



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

“Efecto de la Amida Diazabicclicá (R, Z)-18-((1S-4S)-5-metil-2,5-diazabiccliclo [2.2.1] heptano-2-il)-18-oxooctadec-9-en-7-il-fenilacetato, en el potencial proliferativo y ciclo celular de líneas de cáncer cervicouterino, así como su capacidad inductora de apoptosis.”

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 :
ALMAZÁN MEDINA ALMA VERÓNICA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

ASESOR INTERNO:

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ





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.

Algo he aprendido en mi larga vida: que toda nuestra ciencia, contrastada con la realidad, es primitiva y pueril; y, sin embargo, es lo más valioso que tenemos.

Albert Einstein

A mi madre, quien es mi ejemplo a seguir, ya que pese a todas las adversidades siempre conté con su amor, confianza y sobre todo, su apoyo incondicional. Este logro también es tuyo.

A Alberto, por ser parte importante de mi crecimiento como persona, sé que tengo un padre que me cuida y apoya.

A Lucero, por ser mi mejor amiga y confidente de toda la vida.

A Ramón, por siempre estar a mi lado y darme ánimos cuando más lo necesitaba. Te amo.

A Maricarmen, César, Víctor, Roberto, Carlos y Alfonso, por hacer que mis años en la Universidad fueran los mejores de mi vida, no sólo son mis mejores amigos, sí no que forman parte de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por compartir sus conocimientos y brindarme parte de su tiempo para poder realizar ésta tesis.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por orientarme en este trabajo y siempre ser tan paciente para enseñarme y corregirme.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández, por compartir su valioso conocimiento conmigo.

Al M. en C. Hugo López Muñoz, por siempre tener el tiempo de resolver mis dudas.

A la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez y a la M. en C. Yolanda Córdova Galaviz, por sus observaciones a este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, por su compañía y gratos momentos.

Al Dr. Ignacio Regla y al Laboratorio de Síntesis Orgánica UMIEZ, por elaborar el compuesto con el que se realizó el trabajo.

La tesis fue realizada con apoyo del proyecto CONACYT 84380.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM bajo la dirección de la Dra. María Luisa Escobar Sánchez.

ÍNDICE

Resumen	1
Marco teórico	
La Célula.....	2
Ciclo celular.....	3
Muerte celular.....	8
Necrosis.....	8
Apoptosis.....	10
Cáncer.....	13
Cáncer cervicouterino.....	15
Tratamientos.....	18
Capsaicina y Análogos.....	19
Planteamiento del problema	23
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivos	26
Metodología	27
Resultados	32
Discusión	41
Conclusiones	44
Referencias	45
Apéndice	50

RESUMEN

El cáncer cervicouterino persiste como un problema de salud pública, siendo la segunda causa de muerte por cáncer tanto a nivel mundial como nacional. Actualmente se cuentan con diferentes tratamientos, sin embargo, estos no presentan selectividad en su acción y producen efectos secundarios que deterioran la calidad de vida del paciente, es por esto que surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas en las cuales se exalte la acción selectiva y se disminuyan los efectos nocivos.

Se ha demostrado que la Capsaicina, compuesto de origen natural que le confiere la pungencia al fruto del chile, tiene un acción farmacológica en funciones cardiovasculares, respiratorias y gastrointestinales, así también se ha mostrado su efecto anticancerígeno e inductor de apoptosis en diversas líneas celulares como de Melanoma o de Glioblastoma; sin embargo algunas investigaciones sugieren que la Capsaicina es un carcinogénico o promotor de tumores, citotóxico e irritante además que su extracción resulta ser poco rentable. Es por esto que se ha buscado la síntesis de nuevos compuestos, que tengan como modelo estructural a la Capsaicina y se realicen modificaciones para conservar las propiedades antiproliferativas y apoptóticas y eliminar los efectos adversos.

Respondiendo a esta necesidad, se han sintetizado compuestos como el 12-Fenilacetilrinvanil (FAR), cuya actividad anticancerígena fue probada en la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa, observándose que posee actividad antiproliferativa y también induce apoptosis. Sin embargo, el compuesto presenta una citotoxicidad considerable, es por ello que se decidió sintetizar un nuevo compuesto en base a la estructura del FAR, obteniendo como resultado la Amida Diazabicclicá. Las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con la Amida y ésta disminuyó en un 50% el número celular a concentraciones de 6.2, 5.9 y 6.7 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se observó que este efecto antiproliferativo produce alteraciones en el ciclo celular para la línea celular HeLa, expulsando a las células de las fases G1 y S del ciclo y enviándolas a la región sub G1. En las células CaSki y ViBo el ciclo celular no se ve afectado. Las evaluaciones para detectar a la apoptosis como la presencia de caspasa-3 activa y la fragmentación de ADN fueron positivas en todas las líneas celulares analizadas. En cuanto a los niveles de citotoxicidad, la Amida presentó cierto efecto sobre las líneas tumorales, demostrando que las células tratadas mueren por dos vías: apoptótica y necrótica. La citotoxicidad en cultivos de células linfocíticas resultó ser nula, confiriéndole un fuerte potencial selectivo. Sugiriendo a este compuesto como un buen candidato para ser evaluado como agente anticancerígeno.

nuevas características, como presentar crecimiento independiente del anclaje e inmortalidad, lo que les confiere ciertas ventajas sobre las células normales. Para evitar la división descontrolada de células, los organismos utilizan proteínas extracelulares de señalización denominados factores de crecimiento, que controlan la tasa de crecimiento y división celular. Así cuando la célula ha recibido el estímulo de división entra en un proceso conocido como ciclo celular (Alberts *et al.*, 2002).

Ciclo Celular

El ciclo celular consiste en un intervalo de biosíntesis y crecimiento activo donde la célula duplica su masa y contenido, seguido por un episodio relativamente breve de división nuclear que suele ir acompañado por la división del citoplasma y la formación de una nueva frontera o límite para separar los núcleos y el citoplasma en un par de células hijas (Avers, 1996).

El proceso consta de dos fases:

1) Interfase, que consta de:

- Fase G1: Donde la célula duplica de tamaño y aumenta la cantidad de organelos, enzimas y otras moléculas.
- Fase de síntesis (S): En esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas.
- Fase G2: Entre la fase S y M, la célula está muy activa metabólicamente, lo cual le permite incrementar su tamaño (aumentando el número de proteínas y organelos), de lo contrario las células se harían más pequeñas con cada división (Fig.2).

2) Fase M

Mitosis (M): En esta fase se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. La fase M, para su estudio se divide en:

- Profase: En esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromátidas hermanas) se condensan en el núcleo, mientras en el citoplasma se comienza a ensamblar el huso mitótico entre los centrosomas.
- Metafase: Comienza con el rompimiento de la membrana nuclear, de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los

cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas éstos se alinean en el ecuador de la célula.

- Anafase: Se produce la separación de las cromátidas hermanas, las cuales dan lugar a dos cromosomas hijos, los cuales migran hacia polos opuestos de la célula.
- Telofase: Aquí ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil.
- Citocinesis: Finalmente se divide la célula mediante el anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas cada una con un juego completo de cromosomas (Alberts *et al.*, 2002).

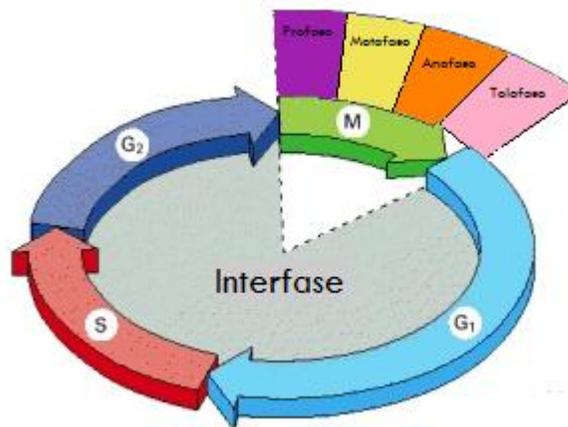


Fig. 2 Fases del Ciclo celular de una célula eucariota típica. Tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2002.

La progresión del ciclo de división celular está controlada por un grupo de genes, denominados genes del ciclo de división celular (*cdc*), que pueden dividirse en dos grandes grupos. Primeramente, los genes que codifican proteínas necesarias para la progresión del ciclo (enzimas y precursores de la síntesis de ADN, enzimas para la síntesis y ensamblajes de las tubulinas del huso, etc.) y los genes que codifican proteínas que regulan positiva o negativamente el ciclo celular.

a) Los genes que regulan positivamente el ciclo corresponden a los denominados protooncogenes. Este sistema está a cargo principalmente por dos grupos de proteínas que son el producto de protooncogenes y trabajan en asociación: las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Las Cdk actúan fosforilando serinas y treoninas de proteínas diana para desencadenar procesos celulares. A ellas se unen las ciclinas para regular el proceso con intervención de otros factores activadores (Paniagua, 2003).

Las ciclinas constituyen un grupo heterogéneo cuyos pesos moleculares varían de 36 a 87 kDa. En los mamíferos se consideran dos grandes grupos de ciclinas, en relación con el momento del ciclo en que se detectan: ciclinas G1 y ciclinas mitóticas. Las ciclinas G1 comprenden las ciclinas D (varios subtipos de D) y E; las mitóticas comprenden la A y B (varios subtipos de B).

La unión ciclina-Cdk provoca cambios de conformación determinantes para la activación de la cinasa. El bloqueo producido por el lazo T sobre la cavidad catalítica es eliminado y la treonina del lazo queda accesible para su fosforilación por la cinasa activadora de Cdk (CAK).

En este sistema de regulación del ciclo hay dos puntos especialmente importantes:

1.-El tránsito de G1 a S, que fue designado con diferentes denominaciones, como punto de inicio o punto de restricción. Se propuso la existencia de una proteína reguladora de este proceso, a la que se denominó proteína de disparo. Hoy se sabe que en mamíferos, este proceso es regulado por la unión de la Cdk 2 a la ciclina E.

2.-El paso de G2 a mitosis, que se consideró controlado por un factor promotor de mitosis (MPF). En los mamíferos se regula por el ensamblaje de la Cdk 1 con las ciclinas A o B (Fig.3).

b) Los genes que regulan negativamente el ciclo reciben en conjunto el nombre de genes de verificación (chk) o, en mamíferos, genes supresores tumorales; los cuales tienen como misión asegurar la dependencia entre dos procesos secuenciales del ciclo celular, es decir, que no se continúe el proceso más allá de un punto si en este punto se ha producido una alteración del proceso normal. Su principal función es asegurar la fidelidad del genoma durante su replicación y segregación.

Entre los genes de verificación se encuentran:

- Genes que previenen mutaciones de genes reguladores del ciclo.
- Genes inductores de la salida del ciclo bien hacia un estado celular diferenciado o bien hacia la apoptosis.
- Los genes que codifican proteínas que inactivan la Cdk por fosforilación/desfosforilación como la cinasa Wee, que fosforila los aminoácidos Thr 14 Y Tyr 15 causando la inactivación de la Cdk.
- Los genes que codifican proteínas inhibidoras del ciclo:
 - Un grupo de proteínas inhibidoras de las Cdk (proteínas *cki*) como las proteínas p21 y p16, que interaccionan con las Cdk.
 - La proteína del Retinoblastoma (Rb), que en su forma no fosforilada actúa como un represor génico al capturar los factores de transcripción necesarios para la replicación de ADN, y así, inhibe el paso de G1 a la fase S, pudiendo producir el paso a G0. La fosforilación de la proteína Rb provoca la liberación de estos factores y desencadena una trama compleja de señales en la que intervienen varios protooncogenes (*ras*, *c-myc*, *c-fos* y *c-jun*).
 - La proteína p53 que provoca la parada de G1 al activar la síntesis de p21, la cual activa complejos Cdk-ciclinas y evita la fosforilación de la proteína Rb (Paniagua, 2003).

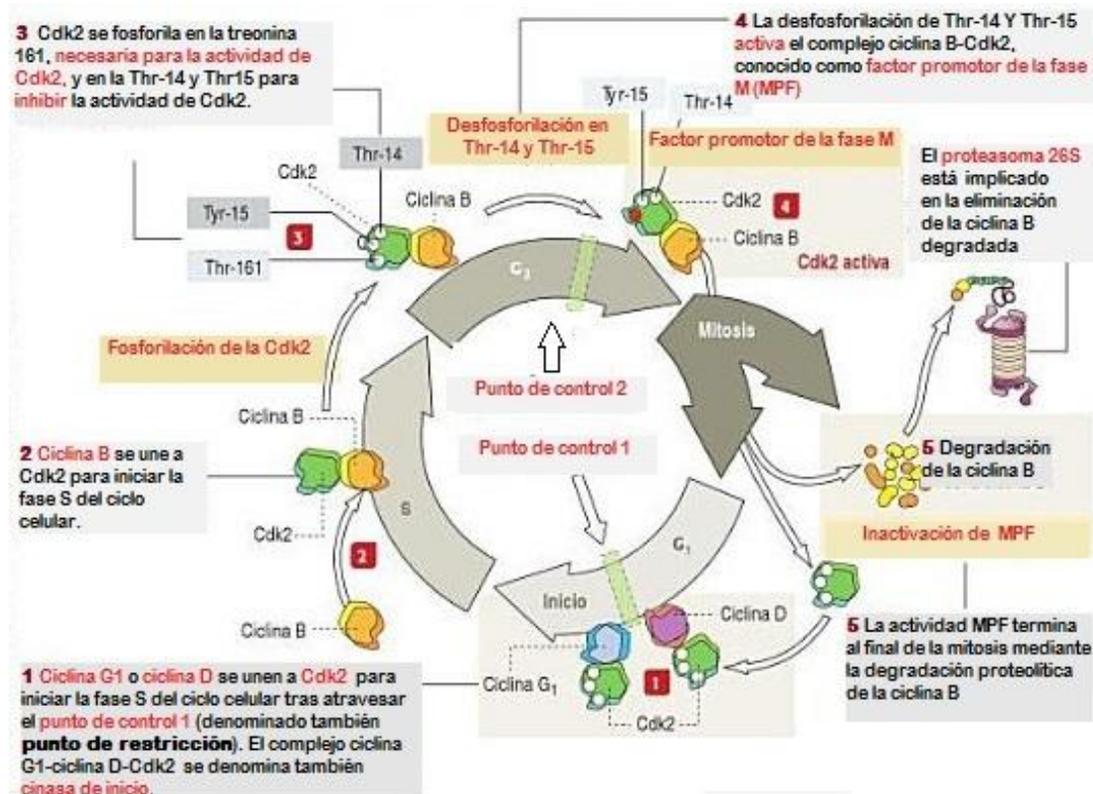


Fig. 3 Regulación del ciclo celular. Tomado y modificado de Kierszenbaum, 2008.

Cuando ya no se requieren más células, estas entran en un estado denominado G₀, en el cual abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de latencia, lo cual no significa que entren en reposo ya que éstas células presentan un metabolismo activo, pues si estas células reciben el estímulo adecuado abandonan el estado G₀ y entran al G₁. Algunas poblaciones celulares altamente especializadas como las fibras musculares o neuronas al entrar en estado G₀ abandonan indefinidamente el ciclo celular.

En los organismos complejos las células tienen ciclos de duración muy variable, lo cual depende de los tejidos. Además las células especializadas que no se dividen después de su diferenciación (células musculares y nerviosas), se conocen otras que se multiplican de manera regular y a ritmo acelerado (células de tallo). Un organismo constituye una comunidad dentro de la cual ciertos grupos de células regulan el desarrollo de las células que les rodean. Este perfecto equilibrio (homeostasis) entre la renovación de células, únicamente puede ser regulado por la eliminación de las mismas, es decir una muerte celular (Callen, 2000).

Muerte Celular

La muerte celular es de fundamental importancia para explicar procesos biológicos como la formación y maduración de embriones, la senilidad, la formación de queratocitos, la renovación del epitelio de las membranas mucosas y la atrofia de órganos después de la eliminación de las hormonas tróficas como consecuencia de la castración, la muerte de neutrofilos, etc. La muerte celular programada es un término funcional, que se usa para definir la muerte celular como parte normal de la vida de los organismos multicelulares (Dubin, 2000).

Necrosis

En la actualidad se conocen de manera general dos formas de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (Fig.4). La necrosis fue descrita en 1858 por Virchow, y puede ser definida como un fenómeno degenerativo producido por un daño repentino y severo. Dentro de los factores desencadenantes pueden citarse la isquemia, la hipertermia o hipotermia severa, el trauma físico o químico, así como las altas concentraciones de agentes tóxicos. Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintivas: los cambios tempranos incluyen un aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células de la vecindad. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar. La apoptosis en cambio, se define como una forma de deceso celular caracterizada por la ejecución de un programa de muerte que tienen todas las células, y que está codificado genéticamente (Sánchez-Torres, 2003) (Tabla 1).

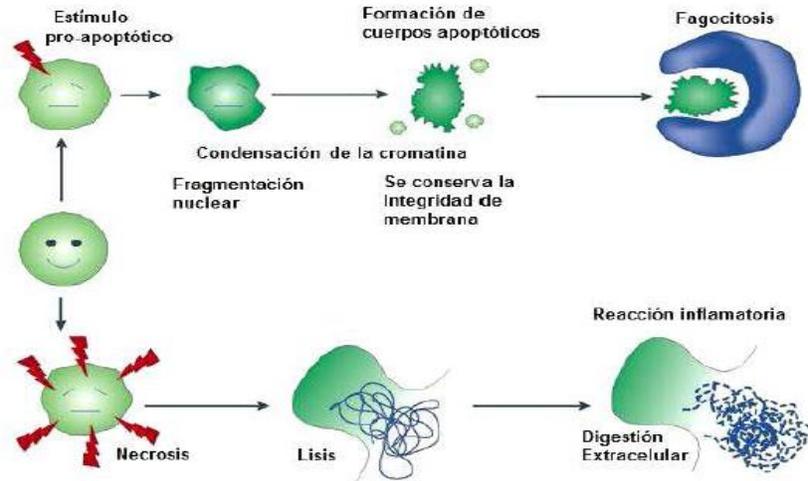


Fig. 4 Diferencias entre la muerte celular apoptótica y necrótica. Tomado y modificado de Samejima, 2005.

MUERTE CELULAR		
PARÁMETRO	APOPTOSIS	NECROSIS
Morfología celular.	Contraída.	Expandida con formación de microvesículas y liberación de citoplasma al espacio intracelular.
Integridad de la membrana celular.	Intacta.	Dañada
Fragmentación de ADN	Fragmentos de 180-200 pares de bases, y sus múltiplos.	Fragmentos de tamaño variable.
Tejidos pericelulares.	Signos de fagocitosis	Signos de inflamación extensos.
Citoplasma.	Empaquetado en cuerpos apoptóticos.	Liberado.
Membrana nuclear.	Normal.	Rota y deformada.
Requerimiento energético.	Necesario.	Innecesario.
Síntesis de proteínas.	Necesaria.	Detenida.

Tabla 1 Diferencias entre la muerte necrótica y apoptótica. Tomada y modificada de Dubin, 2000 y Elmore, 2007.

Apoptosis

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; la segunda o de ejecución, en donde se presentan los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Elmore, 2007).

1. Fase de Iniciación. La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria (Vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (Vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones) (Sánchez-Torres, 2003).
2. Fase de Ejecución. La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplásmicos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno. En etapas posteriores la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta, formando un número variable de vesículas conocidas como cuerpos apoptóticos.

A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios que representa la célula durante la apoptosis. Esta maquinaria básica la constituyen las caspasas, que son proteasas dependientes de tioles (residuos de cisteína), caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas en la vecindad de residuos aspárticos. Por su estructura y actividad proteolítica específica, se conocen por lo menos 10 caspasas y se incluyen en los grupos siguientes: (a) activadoras de caspasas apoptogénicas (caspasa -2, -8, -9 y -10); (b) efectoras de la

apoptosis (caspasa -3, -6 y -7); (c) mediadores de la inflamación (caspasa -1, -4 y -5) (Dubin, 2000).

Las caspasas que participan durante la muerte apoptótica y su secuencia dependen del inductor. Se han descrito de manera general dos cascadas o vías de inducción, las cuales pueden unirse en un componente común, la caspasa 3.

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal proapoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando (FasL). FasL es un trímero que al unirse con Fas induce la trimerización de éste. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC (*death inducing signaling complex*) al dominio citoplásmico de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la procaspasa 8 favoreciendo su autoactivación; la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7. La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés, y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo c al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la procaspasa 9, la cual a su vez activa las caspasas 3,6 y 7(Sánchez-Torres, 2003) (Fig.5).

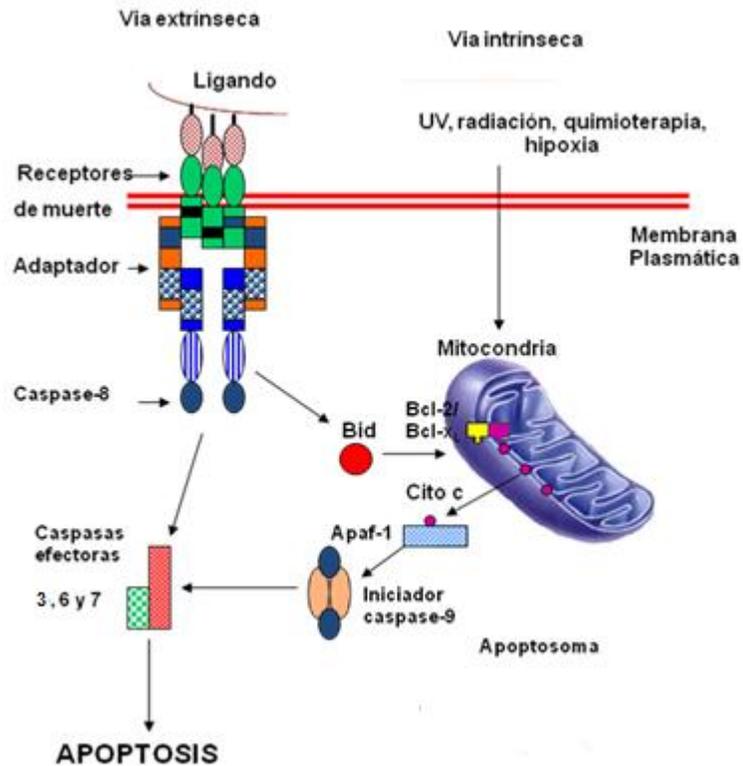


Fig. 5 Vía Extrínseca e Intrínseca de la muerte por apoptosis. Tomado y modificado de Gupta *et al.*, 2006.

3. Fase de Eliminación. Las células son rápida y eficientemente removidas por fagocitos (Sánchez-Torres, 2003).

Existe un frágil equilibrio entre los tres destinos posibles para las células pertenecientes a un tejido dado: la diferenciación, proliferación y la muerte de tipo programado (Callen, 2000), cuando este equilibrio se rompe por diversos factores desencadena una serie de anomalías, entre ellas y una de las más graves es el cáncer.

Cáncer

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células provocada por modificaciones en la información genética subyacente de las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales. En tanto el crecimiento del tumor permanezca delimitado, la enfermedad en ordinario se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y del tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar metástasis, es decir, células que se desprenden de la masa original entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (Karp, 1998) (Fig.6).

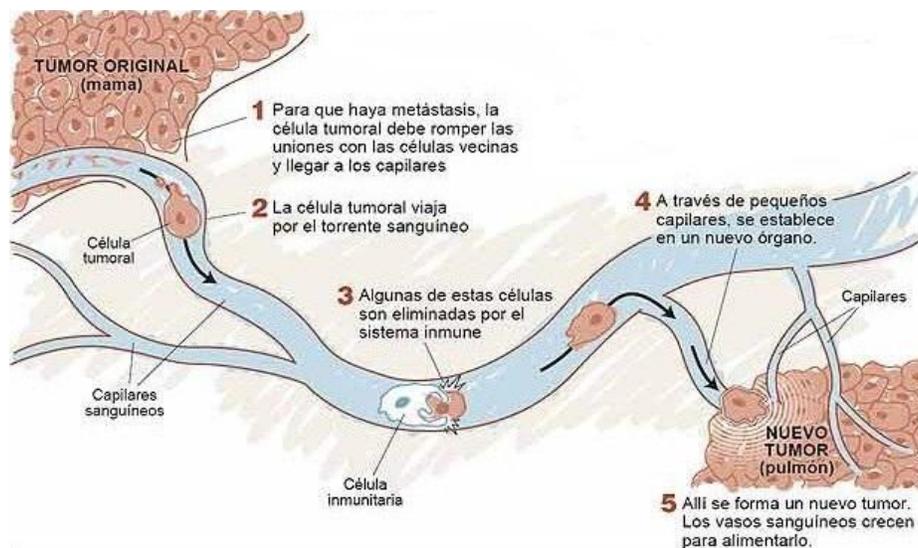


Fig. 6 Proceso Metastásico. Tomado de Sahai, 2005.

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir de los que se originan. Los cánceres procedentes de células epiteliales se denominan carcinomas; los que proceden de tejido conjuntivo o de células musculares se denominan sarcomas. Entre los cánceres que no encajan en ninguna de estas dos amplias categorías se encuentran las diversas formas de leucemia, derivadas de células hematopoyéticas, y los cánceres derivados de células del sistema nervioso (Alberts *et al.*, 2002).

Los genes que participan en la carcinogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma cuyos productos proteicos están implicados en actividades celulares como la progresión a través del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN y la adherencia entre las células vecinas (Paniagua, 2003). Estos genes se dividen en dos grandes categorías:

- Oncogenes, son las formas alteradas de los genes que tienen papeles claves en el crecimiento celular y en las rutas de diferenciación (Turnpenny, 2009). Según la función de la proteína codificada se distinguen diferentes tipos de oncogenes, como los que codifican proteínas G (oncogén *ras*); los que codifican factores de crecimiento o sus receptores (oncogén *sis* –virus del sarcoma del simio-); que codifican a proteínas cinasas de serina, treonina y de tirosina (oncogén *raf*, *src*); codifican factores de transcripción nuclear (oncogén *myc*); y los que codifican productos que afectan a la apoptosis (oncogén *bcl-2*) (Paniagua, 2003).
- Genes supresores de tumores, grupo de genes que controlan la proliferación celular de forma inhibitoria. La inactivación de dos alelos predispone a la célula a la división incontrolada. Los genes supresores más conocidos son: Rb, p53, APC, DCC, NF1, NF2, WT (Tumor de Wilms) y p16 (González-Sastre, 2003).

La correlación entre mutagénesis (la producción de un cambio en la secuencia de ADN) y carcinogénesis está clara para tres clases de agentes: los cancerígenos químicos (que habitualmente causan simples cambios locales en la secuencia de nucleótidos), las radiaciones ionizantes, como los rayos X (que típicamente causan roturas de cromosomas y translocaciones) y los virus (que introducen en las células ADN ajeno) (Alberts *et al.*, 2002).

Cáncer cervicouterino

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300,000 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500,000 casos nuevos se presentan cada año (López *et al.*, 2006).

Esta alteración celular se origina en el epitelio del cuello del útero (Fig.7), y se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando traspasa la membrana basal (Ministerio de Salud Chilena, 2007).

Se reconocen dos tipos histológicos principales: el epidermoide espinocelular o de células escamosas y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical. El resto lo constituyen los carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células pequeñas, los cuales son relativamente raros (Lazcano, 2000).

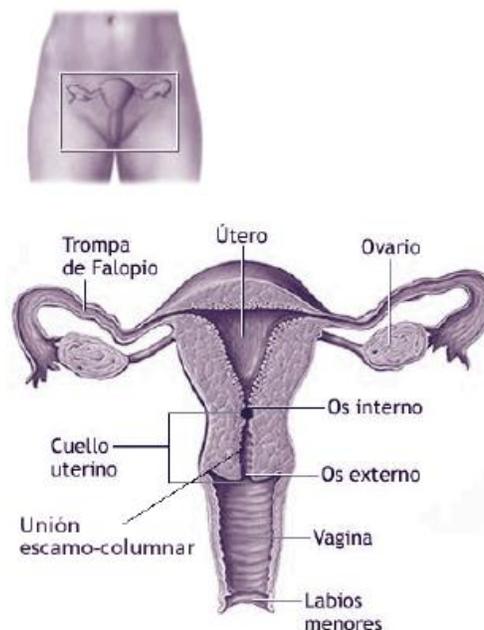


Fig.7 Esquema general del Aparato Reproductor Femenino. Tomado de ICCE, 2007.

Los virus oncogénicos desempeñan un papel etiológico de extrema importancia en varios de los tumores malignos que afectan al hombre. Los estudios moleculares han demostrado la relación entre las células intraepiteliales y escamosas de cérvix y numerosas infecciones inducidas por los virus Epstein Barr, Virus de inmunodeficiencia humana (VIH), Herpes virus tipo II (VSH-2), Citomegalovirus (VMC) y Papiloma humano (VPH) (Bosch, 1997).

Casi todos los casos de cáncer cérvicouterino (99,8%), se deben a tipos específicos de un virus de ADN tumoral transmitido por vía sexual, denominado Virus del papiloma humano (VPH). El enlace entre cáncer cervicouterino y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen (López *et al.*, 2006).

Se han aislado, secuenciado y clonado al menos 100 tipos del virus y de ellos, 50 están asociados al tracto genital femenino. Éste ha sido clasificado en cepas de "alto riesgo" y/o de "bajo riesgo", según el grado de transformación maligna que ocasiona en la célula infectada. Entre los más comunes, los que representan al grupo de bajo riesgo incluyen a los tipos 6 y 11 que usualmente causan verrugas benignas y que ocasionalmente, se asocian a lesiones invasivas; mientras que los tipos 16 y 18, corresponden a los de "alto riesgo" por su gran potencial carcinogénico. El VPH-16 es el tipo que aparece, fundamentalmente, en los tumores invasivos y en los de alto grado de malignidad; el VPH-18 se relaciona con el carcinoma pobremente diferenciado y con un mayor compromiso de los ganglios linfáticos, lo cual puede variar en dependencia de la localización geográfica (León, 2004).

El riesgo de contraer el virus está influenciado por la actividad sexual, por lo que el cáncer sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente:

- Hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida.
- Actividad sexual a temprana edad.
- Tener historial con enfermedades transmitidas sexualmente.
- Edad. La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El cáncer es más común después de los 35 años (OMS, 2007).
- Uso prolongado de anticonceptivos orales (más de 5 años). La región larga de control (LCR por las siglas en inglés), en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroidales como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) (López *et al.*, 2006).

- Transmisión de agentes infecciosos (*Trichomonas*, *Gardnerella*, Herpes virus tipo II (HSV-2), Clamidia) (León, 2004).
- Predisposición genética. Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor (López *et al.*, 2006).

El aspecto clínico de la infección se inicia cuando el virus penetra en el epitelio del cuello uterino o de la vagina, que al ser epitelios característicos en continuo crecimiento y maduración, resultan ideales para la infección y desarrollo del virus (Fig.8).

Esta infección se realiza a través de microabrasiones, de ahí el virus alcanza la zona basal y dependiendo del genotipo, se desencadenarán una serie de cambios, como la hiperplasia, tanto del epitelio como del estroma. La infección puede no manifestarse inmediatamente al haber un periodo de latencia que puede estar mediado por multitud de factores, tanto del propio virus como del huésped, y puede ser de meses o años, al cabo de las cuales las lesiones se presentarán bajo tres modalidades:

- Infección clínica: produce síntomas y puede verse a simple vista en forma de lesiones verrugosas.
- Infección subclínica: Se hace visible sólo utilizando algún procedimiento como el colposcopio o el microscopio.
- Infección latente: Se puede identificar por medio de investigaciones virológicas (Lazcano, 2000).

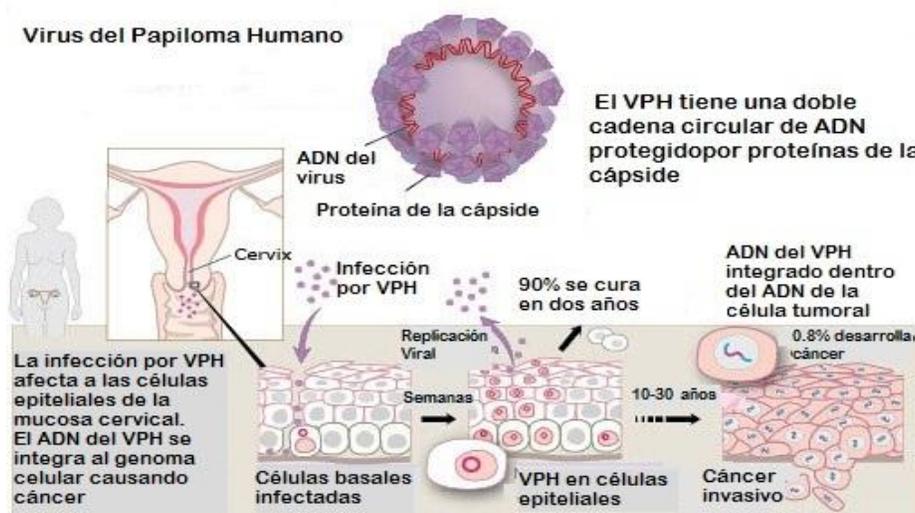


Fig. 8 Infección y replicación del Virus del Papiloma Humano. Tomado y modificado de Rohl, 2008.

Tratamientos

El cáncer puede ser controlado por medio de cuatro tipos de tratamientos, los cuales se eligen de acuerdo al estadio de la enfermedad y a criterio del médico oncólogo: la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia y con radiaciones ionizantes llamada radioterapia (Mahecha, 2006).

- Cirugía, es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido extirpadas.
- Quimioterapia, la cual está basada en la administración de fármacos citostáticos o citotóxicos; el mecanismo de acción de los antineoplásicos es frenar la proliferación y/o el crecimiento celular. Actúan sobre el ADN, el ARN o la mitosis celular y en algunas ocasiones sobre la síntesis de proteínas. La acción no siempre es única, sino que puede realizarse por diversos mecanismos. La especificidad por las células tumorales es escasa y por ello dan lugar a toxicidad.
- Inmunoterapia, se refiere al tratamiento que inmunomodula positivamente la respuesta mediada por los Linfocitos T eficientes contra las células tumorales. Dentro de los tratamientos biológicos están los anticuerpos monoclonales, las vacunas y los denominados factores de crecimiento (Valdespino, 2005).
- Radioterapia, basada en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa). La radiación de forma directa produce rotura cromosómica e indirectamente genera radicales libres que lesionarán posteriormente a la célula, el resultado final es la muerte de la célula por interrupción de su proceso reproductivo (Guereña, 2006).

Estos tratamientos son muy agresivos, ya que no se limitan solo a afectar a las células tumorales si no que también afectan a las células sanas produciendo consecuencias graves al paciente como la pérdida de cabello, debilidad, náuseas, vómito y con esto una disminución en su calidad de vida. Es por esto que se han emprendido investigaciones con el fin de encontrar compuestos naturales que tengan actividad antineoplásica y selectiva.

Capsaicina y Análogos.

La Capsaicina (E)-N-((4-hidroxi-3-metoxifenil) metil)-8-metil-6-nonamida (Fig.9) es un compuesto de origen natural y componente mayoritario de los capsaicinoides, grupo de compuestos que le confieren el efecto de pungencia al fruto del chile (*capsicum sp*) (Salazar, 2004).

El nombre del género, *Capsicum*, deriva del griego *Kapto*, que significa “picar”, lo que describe la principal característica del fruto. También se argumenta que deriva de *capsa*, el latín de caja, refiriéndose al hecho de que el fruto del chile es hueca, dividida en compartimentos que contienen las semillas (Salazar, 2004). Fue descubierta por L. Tresh en 1846 y predijo que la estructura estaba muy relacionada con la Vanilina. Después de este descubrimiento, no fue hasta 1919 que se determinó la estructura química por Nelson (Szallas, 1999).

Por los estudios de actividad estructural, la Capsaicina tradicionalmente se ha dividido en tres fracciones, aromática, lipofílica y la amida enlazadora (Apendino, 2005) (Fig.9).

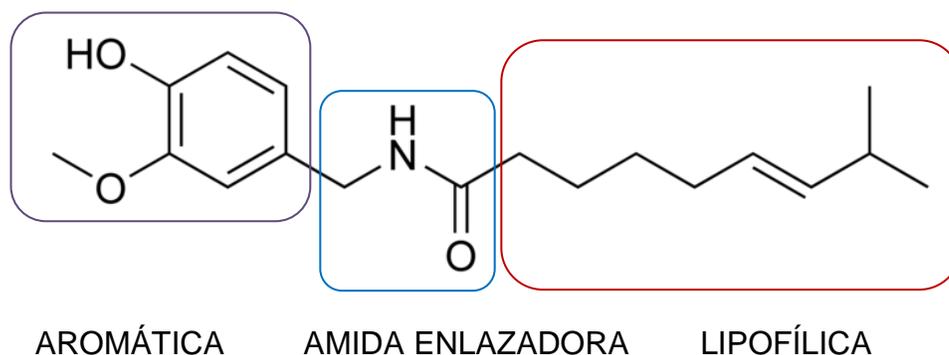


Fig. 9 Estructura química de la Capsaicina.

Se ha determinado que la actividad estructural de la Capsaicina, requiere la 4-hidroxi-3-metoxibencilamida (anillo vaniloide farmacóforo) (Roy *et al.*, 2002), para obtener actividad farmacológica. Así mismo una variedad de otros ligandos como: resiniferatoxin, olvanil, capsazepina, forbol 20-homovanillatos, etc.

requieren de la presencia del anillo vaniloide y a causa de esto el receptor de la Capsaicina ha sido nombrado receptor vaniloide tipo I (VR1).

Una nueva nomenclatura fue recientemente sugerida para la súper familia de los canales catiónicos de potencial transitorio que funcionan como receptores (TRP), familia de la cual forma parte el VR1. Esta nomenclatura nombra al receptor VR1 como TRPV1, que fue el primer miembro de la creciente familia de receptores vaniloideos que se caracterizó (Montell, 2002).

El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo que es activado por la Capsaicina, pH ácido, protones y estímulos térmicos. La activación sostenida del canal TRPV1 provoca una severa citotoxicidad, la que conduce a una muerte celular. Esto ha propiciado que la actividad de los capsaicinoides sea estudiada en diferentes áreas de la medicina (Szallas, 1999).

La Capsaicina ha demostrado tener una variedad de acciones farmacológicas en funciones cardiovasculares, respiratorias y gastrointestinales, así como también en la termorregulación (Díaz *et al.*, 1995). También ha sido usada para tratar dolor e inflamación asociada con varias enfermedades, incluyendo la artritis reumatoide, neuropatía diabética y herpes zóster (Kim *et al.*, 2010). Además, estudios recientes han demostrado que la Capsaicina tiene un efecto antiproliferativo y apoptótico en una variedad de líneas celulares de cáncer como de próstata (Mori, 2006), melanocitos de la línea B16-F10 (Jun, 2007), hepatocarcinoma SK-Hep1 (Young-Jung, 2001), MCF-7 de cáncer de mama (Tuoya, 2006) y la línea SNU-1 de estómago (Kim, 1997).

Por otro lado, de acuerdo con estudios clínico y epidemiológicos, el consumo excesivo de Capsaicina ha sido relacionado con trastornos orgánicos mayormente en el tracto digestivo, también está involucrado en la presencia de tumores orales y hepáticos (Díaz *et al.*, 1995).

Actualmente se realizan investigaciones con compuestos análogos que pudieran mantener el potencial antitumoral, pero reduciendo su costo de producción y los efectos adversos que produce; en ese sentido, Giovanni Apendino y cols. reportaron la síntesis y evaluación farmacológica como agonista de los receptores TRPV1 del Fenilacetilrivanil, el cual es el agonista de los receptores TRPV1 más potente que se ha sido sintetizado y que carece de acción pungente (Fig. 10). Acorde a esto, se desarrolló la síntesis de una nueva Amida Diazabicclicá, análoga del Fenilacetilrivanil en donde se reemplazo la cadena lateral de vainililamida por el sistema (1S, 4S)-2,5-diazabicciclo [2.2.1] heptano.

El sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, ha sido incorporado en algunos fármacos como equivalente bioisostérico de la piperazina, debido a sus propiedades estructurales como son la quiralidad y la rigidez (Melgar *et al.*, 2008).

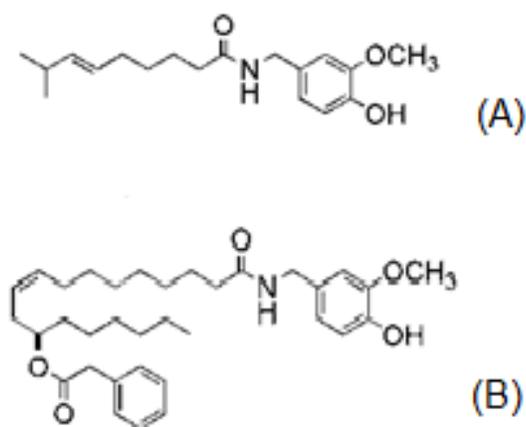


Fig. 10 Estructuras químicas de la Capsaicina (A), Fenilacetilrinvanil (B)

La estrategia sintética involucró primeramente la construcción del heterociclo (1S, 4S)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (**8**) a partir de la trans-4-hidroxi-(S)-prolina (**1**) (Melgar *et al.*, 2008). Paralelamente se realizó la síntesis química del fenilacetilricinoleato de metilo (**10**) a partir del aceite de ricino empleando la metodología recientemente desarrollada por el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. El diéster **10** fue sometido a una hidrólisis enzimática regioselectiva con lipasa B de *Candida antarctica* en una mezcla acetona:agua 6:4 para producir después de 1 h de incubación el ácido fenilacetilricinoleico (**12**) con un rendimiento del 75%. El último paso consistió en la amidación del compuesto **11** con la diamina **8** a través de la formación del anhídrido mixto piválico para obtener un 80% de rendimiento del compuesto deseado **12**. Todos los compuestos fueron caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . (Fig. 11).

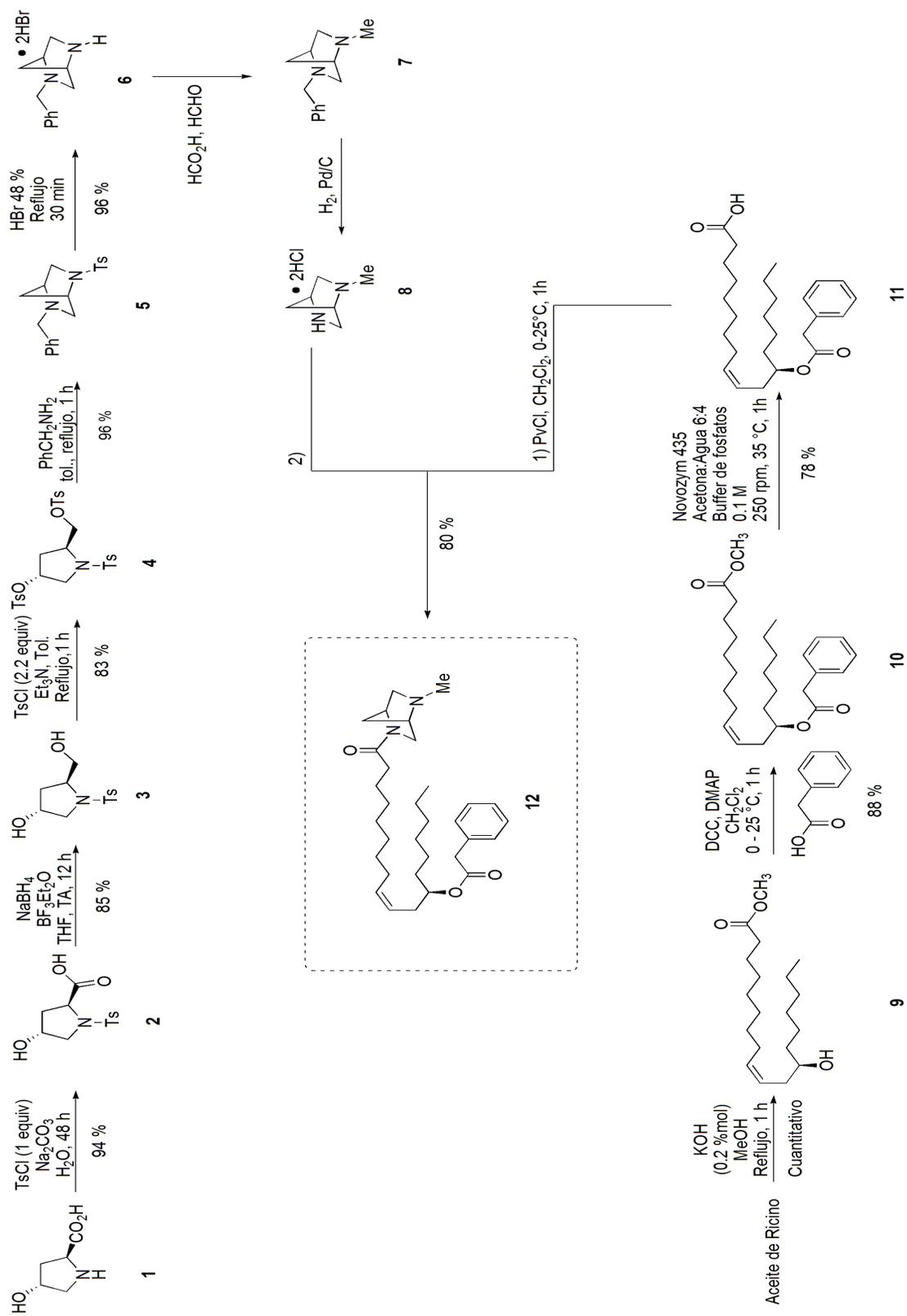


Fig. 11 Síntesis quimioenzimática de la Amida Diazabicyclica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen una gran variedad de tratamientos que se aplican a los pacientes con cáncer, sin embargo, estos resultan ser poco selectivos, costosos, ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y generan efectos colaterales que demeritan la calidad de vida del paciente. Por ello, surge la necesidad de buscar nuevas terapias, sobre todo, aquellas que estén basadas en compuestos orgánicos que presenten acción selectiva, no citotóxicos e inductores de apoptosis.

Un compuesto que ha llamado fuertemente la atención es la Capsaicina la cual ha demostrado tener actividad inhibitoria sobre diversos tipos de cáncer. Sin embargo, debido a sus características irritantes, se ha generado la necesidad de sintetizar compuestos análogos que conserven su actividad inhibitoria, pero carezcan de propiedades irritantes. La Amida Diazabicclicá es un análogo de la Capsaicina que tiene la característica de no ser irritante, por lo que la convierte en un buen candidato para ser evaluado con respecto a su actividad antitumoral.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, pues se estima que produce alrededor de 250,000 muertes por año, 80% de las cuales ocurre en países en vías de desarrollo. (Zuñiga *et al.*, 2009).

En México, es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años, precedido únicamente por el cáncer de mama. Anualmente se brinda atención médica a 9,000 casos de cáncer cervicouterino invasor y más de la mitad muere (INEGI 2010).

Frente al panorama descrito, es necesario que se diseñen nuevas estrategias para combatir al cáncer en sus diferentes modalidades, por lo que la creación y diseño de diferentes fármacos a partir de derivados orgánicos es una opción que debe ser explorada y evaluada.

HIPÓTESIS

Es conocido que compuestos como la Capsaicina y sus análogos, han mostrado tener efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis sobre líneas celulares. Por ejemplo, la Capsaicina presenta un efecto antiproliferativo en células de próstata (Mori, 2006), melanocitos de la línea B16-F10 (Jun, 2007), hepatocarcinoma SK-Hep1 (Young-Jung, 2001), MCF-7 cáncer de mama (Tuoya, 2006) y la línea SNU-1 de estómago (Kim ,1997). Dado que la Amida Diazabicclicá es un análogo del Fenilacetilrinvanil, el cual es un análogo de la Capsaicina, genera la posibilidad de presentar actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto antiproliferativo y apoptótico de la Amida Diazabicclicla, así como su efecto en el ciclo celular en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Objetivos particulares

- Desarrollar cultivos de las líneas HeLa, CaSki y ViBo así como también de linfocitos de sangre periférica humana.
- Determinar la concentración de la Amida Diazabicclicla requerida para inducir un decremento celular del 50% (IC_{50}), en cultivos de células tumorales de cáncer cervicouterino.
- Evaluar el efecto de la Amida en la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo, mediante citometría de flujo en las líneas tumorales.
- Determinar si la Amida Diazabicclicla induce muerte por apoptosis en las líneas tumorales de cáncer cervicouterino, identificando la formación de cuerpos apoptóticos, y la presencia de caspasa 3 activa por inmunocitoquímica.
- Evaluar si la Amida Diazabicclicla induce fragmentación de ADN en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, por medio de la técnica de TUNEL.
- Determinar si las IC_{50} obtenidas ejercen un efecto citotóxico en las líneas de células de cáncer cervicouterino, así como en células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, por medio de la cuantificación de LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Evaluar el efecto antiproliferativo la Amida Diazabicclicla sobre células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana).

METODOLOGÍA

Cultivo de células tumorales.

Se establecieron las condiciones necesarias para hacer proliferar cultivos de las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo (American Type Culture Collection), se sembraron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), al 10% de suero neonato de ternera (NCS; Gibco,USA) previamente desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Nuair, USA) a 37°C con 5% de CO₂ y una atmósfera a saturación húmeda. Se permitió la proliferación de los cultivos hasta alrededor de un 70% de confluencia para realizar los ensayos.

Preparación del Stock.

Se preparó una primera solución pesando 1mg de la Amida Diazabicclicá en un tubo cónico de plástico de 600 µl, posteriormente se disolvió en 100 µl de etanol. Una vez disuelto, se preparó una segunda solución *stock*, tomando 10 µl del compuesto disuelto en etanol más 90 µl de RPMI (1µg/1µl). Se disolvió con la ayuda de un agitador tipo vórtex. A partir de este *stock* se tomaron las concentraciones requeridas para cada ensayo.

Determinación de la proliferación celular por incorporación del colorante cristal violeta.

Se cultivaron células de las líneas de cáncer cervicouterino, HeLa, CaSki y ViBo en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), poniendo 7,500 células por pozo, con 100 µl de RPMI-1640 al 5% de NCS, por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó la Amida diluida en RPMI-1640 al 5% de NCS. Las concentraciones de Amida Diazabicclicá fueron desde 10 hasta 3 µg/ml, permitiendo actuar al compuesto por 24 h. Además se incluyó un ensayo control-vehículo que contempló 5 µl de Etanol diluido en 1ml de RPMI-1640 al 5% de NCS. Al término del estímulo con las diferentes concentraciones, se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta (*Kueng et al., 1989*). Para ello, a los cultivos tratados se les retiró el medio

de cultivo y las células se fijaron inmediatamente con Glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para después lavar las células con agua desionizada; posteriormente se dejaron secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente dejando secar al aire. Por último, el colorante incorporado a las células se solubilizó en ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% en agitación por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Imagine Tecan Spectra). En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal para obtener la concentración que disminuye en un 50% a la población celular (IC_{50}).

Obtención de la IC_{50} .

Para calcular las IC_{50} , los datos arrojados por el espectrofotómetro se procesaron en el programa Microsoft Office Excel 2007, para obtener las curvas dosis respuesta, que mostró el efecto del compuesto sobre la población celular. A estas curvas se les aplicó regresión lineal la cual es obtenida por medio de la ecuación de la recta, de este modo, en base a esta ecuación, el valor de "Y" se sustituye por 50 y el valor de $X = \mu\text{g/ml}$. Obteniendo así finalmente el valor de la respectiva IC_{50} .

Evaluación del ciclo celular por Citometría de flujo.

500,000 células de cáncer cervicouterino de las líneas HeLa, CaSki y ViBo, se sembraron en cajas Petri de 50mm (Kimex, USA) con 5 ml de RPMI al 5% de NCS. Se incubaron por 24 h para permitir su adherencia. Posteriormente se estimularon con las IC_{50} obtenidas, permitiendo actuar al compuesto por 24 h. Después del estímulo, las células se despegaron de las cajas de cultivo con Verseno o Tripsina, se centrifugaron y lavaron con PBS. El botón celular se fijó y resuspendió con 1ml de una solución metanol/PBS 1:1, después de 20 minutos se centrifugó y se lavó con PBS. El botón se resuspendió con 500 μl de ARNasa (2.5 U/ml) para incubar a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 μl de yoduro de propidio (200 mg/l), protegiendo de la luz. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro de flujo (FACS ARIA II) y analizadas con el software FACSDIVA.

Evaluación del efecto de la Amida sobre inducción de apoptosis en las líneas celulares a través de la detección específica de la caspasa 3 activa.

Se sembraron 200,000 células de las líneas de cáncer cervicouterino en cubreobjetos en 2 ml de RPMI-1640 al 5% de NCS en cajas Petri de 50 mm. Después de 24 h. se trató a las células con las IC₅₀ de la Amida, en medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de NCS, este estímulo duró 24 h.

Las células se fijaron en Paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permearon con Tritón X-100 0.2% durante 5 minutos a 4°C. Después de ser lavadas, las células se bloquearon con PBS-BSA-Tween 20, durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Inmediatamente, se adicionó el anticuerpo primario anti-caspasa 3 activa (anticuerpo producido en conejo SIGMA (1:50 en PBS)) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al término del tiempo, las muestras se lavaron con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit acoplado a FITC (1:100 en PBS)), en cámara húmeda en oscuridad durante 2 h. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS para después aplicar 15 µl de DAPI de manera muy cuidadosa durante 1 minuto e inmediatamente después se lavaron 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestras con medio de montaje *anti-fading* (Vectashield USA). Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia.

Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling* (TUNEL).

Fueron sembradas 50,000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm en RPMI al 5% de NCS. A las 24 h se trató a las células con la IC₅₀ en medio de cultivo. Después las células fueron fijadas con Paraformaldehído (al 2% en PBS) el cual se preparó al momento. Las células fueron lavadas con PBS y permeadas con Tritón X-100 al 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4°C. La técnica de TUNEL (Millipore, USA) se desarrolló de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con 30 µl de buffer de equilibrio en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron por 1 hora con enzima TdT, en cámara húmeda. Al término del tiempo se detuvo la reacción con el buffer de paro por 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con anti-digoxigenina-rodamina durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados

con PBS y se incubaron con 15 μ l DAPI por 1 minuto. Posteriormente las muestras se volvieron a lavar con PBS y fueron montadas con medio de montaje *anti-fading*. Se analizaron en un microscopio de epifluorescencia.

Determinación de la citotoxicidad por medio de la evaluación de LDH.

En una caja de 96 pozos (Corning Inc.) se sembraron 7,500 células con 100 μ l de medio RPMI al 5% de SNC, por 24 h. Se adicionaron las IC₅₀ de la Amida en RPMI fresco al 5% de SNC. Se consideró un control sin estímulo al cual solamente se le hizo un cambio de medio de cultivo fresco (RPMI al 5% de SNC); además se consideró un control vehículo con el volumen de etanol con el cual se solubiliza la IC₅₀. El ensayo se mantuvo por 24 h más dando un tiempo total de cultivo de 48 h.

Una vez completadas las 48 h se retiró únicamente el medio de cultivo de los controles que contienen solo RPMI al 5% de SNC. Las células fueron permeadas con 100 μ l de Tritón X-100 al 0.5% en PBS e incubadas por 1 h a 37°C en atmosfera húmeda (dichas células tuvieron el efecto de control positivo a citotoxicidad), posteriormente se extrajo individualmente el medio de cultivo de cada uno de los pozos (incluidos controles y tratamientos), y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos en tubos cónicos de plástico de 600 μ l, para eliminar residuos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en una caja nueva de 96 pozos para así agregar 100 μ l de la mezcla de reacción (250 ml de catalizador y 11.25 ml de solución colorante) (Kit BioVisionK – 311 400; 400 assays) se incubaron por 30 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia de los controles fueron comparados con los de los tratamientos de la Amida.

Evaluación del efecto de la Amida Diazabicclicá sobre la proliferación de linfocitos humanos a través de la porción de Carboxifluoresceina (CSFE).

Cultivo de linfocitos humanos con tubos Vacutainer®. Se colectaron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano; posteriormente se colocaron 5 ml en tubos cónico de vidrio (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque y fueron centrifugados (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm, la velocidad fue en aumento gradualmente de (300 rpm cada 2 minutos, hasta llegar a 1500 rpm) centrifugando por 25 minutos más. Posteriormente se retiró la parte superior la cual contiene el plasma y así coleccionar al anillo de leucocitos, el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendido en 10 ml de

PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante para resuspenderse en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. (El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja Petri de 10 ml (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, y fueron incubadas durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Una vez centrifugada la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Posteriormente se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Ensayo de Carboxifluoresceína. Se agregaron en tubos cónicos de plástico de 1.6 ml la concentración del tratamiento a evaluar, cuidando de mantener la concentración final de 1,000 000 de células/ml de medio total. Para marcar con Carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de Carboxifluoresceína (12 μ l por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron por 15 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5% SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos se transfirieron a tubos eppendorf a una densidad de 1,000 000 de células por ml de RPMI suplementado con 20% de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Se trataron a las células con las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular. Las células contenidas en cada tubo cónico de plástico de 1.6 ml se sembraron en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l. Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, posteriormente se centrifugó y retiró el verseno, resuspendiendo con 500 μ l de PBS (dos veces), y 500 μ l de Paraformaldehído al 2%, para leerse en el Citómetro de flujo.

Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows. Seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

Con el fin de determinar la concentración de la Amida Diazabicclicá necesaria para inducir un decremento del 50% en la densidad celular (IC_{50}), los cultivos de células de cáncer cervicouterino, HeLa, CaSki y ViBo, fueron tratados con concentraciones de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.12), y la densidad celular fue evaluada por medio de la técnica de cristal violeta.

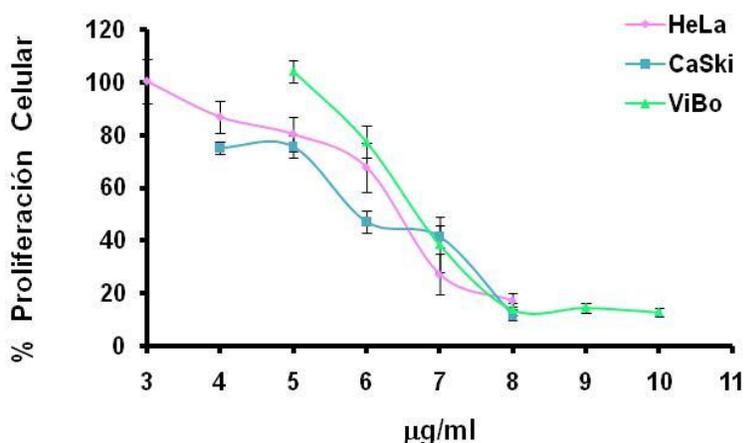


Fig. 12 Efecto antiproliferativo de la Amida Diazabicclicá en cultivos tumorales de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki Y ViBo.

Línea Celular	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
HeLa	6.2
CaSki	5.9
ViBo	6.7

Tabla 2 Concentración requerida de la Amida Diazabicclicá que induce un decremento del 50% en la proliferación celular (IC_{50}) en cultivos de líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Los resultados mostrados en la figura 12, establecen que el efecto inhibitorio de la Amida depende de la dosis, ya que conforme se incrementa la concentración la densidad celular disminuye, los valores de IC_{50} , indican que el efecto antiproliferativo en las tres líneas tumorales se encuentra en un rango de concentración entre 6 y 7 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2). El hecho de que las células HeLa y

CaSki sean positivas al virus del papiloma tipo 18 y 16 respectivamente, mientras que las células ViBo son negativas a éste, sugiere que el efecto antiproliferativo es independiente de la presencia del virus.

Con el propósito de establecer si la Amida Diazabicclicá afecta la morfología de las células tumorales, los cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con 6.2, 5.9 y 6.7 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, de la Amida durante 24 h, y se fotografiaron en un microscopio NIKON en contraste de fases con un aumento de 10 X (Fig.13).

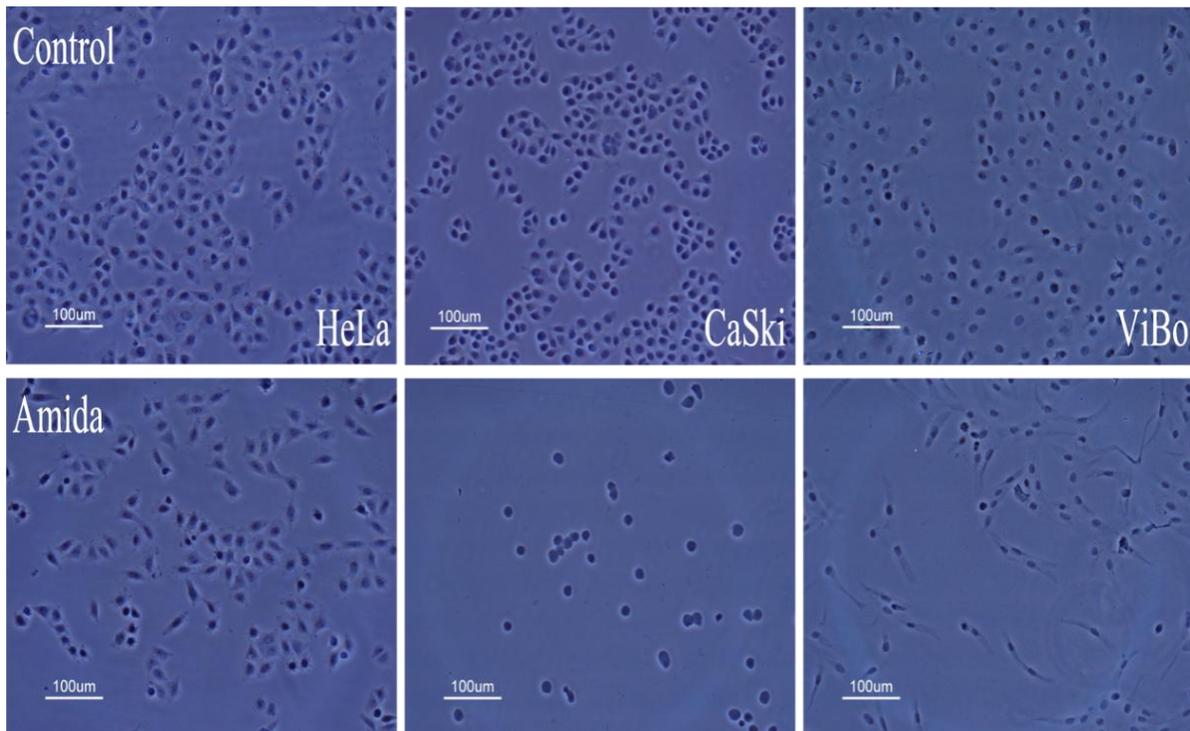


Fig. 13 Efecto de la Amida Diazabicclicá sobre la morfología de las líneas de cáncer cervicouterino. Controles de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo comparados con cultivos celulares estimulados con 6.2, 5.9 y 6.7 $\mu\text{g/ml}$ de la Amida Diazabicclicá respectivamente.

Como se aprecia en la figura 13, la morfología de las tres líneas tumorales se ve afectada tras la adición de la Amida, observando una forma poliédrica de las células en los cultivos no tratados, mientras que en los cultivos con la Amida, se observan células de forma redonda en el caso de las células HeLa y CaSki, y de forma irregular en las células ViBo, indicando una pérdida de la adherencia y un posible efecto en los componentes del citoesqueleto.

Para descartar la posibilidad de que el efecto en la proliferación celular inducido por la Amida se deba a una muerte necrótica, los cultivos de las líneas celulares de cáncer cervicouterino tratados con sus respectivas IC_{50} fueron sometidos a una prueba de citotoxicidad, midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, en el cerebro y en los pulmones. Cuando la enzima se encuentra en el medio extracelular indica una muerte celular (traumática, infecciosa o neoplásica).

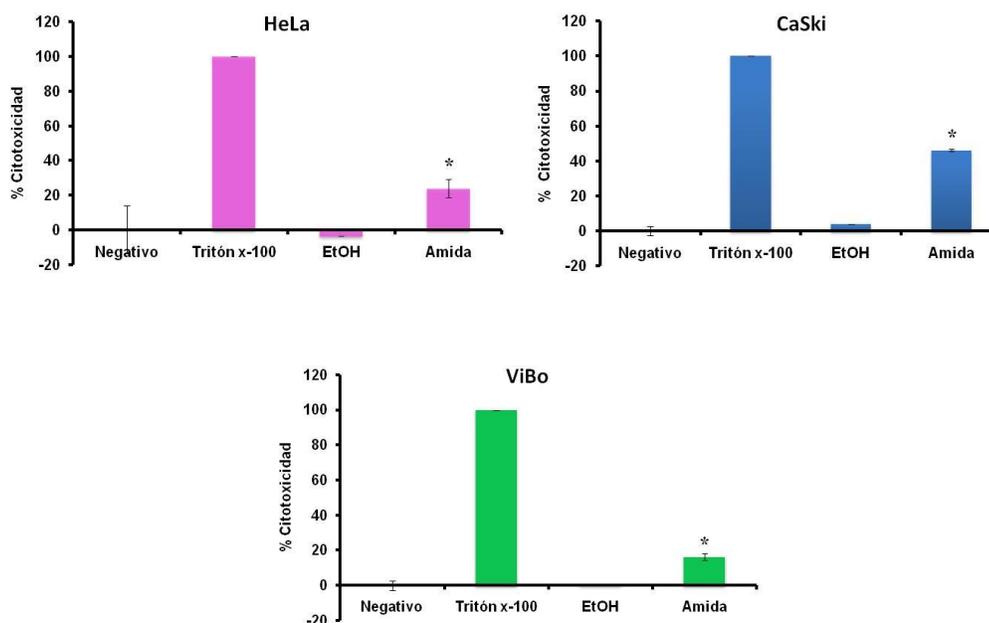


Fig. 14 Liberación de LDH expresada en porcentaje de citotoxicidad en células de cáncer cervicouterino tratadas con la Amida Diazabicclicá. Las gráficas representan el promedio de tres eventos independientes para los cultivos celulares (* $p < 0.05$ vs. EtOH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se puede apreciar en la figura 14, el porcentaje de citotoxicidad para el control vehículo etanol es mínimo en las tres líneas mientras que el porcentaje de citotoxicidad en los cultivos de las líneas HeLa (24%) y ViBo (16%) tratados con la Amida, que son comparados con un control positivo Tritón X-100, es bajo, por el contrario para el cultivo de células CaSki alcanza un 46%. Esto nos indica que en las células CaSki el efecto de la Amida resulta ser citotóxico, mientras que para las otras dos líneas, la citotoxicidad es mínima.

Para determinar si la causa del decremento en el número celular observado en los cultivos tratados con la Amida, es consecuencia de una afectación al ciclo celular; cultivos de las líneas celulares fueron tratados con las respectivas IC_{50} y la distribución de la cantidad de ADN en las fases G1, S, G2/M y subG1 fue determinada por citometría de flujo.

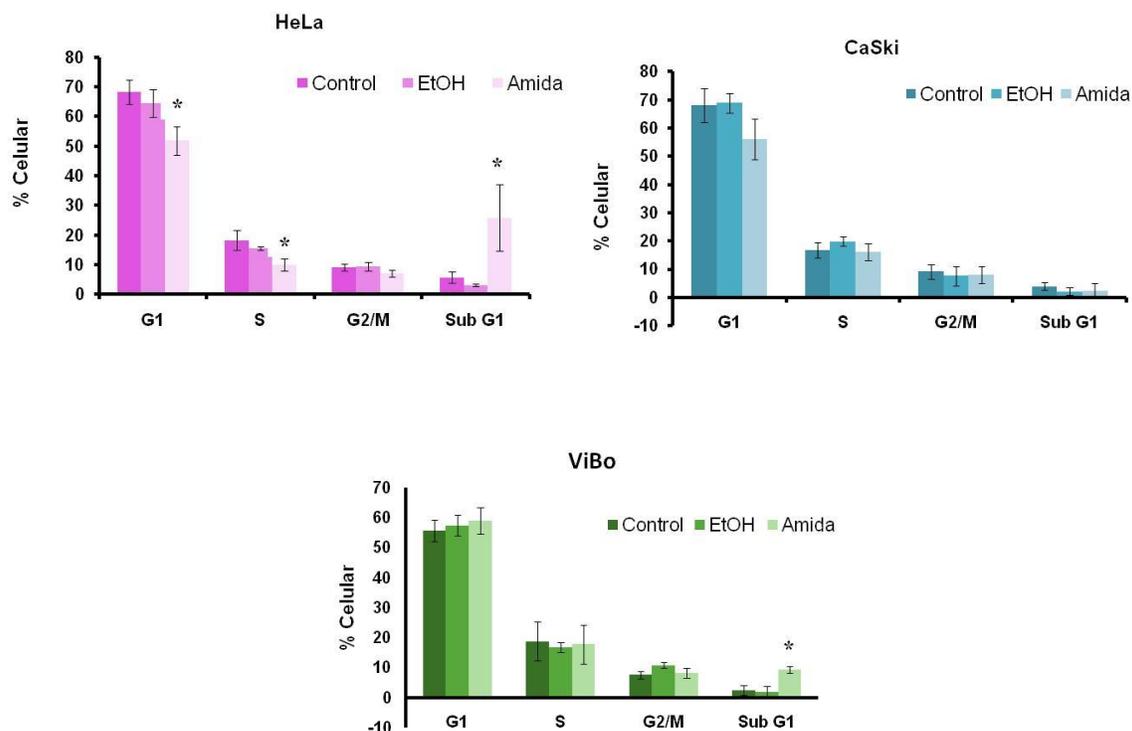


Fig. 15 Efecto de la Amida Diazabicclicá sobre la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo. Las gráficas representan el promedio de 6 eventos independientes para las tres líneas (* $p < 0.05$ vs EtOH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos indican que la Amida induce un incremento sobre la región subG1, en las líneas celulares Hela y ViBo, pero en las células HeLa hay una disminución en las fases G1 y S del ciclo. Sin embargo, la línea celular CaSki parece no ser afectada. A excepción de las células HeLa, el compuesto no afecta el ciclo celular, ya que la región subG1, solo nos dice que el contenido de ADN en las células es menor a $2n$, es decir que el material genético está fragmentándose por alguna razón.

Con el propósito de establecer si esta fragmentación provocada por el tratamiento con la Amida era producto de una muerte apoptótica, los cultivos de las tres líneas de cáncer cervicouterino tratados con las respectivas IC_{50} se evaluaron morfológicamente. La identificación de cuerpos apoptóticos así como la condensación de la cromatina, fue determinada marcando los núcleos con el fluorocromo DAPI, para luego ser observados en un microscopio de epifluorescencia (Fig.16).

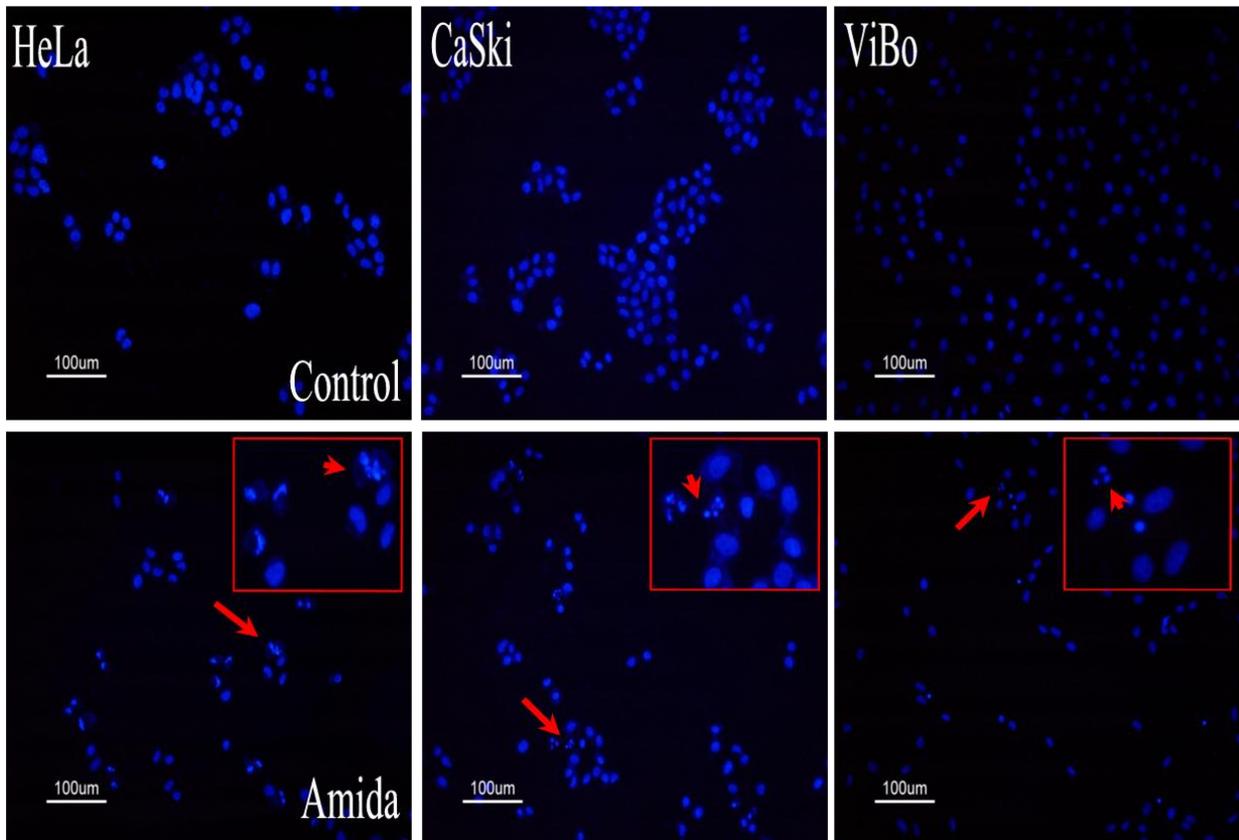


Fig. 16 Micrografías que muestran los núcleos de las células de los cultivos marcados con DAPI en color azul. Los recuadros muestran un aumento de 600X, las flechas señalan los cuerpos apoptóticos. Se muestran los cultivos controles para las líneas HeLa, CaSki y ViBo, y los cultivos tratados con la Amida.

Las fotografías de los cultivos marcados con DAPI muestran un cambio en la forma de los núcleos de las células tratadas, se distinguen claramente los cuerpos apoptóticos, esto es un indicio de que la Amida induce apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, por lo que se realizó una prueba inmunocitoquímica para detectar la expresión de la caspasa-3 activa, caspasa

ejecutora que se activa al final de la apoptosis; incluyéndose un cultivo control, cultivo-vehículo y tratado para cada línea.

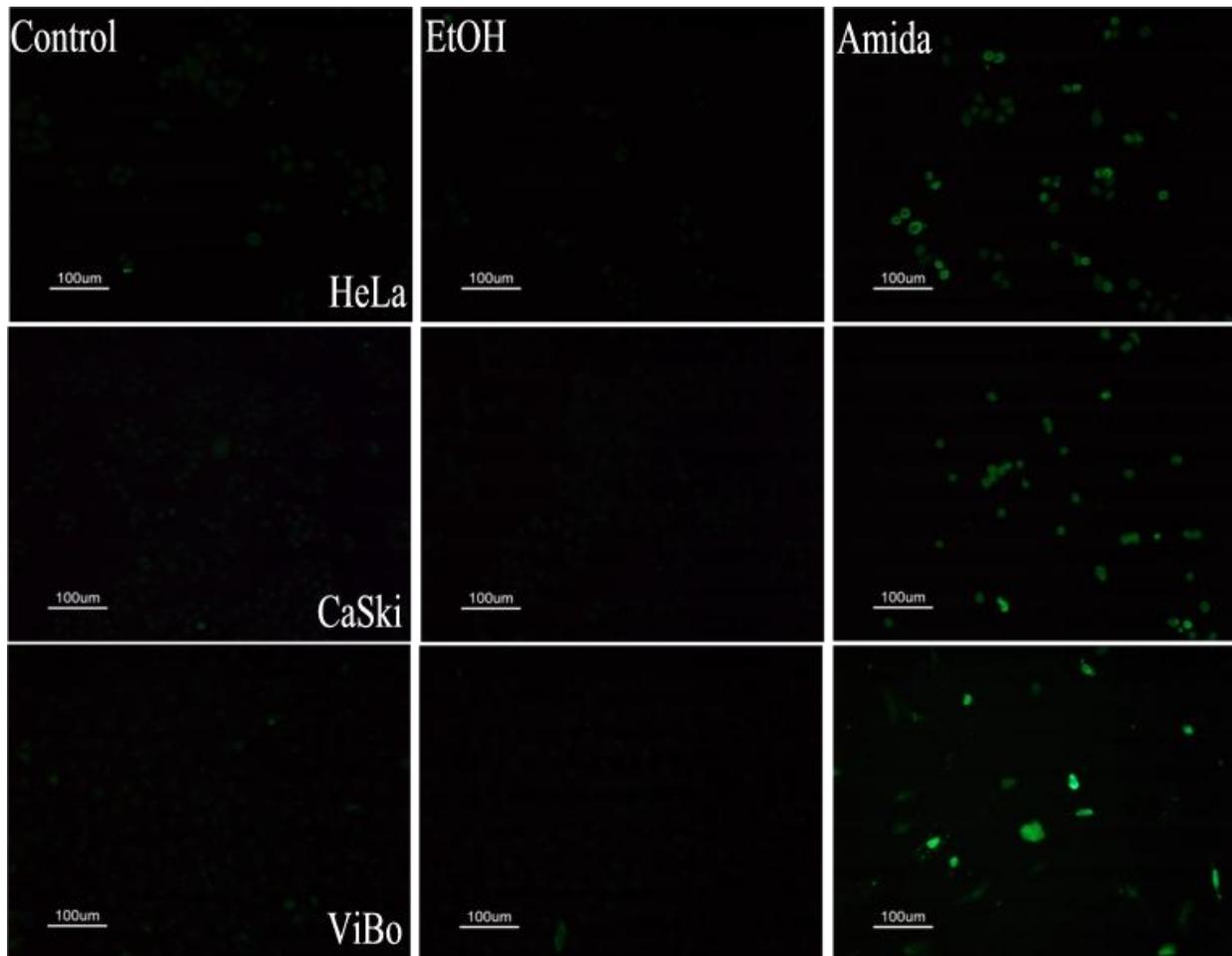


Fig. 17 Inmunodetección de caspasa 3 activa en cultivos celulares. Las células tratadas con la Amida muestran una marca positiva a la inmunodetección de la proteasa, indicando células apoptóticas.

Se puede observar en la figura 17 que las células de los cultivos control y vehículo, presentan alguna célula positiva a la técnica, mientras que las células tratadas con la Amida Diazabicclicá tienen una elevada cantidad de células positivas a la caspasa 3 activa, indicando una muerte apoptótica. Sin embargo, para confirmar este tipo de muerte en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, se desarrolló la técnica de TUNEL, la cual permite identificar los

extremos 3'OH del ADN fragmentado por medio de ADNasas específicas de la apoptosis. Células de las líneas HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con la IC₅₀ de la Amida por 24 h.

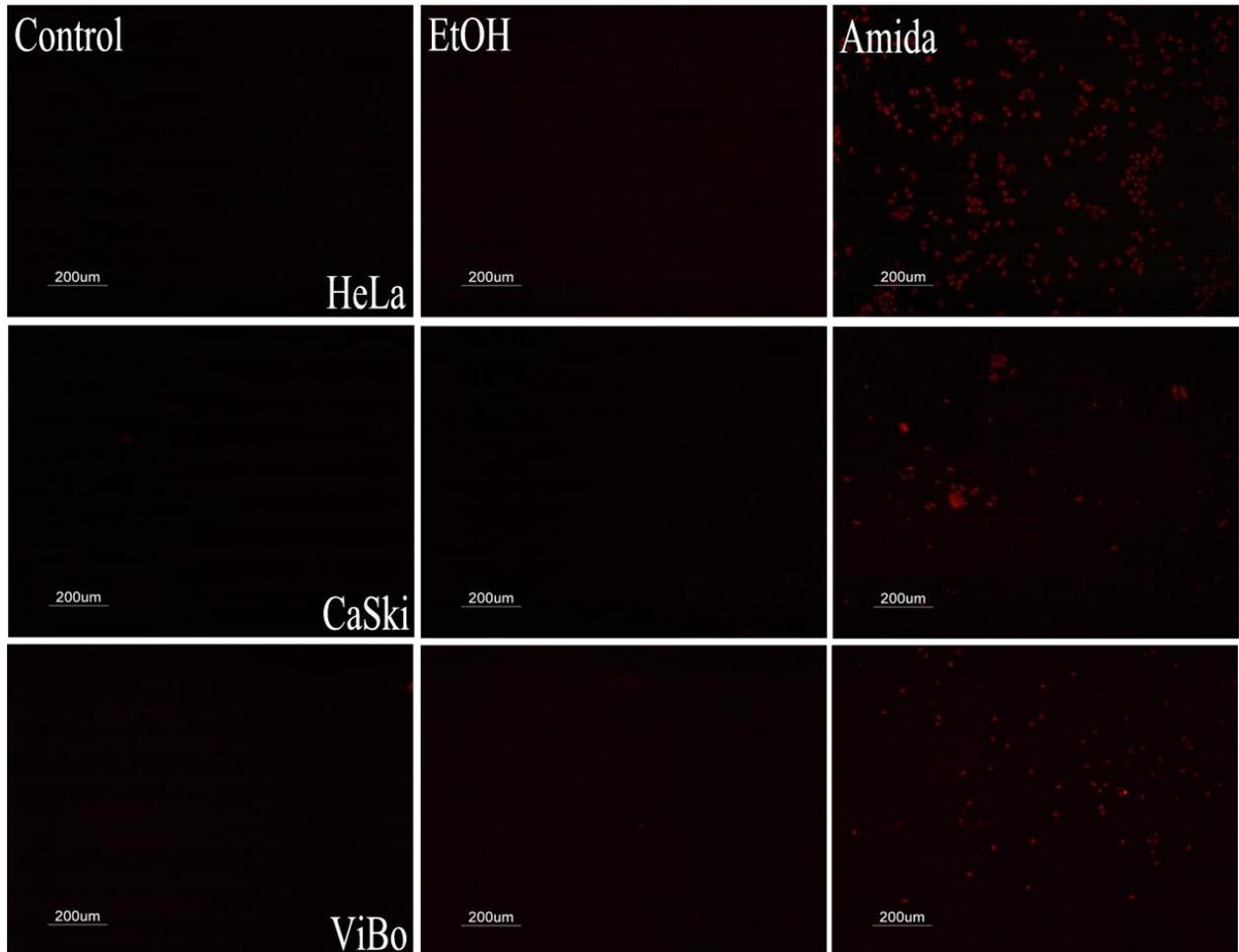


Fig. 18 Técnica de TUNEL en células en cultivo, la fluorescencia roja indica a las células positivas. Las células positivas a la técnica, muestran la fragmentación inducida por la Amida en los cultivos mientras que en los cultivos controles no está presente.

La figura 18 muestra que la fluorescencia observada en los cultivos control y vehículo es nula al ser comparados con los cultivos tratados con la Amida, indicándonos que en efecto se está llevando a cabo una fragmentación ordenada del ADN, característica importante dentro de la muerte apoptótica.

Se sabe que las células normales son afectadas por los tratamientos contra el cáncer, es por esto que se evaluó la acción selectiva de la Amida Diazabicclicá, mediante la determinación del efecto sobre la proliferación en cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana, tratados con el compuesto; la proliferación de los linfocitos fue analizada por la técnica de Incorporación de Carboxifluoresceina (CSFE).

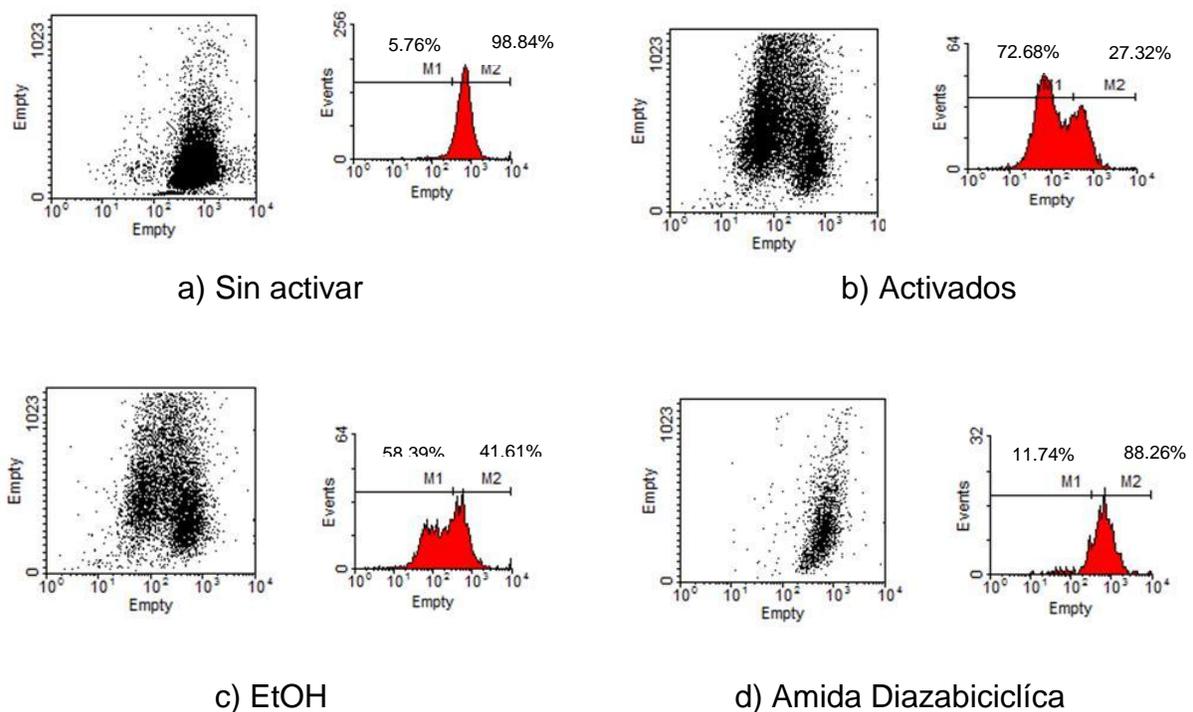


Fig. 19 Efecto de la Amida Diazabicclicá en la proliferación de linfocitos humanos. M1: Región de células en proliferación. M2: Región de células no proliferantes. Los diagramas representan: a) Linfocitos sin activar; b) Linfocitos activados; c) EtOH 10µl/ml; d) Amida Diazabicclicá (6.7 µg/ml).

Los resultados muestran que los cultivos de células linfocíticas tratadas con etanol no afecta su potencial proliferativo, sin embargo los cultivos tratados con la IC₅₀ de 6.7 µg/ml de la Amida inhibe considerablemente la proliferación de éstas células en un 88.26% (Fig.19).

Para comprobar si el efecto antiproliferativo inducido por la Amida sobre células linfocíticas, no era citotóxico, se realizó un ensayo de LDH.

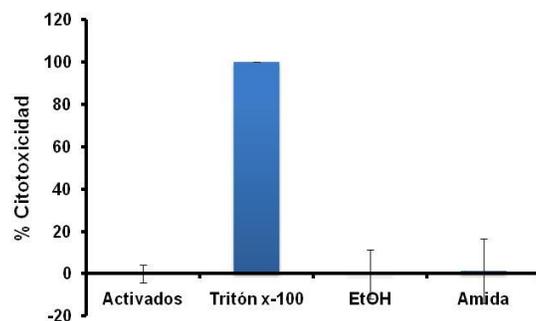


Fig. 20 Liberación de LDH expresada en porcentaje de citotoxicidad en cultivos de células linfocíticas humanas tratadas con la Amida Diazabicclicá. Las gráficas representan el promedio de tres eventos independientes para los cultivos celulares (* $p < 0.05$ vs EtOH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados indican que la Amida no ejerce un daño citotóxico sobre los linfocitos humanos, sugiriendo que el efecto antiproliferativo inducido por la Amida en éstas células no está dado por citotoxicidad (Fig. 20).

DISCUSIÓN

La búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa, inductora de apoptosis y de acción selectiva, es actualmente el objetivo de un gran número de investigadores. Pese a la extensa cantidad de compuestos descritos con actividad antitumoral (Bocca *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010), son pocos los trabajos que describen de manera adecuada si el compuesto presenta acción selectiva. Al respecto, se ha reportado que los capsaicinoides presentan actividad antitumoral y sin duda la Capsaicina es el capsaicinoide más estudiado, sin embargo, su acción pungente así como su actividad citotóxica han generado la necesidad de sintetizar nuevos análogos o derivados. En base a esto, se generó la Amida Diazabicclicá, la cual presenta el anillo (1S, 4S)-2,5-diazabicciclo [2.2.1] heptano, que la hace diferente a la Capsaicina y a su análogo el Fenilacetilrinvánil (FAR). Los resultados establecen que la Amida presenta una acción antiproliferativa dependiendo de la dosis en células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, cuyas IC_{50} son de 6.2, 5.9 y 6.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente; mientras que las reportadas para esas mismas líneas celulares tratadas con Capsaicina son de 100; 55 y 77.8 $\mu\text{g/ml}$ así como de 56.57, 121.83 y 74.19 $\mu\text{g/ml}$ tratadas con FAR (Quisehuatl, 2009), indicando que el cambio estructural presente en la Amida Diazabicclicá generó que este compuesto sea de 9 a 16 veces más potente que Capsaicina y 9 a 21 veces más potente para FAR en células de cáncer cervicouterino. También se ha demostrado que la Capsaicina tiene un efecto antiproliferativo en otras líneas celulares cancerígenas, por ejemplo: melanocitos de la línea B16-F10 (Jun, 2007), hepatocarcinoma SK-Hep1 (Young-Jung, 2001), glioblastoma humano A172 (Lee, 2000), sin embargo, con respecto a la Amida en las células de cáncer cervicouterino, la dosis requerida del compuesto para inducir el mismo efecto es diez veces menor.

En el presente trabajo las células tratadas con la Amida, muestran cambios en su morfología como es la pérdida de la forma poliédrica, la pérdida de adherencia, el contacto con las células vecinas, indicando una posible despolimerización de los componentes citoplasmáticos.

Con respecto al efecto de la Capsaicina sobre el ciclo celular, se conoce que en células de cáncer de mama (Thoennissen *et al.*, 2010), carcinoma de esófago (Wu *et al.*, 2006) y cáncer de vejiga de la línea RT4 (Li *et al.*, 2010) induce una detención del ciclo en la fase G1, mediante la supresión del complejo CDK2-ciclina E, enzimas del punto de control que permiten que las células pasen de la fase G1 a S (Tsou *et al.*, 2006). El 12-Fenilacetilrinvánil detiene a la línea celular HeLa en las fases G1 y G2/M del ciclo (Quisehuatl, 2009). Sin embargo, la Amida

Diazabicclicá no afecta el ciclo celular para las líneas CaSki y ViBo, mientras que las células de la línea HeLa progresaron hacia las fases G1 y S indicando que su acción es dependiente o independiente del ciclo, de acuerdo a la línea celular. Por otro lado, se sabe que cuando las células presentan algún daño en el ADN, son capaces de detener su ciclo, con la intención de repararlo (Alberts *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando este daño no puede ser reparado, la célula activa un mecanismo de muerte programada (apoptosis), que lleva a la célula a morir sin afectar al organismo y es sustituida por una nueva. En el caso de la Amida, se observa un aumento significativo de la región subG1 en las líneas HeLa y ViBo, sugiriendo que induce a las células tumorales a morir, sin embargo, este incremento en la región subG1 sólo indica que existen núcleos fragmentados, implicando que las células presentan algún tipo de muerte.

Una de las principales características morfológicas del proceso de muerte celular tipo apoptótico es la condensación de la cromatina (Young-Jung, 2000). El análisis morfológico de los cultivos celulares estimulados con la Amida indica una alta compactación de la cromatina y en algunos casos la formación de cuerpos apoptóticos, evidenciando una muerte apoptótica (Lee, 2000). Los análisis inmunocitoquímicos de la apoptosis indican la expresión de la caspasa-3 en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el compuesto, así como la presencia de ADN fragmentado evidenciado por la técnica de TUNEL; apoyan la idea de que la Amida induce una muerte apoptótica en las células tumorales, coincidiendo con lo reportado para la Capsaicina en células neuronales (Wei-Jin, 2005).

Al igual que la Capsaicina, que se le ha descrito con actividad citotóxica y genotóxica en líneas celulares de neuroblastoma humano (Richeux, 1999), la Amida Diazabicclicá presenta actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer cervicouterino, indicando que la Amida mantiene esta actividad. Además de que el compuesto induce a las células a una muerte apoptótica, también provoca cierto grado de necrosis, sugiriendo que la actividad inductora de apoptosis se lleva a cabo paralelamente con el proceso necrótico en las condiciones de cultivo previamente establecidas.

A pesar de las numerosas investigaciones sobre el efecto antitumoral inducido por compuestos orgánicos, éstas dejan a un lado la selectividad. Al respecto, los resultados demuestran que la concentración más alta de la Amida utilizada reduce la proliferación de los linfocitos humanos de sangre periférica en un 88.26%, pero este efecto está dado por un mecanismo no citotóxico, a diferencia de la Capsaicina, la cual presenta una acción citotóxica en células epiteliales de riñón de mono (Creppy, 2000), además de suprimir los

neuropéptidos en las fibras c de las neuronas, afectando directamente a la respuesta inmune (Nilsson, 1988), sugiriendo que la Amida Diazabicclicla presenta una acción selectiva.

A partir de los resultados y la discusión presentada, las perspectivas del trabajo se orientan hacia dos direcciones:

Por un lado, dada la selectividad que presenta la Amida Diazabicclicla, sería conveniente realizar trabajos con modelos *in vivo* en el corto plazo y de ser alentadores los resultados, podría evaluarse a largo plazo su aplicación terapéutica contra el cáncer. Por otro lado, los resultados demuestran que el compuesto tiene efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, por lo que sería conveniente probar la Amida en otro tipo de células tumorales con la intención de establecer si el compuesto presenta acción específica de un tipo tumoral o su acción es generalizada.

CONCLUSIONES

- La concentración de la Amida a la cual se disminuye la densidad celular en un 50% para las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo es de 6.2, 5.9 y 6.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
- El efecto de la Amida es dependiente del ciclo celular para la línea HeLa e independiente para las células CaSki y ViBo.
- La Amida Diazabicclicá induce muerte por apoptosis en las células de cáncer cervicouterino.
- La Amida induce muerte por necrosis en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo en un 24, 46 y 16 % respectivamente.
- El compuesto a una concentración de 6.7 $\mu\text{g/ml}$ reduce la proliferación de los linfocitos, sin inducir muerte por citotoxicidad.

REFERENCIAS

1. ALBERTS B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Biología molecular de la célula. Editorial Omega, 4ª edición.
2. APPENDINO G. (2005). Hot cuisine as a source of anti-inflammatory drugs. *Phytochem Reviews*, 4:3-10.
3. AVERS C. (1996). Biología Celular, Grupo Editorial Iberoamérica, 2ª edición.
4. BOCCA C, Bozzo F, Bassignana A, Miglietta A. (2010). Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. *Mol Cell Biochem* 350(1-2):59-70.
5. BOSCH F. (1997). Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomed Pharmather*, 51:268-275.
6. CALLEN J. (2000). Biología Celular: de las moléculas a los organismos. Compañía editorial Continental.
7. CURTIS H, Barnes N. (2005). Biología. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana, México DF.
8. DARNELL J. (1990). Biología Celular y Molecular. Ediciones Omega, 2ª edición.
9. DIAZ S. (1995). Genotoxic effects produced by Capsaicin in mouse during subchronic treatment. *Mutation Reserch*, 345:105-109.
10. DUBIN M. (2000). Muerte celular programada y apoptosis. *Medicina*, 60:375-386.
11. GONZALES-SASTRE F. (2003). Patología Molecular. Elsevier, España.
12. GUEREÑA T. (2006). Tratamientos contra el cáncer. Centro de Salud Palacio de Segovia, Madrid.
13. GUPTA S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. (2006). A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immunity & Ageing*, 3:1-8. Consultada Diciembre de 2010. Disponible en: <http://www.immunityageing.com/content/3/1/5/figure/F1>.

14. ICCE. (2007). Intervenciones de enfermería para la prevención del cáncer cervicouterino (CaCu). Boletín de Información científica para el cuidado en enfermería. Secretaria de Salud.
15. JIN L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou (2010). Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br J Cancer*. 104:91-100.
16. JUN S. (2007). Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down regulation of Bcl2. *Food and chemical Toxicology*, 45:708-715.
17. KARP G. (2005). *Biología Celular y Molecular*, Editorial Mc. Graw-Hills, 4ª Edición.
18. KIERSZENBAUM A. (2008). *Histología y Biología celular*. Elsevier, España.
19. KIM J. (1997). Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line SNU-1. *Cancer Letters*, 120:235-241.
20. KIM J. (2010). Capsaicin sensitizes malignant glioma cells to TRAL-mediated apoptosis via DR5 upregulation and surviving downregulation. *Carcinogenesis*, 31(3):367-375.
21. KO F, Diaz M, Smith P, Emerson E, Kim YJ, Krizek TJ, Robson MC. (1998). Toxic effects of capsaicin on keratinocytes and fibroblasts. *J Burn Care Rehabilitation*, 19(5):409-13.
22. KOEPPEN M. (2009). Berne y Levy. *Fisiología*. Elsevier, España.
23. KUENG E. Silber E, Eppenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96 Well-Plates. *Analytical Biochemistry*, 182:16-19.
24. LAZCANO E. (2000). *Cáncer cervicouterino: Diagnostico, prevención y control*. Ed. Panamericana.
25. LEON G. (2004). *Cáncer de cuello uterino, Aspectos Inmunológicos y genéticos de mayor relevancia*. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. *Rev. Cubana Med*, 43:1.
26. LI Q, Wang XH, Yang ZH. (2010). Induction of cell cycle arrest in bladder cancer RT4 cells by capsaicin. *American Society of Microbiology* 90(18):1230-3.

27. LÓPEZ A, Marcela L. (2006). Cáncer cervicouterino y el Virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1: 31-55.
28. MAHECHA L. (2006). Comparación de los tratamientos en radioterapia convencional y conformal para cáncer. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 30 (117): 517-524.
29. MELGAR R, González-Olvera J, Olivares-Romero L, González-López V, Romero-Ponce L, Ramírez-Zárte M, Demare P, Regla I, Juaristi E. (2008). "Synthesis of Novel Derivatives of (1S,4S)-2,5-Diazabicyclo[2.2.1]heptane and Their Evaluation as Potential Ligands in Asymmetric Catalysis." *Eur. J. Org. Chem.*, 4: 655-672.
30. Ministerio de Salud. (2007). Comisión Nacional de Cáncer cervicouterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer cervicouterino. Chile.
31. MONTELL C. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell*; 9:229-231.
32. MORI A. (2006). Capsaicin a component of red peppers inhibits the growth of androgen-independent p-53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res*, 66:6.
33. NILSSON G. (1988). Altered lymphocyte proliferation of immunized rats after neurological manipulation with capsaicin. *Immunopharmacol.*, 10(6):747-51.
34. O.M.S. (2007). Control Integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales.
35. PANIAGUA-GÓMEZ R. (2003). *Biología Celular*. Mc Garw Hill. 2ª Edición.
36. QUISEHUATL E. (2009). Efecto antitumoral de los análogos de la Capsaicina: 12- Fenilacetilrinvanil (12-FAR) y Rinvanil en la línea celular HeLa proveniente de cáncer cérvicouterino. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
37. RICHEUX F. (1999). Citotoxicity and genotoxicity of capsaicin in human neuroblastoma cells SHSY-SY. *Arch Toxicol.*, 73(7):403-9.
38. ROHL A. (2008). Infection VPH. The Nobel Committee for Physiology or Medicine.
39. ROY M, Chakraborty S, Sidding M. (2002). Induction of apoptosis in Tumor cells by natural phenolic compounds. *Asian Pac J. Cancer Prev.*, 3(1) 61-67.

40. SAHAI E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. Current Opinion in genetics and development. Elsevier.
41. SALAZAR L. (2004). Efectos farmacológicos de la Capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta*, 7-14.
42. SAMEJIMA K, William E. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nature Reviews cell biology*. 667-688.
43. SANCHEZ-TORRES L. (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc Pecu Méx*, 41(1): 49-62.
44. SURH Y. (1995). Capsaicin in Hot chilli pepper: Carcinogen, Co-carcinogen or anticarcinogen. *Food and Chemical Toxicology*. 34(3): 313-316.
45. SZALLAS A. (1999). Vanilloid (Capsacin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol, Rev*, 51:159-212.
46. THOENNISSSEN NH, O'Kelly J, Lu D, Iwanski GB, La DT, Abbassi S, Leiter A, Karlan B, Mehta R, Koeffler HP.(2010). Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*, 29(2):285-296.
47. TSOU MF, Lu HF, Chen SC, Wu LT, Chen YS, Kuo HM, Lin SS, Chung JG. (2006). Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and caspase-3 in capsaicin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Research*, 26(3A):1965-71.
48. TUOYA. (2006). Apoptosis induction by Dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin in MCF-7 cells. *Life Sciences*, 78:1515-1519.
49. TURNPENNY P. (2009). Emery. *Elementos de Genética médica*. Elsevier, España.
50. VALDESPINO V. (2005). Vacunas preventivas y ensayos clínicos de inmunoterapia contra el Cáncer cervicouterino. *Cirugía y cirujanos*, 73(1):57-69.
51. WEI-JIN H, Hiroyuki I, Masako F, Tomoichiro Y, Kazuo M, Kay N. (2006). Involvement of caspase cascade in capsaicin-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 1056:139-144.
52. WU C, Lin JP, Yang JS, Chou ST, Chen SC, Lin YT, Lin HL, Chun JG. (2006) Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation

of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutat. Res*, 601(1-2):71-82.

53. YOUNG-JUNG. (2001). Capsaicin induced apoptosis in Sk-Hep-1 Hepatocarcinoma cells involves Bcl-2, down regulation and caspase 3 activation. *Cancer Letters*, 165:139-145.
54. ZUÑIGA I, Caro L. (2009). Perfil epidemiológico del cáncer cervicouterino en México. *Rev Enfer Infec Pediatr*, XXIII (90):36-37.

APÉNDICE

RPMI 1640

Componente	mg/l
L-Arginina (base libre)	200
L-Asparagina	50
Ácido L-Aspártico	20
L-Cistina	50
Ácido L-Glutámico	20
L-Glutamina	300
Glicina	10
L-Histidina (base libre)	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-Lisina HCl	40
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	20
L-Serina	30
L-Treonina	20
L-Triptófano	5
L-Tirosina	20
L-Valina	20
Biotina	0.2
D-Ca pantotenato	0.25
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
I-Inositol	35
Nicotinamida	1
Riboflavina	0.2
Tiamina HCl	1
Vitamina B12	0.005
Piridoxina HCl	1

Ácido P-Aminobenzoico	1
KCl	400
MgSO4 7 H2O	100
NaCl	6000
NaHCO3	2200
Na2HPO4 7 H2O	1512
CaNO3 4 H2O	100
D-Glucosa	2000
Glutation reducido	1
CO ₂ fase de gas	5%

VERSENO

EDTA (Sigma Chem. USA)	0.4 g
NaCl (Sigma Chem. USA)	8 g
KCl (Sigma Chem. USA)	0.4 g
Tris (Sigma Chem. USA)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 minutos.

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)

Mg Cl ₂ (Sigma Chem. USA)	0.1 g
Ca Cl ₂ (Sigma Chem. USA)	0.1 g
Na Cl (Sigma Chem. USA)	8 g
K Cl (Sigma Chem. USA)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma Chem. USA)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma Chem. USA)	0.2 g

El MgCl₂ y CaCl₂ se disuelve en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1N y se afora a 1000 ml. Se esteriliza usando filtro (Millipore) de poro de 0.22 µm y se almacena a 4° C.

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, Se almacene a 4° C.

Solución cristal violeta (0.1%)

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

NaOH (Sigma Chem. USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma Chem. USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma Chem. USA)	1 g

Solución de ácido acético (10%)

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

Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% de PBS (preparado al momento, para disolverlo se calienta la solución a temperatura no mayor a 60°C, sí rebasa esta temperatura el paraformaldehído polimeriza y la solución no sirve para fijar.

Desactivación del suero fetal bovino (SFB) y de neonato de ternera (NCS)

El SFB es descongelado a temperatura ambiente, posteriormente es puesto a baño de agua a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico en condiciones estériles.