



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**“Estudio antiproliferativo e inductor de apoptosis del
capsaicinoide rinvanil en líneas celulares
provenientes de cáncer cervicouterino”.**

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:

JESÚS JAVIER ALVARADO SANSININEA

DIRECTOR DE TESIS

BIÓL. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2011



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.

La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar.

Eduardo Galeano

En cuestiones de ciencia, la autoridad de mil no vale lo que el humilde razonamiento de un sólo individuo.

Galileo Galilei

DEDICATORIAS

A mi madre, Agustina, por enseñarme que todo conocimiento es vano sin fe y por ayudarme desde que era niño hasta el día de hoy. Gracias mamá.

A mi padre, Javier, por ser mi ejemplo, por enseñarme a trabajar y por qué sobre todo siempre cuento contigo. Gracias papá.

A mis hermanas Nora y Dolores, por estar ahí, por soportarme y por ayudarme cuando necesito ayuda. Gracias.

Al resto de mi familia, porque de alguna manera, me han influenciado y ayudado a mi desarrollo. A mis abuelos, a mis tíos, a mis primos; especialmente, mi tía Alma y mis tíos Marcelino y Adán.

A Alexis, por siempre estar a mi lado, ser mi más grande cómplice y sobre todo lo más lindo que me ha pasado. Te amo.

A toda la pandilla, porque también ustedes han intervenido en mi desarrollo profesional, pero sobre todo en el personal y en que siempre están ahí para platicar o cotorrear. Gracias Ricardo, Raúl, Luis, Alma, Gisela, Berenice y demás banda especialmente la del primer semestre de la facultad.

AGRADECIMIENTOS

Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vásquez, por compartir sus conocimientos y brindarme parte de su tiempo para poder realizar esta tesis.

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

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su atento asesoramiento que contribuyó en la culminación de este trabajo.

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

Al Dr. Benny Weiss, a la M. en C. Juana María de la Paz y a la Biol. Irene Castillo, por sus observaciones en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Gisela, Berenice, Betzabe, Casandra, Moisés, Maricarmen, Verónica y Axel por su ayuda y compañía.

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

La tesis fue realizada con apoyo del proyecto PAPIME N° PE204609 y del proyecto CONACYT 84380.

ÍNDICE

RESUMEN.....	-1-
INTRODUCCIÓN.....	-2-
MARCO TEÓRICO.....	-3-
Cáncer.....	-3-
Cáncer y Ciclo celular.....	-4-
Muerte celular.....	-9-
Necrosis.....	-9-
Apoptosis.....	-10-
El cáncer cervicouterino (CaCu).....	-12-
Tratamientos.....	-16-
Capsaicina y sus derivados.....	-16-
Rinvanil.....	-20-
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	-21-
JUSTIFICACIÓN.....	-22-
HIPÓTESIS.....	-22-
OBJETIVO GENERAL.....	-23-
OBJETIVOS PARTICULARES.....	-23-
MÉTODO.....	-24-
RESULTADOS.....	-32-
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	-47-
CONCLUSIONES.....	-50-
BIBLIOGRAFIA.....	-51-
APENDICE.....	-60-

RESUMEN

En México el CaCU (cáncer cervicouterino) es una de las principales causas de muerte en mujeres, ocupando el segundo lugar. Los tratamientos actuales para esta enfermedad afectan tanto a células tumorales como normales, además de ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y con efectos secundarios graves. Este hecho genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial antitumoral, que afecten células tumorales y que no presenten actividad sobre células normales. Actualmente se tiene un gran interés en alternativas basadas en compuestos de origen vegetal, tal es el caso de los compuestos capsaicinoides (obtenidos de frutos del género *Capsicum*) a los que se les ha determinado actividad citotóxica que abarca tanto, inducción de muerte celular necrótica como apoptótica; entre éstos, la capsaicina destaca por presentar efectos sobre líneas celulares de cáncer de pulmón, hígado, próstata, glioma además de leucemias, sin embargo, su alta pungencia y bajo rendimiento en el proceso de extracción y purificación, limitan su uso en el estudio de un mayor número de cánceres. La síntesis de nuevos capsaicinoides busca eliminar esta capacidad pungente y potenciar las propiedades citotóxicas de la capsaicina, entre tales compuestos recientemente sintetizados, rinvanil ha mostrado tener nula actividad pungente. Al evaluar el efecto de rinvanil sobre el potencial proliferativo de las células tumorales de CaCU, CaSki, HeLa y ViBo se determinó que rinvanil abate el número celular de cultivos de estas tres líneas celulares en un 50 % a concentraciones de 90.87, 62.24 y 149.13 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Al analizar el ciclo celular en cultivos de estas líneas celulares se encontró que las líneas CaSki y HeLa presentan una disminución en la población que se encuentra en la fase G1 con el correspondiente aumento en la región subG1; ViBo no presentó alteración en la progresión del ciclo celular. Al evaluar si los cultivos de estas líneas tumorales mueren por necrosis se encontró que sólo la línea CaSki presentó un 26 % de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de estos cultivos; las líneas celulares, HeLa y ViBo no mostraron diferencia significativa con respecto a sus controles. Al evaluar muerte celular por apoptosis, las tres líneas celulares fueron positivas a actividad de la enzima caspasa 3 en un 160%, 13% y 45 % para CaSki, HeLa y ViBo respectivamente. Como consecuencia de la activación de caspasa 3 la fragmentación de ADN nuclear es esperada y en efecto se encontró que rinvanil induce fragmentación de ADN en las tres líneas celulares. Al probar el efecto de rinvanil a las concentraciones de 90.87, 62.24 y 149.13 $\mu\text{g/ml}$ sobre cultivos de fibroblastos de cérvix se determinó que las concentraciones más bajas no afectan el potencial proliferativo, sin embargo la concentración de 149.13 $\mu\text{g/ml}$ indujo una disminución de 17 % del número celular. Por otro lado los cultivos de linfocitos de sangre periférica no fueron afectados en su potencial proliferativo ni fueron inducidos a una muerte celular necrótica.

Los resultados indican una fuerte actividad citotóxica selectiva de rinvanil sobre las líneas celulares tumorales de CaCU.

INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial, el CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer (WHO, 2008), sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se le puede detectar y tratar oportunamente, reduciendo el impacto de esta enfermedad. Aunado a estas medidas de diagnóstico temprano, se cuenta con vacunas que prometen disminuir este cáncer, especialmente en países en vías de desarrollo, donde no hay una cultura de prevención muy desarrollada. Es en países subdesarrollados, como es el caso de México, donde aún se encuentran un elevado número de casos de CaCU, en etapas avanzadas, y que sólo pueden ser tratados por cirugía, radioterapia o quimioterapia. Estos tratamientos son muy agresivos y por lo tanto degradan la calidad de vida del paciente, ya que no discriminan entre células normales y células cancerosas, llevando a una pérdida en la homeostasis del organismo, puesto que se pierden células normales al igual que tumorales. Es por ello que la búsqueda de nuevos compuestos con una selectividad hacia este tipo de células malignas es fundamental para buscar soluciones que no interfieran con la calidad de vida del paciente. Una de las alternativas para encontrar compuestos con estas características son las plantas, y es la que mejores resultados está arrojando. Dentro de ésta se está explorando la actividad de la capsaicina que es el compuesto que le da el efecto picante a los frutos del género *Capsicum*. La capsaicina ha presentado efecto citotóxico en diversas líneas tumorales humanas derivadas de epitelio branquial (BEAS-2B), adenocarcinoma de epitelio alveolar (A549), hepatoma (HepG2) (Reilly *et al*, 2003) y en células de glioma (C6) (Qiao *et al*, 2005). Además induce apoptosis en células de leucemia (HTLV-1) (Zhang *et al*, 2003) y de próstata (PC3) (Sanchez *et al*, 2007) entre otras, sin embargo, debido a sus propiedades irritantes y difícil obtención, se ha optado por sintetizar análogos de la capsaicina que conserven la actividad biológica, pero dejando de lado la alta pungencia y el difícil manejo. Es por ello que el rinvanil, como un análogo de la capsaicina es evaluado en este trabajo en cultivos de células tumorales provenientes de CaCU.

MARCO TEÓRICO.

Cáncer.

Cáncer, del latín *Karikinos* que significa cangrejo, es el término adoptado para definir el desequilibrio de la división y crecimiento celular, caracterizado por la pérdida de la homeostasis entre la proliferación y muerte celular; presenta interacciones complejas que intervienen en la conducta de las células y en su información genética, lo que modifica el correcto funcionamiento de los mecanismos reguladores del ciclo celular, diferenciación y muerte (Hanahan *et al*, 2000), el cáncer es una enfermedad que se puede manifestar en cualquier tejido del organismo.

Los tumores o neoplasias surgen como consecuencia de la acumulación de mutaciones en células de cualquier órgano (Folkman *et al*, 2004), entre los cuales podemos destacar: pulmón, próstata, piel, huesos, glándulas mamarias, CaCU e hígado entre otros (Hanahan *et al*, 2011),

El cáncer es un proceso multifactorial, en el cual intervienen factores biológicos como químicos y físicos, que contribuyen a su desarrollo; dentro de los biológicos se encuentran los agentes infecciosos, como virus y bacterias, en los químicos se pueden mencionar sustancias cancerígenas como el benceno, así como la contaminación en general y dentro de los físicos, se encuentran la radiación ionizante, los rayos UV. Todos estos factores muestran una característica en común, provocan cambios en el genoma, sin embargo, la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen (Hernández *et al*, 1999).

El cáncer es una enfermedad degenerativa y muchas veces invasiva, en algunos casos las células del tumor primario migran hacia otros sitios dentro del sistema donde se están desarrollando, a este proceso se le llama metástasis y es donde se producen tumores secundarios. (Carmeliet, *et al*, 2000). El proceso de desarrollo de un tumor secundario es por una vía linfática o sanguínea, en donde la célula maligna que se desprende del tumor primario y coloniza un órgano donde se ancla, no lo hace de manera aleatoria, sino que depende de la naturaleza del tejido invadido. La metástasis se facilita si las células tumorales producen factores de crecimiento y de angiogénesis, (Ahmed *et al*, 2009) que es la inducción del crecimiento de vasos sanguíneos que provean de nutrientes al tumor (Folkman, 2006). La malignidad o benignidad del tumor radica en que los tumores clasificados como benignos se limitan o encapsulan, (Aguirre *et al*, 2007) y no invaden ni producen metástasis. La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos, pero algunos por el linaje celular de su origen no lo hacen, por ejemplo en la sangre que dan origen a las leucemias. Esta transformación celular se desarrolla por la interacción de factores ambientales, así como inmunológicos y genéticos específicos de cada individuo (Kroemer

et al, 2008), por lo que las anomalías genéticas pueden variar entre los distintos tipos de cáncer (Lodish *et al*, 2005); algunos pueden ser una mutación puntual, translocación, amplificación, delección, ganancia y/o pérdida de un cromosoma.

Los cambios específicos en el ADN, o mutaciones, pueden ser heredados o adquiridos (Hidalgo *et al*, 2001), dependiendo del caso muchas veces afectan genes específicos del control sobre la vida y la muerte de la célula. Dependiendo de la función de sus proteínas producto y de la naturaleza de las alteraciones genéticas sufridas, los genes implicados en el desarrollo del cáncer pueden agruparse en dos grupos fundamentales: oncogenes y genes supresores de tumores (Weinberg, 1989). Puesto que los productos codificados por protooncogenes ejercen efectos de control positivo sobre la proliferación celular, éstos promueven el crecimiento y división celular y codifican factores de transcripción que estimulan otros genes que regulan el ciclo celular, por ejemplo ras y las ciclinas. Los productos de genes supresores de tumores ejercen un papel regulador negativo sobre los procesos de proliferación celular, como el gen Rb (Adams *et al*, 2007).

El cáncer se pueden clasificar a partir del tejido y el tipo de célula del cual se originan (Boticario, 2005).

Leucemias y linfomas: Son el cáncer de los tejidos formadores de las células sanguíneas, producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

Sarcomas: Se encuentran en tejido conectivo, como huesos, cartílago, nervios, vasos sanguíneos, músculo y tejido adiposo.

Carcinoma: Se encuentran en tejido epitelial, como la piel, o en los epitelios que revisten cavidades y órganos.

Cáncer y ciclo celular

El ciclo de división celular es el mecanismo a través del cual todos los seres vivos se propagan y también es necesario en el cuerpo para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada. (Darzynkiewicz, 2002). Para que un nuevo proceso de división se lleve a cabo es necesario que la célula coordine un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares, los cuales logran dividir exactamente el material genético. Este conjunto de pasos para la división celular es llamado ciclo celular, el cual está dividido en dos estadios: mitosis e interfase, el cual puede durar dependiendo de la estirpe celular. La duración del ciclo celular presenta variaciones de un tipo de célula a otra y entre las especies. Existen varios tipos de células en el organismo, algunas con alta especialización estructural, como las células nerviosas, las células musculares y los eritrocitos que maduran y pierden su capacidad de división, mientras que otras que normalmente no se dividen, pero que pueden iniciar un ciclo de división celular

como respuesta a un estímulo apropiado; por ejemplo, los hepatocitos y linfocitos, y algunas otras, con un alto nivel de división celular, tales como las células epiteliales (Moeller, 2006).

Interfase:

Durante la Interfase se reconocen tres fases que sirven de preparación para que la célula pueda entrar a un proceso de división celular.

Fase G1.

El inicio de un nuevo ciclo, es llamado la fase G1, en el cual la célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número en consecuencia la célula aumenta de tamaño. Algunas estructuras son sintetizadas por la célula, entre éstas se encuentran microtubulos, microfilamentos de actina y los ribosomas, los cuales están compuestos por subunidades proteicas. Las estructuras membranosas como el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas se derivan del retículo endoplásmico, el cual se renueva y aumenta en tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos. También hay replicación de mitocondrias previamente existentes (Moeller, 2006).

Fase S: síntesis.

La replicación del ADN comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado y se tiene el ATP necesario. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis debe generarse dos juegos o complementos de ADN idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. Durante la interfase el ADN asociado a las histonas constituye la cromatina, que se encuentra desenrollada en largas y delicadas hebras. El ADN es una doble hélice que durante la replicación se abre y cada cadena es utilizada como molde para la producción de una nueva doble cadena, que queda unida a la original y que sirve como guía. Por esta razón, la replicación del ADN se denomina semiconservativa. Estas dos dobles cadenas de ADN quedan unidas por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de cromátidas hermanas. El proceso clave de la replicación del ADN ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, momento en el cual las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras de las proteínas asociadas al ADN son sintetizadas (ADN polimerasas, ligasas, topoisomerasas entre otras) (Alberts *et al.*, 2006).

Fase G2.

Durante la fase G2 ocurre la preparación para la mitosis en la cual se producirá repartición equitativa del material genético; todos los organelos y la maquinaria necesaria esencial para la división de la célula, en dos células hijas idénticas en contenido, aunque de menor tamaño, se adquieren en esta etapa. La cromatina recién duplicada, que está dispersa en el

núcleo en forma de cordones filamentosos, comienza a enrollarse lentamente y a condensarse en una forma compacta llamada cromosoma; además, la célula realiza una supervisión completa del ADN duplicado anteriormente. Durante este periodo la célula empieza a ensamblar las estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto completo y equitativo de cromosomas a cada célula hija lo cual se desarrollará durante la mitosis.

Fase M: Mitosis.

Durante la mitosis (M) la cromatina se condensa para formar cromosomas, la membrana nuclear se rompe, el citoesqueleto se organiza para formar el huso mitótico y los cromosomas se mueven a los polos opuestos. La segregación cromosómica es seguida usualmente por la división celular (Wayne *et al*, 2006).

Muchos de los detalles de la mitosis varían de unos organismos a otros, sin embargo, la mitosis está dividida convencionalmente en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales tienen como función realizar los movimientos necesarios para repartir equitativamente el material genético. La ruptura de la envoltura nuclear marca el inicio de la profase. Cada cromosoma está formado por dos cromátidas dispuestas muy juntas longitudinalmente y conectadas por el centrómero. Durante la metafase los pares de cromátidas se mueven dentro del huso y finalmente se disponen en el plano medial de la célula. En anafase las cromátidas hermanas se separan y son conducidas a los polos opuestos del huso, mientras que el alargamiento del huso aumenta la separación entre los polos, cada cromátida se transforma en un cromosoma separado. Al iniciarse la telofase, los cromosomas alcanzan los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse en dímeros de tubulina y finalmente se vuelven a formar envolturas nucleares alrededor de los conjuntos de cromosomas.

Si al término de la fase M existe una ausencia de factores de crecimiento apropiados, esto lleva a las células a una especie de latencia en el ciclo celular, en el cual el sistema de control no avanza a través de G1, ya sea porque es incapaz o porque no lo necesita. Además, si se suprimen los nutrientes a la célula, ésta no podría proseguir con el ciclo, la ausencia de aminoácidos provocaría que la síntesis de proteínas no se lleve a cabo óptimamente, y por tanto, la célula no continuaría con su división. Las células pueden detener su progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial, llamado G0 (G cero), donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar y en ocasiones nunca más dividirse, como por ejemplo las fibras musculares esqueléticas que no se dividen, pero sí renuevan sus organelos (Figura 1) (Alberts *et al.*, 2006).

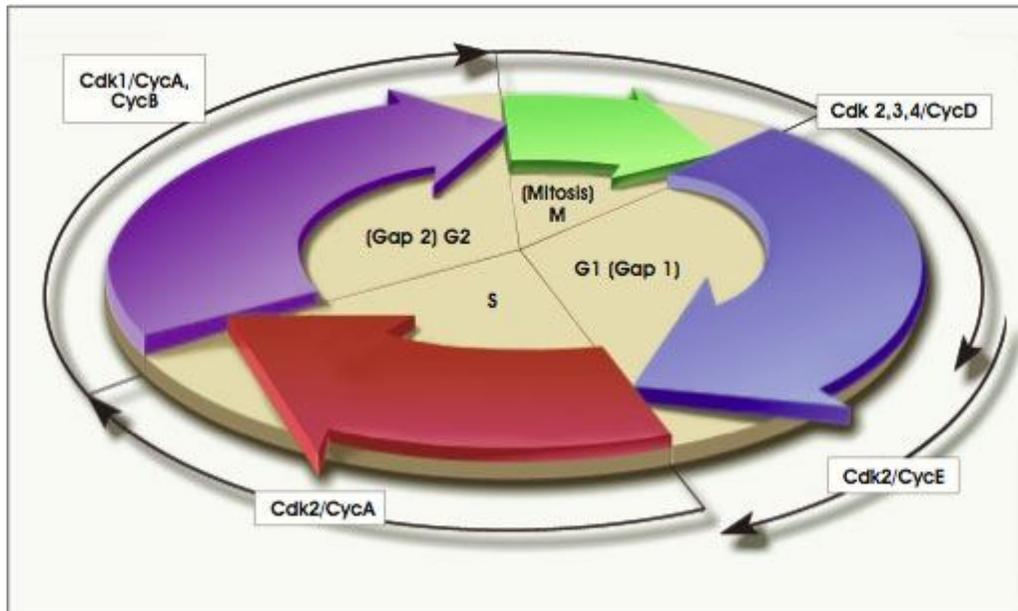


Figura 1. Las cuatro fases del ciclo celular eucariótico. (Imagen tomada de Stem cell information, enero 2011).

Control del Ciclo Celular.

Los procesos básicos tales como la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo celular (Nashmyt, 1996). Éste es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas interactivas y dependientes entre sí que inducen y coordinan los procesos subordinados básicos (aquellos procesos que ocupan una posición inferior en la jerarquía del control del ciclo celular) que duplican y dividen los contenidos de la célula. Durante un ciclo celular típico, el sistema de control está regulado por unos factores de retraso que pueden parar el ciclo en unos puntos de control determinados. En ellos existen señales de retroalimentación que pueden retrasar el propio sistema de control, evitando que se desencadene el proceso siguiente sin que el anterior haya terminado adecuadamente (Fink *et al.*, 2005).

Puntos de control.

Los puntos de verificación actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente; uno de ellos se encuentra en G1, justo antes de entrar en fase S y el otro en G2 antes de la mitosis. En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, estados de las partículas, entre otros elementos necesarios en un ciclo celular típico normal. El sistema de control del ciclo celular está basado en dos familias claves de proteínas: la primera es la familia de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las cuales sufren fosforilación sobre sus aminoácidos (serinas y treoninas) y la segunda familia son las

ciclinas (cdc) (llamadas así debido a que aparecen y desaparecen a lo largo del ciclo), las cuales se unen a las CDK y controlan sus reacciones de fosforilación. El ensamblaje cíclico entre estos dos compuestos, ciclinas y CDK, su activación y desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular (Mesa *et al*, 2003).

Existen dos clases de ciclinas: las ciclinas mitóticas, las cuales se unen a las CDK durante G2, forman el Factor Promotor de la fase M (FPM), el cual induce a la célula a entrar en mitosis; la segunda clase son las ciclinas G1, las cuales se unen a las CDK durante G1 e inducen el paso de G1 a fase S (Lane, 1992) (Figura 2).

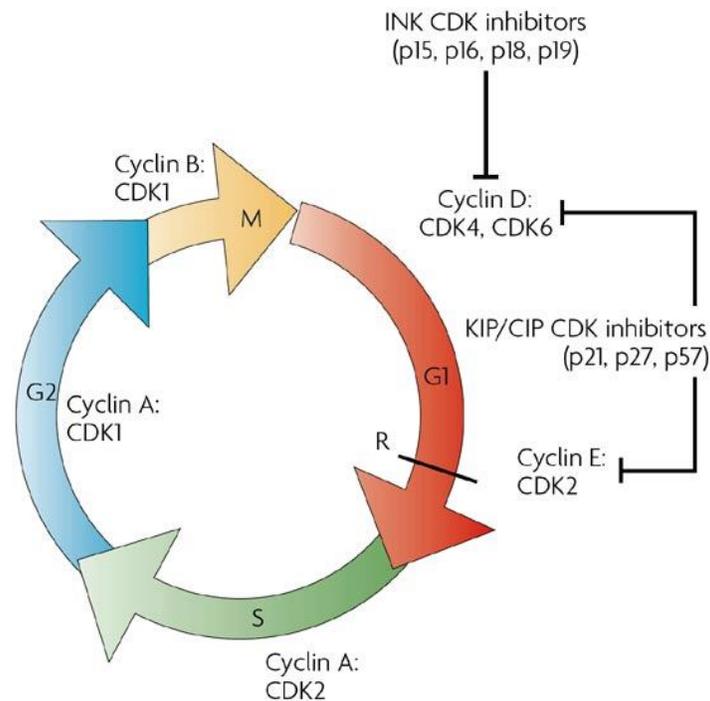


Figura 2. La regulación del ciclo celular se lleva a cabo, por la acción, de factores de crecimiento (tomada de y modificada de www.Nature.com, enero 2011).

Una de las características sobresalientes de las células cancerígenas es la proliferación exacerbada de éstas, pese a las condiciones normales de restricción de la proliferación; esto se debe a la alteración a nivel génico de los reguladores tanto negativos como positivos del ciclo celular. Además, alteraciones en el sistema inductor de muerte que de manera normal eliminaría a células con daños irreparables, hacen que estas células se acumulen y formen tumores malignos.

Muerte Celular.

La muerte celular es un proceso fundamental para mantener la homeostasis de cualquier organismo; en las células de los organismos pluricelulares impera el autosacrificio es decir que, al ser miembros de una comunidad sumamente organizada el número de células está regulado con precisión, de tal manera que, aquellas células que ya no son necesarias, se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte (Alberts *et al*, 2006).

Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo las más importantes necrosis y apoptosis. Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica (Diaz *et al*, 2005).

Necrosis.

La necrosis es definida frecuentemente como un fenómeno pasivo y degenerativo que se da por factores ajenos al control celular, (Baumforth *et al*, 2003) puede ser una consecuencia de un trauma ambiental con temperaturas extremas, isquemia, daño mecánico y generalmente como respuesta a una lesión grave, en algunos casos por una sobredosis de agentes citotóxicos (Fink *et al.*, 2005). Además puede implicar un carácter patológico que se desencadena tras un daño celular extremo que daña irreversiblemente el funcionamiento de las células. La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por un aumento en el volumen celular (oncosis), hinchazón de orgánulos, la rotura de la membrana plasmática y la subsiguiente pérdida o salida del contenido citoplasmático al espacio extracelular induciendo una respuesta inflamatoria que daña a las células vecinas (Karp, 1996).

La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana (Kroemer *et al*, 2009), esto puede ser consecuencia de la depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana ó la pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos; entre ellos hay una sinergia y cualquier alteración de uno produce un efecto en la función de los otros, siendo difícil definir cual ocurre primero.

La necrosis provoca la aparición de los siguientes cambios intracelulares: picnosis (condensación del núcleo), cariolisis (disolución de la cromatina), cromatolisis (disolución de los cromosomas), carriorexis (fragmentación de la cromatina). Estos cambios van apareciendo a lo largo del tiempo y nos permiten diferenciar las células que van a morir (o ya están muertas) de las que todavía están sanas. Al final sufren autolisis, con la liberación de enzimas, y desencadenan así una reacción inflamatoria que atrae leucocitos y proteínas plasmáticas. Finalmente tiene lugar la degradación de las células muertas (Sánchez, 2001).

La etapa de lisis incluye, todos los cambios que dependen de alteraciones en los componentes celulares, proceso que ocurre con un patrón morfológico en cierta medida característico y que consiste en cambios en el núcleo (disolución progresiva de la cromatina o cariólisis); cambios en el citoplasma (pérdida de la basófilia por esparcimiento de las ribonucleoproteínas); aspecto homogéneo del citoplasma (por pérdida de los compartimientos celulares); tumefacción de las mitocondrias y la alteración de las células vecinas. Para la eliminación de los restos celulares la etapa de Fagocitosis elimina restos celulares con ayuda de los macrófagos tisulares. Todos estos cambios condenan a la célula a perder su función específica y solamente forman parte de restos celulares que serán fagocitados por los macrófagos reclutados por el sistema inmune para resolver un problema inflamatorio (Sánchez, 2001).

Apoptosis:

Los procesos bioquímicos y macromoleculares que ocurren durante la muerte por apoptosis (Elmore, 2007), son claramente diferentes de los que acompañan a la muerte por necrosis. Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician este proceso apoptótico consiste en la condensación del citoplasma y la reducción del volumen celular, acompañada de los cambios en la estructura del núcleo, la cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana nuclear (Zhaoyu *et al*, 2005). Esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera análoga, la membrana celular sufre invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula, formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con lisosomas; a estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos (Adams *et al*, 2007).

In vitro los cuerpos apoptóticos terminan por desintegrarse, pero *in vivo*, éstos son rápidamente fagocitados por células vecinas, por lo tanto una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis, es que no se libera material intracelular al medio intersticial. Este tipo de muerte está restringida a células individuales y nunca resulta en la muerte de células vecinas, en las que no se haya activado el programa de muerte (Amaravadi *et al*, 2007).

La formación de los cuerpos apoptóticos previene que el contenido citoplasmático pueda ser liberado al medio intersticial. Antes de que los cuerpos apoptóticos se desintegren, éstos son fagocitados por células vecinas en un proceso en el que participan antígenos de superficie como la fosfatidilserina, que sólo en estas circunstancias se presenta en la lámina externa de la membrana celular de los cuerpos apoptóticos (Fink *et al*, 2005).

La apoptosis puede ocurrir por diferentes vías (Caballero *et al*, 2002), las más ampliamente estudiadas son dos; la vía extrínseca y la vía intrínseca (Fisher, 2001), en la primera se

encuentra implicado un receptor de muerte y la segunda se encuentra mediada por la mitocondria, pero ambas causan una activación de enzimas inductoras y efectoras llamadas caspasas (Baynes *et al*, 2008).

Las caspasas, se clasifican en base al tamaño del dominio. Las caspasas con grandes dominios, como las caspasas-2, 8 y 9 funcionan como iniciadores de señales que se encuentran al principio de cascadas proteolíticas, mientras que las que presentan un dominio pequeño, como las caspasas-3, 6, y 7, se localizan debajo de las caspasas iniciadoras y funcionan como proteasas efectoras que rompen principalmente sustratos proteicos en núcleo y citoesqueleto (Caballero *et al*, 2002).

La activación de los receptores de muerte de TNF tipo 1, el antígeno APO/FAS ó CD40, encienden el programa de muerte (fase de iniciación) y la activación de las caspasas efectoras forma parte del programa de ejecución. Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por ruptura proteolítica mediante dos vías alternativas (Stevens *et al*, 2001).

Vía extrínseca.

La vía extrínseca se lleva a cabo a través de receptores superficiales de muerte, estos receptores pertenecen a la familia de los TNFR, dentro de los cuales se encuentra: CD95, TNFR1, TNFR2; tienen un dominio de muerte citoplasmático implicado en las interacciones proteína proteína. Al receptor activado se le asocia un complejo de proteínas que presentan dominios de muerte (DD), lo que forma un complejo denominado dominio de señalización inductor de muerte DISC (death-induced signalling domain).

El adaptador FADD se une a través de su dominio de muerte al dominio de muerte del receptor activado, FADD contienen un dominio efector de muerte DED que por homología atrae a la procaspasa 8 y que activa, posteriormente caspasa 8 activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Anaya *et al*, 2005).

Vía intrínseca.

La regulación de la apoptosis en esta vía es debida a la familia de Bcl-2, ésta fue descubierta como un protooncogen en el linfoma folicular de células B y es homólogo a ced-9. La vía intrínseca es iniciada por un desbalance entre los diferentes miembros de la familia de proteínas emparentadas con bcl-2, unos con actividad proapoptótica y otros con actividad antiapoptótica. Este desbalance inicia con la salida de citocromo c desde el espacio intermembranoso de la mitocondria al citoplasma, donde se une a proteínas adaptadoras que se agrupan, y de esta manera, activan a las caspasas iniciadoras; como caspasa 9. La activación de caspasa 9 repercute en la activación de las caspasas efectoras 3,6 y 7 (Figura 3) (Anaya *et al*, 2005).

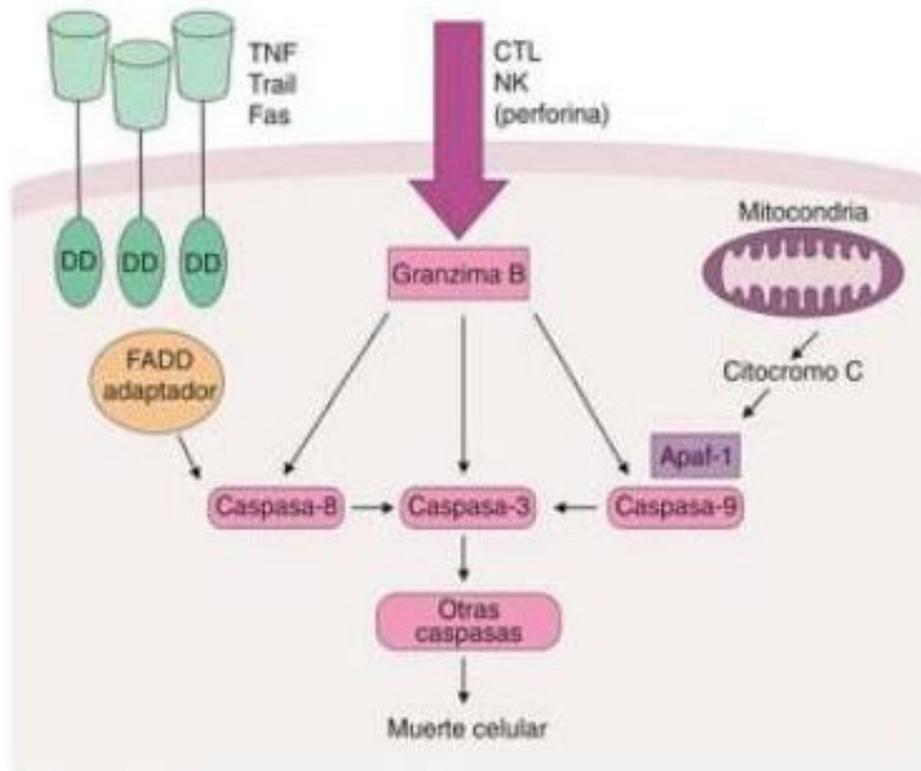


Figura 3. Vías extrínseca e intrínseca de la muerte por apoptosis. (Imagen tomada y modificada de, Anaya *et al*, 2005)

Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCU) es el segundo cáncer más frecuente en mujeres, sólo por detrás del cáncer de mama. Según la Organización Mundial de la Salud en el 2008 causó 530,000 casos de los cuales 270,000 fueron muertes; registrándose 10,186 defunciones en México (WHO, 2008).

La edad es un factor de riesgo para el CaCU (Moore *et al*, 2001), la etapa crítica aumenta en la edad reproductiva, porque es cuando se puede contraer el agente infeccioso más ligado al desarrollo del CaCU, la infección por el virus del papiloma humano (Herdman *et al* 2002). Otros factores de riesgo (Tirado *et al*, 2005), están ligados al comportamiento sexual, al nivel cultural y socioeconómico, como, tener varias parejas sexuales, el uso de anticonceptivos orales, acceso limitado a los servicios de salud, (Alemán *et al*, 2007) y tener infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), o por el virus del papiloma humano (VPH).

Casi todos los casos de CaCU (99,8%) se deben a tipos específicos de un virus de ADN transmitido por vía sexual (Rivera *et al*, 2006), a éste se le denomina virus del papiloma humano VPH (Zur Hausen, 2002). El virus del papiloma VPH, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV). Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles (Lopez *et al*, 2006).

La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2 en menor proporción. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses. El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas de expresión tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Figura 4) (Lopez *et al*, 2006).

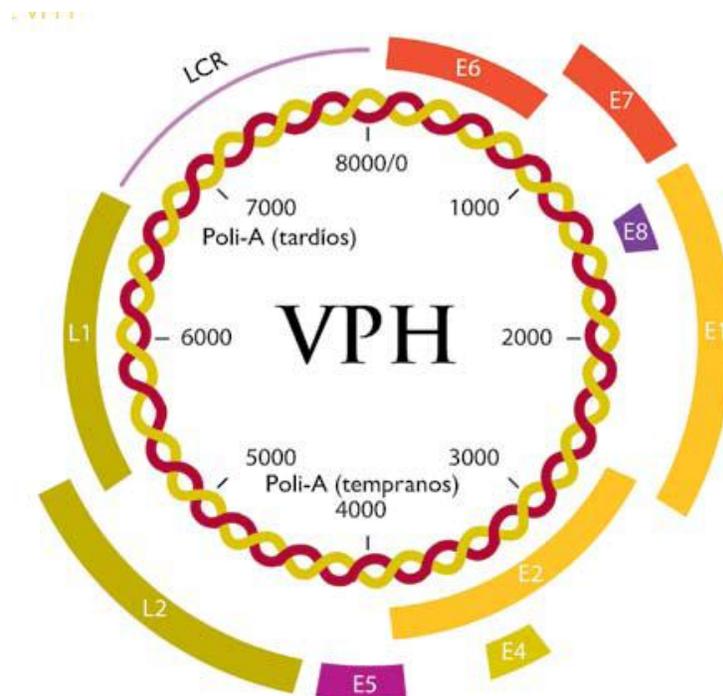


Figura 4. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular de doble cadena, se divide en tres regiones, la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región temprana, que contiene a los genes E1 a E8 y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2, los cuales constituyen la cápside (Tomado y modificado de López A, 2006).

El resultado usual de la infección por VPH es una verruga o papiloma (Bousarghin *et al.* 2003). Los virus genitales, tanto oncogénicos como no oncogénicos, pueden causar neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (NIC 1), las cuales son manifestaciones transitorias de la infección viral producida. Se caracteriza por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio (Lacruz *et al.* 2003). Éste se diferencia y madura, mostrando anomalías menores de la célula.

El cáncer cervicouterino se origina en el tejido que recubre el cuello del útero, en éste, el epitelio presenta dos regiones bien definidas, el exocérvix y el endocérvix (Figura 5). La unión de ambos se denomina zona de unión escamo-columnar y es un área de cambios constantes provocados por estrógenos, llamada zona de transformación.

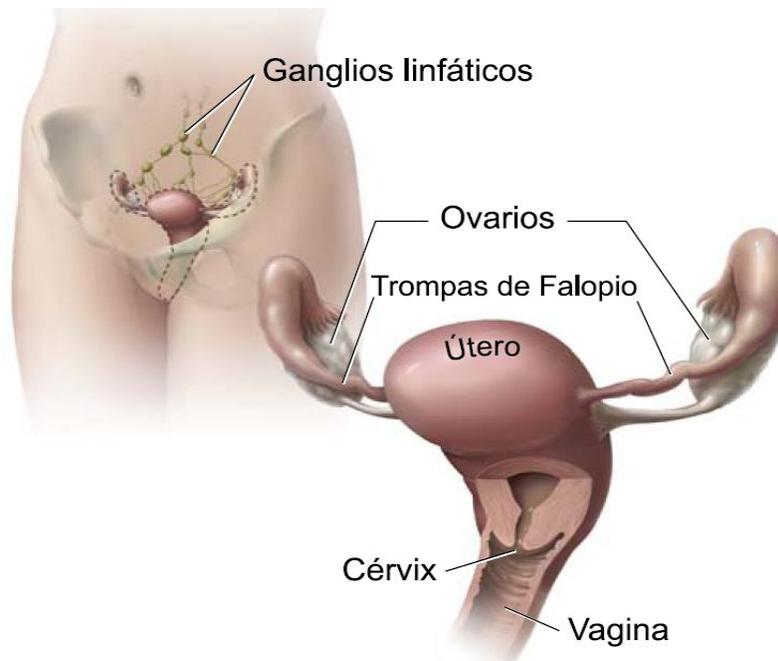


Figura 5. Anatomía del útero, el cérvix o cuello uterino y otras partes del sistema reproductor de la mujer. Así como su localización (Imagen Tomada y modificada de www.cancer.gov, enero 2011).

El epitelio pavimentoso que recubre al exocérvix y la mucosa vaginal, está constituido por tres zonas con el mismo tipo y características morfológicas celulares, estas zonas son la capa profunda o basal, la capa intermedia y la capa superficial (Figura 6) (Lazcano *et al.*, 2000).

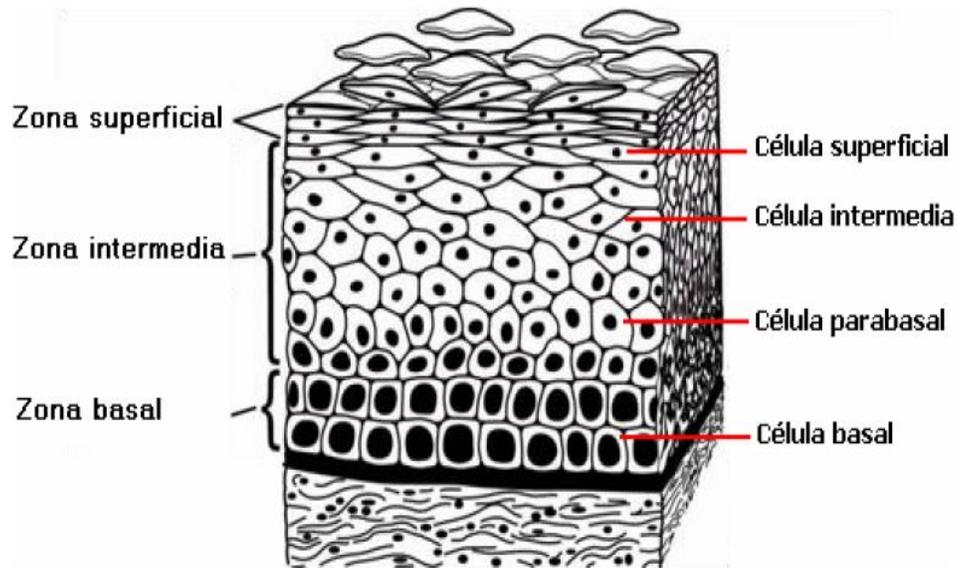


Figura 6. Acomodo de las células cervicales. (Imagen tomada y modificada de: www.merkmedicus.com, enero 2011)

El proceso de cambio de células normales a células precancerosas, toma entre 10 y 20 años, en algunas mujeres las células anormales desaparecen sin tratamiento, sin embargo, la mayoría de las mujeres que presentan células anormales, requieren tratamiento para evitar el desarrollo del cáncer.

Hay dos tipos de cáncer cervical, el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. El cáncer y el precáncer en las primeras etapas no presentan ni signos ni síntomas; cuando se presentan los síntomas es por qué el cáncer ya se encuentra en una etapa avanzada (Garnett *et al*, 2006).

Desarrollo del CaCU.

La clasificación por etapas del cáncer contribuye a comprender la conducta del padecimiento y permite la comprensión del avance de la enfermedad. El CaCU tiene varias etapas de evolución y un diagnóstico para cada una de ellas. (Alonso de Ruiz *et al*, 2000). En los primeros estadios las células anormales se encuentran en la capa superficial del cuello uterino; en etapas consecutivas las células anormales han invadido el cuello uterino, pero aún no se han diseminado a los alrededores, una capa pequeña de células anormales se encuentra en el tejido más profundo del cuello uterino y sólo es visible con microscopio. Si continua avanzando las células anormales se han diseminado a las áreas cercanas del cuello uterino, pero aún dentro del área pélvica. Estas células se encuentran, en la parte superior de la vagina y posteriormente se diseminan alrededor del cuello uterino. En etapas ya muy avanzadas las células anormales se encuentran en toda el área pélvica con posibles diseminaciones a la parte inferior de la vagina (Lazcano *et al*, 2000).

La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) es una lesión precursora del cáncer del cuello uterino, se caracteriza por alteraciones de la maduración y anomalías nucleares y se han subdividido en tres grados según su extensión y gravedad: I, II y III (Arends *et al*, 1998).

Si la displasia está confinada al tercio inferior del epitelio estamos en presencia de una NIC I también conocida como lesión intraepitelial de bajo grado (LEI-BG); si implica los dos tercios inferiores se denomina NIC II y si las anomalías nucleares afectan a más de dos tercios de todo el espesor del epitelio están en presencia de una NIC III. Estas dos últimas denominaciones en conjunto se conocen también como: lesiones intraepiteliales de alto grado (LEI-AG) (Arends *et al*, 1998).

Tratamientos para el CaCU.

Para evitar el avance del cáncer, específicamente el de cérvix; es conveniente una revisión regular como una forma de prevención. Entre los métodos de detección se encuentra la prueba del papanicolau que es la más utilizada para detectar la presencia de células anormales del epitelio escamoso del útero. La detección oportuna de células anormales ayuda a combatir, mediante tratamiento, este tipo de células, además de prevenir el desarrollo del cáncer. El frotis del papanicolau es una prueba sencilla en la que se hace un raspado en la superficie del cuello uterino con una espátula o cepillo para recoger muestras de tejido escamoso y mediante tinción, se observa con un microscopio la ausencia o presencia de células anormales; el tipo de células presentes indican (en su caso), el grado de displasia (Avendaño *et al*, 2008).

Si existen células precancerosas, se deberán de tomar las medidas pertinentes para frenar el avance del cáncer. El tratamiento para la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) se debe de basar en los resultados histológicos derivados de una biopsia y dependerá de la etapa en que se encuentra la enfermedad, el tamaño del tumor, la edad, el estado general de salud, y el deseo de tener hijos de la mujer.

Una vez determinadas las características de la paciente, el tratamiento puede ser cirugía o cirugía acompañada de quimioterapia o radioterapia.

Tratamientos.

El tratamiento del cáncer que se proporciona actualmente se fundamenta en tres pilares básicos: cirugía, radioterapia y quimioterapia (Keys, 1999).

Cirugía: extirpación quirúrgica del 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, conización, cirugía con rayo laser, procedimiento de escisión electroquirúrgica, criocirugía o cirugía para extraer el área cancerosa, que puede ser extraer un pedazo, hasta una histerectomía radical (Stern *et al*, 1993).

Terapia de Radiación (Radioterapia): el tumor es irradiado con rayos X o gamma, que originan iones en las células neoplásicas y bajo la influencia de dicha radiación los iones pueden romper las hebras de ADN, dando lugar así a muchas mutaciones, lo que causa suficiente daño al ADN para eliminar directamente las células, o bien, para inducir muerte celular (Grigsby *et al*, 1991).

Quimioterapia:

La clasificación de los fármacos antitumorales se basa tanto en su estructura química como en su mecanismo de acción. Por ejemplo los antimetabolitos interfieren el metabolismo celular por su semejanza estructural con sustancias del metabolismo intermediario fisiológico celular. Los agentes alquilantes interfieren con la síntesis del ADN o de sus precursores. Los antibióticos antitumorales, poseen diferentes mecanismos de acción antineoplásica, la mayor parte de las veces lesionando el ADN de la célula maligna. (Kim *et al*, 2002). Los alcaloides de las plantas, como el taxol, interfieren en el ensamblaje de los microtúbulos celulares perturbando el proceso de división y provocando muerte celular (Gokul *et al*, 2001). En un tratamiento quimioterapéutico las células que se encuentran en proceso de división celular, como es el caso de las células tumorales, además de otras estirpes que proliferan de manera normal y que contribuyen en la homeostasis del organismo, son inducidas a una muerte que mayoritariamente es necrótica y en menor medida mediada por apoptosis (Avendaño *et al*, 2008).

- Tipos de aplicación.

La quimioterapia primaria o neoadyuvante es aplicada a un tumor que se presenta como una gran masa celular con el objetivo de reducirla hasta un nivel que sea fácilmente operable. Si la quimioterapia se aplica tras el tratamiento quirúrgico el objetivo es conseguir una erradicación completa de la enfermedad residual, o las posibles micrometástasis existentes (Avendaño *et al*, 2008).

También podemos unir la acción de la quimioterapia a la de la radioterapia; bien utilizando su propia acción antineoplásica como quimioterapia de inducción, o como quimioterapia sensibilización a la radiación. Por último, en la enfermedad neoplásica avanzada se puede administrar una quimioterapia curativa o paliativa.

- Vías de administración

La quimioterapia puede ser administrada por cualquier vía, según el esquema del tipo de fármaco o fármacos a administrar. Se usan las vías oral, intramuscular, intravenosa, intraarterial e incluso intraperitoneal; si bien esta última, que lógicamente podría presentar grandes ventajas en ginecología debido a su posibilidad de alcanzar gran concentración local con escasa toxicidad, puede presentar una distribución irregular debido a las condiciones locales postoperatorias (Bergers *et al*, 2008).

- Resistencia a los fármacos antineoplásicos

Existen dos mecanismos principales de resistencia que limitan la acción curativa de este conjunto de medicamentos, una es la presencia de una alta tasa de población celular en fase de reposo (desgraciadamente la mayoría de las células de los tumores que han alcanzado un gran tamaño), en segundo lugar, los mecanismos bioquímicos de resistencia, que condicionan una menor captación, una mayor eliminación, una mayor inactivación o menor activación del fármaco (Bergers *et al*, 2008).

Desgraciadamente, las células de crecimiento rápido, tales como las de la mucosa digestiva, las uroepiteliales, los folículos pilosos y, sobre todo, las células de la médula ósea, se ven afectadas en diverso grado por los quimioterápicos, dependiendo tanto de la estructura de los mismos como de la dosis utilizada. Algunos antineoplásicos, como las antraciclinas, el cisplatino o los alcaloides, poseen acciones tóxicas características sobre determinados órganos (afectación cardiaca, renal y nerviosa, respectivamente).

La mayoría de las veces se requiere de la combinación de las terapias para obtener éxito. Sin embargo estos tratamientos son incapaces de destruir selectivamente a las células cancerosas, sin dañar en forma simultánea a las células normales puesto que, tanto células sanas como cancerosas se encuentran en proliferación y exponiendo su material genético ante el tratamiento, generándose así efectos secundarios. Ante esta situación se buscan nuevos tratamientos y medidas de prevención que permitan una mejor calidad de vida del paciente.

Numerosos trabajos han señalado que fármacos tales como el taxol, vinblastina, etopósido (McCloskey *et al*, 1996), topotecán (Tolis *et al*, 1999) y compuestos antitumorales de origen natural (Kathleen, 2001) inducen la muerte en células neoplásicas a través de apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kaufmann, 2000).

Obtener un tratamiento que desate la muerte apoptótica y que sean selectivos; en lo que respecta a inducir a muerte a células cancerosas no afectando, o sólo de manera mínima, a las células normales, sería de gran ayuda la terapia de estas enfermedades; a diferencia de los tratamientos actuales que algunas veces pueden llegar a ser más agresivos que la misma enfermedad.

Capsaicina y sus derivados.

Los capsaicinoides son compuestos provenientes de las plantas pertenecientes al género *Capsicum* y dan a éstos sus propiedades irritantes. Se cree que el nombre del género, deriva del griego Kapto, que significa “picar”; lo que describiría la principal característica del fruto, o del latín capsia “caja”, refiriéndose al hecho de que el fruto del chile es hueco (Salazar, 2004).

Los capsaicinoides son producidos por ciertas glándulas en la placenta del chile, el sitio del fruto donde se producen las semillas. La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida), es el más abundante de los capsaicinoides presentes en el chile y es la principal responsable de la pungencia de éste. La capsaicina fue descubierta por L. T. Thresh en 1846 (Chow *et al*, 2007); se aisló por primera vez en 1876, su estructura química se determinó en 1919 y se logró sintetizar en 1930 (Szallasi, 1999).

Por los estudios de actividad estructural, la capsaicina tradicionalmente se ha dividido en tres fracciones, la región aromática, la región lipofílica y la amida enlazadora (Figura 7) (Appendino *et al*, 2005a).

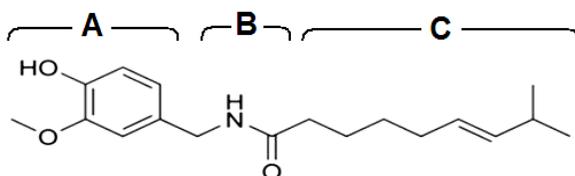


Figura 7. Molécula de la capsaicina donde se muestra la región aromática (A), la amida enlazadora (B) y la región lipofílica (C) (modificado de Appendino *et al*, 2005a).

La capsaicina ha presentado efecto citotóxico (Han *et al*, 2007) en líneas tumorales derivadas de: epitelio branquial humano (BEAS-2B), adenocarcinoma de epitelio alveolar humano (A549), hepatoma humano (HepG2) (Reilly *et al*, 2003), células de glioma (C6) (Qiao *et al*, 2005). Además de inductor de apoptosis en células de leucemia (HTLV-1) (Zhang *et al*, 2003) y de próstata (PC3) (Sanchez *et al*, 2007) entre otras (Bhutani *et al*, 2006).

A lo largo de la investigación que se ha realizado en la capsaicina (Surh *et al*, 1996), se ha modificado la fracción aromática y la fracción amida, y de igual manera han sido ampliamente estudiadas estas modificaciones, (Appendino *et al*, 2002). Sin embargo, las modificaciones en la fracción acilo son nuevas y se requiere de información al respecto (Appendino *et al*, 2002). Para ello fue desarrollada una síntesis común y simple de vanilamidas, empleada para investigar grupos de ácidos grasos e isoprenoides, propuestos como análogos de la capsaicina con nuevas fracciones acilo de relevancia biológica.

El descubrimiento de nuevos análogos de la capsaicina que no presentan efectos colaterales derivados de la irritabilidad, puede conducir a drogas más efectivas para el tratamiento de desórdenes de la salud (Winter *et al*, 1995), como hiperalgesia inflamatoria, hiperactividad de la vejiga, vómito, crecimiento canceroso (Chih-Chung *et al*, 2006) dolor e inmovilidad (Appendino *et al*, 2005b) y ha dado como resultado el desarrollo de rinvanil y 12-fenilacetilrinvanil; compuestos considerados análogos ultrapotentes, varias veces más

afines al receptor TRPV1 que la capsaicina, (Castillo *et al*, 2008), por lo que su estudio es necesario y prometedor.

TRPV-1

Los canales iónicos son proteínas transmembranales encargadas de controlar el paso de iones a través de la membrana de toda célula viva actuando como compuertas que se cierran o se abren en respuesta a determinados estímulos, estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la fisiología de las células y en los sistemas sensoriales, en estos se identifico el canal TRP (potencial transitorio de dolor, por sus siglas en ingles), que desempeña un papel importante en la fisiología sensorial de los organismos (Montel *et al*, 1989), detectando estímulos mecánicos, térmicos, químicos; en base a la homología entre sus secuencias, los canales TRP se dividen en siete subfamilias que poseen diferentes características como la termosensibilidad a diferentes rangos de temperatura, de estos el TRPV-1 es uno de los canales termosensibles más estudiados (Venkatachalam *et al*, 2007).

El TRPV-1 se expresa principalmente en neuronas de sistema nervioso periférico, pero también se encuentra en el sistema nervioso central y en múltiples tejidos no neuronales, al igual que otros canales TRP, el TRPV-1 es un canal catiónico no específico que permite el paso de diferentes cationes monovalentes o divalentes, este canal es activado por altas temperaturas nocivas >42 °C, el voltaje, la acidificación extracelular, el pH intracelular alcalino y el compuesto presente en los chiles picantes, la capsaicina (Caterina *et al*, 1997).

La capsaicina es uno de los agonistas, mejor caracterizados para el canal TRPV-1, dado que la capsaicina y sus análogos son lipofílicos, pueden cruzar la membrana celular e interactuar con sitios de unión localizados en la parte intracelular de canal (Szallasi *et al*, 1999).

TRPV1 y cáncer.

Avances recientes en el tratamiento del dolor promovido por sarcomas óseos se han centrado en explorar el canal TRPV1 como diana para desarrollar terapias contra el dolor. Un estudio reciente ha concluido que el canal TRPV1 interactúa directamente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico y disminuye su expresión (Niiyama *et al*, 2007). Esto resulta de gran interés porque dicho factor esta sobreexpresado en tejidos con cáncer epitelial y se piensa que es importante para el desarrollo del cáncer (Ghilardi *et al*. 2005). Mas importante aun, se ha encontrado que en ratones nulos para el TRPV1 el progreso del cáncer de piel es mucho más rápido y agresivo que en ratones silvestres. Esto indica que el canal TRPV1 constituye un supresor tumoral directamente asociado a la disminución de expresión de otro receptor que es importante para el desarrollo de este tipo de cáncer. (Bode *et al*, 2009).

Rinvanil

Rinvanil es un nuevo vaniloide más potente que capsaicina, lo que le da gran valor para la investigación de sus relaciones estructura-actividad. La presencia de un grupo hidroxilo secundario en la región lipofílica de este compuesto, da la oportunidad de una variedad de modificaciones interesantes (Figura 8) (Apenddino *et al*, 2005b).

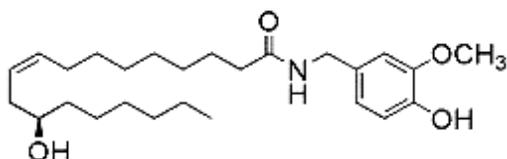


Figura 8. Molécula de rinvanil (Castillo *et al*, 2008).

Puesto que la síntesis del compuesto rinvanil es reciente, parece lógica la escasez de información y reportes que se tienen al respecto. En consecuencia, el que se ponga atención en el estudio de sus efectos sobre el cáncer y otros padecimientos no es tarea vana.

La capsaicina cobró importancia gracias a la actividad antiproliferativa que ha mostrado tener sobre líneas celulares tumorales de esófago, próstata, hígado, leucémicas, entre otras; pero en contraparte debido a sus propiedades irritantes y su difícil obtención, se busca la generación de nuevos análogos de la capsaicina que mantengan su actividad antiproliferativa dejando de lado el difícil manejo y la alta pungencia (es muy picante). En este trabajo se evaluó a rinvanil, que es un compuesto análogo de la capsaicina (Figura 9), que a diferencia de éste, no presenta propiedades irritantes y requiere ser evaluado en su actividad biológica y antitumoral.

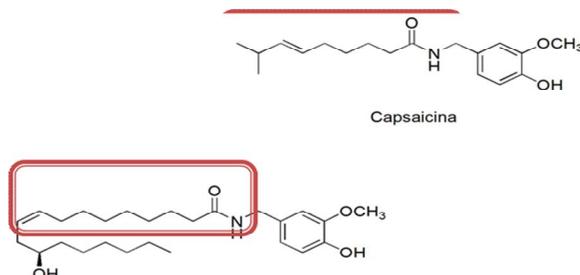


Figura 9. Similitud entre la estructura de la capsaicina y el rinvanil

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer cervicouterino se ubica como una de las principales causas de muerte en nuestro país. Los tratamientos que existen son muy agresivos e ineficientes para pacientes con un estado avanzado de la enfermedad y con metástasis. Estudios sobre la actividad biológica que ejercen los capsaicinoides y sus derivados, han demostrado que pueden ser útiles en el tratamiento y prevención de varios tipos de cáncer (colon, hígado, mama, leucemias), sin embargo, es escasa la información que se tiene sobre la actividad biológica que podrían ejercer estos compuestos sobre el CaCU.

La capsaicina es un compuesto que 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. De este modo uno de sus derivados; el rinvanil, que tiene dicha peculiaridad ha despertado interés en el estudio de este compuesto como agente anticancerígeno. Debido a esto, es importante iniciar el estudio de esta molécula, para aportar información de los efectos que dicho compuesto pueda tener en la proliferación y muerte de cultivos de líneas celulares derivadas de CaCU, así como de cultivos de células no tumorales para evaluar su posible efecto selectivo.

JUSTIFICACIÓN.

En México el cáncer cervicouterino representa la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres (WHO, 2008); de éstos, el 95 % está asociado con el VPH (Muñoz *et al.*, 1997), donde el tipo 16 y 18 se consideran los de mayor incidencia y por tanto de alto riesgo (Lewis, 2004).

Para enfrentar este problema se cuentan con diferentes estrategias, sin embargo, sus efectos secundarios afectan la calidad de vida del paciente. Es por ello que se ha optado por continuar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que reduzcan estos efectos y sobre todo que se obtengan a partir de fuentes naturales. De esta manera, se ha reportado que la capsaicina posee efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis en diversas líneas celulares. Pese a esto, se caracteriza por ser un compuesto sumamente citotóxico, irritante e hiperalgésico, sumado al poco contenido de capsaicinoides en los chiles (0.6-1.0 %) y los bajos rendimientos en los procesos de extracción, que hace limitada la disponibilidad de la capsaicina. En consecuencia se ha tratado de desarrollar moléculas análogas de fácil obtención y manejo que puedan desempeñar su acción biológica disminuyendo su capacidad irritante.

Por este motivo este trabajo tiene el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis del rinvanil, considerado como un análogo ultrapotente de la capsaicina, en las líneas celulares proveniente de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

HIPÓTESIS.

La capsaicina es un compuesto que ha mostrado tener efecto antiproliferativo e inductor de muerte sobre líneas celulares cancerosas. El compuesto rinvanil es un análogo de la capsaicina que conserva su afinidad por el TRPV-1 pero que no conserva las propiedades irritantes de la capsaicina. Por lo anterior se espera que el rinvanil presente actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células provenientes de cáncer cervicouterino.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si el rinvanil induce un efecto antiproliferativo y apoptótico en células provenientes de cáncer cervicouterino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer condiciones de cultivo de las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino: CaSki, HeLa y ViBo.
- Establecer condiciones de cultivos primarios de fibroblastos obtenidos de cérvix humano, así como de linfocitos de sangre periférica humana.
- Determinar la concentración requerida de rinvanil, para inducir un decremento del 50 % del número celular (IC50), en cultivos de células provenientes de CaCU, CaSki, HeLa y ViBo.
- Establecer si el rinvanil afecta el ciclo celular de las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo.
- Evaluar si la concentración IC50 obtenida para el rinvanil, induce un efecto necrótico en las líneas celulares tumorales: CaSki, HeLa y ViBo.
- Determinar si la concentración IC50 de rinvanil induce expresión de caspasa-3 activa en cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo
- Determinar si la concentración IC50 de rinvanil induce fragmentación de ADN en cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo
- Evaluar si rinvanil disminuye el número celular de cultivos primarios de fibroblastos humanos.
- Evaluar si rinvanil afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana.
- Evaluar si rinvanil induce muerte celular por necrosis en células linfocíticas de sangre periférica humana.

MÉTODO.

Cultivo de células tumorales provenientes de cérvix.

Las líneas celulares provenientes de CaCU HeLa, CaSki y ViBo fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) con 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX) al 5 % de suero de neonato de ternera (SNT; Gibco, USA), que previamente fue desactivado a 56 °C por 30 minutos (Ver apéndice). Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación. Se permitió la saturación de los cultivos hasta un 70 % de confluencia para realizar los ensayos (Morgan y Darling, 1995).

Procesamiento y obtención de células de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino humano de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes al CaCU. Una vez obtenida la pieza quirúrgica, fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco, USA) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió en escindir el tejido en trozos pequeños de 2 a 3 mm para proseguir con una digestión enzimática con tripsina (SIGMA, U.S.A.) al 0.05 % en solución de Verseno. La digestión enzimática se lleva a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pirex, USA) de 50 ml con 10 ml de tripsina e incubación por 15 min a 37 °C en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla es filtrada a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla de nylon. El filtrado es centrifugado (centrifuga; Dinac, USA) por 5 minutos a 2000 rpm; se decanta el sobrenadante y el botón celular es cultivado en cajas de Petri de plástico de 60 mm con RPMI al 10 % de SFB, y se mantiene en una incubadora (Nuair, USA) 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 un cambio de medio de cultivo (totalmente), de tal manera que fueron removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continúa incubando así hasta obtener un buen número de células proliferando. Las resiembras se realizan cuando los platos de cultivo desarrollan un 60 % de confluencia. Los ensayos se realizan con cultivos de las resiembras 2 a 4 en una confluencia máxima del 60 %.

Obtención de Rinvanil.

La síntesis de rinvanil se realizó en el laboratorio de Síntesis de Fármacos, a cargo del Dr. Ignacio Regla (FES Zaragoza) de acuerdo al procedimiento descrito previamente por Castillo 2008. En breve, se realizó la transesterificación del aceite de ricino (Sigma, USA) empleando catálisis básica (KOH 0.2 %) (Sigma, USA) en metanol, lo cual produjo una mezcla de ésteres metílicos, de donde fue obtenido el ricinoleato de metilo. Finalmente, se realizó la aminólisis del éster metílico de éste, empleando vainillilamina y catálisis con lipasa B de *Candida antarctica* en 2-metil-2-butanol como disolvente para obtener Rinvanil.

Preparación del stock de Rinvanil.

1 mg de rinvanil fue solubilizado en 50 µl de acetato de etilo (AcEt, vehículo) en un tubo cónico tipo eppendorf de 600 µl y se almacena a -4 °C hasta su utilización.

Determinación de la concentración que abate el 50 % del número celular de cultivos de células tumorales.

Se cultivan células de las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 µl de RPMI-1640 al 5 % de SNT por 24 horas. Posteriormente se retira el medio de cultivo y se adiciona el rinvanil en concentraciones de 0 µg/ml a 200 µg/ml durante 24 h. El control para el vehículo empleado en la solubilización de rinvanil AcEt, contempla la máxima concentración utilizada en la preparación de rinvanil a 200 µg/ml en 10 µl de acetato de etilo diluido en 1 ml RPMI-1640 al 5% de SNT. Al control testigo únicamente se le realiza el cambio de medio por medio de cultivo fresco. Al término del estímulo se procede a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al*, 1989. Para ello se le retira el medio de cultivo e inmediatamente las células son fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada por 15 minutos; al término de los cuales se retira el fijador para posteriormente lavar las células con agua desionizada. A continuación se deja secar al aire y se añade el colorante cristal violeta (Sigma USA) al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se retira el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se deja secar al aire. El colorante incorporado en el núcleo de las células es solubilizado con ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación por 20 minutos. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (image tecan spectra). Cada uno de los tratamientos se realizó por sextuplicado. En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal para la obtención de la concentración que abate el 50 % de la población celular (IC50).

Evaluación del efecto de rinvanil sobre el ciclo celular.

Cultivos de las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo con 10^6 de células en cajas de Petri de 60 mm con 5 ml de RPMI 1640 al 5 % de SNT y posterior a 24 h de adherencia, se les retira el medio de cultivo y se sustituye con medio fresco con la concentración IC50 obtenida para cada línea celular; el estímulo se mantiene por 24 h más. La cantidad de ADN presente en las células fue determinado por el marcaje con el fluorocromo yoduro de propidio (IP) y evaluado por citometría de flujo. Para evaluar la distribución de ADN en el ciclo celular se colectan las células totales del cultivo, para lo cual se retira el medio de cultivo y se colecta en un tubo cónico de plástico de 15 ml. A las cajas de cultivo se agrega una solución de Verseno para CaSki y HeLa, o tripsina al 0.05 % en Verseno para ViBo (para cosechar las células adheridas al piso de la caja de cultivo); se incuba a 37 °C por 5 min para la cosecha con Verseno y 1 min para la cosecha con tripsina. Se pipetea suavemente para desprender las células. Las células son colectadas en el tubo que contiene el medio de cultivo de la misma caja. Para la obtención del botón celular se centrifuga a 1,500 rpm por 5 min. Los botones celulares son resuspendidos y fijados en 1 ml de PBS al 50 % de metanol. Se deja reposar 20 minutos, posteriormente se centrifuga 5 minutos a 1500 rpm y se lava con PBS dos veces. Los botones celulares son resuspendidos en 0.5 ml de ARNasa (0.1 mg/ml) y se incuba a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionan 10 µl de la solución de yoduro de propidio (0.2 mg/ml). Las muestras se analizan en un citómetro de flujo (FACSAria II, USA) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH.

En una caja de 96 pozos son sembradas 7,500 células de cada una de las tres líneas provenientes de CaCu; CaSki, HeLa y ViBo con 100 µl de RPMI al 5 % de SNT, por 24 h. Los tratamientos se hicieron por triplicado. Posteriormente se retira el medio de cultivo y se realizan los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le hace cambio de medio de cultivo, un control positivo al cual se le hace cambio de medio, un control para AcEt con la concentración empleada para preparar la IC50 correspondiente y el tratamiento con rinvanil con la concentración IC50 correspondiente a cada línea celular. A las 23 h de tratamiento, al cultivo control positivo se le hace un nuevo cambio de medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 y se deja que el ensayo complete las 24 h de tratamiento.

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos son colectados de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml y centrifugados a 2,000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes son traspasados una placa de 96 pozos, 50 µl por pozo, para su evaluación. La actividad de

LDH se determina con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregan 50 μ l de la mezcla de reacción (Ver apéndice). Se incuba a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 30 min. Se evalúa a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de elisa (Image tecan spectra). Los datos se analizan haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras son por triplicado.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

A cultivos de 10^6 células de las líneas de CaCU CaSki, HeLa y ViBo en cajas de Petri de 60 mm con 5 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT y con 24 h de adherencia, se les retira el medio de cultivo y se sustituye por medio fresco conteniendo: rinvanil en la concentración IC50 determinada para cada línea celular, AcEt, camptotecina 20 μ g/ml (HeLa y ViBo) o 60 μ g/ml (CaSki) y un control solo con cambio de medio de cultivo. El estímulo se mantiene por 24 h. Para la evaluación de la actividad de caspasa 3 se emplea el kit de evaluación colorimétrica Caspase-3 CPP32 colorimetric assay kit (BioVision, USA), para lo cual los cultivos estimulados en las diferentes condiciones ya especificadas, son cosechados y el botón celular es lisado con 50 μ l del buffer de lisis por 10 min; posteriormente se centrifuga a 10,000 rpm por 1 min. El sobrenadante es transferido a tubos cónicos de pA cástico de 0.6 ml y se mantiene en frío para continuar con la determinación de la concentración de proteínas, o se almacena a -70 °C para su posterior evaluación.

La cuantificación de proteínas se realiza en placas de 96 pozos utilizando el método de Bradford. La curva patrón se hace con albúmina sérica bovina en un rango de 1 a 200 μ g/ml (en PBS), colocando 100 μ l por pozo. De las muestras se agrega 1 μ l por pozo más 99 μ l de PBS. Posteriormente se agregan 20 μ l del reactivo de Bradford y se incuba por 10 min a temperatura ambiente. Se evalúa a una longitud de onda de 590 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (Image tecan spectra). Se determina la cantidad de proteína para cada una de las muestras.

Una vez calculada la concentración de proteína se coloca el volumen necesario que contenga 100 μ g de proteína y se completa a un volumen de 50 μ l con el buffer de lisis. Se agregan 50 μ l del buffer de reacción que contiene 10 nM de DTT a cada muestra. Se agregan 5 μ l de la solución de sustrato 4 mM de DEVD-pNA y se incuba a 37 °C por 1-2 h. Se evalúa a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (Image tecan spectra). Los datos se analizan haciendo una comparación con la expresión de actividad de caspasa 3 en los cultivos positivos estimulados con camptotecina.

Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL.

Para la realización de la técnica de TUNEL se utilizó el kit ApopTag (Chemicon International, USA), para la cual fueron sembradas 30,000 células de las tres líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo en cubreobjetos de 1X1 cm en un volumen de 2 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT en cajas de Petri de 30 mm. Al paso de las 24 horas se procede a retirar el medio de cultivo y se realizan los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le hace cambio de medio de cultivo, un control para AcEt con la concentración empleada para preparar la IC50 correspondiente y el tratamiento con rinvanil con la concentración IC50 correspondiente a cada línea celular. El estímulo se mantiene por 24 h más. Posteriormente las células son fijadas con paraformaldehído al 2 % en PBS (el cual se prepara al momento) por 15 min. Las muestras son lavadas 3 veces con PBS y se permean con tritón X-100 0.5% en PBS durante 5 minutos a 4 °C. Se lavan con PBS 3 veces. Posteriormente se adiciona inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30 µl) en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurren las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar, se incuba inmediatamente por 1 hora con la enzima Tdt (33 µl de enzima Tdt más 77 µl de buffer de reacción), en cámara húmeda. La reacción fue detenida con buffer de paro (Chemicon international, USA) (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua bidestilada) agitando suavemente por 10 minutos, en cámara húmeda. Posteriormente se lava 3 veces con PBS con 1 minuto cada lavado. Se incuba con antidigoxigenina acoplada a rodamina, 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (Chemicon international, USA) (68 µl de solución bloqueó más 62 µl de antidigoxigenina-rodamina). Se realizan los respectivos lavados 3 veces con PBS en cámara húmeda; dos minutos cada lavado. Se procede a incubar con DAPI (Sigma-Aldrich, USA) 30 segundos (se añaden rápidamente). Se lava 3 veces la muestra con PBS en cámara húmeda; 1 minuto cada lavado. Las preparaciones fueron montadas en medio de montaje antifolding (Vectashield, USA), etiquetadas y guardadas en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nakon, JAP).

Efecto de rinvanil sobre la proliferación de linfocitos humanos marcados con carboxifluoresceína.

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónico de vidrio de 15 ml (Pirex, USA) con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich USA) (un total de 4 tubos). Se centrifugan (centrífuga; Dinac, USA) inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumenta gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, después de lo cual se deja centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 µl se retira el plasma y se colecta el anillo de leucocitos. Posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspende con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifuga a 1500 rpm

durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se resuspende en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células queda contenido en un solo tubo con un volumen total de 4ml. Se siembran las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA) en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y se incuban durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se resuspende nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se toma una alícuota de 20 μ l y se determina el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para marcar las células linfocíticas con carboxifluoresceína (CSFE) (Sigma, USA), los linfocitos se resuspenden en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ moles por mililitro de solución o por millón de células) y se incuban 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan con PBS al 5 % de SFB, se centrifugan a 1500 rpm (dos veces) y se resuspenden en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (FHG) los linfocitos son transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10^6 células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (diluida 1:10 de PBS) (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realiza en este momento: control solo con medio de cultivo con y sin FHG, control para el vehículo al cual se le agrega la cantidad de AcEt empleada en la preparación de la concentración IC50 más alta obtenida para células tumorales de CaCu y rinvanil en la concentración IC50 más alta. Las células contenidas en cada tubo cónico son sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y son incubadas en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación las células son cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml. Se centrifuga a 1500 rpm por 5 min, se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 1 ml de Verseno frío y se incuba por 5 min a temperatura ambiente; se centrifuga nuevamente y se retira el verseno. Posteriormente se resuspende con 500 μ l de PBS y se agregan 500 μ l de paraformaldehído al 2%. Las células son evaluadas por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSAria II y los datos son procesados con el programa FACSDiva versión 6.1.2. Los datos son analizados haciendo una comparación con respecto al control positivo para proliferación de células tratadas únicamente con FHG (Ver apéndice).

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH en cultivos de linfocitos humanos.

En tubos vacutainer con EDTA se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónico de vidrio de 15 ml (Pirex, USA) con 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se centrifugan (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumenta gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se deja centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retira el plasma y se colecta el anillo de leucocitos; posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspende con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se re suspende en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células queda contenido en un solo tubo con un volumen total de 4ml. Se siembran las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y se incuban durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se resuspende nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se toma una alícuota de 20 μ l y se determina el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer. Los linfocitos son transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10^6 células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (diluida 1:10 de PBS) (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realiza en este momento: control solo con medio de cultivo con y sin FHG, control positivo al cual en este momento no se agrega tritón X-100, control para el vehículo al cual se le agrega la cantidad de AcEt empleada en la preparación de la concentración IC50 más alta obtenida para células tumorales de CaCu, y rinvanil en la concentración IC50 más alta (Ver apéndice). Las células contenidas en cada tubo cónico son sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y son incubadas en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación a las 71 h de tratamiento al control positivo se agregan 2 μ l tritón X-100 y se homogeniza piteando suavemente el medio de cultivo y se incuba por 1 h más. A las 72 h de cultivo las células son cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml de manera individual. Se centrifuga a 1500 rpm por 5 min y se traspasan 50 μ l de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de LDH se determina con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA) del cual se agregan 50 μ l de la mezcla de reacción. Se incuba a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 30 min. Se evalúa a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de elisa (Image tecan spectra). Los datos se analizan haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras son por triplicado.

Efecto de rinvanil sobre cultivos de células fibroblásticas de cérvix humano

Se cultivaron células de cérvix sano en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 10,000 células/pozo en 100 μ l de RPMI-1640 al 5 % de SNT por 24 h. Posteriormente se retira el medio de cultivo y se agrega medio de cultivo fresco con los siguientes tratamientos: un control al cual sólo se realiza cambio de medio de cultivo, un control con la concentración de AcEt empleada en cada una de las IC50 obtenidas para cada línea celular y rinvanil en cada una de las concentraciones IC50 obtenidas. El estímulo se mantiene por 24 h. Al término del estímulo se procede a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng, et al 1989. Para ello se le retira el medio de cultivo e inmediatamente las células son fijan con glutaraldehído al 1.1% por 15 minutos, al término de los cuales se retira el fijador para posteriormente lavar las células con agua desionizada, a continuación se deja secar al aire y se añade el colorante cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico y se incuba a temperatura ambiente por 20 minutos. Se retira el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se deja secar al aire. Por último el colorante incorporado en el núcleo de las células es solubilizado en ácido acético al 10 % en agitación por 20 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Image tecan spectra). Los datos obtenidos se analizan tomando como referencia al control de proliferación normal, al cual solo se le realizó cambio de medio de cultivo y con el control de AcEt.

Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos se les realiza un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05, utilizando el programa SPSS 14.0 para Windows 7.

RESULTADOS:

El rinvanil es un vaniloide análogo de la capsaicina, a la cual se le ha determinado actividad necrótica e inductora de apoptosis en diversas líneas celulares tumorales. Para determinar el efecto antiproliferativo de este análogo en cultivos de líneas celulares de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados en un rango de concentración de 0 hasta 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10) para obtener la concentración que disminuye la densidad celular de estos cultivos en un 50%.

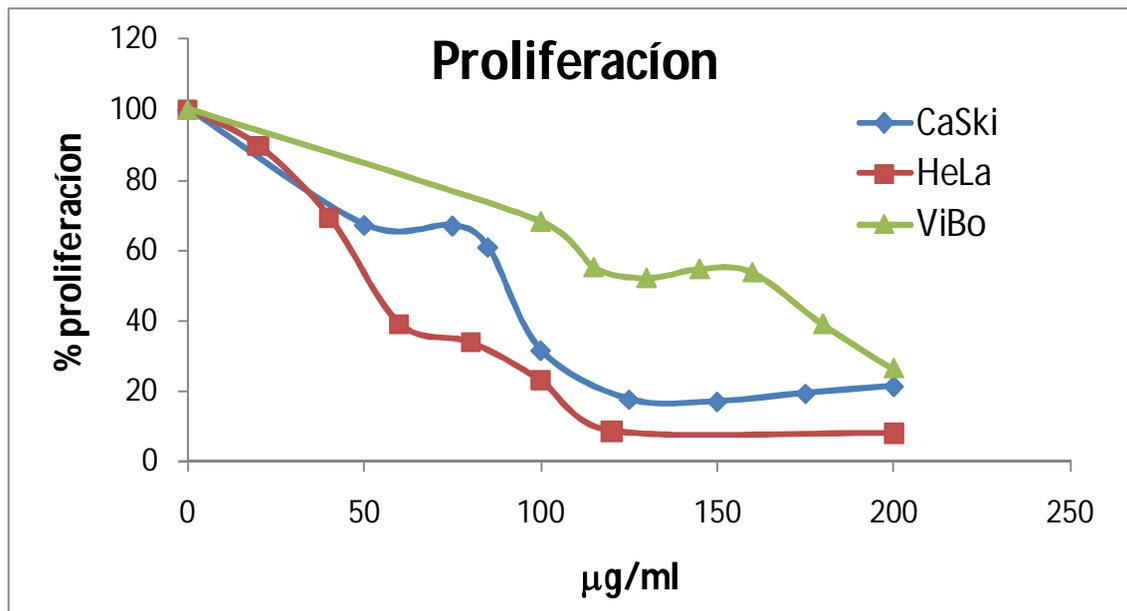


Figura 10. Efecto antiproliferativo de rinvanil sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. 7,500 células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos por 24 h y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de rinvanil, de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.

Línea celular	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
CaSki	90.87
HeLa	62.24
ViBo	149.13

Cuadro 1. Concentración requerida de rinvanil para inducir un 50 % de decremento en la densidad celular de cultivos de CaSki, HeLa y ViBo.

Los resultados obtenidos indican que rinvanil tiene un efecto en el potencial proliferativo de células tumorales Caski, HeLa y ViBo; tal efecto negativo es dependiente de la concentración, ya que al incrementar la concentración el número celular disminuye (Figura A). La concentración calculada para la cual rinvanil induce una disminución del 50 % en el número celular (IC50) en células CaSki es de 90.87, en HeLa de 62.24 y para ViBo de 149.13 $\mu\text{g/ml}$ (Cuadro 1).

Morfología Celular.

Los cultivos de las tres líneas celulares de CaCU tratados con la concentración de rinvanil IC50 correspondiente, mostraron cambios en la forma celular (Figura 11). Además de la disminución del número celular en las células CaSki fue evidente la pérdida de volumen, observándose células pequeñas, redondas y con proyecciones irregulares de la membrana celular, además de la pérdida de adherencia en las células que aun conservan su tamaño regular. En células HeLa, el comportamiento es similar a CaSki, sin embargo disminuyó la cantidad de células con forma regular poliédrica, aumentando la cantidad de células pequeñas y redondas con proyecciones irregulares. Las células ViBo no presentaron cambios tan evidentes con en las líneas celulares CaSki y HeLa, en éstas se aprecian células redondas que conservan el tamaño regular y las células que aún permanecen adheridas presentan proyecciones de la membrana que las hacen ver con formas poliédricas (la forma habitual de estas células es ovalada).

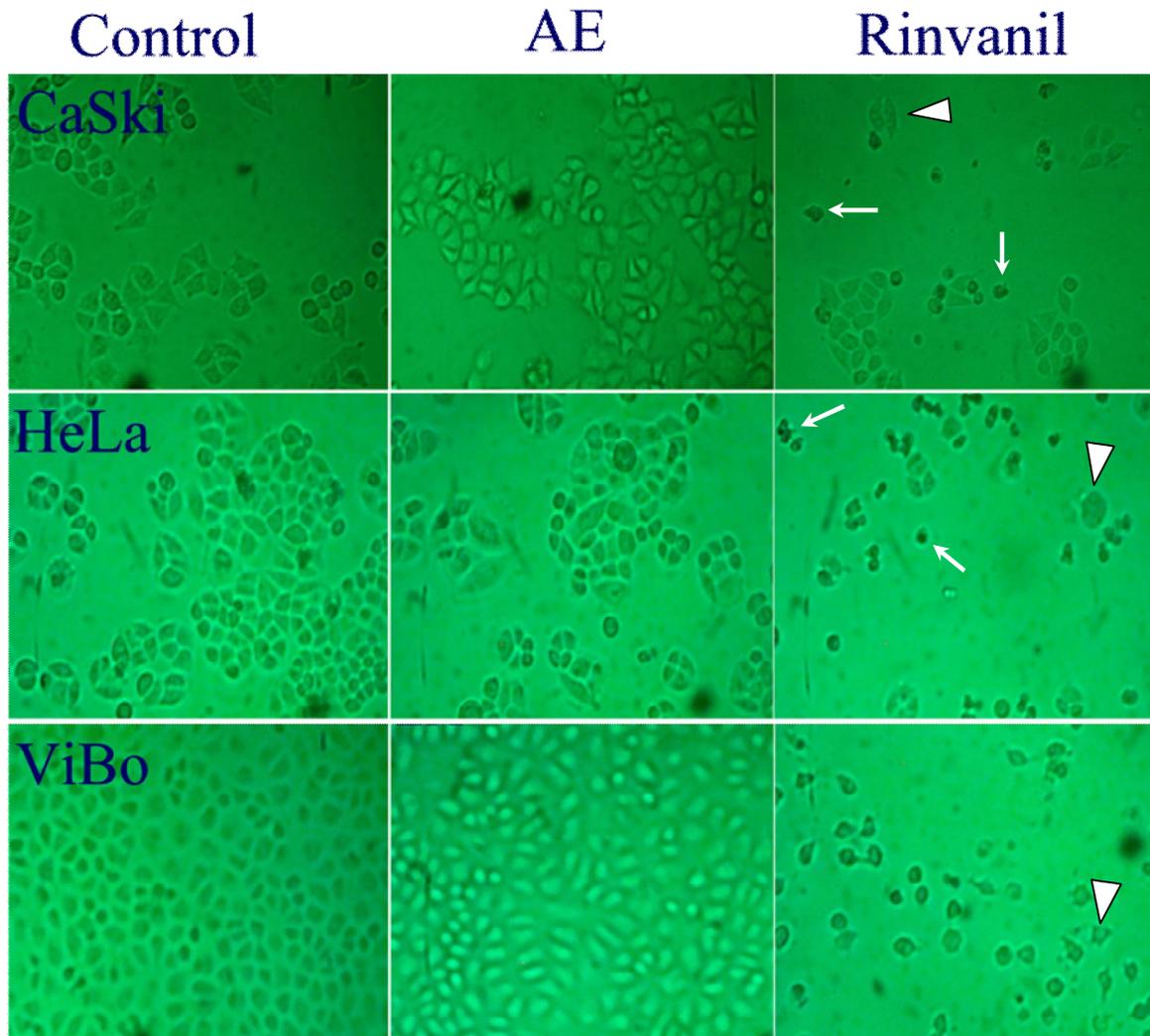


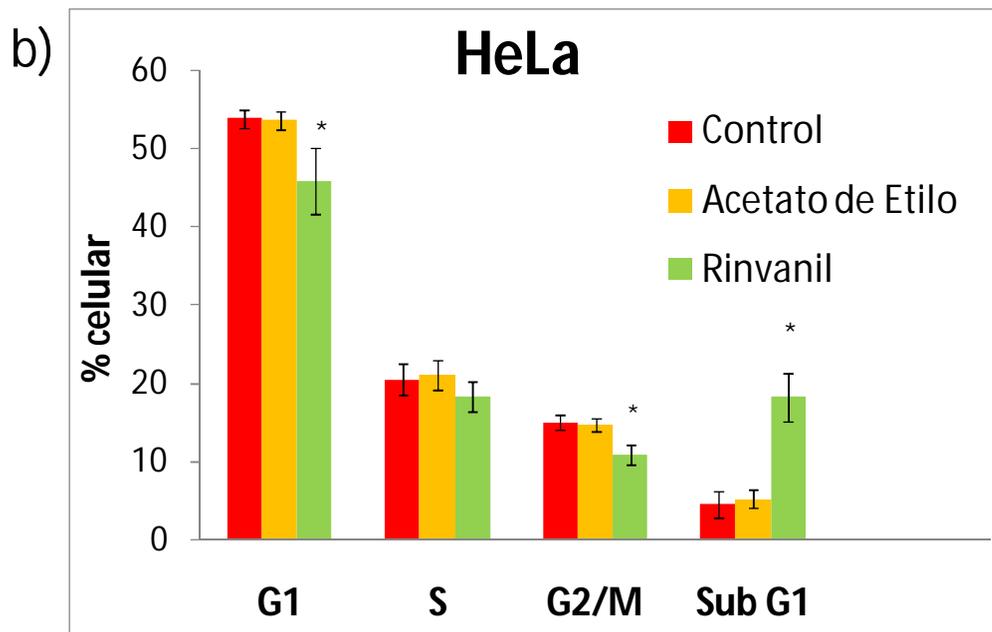
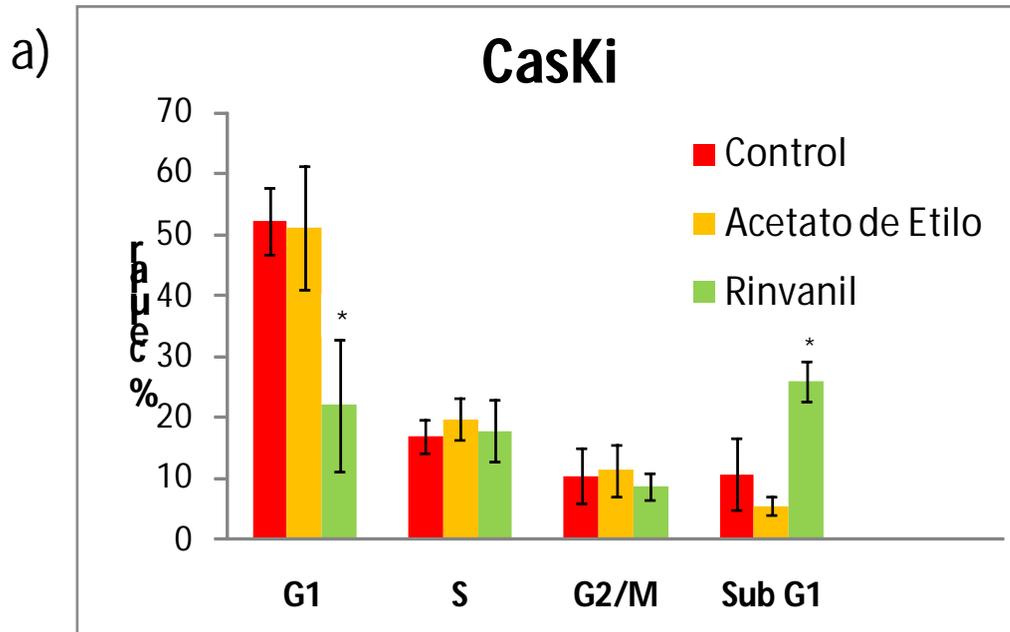
Figura 11. Efecto de rinvanil sobre la morfología de las células de CaCU CaSki, HeLa y ViBo. Las flechas indican células con pérdida de adherencia y proyecciones de la membrana celular; las cabezas de flecha indican células adheridas con cambios en la forma celular. Cultivos de 7,500 células en un volumen de 100 μ l en placas de 96 pozos, fueron estimulados con las respectivas IC50 por 24 h.

Efecto de rinvanil sobre el ciclo celular.

El capsaicinoide rinvanil induce una disminución del número celular, tal disminución puede deberse a un efecto dependiente de ciclo celular o una inducción de muerte celular. Para determinar el efecto de rinvanil sobre el ciclo celular, cultivos de las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo fueron estimuladas con las respectivas IC50 por 24 h. La cantidad de ADN, marcado con el flurocromo ioduro de propidio, presente en cada una de las fases del ciclo celular se evaluó por citometría de flujo. (Figura 12).

Los resultados obtenidos indican que cultivos de la línea celular CaSki son afectados en su progresión por el ciclo celular. La proporción de la población que se encuentra en la fase G1, de cultivos estimulados con rinvanil, disminuye hasta un 22 % con respecto a la

proporción de la población de los cultivos controles; las fases S y G2/M no presentaron disminución, sin embargo, la proporción de la población que presenta un número cromosómico menor a 2n aumentó considerablemente, alcanzando una proporción de 25 %; tal población denominada subG1 indica que las células presentan pérdida de material nuclear o de fragmentación del núcleo (Figura 12 a). La línea celular HeLa presenta un comportamiento similar, una disminución de la población celular presente en la fase G1 en un 10 % y un aumento en la proporción de la población de subG1 de 20 % (Figura 12 b). La línea celular ViBo no presentó alteración en las fases del ciclo celular (Figura 12 c).



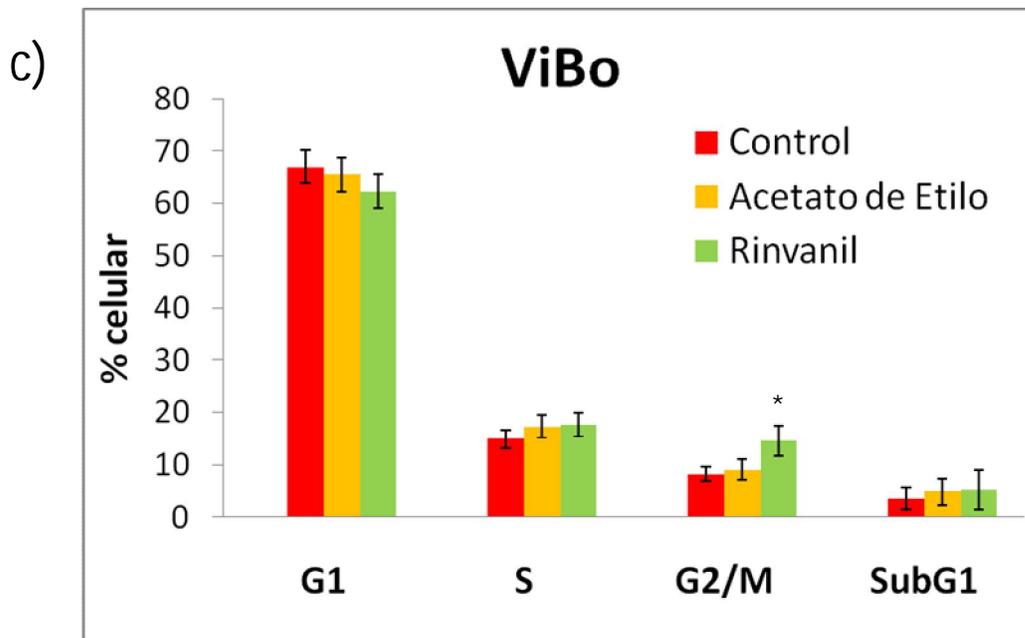


Figura 12. Efecto de rinvanil sobre la distribución del ADN en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular de las líneas celulares CaSki (a), HeLa (b) y ViBo (c). Cultivos de las tres líneas celulares (10^6 células en cajas de Petri de 60 mm) fueron tratadas con las IC_{50} por 24 h, la distribución de ADN fue evaluada por citometría de flujo. Las gráficas representan el promedio de ensayos independientes para cada línea celular. (*. $p < 0.05$ vs AcEt, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Determinación de muerte celular.

Necrosis.

La disminución del contenido nuclear obtenido en el análisis de ciclo celular indica una alteración relacionada a un evento de muerte celular que puede ser por necrosis o apoptosis. Para determinar si rinvanil induce muerte celular por necrosis, a los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo estimulados con sus respectivas IC_{50} por 24 h, se determinó la actividad de la enzima LDH, ya que una célula que muere por necrosis, al perder la integridad de la membrana celular, libera al medio de cultivo su contenido citoplasmático, en el cual se encuentra la enzima LDH (Figura 13). Los resultados muestran que rinvanil induce muerte celular por necrosis en cultivos de las líneas celulares CaSki y ViBo con actividad de LDH de 26.31 y 13.47 % (Tabla 2) respectivamente; sin embargo cultivos de la línea celular HeLa tratados con rinvanil no presentaron diferencia significativa con el control acetato de etilo (Cuadro 2).

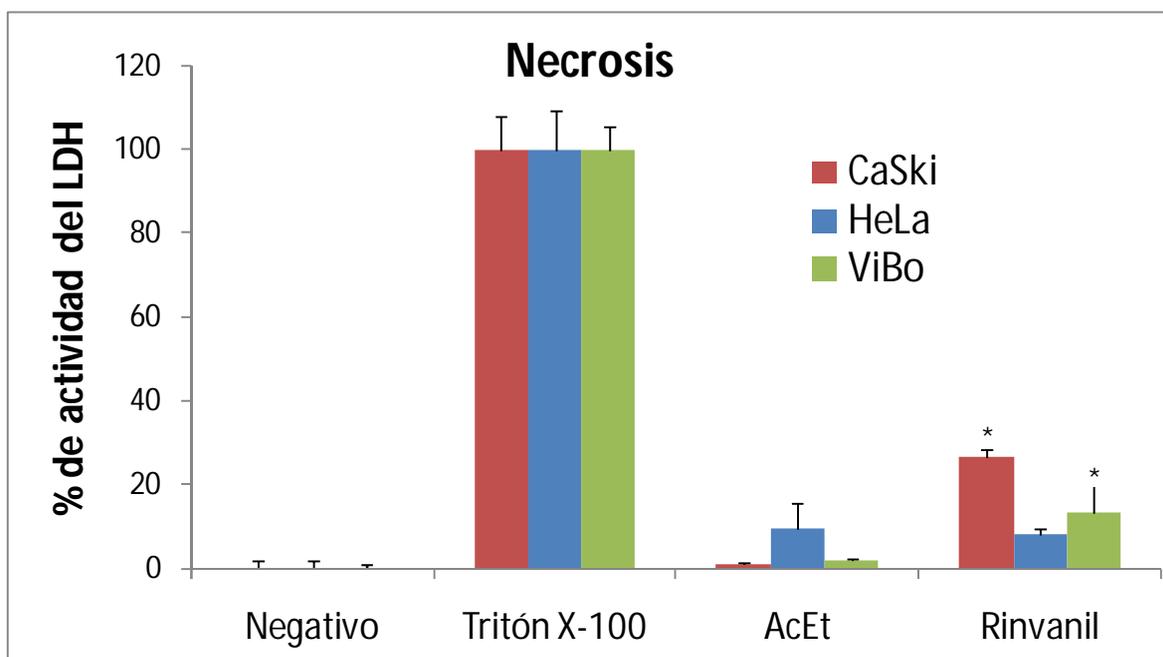


Figura 13. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo (7,500 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos), estimuladas con la IC50 respectiva para cada línea celular por 24 h. La liberación máxima de LDH se determinó con la aplicación de tritón X-100 a las 47 h de cultivo de un tratamiento control, la actividad de la enzima liberada se tomó como el 100 % de actividad. La gráfica representa uno de cuatro ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado. (*. $p < 0.05$ vs AcEt, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Línea	Citotoxicidad	Citotoxicidad Real
CaSki	26.31%	25.53%
HeLa	7.89%	0%
ViBo	13.47%	11.61%

Cuadro 2. Valores de actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo tratadas con sus respectivas IC50.

Apoptosis

Si bien se detectó la presencia de LDH en los sobrenadantes de cultivos de estas líneas celulares, no es lo suficiente como para dar cuenta de la disminución del 50 % del número celular en cultivos de CaSki y ViBo, ni del descenso del 50 % en las células HeLa, por lo que para determinar si rinvanil induce muerte celular por apoptosis, cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo estimulados por 24 h con sus respectivas IC50, se les determinó actividad de la enzima caspasa 3, la cual es una caspasa efectora que al ser activada el proceso de muerte celular apoptótica se considera irreversible (figura 14). Los resultados indican la presencia de caspasa 3 en células CaSki alcanzado una expresión del 50 % más que el control positivo. Las líneas celulares ViBo y HeLa presentan una mínima expresión no alcanzando los niveles de expresión del control positivo, sin embargo la expresión es positiva para las tres líneas celulares.

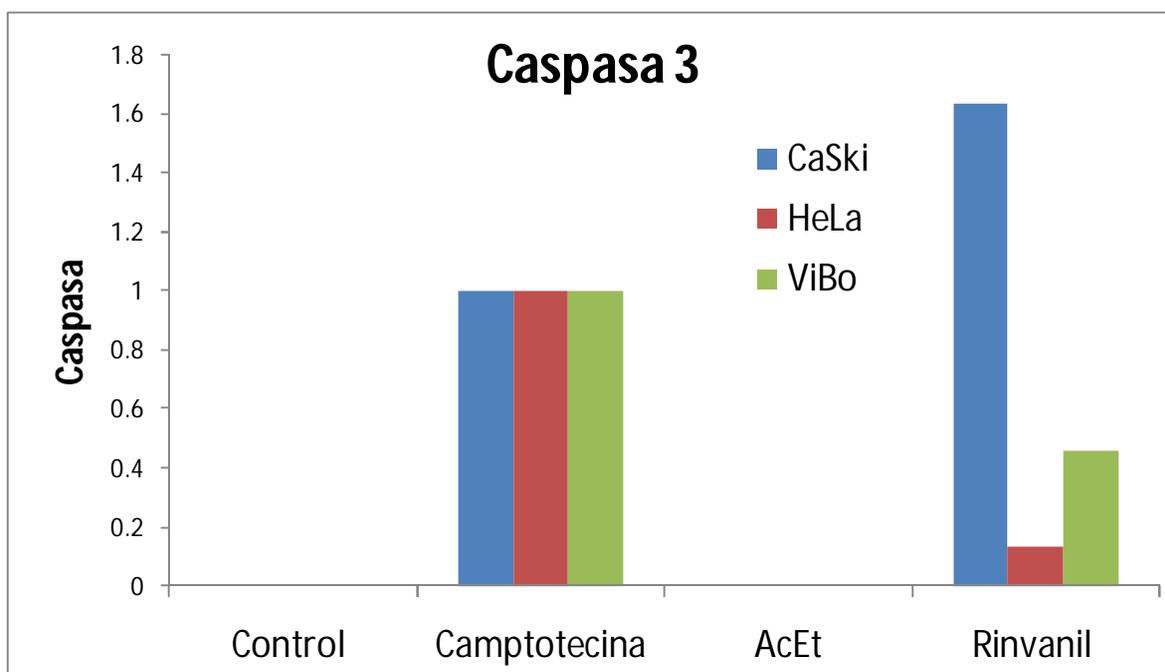


Figura 14. Actividad de la enzima caspasa 3 en cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo (10^6 células en cajas de Petri de 60 mm) estimulados con sus respectivas IC50.

Línea Celular	% Actividad de la Caspasa
CaSki	160
HeLa	13
ViBo	45

Cuadro 3. Valores de actividad de la enzima caspasa 3 en los cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo tratadas con sus respectivas IC50.

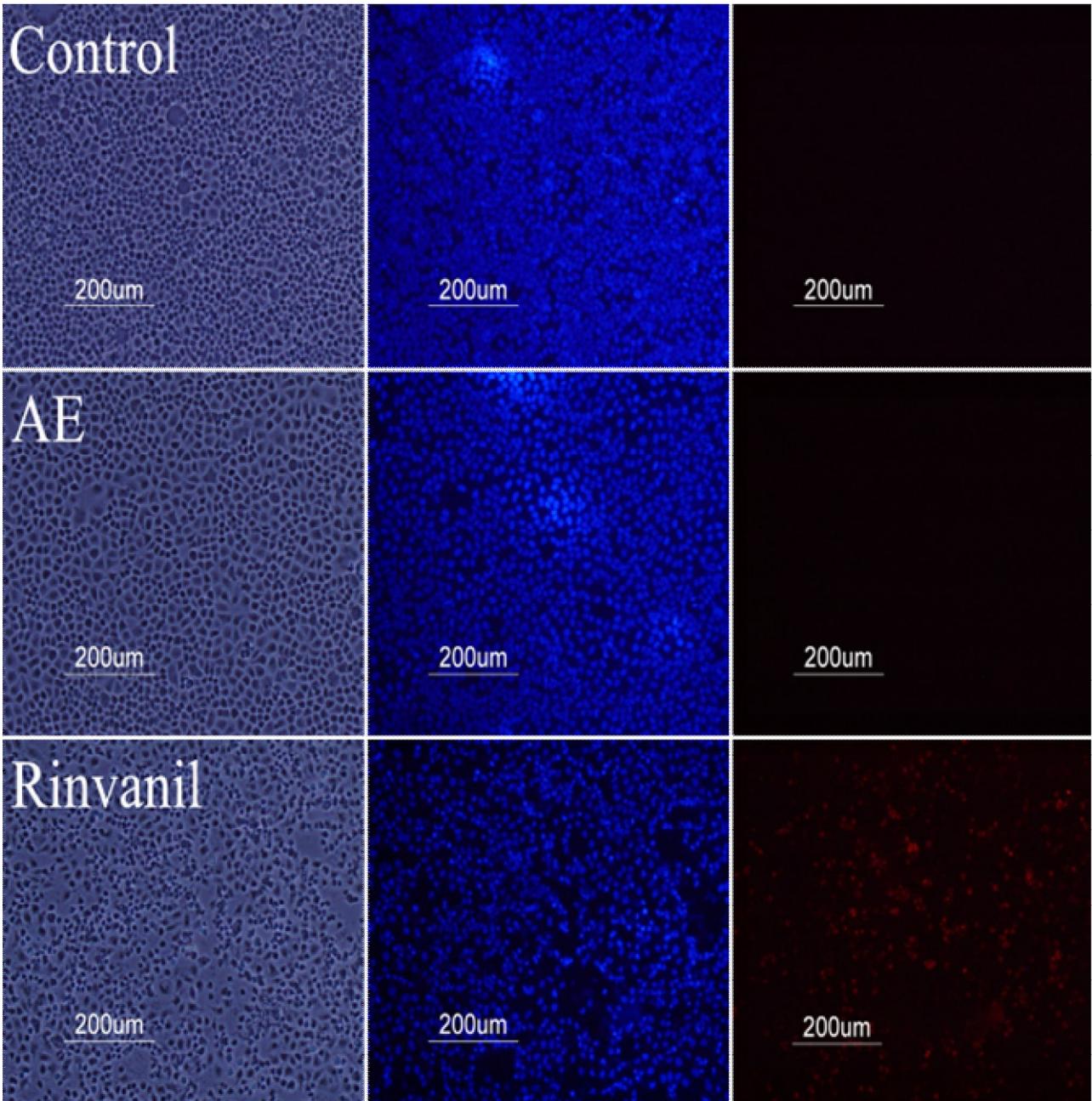
Fragmentación de ADN.

Al evaluar la fragmentación de ADN como un parámetro más de muerte celular, que indica un estado irreversible en el proceso de muerte, se encontró que las líneas celulares CaSki y ViBo fueron altamente positivas a la reacción de TUNEL, no así la línea celular HeLa que si bien es positiva a la reacción de TUNEL la población con marca fue menor (Figura 15).

Los cultivos de la línea celular CaSki (Figura 15a) fueron marcados con la reacción de TUNEL así como con DAPI, este último es un fluorocromo afín a la cromatina. Los controles testigo y AcEt fueron negativos a la fragmentación de ADN y la tinción con DAPI deja ver núcleos con tamaño regular y homogéneo con un patrón de fluorescencia similar. Sin embargo el tratamiento con rinvanil si es positivo a la fragmentación de ADN, la marca se distribuye ampliamente en la población del cultivo, además la tinción con DAPI deja ver núcleos con regiones más brillantes, éstas son indicativas de regiones de alta condensación de ADN, lo cual es característico de un proceso apoptótico.

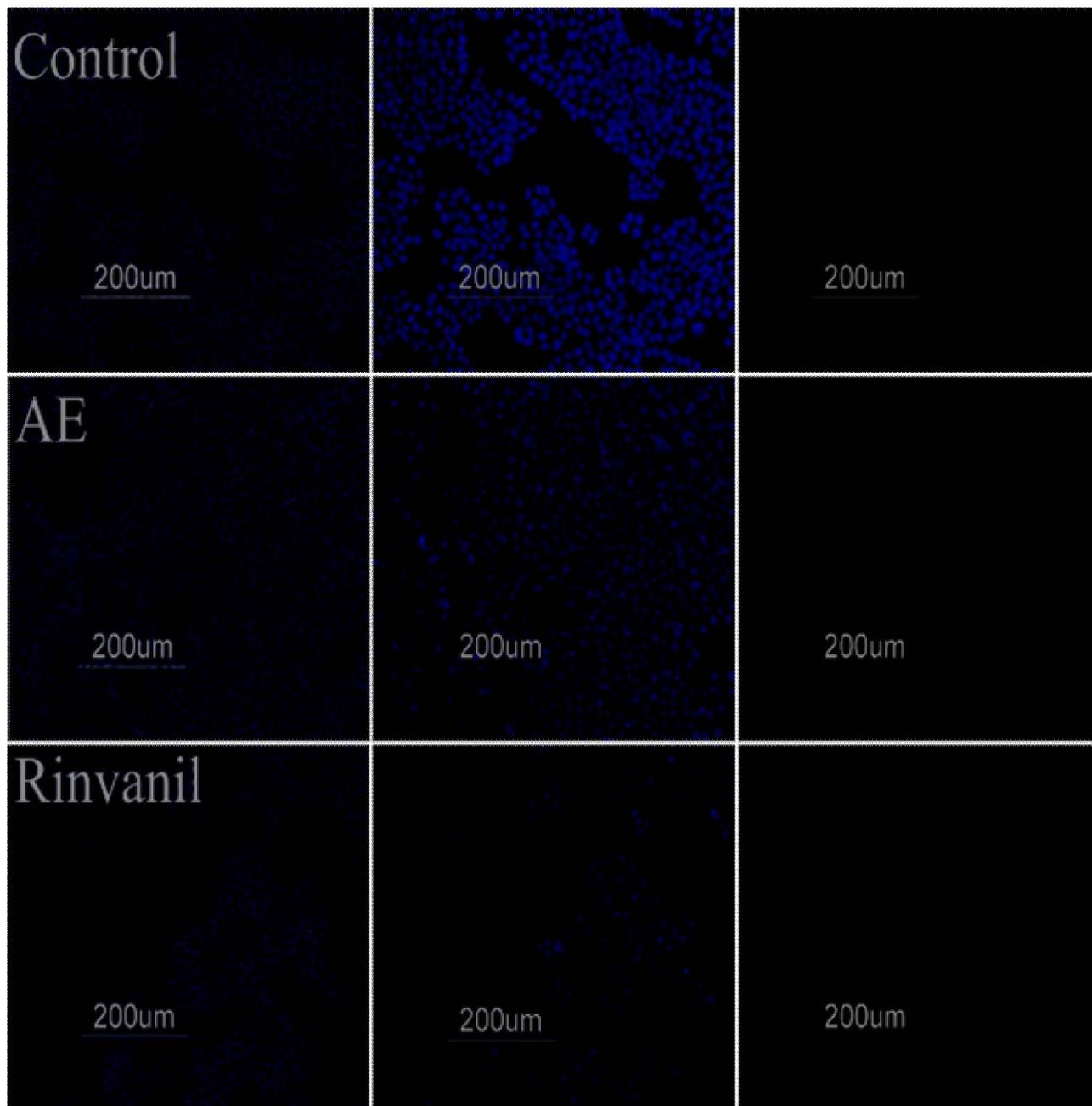
Los cultivos de la línea celular HeLa (Figura 15b) al igual que CaSki fueron marcados con la reacción de TUNEL y DAPI. Los cultivos control fueron negativos a fragmentación de ADN y la tinción con DAPI mostró núcleos de tamaño homogéneo y fluorescencia similar. El tratamiento con rinvanil indujo fragmentación de ADN, pero en menor medida, la observación de núcleos con condensación de ADN correspondió exactamente con los núcleos positivos a TUNEL.

Los cultivos de la línea celular ViBo (Figura 15c) fueron negativos a fragmentación de ADN, y la tinción con DAPI mostró regularidad en la forma y tamaño nuclear. El tratamiento con rinvanil indujo fragmentación de ADN de manera generalizada en el cultivo y la marca con DAPI correspondió con la condensación de la cromatina.



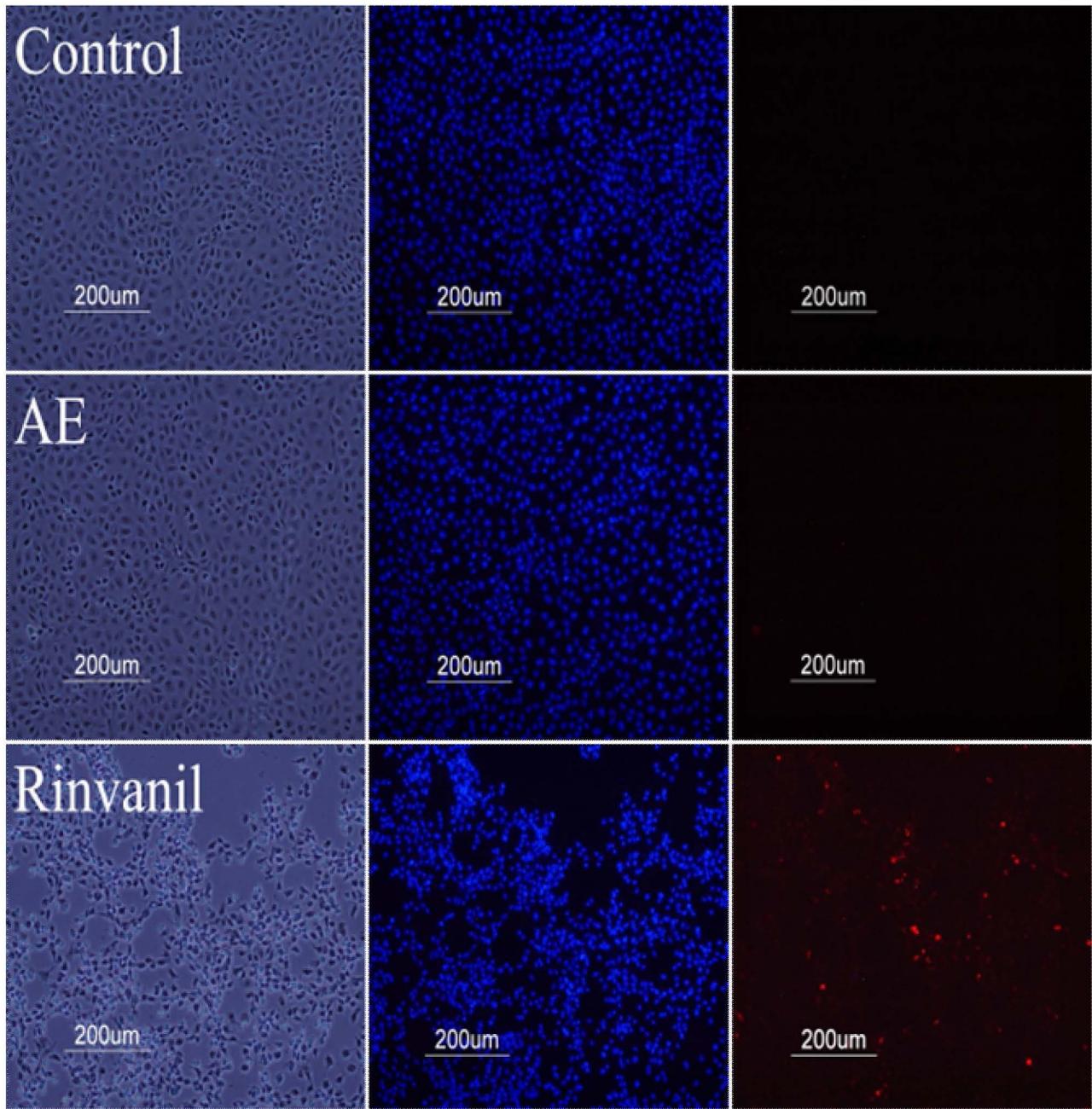
CaSki TUNEL

Figura 15a. Cultivos de la línea celular CaSki marcados con la reacción de TUNEL (rojo) y DAPI (azul). Cultivos de 3×10^5 sobre cubreobjetos de 1X1 cm en cajas de Petri de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo con los tratamientos: control (testigo), vehículo AcEt y rinvanil IC50.



HeLa TUNEL

Figura 15b. Cultivos de la línea celular HeLa marcados con la reacción de TUNEL (rojo) y DAPI (azul). Cultivos de 3×10^5 sobre cubreobjetos de 1×1 cm en cajas de Petri de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo con los tratamientos: control (testigo), vehículo AcEt y rinvanil IC50.



ViBo TUNEL

Figura 15c. Cultivos de la línea celular ViBo marcados con la reacción de TUNEL (rojo) y DAPI (azul). Cultivos de 3×10^5 sobre cubreobjetos de 1×1 cm en cajas de Petri de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo con los tratamientos: control (testigo), vehículo AcEt y rinvanil IC50.

Efecto de rinvanil sobre el potencial proliferativo de células no tumorales.

Células fibroblásticas de cérvix

Con el propósito de determinar si rinvanil presenta actividad selectiva sobre líneas celulares de CaCU sin afectar el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células fibroblásticas obtenidas de cérvix humano (no tumoral) y de linfocitos de sangre periférica humana fueron tratados con las IC50 obtenidas para las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo.

Cultivos primarios de fibroblastos obtenidos de cérvix de pacientes sanas a las que se les practica histerectomía por causas no relacionadas a CaCU, son estimulados con las IC50 de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo (Figura 16). Los datos obtenidos muestran que las células fibroblásticas estimuladas a las concentraciones de 62.24 y 90.87 $\mu\text{g/ml}$, correspondientes a las IC50 de las líneas celulares CaSki y HeLa no presentan efecto sobre el número celular, ni sobre la forma de las células, ya que la forma aguzada de las células fibroblásticas se conserva, sin presentarse pérdida de adherencia, además las células se orientan en ases bien definidos (Figura 17); sin embargo la concentración de 149.13 induce una disminución del 17 % en el número celular de cultivos de estas células fibroblásticas estimuladas por 24 h, además de afectar la forma de estas células, ya que se aprecia reducción en longitud así como aumento en el grosor de éstas.

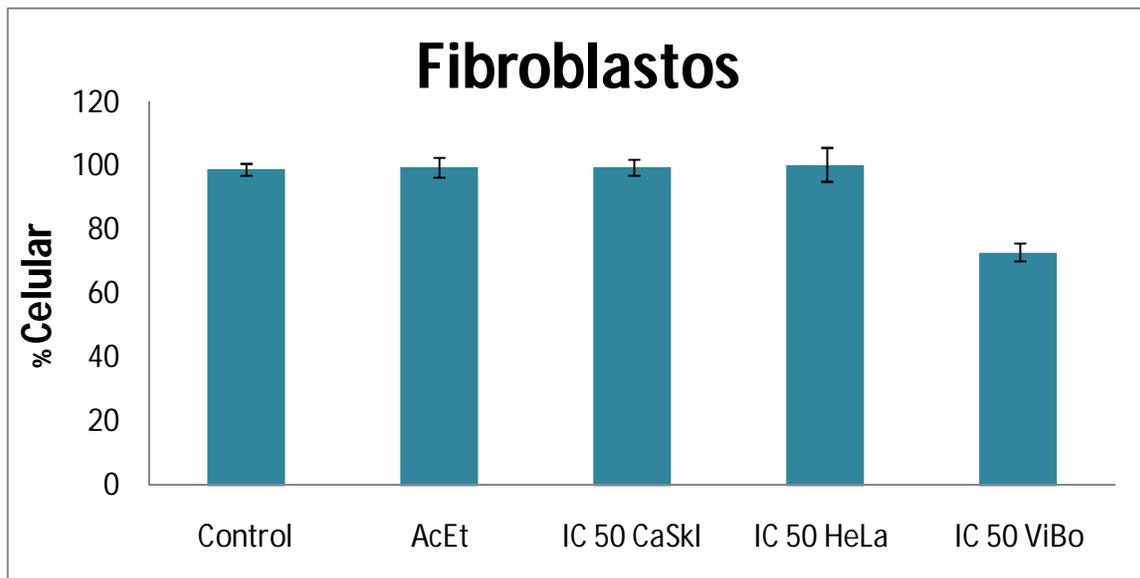


Figura 16. Efecto de rinvanil sobre cultivos primarios de fibroblastos de cérvix (10^4 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos) estimulados por 24 h con las IC50 obtenidas para las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. El número celular se determinó por la incorporación del colorante cristal violeta. La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada ensayo se hizo por sextuplicado (* $p < 0.05$ vs AcEt, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

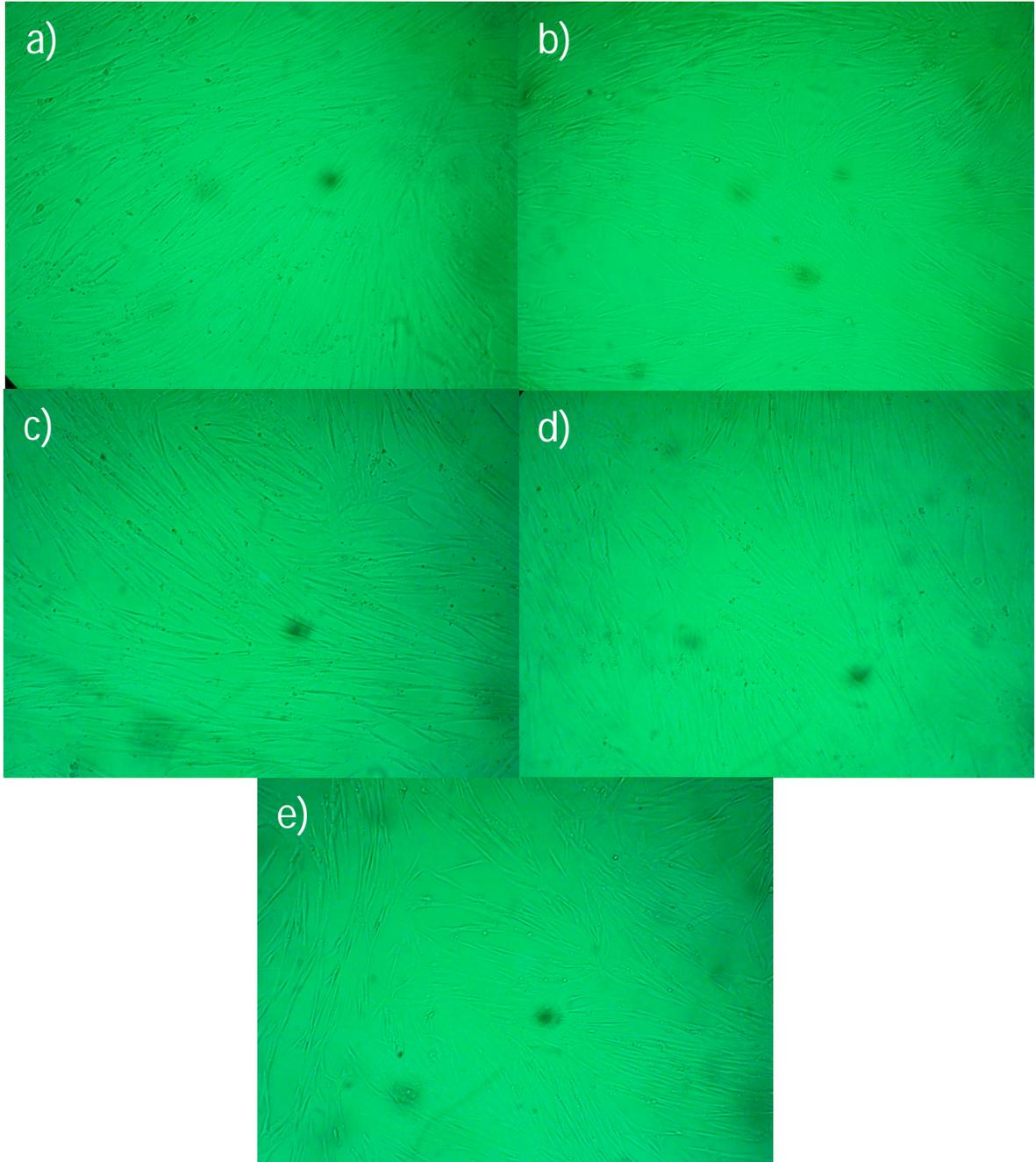


Figura 17. Efecto de rinvanil sobre fibroblastos de cérvix humano: control (a), AcEt (b), IC50 CaSki (c), IC50 HeLa (d), IC50 ViBo (e). 10^4 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos estimulados por 24 h con las respectivas IC50 obtenidas para las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. Cultivos observados a 100 aumentos.

Linfocitos humanos de sangre periférica

Para determinar si rinvanil afecta el potencial proliferativo de cultivos de linfocitos humanos, éstos fueron cultivados en presencia de rinvanil a una concentración de 149.13 µg/ml. Los datos obtenidos indican que la concentración de rinvanil empleada, no afecta negativamente el potencial proliferativo de cultivos primarios de linfocitos humanos extraídos de sangre periférica humana. Los cultivos estimulados con el mitógeno FHG desarrollaron un 50.65 % de proliferación, mientras que los tratados con AcEt y rinvanil, también en presencia de FHG, desarrollaron 42.19 % y 65.97 % respectivamente (Figura 18).

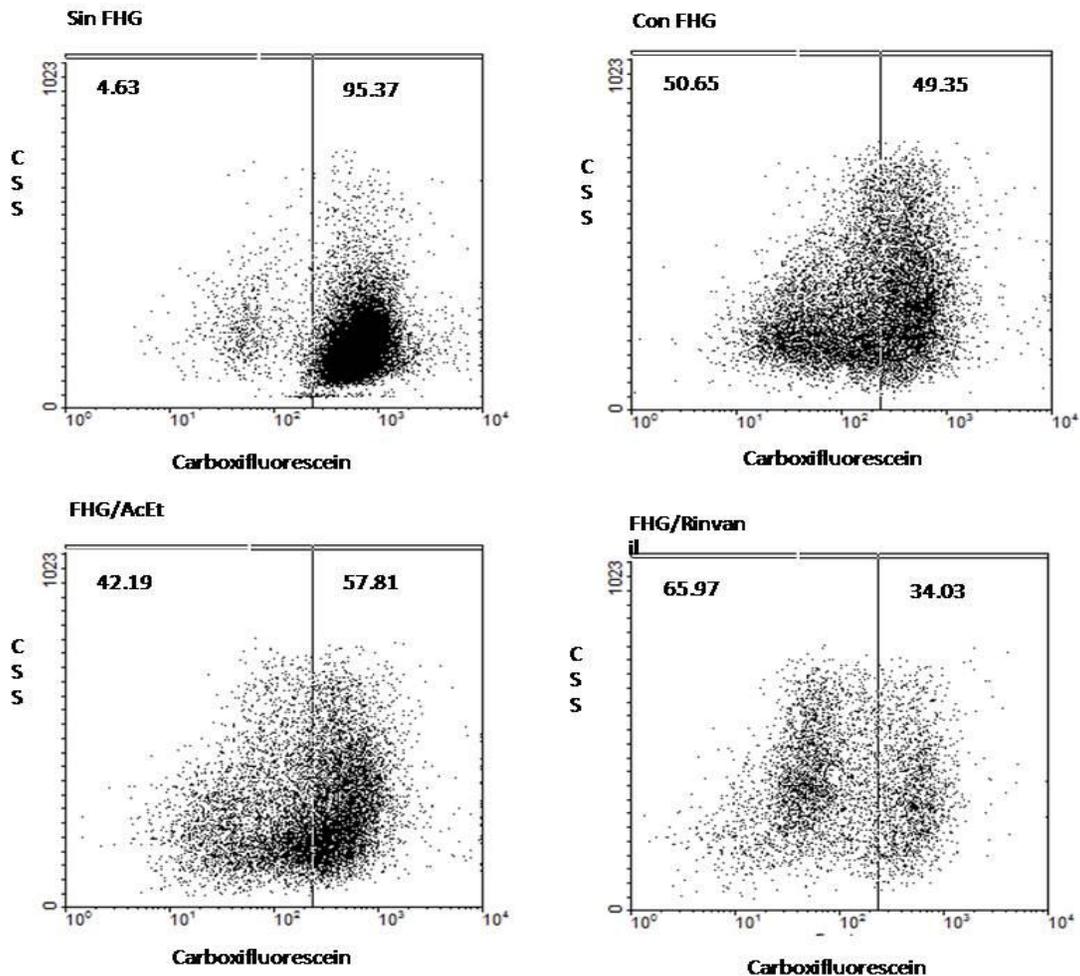


Figura 18. Efecto de rinvanil sobre cultivos de linfocitos humano estimulados por 72 h con la IC50 correspondiente a la línea celular ViBo. Cultivos de 2×10^5 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con un volumen de 200 µl, marcados con CFS. La evaluación se realizó por citometría de flujo. La figura representa uno de cuatro ensayos independientes.

Como parámetro comparativo se determinó si el compuesto rinvanil induce muerte celular por necrosis en cultivos primarios de linfocitos humanos, para ello se realizó la misma prueba para medir actividad de la enzima LDH en los medios de cultivo de estas células, encontrando que en estos cultivos el compuesto no induce una necrosis a la concentración de la IC50 más alta 149.13 $\mu\text{g/ml}$. Esta concentración sólo indujo actividad de LDH en un 5.05 % cultivos tratados con rinvanil, la cual está por debajo de la actividad detectada en los cultivos controles (Figura 19).

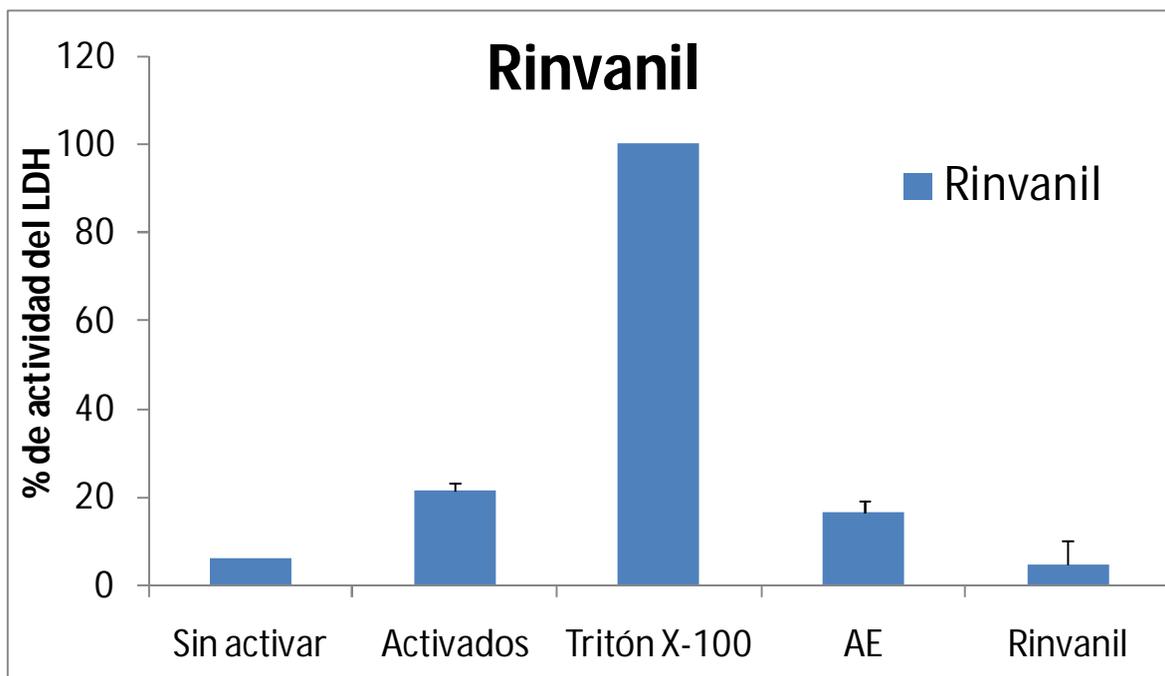


Figura 19. Determinación de actividad de LDH en cultivos de linfocitos humanos (200,000 células por pozo, 200 μl por pozo en placas de cultivo de 96 pozos) estimulados con la IC50 de ViBo. La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado (* $p < 0.05$ vs AcEt, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Células	Citotoxicidad	Citotoxicidad Real
Linfocitos	5.05%	0%

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En México el cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte en mujeres de 35 a 60 años de edad. Actualmente los tratamientos aplicados contra el cáncer cervicouterino carecen de selectividad sobre células tumorales y carecen de éxito en estadios avanzados de esta enfermedad, además provocan efectos secundarios graves que afectan la calidad de vida del paciente. Esta situación ha alentado un creciente interés en la búsqueda de nuevas sustancias antitumorales con propiedades quimioterapéuticas que puedan inhibir y eliminar el proceso oncogénico y que sean de origen natural, especialmente de origen vegetal. Entre las familias de compuestos de origen vegetal más ampliamente estudiadas se encuentra la de compuestos capsaicinoides, cuyo representante más ampliamente estudiado es la capsaicina, uno de los componentes principales de la comida en varias culturas del mundo. La capsaicina es extraída de los frutos del género *Capsicum* y se le ha encontrado usos medicinales como analgésico y ahora como antitumoral; no sólo se ha explorado su papel como producto alimenticio, sino que actualmente se desean encontrar compuestos bioactivos, derivados o análogos, con propiedades quimioterapéuticas o quimiopreventivas que puedan inhibir el proceso oncogénico. Por ejemplo se ha reportado que los capsaicinoides (Zhang *et al*, 2003) han mostrado inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer. Entre los compuestos que despiertan mayor interés tenemos a la capsaicina, por los resultados que ha mostrado frente a líneas celulares de cáncer gástrico, leucemia, cáncer de hígado, entre otras. Sin embargo, pese a sus excelentes aplicaciones farmacológicas (Young Joon, 2002), su uso está restringido por efectos secundarios inherentes e indeseables, como una fuerte irritabilidad, hiperalgesia (Castillo *et al*, 2008) y difícil manejo, lo que generó la necesidad de desarrollar moléculas análogas que conserven o mejoren tal propiedad. Rinvanil es un análogo vaniloide de la capsaicina, carece de pungencia, es de fácil manejo y presenta mayor afinidad al receptor TRPV1 que la capsaicina (Castillo *et al*, 2008), pero no hay registros del efecto de este compuesto sobre líneas celulares de cáncer y específicamente de CaCU.

Para determinar el rango de concentraciones en el cual rinvanil presenta su actividad antiproliferativa, las líneas celulares de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con concentraciones de 12 a 200 $\mu\text{g/ml}$, rango de concentraciones que concuerda con evaluaciones realizadas a diferentes capsaicinoides (Macho *et al*, 2003). Las líneas celulares CaSki y HeLa están infectadas con el VPH 16 y 18 respectivamente, tipos virales que se presentan en el 75 % de casos de CaCU. Las IC50 determinadas para estas dos líneas celulares son de 90.87 y 62.24 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la línea celular ViBo presentó la concentración IC50 más alta con 149.13 $\mu\text{g/ml}$. Esta línea celular no está infectada por el VPH situación que se presenta en menos del 1 % de los casos de CaCU (Monroy *et al*, 1992). Los tratamientos con rinvanil de las tres líneas celulares de CaCU a concentraciones

de sus correspondientes IC50 indujo alteraciones en las formas de estas células, siendo evidentes las pérdidas de adherencia y de volumen, lo que indica un proceso de muerte.

Se ha documentado que el efecto antiproliferativo de un agente quimioterapéutico puede depender de una acción citostática, es decir, que detenga la progresión del ciclo celular en alguna de sus fases, o bien que sea un efecto inductor de muerte celular que puede o no ser dependiente del ciclo celular (Mandal *et al*, 2007). Al evaluar ciclo celular en estas tres líneas de CaCU, únicamente CaSki y HeLa se vieron alteradas en la proporción de la población que se encuentra la fase G1, ésta disminuyó, pero se presentó un correspondiente aumento en el estado de SubG1, el cual se define como una región que, de acuerdo a la evaluación por marcaje con yoduro de propidio, representa a la subpoblación de células que tienen una menor cantidad de contenido nuclear (2n) y que se considera son células que están en un proceso de muerte.

Se sabe que compuestos de origen natural, (Berhow, 2007) como las sapogeninas, (Chun-Te *et al*, 2007) tienen propiedades hemolíticas, por lo que para determinar si rinvanil afecta la membrana plasmática de las células CaSki, HeLa y ViBo, e induce muerte celular necrótica, se evaluó la presencia de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de estas líneas celulares, encontrando que únicamente las células CaSki presentaron una diferencia significativa con respecto a su control AcEt, alcanzando un 26.31 % de actividad de esta enzima. Sin embargo tal actividad no da cuenta de la disminución del 50 % en el número celular por lo que se procedió a evaluar muerte celular por apoptosis. Las líneas celulares HeLa y ViBo no presentaron diferencias significativas con sus controles de AcEt.

Los compuestos capsaicinoides pueden inducir muerte celular por apoptosis (Sánchez *et al*, 2007) y rinvanil presenta la misma actividad. Al evaluar la actividad de caspasa 3 en lisados de cultivos tratados con rinvanil, las tres líneas celulares fueron positivas a caspasa 3 en grado variable siendo CaSki la que presentó un 60 % más actividad que el control positivo inducido con camptotecina, una agente alcaloide que se sabe induce muerte celular por apoptosis (Shimizu *et al*, 1997), le sigue ViBo con 45 % y HeLa con 13 % de la actividad alcanzada por camptotecina.

Dentro del proceso de muerte celular apoptótica la fragmentación de ADN, seguida de la activación de caspasa 3 es un indicativo de un proceso irreversible. Las tres líneas celulares fueron positivas a la marca de fragmentación de ADN, lo cual concordó con una segunda marca con DAPI, al mostrar condensación de cromatina.

Los resultados anteriores demuestran que rinvanil induce una disminución de la proliferación de las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo dependiente de la concentración, es decir, al aumentar la concentración de rinvanil en los cultivos, disminuye el número celular a las 24 h de estímulo. Tal abatimiento del número celular se debe a una inducción de muerte celular por necrosis y apoptosis en las células CaSki y solo el efecto

apoptótico en las células HeLa y ViBo. Al determinar que las células tratadas con rinvanil mueren, ya sea por necrosis y apoptosis, o únicamente por apoptosis, es de esperar que el descenso en la población encontrado en la fase G1 se deba, en efecto, a un proceso de muerte.

Los agentes terapéuticos empleados en el tratamiento contra el cáncer afectan también a células normales que se encuentran en estado de proliferación, por lo que un tratamiento quimioterapéutico afecta tanto células anormales como normales, desencadenando efectos secundarios adversos que minan la calidad de vida del paciente (Bronner *et al*, 1983). Al probar el efecto de rinvanil sobre cultivos de fibroblastos se encontró que a las concentraciones de la IC50 de CaSki y HeLa (62.24 y 90.87 $\mu\text{g}/\text{m}$) no afectan el número celular a las 24 h de cultivo, sin embargo la IC50 (149.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de las células ViBo afecta negativamente el número celular, induciendo una disminución del 17 % a las 24 h de cultivo.

Los agentes quimioterapéuticos aplicados de manera sistémica inducen un descenso en el conteo de leucocitos en sangre (Dunagin, 1982; Ellis, *et al*, 2009), siendo éste una consecuencia del abatimiento de células en estado de proliferación. Al determinar el efecto de rinvanil sobre cultivos de linfocitos se encontró que la concentración IC50 de ViBo, la más alta (149.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$), no afecto el potencial proliferativo de los linfocitos, de igual manera, no induce muerte celular por necrosis en cultivos estimulados por 72 h.

Los resultados anteriores, obtenidos de cultivos primarios de fibroblastos y linfocitos humanos, muestran un nulo o escaso efecto sobre la capacidad proliferativa de estas células. Las células fibroblásticas son poco afectadas con la concentración de 149.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mientras que afecta en un 50 % a las células ViBo. Es interesante mencionar que tal concentración afecta a células no infectadas por el VPH, lo que representa menos del 1 % de los casos de CaCU. Los resultados indican que rinvanil es un compuesto análogo a la capsaicina con actividad antitumoral y selectiva, lo cual lo coloca como un candidato para continuar la evaluación en modelos *in vivo*, además de perfilarse como una posible aplicación terapéutica.

CONCLUSIONES:

- El Rinvanil reduce la densidad celular al 50% en las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino en las siguientes concentraciones:
 - CasKi: 90.87 $\mu\text{g/ml}$
 - HeLa : 62.24 $\mu\text{g/ml}$
 - ViBo: 149.13 $\mu\text{g/ml}$
- Hay detención en el ciclo celular en ViBo, en G2/M y una afectación en HeLa y CaSki en G1 por efecto del rinvanil.
- Rinvanil induce muerte celular por necrosis en CaSki un 26.31% y casi nula en HeLa y ViBo.
- Rinvanil induce expresión de caspasa 3 activa en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.
- Rinvanil induce fragmentación de ADN en CaSki, HeLa y ViBo
- No hay un daño considerable en células de sangre periférica humana (linfocitos) y fibroblastos de cérvix por efecto del rinvanil.
- El rinvanil no afecta cultivos de células fibroblásticas a las concentraciones de 62.24 y 90.87 $\mu\text{g/ml}$, afectando sólo en un 17 % a la concentración de 149.13 $\mu\text{g/ml}$.
- El rinvanil no afecta el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica, ni induce muerte celular por necrosis aún a la concentración de 149.13 $\mu\text{g/ml}$.

BIBLIOGRAFÍA.

Adams J. M. and Cory S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cáncer development and therapy. *Oncogene*; 26: pp 1324-1337.

Aguirre-Ghiso J. A. (2007). Models, Mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Review Cancer*; 7: pp 834-846.

Ahmed Z. and Bicknell, R. (2009). Angiogenic signaling pathways. *Methods Mol. Biol*; 467: pp 3-24.

Alonso de Ruiz P., Lazcano-Ponce E. y Hernandez-Avila M. *Cáncer Cervicouterino diagnóstico prevención y control*. Mexico, DF. Editorial Médica Panamericana. (2000). pp 254.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y P. Walter.. *Introducción a la biología celular: Cáncer*, Madrid. 2 Ed. Editorial Panamericana. (2006): pp 726-736.

Alemán E. M. (2007). *Boletín de información científica para el cuidado en enfermería*. Instituto Nacional de Salud Pública de México.

Amaravadi, R. K. y Thompson, C. B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cáncer tretment. *Clinical Cancer Research*; 13: pp 7271-7279.

Anaya J., Cañas C. y Cervera R.. *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. Apoptosis*, Colombia 1ª ed. Editorial Corporación para investigaciones biológicas. (2005). pp: 171-174.

Appendino G., Minassi A. y Nives D. (2005a). Hot cuisine as a source of anti-inflammatory drugs. *Phytochem Reviews*; 4: pp 3-10.

Appendino G., De Petrocellis L., Trevisani M., Minassi A., Daddario N., Moriello A. S., Gazzieri D., Ligresti A., Campi B., Fontana G., Pinna C., Geppetti P. y V. Di Marzo. (2005b). Development of the first ultra-potent “capsaicinoid” agonist at transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels, and its therapeutic potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 312: pp 561–570.

Appendino G., Minassi A., Morello A., De Petrocellis L. y V. Di Marzo. (2002). N-acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*; 45: pp 3739-3745.

Arends M. J., Buckley CH., Wells M. (1998). Aetiology, Pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol*; 51: pp 96-103.

Avendaño C. y Menéndez J. *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. Inglaterra, Editorial Elsevier Oxford. (2008). pp 53.

Baumforth, K., J. Crocker. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Inglaterra, Editorial Wiley, (2003), pp 49-61.

Baynes J. M. y Dominiczak M. H. *Bioquímica médica*. España, 2a edición. Editorial Elsevier. (2008). pp: 703.

Bergers, G., y Hanahan, D. (2008). Modes of resistense to antiangiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer*; 8: pp 592-603.

Berhow A. (2007). Carcinogenesis. *Centro nacional de investigación de utilización agrícola*; 26: pp. 156-157.

Bode A. M., Cho Y. Y., Zheng D., Zhu F., Ericson M. E. and Ma W. Y. (2009). Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. *Cancer Research*; 69: pp 905-13.

Boticario B. C. (2005). ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*; 71: pp 609-633.

Bhutani M., Pathak A., Sethi G. y B. Aggarwal. (2006). Capsaicin induces G1/S cell cycle arrest leading to apoptosis of multiple myeloma cells through suppression of STAT3 activation and STAT3-regulated gene products. *Journal of Clinical Oncology*. 24 (18): pp 2006-2039.

Bousarghin L., Touzé A., Sizaret P. y P. Coursaget. (2003). Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology*; 77: pp 3846-50.

Bronner A. K. and Hood A. F. (1983). Cutaneous complications of chemotherapeutic agents. *J Am Acad Dermatol*; 9: pp 645-663.

Caballero A. y Moran J. (2002). Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *REB*; 21: pp 235-244.

Carmeliet, P., y Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*; 407: pp 249-257.

Castillo E., Regla I., Demare P., Luviano A. and A. López. (2008). Efficient chemoenzymatic Synthesis de phenylacetylirivanil: An ultrapotent capsaicinoid. *Synlet*; 18: pp 2869-2873.

Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D. y Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*; 389: pp 816-24.

Chih-Chung W., Jing-Pin L., Jai-Sing Y., Su-Tze C., Ssu-Ching C., Yuh-Tzy L., Hui-Lu L. y C. Jing-Gung. (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. *Mutation Research*; 601: pp 71-82.

Chow J., Norng M., Zhang J., y J. Chai. (2007). TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells-mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1773: pp 565-576.

Chun-Te C., Tzong-Der W., Shang-Jie T. & Jen-Kun L. (2007). ”Diosgenin, a naturally occurring steroid, supresses fatty acid synthase expression in her-overexpressing breast cancer cells through modulatingr-akt, m tor and jnk phosphorylation”. *FEBS Letters*; 581.

Darzynkiewicz Z. (2002). Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Hematol Clin North Am*; 16: pp 339-45.

Díaz L., Chiong M., Quest A., Lavandero S. y A. Stutzin. (2005). Mechanisms of cell death: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Cell Death and Differentiation*; 12: pp 1449–1456.

Dunagin W. G. (1982). Clinical toxicity of chemotherapeutic agents: Dermatologic toxicity. *Semin Oncol*; 9: pp14-22.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*; 35(4): pp 495–516.

Ellis L. M. y Reardon D. A. (2009). Cancer: The nuances of therapy. *Nature*; 458: pp 290-292.

Fink S. and Cookson T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*; 4: pp 1907–1916.

Fisher D. (2001). Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol Oncol Clin North*; 15: pp 931-56.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu. Rev. Med*; 57: pp 1-18.

- Folkman, J. y Kalluri, R. (2004). Cancer without disease. *Nature*; 427: pp 787.
- Garnett T. and Duerksen P. (2006). Modulation of Apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *National Institute of Health*; 151: pp 2321–2335.
- Ghilardi J. R., Rohrich H., Lindsay T. H., Sevcik M. A., Schwei M. J., Kubota K. (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neuroscience*; 25: pp 3126-31.
- Grigsby PW, Perez CA (1991). Radiotherapy alone for medically inoperable carcinoma of the cervix: stage IA and carcinoma in situ. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21(2): 375-378.
- Gokul C. D., David H., Rafael G. y Charles H. (2001). Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose–response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letters*; 165: pp 147-153.
- Hanahan D. y Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: pp 57-70.
- Hanahan D. y Weinberg R. A. (2011). The hallmarks of cancer, the next generation. *Cell*; 144: pp 646-674.
- Herdman C. y Sherris J. (2002). Planificación de programas apropiados para la prevención del cáncer cervicouterino. 3ª edición. Editorial Organización Panamericana de la Salud. México, 234 pp.
- Han P., McDonald H., Bianchi B., Kouhen R., Vos M., Jarvis M., Faltynek C., y R. Moreland. (2007). Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochemical Pharmacology*; 73: pp 1635-1645.
- Hernández M. y M. Ríos. (1999). Oncogenes y cáncer. *Revista Cubana de Oncología*; 15: pp 13-19.
- Hidalgo A. y Salcedo M. (2001). Estrategias de análisis global, hacia el manejo genético de las neoplasias. *Investigación Clínica*; 535: pp 430-44.
- Karp G. (1996). *Biología celular*, 2 ed. Mc Graw Hill, México DF. pp: 950
- Kathleen H. (2001). Natural compounds in cancer therapy, *review alternative medicine review*. Consultada: 3 de enero de 2011. Disponible en: http://findarticles.com/p/articles/mi_m0FDN/is_4_6/ai_78539422/
- Kaufmann H. y Earnshaw W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*; 256: pp 42–49.

Keys HM, (1999). Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N.Engl.J.Med*; 340:1154-61.

Kim R., Tanabe K., Uchida Y., Emi M., Inoue H. y Toge T. (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol*; 50: pp 343–352.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. and Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death & Differentiation*; 16: pp 3–11.

Kroemer, G., y Pouysser, J. (2008). Tumor cell metabolism: Cancers Achilles' heel. *Cancer cell*; 13: 472-482.

Kueng W., silver E. y V. Eppenverg. (1989). Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical*; pp: 186.

Lacruz C., Di Martino B. y E. Álvarez. (2003). Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (VPH) en las lesiones escamosas del cérvix uterino. *Revista Española de Patología*; 36: pp 79-84.

Lane, D.P. (1992). Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature*; 358: pp 15-16.

Lazcano E., Alonso de Ruiz P., Hernandez M. *Cancer Cervicouterino. Diagnostico, prevención y control*. 1ª ed. Editorial panamericana. (2000). pp: 3-40

Lewis M. *Análisis de la Situación del cáncer cérvico-Uterino en América Latina y el Caribe*. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C. (2004). pp: 32.

Lodish H., Berk A., Matsudaria P., Kaiser C., Scott M. P., Zipursky S. L. y Darnell J. (2005) *Biología celular y molecular*. 5a edición. Editorial Médica Panamericana. México. pp 973.

Lopez A. y Lizano M. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La Historia que no termina. *Cancerología*; 1: pp 31-55.

Macho A., Lucena C., Sancho R., Daddario N., Minassi A., Muñoz E. y Appendino G. (2003). Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper: Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *Eur. J. Nutriology*; 42: pp 2-9.

Mandal S., Berube G., Asselin E., Richardson V. J., Church J. G., Bridson J., Pham N. Q., Pramanik S. K. and Mandal S. K. (2007). A new platinum complex of triazine demonstrates G1 arrest with novel biological profile in human breast cancer cell line, MDA-MB-468. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*; 17(8): pp 2139-2145.

McCloskey D. E., Kaufmann S. H., Prestigiacomo L. J. and Davidson N. E. (1996). Paclitaxel induces programmed cell death in MDA-MB-468 human breast cancer cell. *Clinical. Cancer Research*; 2: pp 847-854.

Mesa V., Lomanto L., Ortiz O., Breton C., Gomez A. (2003). El ciclo celular. *Med UNAB*; 16: pp 21-29.

Moeller S. J. (2006): G1 Phase: Components, Conundrums, context. *Results Probl Cell Differ*; 42: pp 1-29.

Monroy G. A., Rangel C. R., Rocha Z. L., Trejo B. C., Ramírez G. J., Martínez R. D., y Weiss-Steider B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Rev Mex Oncol*; 7: pp 69-76.

Montell C. y Rubin G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*; 2: pp 1313-23.

Moore T., Moore A., Carrasco D., Straten M., Arany I., Au W. y S. Tying. (2001). Human papillomavirus, smoking, and cancer. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*; 5: pp 323-328

Muñoz N. and X. Bosch. (1997). Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública México*; 39: pp 174-282.

Nashmyt K. (1996). Putting the cell cycle in order. *Science*; 277: pp 2854-2880.

Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Omote K, Namiki A. (2007) Bone cancer increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*; 148: pp 560-72.

Qiao S., Li W., Tsubouchi R., Haneda M., Murakami K. y M. Yoshino. (2005). Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosciency. Research*; 51: pp 175-183.

Reilly C., Taylor J., Lanza D., Carr B., Crouch D. y G. Yost. (2003). Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicological Sciences*; 73: pp 170-181.

Rivera Z., Delgado D., Painel P., Barrero P. y H. Larraín. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*; 71: pp 135-140.

Salazar L. y Silva C. (2004). Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta*; 1: pp 7-14.

Sánchez V. 2001. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica, *Revista Cubana Investigación Biomédica*; 20(4): pp 266-274.

Sánchez A., Malagarie S., Vara N., Chiloeches A. e I. Diaz. (2007). Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*; 12: pp 2013–2024.

Steren A, Nguyen HN, Averette HE, (1993). Radical hysterectomy for stage IB adenocarcinoma of the cervix: the University of Miami experience. *Gynecologic Oncology* 48(3): 355-359.

Stevens A. y Lowe J. Anatomía patológica. 2ª edición. Editorial Elsevier. España. (2001) pp 652

Surh Y., Lee S. (1996). Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chemical Toxicology*; 34: pp 313-316.

Szallasi A. and Blumberg P. (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*; 51: pp 159–212.

Shimizu T. and Pommier Y. (1997) Camptotecin induced apoptosis in p53 null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-vad-fmk and dicloroisomarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia*; 11: pp 1238-1244.

Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F. y G. Borges. (2005). *Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas*. Salud Pública México; 47: pp 342-350.

Tolis C., Peters G. J., Ferreira C. G., Pinedo H. M. and Giaccone G. (1999). Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *European Journal of Cancer*; 35: pp 796-807.

Venkatachalam K. and Montell C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*; 76: pp 387-417.

Wayne N. Becker ; Lewis J. Kleinsmith ; Jeff Hardin. (2006). *El mundo de la célula*. Ed. Prentice Hall. 6ª Edición. Madrid. pp. 20-50.

Weinberg R. (1989). Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Reseach*; 49: pp 3713-3721.

World Health Organization. (2008). *International Agency for Research on Cáncer*. Tomado el 03 de enero del 2011 de: <http://www.iarc.fr>

Winter J., Bevan S. and E. Campbell. (1995). Capsaicin and pain mechanism. *British Journal of anaesthesia*; 75: pp 157-168.

Young Joon S. (2002). More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*; 94: pp 1263-1265.

Young Joon S. and S. Lee. (1995). Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sciences*; 22: pp 1845-1855.

Zhang J., Nagasaki M., Tanaka Y. y S. Morikawa. (2003). Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia Reseach*; 27: pp 275-83.

Zhaoyu J. y W. El-Deiry. (2005). Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*; 4:139-163.

Zur Hausen H., (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. 2: pp 342-350.

APÉNDICE

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

Sales inorgánicas	Cantidad (g/l)
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	6
Cloruro de sodio	0.8
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	
Aminoácidos	
L-Arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina • 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.0652
Glicina	0.02
L-Histidina	0.02
Hidroxi-L-prolina	0.3
L-isoileucina	0.01
L-leucina	0.015
L-Lisina • HCl	0.015
L-Metionina	0.02
L-fenilalanina	0.05
L-prolina	0.05
L-serina	0.05
L-treonina	0.05
L-triptófano	0.05
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.04
L-valina	0.015
	0.015
	0.02
	0.03
	0.02
	0.005

	0.02883
	0.02
Vitaminas	
D-Biotina	
Cloruro de colina	0.0002
Ácido fólico	0.003
myo-inositol	
Niacinamida	0.001
ácido p-aminobenzoico	
D-ácido pantoténico (hemicalcium)	0.035
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	
tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.00025
	0.001
	0.0002
	0.001
	0.000005
Otros	
Glutación (reducido)	0.001
Rojo de fenol • Na	0.0053
Adicionar	
Bicarbonato de Sodio	2

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, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.04 g (SIGMA, U.S.A)
Etilen – diamen- tetra- acético (EDTA)	0.40 g (SIGMA, U.S.A)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 M 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, U.S.A)
Cloruro de calcio	0.10 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.20 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato mono ácido de sodio	2.16 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato di ácido de potasio	0.20 g (SIGMA, USA)

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 8 N 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 500 ml 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.

Glutaraldehído

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2%)

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

Catalizador liofilizado

1 vial y solución colorante 45 ml.

Reconstituir el catalizador en 1 ml de H₂O mili Q estéril por 10 minutos y mezclar completamente. Esta solución es estable varias semanas a 4 °C.

Descongelar la solución colorante, ésta es estable a 4 °C varias semanas. Evitar ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Preparación de la mezcla de reacción (Bio Vision, California): Para 100 ensayos mezclar 250 µl de la solución del catalizador con 11.25 ml de la solución colorante. Esta mezcla deberá prepararse inmediatamente antes de ser utilizada.

Controles que se utilizan en la técnica de linfocitos con carboxifluoresceína

Columna	CSFE	PHA	
1	-	-	Control negativo
2	-	+	Activados sin carboxifluoresceína
3	+	-	Sin activar con carboxifluoresceína
4	+	+	Activados con carboxifluoresceína
5	+		Tratamiento
6	+		Vehículo