



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Efecto antiproliferativo e inductor de muerte de la capsaicina
y sus análogos FAR y Rinvanil, en líneas celulares de cáncer
cervicouterino***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biólogo. Alvarado Sansininea Jesús Javier

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Luis Sánchez Sánchez

FES Zaragoza

COMITÉ TUTOR: Dr. Benny Weiss Steider

FES Zaragoza

Dra. Rebeca López Marure

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D. F. A ABRIL DE 2014.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Efecto antiproliferativo e inductor de muerte de la capsaicina
y sus análogos FAR y Rinvanil, en líneas celulares de cáncer
cervicouterino***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biólogo. Alvarado Sansininea Jesús Javier

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Luis Sánchez Sánchez FES
Zaragoza**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Benny Weiss Steider
FES Zaragoza Dra.
Rebeca López Marure**

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

MÉXICO, D. F. A ABRIL DE 2014.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del subcomité de Biología Experimental y Biotecnología del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de febrero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumnado **ALVARADO SANSININEA JESÚS JAVIER** con número de cuenta 304030000 con la tesis titulada "EFECTO ANTIPROLIFERATIVO E INDUCTOR DE MUERTE DE LA CAPSAICINA Y SUS ANÁLOGOS FAR Y RINVANIL, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO", realizada bajo la dirección del M en C. **LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DR. BENNY WEISS STEIDER
Suplente: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS
Suplente: DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

En otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A FENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de marzo de 2014.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Experiencia del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), No. de becario 270132 y a la UNAM proyecto PAPIME PE206812 y PAPIIT IN222114 por el financiamiento brindado para la realización de esta tesis.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Benny Weiss Steider.

Dra. Rebeca Lopez Marure.

Por sus aportaciones para la realización de este trabajo.

AGRADEZCO A:

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 ayuda en las técnicas de microscopia con lo cual contribuyó en la culminación de este trabajo.

Al Dr. Hugo López Muñoz y al M. en C. Vicente Hernández, por siempre tener el tiempo para resolver mis dudas.

Al Comité tutorial, Dr. Benny Weiss Steider y Dra. Rebeca López Marure por sus observaciones en este trabajo, así como en mi evolución como profesional.

A los miembros del Jurado; Dr. Benny Weiss Steider, Dr. José Ignacio Regla Contreras, Dr. Alberto Monroy García, Dra. María Luisa Escobar Sánchez y Dra. María Isabel Soto Cruz, por enriquecer, mi formación académica y este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y compañía.

Al Dr. Ignacio Regla y al Laboratorio de Síntesis Orgánica UMIEZ, por elaborar los compuestos con los que realicé mi trabajo.

Al MD. Dionisio Parra y al Hospital Regional del ISSSTE, Ignacio Zaragoza por el apoyo brindado para la obtención de muestras de tejido.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. Laboratorio N° 2 Planta Baja del edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES Zaragoza UNAM.

DEDICATORIAS.

¿Quién soy yo?

Soy las manos de mi abuelo...

Soy las lágrimas de mi madre...

Soy la Fuerza de mi padre...

Soy todas las bromas de mis hermanos...

Soy el amor de quien me ama y la disciplina de mis maestros...

Soy la inspiración de muchos para seguir adelante...

Soy la gente que aplaudió mis éxitos...

Soy los consejos de cien hombres...

No soy sólo yo. Soy la suma de todos...

El orgulloso resultado del trabajo de Otros.

De todos aquellos que han tocado mi vida de tantas maneras.

Ahora, llego el momento... Es tiempo de dar.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Capsaicina	4
Cáncer	9
Cáncer cervicouterino	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
APÉNDICE	57

Figuras y Tablas.

Figura 1. Variantes de los frutos del género <i>Capsicum</i> , comúnmente conocido como chile	3
Figura 2. Molécula de la capsaicina	4
Figura 3. Tratamientos actuales en los cuales se utiliza la capsaicina.....	5
Figura 4. Estructuras y características del 12-fenilacetilrinvanil (FAR) y del Rinvanil.....	8
Figura 5. Desarrollo del cáncer	12
Figura 6. Acomodo de las células cervicales	13
Figura 7. Progresión de la infección por VPH a cáncer	15
Figura 8. El genoma del VPH.....	16
Figura 9. Efecto antiproliferativo de la capsaicina, FAR y Rinvanil sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo.....	33
Figura 10. Efecto antiproliferativo de la capsaicina, FAR y Rinvanil sobre fibroblastos de cérvix....	34
Figura 11. Efecto de la capsaicina, FAR y Rinvanil en el potencial proliferativo de células linfocíticas. Resultados expresados a concentraciones de equidosis (A) y equimolar (B).	36
Figura 12. Micrografías ópticas de células CaSki.....	37
Figura 13. Micrografías ópticas de células HeLa.....	38
Figura 14. Micrografías ópticas de células ViBo	39
Figura 15. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo, así como de células fibroblásticas y linfocíticas no tumorales	41
Figura 16. Detección de caspasa 3 Activa en cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo estimulados con sus respectivos IC ₅₀	44
Tabla 1. IC ₅₀ de la capsaicina, FAR y Rinvanil en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo	34
Tabla 2. Efecto antiproliferativo de las IC ₅₀ de la capsaicina, FAR y Rinvanil en las células fibroblásticas.....	35
Tabla 3. Valores de actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo tratadas con sus respectivas IC ₅₀ de los capsaicinoides, medido como porcentaje de células lisadas.....	42

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU), ocupa el segundo lugar a nivel nacional en muertes por cáncer en mujeres. Los tratamientos actuales son ineficientes en estados avanzados y con graves efectos secundarios, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. Los capsaicinoides, compuestos presentes en el Chile, tienen efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis en líneas de cáncer humano, su mayor representante es la capsaicina, la cual presenta actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en una gran variedad de líneas tumorales. Sin embargo su alta pungencia, su bajo rendimiento en la ruta de síntesis y su alto costo han generado la búsqueda de nuevos capsaicinoides con actividad antitumoral. Al respecto, en este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del Fenilacetilrinvanil (FAR) y el Rinvanil, (análogos de la capsaicina), en cultivos de células de CaCU, HeLa, CaSki y ViBo, así como en células no tumorales (fibroblastos de cérvix humano y linfocitos de sangre periférica humana). Los resultados obtenidos indican que la capsaicina y sus derivados afectan el potencial proliferativo de las células tumorales de CaCU de una manera dependiente de la dosis, además los tres capsaicinoides indujeron a las células tumorales a expresar características morfológicas propias de células apoptóticas, sugiriendo una inducción de muerte por apoptosis, sin embargo, la activación de la caspasa 3 activa sólo se presentó en los cultivos que fueron estimulados con la capsaicina, indicando que el FAR y el Rinvanil perdieron esta capacidad. Para determinar muerte por necrosis, se utilizó la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos, tratados con la capsaicina y sus análogos. Los resultados muestran que los tres compuestos inducen a las células tumorales y no tumorales a una muerte necrótica. Sin embargo, es relevante notar que de estos tres capsaicinoides, el menos necrótico en células no tumorales fue el Rinvanil. En conjunto, los resultados establecen por un lado, que la capsaicina, el FAR y el Rinvanil afectan el potencial proliferativo de las células tumorales y que el decremento en el número celular observado tanto en células tumorales como en no tumorales es debido principalmente a la muerte necrótica. Con lo anterior se concluye que, la Capsaicina, FAR y Rinvanil afectan el potencial proliferativo de las líneas celulares de CaCU, CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la concentración, mediante una actividad necrótica con pérdida de la capacidad de inducir la activación de la caspasa 3 por los capsaicinoides FAR y Rinvanil, con lo cual se abre el camino para sintetizar nuevas moléculas que mantengan el potencial apoptótico de la capsaicina y que mantengan el potencial selectivo del Rinvanil, para el tratamiento del CaCU y otros tipos de cáncer.

ABSTRACT

Cervical Cancer (CaCU) ranks second in cancer deaths in Mexican women. Current treatments are inefficient in advanced stages and have serious side effects, generating the need for new therapeutic alternatives. There is currently a strong interest in compounds that induce the death of tumor cells without affecting normal cells. Capsaicin a compound of chili, has an antiproliferative effect on many human cancer lines, this property has stimulated the synthesis of capsaicinoids that retained the antiproliferative activity of capsaicin, by inducing cell death, but with a selective action, with the intention to reduce the undesirable side effects of capsaicin. In the present study we tested the antiproliferative activity, apoptotic and cytotoxic activity of capsaicin and compared it with those of its derivatives the Fenilacetilrinvanil (FAR) and the Rinvanil in tumor cells of cervical cancer (CaCU), HeLa, CaSki and ViBo as well as on non-tumor cells (human cervical fibroblasts and human peripheral blood lymphocytes). Our results showed that capsaicin and derivatives affected the proliferative potential of tumor cells in a dependent dose manner. We also obtained drastic changes in the morphology of the cells suggesting cell death, like changes in the size of the nucleus and the presence of apoptotic bodies. In order to determine the type of cell death induced we evaluated cytotoxic activity (necrotic) by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture supernatants. The CaCU cells treated with capsaicin and their three derivatives indicated a trend to induce a necrotic cell death. We obtained that all the capsaicinoids induced necrotic death, but that only capsaicin retained the capacity to induce apoptosis. In fact capsaicin was the only compound that induced the presence of active caspase-3, a marker for apoptosis, suggesting that the chemical modification of its derivatives interferes with this property.

We also obtained that Rinvanil was the only compound to present a high induction of necrotic cell death in tumor cells, while a low one in normal cells, thus with a potential to become an effective anticancer drug for its selective property. We think that our results could open the way for the synthesis of capsaicinoids that can keep the apoptotic potential of capsaicin, but with the selective property of Rinvanil for the treatment of CaCU, and probably for other type of tumors

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica a partir de productos naturales es un campo muy interesante para la investigación. En este proceso, la valoración de la actividad biológica *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios.

Hacia finales de 1950 comenzó una intensiva revisión de plantas, microorganismos y animales, como corales o estrellas de mar, respecto a su actividad antineoplásica. Esto lo inició el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, que difundió y promovió un programa de detección selectiva (Michael et al., 1995).

Entre los productos naturales, la capsaicina, proveniente del chile, se utiliza ampliamente alrededor del mundo. El chile pertenece al género *Capsicum*, donde se considera a México como uno de los centros de origen de esta especie (figura 1). El principal uso del chile es la alimentación. Una de las características que hace popular e importantes a los chiles es que contienen varias sustancias llamadas capsaicinoides, de los cuales el hombre ha sabido sacar provecho desde hace muchos años, por ejemplo en la medicina tradicional (Hernández et al., 2001).



Figura 1. Variantes de los frutos del género *Capsicum*, comúnmente conocido como chile.

Capsaicina.

La capsaicina es uno de los compuestos presentes en el chile, planta originaria de América conocida y consumida desde antes del establecimiento de la agricultura, como se identificó por algunos arqueólogos en el valle de Tehuacán en México (Paul et al., 2010).

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. Fue descubierta por L. T. Thresh en 1846; se aisló por primera vez en 1876, su estructura química se determinó en 1919 y se logró sintetizar en 1930 (Szallasi, 1999; Wang, 2005).

Para su estudio, la estructura de la capsaicina tradicionalmente se ha dividido en tres fracciones, la región aromática, la región lipofílica y la amida enlazadora (figura 2) (Appendino et al., 2005a).

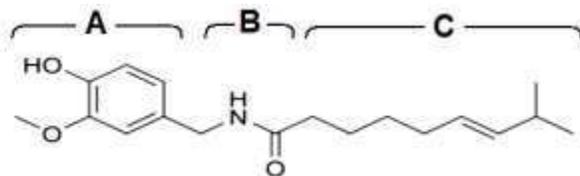


Figura 2. Molécula de la capsaicina donde se muestra la región aromática (A), la amida enlazadora (B) y la región lipofílica (C) (modificado de Appendino et al., 2005a).

El ingrediente activo de los chiles, considerado en un inicio como una sola sustancia, es una mezcla de diferentes sustancias químicas, pero la que se encuentra en mayor porcentaje es la capsaicina, como lo demostraron los químicos japoneses S. Kosuge y Y. Inagaki en 1964.

Los capsaicinoides son producidos por glándulas en la placenta del chile en la parte superior justo debajo del tallo. Cuando la biosíntesis se detiene el contenido de capsaicina puede variar por degradación del fruto (Bernal et al., 1993).

El uso medicinal tiene una larga historia remontándose a la civilización prehispánica de los mayas, que la utilizaban para tratar la tos, molestias de garganta o dolores de muelas (Labored et al., 1984).

La capsaicina podría ser según algunos investigadores, un mecanismo de las plantas del género *Capsicum*, para evitar que los mamíferos se alimentaran de sus frutos y que contrariamente, no impidiera que las aves, si lo hicieran para así dispersar las semillas (Levey et al., 2007; Josua et al., 2001)

Dado que no tiene sabor, color u olor, solo inicia la estimulación de receptores del dolor, en la lengua, en el estómago y en la boca. En respuesta a este estímulo, el cerebro libera endorfinas, las cuales proporcionan al cuerpo una sensación placentera, acelera el metabolismo, el ritmo cardiaco y se libera saliva y sudor.

Por esta y otras características que producen una diversidad de efectos biológicos fue que se continuó con el uso de la capsaicina por largo tiempo. Actualmente es utilizada como analgésico para el tratamiento de enfermedades que producen mucho dolor, como la artritis, causando la pérdida de la sensibilidad.

La capsaicina y los receptores de dolor.

Actualmente existen en el mercado cremas que contienen capsaicina y que ayudan a reducir el dolor, como analgésico auxiliar. La crema es aplicada varias veces al día en la zona afectada.

Por ejemplo, la crema Menthancin: Arthritic Pain Relief ^R (figura 3), combina la capsaicina y el mentol para combatir el dolor artrítico, y al mismo tiempo, no presenta complicaciones, por el uso simultáneo de medicinas anti-inflamatorias libres de esteroides (NSAIDS).



Figura 3. Tratamientos actuales en los cuales se utiliza la capsaicina.

Cuando se produce una lesión o traumatismo directo sobre un tejido por estímulos mecánicos o químicos se produce un daño celular, ésta desencadena una serie de sucesos que producen la activación de terminales nerviosas, que tienen como función informar al cerebro que algo doloroso está sucediendo. La

capsaicina tiene la característica de poder activar y a altas dosis también lesionar o bloquear varios tipos de fibras, induciendo con ello analgesia (Joseph et al., 2005).

Cuando la capsaicina se pone en contacto con los nociceptores, lo hace por medio de un receptor; el TRPV.

TRPV y capsaicina.

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 y desempeñan un papel fundamental en la fisiología de las células y en los sistemas sensoriales. En éstos se identificó el canal TRP (potencial transitorio de dolor, por sus siglas en inglés), que desempeña un papel importante en la fisiología sensorial de los organismos (Montiel et al., 2004), detectando estímulos mecánicos, térmicos y 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 éstos el TRPV-1 es uno de los canales termosensibles más estudiados (Rachelle 2009).

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 un canal catiónico no específico que permite el paso de diferentes cationes monovalentes o divalentes. Es activado por altas temperaturas nocivas mayores a 42 grados centígrados, por el voltaje, por la acidificación extracelular, por el pH intracelular alcalino y por 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 ésta y sus análogos son lipofílicos, pueden cruzar la membrana celular, e interactuar con sitios de unión localizados en la parte intracelular del canal (Szallasi. 1999).

TRPV-1 y cáncer.

Avances recientes en el tratamiento del dolor promovido por sarcomas óseos se han centrado en explorar el canal TRPV-1 como diana para desarrollar terapias.

Un estudio reciente ha concluido que el canal TRPV-1 interactúa directamente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico y disminuye su expresión (Niiyama et al., 2007). Más importante aún, 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 TRPV-1 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 (Shengqing et al., 2011).

Capsaicina, análogos y TRPV.

Se ha modificado la fracción aromática y la fracción amida de la capsaicina (figura 4), con la intención de modificar su pungencia (Appendino et al., 2002; Surth et al., 1996). Sin embargo, las modificaciones en la fracción acilo son nuevas y se requiere de información de su posible efecto biológico, para ello fue desarrollada una síntesis común y simple de vainillilamidas, empleada para investigar grupos de ácidos grasos e isoprenoides, propuestos como análogos de la capsaicina con nuevas fracciones acilo (Castillo et al., 2008).

El descubrimiento de nuevos análogos de la capsaicina, que no presenten pungencia, puede conducir a fármacos más efectivos para el tratamiento de desórdenes de la salud (Winter et al., 1995), como hiperalgesia inflamatoria, hiperactividad de la vejiga, vómito, crecimiento canceroso (Shang et al., 2009), dolor e inmovilidad (Appendino et al., 2005b). Se han desarrollado análogos de la capsaicina, como Rinvanil y FAR (12-fenilacetilrinvanil) varias veces más afines al receptor TRPV1 que la capsaicina (de 10 a 500 veces más respectivamente), además se logró mejorar la síntesis de estos compuestos (Castillo et al., 2008).

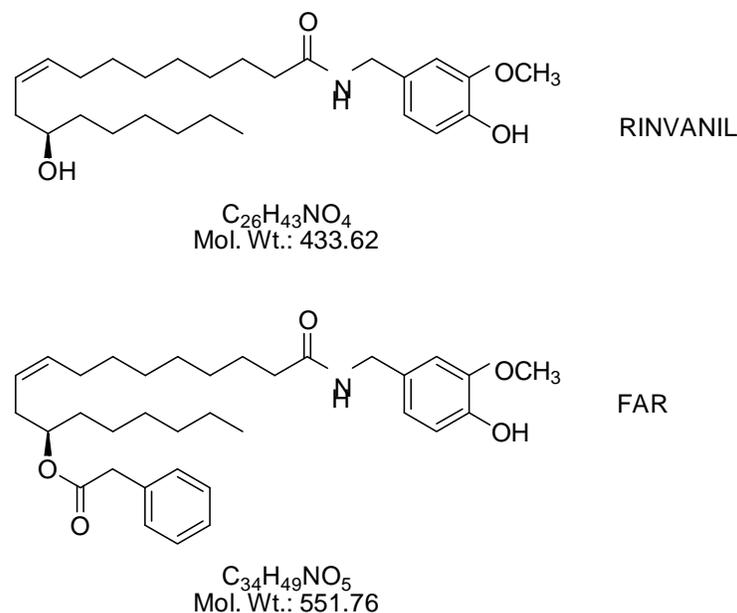


Figura 4. Estructuras y características del 12-fenilacetilrinvanil (FAR) y del Rinvanil.

La capsaicina cobró importancia antitumoral gracias a la actividad antiproliferativa que ha mostrado tener sobre líneas celulares tumorales de esófago, próstata, hígado, leucémicas, entre otras. Sin embargo debido a sus propiedades irritantes se ha buscado la generación de análogos que mantengan su actividad antiproliferativa sin el difícil manejo debido a su alta pungencia.

La naturaleza pungente de la capsaicina dificulta su procesamiento a gran escala, además la concentración de capsaicina en los chiles es muy baja, por otro lado la síntesis química es muy costosa y tiene un bajo rendimiento (Surth et al., 1996). Una investigación dice que el efecto cocarcinogénico de la capsaicina puede estar mediado por el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y no por el receptor transitorio, potencial miembro de la subfamilia vanilloide 1 (TRPV-1), (Mun et al., 2010). Dejando abierto el camino para continuar con la investigación de la capsaicina y su actividad antitumoral como lo demuestran algunos autores (Wei et al., 2006) al encontrar inducción de apoptosis en células tumorales.

Capsaicina y Cáncer.

Recientemente, los capsaicinoides se han empleado en la investigación neurobiológica (Szallasi 1999; Okere 2004), para la pérdida de peso (Manuela et al., 2003), como analgésico local/general (Karai et al., 2004) y como antimicrobiano (Kurita et al., 2002). Recientes investigaciones médicas han descubierto que la capsaicina tiene potentes efectos contra algunos tipos de células cancerígenas y es capaz de eliminar las células malignas atacando su fuente de energía, que son las mitocondrias (Kartick et al., 2009).

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), y 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) (Sánchez et al., 2007) entre otras (Bhutani et al., 2006).

Cáncer.

El cáncer consiste en la pérdida de la homeostasis entre los procesos de división y muerte celulares. Es una enfermedad que se puede manifestar en cualquier tejido del organismo y se caracteriza por una división celular descontrolada, debido a alteraciones genéticas que modifican la regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Hanahan et al., 2000), lo que las lleva a crear tumores, invadir tejidos y hacer metástasis. Este proceso se denomina carcinogénesis y se puede llevar a cabo en cualquier órgano y es clasificado a partir del tejido y el tipo de célula del cual se origina (Folkman et al., 2004).

Por ejemplo las leucemias y los linfomas conforman los cánceres 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. Los sarcomas, se encuentran en tejido conectivo, como huesos, cartílago, nervios, vasos sanguíneos, músculo y tejido adiposo y los carcinomas se encuentran en tejido epitelial, como la piel, o en los epitelios que revisten cavidades y órganos.

El cáncer es un proceso donde intervienen múltiples factores; principalmente los biológicos, químicos y físicos: Entre los factores biológicos se encuentran los agentes infecciosos, como virus y bacterias, en los químicos se pueden mencionar sustancias contaminantes, y dentro de los físicos se encuentra la radiación ionizante y los rayos UV. Éstos comparten una característica que consiste en el

daño que producen al ADN, produciendo cambios en el genoma, que con el paso del tiempo se acumulan múltiples mutaciones dando paso al desarrollo del cáncer por la modificación en los procesos que controlan la proliferación celular (Aguirre et al., 2007).

Proliferación celular y cáncer.

La proliferación celular es un fenómeno fisiológico dependiente de los factores externos a los que se ven sometidas las células, éstos pueden ser factores de crecimiento, interacciones con otras células y nutrientes (Ahmed et al., 2009). Los factores de crecimiento son generalmente proteínas que actúan mediante uniones de alta afinidad a receptores, cuya función principal es la del control externo del ciclo celular. Ésta se realiza mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada en la fase G1 (crecimiento de la célula), dando lugar a los procesos que conforman el ciclo celular y sus fases S y M que corresponden a la síntesis de ADN, la mitosis y G2 (preparación para la división celular). Los factores pueden realizar su función como inductores o supresores de la proliferación celular, promoviendo la diferenciación celular, la movilidad y la adhesión celular, entre otros. Éstos actúan sobre otros elementos celulares por mecanismo endocrino, paracrino o autocrino (Kroemer et al, 2008).

Una vez unido el factor de crecimiento a su receptor, se inicia una cascada de procesos bioquímicos denominados sistemas de transducción de señales que permiten, gracias a la actividad quinasa del receptor, la llegada de esta señal proliferativa hasta el núcleo, donde provoca inducción de la expresión de diversos mediadores que favorecen la proliferación celular; sin embargo, cuando la señal proliferativa llega al núcleo, la división celular queda regulada por puntos de control o "*checkpoint*" del ciclo celular que impiden la progresión de células dañadas y mantienen la homeostasis celular (Massagúe Joan, 2004).

Existe una gran variedad de proteínas que controlan y coordinan el ciclo celular, las principales son las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), que consisten en dos subunidades: subunidad catalítica con actividad cinasa, que permite fosforilar proteínas produciéndose cambios en su actividad o estructura y subunidad de unión al sustrato (Ciclinas) (Malumbres et al., 2009). El proceso de regulación se da en la fosforilación o desfosforilación de la proteína codificada por el gen del retinoblastoma (Rb). Cuando el Rb está hipofosforilada inhibe a E2F (Factor de Transcripción), evitando que éste induzca la expresión de genes que regulan la síntesis de ADN. La fosforilación de Rb conlleva alteraciones que impiden su unión y por tanto la inhibición de E2F, quedando libre para promover la síntesis de ADN. (Malumbres et al., 2002).

La regulación de la división celular es un evento crítico para el desarrollo normal de los organismos multicelulares y se ha demostrado que su alteración se asocia al desarrollo del cáncer. Cuando los mecanismos que regulan la multiplicación celular fallan y las células comienzan a crecer y dividirse incontrolablemente, el resultado es un clon de células que termina formando una masa celular denominada tumor. Los tumores malignos pueden llevar a cabo la invasión del estroma circundante, degradar membranas basales y establecerse en sitios distantes, aún antes de que el tumor primario alcance un tamaño clínicamente detectable (Malumbres et al., 2002).

En algunos casos las células del tumor primario migran hacia otros sitios dentro del sistema donde se están desarrollando (figura 5), a este proceso se le llama metástasis y es donde se producen tumores secundarios (Christoph Klein, 2009). 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, que es la inducción del crecimiento de vasos sanguíneos que provean de nutrientes al tumor. La malignidad o benignidad del tumor radica en que los tumores clasificados como benignos se limitan o encapsulan 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 (Nguyen et al., 2009).

Esta transformación celular se desarrolla por la interacción de factores ambientales, así como inmunológicos y genéticos específicos de cada individuo, por lo que las anormalidades genéticas pueden variar entre los distintos tipos de cáncer; algunos pueden ser una mutación puntual, translocación, amplificación, delección, ganancia y/o pérdida de un cromosoma (Bergers et al., 2003).

Los cambios específicos en el ADN, o mutaciones, pueden ser heredados o adquiridos, dependiendo del caso muchas veces afectan genes específicos del control sobre la vida y la muerte de la célula.

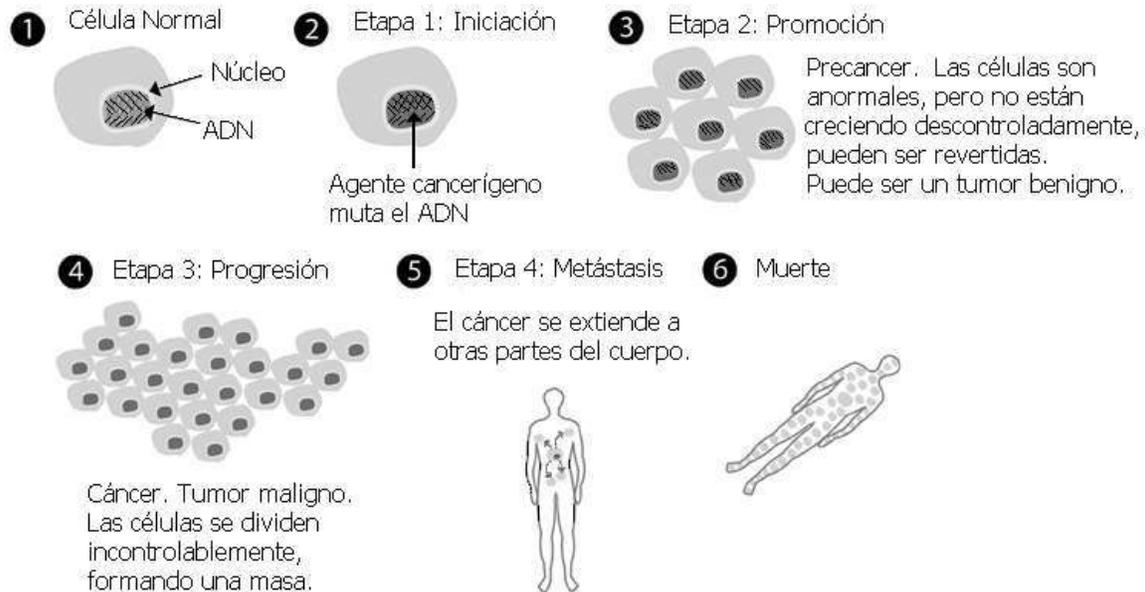


Figura 5. Desarrollo del cáncer. Tomado y modificado de www.Prevencción-de-salud.com; febrero, 2014.

El cáncer es un problema de salud pública, es la tercera causa de muerte en México y según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128,000 casos de mexicanos. Desde el 2008, es la principal causa de muerte en el mundo. Existen más de 100 tipos de cáncer, la mayoría son curables si se detectan en etapas tempranas. En México, el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas. En 2009 la tasa de mortalidad por cáncer en México fue de 65 por cada 100,000 habitantes, según las cifras más recientes, del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).

Si bien cada cáncer tiene síntomas específicos, hay señales generales de la presencia de un tumor maligno como fiebres inexplicables, fatiga, pérdida de peso y malestar generalizado reflejado en debilidad y mareos.

Uno de los cánceres que más vidas cobra es el cáncer cervicouterino (CaCU), éste se asocia con la forma de vida de los individuos, por ello es importante la prevención, la eficacia de los métodos de detección y su tratamiento.

Cáncer cervicouterino (CaCU).

La presencia de tumores malignos en el cuello del útero, es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia en México; el segundo en mujeres mexicanas (INEGI, 2011).

Según el INEGI en el 2011, el porcentaje más alto de prevalencia en este tipo de padecimiento se concentra en la población de entre 45 a 49 años.

El CaCU se origina en el tejido que recubre el cuello del útero. El proceso de cambio de células normales a células precancerosas y células cancerosas 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 de cáncer.

Estructura del Cérvix.

El cuello uterino tiene dos tipos de epitelio, el exocervical o exocérvix y el endocervical o endocérvix. La unión de ambos se denomina zona de unión escamo-columnar y es una área de cambios constantes provocados por los estrógenos, también es llamada zona de transformación. 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 zona basal, la zona intermedia y la zona superficial (figura 6).

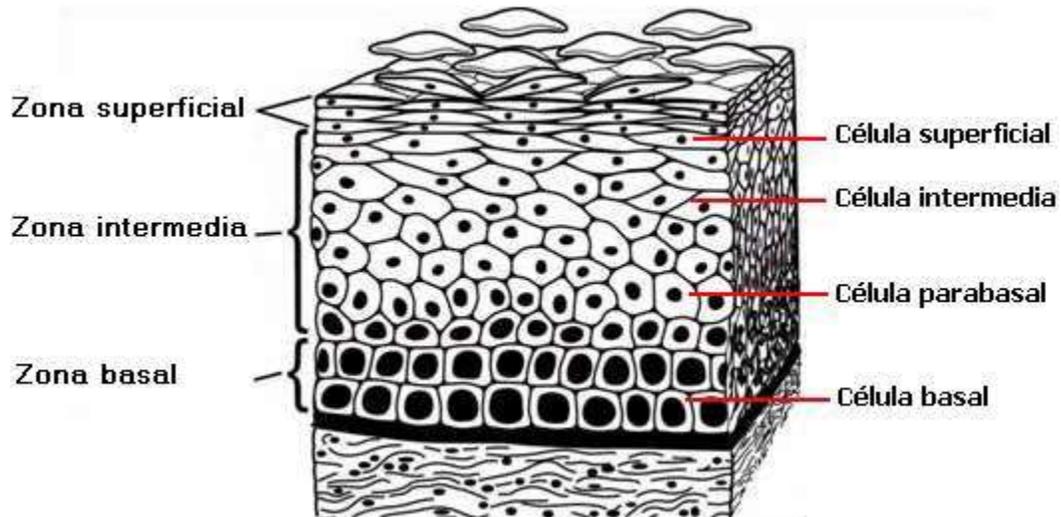


Figura 6. Acomodo de las células cervicales (Imagen tomada y modificada de: www.merkmedicus.com, enero 2014).

En la zona basal se da el fenómeno de regeneración celular, tiene varias hileras de células y es donde se presenta la división celular que contribuye al crecimiento del epitelio. La zona intermedia es la más gruesa y presenta varias hileras de células. La zona superficial es la más próxima a la cavidad vaginal. Las células de la zona basal crecen y maduran hacia la zona superficial, en consecuencia, el

citoplasma aumenta de tamaño y el núcleo se reduce. Este proceso de maduración (descamación) tiene un período de cuatro días y se reduce a 30 o 45 horas con el suministro de estrógenos.

Hay dos tipos de CaCU, el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. El tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado a la infección por el virus de papiloma humano VPH 16 (Woodman et al., 2007).

La infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual. Es por ello que los factores asociados con la infección por VPH esencialmente están relacionados con el comportamiento sexual, como lo es la edad de inicio de la vida sexual, un alto número de parejas sexuales o contacto con individuos de alto riesgo (Schiffman et al., 2003).

Las infecciones por VPH pueden detectarse en cérvix, vagina, vulva y en el canal anal y perianal. Otros factores adicionales incluyen la alta paridad, tabaquismo y una dieta pobre en vitaminas y minerales. El desarrollo del CaCU implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anormalidades histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical, NIC I (Displasia Leve), NIC II (Displasia Moderada), NIC III (Displasia Severa/Carcinoma In Situ) y finalmente un cáncer invasor (Steenberg et al., 2005).

La infección por el virus del papiloma humano (figura 7), se puede clasificar primero en: infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de la enfermedad. Posteriormente la infección subclínica se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de los tejidos afectados. La presencia VPH en este punto se puede verificar mediante el uso de un colposcopio que evidencia cambios de coloración en el cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético; estos cambios se asocian a la infección con VPH y una posible lesión premaligna. Finalmente la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles y es en esta etapa donde podemos encontrar gran cantidad de tejido positivo para VPH (Huh. 2009).

Estos virus se encuentran viables y con capacidad de infectar otros tejidos. Sin embargo, no siempre la enfermedad se manifiesta durante esta última etapa, ya que varios casos llegan a permanecer en periodo de latencia o subclínico, tiempo durante el cual se puede adquirir un estado de resistencia o regresión de las lesiones, o bien de progresión hacia un cáncer invasor.

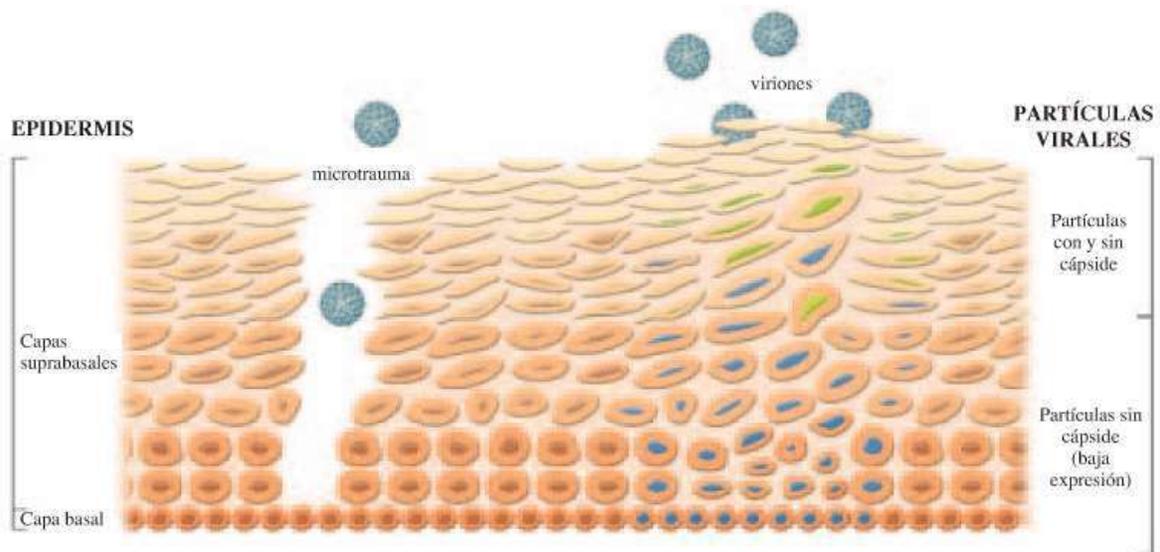


Figura 7. Progresión de la infección por VPH a cáncer microtrauma en las capas suprabasales del epitelio de la unión escamocolumnar facilita la infección del virus en las capas basales. Imagen tomada y modificada de Douglas, 2006.

Los virus del papiloma humano son pequeños virus de ADN de doble cadena (figura 8), sin envoltura, cuyo genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pb, el cual se divide en tres regiones: una región temprana E (*Early*), la cual codifica para proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 Y E7), necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, una región tardía L (*Late*), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (*Long Control Region*), que contiene la secuencia de ADN que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (Mc Murray et al., 2001).

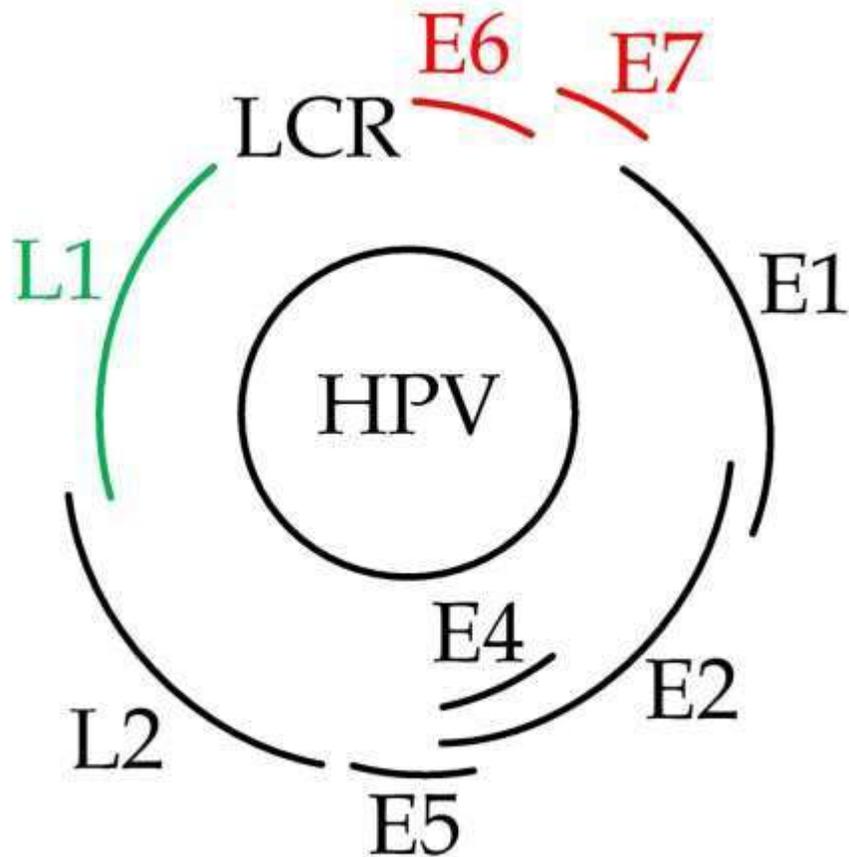


Figura 8. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular de doble cadena, se divide en tres regiones, la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno, la región temprana, que contiene a los genes E1 a E7 y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2, los cuales constituyen la cápside (Tomado y modificado de Tovar et al., 2012).

El mecanismo de acción de los HPV de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales E6 y E7 (figura 8). Éstas tienen la capacidad de inmortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es un requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico del CaCU (Mc Murray et al., 2001). Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, envueltos en procesos biológicos como la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular (Knebel 2002).

Se considera que el proceso de integración del genoma del HPV al genoma de la célula hospedera es el evento fundamental en la progresión a cáncer (Jayshere et al., 2009).

El tratamiento para este tipo de cáncer puede ser mediante: conización, cirugía con rayo láser, procedimiento de escisión electro-quirúrgica (LEEP), criocirugía, cirugía para extraer el área cancerosa, que dependiendo de la profundidad de invasión del tumor, puede cambiar a; Histerectomía abdominal total, histerectomía radical, radioterapia, histerectomía radical con o sin radioterapia (Landoni et al., 1997). Una vez determinadas las características de la paciente, el tratamiento puede ser acompañado de quimioterapia, siendo ésta el principal tratamiento para el cáncer a pesar de sus diversos efectos secundarios.

Quimioterapia.

Los tratamientos de quimioterapia más comunes se basan en sustancias capaces de detener, inhibir o impedir la evolución de una neoplasia, restringiendo para ello la maduración o proliferación celular, actuando sobre fases específicas del ciclo celular y por ello son activas en todas las células que se encuentran en proceso de división (Blass et al., 2002).

La medicina contemporánea ofrece todo un abanico de posibilidades terapéuticas para los distintos tipos de cáncer, siendo la cirugía temprana el método con mayor índice de curaciones; además la combinación de cirugía con tratamientos coadyuvantes, como radioterapia y quimioterapia, facilitan y mejoran el pronóstico tras la intervención quirúrgica del paciente. En la actualidad del 2 al 4% de los tumores malignos responden a la quimioterapia. El objetivo de la quimioterapia es destruir, empleando una gran variedad de fármacos, las células que componen el tumor con el fin de reducir y/o eliminar la enfermedad. A los fármacos empleados en este tipo de tratamiento se les denomina fármacos antineoplásicos, o agentes quimioterapéuticos (Rose et al., 1999).

El principio básico en el que se sustenta la quimioterapia intensiva es la presunción de la existencia de una curva de dosis-respuesta de agentes citotóxicos. Cada fármaco funciona con mecanismos diferentes, de manera que unos son capaces de envenenar directamente a las células malignas dañando su ADN, mientras que otros desencadenan una reacción del sistema inmune para que éste sea capaz de reconocerlas como elementos extraños y ordene su ejecución. En otros casos, la actividad o reposo de las células enfermas depende de su reacción a las hormonas que produce el organismo humano naturalmente. Conociendo en qué momento del ciclo celular actúan y qué actividad concreta bloquean para frenar la multiplicación de la enfermedad, se puede decidir qué

fármaco actuará mejor sobre cada tipo de tumor; si deben combinarse varios de ellos para lograr una mayor eficacia, si se puede emplear conjuntamente con algún otro tipo de medicamento, e incluso cuándo debe administrarse para lograr el efecto deseado (Bruce et al., 2005).

En la actualidad, los agentes quimioterapéuticos pueden agruparse de acuerdo a su estructura química y mecanismos de acción.

Agentes alquilantes. Todos comparten un mecanismo de acción común pero se diferencian en su acción clínica. Atacan los sitios negativamente cargados en el ADN, (átomos del oxígeno, nitrógeno, fósforo y sulfuro), bloqueando la replicación y/o la transcripción. La alquilación del ADN también conduce a roturas y ligadura cruzada. Alterando el ADN de este modo, la actividad celular es detenida con eficacia y la célula morirá. Los fármacos de este grupo son activos en cada etapa del ciclo celular. Por ejemplo: Platinos, Ciclofosfamida y Busulfán (Ann et al., 2001).

Antimetabolitos. Generalmente todos los antimetabolitos interfieren con los caminos metabólicos normales, incluyendo los necesarios para hacer el ADN nuevo. Por ejemplo: 5-Fluorouracilo y 6-mercaptopurina (Kaye 1996).

Camptotecinas. Los fármacos de esta clase de quimioterapéuticos actúan formando un complejo con topoisomerasas y ADN dando por resultado la inhibición de la función de esta enzima. La presencia de topoisomerasa se requiere para la síntesis en curso del ADN. Por ejemplo: Etopósido, Vinblastina y Vincristina (Dancey et al., 1996).

Taxanos. Otra clase de quimioterapéuticos específicos para la fase de Mitosis del ciclo celular son los taxanos. Los taxanos incluyen el paclitaxel y el docetaxel, los cuales atan con alta afinidad los microtúbulos e inhiben su función normal (John et al., 2013).

Dependiendo del tipo de cáncer y de los fármacos que se vayan a emplear, la quimioterapia puede administrarse por vía oral o intravenosa. La duración total del tratamiento y sus efectos secundarios dependen de una serie de factores como son el tipo de tumor, la respuesta del tumor al tratamiento y el tipo de quimioterapia empleada estos agentes farmacológicos producen graves efectos secundarios, además de tener una efectividad limitada. Por ejemplo, los derivados del platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, entre otros) que se utiliza en una amplia variedad de tumores malignos de ovario, mama, pulmón, cuello de útero, testículo, vejiga, próstata, piel, páncreas etc. Forman complejos con al ADN a fin de inducir la muerte celular programada, no obstante son responsables de efectos colaterales severos irreversibles del tipo nefrótico, lo que representa un

obstáculo para extender su uso. Es por ello que la introducción de nuevas estrategias para mejorar la eficacia y especificidad en el tratamiento de cáncer es necesaria (Ann et al., 2001).

Aunque la quimioterapia es una de las modalidades más empleada en el tratamiento del cáncer, la resistencia a los fármacos utilizados representa un obstáculo importante, es por ello que se han explorado muchas posibilidades con el fin de encontrar mejores opciones terapéuticas. La investigación para la obtención de nuevos compuestos con potencial para el tratamiento del cáncer mediante la regulación de la muerte celular, es un campo de investigación de gran impacto (Bruce et al., 2005).

Muerte celular: Apoptosis y Necrosis.

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 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 (Crocker 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. 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, el rompimiento 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 (Fink et al., 2005).

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 pérdida de la energía química de la célula, daño en los lípidos de membrana o 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 cuál ocurre primero.

La necrosis provoca la aparición de los siguientes cambios intracelulares: picnosis (condensación del núcleo), cariólisis (disolución de la cromatina), cromatolisis (disolución de los cromosomas), cariorexis (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 autólisis, 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.

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 basofilia 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.

Apoptosis.

Los procesos bioquímicos y macromoleculares que ocurren durante la muerte por apoptosis (Elmore S. 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. 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.

Las caspasas se clasifican en base al tamaño del predominio. Las caspasas con grandes predominios, como las caspasas-2, 8 y 9 que funcionan como iniciadores de señales que se encuentran al principio de cascadas proteolíticas, mientras que las que presentan un predominio 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 (Stefan et al., 2004).

La activación de los receptores de muerte de TNF tipo 1, el antígeno APO/FAS o 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 (Fisher 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, *death-domain*), 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 contiene un dominio efector de muerte DED que por homología atrae a la procaspasa 8 y que la activa; posteriormente la caspasa 8 activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Stefan et al., 2004).

Vía intrínseca.

La regulación de la apoptosis en la vía intrínseca es debida a la familia de Bcl-2, ésta fue descubierta como un protooncogén en el linfoma folicular de células B y es homólogo a *ced-9*. Esta vía 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 (Taylor et al., 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El CaCU en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial y en México ocupa el segundo lugar. Existen tratamientos, sin embargo, éstos son muy agresivos, costosos y poco selectivos, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas.

Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos, se encuentra la capsaicina y sus análogos, los cuales han demostrado una diversa actividad antitumoral. Son pocos los estudios que se han realizado en CaCU, por lo que resulta de interés determinar la actividad antitumoral de la capsaicina y sus análogos en líneas de CaCU.

El presente trabajo busca analizar el efecto antiproliferativo e inductor de muerte de la capsaicina y de sus análogos, el FAR y el Rinvanil para evaluar su posible utilización como un tratamiento alternativo o preventivo en CaCU.

HIPÓTESIS.

Actualmente se ha descrito que la capsaicina presenta una fuerte afinidad por los receptores del dolor TRPV1, los cuales han sido asociados a la actividad antiproliferativa y citotóxica, en diferentes células tumorales.

Recientemente se han generado análogos de la capsaicina, entre los que destacan al FAR y al Rinvanil, que presentan mayor afinidad a los receptores TRPV1, por lo que se espera que estos análogos presenten mayor actividad antiproliferativa y citotóxica en células de CaCU.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos antiproliferativo, citotóxico (necrosis), e inductor de apoptosis de la capsaicina, el FAR y el Rinvanil, en cultivos de líneas celulares provenientes de CaCU.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la actividad antiproliferativa de la capsaicina, así como de sus análogos en cultivos de células de CaCU (CaSki, HeLa y ViBo), mediante la determinación de la concentración requerida de cada compuesto, para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}).
2. Evaluar el efecto citotóxico de la capsaicina, así como de sus análogos, a las concentraciones de IC_{50} , a través de la detección de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las líneas celulares de CaCU.
3. Determinar si la concentración IC_{50} de capsaicina, FAR y Rinvanil inducen activación de caspasa-3 activa y condensación de la cromatina en células de CaCU.
4. Determinar el efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico (caspasa 3 activa y condensación de la cromatina) de la capsaicina, FAR y Rinvanil a las concentraciones de IC_{50} , en fibroblastos normales de cérvix y en linfocitos humanos de sangre periférica, como controles no tumorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células tumorales provenientes de cérvix.

Las líneas celulares provenientes de CaCU, CaSki, HeLa 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 (Nuaire, 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.

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-1640 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 (Los componentes del Verseno, se encuentran descritos en el apéndice).

La digestión enzimática se llevó a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pyrex, USA) de 50 ml; con 10 ml de tripsina e incubación por 15 minutos a 37°C en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla fue filtrada a través de una malla de nylon que permitió sólo el paso del material disgregado. El filtrado fue centrifugado (centrifuga; Dinac, USA) por 5 minutos a 2000 rpm; se decantó el sobrenadante y el botón celular fue cultivado en cajas de Petri de plástico de 60 mm con RPMI al 10 % de SFB, y se mantuvo en una incubadora (Nuaire, USA) al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas 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. Posteriormente se añadió medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continuó la incubación hasta obtener un 60% de confluencia, momento en el que se realizaron las resiembras. Los ensayos se realizan con cultivos de las resiembras 2 a 4 en una confluencia máxima del 60 %.

Obtención de la Capsaicina, el FAR y el Rinvanil.

La Capsaicina fue adquirida de Sigma (Sigma-Aldrich, USA), la síntesis de FAR y 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.

Preparación del stock de Capsaicina, FAR y Rinvanil.

1 mg de Capsaicina, FAR y Rinvanil fueron disueltos por separado en 50 μ l de acetato de etilo (AcOEt) cada uno en un tubo cónico tipo *eppendorf* de 600 μ l y se almacenó a -4°C hasta su utilización. El Acetato de etilo es un disolvente orgánico, lo cual, lo hace muy utilizado en la purificación y en pruebas de solubilidad de sustancias orgánicas, en lo que respecta a la experimentación biológica *In vitro*, concentraciones menores o iguales al 1% v/v no generan daño a cultivos celulares.

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

Se cultivaron 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 μ l de RPMI-1640 al 5 % de SNT por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó, la capsaicina, el FAR y el Rinvanil en concentraciones de 0 μ g/ml a 200 μ g/ml durante 24 horas, en ensayos individuales. El control para el vehículo empleado en la solubilización, el AcOEt, contempló la máxima concentración utilizada en la preparación de los compuestos a 200 μ g/ml en 10 μ l de acetato de etilo diluido en 1 ml de RPMI-1640 al 5% de SNT. Al control testigo únicamente se le realizó el cambio de medio por medio de cultivo fresco. Al término del estímulo se procedió 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 retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma, USA) en agua desionizada por 15 minutos. Al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con agua desionizada. A continuación se dejó secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta (Sigma USA) al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma, USA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se dejó secar al aire. El colorante incorporado en el núcleo de las células fue solubilizado con ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación por 20 minutos. Finalmente la absorbancia fue tomada 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 (IC_{50}).

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH (Lactato deshidrogenasa).

En una caja de 96 pozos fueron sembradas 7,500 células de cada una de las tres líneas provenientes de CaCU; CaSki, HeLa y ViBo con 100 μ l de RPMI al 5 % de SNT, por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le realizó un cambio de medio de cultivo, un control para AcOEt con la concentración empleada para preparar la IC_{50} correspondiente de cada uno y el tratamiento con capsaicina, FAR y Rinvanil con la concentración de la IC_{50} correspondiente a cada línea celular. A las 23 h de tratamiento, al cultivo del control positivo se le hizo un nuevo cambio de medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 y se dejó que el ensayo completara las 24 horas.

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml y centrifugados a 2,000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron traspasados a una placa de cultivo de 96 pozos, 50 μ l por pozo, para su evaluación. La actividad de la LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 50 μ l de la mezcla de reacción (Ver apéndice). Se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 30 minutos. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas para elisa (ChroMate, USA). Los datos fueron analizados haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Cultivos de 10^6 células de las líneas de CaCU CaSki, HeLa y ViBo fueron sembradas en cajas de Petri de 60 mm con 5 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT e incubadas durante 24 horas, posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio fresco conteniendo: Capsaicina, FAR y Rinvanil en la concentración IC_{50} determinada para cada línea celular, AcOEt, Camptotecina 20 μ g/ml (HeLa y ViBo) o 60 μ g/ml (CaSki) y un control sólo con cambio de medio de cultivo. El estímulo se mantuvo por 24 horas. La evaluación de la actividad de la caspasa 3 se realizó por citometría de flujo.

Las células fueron cosechadas y fijadas con etanol al 70% por 5 minutos en el refrigerador, al término del tiempo fueron lavadas 2 veces con PBS.

Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario policlonal anti-caspasa 3 desarrollado en conejo, 1:250 en PBS y se dejó incubando toda la noche. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo anticuerpo anti-conejo con FIT-C desarrollada en cabre, 1:500 (J.T. Baker, MEX) en PBS y se dejó incubar en la obscuridad durante tres horas. Posteriormente fueron lavadas las muestras 3 veces con PBS. Finalmente el botón celular fue diluido en 1 ml de PBS y evaluado en el citómetro de flujo FACSAria II; los datos fueron procesados en el programa WinMDI.

Detección de la cromatina condensada, utilizando en colorante DAPI (Diaminofenilindol).

30,000 células tumorales fueron sembradas en cubreobjetos de 1X1 cm en un volumen de 5 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT en cajas de Petri de 50 mm. Al paso de las 24 horas se procedió a retirar el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le hizo un cambio de medio de cultivo, un control para AcOEt con la concentración empleada para preparar la IC₅₀ correspondiente a cada uno de los compuestos, los tratamientos con capsaicina, FAR y Rinvanil con la concentración IC₅₀ determinada a cada línea celular. El estímulo se mantuvo por 24 horas. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % en PBS (el cual se preparó al momento) por 15 minutos. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS. A continuación se procedió a incubar con DAPI (Sigma-Aldrich, USA) 30 segundos. Se lavó 3 veces la muestra con PBS en cámara húmeda; 1 minuto cada lavado. Las preparaciones fueron montadas en medio de montaje anti-fade (Vectashield, USA), etiquetadas y guardadas en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

Efecto de la capsaicina, FAR y Rinvanil sobre la proliferación de linfocitos humanos utilizando carboxifluoresceina.

20 ml de sangre periférica de un donador sano fue vertida en tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pyrex, USA) con 5 ml de Histopaque (Sigma, USA) (un total de 4 tubos). Se centrifugaron (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 dejó centrifugando por 25 minutos más. Terminado el tiempo de centrifugación, con ayuda de la pipeta de 1000 µl, se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos. Posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió con 10 ml

de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml. Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pyrex, USA) en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y se incubó durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para marcar las células linfocíticas con carboxifluoresceína (CSFE) (Sigma, USA), los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ M por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS al 5 % de SFB, se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y nuevamente fueron resuspendidos en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (FHG) los linfocitos fueron 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 realizó en ese momento: control solo con medio de cultivo con y sin FHG, control para el vehículo al cual se le agregó la cantidad de AcOEt empleada en la preparación de la concentración IC_{50} más alta obtenida para células tumorales de CaCU y las IC_{50} correspondientes para capsaicina, FAR y Rinvanil.

Las células contenidas en cada tubo cónico fueron 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 fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 horas. Para la evaluación las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de Verseno frío y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó de nuevo y se retiró el verseno. Posteriormente se resuspendió con 500 μ l de PBS y se agregaron 500 μ l de paraformaldehído al 2 %.

Las células se evaluaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSaria II y los datos son procesados con el programa WinMDI 2.9. 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 donador sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA) con 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos; posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4ml. Se sembraron 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 incubaron 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 retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l y se determinó el número celular con ayuda de una cámara de Neubauer. Los linfocitos fueron 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 realizó en este momento: control sólo con medio de cultivo con y sin FHG, control positivo al cual en este momento no se agregó tritón X-100, control para el vehículo al cual se le agregó la cantidad de AcOEt empleada en la preparación de la concentración IC_{50} más alta obtenida para células tumorales de CaCU, y las IC_{50s} obtenidas para Capsaicina FAR y Rinvanil. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron 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 fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 horas. Para la evaluación a las 71 h de tratamiento al control positivo se le agregaron 2 μ l tritón X-100 y se homogenizó piteando suavemente el medio de cultivo y se incubó por 1 h más. A las 72 horas de cultivo las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml de manera individual. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se traspasaron 50 μ l de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA) del cual se agregaron 50 μ l de la mezcla de reacción. Se incubó a temperatura ambiente protegido de la luz por 30 minutos.

Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro en un lector de placas de elisa (ChroMate, USA). Los datos fueron analizados haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras son por triplicado.

Efecto de capsaicina, FAR y 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 7,500 células/pozo en 100 μ l de RPMI-1640 al 5 % de SNT por 56 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregó 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 AcOEt empleada en cada una de las IC_{50} obtenidas para cada línea celular y Capsaicina, FAR y Rinvanil en cada una de las concentraciones IC_{50} obtenidas. El estímulo se mantuvo por 24 horas. Al término del estímulo se procedió 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 retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador y posteriormente se lavaron con agua desionizada, a continuación se dejaron secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último el colorante incorporado en el núcleo de las células se solubilizo con ácido acético al 10 % en agitación por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de placas (ChroMate, USA). Los datos obtenidos se analizaron tomando como referencia al control de proliferación normal, al cual sólo se le realizó cambio de medio de cultivo y con el control de AcOEt.

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH, en fibroblastos de cérvix.

En una caja de 96 pozos fueron sembradas 7,500 células (fibroblastos de cérvix) con 100 μ l de RPMI al 5 % de SNT, por 24 horas. Los tratamientos se hicieron por triplicado. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le hizo el cambio de medio de cultivo, un control positivo al cual se le hizo cambio de medio, un control para AcOEt con la concentración empleada para preparar la IC_{50} correspondiente y los tratamientos con capsaicina, FAR y Rinvanil con la concentración correspondiente a la determinada para las líneas de CaCU. 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 horas de tratamiento.

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml y centrifugados a 2,000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron traspasados una placa de 96 pozos, 50 μ l por pozo, para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 50 μ l de la mezcla de reacción (Ver apéndice). Se incubó a temperatura ambiente protegido de la luz por 30 minutos. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de elisa (ChroMate, USA). Los datos fueron analizados haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras son por triplicado.

Análisis estadístico.

Los datos experimentales fueron presentados como la media \pm S.D. A los resultados obtenidos se les realizó 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.

Actividad antiproliferativa de la capsaicina, FAR y Rinvanil en células de CaCU.

Con la intención de determinar el efecto antiproliferativo de la capsaicina, FAR y Rinvanil en células de CaCU, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con estos compuestos en un rango de concentraciones de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$ y la actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida que abate en un 50% el número celular (IC_{50}).

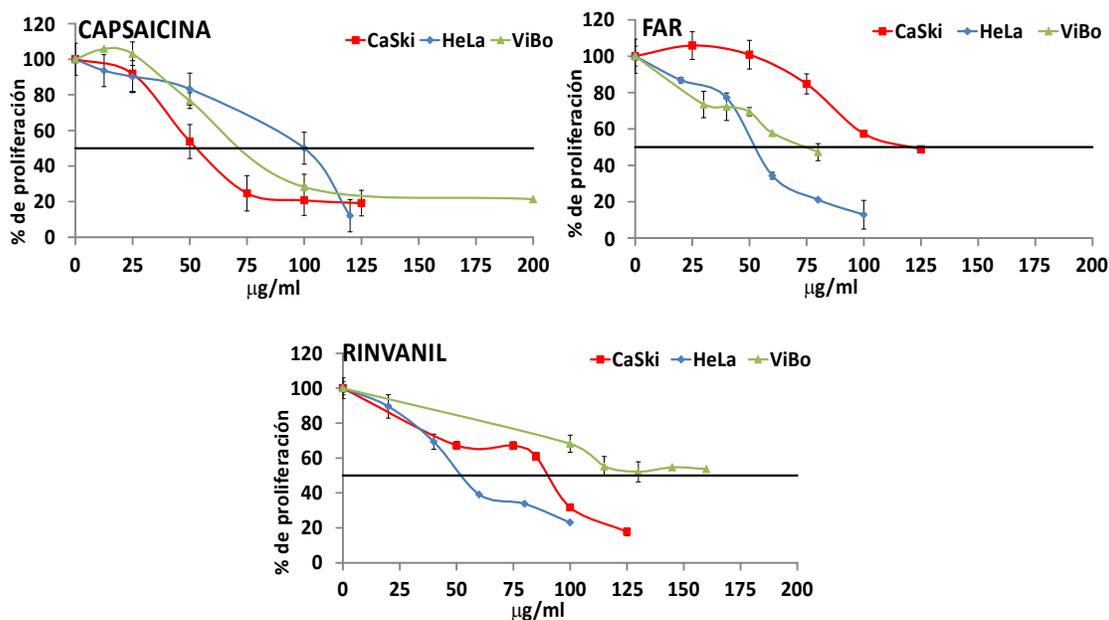


Figura 9. Efecto antiproliferativo de la capsaicina, FAR y Rinvanil sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. Para ello 7,500 células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos por 24 horas y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de estos compuestos. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.

Los compuestos con los que fueron tratadas las diferentes líneas celulares, muestran el efecto a diferentes concentraciones, dependiendo de la línea celular. La capsaicina disminuye un 50 % la población celular en un rango de 60 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (CaSki 60; HeLa 100; ViBo 78). FAR presenta una IC_{50} entre 57 y 122 $\mu\text{g/ml}$ (CaSki 122; HeLa 57; ViBo 74) y Rinvanil posee un rango de acción entre 62 y 149 $\mu\text{g/ml}$ (CaSki 91; HeLa 62; ViBo 149)(Figura9).

	IC ₅₀ capsaicina $\mu\text{g/ml}$	IC ₅₀ capsaicina μM
CaSki	60	197
HeLa	100	327
ViBo	78	255
	IC ₅₀ FAR $\mu\text{g/ml}$	IC ₅₀ FAR μM
CaSki	122	220
HeLa	57	102
ViBo	74	134
	IC ₅₀ Rinvanil $\mu\text{g/ml}$	IC ₅₀ Rinvanil μM
CaSki	91	209
HeLa	62	143
ViBo	149	343

Tabla 1. IC₅₀ de la capsaicina, FAR y Rinvanil en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.

Los resultados obtenidos indican que los tres capsaicinoides afectan el potencial proliferativo de las células tumorales de manera dependiente de la concentración (Fig. 9, Tabla 1).

Actividad Antiproliferativa en células no tumorales.

Con la intención de establecer si las concentraciones de IC₅₀ obtenidas para las células tumorales afectan el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos primarios de fibroblastos de cérvix humano y cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana fueron tratados con capsaicina, FAR y Rinvanil. El número celular fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta para las células fibroblásticas, mientras que para las células linfocíticas el número celular fue evaluado marcando a las células con carboxifluoresceína y cuantificadas por citometría de flujo (Figura 10 y 11).

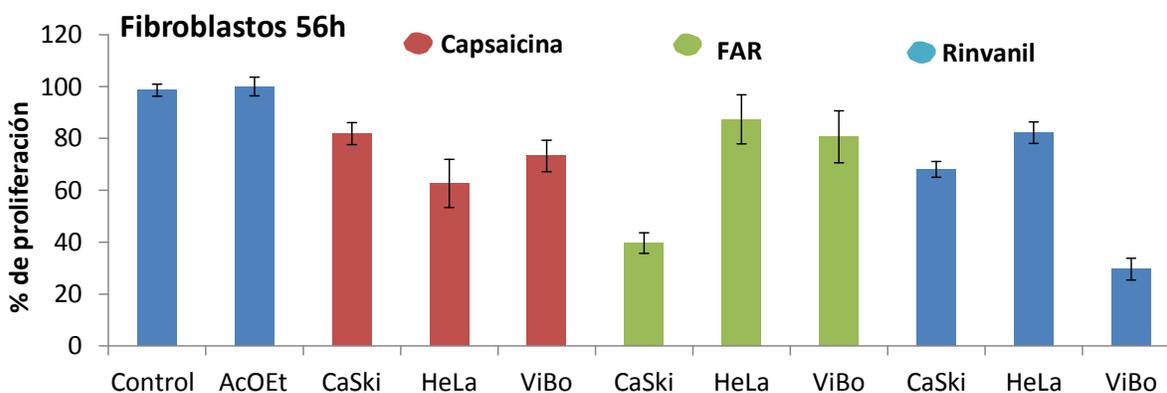


Figura 10. Efecto antiproliferativo de la capsaicina, FAR y Rinvanil sobre fibroblastos de cérvix. Para ello 7,500 células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos por 56 horas. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. Control; células cultivadas sin capsaicinoide y AcoEt; células cultivadas con el disolvente usado.

Línea	Control	AcOET	Capsaicina			FAR			Rinvanil		
			CaSki	HeLa	ViBo	CaSki	HeLa	ViBo	CaSki	HeLa	ViBo
IC ₅₀ µg/mL			60	100	78	122	57	74	91	62	149
% de proliferación	100%	100%	82%	63%	73%	39%	87%	81%	68%	82%	29%

Tabla 2. Efecto antiproliferativo de las IC₅₀ de la capsaicina, FAR y Rinvanil en las células fibroblásticas.

Los resultados obtenidos en las células fibroblásticas indican que la capsaicina disminuye el potencial proliferativo de estas células entre un 18 a 37 %, mientras que el FAR de un 13 a 61 y el Rinvanil entre un 18 a 71% (Tabla 2). Los resultados sugieren que en los tres capsaicinoides probados, a concentraciones mayores de 100 µg/mL, el potencial proliferativo de las células fibroblásticas se ve fuertemente abatido, sin embargo a concentraciones menores, el potencial proliferativo presenta un decremento de solamente entre 13 y 32%.

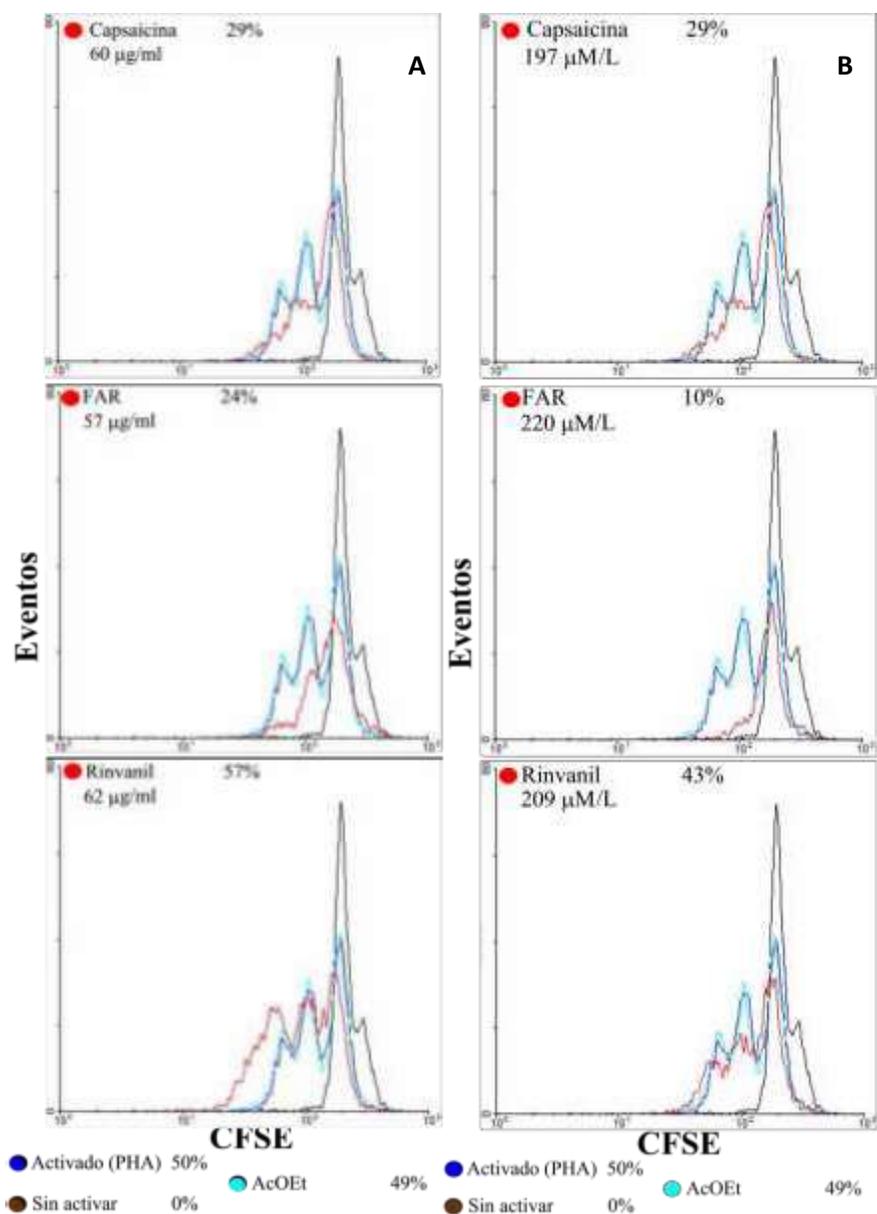


Figura 11. Efecto de la capsaicina, FAR y Rinvanil en el potencial proliferativo de células linfocíticas. Resultados expresados a concentraciones de equidosis (A) y equimolar (B).

Para evaluar el efecto antiproliferativo de los capsaicinoides en linfocitos, se utilizaron dosis muy semejantes de capsaicina, FAR y Rinvanil tanto en µg/mL (60, 57 y 62 respectivamente), como en micromolares (197, 220 y 209 respectivamente). Nuestros resultados muestran que en ausencia de capsaicinoides el PHA genera dos ciclos de proliferación en los linfocitos, mientras en las concentraciones usadas para capsaicina y FAR, la inhibición a la proliferación inducida fue muy alta, ya que desaparece el tercer ciclo de inducción y se ve muy reducido el segundo, sin embargo en aquella inducida por Rinvanil la inhibición en general fue muy baja (Fig. 11).

Estos resultados podrían abrir la posibilidad del uso del Rinvanil como un compuesto selectivo para el tratamiento del CaCU, ya que inhibe fuertemente la proliferación de líneas de CaCU y muestra poca inhibición con linfocitos normales.

Morfología Celular.

Cuando las células son inducidas a una muerte apoptótica, presentan cambios en su morfología, entre ellos la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, y formación de cuerpos apoptóticos.

Con la intención de establecer si los capsaicinoides inducen apoptosis en las células de CaCU, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con capsaicina, FAR y Rinvanil a las IC₅₀ respectivas para cada línea celular.

Se evaluó la morfología celular así como la condensación y/o fragmentación de la cromatina nuclear mediante microscopía de contraste de fases y tinción con el compuesto fluorescente DAPI respectivamente (figura 12, 13 y 14).

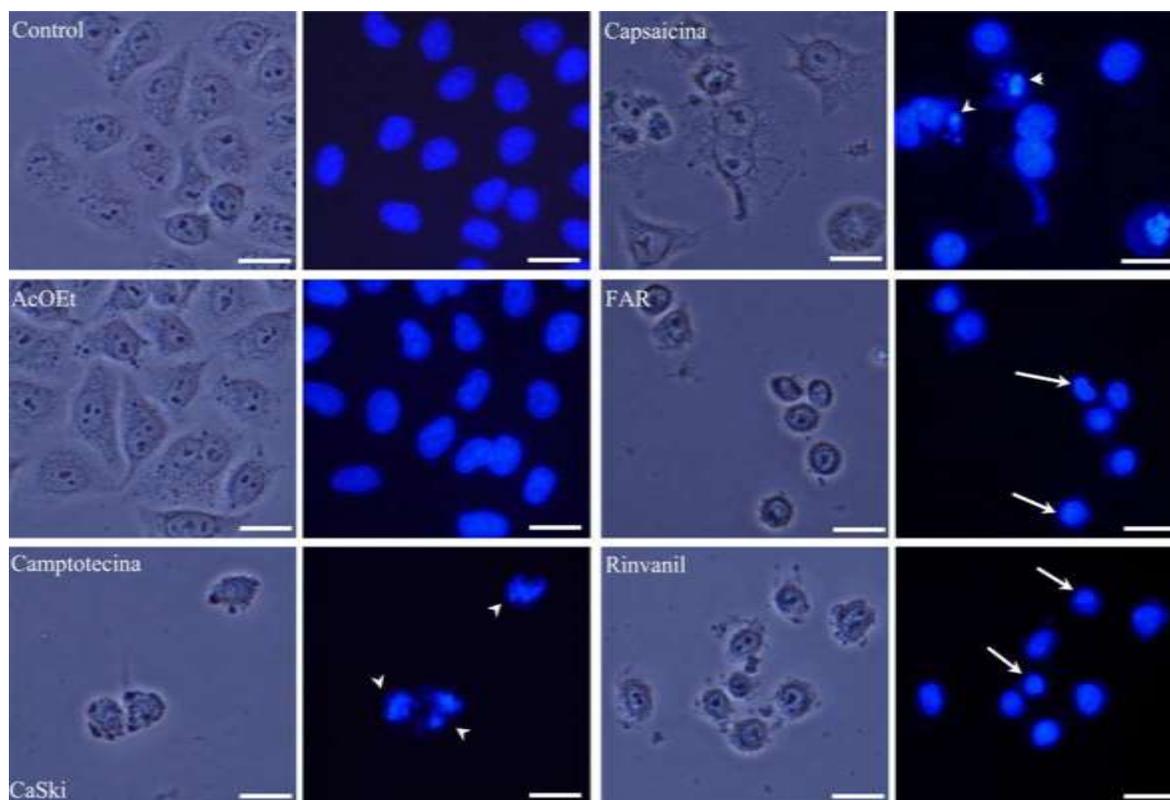


Figura 12. Micrografías ópticas de células CaSki tratadas con Camptotecina (control positivo para apoptosis), Capsaicina, FAR y Rinvanil. En campo claro se observa el contraste de fases que permite apreciar la morfología de las células. En azul, DAPI evidenciando la distribución de la cromatina en los diferentes tratamientos. Las flechas indican núcleos compactos y las puntas de flecha muestran cuerpos apoptóticos.

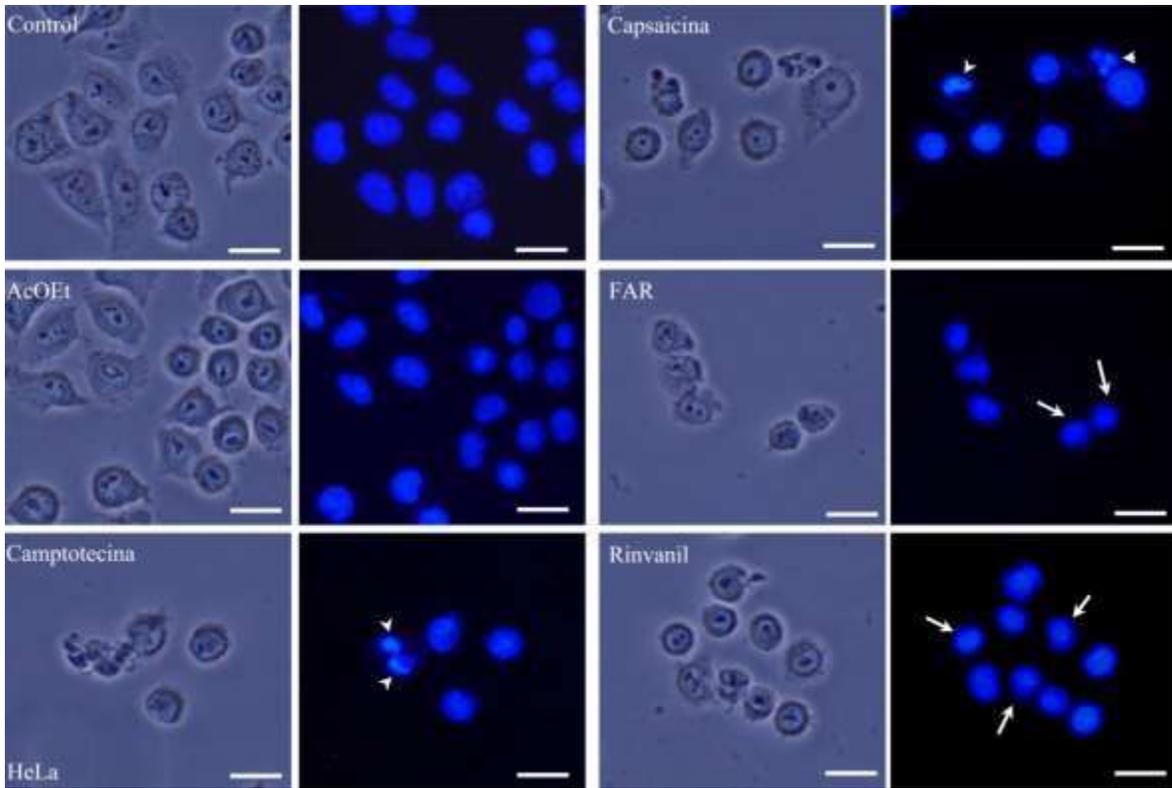


Figura 13. Micrografías ópticas de células HeLa tratadas con Camptotecina (control positivo para apoptosis), Capsaicina, FAR y Rinvanil. En campo claro se observa el contraste de fases que permite apreciar la morfología de las células. En azul, DAPI evidenciando la distribución de la cromatina en los diferentes tratamientos. Las flechas indican núcleos compactos y las puntas de flecha muestran cuerpos apoptóticos.

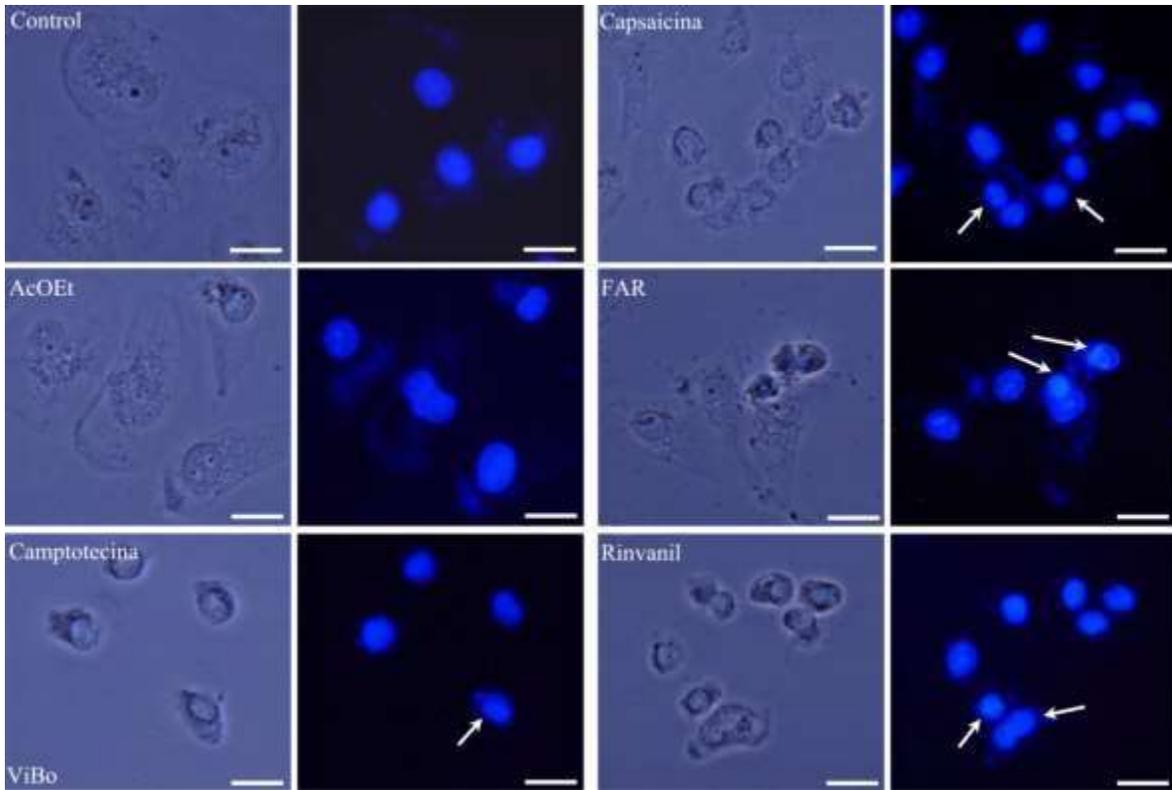


Figura 14. Micrografías ópticas de células ViBo tratadas con Camptotecina (control positivo para apoptosis), Capsaicina, FAR y Rinvanil. En campo claro se observa el contraste de fases que permite apreciar la morfología de las células. En azul, DAPI evidenciando la distribución de la cromatina en los diferentes tratamientos. Las flechas indican núcleos compactos y las puntas de flecha muestran cuerpos apoptóticos.

Los resultados obtenidos establecen que los tres capsaicinoides afectan la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo, observando en las fotografías de contraste de fases que las células no tratadas presentan forma poliédrica con proyecciones citoplasmáticas, se encuentran bien adheridas con citoplasma abundante, los núcleos tienen forma redonda y bien definida ocupando poco más de la mitad del volumen celular y con nucléolos bien delimitados (Figs. 12,13 y 14). Además la observación de núcleos marcados con DAPI, los muestran con una forma esférica de bordes bien definidos, los puntos más brillantes correspondientes a la cromatina perinucleolar son numerosos, de tamaños diversos y se encuentran distribuidos en toda el área del núcleo (puntas de flecha en figuras 12, 13 y 14). Sin embargo, las células tratadas con capsaicina, FAR y Rinvanil presentan forma redonda, de menor tamaño, con el volumen del citoplasma reducido hasta ser casi imperceptible (*pyknosis*), con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas características de la adhesión celular, indicando una disminución de la adherencia, además los núcleos son compactos con nucléolos poco definidos (flechas en figuras 12, 13 y 14). La observación de núcleos marcados con DAPI, muestran núcleos de menor tamaño y/o fragmentados que

indican condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del ADN, los puntos más brillantes han desaparecido casi totalmente y algunos de estos núcleos presentan una morfología arriñonada indicando cuerpos apoptóticos (punta de flechas en figuras 12 y 13). Las características morfológicas observadas en las células tratadas con los capsaicinoides son similares a las observadas en los cultivos estimulados con la camptotecina, la cual es un compuesto que ha sido descrito como inductor de muerte apoptótica en diferentes líneas tumorales, sugiriendo que la capsaicina, FAR y Rinvanil inducen a las células tumorales de CaCU a expresar una morfología de células apoptóticas. Sin embargo, en las células tratadas con capsaicina y el FAR se observan algunas células de abundante citoplasma, con núcleos grandes y bien definidos, características morfológicas de células necróticas, por lo que consideramos importante determinar si estos capsaicinoides inducen a las células tumorales a una muerte necrótica además de apoptótica.

Actividad citotóxica (necrótica) de la capsaicina, FAR y Rinvanil

Es conocido que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción citotóxica (necrótica), caracterizada principalmente por inducir la pérdida de la integridad de la membrana celular, la cual es una característica de muerte por necrosis. Con la intención de determinar si la capsaicina, FAR y Rinvanil ejercen una actividad citotóxica sobre las líneas celulares de CaCU y células normales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo así como de células fibroblásticas y linfocíticas fueron tratadas con las concentraciones IC_{50} respectiva y la integridad de la membrana citoplasmática fue evaluada determinando para ello la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes.

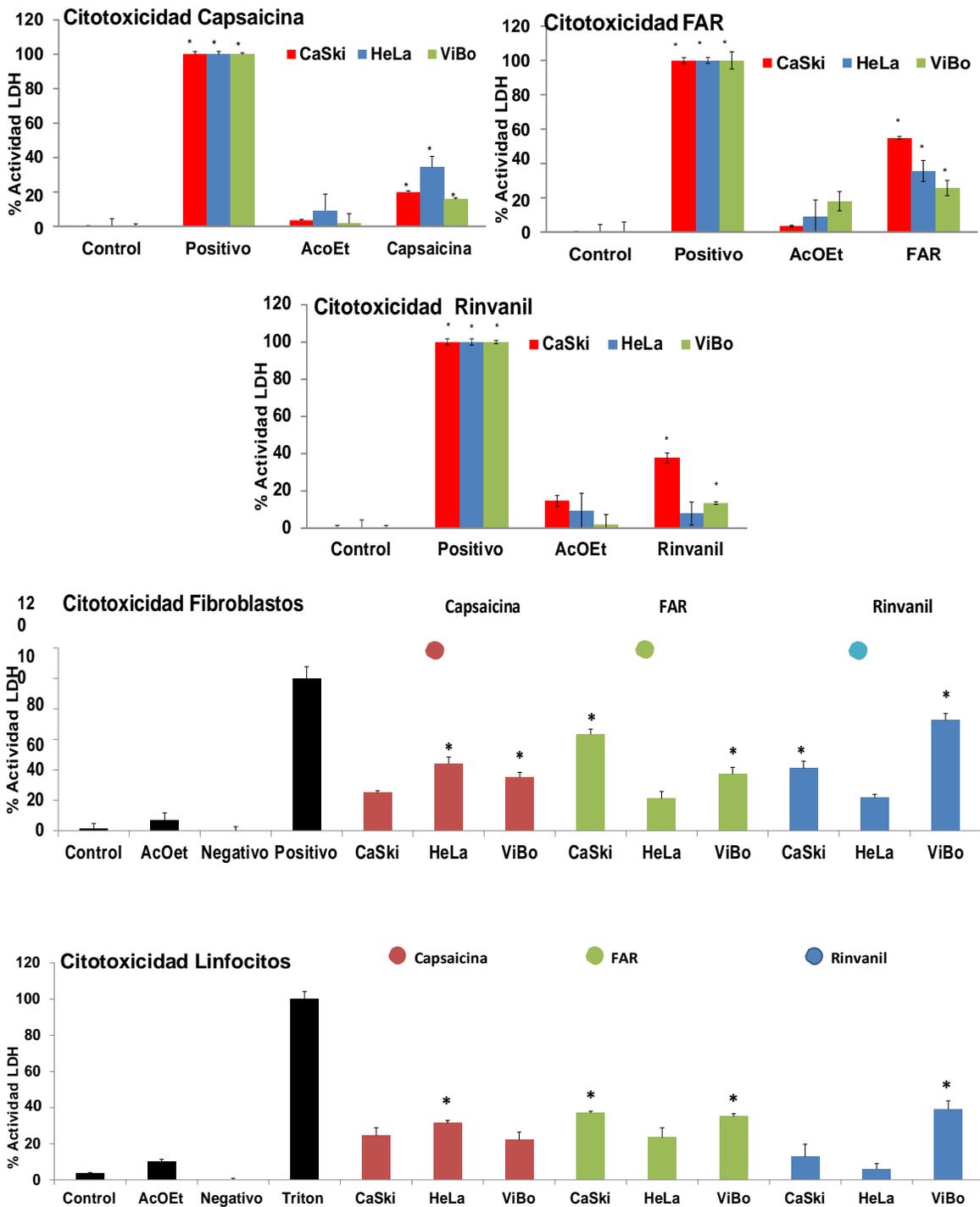


Figura 15. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo, así como de células fibroblásticas y linfocíticas no tumorales, estimuladas con la IC₅₀ de capsaicina, FAR y Rinvanil respectiva por 24 horas, de 56 horas para fibroblastos y de 72 horas para linfocitos. La liberación máxima de LDH se determinó con la aplicación de tritón X-100 en un cultivo control (Positivo) y fue tomada como el 100 % de actividad. El control (Negativo) consistió en células sin capsaicinoides y AcOEt con el solvente. La gráfica representa uno de cuatro ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado. (*. p<0.05 vs AcOEt, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Células	Control	Positivo	AcOEt	% Citotoxicidad	Compuesto	IC ₅₀	
CaSki	0	100	3	20	Capsaicina	60 µg/ml	
HeLa	0	100	9	35	Capsaicina	100 µg/ml	
ViBo	0	100	2	16	Capsaicina	78 µg/ml	
CaSki	0	100	3	55	FAR	122 µg/ml	
HeLa	0	100	9	36	FAR	57 µg/ml	
ViBo	0	100	18	26	FAR	74 µg/ml	
CaSki	0	100	14	38	Rinvanil	91 µg/ml	
HeLa	0	100	9	8	Rinvanil	62 µg/ml	
ViBo	0	100	2	13	Rinvanil	149 µg/ml	
-- No tumorales --							
					Capsaicina	FAR	Rinvanil
Células	Control	Positivo	AcOEt		CaSki 60 µg/ml	CaSki 122 µg/ml	CaSki 91 µg/ml
					25	63	41
Fibroblastos	1	100	7		HeLa 100 µg/ml	HeLa 57 µg/ml	HeLa 62 µg/ml
					44	21	21
					ViBo 78 µg/ml	ViBo 74 µg/ml	ViBo 149 µg/ml
					35	37	72
					CaSki 60 µg/ml	CaSki 122 µg/ml	CaSki 91 µg/ml
					24	31	22
Linfocitos	3	100	10		HeLa 100 µg/ml	HeLa 57 µg/ml	HeLa 62 µg/ml
					37	23	35
					ViBo 78 µg/ml	ViBo 74 µg/ml	ViBo 149 µg/ml
					13	6	39

Tabla 3. Valores de actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares

CaSki, HeLa y ViBo tratadas con sus respectivas IC₅₀ de los capsaicinoides, medido como porcentaje de células lisadas.

Los resultados indican que la capsaicina, FAR y Rinvanil ejercen una actividad necrótica en las tres líneas tumorales, siendo las células HeLa las más sensibles para la capsaicina, presentando un 35 % de actividad necrótica a la concentración de 100 µg/ml, mientras que las células ViBo fueron las menos sensibles, presentando sólo un 16 % de necrosis a la concentración de 78 µg/ml. En el caso de FAR, éste resultó ser el más necrótico, donde las células CaSki fueron las más sensibles, presentando una actividad necrótica de un 55% a la concentración de 122 µg/ml, mientras que las células ViBo presentaron la menor actividad de 26% a una concentración de 74 µg/ml. Con respecto al Rinvanil, éste fue el menos necrótico de los tres, generando una actividad necrótica de 38% en

células CaSki a una concentración de 91 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en células HeLa y ViBo únicamente presentaron una actividad necrótica de 1 y 11% de necrosis, respectivamente (Fig. 15, Tabla 3).

En lo que respecta a las células no tumorales, los tres capsaicinoides ejercieron actividad necrótica tanto en células fibroblásticas así como en células linfocíticas, destacándose la capsaicina como la de mayor actividad necrótica en fibroblastos (71%), mientras que en linfocitos mostró una actividad de 22 a 31%. Con respecto al FAR, éste presentó una actividad necrótica del 57% en células fibroblásticas, mientras que en células linfocíticas fue en un rango de 23 a 37%. Sin embargo, el Rinvanil fue el menos necrótico de los tres, presentando una actividad necrótica máxima de 22% en células fibroblásticas, mientras que en células linfocíticas presentó una actividad necrótica de 13, 6 y 39% a las concentraciones de 91, 62 y 149 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Inducción de Caspasa 3 activa por la capsaicina, FAR y Rinvanil en células tumorales.

Partiendo del hecho de que la capsaicina, el FAR y el Rinvanil inducen a las células tumorales a expresar una morfología celular y nuclear característica de células apoptóticas, procedimos a cultivar células HeLa, CaSki y ViBo con las IC_{50} de estos capsaicinoides, con la finalidad de localizar caspasa 3 activa, la cual es característica de un proceso apoptótico, esta fue evaluada por citometría de flujo.

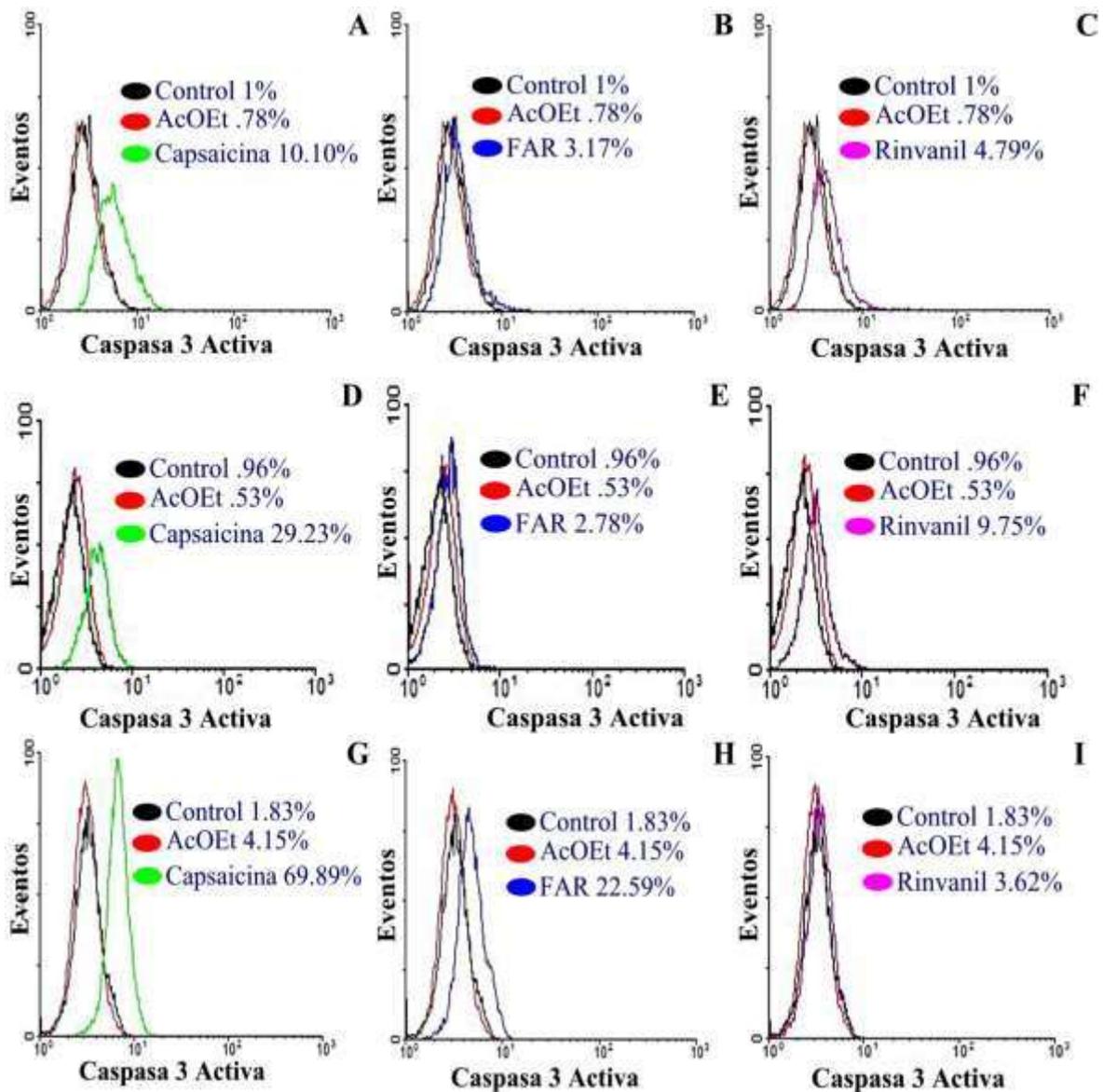


Figura 16. Detección de caspasa 3 Activa en cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo estimulados con sus respectivos IC_{50} obtenidos de los diferentes capsaicinoides. A,B y C; línea CaSki; D, E y F; línea HeLa y G, H y I; línea ViBo. Control; cultivo sin capsaicinoide y AcOEt; cultivo con solvente. Los porcentajes representan la cantidad de caspasa 3 activa localizada por citometría de flujo.

Los resultados muestran que la capsaicina fue el único capsaicinoide que indujo la activación de la caspasa 3 activa en las tres líneas tumorales (Fig. 16), sugiriendo que el FAR y el Rinvanil han perdido la capacidad de inducir la activación de caspasa 3 activa y por tanto su capacidad apoptótica.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas los tratamientos contra el cáncer se han basado principalmente en la aplicación dirigida de la radiación y el uso de fármacos citotóxicos, que son de baja selectividad y de alto costo. No obstante su innegable éxito, éstos sólo son eficientes en tumores que han sido detectados tempranamente y que aún no han desarrollado metástasis, resultando ineficientes en pacientes en fase terminal o metastásicos, dejando ver la necesidad de generar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer. Al respecto, los capsaicinoides han sido descritos como agentes antitumorales, donde la capsaicina es uno de los capsaicinoides más estudiados. (C. Chien et al., 2013; Yun et al., 2005). La actividad antiproliferativa de la capsaicina descrita en diferentes líneas tumorales, cuyas IC_{50} oscilan entre 200 a 300 μM (Bley et al., 2012), están acorde con los valores de IC_{50} obtenidos en este trabajo para las líneas celulares de CaCU HeLa, CaSki y ViBo tratadas con capsaicina (197, 327 y 255 μM respectivamente).

Con respecto a las células no tumorales, el grupo de J. Chow, 2007 mostró que la capsaicina ejerce una actividad antiproliferativa de acción selectiva, ya que mientras en células AGS (cáncer gástrico) abate un 50 %, en células no tumorales sólo se registró un 20%. Al respecto, nuestros resultados indican que la capsaicina y sus análogos afectan el potencial proliferativo de células fibroblásticas entre un 18-71%, siendo la capsaicina la de menor actividad antiproliferativa (18-27%), mientras que en células linfocíticas, utilizando dosis equimolares, la capsaicina y el FAR afectaron fuertemente a estas células (42 y 80% respectivamente), siendo el Rinvanil el de menor efecto antiproliferativo (14%). Por lo que tanto la capsaicina, como el Rinvanil pudieran tener efecto selectivo, ya que mostraron a las mismas dosis, una menor capacidad de inhibición a la proliferación respecto a las líneas de CaCU, aunque se observó que a concentraciones mayores a los 327 μM , los tres capsaicinoides afectan el potencial proliferativo de ambos tipos celulares normales de manera significativa. Es interesante mencionar que se ha descrito que algunos fármacos anticancerígenos inducen un decremento en el conteo de linfocitos en sangre (Dunagin, 1982; Ellis et al., 2009), por lo que tomando en cuenta que en nuestro trabajo el Rinvanil presentó un muy bajo efecto antiproliferativo en linfocitos, podríamos suponer que este fármaco tenga un bajo efecto en el decremento de linfocitos en tratamiento. Nuestros resultados concuerdan con lo publicado por el grupo de Zhang y col., 2003, quienes reportan que a 200 μM la capsaicina produce una inhibición del 75% en la proliferación inducida de linfocitos.

Con respecto al efecto en la morfología celular y nuclear, nuestra evaluación indica que la capsaicina, FAR y Rinvanil induce a las células de CaCU HeLa, CaSki y ViBo a expresar características morfológicas propias de células apoptóticas, lo cual concuerda con lo publicado para la capsaicina, la cual ha sido descrita como un inductor de apoptosis en diferentes líneas tumorales (Czaja et al., 2006; S-W et al., 2011; Anand et al., 2010).

Los niveles de activación de caspasa 3 activa, demostraron que muy pocas células presentaban la enzima en su forma activa cuando se trataron con FAR y Rinvanil. En el caso de las células inducidas con Capsaicina, la cantidad de células positivas a la inmunodetección aumentó considerablemente en comparación a las tratadas con sus análogos. En este sentido es muy importante hacer una correlación entre las características morfológicas adquiridas por las células durante el tratamiento y la actividad de las enzimas apoptóticas encontradas. Las imágenes de microscopía óptica permiten apreciar que las células tratadas con capsaicina presentan una fuerte compactación de la cromatina e incluso se pueden observar francos cuerpos apoptóticos, características coincidentes con los elevados niveles de activación de caspasa 3 activa. Sin embargo, en las células tratadas con los análogos, en donde la activación de la enzima es menor, las alteraciones morfológicas que presentan las células resultan ser menos drásticas. Sugiriendo que no todos estos compuestos provocan la misma respuesta con respecto a la activación de la caspasa evaluada aquí, con lo que tales cambios estructurales en FAR y en Rinvanil pueden estar interfiriendo en su capacidad de activar a la enzima. En conclusión encontramos que la activación de la caspasa 3 activa sólo fue detectada para la capsaicina, sugiriendo que los cambios estructurales del FAR y el Rinvanil provocaron que perdieran esta capacidad apoptótica.

El hecho de que los tres capsaicinoides presentaran actividad citotóxica (liberación de LDH) en los cultivos de las líneas tumorales indica que su mecanismo de acción también presenta, aparte del apoptótico, una acción citotóxica, siendo el FAR es el más citotóxico, lo cual concuerda con publicaciones en donde encuentran que los capsaicinoides son fuertes agentes citotóxicos (Reilly et al., 2003). Con respecto al efecto citotóxico en células no tumorales, los tres capsaicinoides resultaron también significativamente citotóxicos en células fibroblásticas, así como en células linfocíticas, sin embargo, interesantemente en estos últimos, el Rinvanil fue el de menor efecto citotóxico a concentraciones menores de 327 μ M. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ko F. et al., 1998, donde encuentra que la capsaicina es tóxica para fibroblastos (Bley et al., 2012). También el Rinvanil mostró un efecto selectivo en linfocitos al inducir

una mucho menor citotoxicidad que en las células de CaCU, indicando un posible uso del Rinvanil en terapias anticáncer.

Nuestros resultados indican que los cambios estructurales en los análogos de la capsaicina; el FAR y el Rinvanil, que también presentan una mucho mayor afinidad a los receptores TRPV1, aunque conservan la actividad antiproliferativa y citotóxica presente en la capsaicina, así como la capacidad de inducir características morfológicas propias de células apoptóticas, perdieron la capacidad de inducir la activación de la caspasa 3 activa.

Estos resultados sugieren que aunque todos los compuestos inician el proceso de apoptosis, solo la capsaicina lo lleva a conclusión. Sería interesante determinar qué cambio estructural de la capsaicina es aquella encargada de perder la capacidad apoptótica. Por otro lado la conocida actividad analgésica aumentada en los análogos de la capsaicina, evaluada a través de los receptores TRPV1, resultó ser un evento independiente a la actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis encontrada en nuestro trabajo. Es importante en un futuro, encontrar una relación estrecha entre la estructura y función de estos compuestos, de tal forma que se pudiera establecer que cambio es el adecuado para hacer que la capsaicina conserve su potencial apoptótico, pero se vuelva más selectiva como lo encontrado en el Rinvanil. Esto abre un campo interesante para el diseño de fármacos análogos de la capsaicina, que pudieran tener una aplicación clínica antitumoral

CONCLUSIONES.

La Capsaicina, FAR y Rinvanil afectan el potencial proliferativo de las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la concentración.

Capsaicina, FAR y Rinvanil inducen muerte celular necrótica tanto en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo así como en las células fibroblásticas y linfocíticas no tumorales.

Capsaicina induce la presencia de caspasa 3 activa en líneas celulares de CaCU, CaSki, HeLa y ViBo.

Rinvanil se muestra como la alternativa, para continuar con la investigación.

PERSPECTIVAS.

Continuar con la investigación con el fin de detectar que cambios estructurales potencian la apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA.

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

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

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

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

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

Amiya K., Basu S. (2010). Fas-associated factor 1 is a negative regulator in capsaicin induced cancer cell apoptosis. *Cancer Letters*; 287:142-149.

Anand U., Otto W., Anand P. (2010). Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Molecular Pain*; 6(82):1-11.

Ann H., Harold J. (2001). Side effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Terapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*; 30:135-142.

Appendino G., Alberto M. (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(17):3739–3745.

Appendino, G., De petrocellis L. (2005b). Develop pf the firts Ultra-Potent “Capsaicinoid” Agonist at Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channels and its Therapeutic Potential. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 312:561-570.

Appendino G., Minassi A. (2005a). Hot cuisine as a source of anti-inflammatory drugs. *Phytochemistry Review*; 4:3-10.

Baranidhran G., S. Das y A. Bhaskar. (2013). A review of the high concentration capsaicin path and experience in its use in the management of neuropathic pain. *Therapeutical Advances in Neurological Disorders*. 6(5)287-297.

Bergers G., Benjamin L. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature*; 3:401-411.

Bhutani M., Pathak A., (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):2006-2039.

Blass D., Blessing J. (2002). Randomized Trial of Cisplatin and Ifosfamide with or without bleomycin in squamous Carcinoma of the cervix: A gynecologic oncology group study. *Journal of clinical oncology*; 20.7:1832-1837.

Bley K., B. Gary and M. Bashir. (2012). A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicologic Pathology*. 40:847-873.

Bruce A., Thomas G. (2005). Chemotherapy and the war on cáncer. *Nature: Reviews Cancer*; 5:65-72.

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

Castillo E., Regla I. (2008). Efficient Chemoenzymatic Syntesis of Phenylacetylirivanil: An Ultrapotent Capsaicinoid. *SYNLETT*; 18:2869-2873.

Caterina J., Schumacher M. (1997). The capsaicina receptor: a heat-actived ion channel in the pain pathway. *Nature*; 389:816-824.

Chien C., K. Ma, H. Lee y P. Liu (2013). Dual Effec of capsaicin on cell death in human osteosarcoma G292 cells. *European Journal of pharmacology*

Chow J, Manith N. Jing Z y Chai J. (2007). TRPV 6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells-Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1773:565-576.

Christoph A. Klein (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature*; 9:302-313. (Christoph A. Klein, 2009).

- Cory J., G. Postle, C. Aaron y S. Mauren (2007). Potassium and capsaicin induced release of agmatine from spinal nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*. 102:1738-1748.
- Cordell A. (2000). Biodiversity and drug discovery a symbiotic relationship. *Phytochemistry*; 55:463-480.
- Crocker J. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Inglaterra, Editorial Wiley, (2003), pp 49-61.
- Czaja k. Burns G. Ritter R. (2006). Capsaicin-induced neuronal death and proliferation of the primary sensory neurons located in the nodose ganglia of adult rats. *Neuroscience*; 154:621-630.
- Dancey J., Eisenhauer E.A. (1996). Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. *British Journal or Cancer*; 74:327-338.
- Díaz L., Chiong M., Quest A., Lavandero S., A. Stutzin. (2005). Mechanisms of cell death: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Cell Death and Differentiation*; 12: pp 1449–1456.
- Douglas R. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J.Clin. Invest*; 116:1167-1173.
- Dunagin W. G. (1982). Clinical toxicity of chemotherapeutic agents: Dermatologic toxicity. *Semin Oncol*; 9:14-22.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*68:383–424.
- Ellis L. M., Reardon D. A. (2009). Cancer: The nuances of therapy. *Nature*; 458:290-292.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*; 35(4): pp 495–516.
- Fink S., Cookson T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*; 4:1907–1916.
- Fisher D. (2001). Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol Oncol Clin North*; 15:931-56.
- Folkman, J., Kalluri, R. (2004). Cancer without disease. *Nature*; 427:787.

- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100:57-70.
- Han P., Heath A, (2007). Capsaicin causes protein synthesis and microtubule disassembly through TRPV1 Activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochemical Pharmacology*; 73:1635-1645.
- Hernández S., R. Luna-Reyes y K. Oyama. (2001) Genetic Structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annum* (*Solanaceae*) from Mexico. *Plant Systematics and Evolution*. 226:129-142.
- Huh WK. (2009). Human Papillomavirus Infection: A concise review of natural history. *Obstetrics and Gynecology*; 114:139-143.
- INEGI, (2014). Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/mama0.pdf>
- Jayshere R., Sreenivas A. (2009). Cell intrinsic and extrinsic factors in cervical carcinogénesis. *J. Med. Research*. 13:286-295.
- John M., Ronald de Wit. (2013). Taxane Mechanism of action: potential implications for treatment sequencing in metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*; 5218:7-14.
- Joshua J. Tewksbury, Gary P. Nabhan. (2001). Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature*; 412: 403-404.
- Joseph R., Rohrich H. (2005). Selective Blockade of Capsaicin Receptor TRPV1 attenuates Bone Cancer Pain. *The Journal of Neuroscience*; 25(12):3126-3131.
- Kamb A. Wee S., Lengauer C. (2007). Why is cancer drug discovery so difficult?. *Nature Review Drug Discovery*. 6:115-121.
- Karai L., Brown D. (2004). Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *The Journal of Clinical investigation*; 113(9):1344-1352.
- Kartick C., Reddy B. (2009). Role of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Capsaicin Mediated Oxidative Stress Leading to Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *PloS ONE*; 6(5):e20151.
- Kaye SB. (1996). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British Journal of Cancer*; 78.3:1-7.

Kazuya O., Toshiki O., Masamune H. (2001). Plasma, intestine and tumor levels of 5-fluorouracil in Mice Bearing L1210 Ascites Tumor Following Oral Administration of 5-Fluorouracil, UFT (Mixed Compound of Tegafur and Uracil), Carmafur and 5'-Deoxy-5-fluorouridine. *Biol. Pharm. Bull*; 11:1329-1331.

Kivinen K., M. Kallajoki y P. Taimen. (2005). Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Experimental Cell Research*. 311:62-73.

Knebel V. (2002). New Markers for Cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal Cancer*; 38:2229-2242.

Ko F., M. Diaz, P. Smith E. Emerson y Yj. Kim (1998). Toxic effects of capsaicin on keratinocytes and fibroblasts. *J. Burn Care Rehabil*. 19:409-413.

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

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death & Differentiation*; 16: pp 3–11.

Kurita S., Kitagawa E. (2002). Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast ADN Microarray. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*; 66(3):532-536.

Labianca A., Pancera G., Aitini E. (1991). Folic acid +5-fluorouracil(5FU) versus equidose 5-FU in advanced colorectal cancer. Phase III study of GISCAD. *Ann. Oncology*. 2(9):673-679.

Laborde C., J. A., O. Pozo C. 1984. Presente y Pasado del Chile en México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Publicación Especial No. 85, México. 80 p.

Landoni F., Maneo A. (1997). Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for Ib-IIa cervical cancer. *Lancet*, 350:535-540.

Levey, J.J. Tewksbury. (2007) Evolutionary Ecology of secondary compounds in ripe fruit: Case Studies with Capsaicin and Emodin. *Seed Dispersal: Theory and its Application in a Changing World*. 37-47.

- Lin C., Lu W., Wang C., Chan Y. (2013). Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *Complementary and alternative Medicine*. 13(46):1-9.
- Manuela P., Lejeune G. (2003). Effect of capsaicin on substrate oxidation and weight maintenance after modest body-weight loss in human subjects. *British Journal of Nutrition*; 90:651-659.
- Malumbres M., Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature*; 9:153-168.
- Malumbres M., Barbacid M. (2002). To cycle or no to cycle: a critical decision in cancer. *Nature*; 1:222-232.
- Massagúe Joan (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*; 432:298-307.
- Mc Murray H., Nguyen D. (2001). Biology of human Papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*; 82:15-33.
- Michael R. Boyd., Kenneth D. Paull. (1995). Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Development Research*.34:91-109.
- Min Y. (2012). Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. *Molecular Medicine Reports*; 5:585-591.
- Moon D., Kang C., Kang S., Choi H. (2012). Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 up-regulation: involvement of Ca²⁺ influx. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 259:87-95.
- Montiel A., Garcia C. (2004). Molecular architecture of the vanilloid receptor, Insights for drug design. *European Journal of Biochemistry*; 271:1820-1826.
- Mun K., Ann M. y Sanguine Byun (2010). Cocarcinogenic Effect of Capsaicin Involves Activation of EGFR Signaling but Not TRPV1. *Cancer Research*; 70:6859-6869.
- Nevius E., Srivastava P., Basu S. (2011). Oral ingestion of Capsaicin, the pungent component of chilli pepper, enhances a discrete population of macrophages and confers protection from autoimmune diabetes. *Nature*. 5(1):76-87.
- Nguyen D. y Bos. P. (2009). Metastasis:from dissemination to organ-specific colonization. *Nature*; 9:274-286.

Niiyama, Y., Y. kawamata, Ji. (2007). Bone Cancer Increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*; 148:560-572.

Ocampo E., Pereira A. Moral O., Cedillo L., Rodríguez M., Alvarez A. (2008). HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases. *Gynecologic Oncology*; 108:10-18.

Okere O., Waterhouse D. (2004). Capsaicin increases GFAP and glutamine synthetase immunoreactivity in rat arcuate nucleus and median eminence. *NeuroReport*; 15(2):255-258.

Onishi K. Jimi S. Tsugu H. (2006). Mechanis of small globular protein-induced plasma membrane permeability and cytotoxicity in U87-MG Human Malignant Glioblastoma Cells. *Anticancer Research*; 26:4033-4042.

Paul E., Michael E. (2010). The firts prehispanic chile (capsicum) from the U.S. Southwest/Northwest Mexico and its changing use. *American Antiquity*.75(2):245-257.

Qiao S., Weihua L. (2005). Involvement of peroxyntirite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neuroscience Research*; 51:175-183.

Rachelle G. (2009). Divide and conquer: High resolution structural information of TRP channel fragments. *The journal of general physiology*; 133(3):231-237.

Reilly A., Taylor J. (2003). Capsaicinoids Cause Inflammation and Epithelial Cell Death trough Activation of vanilloid Receptors. *Toxicological Sciences*; 73:170-181.

Rose P., Bundy B. (1999). Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy and Chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*; 340.15:1144-1153.

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

Schiffman M. Kruger k. (2003). Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *JNCI Monographs*; 31:14-19.

Shang P., Jung C. (2009). Capsaicin-Induced apoptosis in human Hepatoma HepG2 Cells. *Anticancer Research*; 29:165-174.

Shengqing Liy., Ann M.Bodey. (2011). TRPV1-antagonist AMG9810 promotes mouse skin tumorigenesis through EGFR/Akt signaling. *Carcinogenesis*;32(5):779-785.

Steenberg R., Wilde J(2005). HPV Mediated transformation of anogenital tract. *J Clinical Virology*; 32S:S25-S33.

Stefan J., Yigong S. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature*.5:897-908.

Surh YJ., Lee S. (1996). Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, Co-carcinogen or Anticarcinogen? *Food Chemistry Toxicology*; 34(3):313-316.

S-W Ip, S-h L. A-C huang. (2011). Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmatic reticulum stress. *Human and Experimental Toxicology*; 1-11.

Szallasi A., Blumberg P. (1999). Vanilloid Capsaicin Receptors and Mechanism. *Pharmacological Reviews*; 51(2):159-211.

Taylor R., Cullen S. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*; 9:231-242.

Tovar M., Martinez M. (2012). Human Papillomavirus Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and its Clinical Implications. *Intech*; 1:1-22.

Wang. H.D. (2005). The vanilloid receptor and hypertension. *Acta Pharmacologica Sinica*; 26(3):286-294.

Wei y., Xianfeng G. (2006). Capsaicin Induces apoptosis in hela cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian Journal of Traditional Medicine*; 1:1-7.

Winter J., Bevan S. (1995). Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal Of Anaesthesia*; 75:157-168.

Woodman C., Collins S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews*; 7:11-22.

Yang W., Gong X., Zhao X. (2006). Capsaicin Induces apoptosis in HeLa cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian Journal of traditional medicines*. 1:1-7.

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

Yun SK, Kim JK, Kim SJ, Won YH. (2005). Cytotoxicity of capsaicin on cultured Human Skin fibroblast. *Korean Journal of Dermatology*. 2:194-203

Zhang J., Nagasaki M. (2003). Capsaicin inhibits growth of adult T-cells. *Leukemia Research*; 27:275-283.

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

APÉNDICE

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

	Cantidad (g/l)
Sales inorgánicas	
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0.8
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	0.0652
L-Histidina Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.3
L-leucina	0.01
L-Lisina • HCl	0.015
L-Metionina L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02

L-serina	0.05
L-treonina	
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)	
Rojo de fenol • Na	0.001
	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 minutos.

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 minutos. 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, si 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