificada de www.geocities.com

La desregulación de los procesos que regulan la división celular, así como los que controlan la integridad del genoma y los mecanismos de reparación del mismo y los mecanismos de muerte, son características distintivas de las células que dan origen a crecimientos tumorales malignos (Caerr F. 1994).

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad en la cual clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas, destruyendo finalmente toda la sociedad celular (Schmitt *et al*, 2002) y se produce a una escala temporal de meses o años en una población de células del organismo (Fig. 7).

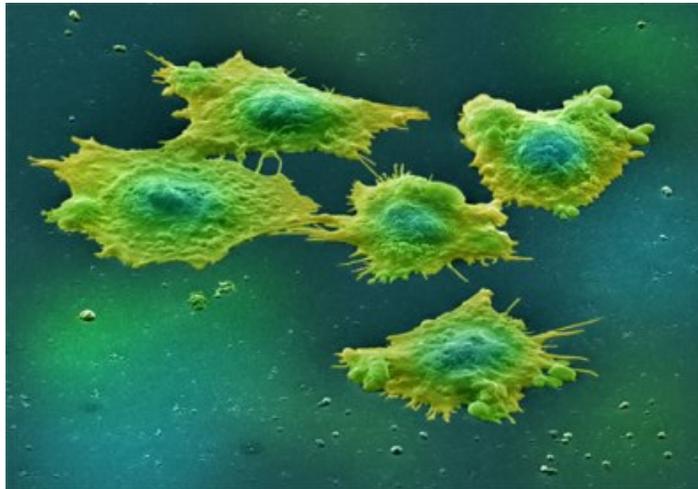


Fig. 7. Imagen que muestra células cancerígenas de un carcinoma de colon, tomadas de un cultivo celular, así mismo se aprecia la morfología de cada una de ellas. Tomada de www.pasteur.be

De esta manera, las células cancerosas han sido definidas por dos características hereditarias particulares:

- a) Se reproducen desafiando los comportamientos normales que posee una célula en división e,
- b) invade y coloniza los territorios reservados normalmente para otras células.

Esta es la combinación que hace tan peculiarmente peligroso a un cáncer. Una célula anormal aislada que no prolifera más que sus vecinos normales no provoca ningún daño significativo, pero si su proliferación está fuera de control, puede dar lugar a un tumor. Mientras las células neoplásicas sigan juntas en una sola masa, se dice que el tumor es benigno. En esta etapa, una curación completa puede ser alcanzada generalmente quitando la masa quirúrgicamente. Un tumor se considera un cáncer maligno, cuando las células cancerosas pueden separarse

del tumor maligno y entrar al sistema linfático o al flujo sanguíneo, que es la manera en que el cáncer invade otras partes del cuerpo. Se entiende por invasión cuando un tumor rebasa los límites anatómicos del tejido de origen. Un carcinoma es invasivo cuando rompe la membrana basal y comienza un proceso de penetración hacia el tejido subyacente (mesénquima, tejido conjuntivo). Dentro del proceso de invasión (del tejido subyacente) las células tumorales alcanzan la lamina basal de las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos o linfáticos, la degrada y viaja por el torrente sanguíneo, invadiendo y colonizando nuevos tejidos y órganos, a este proceso se le conoce como metástasis (Scully C., 2002), (Fig. 8).

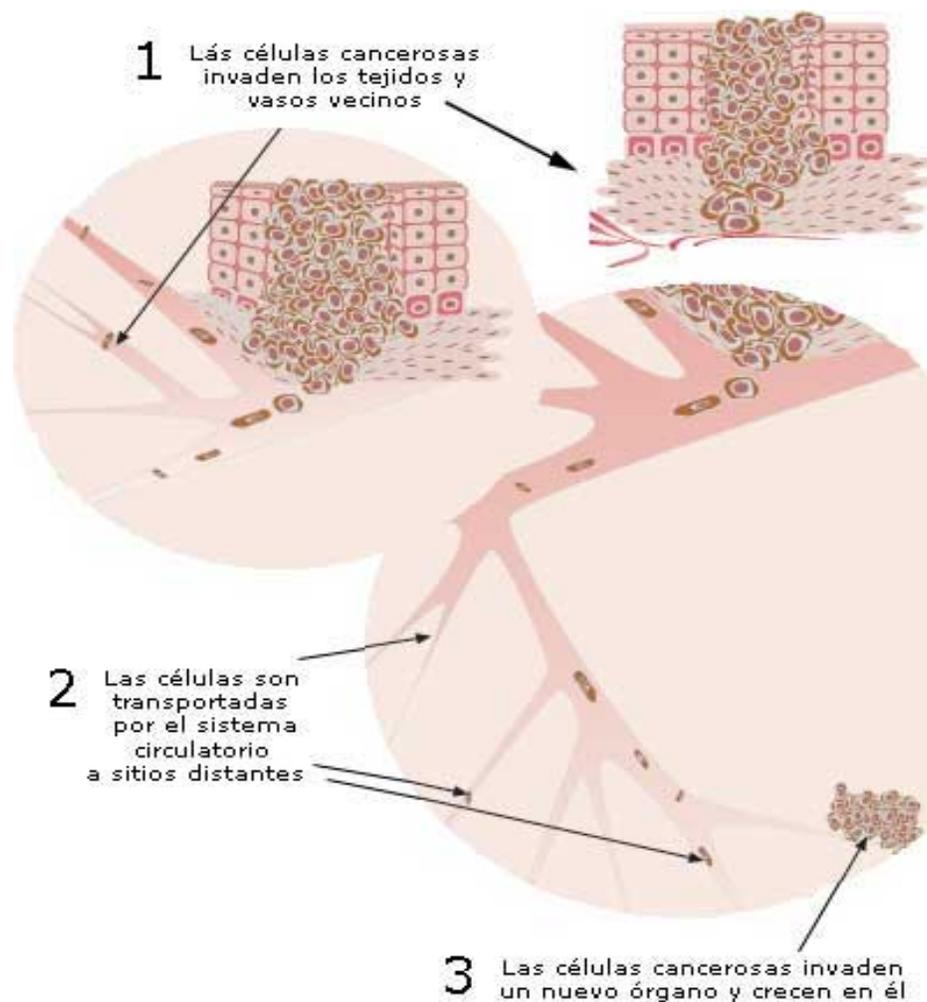


Fig. 8. Las células cancerosas poseen la propiedad de invadir, destruir y reemplazar progresivamente los órganos y tejidos vecinos, así también, circular por la sangre o la corriente linfática y formar tumores secundarios.

Existen diferentes tipos de cánceres y se clasifican según el tejido y célula de la cual se originan. Por ejemplo, los cánceres que se presentan en células epiteliales como la piel o endotelios se llaman carcinomas; los que se presentan en las células del tejido fino conectivo (huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos) o del músculo (tejido adiposo) se llaman sarcomas. Y los que proceden de los tejidos formadores de células sanguíneas (células hematopoyéticas) se les llama leucemias y linfomas (Pardo F. J., 1998).

Se ha reportado que cerca del 90% de los cánceres humanos son carcinomas, quizás porque la mayoría de la proliferación de la célula ocurre en el epitelio, o porque se exponen con mayor frecuencia a las variables formas de daño físico y químico que favorecen el desarrollo de un cáncer.

Dentro de los tumores malignos sólidos, se ha encontrado que la formación de lesiones cancerosas a nivel de la región cérvico-uterina se ubica como la tercer causa de muerte a nivel mundial (GLOBOCAN, 2006), mientras que, para la ciudad de México, se reporta como la segunda causa de muerte, después del cáncer de mama (INEGI 2008).

La Organización Mundial de la Salud calcula que actualmente hay más de 2 millones de mujeres en el mundo que tienen cáncer cérvico-uterino (Winer *et al*, 2003). En México, se diagnostican 4270, casos por día, de los que al menos el 50% de la población fallece por esta causa (INEGI, 2008).

CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu)

El cáncer cervical es una forma de cáncer que se desarrolla en el cérvix, en la región inferior y estrecha del útero. El cáncer ocurre cuando las células en el cuerpo (en este caso células del cérvix) se dividen sin control ni orden (Herrero *et al*, 2003).

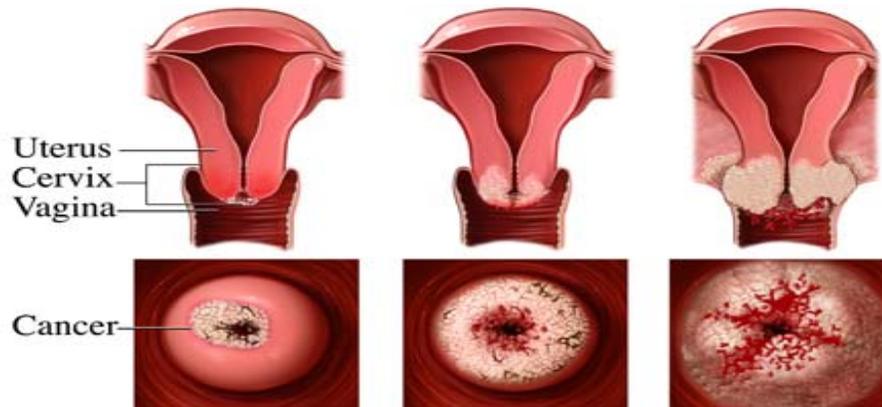


Fig. 9. Imagen que muestra cómo se va desarrollando el cáncer de cérvix. Inicialmente progresa en capas de tejido que se encuentran en la superficie del cérvix, posteriormente invaden capas más profundas del cérvix y útero y finalmente se extiende en el área pélvica y otras áreas del cuerpo (metástasis). Tomada de www.health.com

Entre los principales factores de riesgo que se conocen para el cáncer de cérvix, se encuentran:

- Infección del cérvix con el virus del papiloma humano (HPV).
- Historial de displasia cervical (una condición pre-cancerosa).
- Historial de SIDA o infección con VIH.
- Múltiples parejas sexuales.
- Actividad sexual antes de los 18 años de edad.
- Primer embarazo antes de los 20 años de edad.
- Historial de no haberse realizado exámenes de Papanicolaou.
- El uso de anticonceptivos orales.
- Haber estado expuesta a la hormona sintética dietilestilbestrol antes del nacimiento.
- Tener más de 25 años.
- Fumar.

Aunque la causa del cáncer es MULTIFACTORIAL, la Investigación sugiere que el cáncer cervical es causado por un virus que se transmite sexualmente llamado Virus del Papiloma Humano (VPH) (Walboomers *et al*, 2000).

CaCu y VPH

El virus del papiloma humano es un virus común que afecta tanto a hombres como a mujeres. Existen más de 100 diferentes tipos de VPH. Aunque la mayoría de los tipos de VPH no causan ningún signo o síntoma y desaparecen sin tratamiento (Koutsky, 1997), existen ciertos tipos de VPH que causan verrugas (papilomas) en las manos, brazos, piernas y otras zonas de la piel (Herrero *et al*, 2003).

Existen varios tipos de VPH que representan un problema grave, puesto que se adquieren por transmisión sexual, algunos de ellos son el VPH-16, VPH-18, VPH-31 y VPH-45 (Villa *et al*, 2006). Generalmente causan displasias de tejidos, que finalizan en metástasis. Hasta el momento se sabe que el VPH 16 y 18 causan el 70% de todos los casos de cáncer de cérvix (Tortolero, 2005).

SÍNTOMAS

Los síntomas del cáncer cervical por lo general no aparecen hasta que células anormales se vuelven cancerosas e invaden tejido cercano (Hazzard, 2005). Cuando esto sucede, el síntoma más común es el sangrado anormal, que puede incluir:

- Sangrado entre periodos menstruales regulares, o bien, sangrado menstrual que dura más tiempo y es más abundante de lo normal.
- Sangrado después de las relaciones sexuales, duchas vaginales, o un examen pélvico (más común).
- Sangrado después de la menopausia.
- Secreción vaginal incrementada que no es sangre.

DIAGNÓSTICO

Los exámenes para diagnosticar cáncer cervical incluyen:

- Examen de Papanicolaou: detecta cáncer cervical así como tejidos precancerosos en el cérvix, llamada displasia cervical. El médico recolecta una muestra de células del cérvix para su examinación. Es importante que una mujer sexualmente activa reciba un examen anual de Papanicolaou, y que de seguimiento a cualquier resultado anormal. Nuevos estudios indican que las mujeres mayores de 30 años de edad que han tenido tres o más exámenes anuales normales de Papanicolaou pueden prolongar con seguridad la revisión de Papanicolaou a una vez cada tres años (Fig. 10).
- Examen de VPH: se puede examinar el mismo material de la prueba de Papanicolaou para detectar virus de VPH (subtipos de alto riesgo).
- Colposcopía: examinación de la vagina y cérvix usando un instrumento iluminado con aumento llamado colposcopio. La colposcopía indica si un examen de Papanicolaou sugiere displasia cervical (pre-cáncer) o cáncer.
- Biopsias: se realizan en cualquier área sospechosa y se examinan para detectar la presencia de células cancerígenas (Mount S. L., 2005).

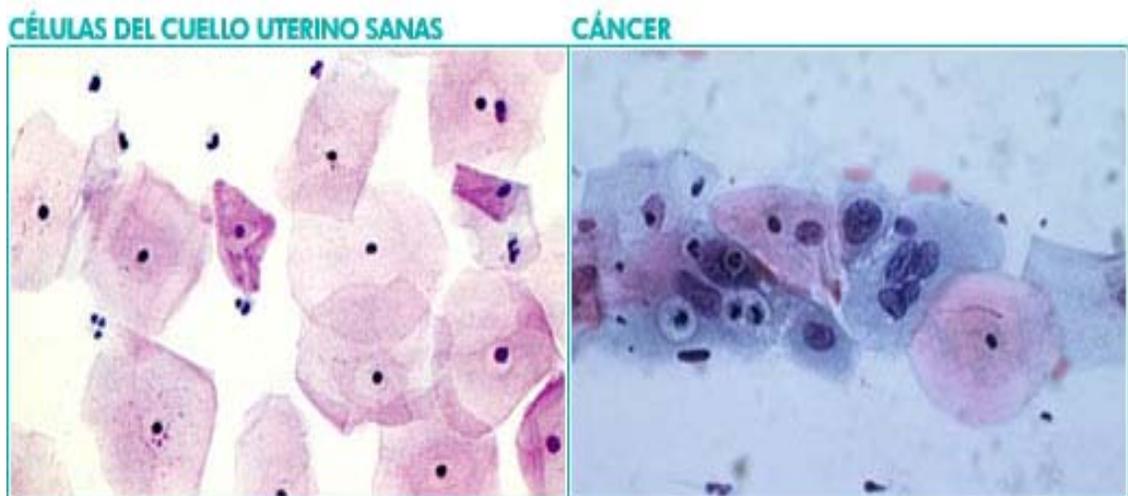


Fig. 10. Citología de células de cuello uterino sanas y células de cuello uterino transformadas. Tomada de www.womanlab.com

TRATAMIENTO

El tratamiento depende del diagnóstico. Según la extensión del cáncer, el tratamiento puede consistir en una o más terapias (Lowy *et al*, 2006):

- Cirugía - extirpación quirúrgica de un tumor canceroso y tejido cercano, y posiblemente nódulos linfáticos cercanos. Si el cáncer ha alcanzado capas más profundas del cérvix pero no se ha propagado más allá del cérvix, el médico puede extirpar sólo el tumor y tejido circundante normal. En algunos casos, se necesita una histerectomía (extirpación del útero completo).
- Terapia de Radiación (Radioterapia) - el uso de radiación para matar células cancerosas y encoger tumores. La radiación se puede administrar de dos maneras:
 - Terapia de Radiación Externa - radiación dirigida al tumor desde una fuente externa del cuerpo.
 - Terapia de Radiación Interna - se colocan materiales radioactivos dentro o cerca de células cancerosas.
- Quimioterapia - el uso de medicamentos tóxicos para matar células cancerígenas. La quimioterapia se puede administrar en muchas formas incluyendo: pastillas, inyecciones, y vía catéter. Los medicamentos entran en el torrente sanguíneo y viajan a través del cuerpo matando principalmente a las células que se encuentran en ciclo celular. La quimioterapia sola, rara vez cura el cáncer cervical. Se puede usar junto con cirugía y/o radiación; la quimioterapia y radioterapia juntas han mostrado ser más efectivas que la radioterapia sola. La quimioterapia también se puede usar para ayudar a controlar los síntomas (dolor y sangrado) cuando una cura ya no es posible.
- Quimioterapia o Terapia de Modalidad Combinada - para la mayoría de los cánceres cervicales, excepto para las primeras etapas del cáncer, la quimioterapia y radioterapia juntas han mostrado curar a más mujeres que la radioterapia sola.

Gran parte de la investigación clínica se centra en el problema de cómo matar selectivamente las células cancerosas. Sólo existen algunas pequeñas diferencias bioquímicas entre las células tumorales y las normales de proliferación rápida. Los niveles de enzimas y las velocidades de reacción difieren ligeramente entre las células malignas y las normales, son estas pequeñas diferencias cuantitativas las que se aprovechan por los métodos de tratamiento actuales.

Actualmente existen numerosos fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores resistentes a estos tratamientos, la elevada toxicidad de los existentes y su alto costo estimulan la búsqueda de nuevas moléculas que mejoren las características mencionadas. Actualmente existe un fuerte interés en moléculas de origen vegetal y en particular en las lactonas producidas por diferentes tipos de plantas, a las cuales se les ha atribuido actividades antimicrobianas, antifúngicas, antitumorales, entre otras.

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

Hoy en día se buscan mejorar las alternativas que existen en el tratamiento del cáncer, ya que en su mayoría poseen diversos efectos secundarios que afectan significativamente la vida del paciente. Dentro de los agentes con posibles fines terapéuticos, se encuentran los compuestos de origen vegetal, los cuales han mostrado poseer diversas actividades biológicas. Entre ellos destacan las lactonas sesquiterpénicas las cuales poseen actividades citotóxicas, insecticidas, amebicidas, antifúngicas, antitumorales, entre otras.

Las lactonas sesquiterpénicas (LSs), son un amplio y diverso grupo de productos naturales presentes en más de 100 familias de plantas con flores. Siendo la familia Asteraceae (Compositae), la más importante, de donde se han aislado cerca de 3000 sustancias, dentro de dicha familia se encuentran plantas de uso medicinal – *Arnica montana*, *Artemisia annua* y *Tanacetum parthenium* – las cuales contienen lactonas sesquiterpénicas, como sus principales

componentes activos, muchos de estos compuestos se han aislado de la hoja y flores de estas plantas, donde pueden constituir cerca del 5% del peso seco (Heywood *et al*, 1997).

El prefijo “sesqui” indica que las LSs están formadas por 15 átomos de carbono (Sukh *et al*, 1982). De acuerdo con su esqueleto carbocíclico, químicamente pueden ser clasificadas en cuatro grupos principalmente; 1) germacranolidas: anillos compuesto de 10 átomos de carbono; 2) eudesmanolidas: compuestos bicíclicos constituidos de 6 átomos de carbono; 3) guayanolidas y 4) pseudoguayanolidas, ambos compuestos bicíclicos constituidos de 5/7 átomos de carbono respectivamente (Holub *et al*, 1986), (Fig. 11).

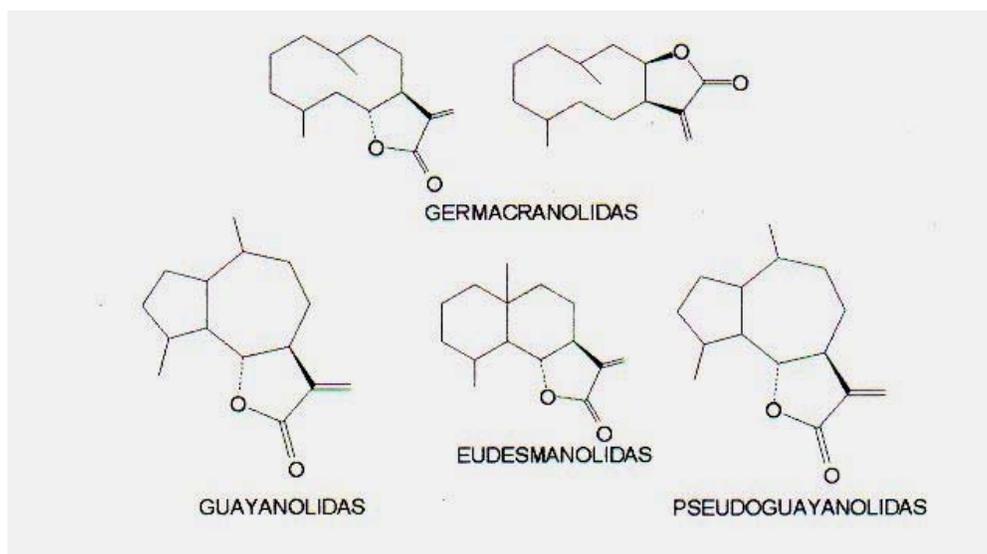


Fig. 11. Diferentes tipos estructurales de lactonas sesquiterpénicas.

Dentro de las Guayanolidas, podemos encontrar a la, lactona sesquiterpénica con nombre 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA), aislada de las partes aéreas de *Podachaenium eminens*, planta colectada en Oax., México (Fig. 12).

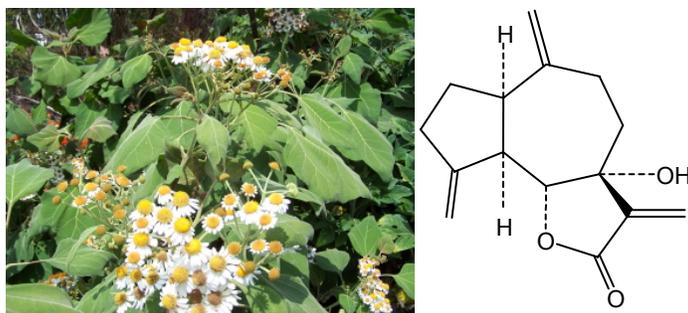


Fig. 12. Planta *Podachaenium eminens* y estructura química de la lactona CAFA. Tomada de www.kartuz.com

La 7α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C, ha mostrado tener efectos biológicos importantes donde destaca la estimulación en la germinación de especies diversas de semillas de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Vargas et al, 2001). Y por otro lado, su actividad para inhibir la enzima fosfofructoquinasa (PKF) en músculo de conejo (Fischer et al, 1989).

Dentro de las actividades farmacológicas descritas para las LSs incluyen su actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral (Siyuan et al, 2005). En el mecanismo de acción de estas sustancias, es generalmente aceptado que la unión covalente de las LSs a grupos sulfhidrilos libres en proteínas, inactiva las funciones de varias macromoléculas, dando como resultado que las LSs pueden interferir con algunos procesos biológicos claves, tales como, señalización celular, proliferación celular, muerte celular (apoptosis) y respiración mitocondrial, entre otros, que dejan ver su diversa actividad farmacológica (Beekman et al, 1997). Un carácter estructural de todos estos compuestos que puede asociarse con muchas de sus actividades biológicas es la γ -lactona- α - β -insaturada que poseen en su estructura (Ze et al, 2005).

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen una de las áreas más activas e interesantes de la investigación fitoquímica, por lo que existe un fuerte interés en evaluar a la lactona sesquiterpénica 7α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA), como una lactona que podría tener un efecto antineoplásico útil en el tratamiento y prevención del cáncer cérvico-uterino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico-uterino se ubica como la principal causa de muerte a nivel mundial, mientras que, en nuestro país presenta una tasa de mortalidad del 13.9% (INEGI, 2008). Para combatir esta enfermedad, existen diversos tratamientos, sin embargo, no son selectivos puesto que algunas células tumorales son capaces de generar resistencia a la droga, lo que repercute en la eficacia del tratamiento. Actualmente, se han tratado de mejorar estas estrategias con el fin de seleccionar e inhibir solo la proliferación tumoral ocasionando los menores efectos secundarios posibles.

Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos y que presentan un fuerte interés por sus múltiples actividades biológicas, se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, las cuales, han demostrado que pueden ser útiles en el tratamiento y prevención de este tipo de cáncer; sin embargo, pocas lactonas han sido descritas sobre el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto antiproliferativo, por lo que resulta de gran interés determinar la actividad biológica que presenta la lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) en líneas de cáncer cervical, con el fin de aportar nueva información que permita describir el mecanismo de acción por el cual ejerce su efecto biológico.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico uterino se encuentra como la principal causa de muerte en mujeres mexicanas, siendo el responsable de más de 450 000 muertes al año. El virus del papiloma humano tipo 16 y 18, están asociados en un 95% de todos los casos. Pese a las estrategias que existen para combatir y erradicar este tipo de cáncer, la tasa de incidencia y mortalidad sigue aumentando día con día.

Dentro de las nuevas alternativas terapéuticas con fines orientados hacia la quimioprevención del cáncer, está el uso de compuestos vegetales entre los cuales podemos mencionar a las lactonas sesquiterpénicas, las cuales poseen actividades antineoplásicas en líneas de cáncer de colon y mama. Sin embargo, para el cáncer cervical es escasa la información que se tiene sobre la actividad biológica que ejercen estos compuestos, por lo que, es necesario generar información acerca de la actividad biológica de lactonas sesquiterpénicas y en particular la lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA), sobre células tumorales de cáncer cérvico-uterino.

HIPÓTESIS

Dado que las lactonas sesquiterpénicas presentan diversas actividades biológicas, como es el caso de la Parthenolida (Changqing *et al*, 2006), deriva la posibilidad de que la lactona sesquiterpénica 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA), ejerza un efecto antitumoral en líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino a través de la detención de alguna fase del ciclo celular, y/o por inducción de muerte por apoptosis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) afecta la densidad celular de las líneas celulares provenientes de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, a través de la detención del ciclo celular y la inducción de muerte por apoptosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
- Determinar la concentración necesaria de la lactona CAFA para disminuir en un 50 % la densidad celular en cada una de las líneas tumorales (IC_{50}).
- Evaluar sí el efecto antitumoral de la lactona CAFA, se origina por la detención en alguna de las fases del ciclo celular, determinada a través de citometría de flujo.
- Determinar mediante inmunocitoquímica, sí la lactona CAFA induce el incremento de la expresión de procaspasa-3 como un parámetro de inducción de muerte por apoptosis.
- Determinar sí la lactona CAFA induce fragmentación del ADN en las células tumorales como un parámetro de evidencia de muerte por apoptosis, a través de la técnica de TUNEL.
- Determinar sí la lactona CAFA disminuye el número celular en fibroblastos normales de cérvix.

MÉTODO

- **Cultivo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.**

Células provenientes de cáncer cérvico uterino son sembradas en cajas petri de cristal de 100 mm. (Pirex USA), con 10 ml. de medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) con rojo fenol, al 10% de suero neonato de cabra (SNC) desactivado a 56°C por 30 minutos (Gibco BRL). Los cultivos son mantenidos a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuaire US Autoflow). Para la realización de los ensayos, se utilizaron cultivos de células tumorales a un 70% de saturación (fase de crecimiento exponencial) (Morgan y Darling, 1993).

- **Aislamiento y purificación de la lactona CAFA**

La lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA), fue donada por el M. en C. Arturo E. Cano Flores, quien aisló y purificó la lactona de la planta *Podachaenium eminens* (Lag) Sch. Bip., colectada a 3 km. al este de Pochutla, Oax., México. En septiembre del 2004. Un ejemplar fue depositado en el Herbario Mexu del Instituto de Biología con número de registro —Mexu-499853—.

De la separación cromatográfica, realizada por el M. en C. Arturo Cano, en las fracciones obtenidas con CH₂Cl₂ (100%) y CH₂Cl₂/AcOEt (80:20 y 60:40), se obtuvo un sólido blanco, que fue recristalizado por un par de disolventes CH₂Cl₂/Pr₂O, para obtener un sólido blanco (1.0720 g, 0.70%) de pf. 124-126°C, y fue caracterizado e identificado como la 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (Fronczek *et al*, 1984), sustancia aislada previamente de una población de *P. eminens*, colectada en Guatemala (Bohlmann *et al*, 1977).

- **Preparación del stock**

A partir de 578 µg de 7α-hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) disuelta en 25 µl de acetato de etilo, se prepararon 5 nuevos stocks que contenían 115.6 µg de CAFA en 1ml. de RPMI, los cuales se depositaron en tubos cónicos de 2.5 ml. (Eppendorfs) nuevos y en refrigeración hasta su utilización.

- **Determinación de la proliferación celular a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.**

Se siembran 7500 células (HeLa, CaSki o ViBo), en cajas de 96 pozos (Corning Inc.), con 100 µl de medio RPMI al 5% de SNC, por 24 h. Posteriormente, se retira el medio de cultivo y se adiciona el compuesto a probar en RPMI fresco (5% de SNC) a concentraciones de 10 hasta 100 µg/ml. El ensayo control contempla la cantidad de vehículo (disolvente) utilizada en la concentración máxima a probar. El cultivo con el compuesto se mantiene por 24 h. más, dando un tiempo total de 48 h. La determinación del número celular se realiza por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta de acuerdo a Kueng et al (1989), para ello, se retira el medio de cultivo, se deja secar al aire. Inmediatamente las células son fijadas con glutaraldehído al 1.1% (Sigma Chemical Co.) por 15 minutos, al cabo del tiempo, se retira el fijador y se deja secar muy bien al aire, posteriormente se procede a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma Chemical Co.) por 20 minutos, al cabo de los cuales se retira el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada (Mili-Q plus Millipore). Nuevamente, se deja secar al aire. Por último, el colorante es solubilizado en ácido acético (J.T.Baker) al 10% en agitación por 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm. en un espectrofotómetro (Image Tecan Spectra). Los resultados de los grupos estimulados son comparados con el respectivo control y se grafican.

- **Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo**

Se siembran 750,000 células de CaCu en cajas de cultivo de 50 mm. de plástico (Corning), en 5.0 ml de RPMI al 5% de SNC, durante 24 h. para permitir su adherencia, posteriormente, son estimuladas en las siguientes condiciones: un control sin estímulo contempla RPMI al 5% de SNC, otro control contempla la cantidad de vehículo (acetato de etilo) empleado para la preparación de la IC₅₀ con RPMI al 5% de SNC y finalmente, el tratamiento que contempla la IC₅₀ de la lactona CAFA solubilizada en acetato de etilo y mezclada en RPMI al 5% de SNC. Para la evaluación por citometría de flujo, las células son despegadas de las cajas de cultivo con verseno, se centrifugan y lavan con buffer salino de fosfatos, pH 7.3. El botón celular es fijado y resuspendido con 1ml de metanol al 50% en PBS, pasados 20 minutos se centrifuga y se lava con PBS. El botón es resuspendido con 500 µl de RNAasa (2.5 U/ml.) y se incuba a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se adiciona 10µl de una solución de yoduro de propidio (0.2 µg/ml), se mezcla y se protege de la luz. Para finalizar se analizan las muestras en un FACS (Coulter, USA).

- ***Evaluación de la procaspasa –3.***

Se sembraron 50 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm., con un volumen de 300 µl con RPMI al 5% de SNC en cámara húmeda por 24h. Al término del tiempo, se procedió a estimular con cada una de las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular. A continuación, se realizó la detección de la procaspasa 3 por inmunocitoquímica, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% de PBS durante 20 minutos, al término de el tiempo se lavó cuidadosamente 3 veces con PBS, a continuación se permeó con Tritón X-100 0.5% durante 5 minutos a 4°C, nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, después se adicionó el anticuerpo primario (anticaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:100 en PBS) durante un periodo de 24 h. en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se

aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1.5 h., posteriormente se lavan las muestras 3 veces con PBS, después se aplica el DAPI de manera muy cuidadosa durante 1 min. Nuevamente se lavan las muestras con PBS. Finalmente se montan las muestras con medio de montaje antifolding. Una vez realizadas las preparaciones, se procede a analizar las muestras en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON).

- **Detección específica de fragmentos de DNA a través de la técnica de Túnel.**

Gavrieli *et al*, desarrollaron la técnica de marcaje in situ denominada TUNEL (Transfer Uridin Nick-End Labelling). TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una coloración café-rojiza.

Para llevar a cabo la técnica, se sembraron 50 000 células en cubreobjetos en las mismas condiciones que se realiza para la determinación de la procaspasa-3. Al término del cultivo, las células son fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS el cual se prepara al momento. Brevemente las células son lavadas con PBS y permeadas con Tritón X-100 al 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4° C. Se lavan con PBS, y se adiciona inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30 µl) en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurren las preparaciones en un papel absorbente sin dejarlas secar. Se incuban por 1 h. con enzima Tdt (33 µl de enzima más 77 µl de buffer de reacción), en cámara húmeda. Al término del tiempo se detiene la reacción con buffer de paro (1 ml. de buffer de paro en 34 ml. de agua Milli Q), por 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Se lavan con PBS y se incuban con rodamina, durante 30 min. en oscuridad a temperatura ambiente (68 µl de solución bloqueo más 62 µl de rodamina). Se realizan los

respectivos lavados con PBS en cámara húmeda. Se incuba con DAPI por 1 min. A continuación, se lavan las muestras con PBS en cámara húmeda. Las preparaciones son montadas con medio de montaje "antifolding", se etiquetan y guardan en obscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

- **Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.**

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de una muestra de tejido del cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico uterino (CaCu). Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo RPMI al 20% de suero fetal bovino (SFB) a 4°C y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos, ambas partes son cortadas por separado en trozos pequeños (1-2 mm.), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05%. Esto consiste en colocar los trozos de tejido en un matraz de fondo plano de 50 ml., con 10 ml. de tripsina a 37°C en un baño con agitación durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, se colecta la solución de tripsina en un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga un ml. de SFB y es centrifugado a 2000 rpm en una centrifuga clínica. El paquete celular obtenido de la disgregación es resuspendido en RPMI al 10% de SFB, de tal manera que las células del paquete sean sembradas en cajas de cultivo de 5 ml. (CORNING), con una densidad celular de 5×10^5 células por caja. Por otro lado, se añade nuevamente a la muestra de tejido remanente 10 ml de tripsina y se continua durante 15 minutos mas con agitación suave a 37°C. La mezcla se vierte a través de una malla de nylon que permite solo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. Las células obtenidas del disgregado son cultivadas en cajas de cultivo de 5 ml. y se mantienen en una incubadora (Scientific) al 5% de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 h. máximo, después de este tiempo de incubación, se realiza el cambio de medio

(totalmente), de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10% y se continua así hasta obtener un buen número de células proliferando. En este momento se obtienen poblaciones (fibroblásticas o epiteliales), las cuales son utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitan mantener poblaciones de un solo tipo celular. La resiembra consiste en separar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentra a un 70% de saturación, con ayuda de una proteasa (tripsina al 0.05 % 1-3 minutos). Las células obtenidas son lavadas por centrifugación (2000 rpm) dos veces y posteriormente son contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo.

- **Determinación de la IC₅₀ matemática.**

Para la determinación de la IC₅₀ matemática los datos obtenidos de concentración en $\mu\text{g/ml}$ son correlacionados con los respectivo valores de % celular. Los datos son linearizados y se realiza una intrapolación para calcular la disminución del 50% de la población celular (IC₅₀). Todo esto se realiza con la ayuda de un paquete de Excel (2003).

- **Cuantificación de la procaspasa-3 a través del programa Adobe Photoshop CS2.**

El porcentaje de fluorescencia es obtenido a través del Programa Adobe Photoshop CS2, para ello, todas las imágenes correspondientes a procaspasa-3, se trasladan a una hoja de Photoshop donde se cuantifica la luminiscencia de un mínimo de 100 células por condición en la ventana de Histograma, posteriormente, se analizan los valores y se obtiene la estadística en un paquete de Excel.

- **Análisis estadístico.**

Todos los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza ANDEVA, con una significancia del 0.05, seguida de una prueba de Tukey, realizado en el paquete SPSS 10.0 for Windows.

RESULTADOS

Con el propósito de evaluar la actividad antitumoral de la lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA) en las líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo, cultivos independientes de estas células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de la lactona, con el fin de encontrar la concentración a la cual se disminuía en un 50% la densidad celular (IC₅₀) (Fig. 13).

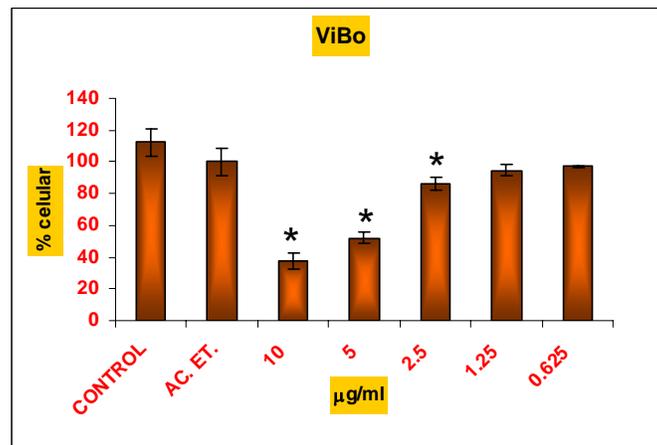
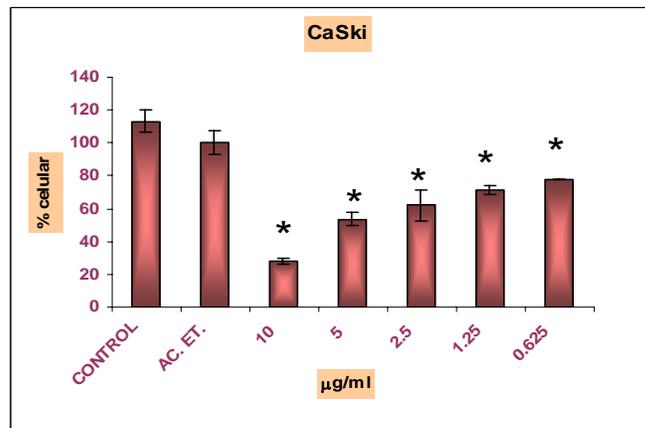
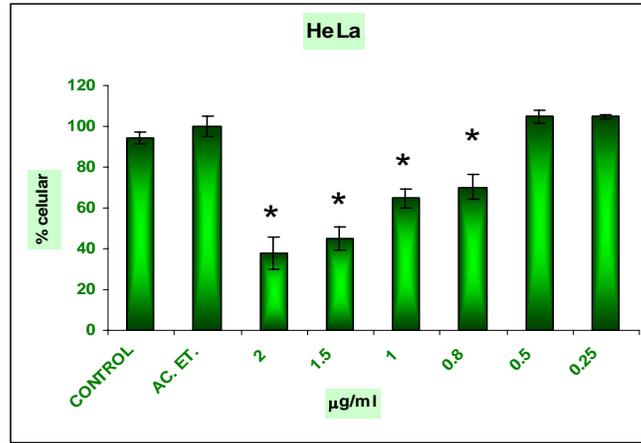


Fig. 13. Determinación de la concentración a la cual se induce un decremento del 50% en la densidad celular (IC_{50}), en las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino, HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos (7500 células /pozo) por 24 h. y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de la lactona CAFA por 24 h. mas. Al término del tiempo, el número celular fue evaluado por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta. Las gráficas representan uno de tres experimentos realizados por separado con 6 repeticiones por condición. AC. ET. Acetato de etilo.* $p < 0.05$ vs AC. ET. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados en la Fig. 13 establecen que el efecto de la lactona CAFA para las tres líneas tumorales es dosis dependiente, ya que, conforme se incrementa la concentración, la densidad celular disminuye. Con la intención de calcular matemáticamente la IC_{50} en las diferentes gráficas, los datos fueron linearizados y con la ayuda de la ecuación de la recta, el valor del 50% en la densidad celular fue calculado (ver material y métodos). Al respecto, se obtuvo que, en el caso de las células HeLa, el valor de la IC_{50} fue de 1.55 $\mu\text{g/ml}$., mientras que para las células CaSki y ViBo los valores fueron de 5.77 y 7.34 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Al mismo tiempo y con el fin de determinar si la lactona CAFA afectaba la morfología celular, los cultivos de las tres líneas tumorales fueron fotografiados en un microscopio de alta definición (NIKON) (Fig.14).

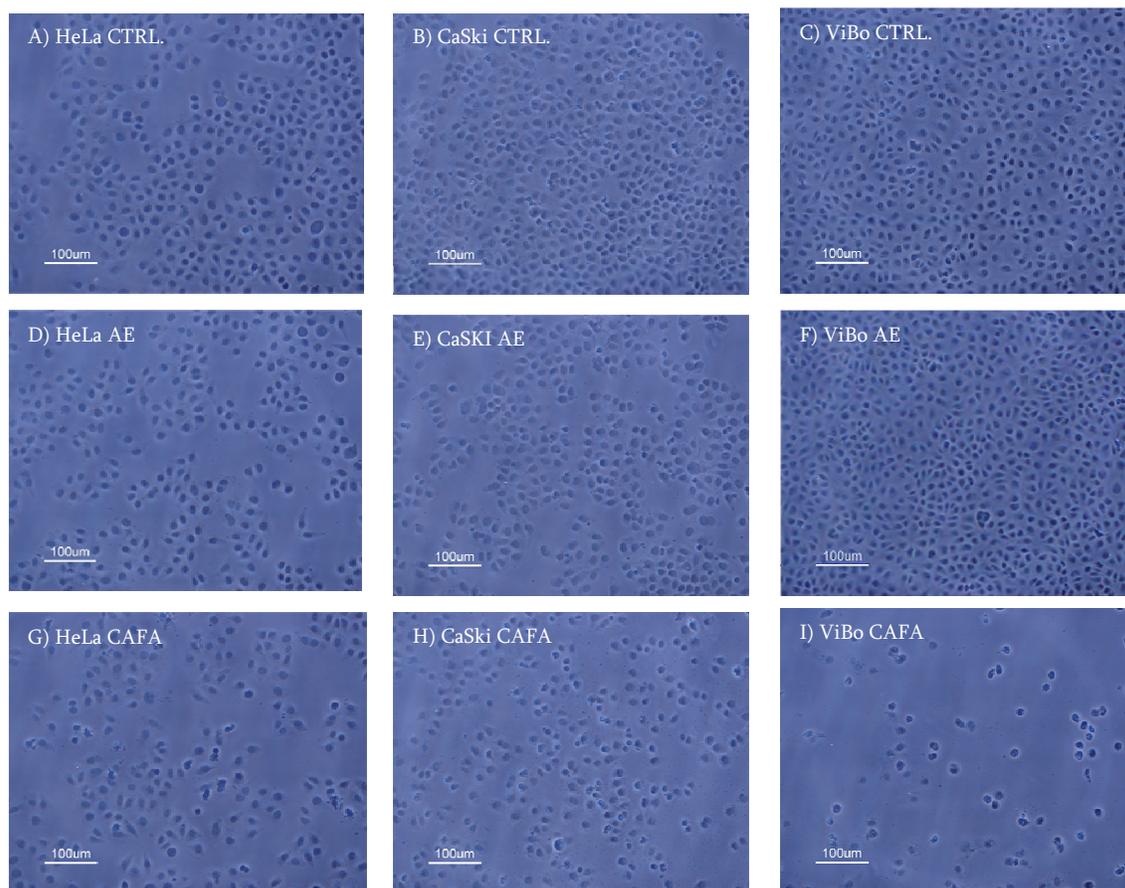


Fig. 14. Efecto de la lactona CAFA en la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo. A, B y C: Cultivo de células HeLa, CaSki y ViBo en medio RPMI al 5% de SNC; D, E y F: Cultivo de células HeLa, CaSki y ViBo cultivadas al 1% de acetato de etilo con RPMI al 5% de SNC; G, H e I: Cultivo de células HeLa, CaSki y ViBo cultivadas en RPMI al 5% de SNC estimuladas con 1.55, 5.77 y 7.34 $\mu\text{g/ml}$ de CAFA respectivamente. Todas las fotografías están tomadas en contraste de fases. CTRL: control. AE: acetato de etilo.

Como se observa en la Fig. 14, la morfología celular de los cultivos tratados con la lactona CAFA en las tres líneas tumorales se ven afectados. En los cultivos control así como en los estimulados únicamente con acetato de etilo, las células se muestran con un contorno regular, con citoplasma extendido, adheridas al plato de cultivo y en su mayoría tocándose una con otra. Con respecto a los cultivos tratados con la lactona CAFA, las células se muestran tanto desprendidas como adheridas al plato de cultivo. Las células que se encuentran adheridas presentan un menor tamaño, se observan células con el citoplasma retraído, un núcleo pequeño que indica una compactación de la cromatina y poco refringentes. No obstante, la alteración de la morfología celular observada en los cultivos de las tres líneas tumorales, aparenta una menor afección en la línea tumoral CaSki que las otras dos líneas celulares.

De esta manera, el hecho de observar un decremento del 50% en el número celular en los cultivos estimulados con la lactona CAFA, generó las siguientes interrogantes: ¿A que se debe esta disminución celular? ¿La lactona CAFA estará afectando el ciclo celular de estas líneas? ¿Se estará originando algún proceso de muerte? Para dar respuesta a cada una de estas interrogantes, primeramente se evaluó: el efecto de la lactona CAFA sobre el ciclo celular de las 3 líneas tumorales. Para ello, cultivos asincrónicos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con las concentraciones de las IC_{50} obtenidas para cada una de las líneas tumorales y la distribución de la cantidad de DNA presente en cada una de las fases del ciclo celular fue cuantificada por citometría de flujo (ver material y métodos) (Fig. 15).

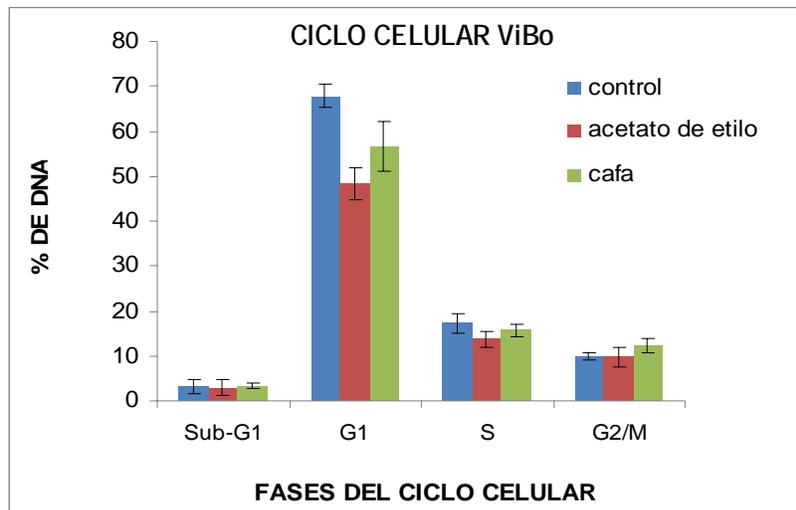
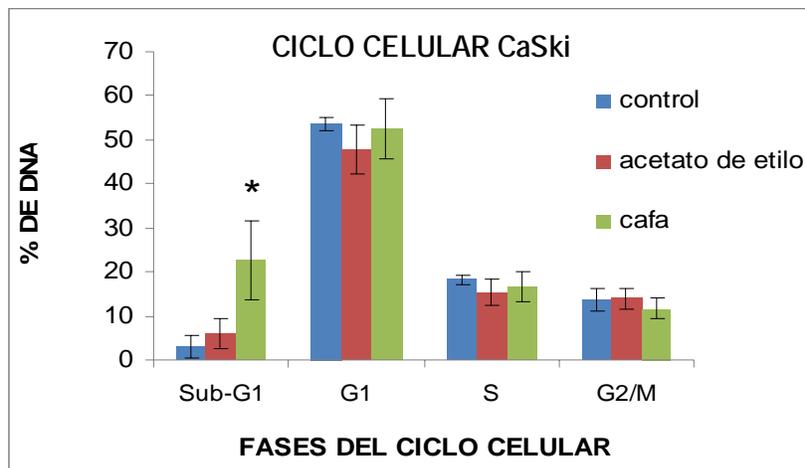
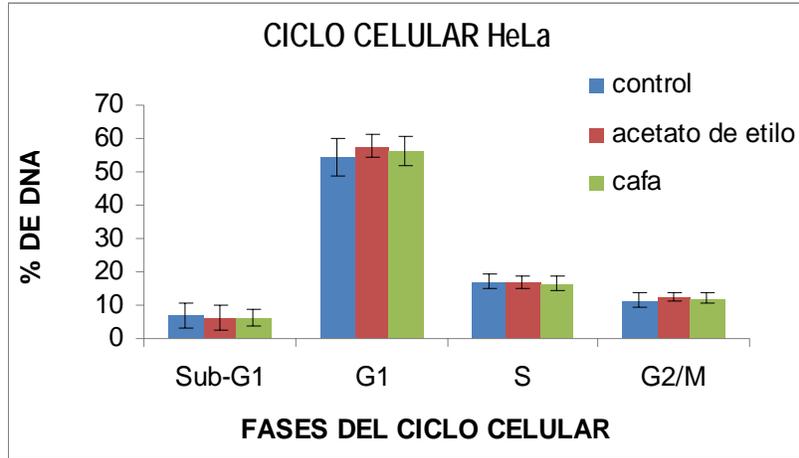


Figura 15. Distribución de la cantidad de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratados con 1.55, 5.77 y 7.34 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Las gráficas representan el promedio de 6 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ vs AC. ET. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se aprecia en la Fig. 15, no se observa diferencia alguna en los valores de distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las tres líneas tumorales tratadas con la lactona, comparada con los controles y las estimuladas únicamente con el acetato de etilo, sugiriendo que su efecto no es dependiente del ciclo celular. Sin embargo, en las células CaSki tratadas con la lactona, se observa un incremento en la región sub-G₁, sugiriendo que la lactona CAFA induce a las células CaSki a algún tipo de muerte, ya que la región sub-G₁ se caracteriza por presentar una cantidad de ADN menor a la de las células que están en la fase G₁.

Con la finalidad de aclarar, sí el decremento en el número celular inducido por la lactona CAFA en los cultivos de células tumorales, es debido a una muerte por apoptosis, cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con la lactona CAFA y la expresión de la procaspasa-3 fue determinada por inmunocitoquímica y la fluorescencia fue cuantificada mediante el programa Adobe Photoshop CS2 (Ver material y métodos) (Fig. 16 y 17).

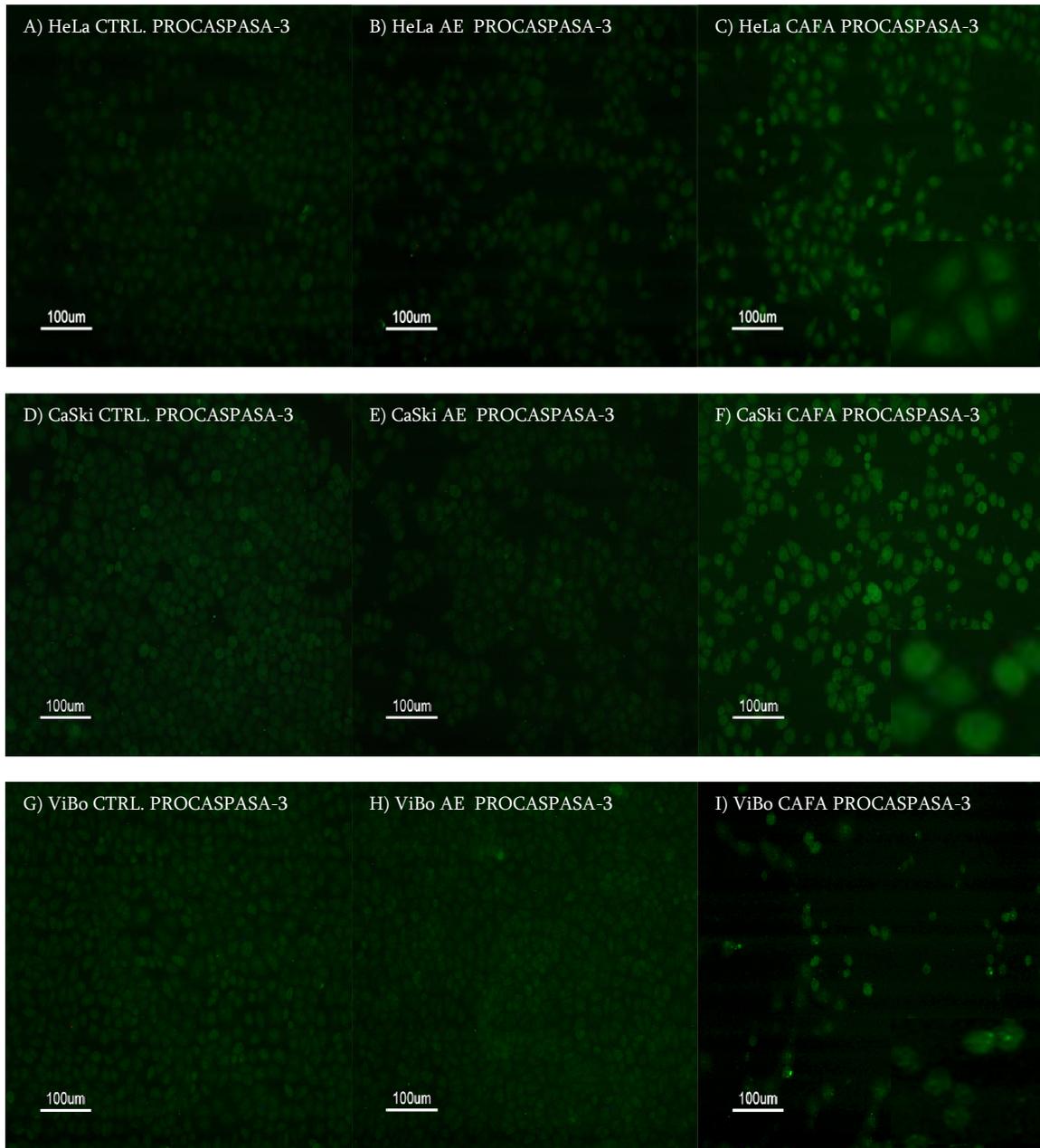


Figura 16. Expresión de la procaspasa-3 en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con 1.55, 5.77 y 7.34 µg/ml de CAFA. A, B, y C: fotografías de células HeLa; D, E y F: fotografías de células CaSki y G, H e I: fotografías de células ViBo. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON) y las imágenes fueron capturadas con una cámara NIKON acoplada a la computadora. Todas las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. CTRL, control; AE, acetato de etilo.

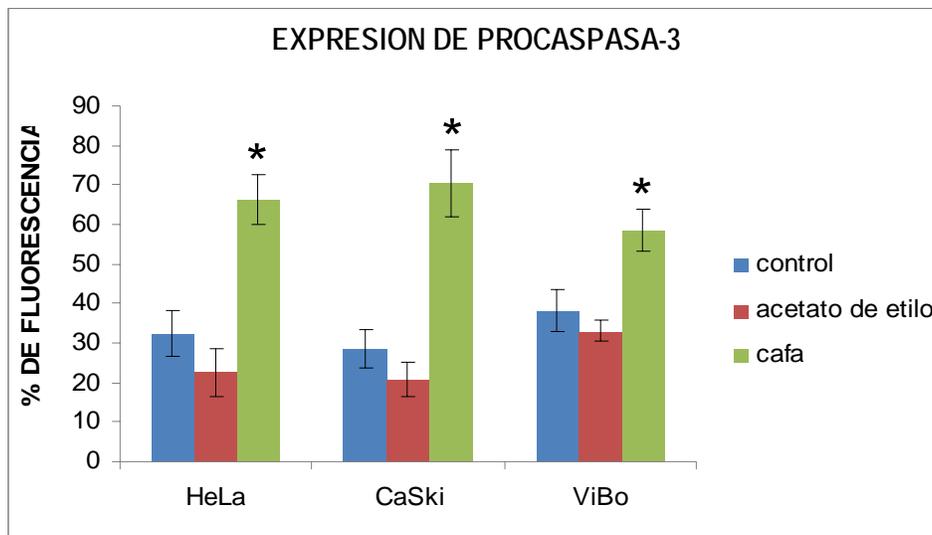


Figura 17. Cuantificación de la expresión de la procaspasa-3 en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con 1.55, 5.77 y 7.34 $\mu\text{g/ml}$ de CAFA. La expresión de la procaspasa-3 fue determinada por inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo anti-procaspasa 3 (Rabbit Caspase 3 Ab4 Neomarkers, Fremont CA) y un anticuerpo acoplado a FITC (FITC- Goat Anti-Rabbit IgG, ZYMED, San Francisco, California, USA). La fluorescencia fue cuantificada a través del programa Adobe Photoshop CS2. La gráfica es representativa de por lo menos tres ensayos independientes. * $p < 0.05$ vs AC. ET. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se muestra en la Fig. 16, la lactona CAFA induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a expresar a la procaspasa 3, con un incremento en promedio de un 40 a un 50%, para las tres líneas tumorales (Fig.17), implicando que ésta es requerida para ser activada y convertirse en caspasa 3 activa, la cual podría inducir una fragmentación del ADN.

En el proceso de una muerte apoptótica, las células sufren cambios morfológicos característicos de esta muerte, estos cambios pueden observarse dependiendo del grado de apoptosis que presenta la célula. Un cambio morfológico característico en la célula apoptótica es la compactación o condensación de la cromatina, reflejada en núcleos pequeños, compactos que al ser marcados con un fluoróforo como el DAPI, se observan con una mayor luminosidad. Por ello, cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con la lactona CAFA y sus núcleos fueron marcados con el fluoróforo DAPI y observados en un microscopio de epifluorescencia (Fig. 18).

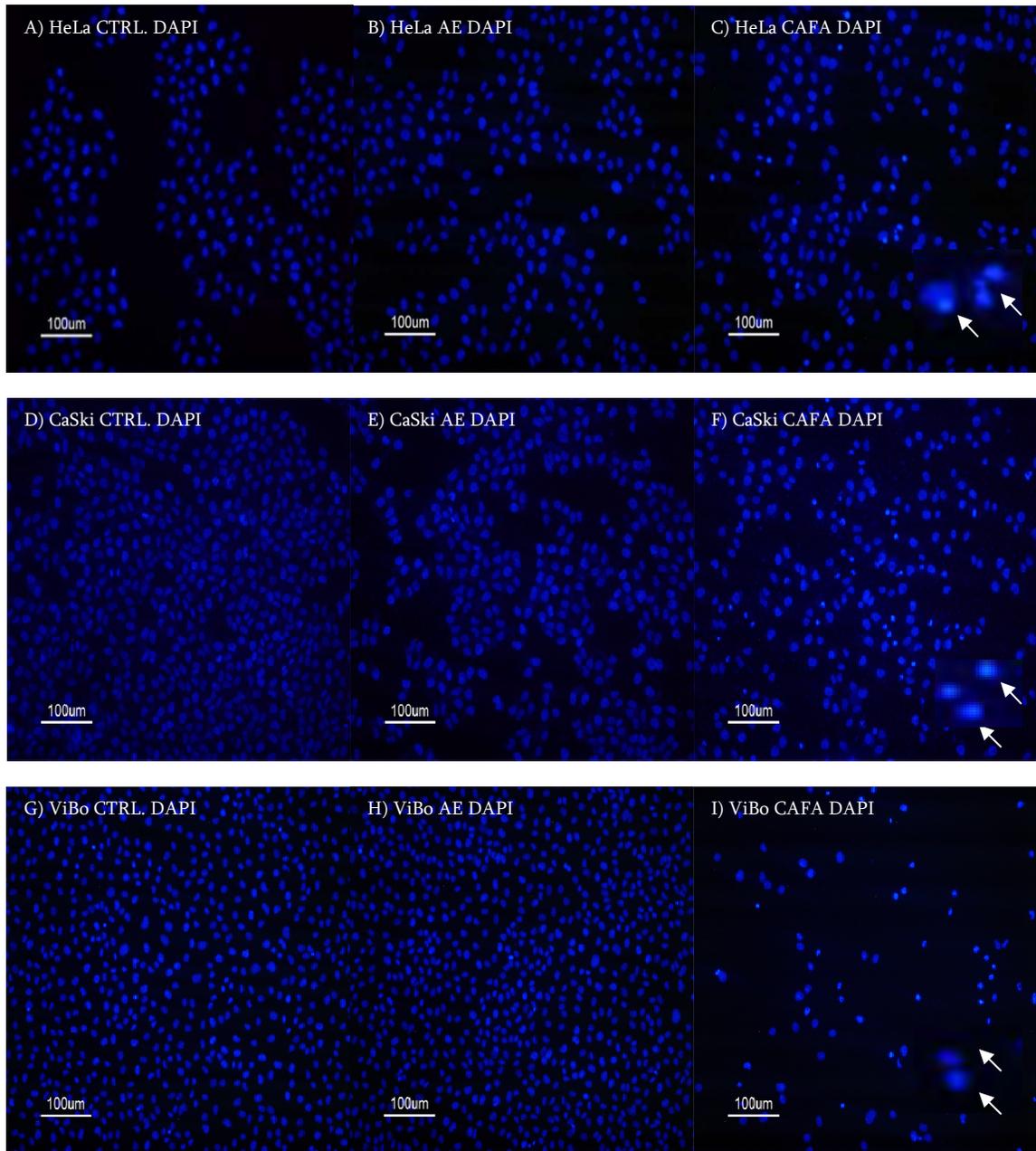


Figura 18. Observación de núcleos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, estimuladas con 1.55, 5.77 y 7.34 $\mu\text{g/ml}$ de CAFA respectivamente. A, B, y C: fotografías de células HeLa; D, E y F: fotografías de células CaSki y G, H e I: fotografías de células ViBo. Los núcleos fueron marcados con el fluorocromo DAPI y observados en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON). Las flechas indican los núcleos compactados que presentan la cromatina condensada. Las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. CTRL, control; AE, acetato de etilo.

Las imágenes de la Fig. 18 revelan que la lactona CAFA induce una condensación o compactación de la cromatina en las tres líneas tumorales, generando núcleos pequeños, compactos y más luminosos, característicos de células apoptóticas.

El hecho de que la lactona CAFA, induzca un incremento de procaspasa 3 en las células tumorales, no garantiza que dichas células presenten una fragmentación de su ADN como consecuencia de la activación de esta caspasa, por lo que es necesario determinar si el ADN de estas células es fragmentado como consecuencia de la inducción con la lactona. Al respecto, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con CAFA y el ADN fragmentado fue evaluado mediante la técnica de TUNEL (ver material y métodos) (Fig. 19).

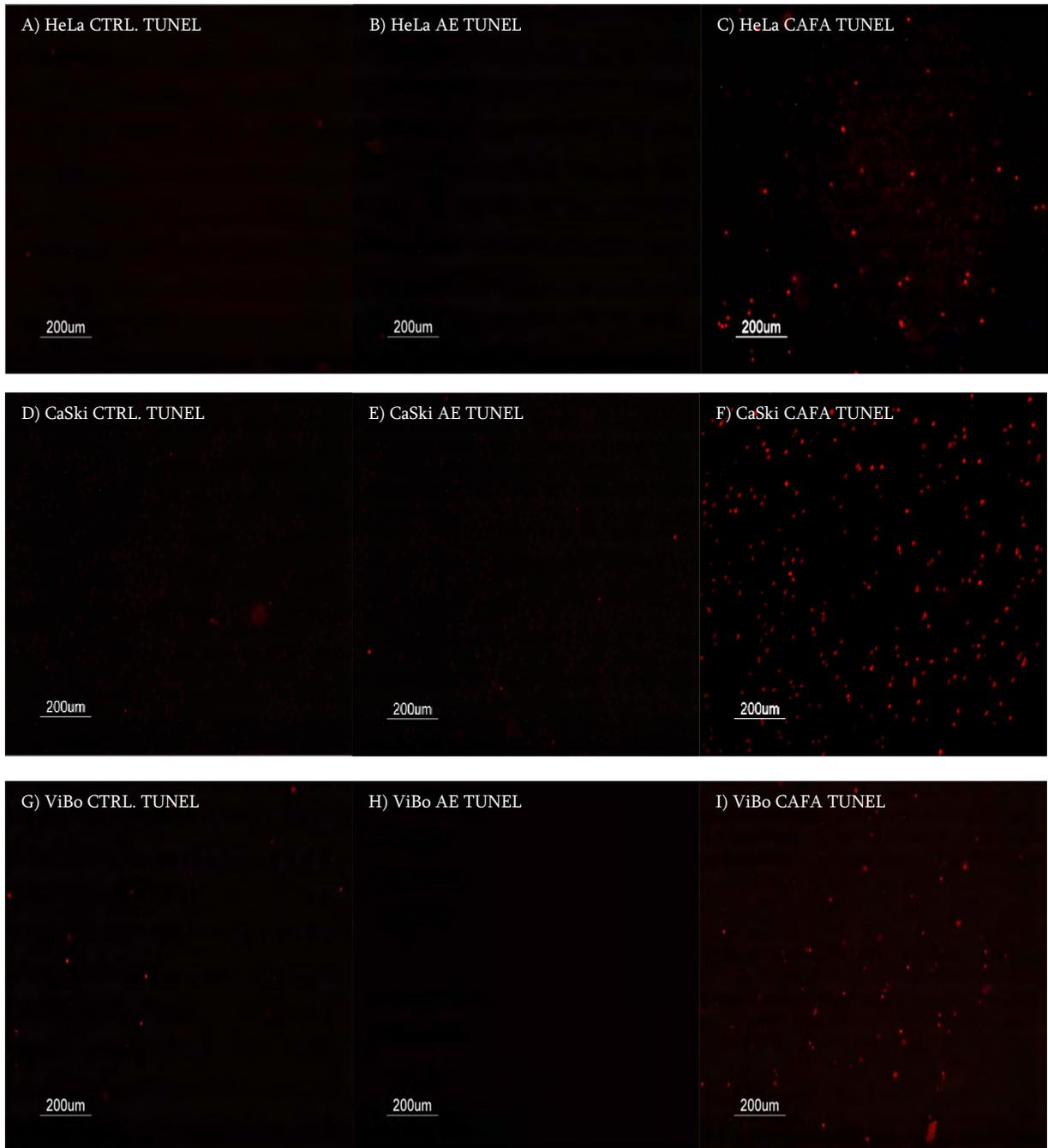


Figura 19. Detección de fragmentos de ADN en cultivos de células HeLa tratadas con 1.55 $\mu\text{g/ml}$ de CAFA. A, B, y C: fotografías de células HeLa; D, E y F: fotografías de células CaSki y G, H e I: fotografías de células ViBo. La detección de ADN fragmentado en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fue evaluado mediante la técnica de TUNEL observada por epifluorescencia a través del fluorocromo rodamina. Las fotografías representan un ensayo de un mínimo de tres eventos independientes. CTRL, control; AE, acetato de etilo.

Las imágenes revelan que existe una fuerte positividad por parte de las 3 líneas a ambas pruebas, ya que se observó tanto la expresión de la procaspasa-3 (Fig. 18-21), como una fragmentación de ADN, (Fig. 22-24), lo cual nos indica que CAFA tiene un efecto apoptótico sobre estas líneas, además de que, nos hace pensar que tal vez la expresión de la caspasa-3 sea la vía por la cual se activa la fragmentación de ADN.

Dado que la experimentación fue realizada sobre tres líneas tumorales, generaba la necesidad de realizarse sobre células normales, para determinar que tan diferente era la respuesta de las células ante el compuesto. Con este propósito, células fibroblásticas obtenidas de biopsias de cérvix, fueron estimuladas con cada una de las IC_{50} dadas para las tres líneas tumorales, posteriormente, la densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta (Fig. 25).

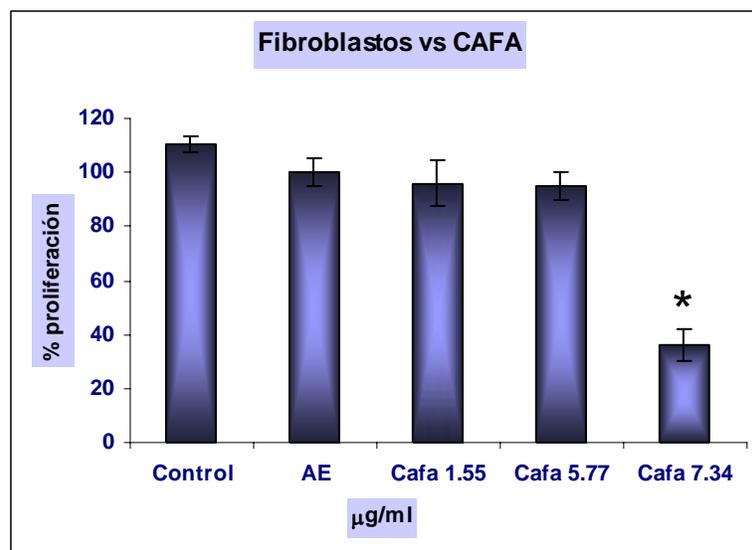


Fig. 25. Efecto de la lactona CAFA sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano. 7500 células fibroblásticas fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos en RPMI al 10% de SFB y fueron estimuladas con la lactona CAFA por 24 h. más. La densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. Control, AE, Acetato de etilo y 1.55, 5.77y 7.34µg/ml concentraciones de CAFA utilizadas.* $p < 0.05$ vs AC. ET. (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

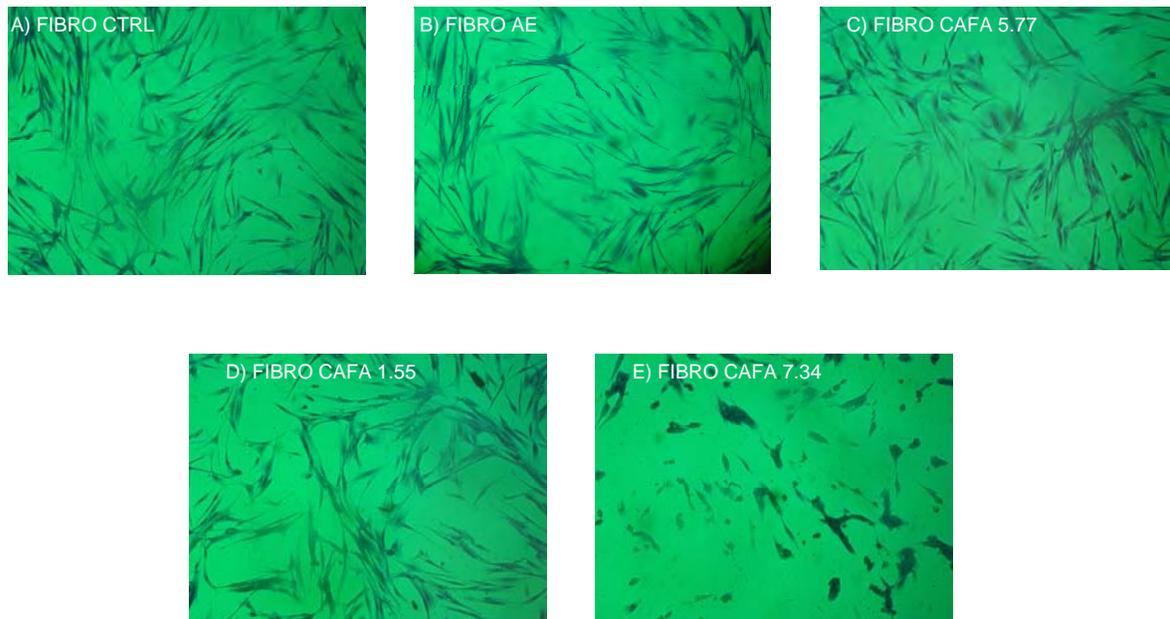


Fig. 26. Imágenes que muestran el efecto de la lactona CAFA sobre la morfología de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano. A) Control, B) Acetato de etilo y C) 1.55, 5.77 y 7.34 $\mu\text{g/ml}$ de CAFA. Nótese los cambios en la forma de las células solo con la dosis mayor de CAFA.

Los resultados indican que las células fibroblásticas solo son afectadas con la dosis de 7.34 $\mu\text{g/ml}$, pues se observa un decremento de la población en un 60%, no así para las dosis de 1.55 y 5.77 $\mu\text{g/ml}$, puesto que no presentaron disminución de la población, lo cual nos establece que células tumorales son mas sensibles a la lactona que las células normales. De la misma manera, la morfología de las células fibroblásticas se ve afectada solo con la dosis mayor empleada (Fig. 26), ya que se pierde completamente la conformación normal, esto es, células con núcleo pequeño, alargadas y planas.

DISCUSION DE RESULTADOS

La búsqueda de compuestos naturales con actividad antineoplásica es una de las prioridades actuales en la lucha contra el cáncer en todos los países del mundo. El creciente empleo de productos naturales en la prevención y cura de diferentes enfermedades ha llevado a la evaluación antitumoral de nuevos extractos de plantas, especialmente de aquellas pertenecientes a la flora endémica de cada país (Siyuan Zhang *et al*, 2005).

Las lactonas sesquiterpénicas (LSs) se ubican como un grupo importante de productos naturales obtenidos de muchas especies de plantas medicinales, especialmente provenientes de la familia Asteraceae (Compositae). En investigaciones recientes sobre estudios de cáncer *in vitro* y modelos animales *in vivo* se ha demostrado la capacidad que presentan diversas lactonas para ejecutar su respuesta anticancerígena a través de la inhibición de respuestas inflamatorias, prevención de la metástasis e inducción de la apoptosis (Christopher *et al*, 2005).

Los resultados obtenidos para la lactona 7 α -hidroxi-3-desoxizaluzanina C (CAFA), establecen que ésta posee un efecto antitumoral dependiente de la concentración sobre líneas de cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, el requerir una concentración mayor o menor de lactona para ejercer el mismo efecto antitumoral en cada una de las líneas tumorales, sugiere que existe una diferencia en la sensibilidad de cada línea tumoral en respuesta a la lactona. Tratando de explicar esta diferencia en la sensibilidad entre las tres líneas tumorales, es prudente tomar en cuenta que estas células tumorales provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino, se encuentran infectadas con el virus del papiloma humano tipo 18 (HeLa), con el tipo 16 (CaSki) y no infectadas ó VPH negativas (ViBo), permitiendo generar una relación entre el subtipo de VPH y la sensibilidad a la lactona. Es decir, que es probable que las células provenientes de CaCu infectadas con el VPH sean más sensibles al efecto antitumoral de la lactona CAFA, que aquellas células tumorales provenientes de CaCu que no están

infectadas con el VPH, ya que las células tumorales infectadas con el VPH (HeLa y CaSki) requirieron de menor cantidad de lactona que las células tumorales no infectadas (ViBo), para generar el mismo efecto. Desde luego, es conveniente en el futuro, realizar este mismo trabajo con un número mayor de líneas tumorales infectadas con los diferentes subtipos de VPH y negativas a éste, para confirmar lo anteriormente escrito.

Respecto a la evaluación del ciclo celular en cada línea tumoral, se han encontrado reportes acerca de los efectos causados por LSs en diferentes tipos de células cancerosas. Por ejemplo, la Parthenolida, extraída de la planta *Tanacetum parthenium*, ha demostrado tener efecto antitumoral sobre una línea de cáncer de hígado SH-J1, así como de otras líneas tumorales de cáncer de colon y mama (Wen et al, 2002). De la misma manera, Tomentosina e Inuviscolida se le ha asociado con inducción de apoptosis y arresto de la fase G₂/M en células de melanoma (Rozenblat S. et al, 2007) y finalmente Cinaropicrina, ha inducido detención del ciclo celular en la fase G₁/S en las líneas celulares U937 y Jurkat (Cho et al, 2004). Para el caso de la lactona CAFA se determinó que el efecto antitumoral observado no se encuentra asociado con alguna fase del ciclo celular, implicando que su acción es independiente del ciclo celular.

No obstante, a pesar de que la acción antiproliferativa fue independiente del ciclo celular de la lactona CAFA, ésta fue capaz de inducir en las tres líneas tumorales una muerte por apoptosis, ya que, se observó tanto una condensación de la cromatina (condensación de núcleos), un incremento homogéneo en la expresión de la procaspasa 3, así como una fragmentación del DNA, sugiriendo así, que la muerte celular inducida es por vía apoptótica. Este tipo de muerte presenta la ventaja de no estimular la respuesta inmunológica, es decir, no desencadena una respuesta inflamatoria, generando una muerte celular silenciosa.

Cabe destacar que en la mayoría de las lactonas o compuestos que describen actividad antitumoral, su efecto citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e inductor de apoptosis solo ha sido evaluado en líneas tumorales, careciendo en la mayoría de los casos de controles normales. Algunos comparan el efecto en líneas celulares normales, las cuales presentan una característica común con las células tumorales, ambas proliferan sin control, por lo que los resultados no son muy claros o contundentes. Otro control utilizado es el uso de células provenientes de ratón, sin embargo, éstas pueden responder de manera diferente a como lo haría una célula humana. Por ello, se recomienda el uso de células humanas, de preferencia del mismo origen o estirpe, para comparar los efectos observados.

En el caso de la lactona CAFA, el efecto antitumoral fue evaluado en células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano, demostrando que solo la concentración mayor de lactona (7.34 $\mu\text{g/ml}$) correspondiente a las células ViBo, afectó el potencial proliferativo de las células fibroblásticas. Este resultado es de gran importancia, ya que sugiere que la acción antiproliferativa de la lactona CAFA es selectiva a las concentraciones de 1.55 y 5.77 $\mu\text{g/ml}$, es decir, el efecto de la lactona afecta a las células tumorales sin afectar a las células fibroblásticas no tumorales. No obstante que la concentración de lactona CAFA para las células tumorales ViBo afectó significativamente el potencial de células fibroblásticas no tumorales, sugiere que la lactona no es selectiva a esta concentración, afectando tanto a células tumorales como a células no tumorales. Recordando que las células tumorales ViBo no están infectadas con el VPH, sugiere que las células tumorales de cáncer cérvico-uterino no infectadas con el VPH son más resistentes al efecto de la lactona que las células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano. Afortunadamente, los tumores de cáncer cérvico-uterino que no están infectados con el VPH representan únicamente menos del 1% de incidencia y por lo tanto, esta lactona no sería la adecuada para tratar este tipo de tumor. Sin embargo, al observar el efecto con las dosis (1.55 y 5.77 $\mu\text{g/ml}$) correspondientes a las líneas infectadas con el virus se determinó que no se afectaba el potencial proliferativo de las células fibroblásticas,

demostrando que la lactona CAFA podría ser muy útil en los casos que presenten a los virus 16 y 18, además, se sabe que, al menos el 70% de todos los casos que presentan cáncer de cérvix se asocian con la presencia del virus, específicamente, con los subtipos 16 y 18.

A pesar de ello, es conveniente repetir este trabajo en líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino, tanto infectadas con los diferentes tipos de VPH así como no infectadas, con el propósito de confirmar y de ser el caso de generalizar la acción antiproliferativa de la lactona en las células tumorales de CaCu infectadas con el VPH tipo 16 y 18 así como el confirmar la mayor resistencia de las células tumorales de CaCu no infectadas con el VPH. Por otro lado, se sugiere evaluar el efecto antitumoral de la lactona CAFA en células tumorales de diferentes tipos (riñón, pulmón, estómago...etc.) con la intención de determinar si su efecto antitumoral es independiente del tipo del tumor o es específico de tumores de CaCu.

Por último, es importante determinar el o los mecanismos moleculares que están implicados en la acción antiproliferativa o antitumoral, que dejen visualizar los genes o proteínas que regulan dicha acción y que podrían ser objeto de estudio que permitan generar modelos que expliquen la intrincada red de eventos moleculares que hacen que una célula normal se transforme en una célula tumoral.

CONCLUSIONES

- La lactona CAFA (7a -hidroxi-3-desoxizaluzanina C) tiene un efecto antitumoral en las tres líneas celulares.
- Las IC_{50s} para las líneas tumorales son:
 - HeLa = 1.55 µg/ml
 - CaSki = 5.77 µg/ml
 - ViBo = 7.34 µg/ml.
- 7a -hidroxi-3-desoxizaluzanina C no altera el ciclo celular de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
- 7a -hidroxi-3-desoxizaluzanina C induce una muerte por apoptosis a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, a través de la expresión de la procaspasa-3 y la fragmentación del ADN.
- 7a -hidroxi-3-desoxizaluzanina C no disminuye la densidad celular de fibroblastos normales de cervix con las dosis de 1.55 y 5.77 µg/ml.

BIBLIOGRAFIA

- Adrain C., Creagh E. M., and Martin S. J. 2002. Caspase Cascades in Apoptosis. Caspases-their role in cell death and cell survival. Ed. Marek Los and Henning Walczak. Molecular Biology Intelligence Unit 24. New York: New York. 41-51pp.
- Alberts B., D. Bray J. Lewis, M. Raff K., Raberts & J. D . Watson. 2004. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing inc. New York. 1294 pp.
- Beekman H. and T. Schmidt .1997. Structure-Cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpen lactones. J.Nat. 60(2):252-257.
- Bohlmann F. and Le-Van Ngo. 1997. Naturally-occurring terpene derivatives. Part 107. New guaianolides from *Podochaenium eminens*. Phytochemistry. 16(8):1304-6.
- Caballero, B. A y Morán. A. J. 2002. Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. Science. 2(4):235-244.
- Caer F. R. 1994. Apoptosis: It's Significance in Cancer and Cancer Therapy. Journal of Animal Science. 73:2013-2026.
- Carnero A. 2002. Targeting the cell cycle for cancer therapy. British Journal of Cancer. 87:129–133.
- Changqing Wu, Feng Chen, James W. Rushing, Xi Wang, Hyun-Jin Kim, George Huang, Vivian Haley-Zitlin and Guoqing He. 2006. Antiproliferative Activities of Parthenolide and Golden Feverfew Extract Against Three Human Cancer Cell Lines. Journal of Medicinal Food. 9(1):55-61.
- Cho J.Y., Kim A.R., Jung J.H., Chun T., Rhee M.H. and Yoo E.S. 2004. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. European Journal of Pharmacology. 492:85-94.
- Christopher J. S., Sanjana M., Miral R. S., Suresh K., Nicholas H. S., Yaritzabel R., Carol S., Robert A. C., Daryl J. M., Sunil B. and Harikrishna N. 2005. The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with

docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 4:1004-1012.

- Cooper Geoffrey M. 2000. *The Cell a Molecular Approach.* 2a ed., Sinauer.
- Csipo I., Montel A. H., Hobbs J. A., Morse P. A., and Brahmi Z. 2004. Effect of Fas+ and Fas- target cells on the ability of NK cells to repeatedly fragment DNA and trigger lysis via the Fas lytic pathway. *Eur. J. Pharmacol* 3:105-114.
- Evan G.I. and Vousden K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 411:342.
- Fischer Nikolaus H., Weidenhamer Jeffrey D. and Bradow Judith M. 1989. Inhibition and promotion of germination by several sesquiterpenes. *Journal of Chemical Ecology.* 15(6):1785-93.
- Fronczek Frank R., Vargas David, Fischer Nikolaus H. and Hostettmann Kurt. 1984. The molecular structure of 7a -hydroxy-3-desoxyzaluzanin C, a molluskicidal sesquiterpene lactone. *Journal of Natural Products.* 47(6): 1036-9.
- Gupta S. 2001. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med.*1(3):317-324.
- Hague A., and Paraskeva, C. 2004. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Nature Cell Death and Differentiation.* 1-7 pp.
- Hazzard R. William. 2005. *Principles of geriatric medicine and gerontology.* 4ta ed. Mc.Graw Hill.125–187 pp.
- Herrero R, Castellsague X. y Pawlita M. 2003. Human papillomavirus and oral cancer: The international agency for research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 95:1772–1783.
- Heywood V,H; Harborne,J.B;Turner,B.L. 1997. *The biology and chemistry of the compositae.* Vols. I y II. Academic Press:New York.
- Holub M and C.Budesinsky. 1986. Particularly, the biological activity of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry.* 25:2015-2026.
- INEGI. Consulta Interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 4 de febrero del 2008 www.inegi.com

- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2002 database. Tabla que muestra la incidencia, prevalencia y mortalidad del cáncer cérvico-uterino en Centroamérica. Disponible en <http://www.dep.iarc.fr/> creada el 26 de abril, 2006. Consultada el 1 de agosto del 2007.
- Johnstone R. W., Ruefli A. A. and Lowe S. W. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 108:153-164.
- Koutsky L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*.102:3-8.
- Kueng W., E. Silver & V. Eppenberg. 1989. Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical*. 186:16-19.
- Lee K. H., Huang E. S., Piantadosi C., Pagano J. S. and Geissman T. A. 1971. Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones. *Cancer Res*. 31:1649-1654.
- Lodish Harvey, Berk Arnold, Zipursky S. Lawrence, Matsudaira Paul, Baltimore David and Darnell James E. 2002. *Molecular Cell Biology*. WH Freeman and Company.
- Lowy DR, Schiller JT. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest*. 116(5):1167-73.
- Morgan, S. J. y D. C. Darling. 1993. *Cultivo de células animales*. Editorial Acriba, España. 159 pp.
- Mount S. L and Papillo J. L. 1999. A study of 10,296 pediatric and adolescent Papanicolaou smear diagnoses in northern New England. *Pediatrics*. 103:539-45.
- Muñoz. N.& X . Bosch. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica México*. 39:174-282.
- Pardo, F. J. 1998. *Anatomía patología general y especial de las neoplasias*. Editorial Científico- Médico, España. 335 pp.
- Raff Martin. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature*. 396:119-122.
- Schmitt C. A., Fridman J. S., Yang M., Baranow E., Hoffman R. M. and Lowe S. W. 2002. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell*. 1:289-91.

- Scully C. 2002. Carcinoma oral de células escamosas: de una hipótesis acerca de un virus, a la preocupación acerca de una posible transmisión sexual. *Oral Oncol. Review.* 38(3):227-34.
- Siyuan Zhang, Yen-KimWon, Con-Nam Ong and Han-Ming Shen. 2005. Anti-cancer potencial of sesquiterpene lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr. Med. Chem.* 5:239-249.
- Solé F. J., Chechile G., Algaba F., Villaviciencio H. and Cordon C. 1995. Regulación del ciclo celular. Bases moleculares de la carcinogénesis. In: *Biología molecular de los tumores urológicos.* Ediciones, Madrid. 61-66 pp.
- Studzinski G. P. 1995. *Cell growth and apoptosis.* Oxford University Press. New York . 269 pp.
- Sukh Dev. *et al.* 1982. *Handbook of Terpenoids: Monoterpenoids, Vols.1 y 11,* Sukh Dev. *et al.* (1985 1986). *Handbook of Terpenoids: Diterpenoids Vols. 1 y IV.* Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Tortolero Luna G. 2005. Epidemiology of genital human papillomavirus. *Hematol Oncol Clin North Am.* 13: 245-257.
- Vargas David., Fischer Nikolaus H. and Younathan Ezzat S. 2001. Inhibition of phosphofructokinase by molluscicidal sesquiterpene lactones. *Rev. Soc. Quim. de Mexico.* 45(4):159-162.
- Villa L. L., Ault K. A. y Giuliano A. R. 2006. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 24:5571-5583.
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. 2000. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cáncer cervicouterino worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.
- Wen J., You K.R., Lee S.Y., Song C.H. and Kim, D.G. *J. Biol.* 2002. Oxidative Stress-mediated Apoptosis. THE ANTICANCER EFFECT OF THE SESQUITERPENE LACTONE PARTHENOLIDE. *J. Biol. Chem.* 277(41):38954-38964

- Winer RL, Lee S-K, Hughes JP. 2003. Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am.J. Epidemiol.* 157: 218-226.
- Ze T., Sinbao C., Yaou Z., Minghui H., Lin S., Feng H., Chichón F. and Mengsu Peinen X. 2005. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine.* 13:181-186.

APÈNDICE

❖ Composición del RPMI-1640 (Sigma Chemical Co .U.S.A).

Nitrato de calcio tetrahidratado	0.100000
Sulfato de magnesio anhídrido	0.048840
Cloruro de sodio	6000000
Fosfato dibásico de sodio anhidro	0.800000

Aminoácidos

L- arginina	0.200000
L-aspargina	0.050000
L-ácido aspárgico	0.200000
L-cisteina 2HCL	0.065200
L-ácido glutâmico	0.020000
L-glutamina	0.300000
Glicina	0.100000
L-histidina	0.015000
L-hidroxi prolina	0.020000
L-iso leucina	0.050000
L-leucina	0.050000
L-lisina HCL	0.040000
L-metionina	0.015000
L-fenilalanina	0.015000
L-prolina	0.020000
L-serina	0.030000
L-treonina	0.020000
L-triptofano	0.005000
L-tirosina	0.028830
L-valina	0.020000

Vitaminas

D-biotina	0.000200
Cloruro de colina	0.003000
Ácido fólico	0.001000
Myo-inositol	0.035000
Niacinamida	0.001000
Ácido-p-Amino Benzoico	0.001000
Ácido – D- pantoténico	0.000250
Piridoxina HCL	0.001000
Riboflavina	0.000200
Tiamina HCL	0.001000
Vitamina B-12	0.000005

❖ Verseno

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

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

Los reactivos se disuelven en 800 ml. de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 ml. de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

❖ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

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

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

❖ Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g. de NaOH y 4.28 ml. de ácido fórmico aforados a 500ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución se filtra y posteriormente se usa.

❖ Desactivación del suero

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone,U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57°C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml. para su mejor uso y manipulación.