



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA**

“Efecto del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne sobre la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

GUZMÁN PÉREZ NANCY NALLELY

**DIRECTOR DE TESIS: M en C. ROSALVA RANGEL CORONA
ASESOR: DRA. ALEJANDRINA GRACIELA ÁVILA ORTÍZ**



México, D. F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **GUZMÁN PÉREZ NANCY NALLELY**, con número de cuenta **304122637**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de febrero de 2015** a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. ALEJANDRINA GRACIELA ÁVILA ORTÍZ

VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SECRETARIO Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE Biól. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne sobre la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 25 de noviembre de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo fue elaborado bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y el asesoramiento de la Dra. Alejandrina G. Ávila Ortiz, en el Laboratorio de Oncología Celular, L 4 PB. de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), perteneciente a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

Así mismo hago mención que este trabajo de tesis contó con el apoyo financiero del programa PAPIIT con clave del Proyecto IN215713 y PAPIME con la clave de proyecto 213312 de la DGAPA, UNAM.

“A menos que, alguien como tú se interese de verdad nada va a mejorar, jamás”

Dr. Seuss

“Tres billones de bases químicas.

Es lo que se necesita para construir a un ser humano. Individual y diferente de cualquier otro. Y aun así estamos conectados a toda forma de vida en este planeta.

Todos compartimos los mismos mecanismos fundamentales y todos compartimos esta tierra que evoluciona constantemente.

Esa es la belleza, la magia, de la vida”

Anónimo.

Agradecimientos

Agradezco a mi directora de tesis la **Dra. Rosalva Rangel Corona**, por abrirme las puertas de su laboratorio permitiéndome formar parte de su equipo de trabajo, por haberme tenido la paciencia necesaria para guiarme y aportarme sus enseñanzas, las cuales ayudaron en mi desarrollo académico y personal.

A mis sinodales **Dra. Alejandrina Ávila Ortiz, Dr. Edelmiro Santiago Osorio, M en C. José Vicente Misael Hernández Vázquez, Biol. Reynalda Roldan Pérez**, por sus aportaciones y observaciones que enriquecieron el presente trabajo.

Al **Dr. Hugo López Moñuz**, por compartirme sus conocimientos, por tener el tiempo de apoyarme a resolver mis dudas.

A mis Maestros de laboratorio **Norma Luna, Leonardo Trujillo e Itzel del Rio** por darme su tiempo, apoyo y compartir sus conocimientos, los cuales fortalecieron mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio que estuvieron desde el inicio de esta aventura, **Alondra Díaz, Daniel Aguilar, Luis Tapia, Libertad Palomares**, los cuales me enseñaron y compartieron muchas lecciones de vida y de los cuales aún me falta mucho por aprender. En especial a **Rubí Santiago**, quien estuvo conmigo desde un principio y que me apoyo incondicionalmente en los buenos y malos momentos, que entre penas y alegrías supimos sacar este proyecto. Así mismo a **Arturo, Armando, Ana, Pablo, Paty, Saúl, Hugo, Salvador, Erika, Carlos, Axel, Marlene, Miriam**, que en su paso por el L-4 aportaron muchas cosas a mi desarrollo profesional y personal.

A **Don José Chavarría**, ya que gracias a su trabajo técnico en el laboratorio, teniendo siempre todo en orden y facilitaba el poder realizar la parte experimental de este trabajo.

A ti, que has estado conmigo en estos últimos 2 años, compartiendo miles de historias, enseñándome y guiándome con tu experiencia, mil gracias por todo tu apoyo y consejos.

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico principalmente a mi mamá, por todo su amor y paciencia, a quien le debo todo lo que soy, que a través de muchos sacrificios pudo darme todo lo que necesite para lograr llegar a donde estoy, que me ha brindado todo su apoyo y comprensión en todo momento, por todas esas lecciones de vida que me ha enseñado, por demostrarme que en esta vida todo se puede y que jamás debo rendirme, te entrego el producto de nuestro esfuerzo, ¡LO LOGRAMOS!

A mi tía y hermana, que han estado conmigo en todo momento, siendo parte fundamental en mi vida, que han estado ahí siempre para aconsejarme y guiarme, por todo su apoyo y comprensión, por todos esos momentos que han enriquecido mi vida, solo me queda decirles ¡GRACIAS!

A mis tíos, por su apoyo incondicional, que gracias a sus consejos me han sabido guiar, dándome su ejemplo de superación, en especial a mi tía Mary y a mi tío Martín quienes además de su apoyo y consejos, han estado presentes en todo momento, siendo parte esencial en mi vida.

A todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a mi formación académica y personal, con sus consejos, apoyo y lecciones de vida.

“Efecto del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne sobre la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL”

Guzmán-Pérez, 2015

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| Resumen | 2 |
| Introducción | 3 |
| Marco teórico | 5 |
| ➤ Muerte celular | 5 |
| ➤ Necrosis | 6 |
| ➤ Apoptosis | 7 |
| • Proteínas inhibidoras de la Apoptosis | 11 |
| • Smac/DIABLO | 12 |
| ➤ Cáncer | 18 |
| • Cáncer de Cérvix | 21 |
| ➤ Tratamientos | 23 |
| • Tratamientos Naturales | 25 |
| ➤ Algas Pardas | 26 |
| • <i>Sargassum</i> | 28 |
| Justificación | 31 |
| Hipótesis | 32 |
| Objetivos | 33 |
| Material y Método | 34 |
| Resultados | 41 |
| Discusión | 56 |
| Conclusión | 63 |
| Perspectivas | 63 |
| Apéndice | 64 |
| Referencias | 70 |

| Figuras | Página |
|--|---------------|
| - Muerte por Necrosis | 6 |
| - Muerte por apoptosis | 7 |
| - Cambios bioquímicos que presenta una célula en apoptosis | 8 |
| - Vías de muerte celular | 10 |
| - Estructura molecular de los miembros de la familia de las IAP | 11 |
| - Estructura molecular de la XIAP | 12 |
| - Estructura del gen Smac DUABLO | 14 |
| - Interacción de Smac/DIABLO con las IAP | 15 |
| - Comparación de la división de una célula normal y una cancerígena | 19 |
| - Desarrollo del cáncer de cérvix | 22 |
| - Proporción de xantofilas y carotenoides del extracto de <i>Sabu</i> (Ch) | 34 |
| - Integridad del ARN | 42 |
| - Expresión del ARNm para β -actina | 44 |
| - Expresión del ARNm para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en la línea celular CALO | 46 |
| - Expresión del ARNm para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en la línea celular INBL | 51 |

| Tablas | |
|---|----|
| - Patologías causadas por la desregulación del proceso de apoptosis | 17 |
| - Diferencias entre tumor benigno y maligno | 19 |
| - Valores de las diluciones para las IC50 | 35 |
| - Características de las líneas celulares CALO e INBL | 35 |
| - Secuencias del primer de β -actina y Smac/DIABLO | 38 |
| - Densitometría de los productos de amplificación de Smac/DIABLO en la línea celular CALO | 47 |
| - Densitometría de los productos de amplificación de Smac/DIABLO en la línea celular INBL | 52 |

| Gráficas | |
|--|----|
| - Masa de los productos obtenidos para el ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular CALO | 48 |
| - Histograma del ARNm para el ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular CALO | 50 |
| - Masa de los productos obtenidos para el ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular INBL | 53 |
| - Histograma del ARNm para el ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular INBL | 55 |

Abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico, molécula compuesta por nucleótidos desoxirribosa, contiene la información genética de todas las células vivas.
- **ADNc:** ADN complementario, producto obtenido a partir de la RT.
- **AIF:** (Apoptosis Inducing Factor). Factor Inductor de Apoptosis
- **Apaf-1:** Factor activador de apoptosis-1, homólogo de la proteína CED-4 del *elegans*.
- **Apoptosoma:** Complejo oligomérico Formado por apaf-1, Citocromo c y procaspasa 9, que desencadenan los procesos, propios de la muerte celular.
- **ATP:** Trifosfato de adenosina.
- **ARN:** Ácido ribonucleico, molécula formada por nucleótidos de ribosa; transfiere instrucciones hereditarias del núcleo al citoplasma, también es material genético de algunos virus.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico ribosomático, se combina con proteínas para formar ribosomas, que son las estructuras que enlazan aminoácidos para formar proteínas.
- **ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia, lleva el aminoácido correcto al ribosoma, según el código del ARNm.
- **Bad:** Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, asociado a Bcl-XL/Bcl-2.
- **Bak y Bax:** Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2.
- **Bcl-2:** (B-Cell lymphoma 2). Miembro de la familia Bcl-2, identificada como producto del pro-oncogen Bcl-2.
- **BH:** (Homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoides que funcionan como motivos de interacción proteica.
- **BH3:** Dominio proapoptótico de la familia Bcl-2.
- **Bid:** Dominio de muerte para interacción con BH3, del inglés *Interacting domain Death*.
- **BIR:** Supresor de la apoptosis identificado en el genoma de baculovirus.
- **CARD:** Dominio de reclutamiento de caspasas.
- **Caspasa:** Cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzima proteolítica que contiene cisteína en su molécula y verifica la proteólisis en lugares previos a aspartato.
- **Ced:** (Cell Death Anormal), Muerte celular anormal, genes que regulan la muerte celular en *C.elegans*.
- **dATP:** Desoxiadenosina trifosfato. Participa en el reclutamiento y activación de la Caspasa 9.
- **DD:** Dominio de muerte.
- **DED:** Dominio efector de muerte.
- **dNTP_s:** Desoxinucleótido trifosfato.

-
- **FADD:** dominio de muerte asociado a Fas.
 - **FAS:** CD95/APO-1. Miembro de la super familia de receptores de muerte TNF.
 - **FASL:** ligando del receptor de muerte Fas.
 - **IAP:** Inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR, críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por Smac/DIABLO.
 - **LSHP:** Linfocitos de Sangre Periférica Humana.
 - **PARr:** Poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparadora del ADN inactivado por las caspasas.
 - **PBS:** Tampón salino fosfato.
 - **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
 - **PPTM:** Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.
 - **PS:** Fosfatidilserina.
 - **Sabu(Ch)W:** *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne.
 - **SFB:** Suero Fetal Bovino.
 - **Smac/DIABLO:** Inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de las caspasas, proteína que se une directamente y bloquea la acción de las IAP.
 - **TNF:** Factor de Necrosis Tumoral que se une al TNF-R1.
 - **TNF-R:** Receptor del factor de necrosis tumoral.
 - **TRADD:** Proteína con dominio de muerte asociada a TNF-R1.
 - **TRAIL:** Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF.
 - **VDAC:** (Voltage Dependent Anion Chanel), Canal de aniones dependiente de voltaje; funciona como controlador de acceso para la entrada y salida de los metabolitos mitocondriales.
 - **XIAP:** Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis.

Resumen

El Cáncer de Cérvix es una de las principales enfermedades neoplásicas más frecuentes y mortales en la población femenina, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Actualmente, los diversos tratamientos disponibles para este padecimiento causan severos efectos colaterales, que merman seriamente la condición general de la paciente. Es por ello que en los últimos años la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas de origen natural constituye una de las principales tendencias de investigación. Las algas se han convertido en el eje de numerosos estudios, los cuales demuestran que de ellas se obtienen diversos metabolitos secundarios. En el caso particular de las algas pardas, que pertenecen al género *Sargassum*, se ha demostrado que son fuente de diversos compuestos con propiedades biológicas como: antibacterial, antifúngica, anticoagulante, antioxidante, inmunoregulador, antiinflamatorio, antiangiogénico, antitumoral, entre otras.

Las algas del género *Sargassum* tienen una amplia distribución, particularmente en el estado de Veracruz, donde se encuentra la especie *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne [*Sabu(Ch)W*]; la cual, recientemente en el Laboratorio de Oncología Celular, ha reportado un efecto citostático, deteniendo a las células de Cáncer de Cérvix en diferentes fases del ciclo celular, dependiendo del estadio, para posteriormente inducir a muerte por apoptosis, además de regular positivamente la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica *Citocromo c*. Asimismo, presenta un efecto Inmunoregulador sobre Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH), por ello, este trabajo tiene como objetivo evaluar la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, para dilucidar la ruta mediante la cual el extracto de *Sabu(Ch)W* induce a muerte por apoptosis a las células de Cáncer de Cérvix.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto de *Sabu(Ch)W* presenta una regulación positiva sobre el ARNm de Smac/DIABLO, aportando información que ayudará a determinar la ruta por la cual el extracto de *Sabu(Ch)W* induce a muerte por apoptosis a las células de Cáncer de Cérvix. Dando así un paso más para que en un futuro este extracto pueda llegar a ser una alternativa en el tratamiento de dicho padecimiento, ya que proporcionaría una acción dual; esto es, activando estimulando al sistema inmunológico e induciendo a apoptosis a las células tumorales.

Introducción

En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la generación, proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen, con el fin de mantener un tamaño constante (Jordán, 2003). Por eso, la muerte celular es un proceso fisiológico-patológico fundamental para mantener dicho equilibrio, el cual es un punto de no retorno para las células que hayan recibido un estímulo de muerte, llevándolas así a su eliminación (Lizarbe, 2007). De esta forma se logra mantener la homeostasis en el organismo. La presencia de anomalías en la regulación de este proceso pueden ser un componente importante de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington; o incluso, el síndrome linfoproliferativo autoinmune, el SIDA, isquemia y cáncer (Norbury y Zhivotovsky, 2004).

El vocablo Cáncer no denomina sólo a una enfermedad, sino a una gran variedad de ellas ocasionadas por la suma de mutaciones en la célula, provocando así la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción a otros tejidos, siendo de esta forma una de las primeras causas de fallecimiento en el mundo (Massagué, 2009). En 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes, alcanzando los 14 millones de casos nuevos, una cifra que se prevé aumente hasta los 22 millones anuales en los próximos dos decenios (OMS, 2014).

En este contexto, cabe destacar que el Cáncer de Cérnix es un problema importante de salud pública a nivel mundial, convirtiéndose en una de las principales causas de muerte por neoplasias malignas en la mujer; afectando principalmente a los grupos de entre 25 y 69 años de edad, superado sólo por el Cáncer de mama, siendo los países en vías de desarrollo como México los que presentan una mayor incidencia (López y Lizano, 2006).

En el caso de México, a pesar de los programas de salubridad implementados, es detectado en estadios avanzados y por lo tanto los tratamientos son poco oportunos y muchas veces sólo de tipo paliativo. Hoy en día los más utilizados son la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía. Sin embargo, el éxito de estas terapias depende de que se realice una detección temprana del tumor, ya que en estas etapas se logra una mayor efectividad, pero no olvidemos que dichos procedimientos suelen ser invasivos y poco selectivos. Cualquiera de dichos procedimientos afecta severamente la calidad de vida de las pacientes, pues producen diversos efectos secundarios que merman la salud en general. Es así que la

búsqueda de tratamientos alternativos naturales que ayuden a disminuir estos efectos se ha intensificado en los últimos años, dando lugar a numerosos estudios donde los metabolitos bioactivos de diversas plantas y algas han sido la base.

Dentro de las investigaciones realizadas al género *Sargassum*, el cual pertenece a las algas pardas, se ha identificado que posee diversas moléculas bioactivas como fucanos y sus derivados, así como sarganinas, taninos, polisacáridos, etc. Éstas le proporcionan propiedades que van desde antibacterial, antifúngica, hasta antiangiogénica y antitumoral (Oranday, 1998).

En particular, para la especie de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne, se ha reportado una actividad citostática sobre las líneas de Cáncer de Cérvix CALO e INBL, deteniéndolas en diferentes fases del ciclo celular, dependiendo del estadio (Luna, 2012). Asimismo, se ha demostrado que dicho extracto influye de manera positiva en la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica *Citocromo c* (Santiago, 2014), además de inducir la proliferación y activación de linfocitos de Sangre Periférica Humana. Por lo cual, podemos deducir que dicho extracto puede presentar una función dual en el tratamiento del Cáncer de Cérvix: deteniendo, por un lado, la proliferación de las células tumorales para después mandarlas a muerte por apoptosis y, por otro, activando el sistema inmune.

Marco Teórico

Muerte Celular

El cuerpo humano adulto genera aproximadamente 6×10^{10} de células por día y por lo tanto un número igual de células debe morir para mantener la homeostasis celular (Cotter, 2009). Desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar células inflamatorias (Jordán, 2003). Existen células cuyo período de vida es largo, como las musculares o las neuronas, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras (Lizarbe, 2007).

El estado normal o fisiológico de un organismo se obtiene con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la endocitosis y exocitosis (en la membrana), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante: las células que mueren se sustituyen por otras. Este proceso está regulado y asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular (Lizarbe, 2007). Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto de no retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos que impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte.

La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (Degterev, 2008). Según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos no regulados como la necrosis y regulados, los cuales comprenden la activación de mecanismos específicos que determinan se produzca una muerte celular programada: apoptosis (Degterev, 2008). La apoptosis se puede especificar como una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada (Lizarbe, 2007).

Necrosis

La necrosis se ha definido como la serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular, lo que desencadena una reacción inflamatoria; algunos patólogos la definen como los eventos posteriores a la muerte celular. De tal forma, los fenómenos relacionados con la necrosis se fundamentan en la observación directa de los tejidos muertos, con tinciones que evidencian

las huellas postreras de la muerte (Ramírez *et al.* 2010) (Figura 1).

La necrosis es entendida como una muerte celular no controlada que promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y puede favorecer la diseminación de patógenos en un hospedero susceptible a perecer (Ramírez *et al.* 2010).

Diferentes estudios la replantean como un fenómeno “esencial y anunciado”, señalando que ocurre durante la ontogenia y que puede ser regulada por vías no tan claras como las de la apoptosis.

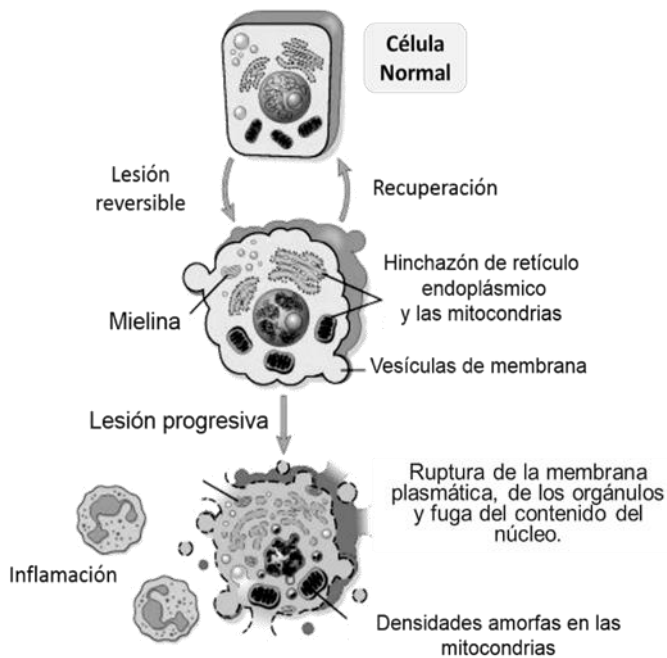


Figura 1. Muerte celular por Necrosis, Muestra algunas de las características morfológicas que se presentan en este tipo de muerte. Tomado de <http://dc359.4shared.com/doc/UkENW-xI/preview.html>

De igual forma, se ha descrito la necrosis inducida por deficiencias de ATP en la isquemia y cuando hay alteraciones de las funciones dependientes de oxígeno y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Cotran *et. al.* 2000).

Apoptosis

La apoptosis se puede definir como “el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos”. Es decir, la célula decide su propia muerte a través de una serie de estímulos o señales. Este procedimiento se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nemátodos y los mamíferos (Lizarbe, 2007). Comprendiendo así que la apoptosis es un mecanismo regulador esencial que interviene en la homeostasis tisular y en el desarrollo normal, eliminando las células innecesarias. El término apoptosis (del griego: caída) fue usado, a principios de la década de 1970, por los botánicos, pero los científicos escoceses Kerr, Wyllie y Currie lo utilizaron para describir la muerte de células del hígado, el cual al encogerse –y marchitarse– se desprendían de este órgano como hojas en el otoño. (Sánchez y Arboleda, 2008).

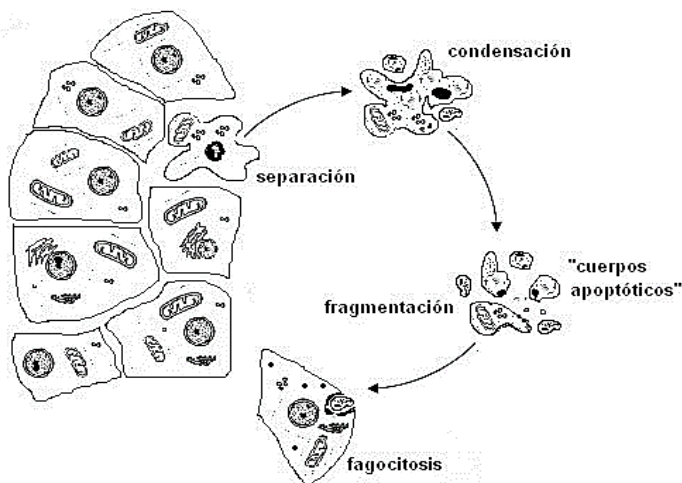


Figura 2. Muerte por apoptosis. Presenta las características morfológicas y secuenciales de este tipo de muerte. Tomado de: <http://anteshuevoogallina.blogspot.mx/2011/05/apoptosis-i-la-muerte-celular-discreta.html>

La apoptosis presenta ciertas características morfológicas como son: pérdida del contacto con otras células, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, formación de cuerpos apoptóticos, para su posterior eliminación por fagocitosis (Figura 2). Dentro de los cambios bioquímicos y moleculares que sufre la célula tenemos: la fragmentación nuclear por las endonucleasas

endógenas que dividen el ADN en fragmentos oligonucleosomales, los cuales son escindidos en regiones ricas en adenina/timina (A/T), localizados en sitios de andamiaje nuclear dando fragmentos entre 180-200pb. Esto produce el característico patrón de ADN en escalera cuando se analiza una electroforesis y se utiliza como marca bioquímica en el reconocimiento de la apoptosis (Danial y Korsmeyer 2004; Guimaraes y Linden, 2004). La

cromatina se comienza a condensar y se acumula en la periferia del núcleo. Además el nucléolo se desintegra en partículas osmiófilas (Savill y Fadok, 2000).

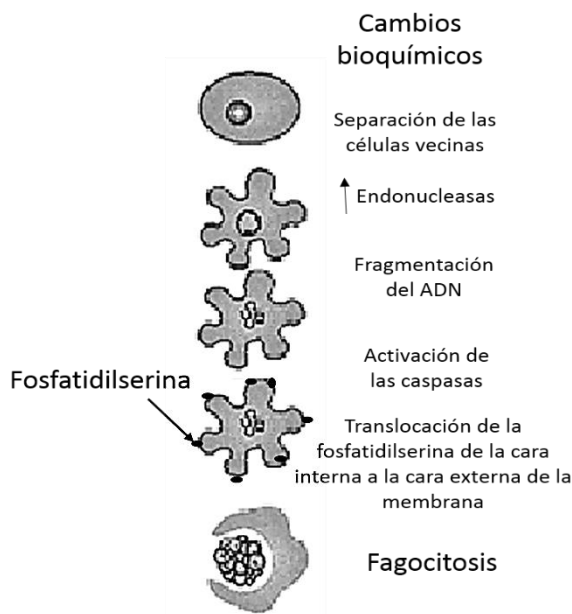


Figura 3. Cambios bioquímicos que presenta una célula en apoptosis. Tomada de Kruidering, 2001.

La fosfatidilserina (PS), presente en la cara interna de la membrana plasmática, pasa al exterior de la superficie celular (Figura 3).

Recientemente se ha propuesto que además de PS se libera otro fosfolípido, posiblemente lisofosfatidilcolina (LPC), que actúa como quimio-atrayente ayudando al reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas (Kruidering, 2001; Leyton y Quest, 2004). Esencialmente, no hay reacción inflamatoria asociada con el proceso de la apoptosis, ni con la eliminación de células apoptóticas, ya

que: (1) éstas no liberan sus componentes celulares en el tejido intersticial que rodea, (2) son rápidamente fagocitadas, y (3) la fagocitosis de las células apoptóticas no producen citocinas inflamatorias (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka *et al*, 2003). Existen dos tipos de vías de activación de la apoptosis: la extrínseca y la intrínseca.

Vía extrínseca de la apoptosis

Las células de los mamíferos expresan receptores localizados en su membrana plasmática. La unión de ligandos a estos receptores desencadena la activación de las caspasas y una cascada de reacciones que finalizan con la muerte celular. Algunos de estos receptores son el Fas, el receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) y el DR3. La fijación del Fas ligando a su receptor (Fas) provoca el reclutamiento citoplasmático del adaptador FADD (del inglés Fas-associated death domain protein), al cual fija la procaspasa 8. Este complejo se realiza por interacciones homofílicas entre secuencias polipeptídicas designadas como dominios efectores de muerte (DED, del inglés death effector domain), que están presentes en ambas proteínas. La asociación Fas/FADD y procaspasa 8 forma un complejo

denominado Complejo de señalización de muerte (DISC, por sus iniciales en inglés Death Inducing Signalling Complex). La procaspasa 8 es activada en el DISC por una proteólisis y actúa sobre las procaspasas 3, 6 y 7 que coordinan, entonces, la muerte celular. Algo similar sucede con el receptor TNF-R1 (Figura 4).

Vía intrínseca de la Apoptosis

Durante décadas se consideró a la mitocondria como un organelo encargado exclusivamente de oxidar sustratos, para dar lugar a la formación de agua en un proceso acoplado a la fosforilación en la producción de ATP. En la actualidad, se sabe que en la mitocondria existe un proceso latente de transporte, conocido como “permeabilidad transicional mitocondrial”, cuya activación se presenta bajo ciertas condiciones y se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial a iones que incluyen calcio. Se ha propuesto que esta permeabilidad mitocondrial, podría ser una de las vías de conducción de moléculas proapoptóticas (Sierra, 2011). Por lo cual, podemos inferir que la mitocondria es mediador en el proceso de apoptosis.

Hoy en día, se sabe que el poro se abre cuando hay un exceso de calcio y fosfato, lo que despolariza la mitocondria y desacopla la cadena respiratoria. El poro de permeabilidad transicional mitocondrial (PTPm) favorece la cascada de caspasas, así como la muerte celular, al liberar factores inductores de apoptosis como el *Citocromo c*, factores de fragmentación del núcleo y proteínas como Smac/ DIABLO que neutraliza a las proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) (Sánchez y Arboleda, 2008).

La proteína de translocación mitocondrial (TSPO) de 18 kDa, interactúa con VDAC para desempeñar un papel en la apoptosis. En este contexto, TSPO parece participar en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de ROS induce la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. Las ROS son conocidas por ser capaces de liberación de *Citocromo c* (Sánchez y Arboleda, 2008).

Por su parte, el *Citocromo c* liberado se une a Apaf-1 para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa- 9. La caspasa 9 activa a su vez induce a las procaspasas 3 y 7. Aunque estas vías pueden activarse de manera independiente, puede existir una intercomunicación entre ellas. La caspasa 8 que participa en la vía de receptor de muerte, puede cortar a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. Una vez que

Bid es cortado se transloca del citosol a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana, provocando la liberación del *Citocromo c* del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol. De esta manera se conectan las vías extrínseca e intrínseca. La actividad proteolítica de las caspasas proporciona las bases bioquímicas para el fenotipo apoptótico (Martínez M. *et al.*, 2004) (Figura 4).

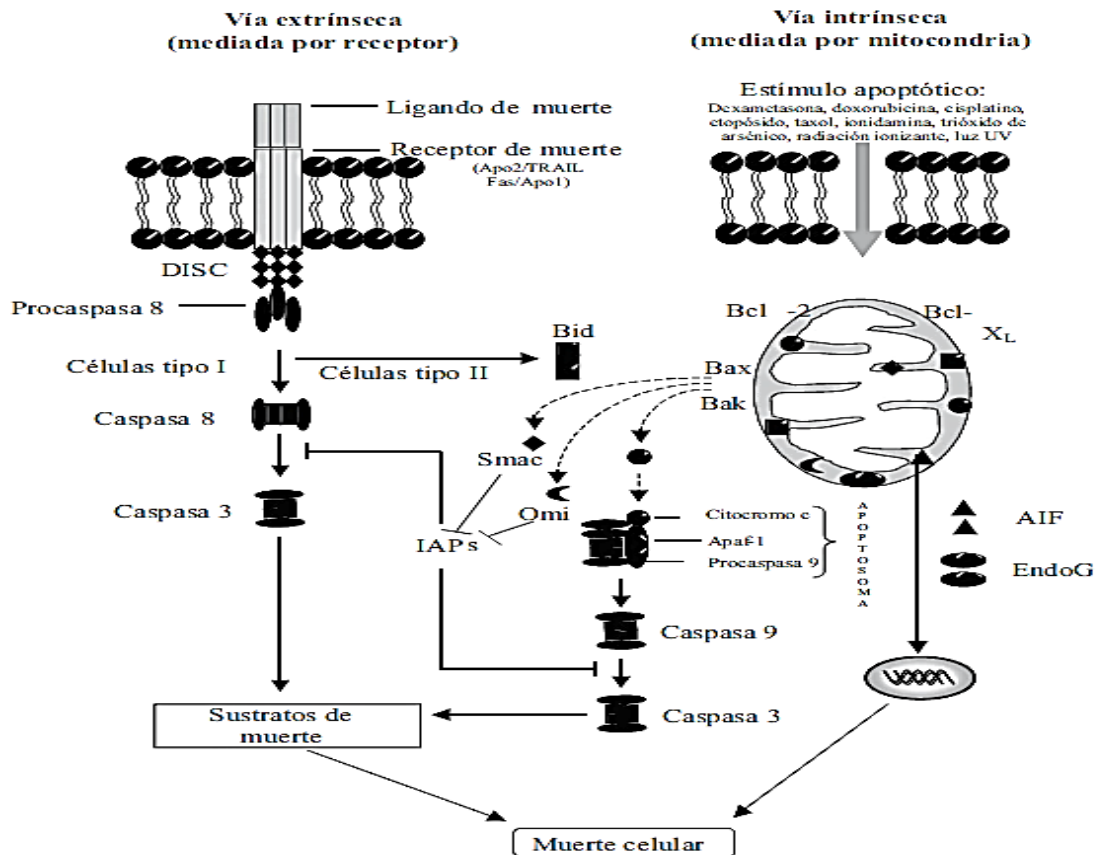


Figura 4. Vías de muerte celular. En la vía extrínseca (mediada por receptor) la unión de un ligando a su receptor de muerte es seguida por la formación del DISC (complejo de señalización inducible por muerte), lo que resulta en la activación de la procaspasa 8. La caspasa 8 activa a la procaspasa 3, la cual corta a proteínas blanco, conduciendo a apoptosis. En las células tipo II, la caspasa 8 corta a Bid, el cual induce la translocación, oligomerización e inserción de Bax y/o Bak en la membrana externa mitocondrial. Esto es seguido por la liberación de varias proteínas del espacio intermembranal mitocondrial, incluyendo a Smac/Diablo, Omi y *Citocromo c*. Este último forma un complejo citosólico (apoptosoma) con Apaf-1 y la procaspasa 9. Esto resulta en la activación de la procaspasa 9, la cual activa a la procaspasa 3. En la vía intrínseca (mediada por mitocondria), las señales de muerte inciden directa o indirectamente en la mitocondria, resultando en la formación del apoptosoma. Esta vía de muerte celular es controlada por proteínas de la familia de Bcl-2. La vía intrínseca puede funcionar a través de mecanismos independientes de caspasas, implicando la liberación desde la mitocondria y la translocación hacia el núcleo de AIF y endonucleasa G. Se ha comprobado que todos los estímulos apoptóticos mostrados inducen la liberación de Smac/Diablo de la mitocondria. Tomado de Martínez, 2004)

Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAP)

Como se dijo anteriormente las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica, éstas encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas: las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores; por su parte, las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis (Elinos *et al.*, 2003). Sin embargo, la actividad de las caspasas está sujeta a los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). Las IAP fueron originalmente identificadas en baculovirus por su capacidad de suprimir la apoptosis en células infectadas del hospedero. Ha sido sugerido que la acción de estas moléculas ocurre por medio de una interacción directa con las caspasas (Martínez M. *et al.* 2004).

En mamíferos se han identificado ocho distintas IAP, entre las más estudiadas se encuentran la XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivina, MLIAP, NAIP y BRUCE (Wei *et al.*, 2008), siendo el repetido IAP baculoviral la unidad fundamental en las IAP (Martínez M. *et al.*, 2004). Dichos miembros de la familia de las IAP se caracterizan por el dominio BIR, nombre que deriva de su descubrimiento original de estos supresores de la apoptosis en el genoma de baculovirus (Wei *et al.*, 2008), este contiene 80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc XIAP, c-IAP1 y c-IAP2. Cada una presenta 3 dominios BIR, los cuales tienen funciones diferentes. En estas IAP, BIR3 inhabilita la actividad de la caspasa 9, mientras que la región de unión entre BIR1 y BIR2 inhibe selectivamente a las caspasas 3 y 7 (Martínez *et al.* 2004) (Figura 5).

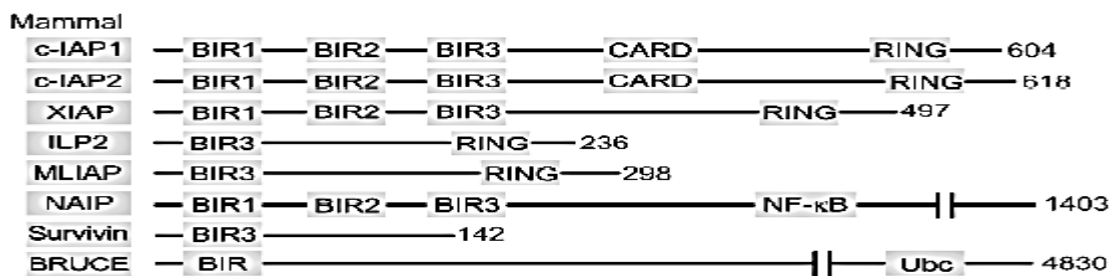


Figura 5. Estructura molecular de los miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), mostrando sus diferentes dominios. Tomado de Wei *et al.*, 2008.

Dentro de esta familia de proteínas, la más estudiada es la XIAP, cuya estructura está formada por tres dominios BIR y uno RING. El dominio BIR2 inhibe las caspasas 3 y 7, mientras que el dominio BIR3 a la caspasa 9 (Carter *et al.*, 2005) (Figura 6).

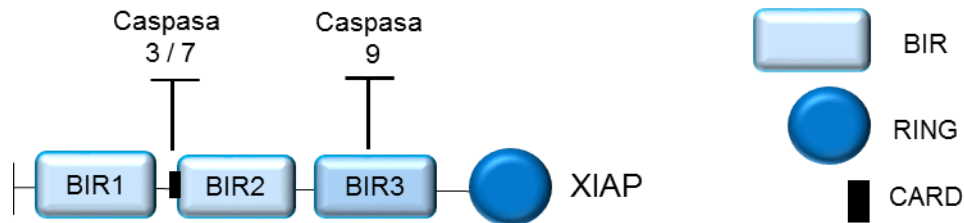


Figura 6. Estructura molecular de XIAP, XIAP puede unirse e inhibir a las caspasas 3, 7 y 9, esto lo realiza mediante la unión de BIR2 con una secuencia específica de la caspasa 3 y 7, mientras que caspasa 9 se une a una región de BIR3. Tomado de Wright y Duckett, 2014.

Algunos elementos de la familia IAP, también contienen otras estructuras, tales como el dominio de reclutamiento de activación de caspasas, phosphate-loop y ubiquitin-conjugating (UBC). Aunque se requiere el dominio BIR para llevar a cabo la función anti-apoptótica de las proteínas de la familia IAP, no todos los miembros que contienen este dominio presentan dicha función (Wei *et al.*, 2008).

La inhibición de las caspasas mediada por las IAP puede ser removida por la proteína proapoptotica Smac/DIABLO, dejando libre a las caspasas para que puedan realizar su función, conduciendo a la apoptosis.

Smac/DIABLO

Smac/Diablo es una proteína que fue descubierta simultáneamente por dos grupos de investigación. Por un lado, Du *et al.*, 2000, aislaron una fracción a partir de extractos de membrana mitocondrial de células HeLa, la cual estaba relacionada con la activación de caspasa 3. De esta fracción purificaron una proteína de aproximadamente 25 kDa que denominaron Smac (del inglés Second mitochondria-derived activator of caspase). Por su parte, Verhagen *et al.*, 2000, mediante ensayos de coimmunoprecipitación con XIAP-Flag, transfectada en células 293T, aislaron una proteína de 23 kDa con un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 5.3 que se unía a la XIAP. La secuencia peptídica de esta proteína fue usada para hacer una búsqueda en la base de datos de secuencias expresadas de ADN, ESTs (del inglés Expressed Sequence Tag) y se encontró un alineamiento idéntico con secuencias

de humano y de ratón. La clona de ADNc EST elegida era de un ratón, ésta codificaba una proteína de 26.8 kDa, la cual fue nombrada DIABLO (del inglés Direct IAP Inding Protein With Low PI) (Martínez *et al.*, .2004).

Smac/DIABLO se expresa de manera diferencial en diferentes tejidos de humano adulto. Por ejemplo, presenta una expresión elevada en testículo, corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario, así como una baja expresión en cerebro, pulmón, timo y leucocitos. Por otro lado, manifiesta un patrón similar de expresión en tejidos de ratón adulto (Martínez M. *et al.*2004).

El ARN mensajero de Smac/DIABLO codifica una proteína de 239 aminoácidos. Esto provoca que la región amino terminal (55 aminoácidos) representa una típica señal anfipática de localización mitocondrial (MTS), la cual es cortada una vez que Smac/DIABLO se importa a la mitocondria. En condiciones normales Smac/DIABLO reside en el espacio intermembranal, pero después de un estímulo apoptótico (dexametasona, radiación ionizante, luz UV, Apo2L/TRAIL, Fas/Apo1, doxorubicina, cisplatino, etopósido, taxol, ionidamina, trióxido de arsénico) se libera de la mitocondria al citosol, en donde se une a varias IAPs, antagonizando su función (Meléndez *et al.*, 2008).

Sabemos que Smac/DIABLO puede interactuar con XIAP, c-IAP1, cIAP2, survivina y la IAP baculoviral OpIAP, sin embargo, sólo cuando están en una etapa madura tiene la capacidad de promover la activación de caspasas, mientras que el precursor con la señal de localización mitocondrial no posee tal capacidad. Por lo tanto, Smac/DIABLO requiere de un proceso de maduración dentro de la mitocondria antes de presentar su actividad apoptótica (Martínez *et al.*, 2008).

El gen Smac/DIABLO se localiza en el ser humano en el cromosoma 12q y que está compuesto de siete exones. Han sido registradas cuatro isoformas de Smac/DIABLO, generadas por procesamiento alternativo del ARN mensajero, a las cuales se les denominó α , β , γ y δ , esta última también llamada Smac3. (Figura 7). (Martínez *et al.*, 2004). Las isoformas α y β son mitocondriales mientras que γ y δ son citosólicas, ya que no presentan una MTS.

Ha sido descubierto que la isoforma β , generada por un procesamiento alternativo que integra un exón críptico, se expresa en todas las líneas celulares probadas incluyendo: HeLa, Jurkat, 293, THP1, MCF-7, A431 y 697, aunque en una cantidad menor que la

isoforma α (Srinivasula *et al*, 2000 y Roberts *et al.*, 2001). Por su parte, la isoforma δ (Smac3) es producida por el procesamiento alternativo del exón 4. Esta isoforma particular posee una MTS, por lo cual se dirige a la mitocondria una vez sintetizada. Su expresión, al igual que la isoforma α , es diferencial en tejidos de humano adulto y de la misma manera se expresa en las líneas celulares: MCF-7, HeLa, 293T, Jurkat y HEK293 (Fu J. y Arend *et al.*, 2003). La isoforma γ es la menos estudiada y se desconoce casi todo de ella (Martínez M. *et al.*2004).

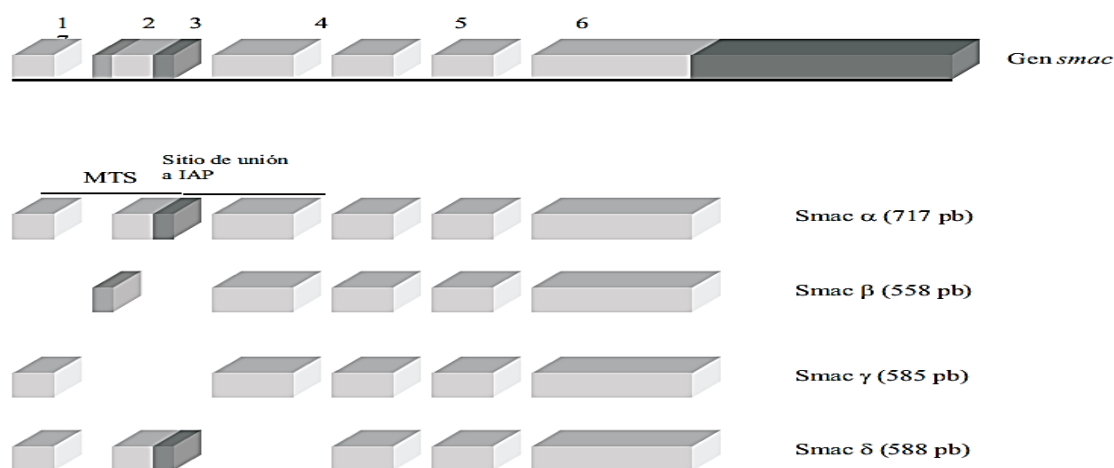


Figura 7. Estructura del gen Smac/DIABLO y las diferentes isoformas generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero. El gen Smac/DIABLO presenta siete exones. El exón 2 es un exón críptico que permite la generación de la isoforma β . La MTS (señal de localización mitocondrial) es codificada por los exones 1 y 3. Smac/Diablo α y δ son mitocondriales (presentan una MTS intacta), mientras que Smac/Diablo β y γ son citosólicas (no tienen MTS) Tomado de Martínez, 2009.

Inhibición de las IAPS por Smac/DIABLO.

Smac/DIABLO α madura se comporta como un dímero en solución y utiliza su región N-terminal para interactuar con las IAP e inhibir su función. Asimismo, se une a los dominios BIR2 y BIR3 de la XIAP, pero no al BIR1. La unión a cada BIR es mutuamente excluyente. Se ha demostrado que las mutantes monoméricas de Smac/DIABLO α interactúan fuertemente con el BIR3, pero no forman un complejo estable con el BIR2. Estas mutantes tienen menor capacidad para promover la activación de la procaspasa 3.

Smac/DIABLO α se une al BIR3 de la XIAP a través de sus primeros cuatro residuos de aminoácidos N-terminales AVPI. La sustitución de cualquiera de éstos elimina

la capacidad de unión, probablemente debido a una pérdida de interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, Smac/DIABLO β interactúa con los dominios BIR1 y BIR2 de la XIAP, pero no con el BIR3. De igual forma, promueve principalmente la función de las caspasas efectoras 3 y 7, aunque en todos los casos presenta una actividad promotora de caspasas menor que Smac/DIABLO α (Figura 8).

Esta diferencia puede explicarse en parte porque los primeros residuos N-terminales de Smac/DIABLO β (MKSDFY) son diferentes a los de Smac/DIABLO α (AVPI), siendo estos últimos indispensables para la unión al BIR3 de la XIAP.

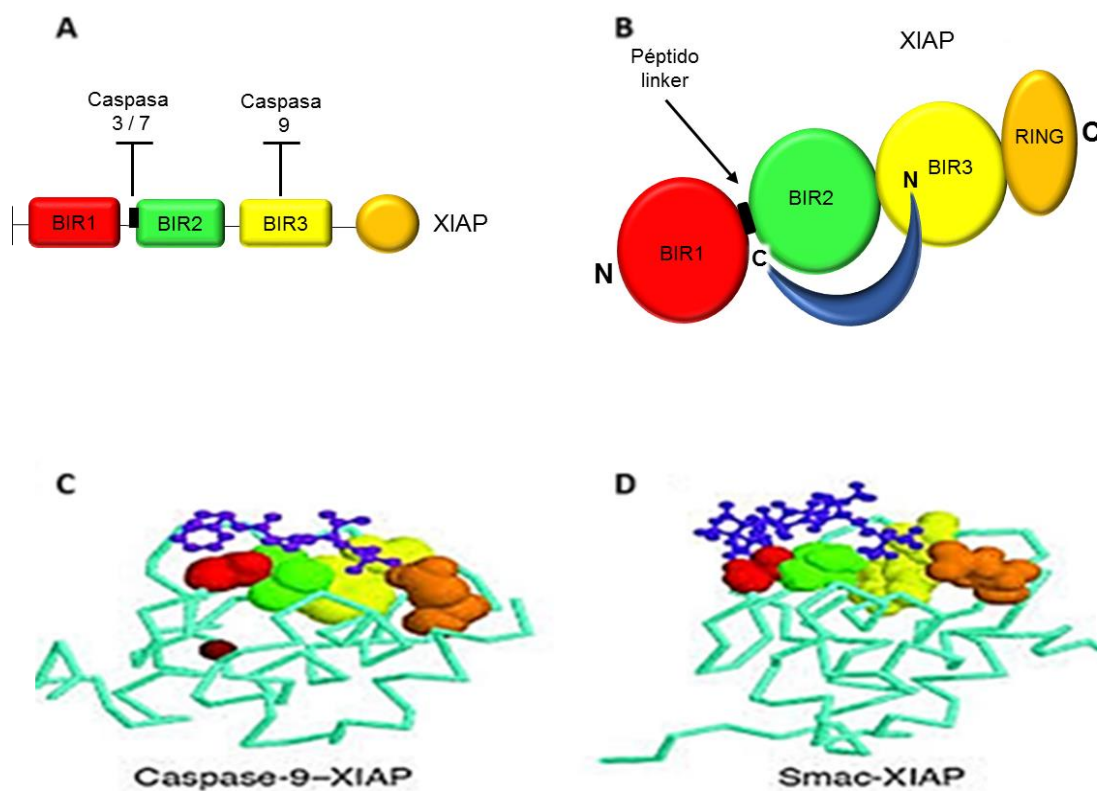


Figura 8. Interacción de Smac/DIABLO con las IAPs para lograr su inhibición. (A) estructura de la XIAP, mostrando sus tres dominios así como los lugares donde interacciona con las caspasas 3,7 y 9. (B) muestra los sitios donde interactúa Smac/diablo con las XIAP para lograr su inhibición. (C) Smac / DIABLO desplaza la caspasa-9 de BIR3 de XIAP. (C) Estructura cristalinas de la caspasa-9 procesado unido a BIR3 de XIAP. El péptido púrpura representa los primeros 4 aminoácidos que entran en contacto de XIAP, con el extremo amino terminal cerca del residuo naranja de XIAP. (D) Estructura de RMN de la Smac / DIABLO de IBM (péptido púrpura con el extremo amino terminal cerca de la residuo naranja de XIAP) unidos a la misma ranura en BIR3 de XIAP que se une la caspasa-9, abrogando así la capacidad de XIAP para bloquear la caspasa-9 actividad. Tomado de: Wright y Duckett, 2014.

Roberts *et al*, 2001, demostraron que Smac/DIABLO β no es capaz de interactuar con XIAP, c-IAP1 ni c-IAP2 *in vivo*. Ellos proponen que 20 aminoácidos del N-terminal de Smac/DIABLO β son procesados intracelularmente. Sin embargo, esta forma de la proteína es capaz de potenciar la apoptosis inducida por diversos estímulos al mismo nivel que Smac/DIABLO α . Como Smac/DIABLO β no posee los aminoácidos necesarios para la interacción con las IAPs, se postula que el (los) dominio(s) para la función proapoptótica reside(n) en el fragmento C-terminal y que la unión de Smac/DIABLO α a la XIAP es únicamente una función secundaria. Smac/DIABLO δ madura interactúa con los dominios BIR2 y BIR3 de la XIAP a través del tetrapéptido N-terminal AVPI, promoviendo la activación de la caspasa 3 (Fu J, Jin Y y Arend L J .2003) Sin embargo Smac/DIABLO está sujeta a regulación a distintos niveles.

Regulación de Smac/DIABLO.

El mecanismo de regulación más evidente para Smac/DIABLO α y δ es la translocación desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol durante la apoptosis. Este evento es regulado por miembros de la familia de Bcl-2, la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x inhibe la translocación, mientras que Bid truncado la favorece, al parecer es necesaria la activación de la vía de JNK (cinasas del N-terminal de c-Jun) para tal translocación (Chauhan, *et al.*, 2003).

Una vez en el citosol, las mismas proteínas IAP regulan la concentración y la actividad de Smac/DIABLO α . Por una parte, se ha demostrado que XIAP, c-IAP1 y cIAP2 tienen actividad de ligasa de la proteína ubiquitina (E3), sobre la proteína Smac/DIABLO α . Se requiere tanto de la asociación de las IAP con Smac/DIABLO como de la presencia del dominio RING para la ubiquitinación. Esta actividad promueve la rápida disminución de Smac/DIABLO α liberada de la mitocondria y proporciona un mecanismo por el cual las IAP inhiben la muerte celular, dirigiendo a moléculas proapoptóticas a la degradación mediada por el proteosoma (MacFarlane *et al.*, 2002; Hu S y Yang X, 2003). Sin embargo, la proteína Smac/DIABLO δ también tiene la capacidad de promover la autoubiquitinación de la proteína XIAP. Esta actividad, que no presenta Smac/DIABLO α , requiere la asociación de Smac/DIABLO β con la XIAP y el dominio RING intacto de esta última,

aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual Smac/DIABLO δ acelera la autodestrucción de la XIAP (Fu J *et al.*, 2003).

Por su parte, los diversos miembros de la familia de las IAP pueden cooperar entre ellos para inhibir la apoptosis. Se sabe, por ejemplo, que XIAP, pero no survivina, puede unirse a Caspasa 9. Sin embargo, XIAP y survivina sí pueden unirse a Smac/DIABLO. Existe al menos un reporte en el cual se muestra que XIAP se une a la caspasa 9, mientras que survivina se une a Smac/DIABLO y de esta forma evita que éste inhiba a XIAP. En este modelo la apoptosis se inhibe ya que la survivina mantiene secuestrada a Smac/DIABLO, en tanto que XIAP incapacita la función de la caspasa 9 (Song *et al.*, 2003). Aparentemente, Smac/DIABLO β es regulada intracelularmente por proteólisis. La pérdida de sus 20 aminoácidos N-terminales crea una proteína incapaz de interactuar con las IAPs, conservando su actividad promotora de apoptosis. Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual esta isoforma induce apoptosis, sin la necesidad de interactuar con las IAP (Roberts, *et al.*, 2001).

Las anormalidades en la regulación del proceso de muerte celular puede ser un componente importante de enfermedades como el Cáncer, el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune, el SIDA, Isquemia y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington (Norbury y Zhivotovsky, 2004), dependiendo si esta desregulación inhibe o sobre estimula dicho proceso (Tabla 1).

| Enfermedades relacionadas con inhibición de apoptosis | Enfermedades relacionadas con exceso de apoptosis |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Cáncer</p> <p style="text-align: center;">Enfermedades autoinmunes</p> <p style="text-align: center;">Infecciones virales</p> | <p style="text-align: center;">SIDA</p> <p style="text-align: center;">Enfermedades neurodegenerativas</p> <p style="text-align: center;">Síndrome mielodisplásicos</p> <p style="text-align: center;">Daño isquémico</p> <p style="text-align: center;">Hepatitis tóxica</p> <p style="text-align: center;">Pancreatitis</p> <p style="text-align: center;">Hepatitis fulminante</p> <p style="text-align: center;">Tiroiditis</p> |

Tabla 1. Patologías causadas por desregulación de la Apoptosis. Tomado de Norbury y Zhivotovsky, 2004.

Cáncer

La mayoría de los cánceres se originan a partir de una célula única; no obstante, siempre se necesita una suma de múltiples acontecimientos para que una célula pase de fenotipo normal al fenotipo transformado. Un gran número de estas alteraciones implican cambios en la secuencia anormal de ADN (mutación), que puede tener origen en errores aleatorios de repetición, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación de ADN.

Existen 6 características fundamentales para definir a una célula tumoral: 1) Mantenimiento de las señales de proliferación, 2) Inmortalidad replicativa, 3) Inducción de invasión y metástasis, 4) Evasión de supresores de crecimiento, 5) Inducción de angiogénesis y 6) Resistencia a la muerte (Hanahan y Weinberg, 2011).

El Cáncer no es solo una enfermedad, ella sola comprende una variedad de por lo menos cien afecciones muy distintas entre sí, que se produce por el crecimiento anormal y desordenado de las células del cuerpo. Esto causado por una suma de alteraciones celulares ocurridas cuando la clave cromosómica genética ha sido alterada, por lo que las células reciben mensajes erróneos. La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo, de modo que se divide a mayor velocidad que el resto de los tejidos a los que pertenece, dejando de cumplir sus funciones originales (Camargo, 2004) (Figura 9). Este crecimiento anormal de las células puede llegar a formar masas de tejidos llamadas tumores.

El Cáncer se desarrolla en diferentes etapas, y probablemente intervienen varios factores para convertirlo en un tumor visible. Es importante saber diferenciar los tumores benignos o no cancerosos, de los malignos o cancerosos (Tabla 2) (Camargo, 2004).

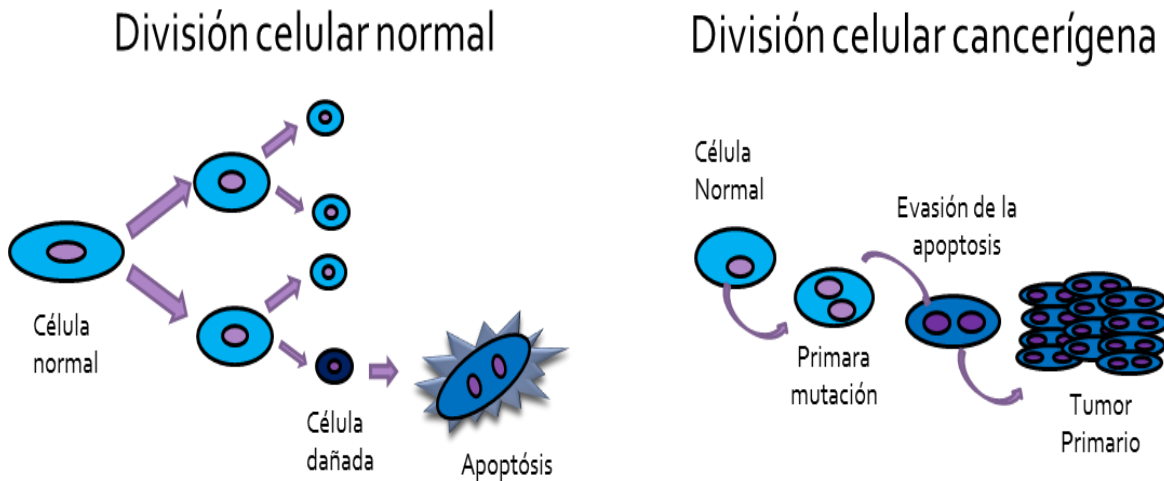


Figura 9. Comparación de la división celular entre una célula normal y una cancerígena. Muestra el crecimiento anormal de las células cancerígenas, hasta la formación de tumores. Los cuales podrían producir una metástasis. Tomado de: <http://www.aurorahealthcare.org/yourhealth/healthgathgate/getcontent.asp?URLhealthgate=%22103616.htm%22>. Alberts *et al.*, 2002.

| TUMORES BENIGNOS | TUMORES MALIGNOS |
|--|---|
| Son de crecimiento lento. | Algunos son de crecimiento lento, pero con frecuencia son de crecimiento muy rápido. |
| Solo crecen hasta determinado tamaño. | Crece de manera progresiva e invasiva. |
| No destruyen células normales. | Destruyen células, tejidos y órganos. |
| Crece de manera ordenada. | Crece de manera desordenada. |
| No se propagan a otros tejidos. | Se propagan a los otros órganos del cuerpo como metástasis. |
| Normalmente no producen efectos secundarios graves. | Normalmente se producen efectos secundarios graves. Si no se controla su crecimiento ocasionan la muerte. |

Tabla 2. Muestra las principales diferencias entre tumores benignos y malignos, tomado de Camargo 2004.

Los tipos de Cáncer se pueden agrupar en categorías más amplias. Los principales son:

- **Carcinoma:** Cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos. Hay varios subtipos de carcinoma, entre ellos, el adenocarcinoma, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células de transición.
- **Sarcoma:** Cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- **Leucemia:** Cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, provocando la producción de grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.
- **Linfoma y mieloma:** En ambos casos el cáncer empieza en las células del sistema inmunitario.
- **Los tipos de Cáncer del sistema nervioso central:** Empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

A nivel mundial, el Cáncer es una de las principales causas de mortandad. Este padecimiento es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, originando lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse hacia a otros órganos, metástasis (OMS, 2011). En algunos casos la incidencia de Cáncer se relaciona directamente con la edad, ya que las personas maduras están más expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad.

En el caso particular de México, según el INEGI, en el año de 2010 las principales causas de muerte, por tumores malignos en la población femenina mayor de 20 años, fueron el Cáncer de Mama, con 13.8% de las defunciones totales, y el Cáncer de Cérvix, con un 10.8%. Tomando en cuenta estos datos el Cáncer de Cérvix se coloca en el segundo de decesos entre las mujeres mexicanas. Siendo los grupos de entre 40 y 49 años de edad los más afectados: 10 de cada 100 mil pieren. Incrementándose a 30 de cada 100 mil en mujeres de entre 65 y 74 años, hasta alcanzar la máxima tasa de mortalidad en mujeres

mayores de 80 años, donde 55 de cada 100 mil mujeres mueren por esta afección (OMS, 2009).

La mayoría de las mujeres hispanas son propensas al desarrollo de esta enfermedad sin importar el grupo de edad, aumentando la posibilidad de adquirirlo al iniciar su vida sexual, ya que se podrían llegar a exponer al Virus del Papiloma Humano (VPH).

Cáncer de Cérvix.

El Cáncer de cérvix se presenta principalmente entre las mujeres con una vida sexual activa, por lo que se considera una enfermedad multifactorial de transmisión sexual aunque no exclusiva, cuyo principal agente etiológico es el virus del papiloma humano (VPH) (López y Lizano, 2006). Es el segundo Cáncer más común a nivel mundial y el primero, reconocido por la Organización Mundial de la Salud, que se atribuye a una infección (Sierra, 2011). Es una enfermedad neoplásica maligna que se origina en el Cérvix y cuya progresión natural lleva a la muerte. Aunque no se tiene un conocimiento amplio de la enfermedad, los estudios realizados han mostrado que la mayoría de estos tumores tienen inicio gradual y sus lesiones precursoras pueden mantenerse en fase reversible o *in situ* por varios años en la mayoría de las pacientes.

La historia natural del Cáncer de Cérvix implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras llamadas lesiones precursoras o premalignas, las cuales son estrictamente intraepiteliales; es decir, se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma (Figura 10). Se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del Cáncer de Cérvix: el número de parejas sexuales, el inicio temprano de vida sexual activa, la multiparidad, etc. Sin embargo, el constituyente etiológico más importante para el desarrollo del Cáncer de Cérvix, es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % de los casos (Sierra, 2011).

Como ya se ha mencionado, el Cáncer de Cérvix es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. Sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se le puede detectar tempranamente y tratar oportunamente, reduciendo su impacto. Hoy en día el panorama se torna más favorable al contar con vacunas preventivas, que prometen disminuir este Cáncer, especialmente en los países que presentan mayor número de casos

(López -Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Sin embargo, hay que recordar que a pesar de que ya se cuenta con una vacuna contra el VPH, el cual es un factor muy importante para que dicho Cáncer se pueda desarrollar, su efecto en la población se verá reflejada en años próximos, ya que esta vacuna solo se les aplica a niñas entre los 9 y 11 años de edad, por lo que actualmente y en un futuro próximo se registrarán muchos casos.

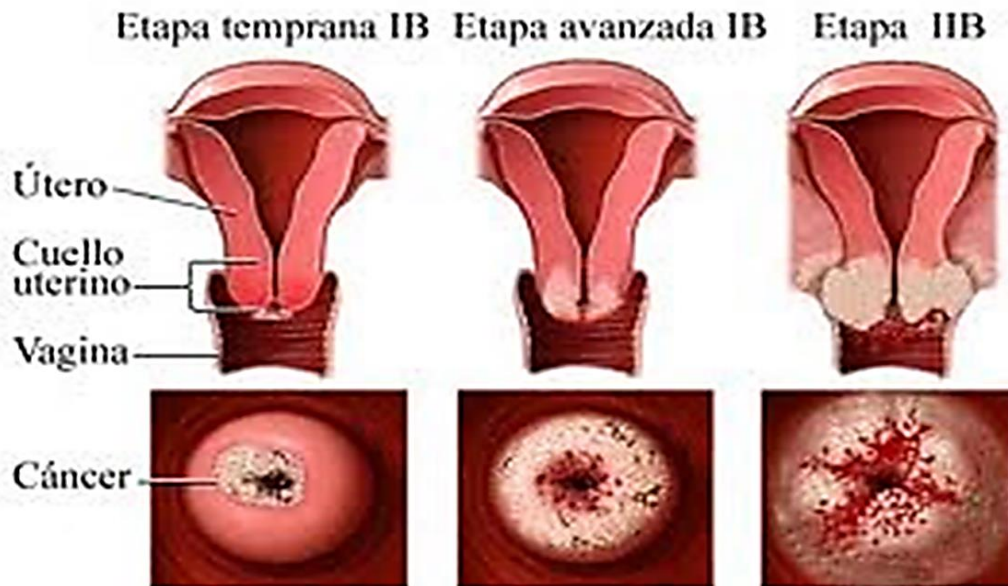


Figura 10. Desarrollo del Cáncer de cérvix. El Cáncer de Cérvix inicialmente progresa en capas de tejido que se encuentran en la superficie del Cérvix, posteriormente invade capas de tejido que se encuentran en la superficie del cérvix, del útero, y finalmente se extiende en el área pélvica y otras áreas del cuerpo iniciando el proceso de metástasis. Tomado de www.health.com.

El proceso gradual de invasión por parte de las lesiones en el cuello uterino se clasifican como: LSIL (Low grade Squamous Intraepithelial Lesión) de acuerdo al grado de afectación en la zona de transformación del cuello uterino. Dicha zona es la unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del ectocervix. Es una región de continuos cambios metaplásicos, principalmente en la pubertad y durante el primer embarazo, después de la menopausia declinan. Otro nombre con el que se conoce al LSIL es NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) el cual parte de NIC 1 que se caracteriza por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio. Este se diferencia y madura, mostrando anormalidades menores de la célula. Una metaplasia escamosa atípica, inducida por algún virus y que se desarrolle en esta

región, puede progresar a una NIC 2 o NIC 3, siendo éstas las verdaderas precursoras del Cáncer de Cérvix o Cáncer Cervicouterino (CaCu). Caracterizándose por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior la lesión. Estas etapas son comúnmente positivas a los tipos virales oncogénicos que evitan la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anormalidades genéticas que favorecen la malignidad. NIC puede establecerse al inicio, al mismo tiempo o en ausencia de HSIL (López -Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

El Cáncer de Cérvix de células escamosas es el más común, mientras que los de origen glandular sólo registran un 10%, es decir adenocarcinoma. Este último tipo de cáncer contiene VPH pero la correlación es menos pronunciada y es dependiente de la edad. Cerca del 50% de las mujeres con adenocarcinoma *in situ* (AIS) tienen también NIC y es a menudo encontrado en pacientes que han sido operados por carcinoma escamoso (López -Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

Tratamientos para el Cáncer de Cérvix

En la actualidad existen diversos tipos de tratamientos para tratar este tipo de Cáncer, los cuales si se aplican oportunamente pueden controlar e incluso eliminar la enfermedad. Algunos de los procedimientos son:

- **Cirugía:** Consiste en la extracción de la masa tumoral mediante una intervención quirúrgica.
- **Criocirugía:** Este proceso, se emplea para Cáncer preinvasivo, mata a las células cancerosas congelándolas con una sonda de metal enfriada en nitrógeno líquido.
- **Cirugía con láser para Cáncer preinvasivo:** Dicho procedimiento utiliza rayos láser para quemar las células anormales o para extraer una muestra de tejido para estudios adicionales.
- **Biopsia de cono:** Extirpa del cuello Cérvico Uterino una sección de tejido en forma de cono. Este método es utilizado para poder conservar la fecundidad en mujeres con Cáncer en etapa temprana, o para obtener una muestra y realizar estudios adicionales.

-
- **Histerectomía básica:** el útero y el cuello Cérvico Uterino se extraen por la vagina, o a través de la pared abdominal; provocando esterilidad
 - **Histerectomía radical y disección de nódulos linfáticos pélvicos:** el útero y los nódulos linfáticos vaginales superiores son extirpados por la vagina, o a través de la pared abdominal; originando esterilidad.
 - **Evisceración pélvica total:** Este procedimiento es utilizado cuando el Cáncer es recurrente. Se realiza una histerectomía radical, se extirpa la vejiga, la vagina, el recto y parte del colon; esto conduce a la esterilidad.
 - **Radiación:** La radiación interna (braquiterapia) o externa se pueden utilizar para tratar el Cáncer de Cérvix.
 - **Quimioterapia:** Es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas, para lograr un resultado satisfactorio las dosis empleadas suelen ser muy altas, lo cual provoca una serie de efectos colaterales que merman seriamente la salud de las pacientes.
 - **Crioterapia:** La crioterapia, consiste en congelar las células anormales con una sonda a baja temperatura, suele considerarse el método ablativo más práctico en los sectores de bajos recursos. Es sencillo, de bajo costo y no requiere electricidad.

Además de dichos procedimientos, en la actualidad también existen otras propuestas de tratamiento como la inmunoterapia, la cual en los últimos años ha mostrado resultados muy satisfactorios. En este contexto, se ha desarrollado la vacuna contra el VPH, pero sólo va dirigida a prevenir ciertos tipos de VPH, como el 18 y 16, que son los responsables del 70% de casos de Cáncer de Cérvix, y cuyos resultados se podrán observar en un lapso de tiempo de 15-20 años, puesto que nada más es administrada a la población femenina menor de edad. Por consiguiente, el Cáncer de Cérvix sigue siendo un importante problema de salud pública, ya que el VPH no es el único factor de riesgo, sino que como se ha mencionado anteriormente es el resultado de muchos otros factores, por lo que si se verá disminuido considerablemente el índice de incidencia gracias a esta vacuna, pero aún no se cuenta con las herramientas necesarias para erradicarlo por completo. Sin embargo, si se detecta a tiempo puede ser controlado, empleando alguno de los tratamientos actualmente disponibles.

Tratamientos Naturales

Los tratamientos actualmente utilizados contra el Cáncer de Cérvix, así como para otros tipos de Cáncer, en la mayoría de las ocasiones suelen agravar el problema, ya que son invasivos y poco selectivos; mermando seriamente la salud física y emocional de las pacientes. Es por ello que la tendencia actual de investigación ha sido desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que muestren una selectividad, una reducción en el crecimiento tumoral, además de una disminución de los efectos secundarios que las terapias clásicas llegan a producir.

Es así como los metabolitos secundarios bioactivos de origen natural se han convertido en el eje principal de diversas investigaciones, las cuales han presentado resultados favorables, no solo para el tratamiento contra el Cáncer sino para una gama extensa de enfermedades.

Dichas investigaciones en un principio se centraban en el aspecto fotoquímico de los metabolitos secundarios, sin embargo, actualmente estos estudios se dirigen sobre su aplicación potencial en el tratamiento de enfermedades humanas (Ireland, *et al.*, 1993).

Como sabemos las principales fuentes de estos metabolitos secundarios son las plantas, hongos, los productos de fermentación y los organismos marinos. Es por ello que los productos naturales o metabolitos secundarios de origen marino actualmente están siendo objeto de múltiples investigaciones, debido a que se ha reportado que son una fuente importante de nuevas e inusuales formas de moléculas orgánicas, con una gran actividad biológica. Esto se debe a que los organismos marinos están sujetos a condiciones ambientales completamente diferentes a los presentes en ambientes terrestres, estas características determinan que las rutas biosintéticas también sean diferentes (Baker, 1984). Es por ello que los organismos marinos pueden generar metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas y distintas otros ámbitos.

Cabe señalar que a pesar de que se ha reconocido que diversos organismos marinos presentan varios compuestos prometedores, aproximadamente menos del 1% de las especies se han investigado (Pesando, 1990), aislando de las algas marinas 2,072 productos naturales, los cuales contribuyen con la mayor cantidad de compuestos identificados.

El primer reporte que se tiene del uso de las macroalgas con propiedades curativas data de la antigua China, donde se usaba el alga *Digenia simplex* como vermífugo (De Lara-Isassi, *et al.* 1989), actualmente de esta especie se obtiene el ácido kaínico que se utiliza contra la hipertensión (Der Marderosian y Liberti, 1988). Es bien sabido que en la medicina oriental, las algas pardas se han usado tradicionalmente como una droga hipotensiva, a partir de ella se ha aislado un potente hipotensivo de *Laminaria angustata*, denominado laminine (Baker, 1984a).

Algas Pardas

Las Phaeophytas (algas pardas) son exclusivamente marinas, pues sólo se conocen unas especies de agua dulce. Son muy abundantes en costas rocosas, crecen en la zona litoral (desde la zona que va desde el punto de pleamar al baja mar) y sublitoral, especialmente en aguas frías y agitadas y bien airadas. Estas algas son las más grandes y complejas. La clasificación taxonómica actual de este grupo nos dice que pertenece a la clase Phaeophyceae, división Heterokontophyta (Mansilla y Krisler, 2004).

Morfológicamente son muy variadas, aunque todas son pluricelulares, no existen organismos unicelulares en este grupo. Su rango va desde filamentos microscópicos muy simples hasta grandes formas de varios metros de longitud, con una clara especialización de células, órganos y tejidos. Es el grupo de algas que mayor complejidad anatómica ha alcanzado, presentando estructuras especializadas para la fotosíntesis (lámina), el soporte y transporte de compuestos (estipe), y para el anclaje al sustrato (hapterio). Su gran complejidad morfológica se fundamenta en que algunas algas pardas han desarrollado meristemas bien organizados (Graham and Krisler, 2004). Su color marrón u oliva característico, se debe a la combinación del carotenoide fucoxantina presente en sus plástidos con el verde de las clorofilas *a* y *c*.

Algunos feófitos han alcanzado gran complejidad morfológica extrema e interna, ya que las distintas partes de su talo se han especializado en realizar funciones determinadas, por ejemplo: la combinación de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y *c*, fucosantina y diatoxantina, principalmente) les permite realizar la fotosíntesis incluso donde sólo llegan las longitudes de onda más cortas de luz solar (Mauseth, 1995). Su pared celular contiene, además de celulosa, ácido algínico y sales sulfatadas. Estos compuestos dan resistencia y

flexibilidad al alga, ya que forman geles en la matriz intracelular, ayudándoles a resistir las tensiones provocadas por las fuertes olas y las corrientes marinas. Además intervienen en el intercambio iónico y ayudan a evitar la desecación del alga, especialmente cuando viven en la zona litoral, donde quedan periódicamente expuestas al aire y a la luz solar (Graham and Wilcox, 2000).

Actividad biológica de las algas pardas

Existen amplios reportes que muestran a las Phaeophyta como productoras de un gran número de metabolitos secundarios biológicamente activos, Alguno de los géneros con los que se han trabajado para el aislamiento de compuestos químicos son: *Dictyota* y *Dilophus* (Nouerddine *et al*, 1993), *Dilophus ligulatos* (Zertuche, 1993 y Gonzalez 1992, Tringalli *et al*, 1988 y New Harold, 1992), *Dictyota divaricata* (Zhouyao *et al*. 1994 y Koing *et al.*, 1991), *D. pardalis* (Konig & Wright 1993 y Heinz, 1979), *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris prolifera* (Murakami *et al.*, 1954 y Kajiwara *et al*, 1997), *Cystoseira spinosa* (Amico *et al*, 1988 y Nouerddine *et al*, 1993), *C. barbata* y *C. crinita* (Trigalli *et al*, 1988 y Milkova *et al*, 1997). De estas especies se han aislado compuestos y metabolitos secundarios como los diterpenos (Zertuche, 1993 y Gonzalez 1992) con actividad citotóxica; el compuesto Crenulaidal (New Harold, 1992), que presenta una actividad microbiana; la sustancia dictyodial (Zhouyao *et al*. 1994) posee una actividad antimicrobiana y antifúngica (Koing *et al.*, 1991); Dolabellano (Konig & Wright 1993 y Heinz, 1979), con una función antimalarial en cepas resistentes a cloroquina;, diterpenos con el esqueleto dolabellano tienen una acción contra bacterias gram-positivas y gram-negativas; el vinil ciclopentano (Murakami *et al.*, 1954, Kajiwara *et al*, 1997 y Amico *et al*, 1988); derivados de tetrafeniltoluquinol, de los cuales el que presentó una mayor acción fue el 5-hidroxicistofuranoquinol (Nouerddine *et al*, 1993); hidrocarburos halogenados como el 1-cloro-2-brometano, bromometanol, hexaclorobutano que muestran una actividad fungicida y antibacterial, además del focosterol (Trigalli *et al*, 1988), compuesto altamente distribuido en *Cystoseira* (Milkova *et al*, 1997).

De las algas pardas también se han aislado diversos compuestos aromáticos como los florotaninos extraídos de *C. granulata*, los cuales han comprobado tener acción antibiótica (Glombitza *et al*, 1994). Por su parte, el-la deoxilapachol presenta una actividad citotóxica, al igual que el ácido turbinárico (Konig & Wright 1993) de la familia *Sargassaceae*. Un claro ejemplo de ello es el género *Sargassum*, el cual ha mostrado ser origen de un gran número de metabolitos bioactivos, a partir de este género se han aislado compuestos antioxidantes útiles tanto en la industria alimenticia como en la cosmética (Muruyama *et al*, 1991).

Estos compuestos son los que hacen que las algas pardas sean de gran utilidad e interés económico. Aunque su mayor diversidad es en zonas polares, boreales y en latitudes templadas, también crecen en aguas tropicales y subtropicales, siendo el ejemplo más conocido las grandes concentraciones de algas pardas del genero *Sargassum*, que caracterizan el mar de los “Sargazos”.

Género *Sargassum*

Este género cuenta con más de 550 especies distribuidas en los océanos del mundo (excepto el Ártico) y en una gran variedad de fondos o flotando libremente. Los sargazos fijos al sustrato se encuentran desde la línea de costa (zona intermareal) hasta 20 mts de profundidad (zona submareal). Y los de vida libre forman parches muy densos que llegan alcanzar hectáreas de longitud y de 1 a 2 mts de grosor. Esta alga es un miembro importante de las comunidades costeras debido a la flotación que le proporcionan los aerocistos, a su rápida tasa de crecimiento, a su capacidad de reproducirse en el primer año y a sus diferentes vías reproductivas (Suárez, *et al.*, 2013). Además de esto se caracteriza por exhibir una ramificación monopoidal, con sistema de ramificación lateral presente en todos los miembros, sus ejes principales son perennes, cortos, cilíndricos o aplanados en secciones t, éstos llevan las cicatrices de las ramas de hoja caduca. Los ejes suelen originar ramas de segundo orden, cilíndricas o aplanadas, con una superficie lisa o espinosa y dísticas o dispuestas en espiral (Mattio, *et al.*, 2009). Este sistema tiene en su base dos estructuras en forma de hoja, el resto del sistema de ramificación consiste en vejigas de aire y receptáculos. El pedúnculo es inexistente o de longitud variable, cilíndrico o aplanado, suave o “espinoso”. El talo presenta un disco de fijación, con uno o varios ejes principales

ramificados en “ramas” de varios órdenes que se diferencian en apéndices foliares (hojas), vesículas y receptáculos (órganos reproductivos) (Belsher y Pommellec, 1988).

Los sargazos tiene una importante presencia en las costas del Golfo de México, Mar Caribe y Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California. En el litoral costero de este último, *Sargassum* es el componente de la flora marina que domina en cobertura y biomasa sobre otras especies de algas, durante los meses en los que baja la temperatura del agua; forma bosques submarinos de unos metros a varias hectáreas de extensión y de 0.5 m a 10 m de altura, que sobresalen en la superficie cuando llegan a su edad adulta, lo cual genera generando un hábitat tridimensional heterogéneo que alberga una gran variedad de organismos. Las especies que conforman los bosques son *Sargassum johnstonii*, *S. herporhizum*, *S. lapazeanum*, *S. sinicola* y *S. horridum*. El número y densidad de especies que se observan en el interior de los bosques son mucho mayores que los de zonas carentes de ellos (Suárez, *et al.*, 2013).

De las especies de *Sargassum* que rodean el golfo de México se encuentran, *Sargassum vulgare*, *S. filipéndula*, *S. natans*, (Flores, 2010). Particularmente la especie *Sargassum buxifolium* Chauvin, se distribuye en los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Veracruz (Ortega *et al.*, 2001).

Actividades biológicas de *Sargassum*

Las propiedades y los metabolitos bioactivos aislados de *Sargassum* son muy diversos, por ejemplo, para *Sargassum natans*, Martínez Nadal identificó el compuesto sarganina con propiedades antibióticas (Martínez *et al.*, 1964); más tarde, en 1995, se reportó que también presenta efecto antibacterial y fungicida. De igual forma, se ha demostrado que *S. cinctum* posee una acción fungicida (Sreenivasa, 1982). De *S. polyceratium* y *S. tenemmum*, se obtuvieron sustancias antibióticas con acción fungicida (Levring en 1969). En 1993, Faulkner extrajo de *Sargassum tortil* el tocotrienol y su correspondiente epóxido. Por otra parte, en 1991, De Lara encontró actividad en los extractos acuosos y etanólicos de *Sargassum sp.*, contra *E. coli* y *Micrococcus lisodeikticus*. para *Sargasum palmeri* y *Sargassum acinacifolium* se han encontrado glucoronofucogalactanos, derivados de fucanos, con propiedades anticoagulantes. Kuetzing reportó para *Sargassum micracanthum* 3 plastoquinonas con actividad antioxidante, que puede atribuírsele a su porción

polifenólica o su segmento similar al alfa-tocoferol (o ambos). Por su parte, Shanab estudió la actividad antioxidante de extractos alcohólicos y de diclorometano de *Sargassum dentifolium* y *C. agardh*. Asimismo, Turner ha estudiado a *Sargassum siliquastrum* identificando florotaninos, estructuras químicas características de algunas especies de algas marinas, compuestas por polímeros del floroglucinol, lo que permite clasificarlos como compuestos polifenólicos. Los estudios de Nakai en *Sargassum ringoldianum* han revelado que posee una actividad antioxidante. Hay registros que *Sargassum thunbergii* es utilizado en Japón como agente antitumoral (Ito H., 1976)

En estudios recientes se ha encontrado que compuestos extraídos de especies del género *Sargassum* presentan actividades como antioxidantes e inmunoestimuladores, (*Sargassum hemiphylum*) (Pai-An Hwang *et al.* 2010), además de ser un inhibidor del proceso proinflamatorio, (*Sargassum muticum*) (Weon-Jong *et al.* 2008). Por otra parte, para *Sargassum oligocytum* se ha reportado propiedades antitumorales, el cual ha sido probado en líneas celulares de Cáncer, utilizando concentraciones de entre 100 y 500 mg/ml por kg de peso (Zandi *et al.* 2010). *Sargassum sp.* presenta una actividad citotóxica en líneas de Cáncer de hígado a una concentración de entre 100 y 300 µg/µl (J. Stella *et al.*, 2012). Estudios demuestran que *Sargassum wightii* es fuente de compuestos como: 1-iodo-2-metilundecano, que tiene la característica de mejorar la actividad reproductiva. El heptadecano, 9 hexilo y el ácido hexadecanoico, 1-(hidroximetil) 1,2- esteretanodiol, proporcionan actividad antimicrobiana, antioxidante, anticancerígeno (Vengadesan *et al.*, 2013). Por su parte, *Sargassum thunbergii* con propiedades citotóxica y antitumoral a una concentración de 100 µg/ml.

Aunado a estas propiedades, se ha reportado que el género *Sargassum* es fuente de fucoidan, el cual también presenta actividades antitumorales (Jong-young *et al.*, 2014), además de presentar fucoxantina (Siew-ling *et al.*, 2010) y Heterofucanos, extraídos de *Sargassum filipéndula*, el cual se ha reportado que induce la apoptosis en células de Cáncer de cérvix (Hela), utilizando una concentración de 2mg/ml (Silva *et al.*, 2011). Asimismo, este género presenta polisacáridos que le proporcionan actividades antitumorales y antioxidantes (Hong Ye *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El Cáncer de Cérvix es la segunda enfermedad neoplásica más frecuente y mortal en la población femenina, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados. Actualmente existen diversos tratamientos, los cuales no suelen ser selectivos y causan severos efectos colaterales. Es por ello que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean selectivas y que disminuyan estos efectos, constituye una de las principales tendencias en la investigación. Estudios recientes demuestran que los metabolitos secundarios de algunas plantas y algas, como es el caso del género *Sargassum*, poseen un gran número de metabolitos bioactivos con propiedades: antibacteriales, anticoagulantes, antifúngicas, antioxidantes, antiangiogénicas, inmunoreguladoras y antitumoral, entre otras.

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne [*Sabu*(Ch)W] tiene un efecto citostático sobre líneas de Cáncer de Cérvix (CALO e INBL), mediante el arresto en las fases del ciclo celular, induciéndola a muerte por apoptosis (Luna, 2012). También se ha demostrado que regula positivamente la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica *Citocromo c* (Santiago 2014), así mismo se ha probado su actividad sobre Linfocitos de Sangre Periférica Humana (LSPH), presentando una actividad inmunoreguladora. Sin embargo, se desconoce los mecanismos y la ruta por la cual dicho extracto induce a muerte a las células de Cáncer de Cérvix, o de que éste tenga algún efecto sobre la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica, Smac/DIABLO.

HIPÓTESIS

Se sabe que el extracto de *Sabu(Ch)W* posee un efecto antiproliferativo en células de Cáncer de Cérvix, arretando a las células en diferentes fases del ciclo celular, dependiendo de su estadio, para después inducir las a muerte por apoptosis. Por lo tanto, si se cultivan células de Cáncer de Cérvix en presencia de *Sabu(Ch)W*, este las inducirá a muerte por apoptosis y se observará una regulación en la expresión del ARNm para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar la expresión del ARNm para la proteína proapoptótica, Smac/DIABLO, en células de Cáncer de Cérvix CALO e INBL, cultivadas en presencia y ausencia del extracto de *Sabu(Ch)W* mediante la técnica de RT-PCR.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Realizar cultivos de las líneas celulares de Cáncer de Cérvix CALO (estadio IIB) e INBL (estadio IV metastásico).
- ❖ Cultivar las líneas celulares en presencia y ausencia del extracto de *Sabu(Ch)W* a una dilución de 1:8123 (CALO) y 1:8910 (INBL), durante 36, 48 y 72 horas.
- ❖ Extraer, purificar y retrotranscribir el ARNm de células de las líneas CALO e INBL, cultivadas en presencia del extracto de *Sabu(Ch)W*.
- ❖ Analizar la expresión del producto de amplificación para el ARNm de Smac/DIABLO, en las líneas celulares CALO e INBL cultivadas en presencia y ausencia del extracto de *Sabu(Ch)W*, mediante la técnica de PCR punto final y Electroforesis.
- ❖ Analizar los productos de amplificación obtenidos de la técnica de PCR punto final y de la electroforesis con el programa Life Science (LS) software de UVP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico.

Para el extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, el alga fue colectada en playa Los Muñecos, Veracruz, en la siguiente ubicación geográfica: latitud Norte 19° 44' 38.2'', longitud Oeste 96° 24' 25.3'', en temporada de secas en el mes de abril. La determinación taxonómica se llevó a cabo en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, una vez confirmado que se trataba de la especie de nuestro interés se procedió a realizar el extracto etanólico, todo este proceso fue bajo la dirección y supervisión de la Dra. Alejandrina G. Ávila Ortíz.

Para dicho extracto se realizó una separación- de los carotenoides para después fraccionarlo de acuerdo a la proporción de carotenos y xantofilas, obteniendo así 20 eluatos (Figura 11), los cuales se probaron en las líneas de Cáncer de Cérnix CALO e INBL para obtener la IC50, para cada una de ellas, observando que 5 fracciones eran las más activas, de las cuales la fracción 2 presentaba una actividad mayor a una menor concentración, por lo que se decidió ocupar esta fracción para ambas líneas (Tabla 3).

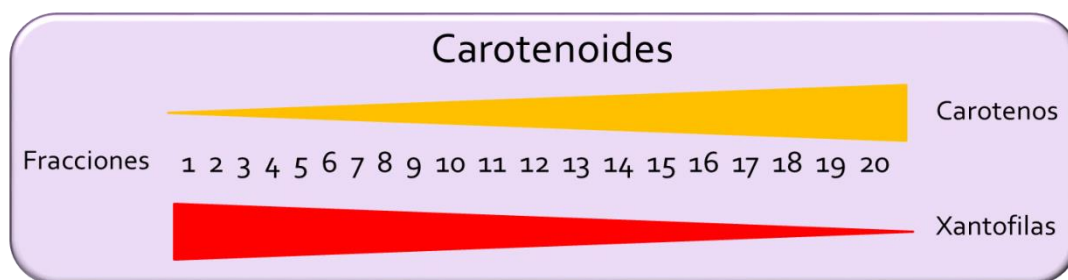


Figura 11. Muestra la proporción de carotenos y xantofilas en las fracciones obtenidas del extracto de *Sabu(Ch)W*.

| Línea celular CALO | | Línea celular INBL | |
|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Fracción | Valor de dilución | Fracción | Valor de dilución |
| Fracción 14 | 1:3723 | Fracción 22 | 1:4380 |
| Fracción 13 | 1:4056 | Fracción 15 | 1:5490 |
| Fracción 17 | 1:4089 | Fracción 12 | 1:7370 |
| Fracción 16 | 1:6684 | Fracción 6 | 1:8420 |
| Fracción 2 | 1:8123 | Fracción 2 | 1:8910 |

Tabla 3. Valor de las diluciones a las cuales se obtuvo la IC50 para cada una de las líneas celulares, cabe destacar que la fracción 2 presentó actividad a una dilución mucho mayor que las demás fracciones. Tomado de Luna 2012

El material biológico consistió en líneas celulares derivadas de Cáncer de Cérvix: CALO e INBL (Tabla 4), las cuales fueron obtenidas del material criopreservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

| Línea celular | Estadio clínico | HPV | Características |
|---------------|-----------------|-----|--|
| CALO | IIB | 18 | Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico |
| INBL | IVB | 18 | Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico |

Tabla 4. Características de las líneas de Cáncer de Cérvix CALO e INBL, Tomado de Sierra 2011

Condiciones del Cultivo

Las líneas Celulares CALO e INBL se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (MICROLAB), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), previamente desactivado, en botellas de cultivo de 75 cm³. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (FORM SCIENTIFIC, USA) a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5 % de CO². Las células tumorales CALO e INBL en fase de confluencia fueron separadas del sustrato con verseno, para colocar 1x10⁶ de células por condición en cajas Petri de 75 cm³.

Posteriormente, se llevó a cabo una sincronización celular para que los cultivos partieran del mismo punto del ciclo celular (G1), esto se realizó cultivando a las células 24 horas en ausencia de SFB.

Tratamiento con el extracto de *Sabu(Ch)W* en las líneas de Cáncer de Cérvix CALO e INBL

Se partió de 1×10^6 de células de las líneas CALO e INBL, las cuales fueron cultivadas en presencia del extracto de *Sabu(Ch)W* a una dilución de 1:8123 para CALO y 1:8910 para INBL. Con el propósito de conocer la expresión basal del ARNm para Smac/DIABLO se utilizó el ARNm extraído de las células cultivadas en ausencia de *Sabu(Ch)W* (control), para comparar si existía un aumento o disminución en dicha expresión cuando son cultivadas con *Sabu(Ch)W*. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (FORM SCIENTIFIC, USA) a 37 °C, con un pH de 7.0-7.2 y en una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO²; en un lapso de 36, 48 y 72 horas, para posteriormente realizar la extracción de ARN total.

Extracción de ARN Total.

Transcurridos los tiempos de cultivo con el extracto de *Sabu(Ch)W*, se recuperó el medio para obtener todas las células muertas, posteriormente las células se despegaron con verseno, colocándolas junto con el medio recuperado y se centrifugaran a 1500 rpm durante 5 minutos, para obtener un solo botón de células, para ello se eliminó el sobrenadante y después realizar la extracción del ARN mediante la utilización de la solución TRIzolTM (INVITROGEN) de isotiocianato de guanidina.

El botón celular se homogenizó en 1ml de la solución de TRIzolTM (INVITROGEN), se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido el tiempo, se añadieron 200 µl de cloroformo (SIGMA) logrando así una emulsión. Se agitaron vigorosamente los tubos de 1.5ml (eppendorf) durante 3 minutos, después se incubaron por 3 minutos en hielo. Una vez finalizada la incubación, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se recogió la fase acuosa. Esta fase se mezcló con 500 µl de isopropanol (SIGMA), con el fin de precipitar el ARN, incubándose durante 24 h a -70 °C, en seguida se centrifugo las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, eliminando el sobrenadante y el botón

obtenido se lavó y purificó con 1ml de etanol (J.T BAKER) frío al 70%, se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos a 4°C dejando evaporar el etanol durante 1 h y media. El precipitado obtenido fue resuspendido con agua libre de ARNsas (FERMENTAS) conservando el stock a -70 °C.

Cuantificación de ARN.

La cantidad de ARN presente en las muestras se determinó en un biofotómetro (BIOPhotometer, Eppendorf), para normalizar las muestras e igualar las concentraciones, se realizó una dilución 1:50 suministrando 4 µl del stock de la muestra y resuspendido en 196 µl de agua inyectable (PISA), las sustancias fueron colocadas en una celda, posteriormente se realizó la lectura en el biofotómetro (BIOPhotometer, Eppendorf) para determinar las concentraciones de ARN (µg/ml), se tomaron las absorbancias de 260 nm y se relacionó con la absorbancia 280 nm para obtener un valor que nos indica su estado de pureza. Para alcanzar un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de ARN se toma el valor de 260/280 nm superior a 1.5 e inferior a 2.0. La contaminación de proteínas o de fenol disminuye la relación. Se aplicó la relación existente para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso ARN, de 1 unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/ml.

Obtención de ADNc por RT

Retrotranscripción (RT).

La concentración de ARN utilizada para la técnica fue de 2µg/µl para cada una de las muestras, para ello, se utilizó un kit de RT-PCR en el que se establecieron las siguientes condiciones: cada reacción (1Rx) fue multiplicada por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia del extracto de *Sargassum*). Las reacciones se colocaron en un termociclador (EPPENDORF ESTANDAR) que fue programado a 42 °C durante 1 hora. El ADNc obtenido se conservó a -70°C.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR semicuantitativa utilizando 2 µg/µl, las condiciones establecidas para 1Rx utilizando un kit de PCR Go taq Polimerasa, las cuales se multiplicaran por el número de muestras (controles y tratamientos con extracto de *Sabu(Ch)W*, se utilizó además primer específicos para el ARNm de Smac/DIABLO y β-actina, esta última utilizada como control interno de la técnica por ser una proteína constitutiva (Tabla 5).

| PRIMER | SECUENCIA | PARES DE BASES |
|--------------------|--|-----------------------|
| β-Actina | Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG Antisentido: GGTCTCAAACATGATCTGGG | 234 pb |
| Smac/DIABLO | Sentido: GGAAAGCAGAAACCAAGCTG Antisentido: CTCGGTGCACAGACAGTCAT | 211 pb |

Tabla 5. Secuencia, sentido y antisentido, del primer a utilizar para la detección de Smac/DIABLO, así como β-actina como un control interno de la técnica. Obtenidos con el programa Primer3 input versión 0.4.0 y comprobado en e-PCR

El protocolo que se utilizó consistió en:

1. Fase de desnaturalización del ADN: 94 °C durante 6 min
2. Fase de alineamiento del ADN: 54 °C durante 2 min
3. Fase de extensión del ADN: 72 °C durante 2 min
4. Fase de disociación: 94 °C durante 45 seg
5. 30 ciclos de repetición del paso 2 al 4
6. Fase de alineamiento del ADN: 54 °C durante 2 min
7. Fase de extensión del ADN: 72 °C durante 7 min
8. Fase de estabilización: 20 °C durante 30 min

ELECTROFORESIS.

Para visualizar la expresión del producto obtenido de la PCR de cada una de las muestras se realizó una electroforesis con 4µl del producto amplificado en un gel de agarosa al 1.5 %.

Para la preparación del gel de agarosa, se pesaron 1.5 g de agarosa la cual fue diluida con 100 ml de TBE 1X en un matraz de 100 ml. Para tener una mejor homogenización, la dilución se calentó a 50 °C durante 4 minutos aproximadamente. Después de montar la cámara de electroforesis ^(Owl, USA) se procedió a verter la dilución de agarosa junto con 15µl de bromuro de etidio en la cámara de electroforesis, inmediatamente se colocó un peine con el número de pozos deseados.

Concluido el tiempo de polimerización de la agarosa (20´ aproximadamente) se procede a retirar el peine y montar la cámara para la corrida electroforética, en el cual se colocara 1 l de buffer de corrida (TBE 0.5X). Posteriormente, se depositaron 4 µl de muestra en los pozos, así como 4 µl de escalera de pares de bases. El tiempo de corrida es aproximadamente de 1 hora a 80 volts.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa, debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el ánodo. De tal manera, la electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño y movilidad.

Para la visualización de los ácidos nucleidos se utilizó un colorante fluorescente: bromuro de etidio ^(MERCURY). Éste tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y aumentar en dichas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta (300 nm) de un transluminador ^(UVP, USA). De este modo se efectúa la visualización del ADN y la identificación de los productos de interés. Se compararon los productos de amplificación de las células cultivadas en ausencia de *Sabu(Ch)W* (control) con las células cultivadas con *Sabu(Ch)W* (Tratamiento) por medio de densitometría utilizando el programa Life Science (LS) software de UVP, para corroborar si existe un aumento o disminución en la expresión del ARNm para Smac/DIABLO.

Densitometría de los productos de amplificación

La electroforesis es la forma habitual y usada para evaluar cualitativamente los productos de amplificación de la PCR, y tiene como propósito separar los componentes moleculares individuales del ADN, ARN o proteínas en un gel plano. Pero para obtener un análisis más exacto y cuantitativo se utiliza la ayuda de fotodocumentadores, los cuales nos permiten determinar la cantidad presente en ng de moléculas de cierta clase, que se encuentren presentes en cada carril de muestra por medio de un equipo denominado Sistema de oscuridad controlada para la adquisición, documentación y análisis de bioimágenes usadas en investigación proteómica y genómica. El fotodocumentador fotografía el gel que contiene las moléculas que han migrado y las cuantifica con ayuda de un *software*, el objetivo es proporcionar en valores numéricos la intensidad de luminiscencia y concentración, los resultados son tabulados y comparados contra la escalera de pares e amplificación (GENERULER 25-700PB, THERMO SCIENTIFIC), que aparte de ofrecer los marcadores específicos de los tamaños de amplificado, también ofrece concentraciones en microgramos (μg) y finalmente el resultado es arrojado en nanogramos (ng) de cada producto amplificado.

En nuestro grupo de trabajo, se utilizó un Fotodocumentador ^(UVP,EE.UU.) Modelo DigiDoc-it[®] 120 *imaging System* junto con el *Software Doc-ItLS Acquisition and Analysis* version 7.1 RC3.54, el cual alimentamos y calibramos en función de los protocolos de las técnicas de RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa nativa y los datos de la escalera de amplificación antes mencionados. Es importante mencionar que este *Software* cumple con la norma 21CFR Parte 11 de los requisitos y reglamentos de los módulos de imágenes opcionales por *Software* para laboratorios de investigación (170-9691).

Para el análisis de los resultados, tomamos como valor aceptable de variación entre lectura y lectura la cantidad de 0.50 ng, esto en función de lo recomendado por el manual de operación del equipo de foto documentación.

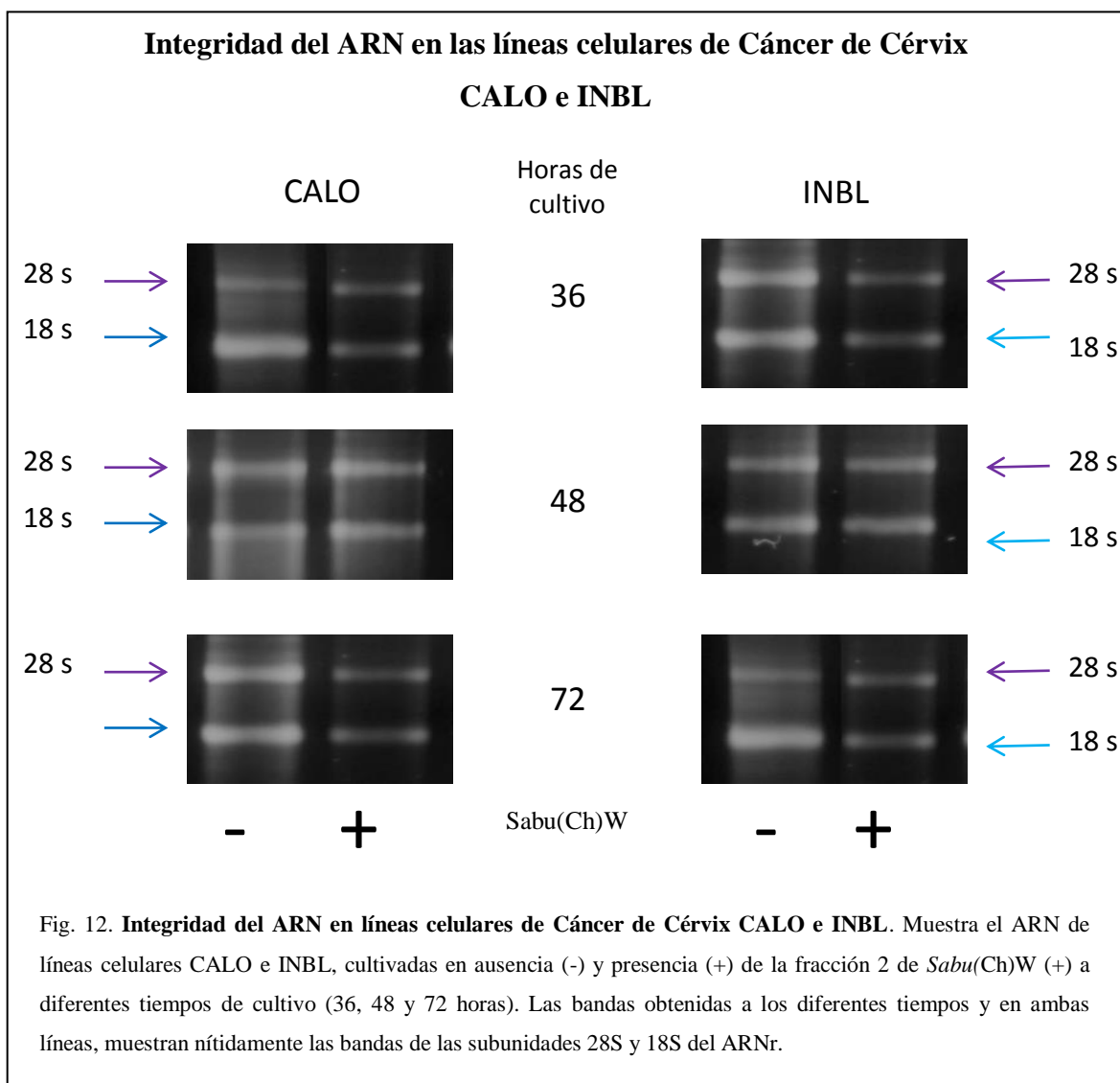
RESULTADOS

Con el propósito de evaluar el efecto de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* sobre la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, se cultivaron células de Cáncer de Cérvix de las líneas CALO e INBL, en presencia y en ausencia de dicho extracto, es importante aclarar que para definir los tiempos de cultivo se tomaron en cuenta los resultados de trabajos previos (Luna, 2012 y Santiago 2014), donde se evaluó el efecto del extracto de *Sabu(Ch)W* sobre la proliferación de las líneas CALO e INBL y sobre la expresión del ARNm la proteína proapoptótica *Citocromo c*. En dichos trabajos se reportan que la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* detiene a las células en diferentes fases del ciclo celular, observando para la línea celular CALO un arresto a las 24 horas en la fase S, de manera similar para la línea INBL, para la cual se observa una detención del ciclo celular a las 24 horas en la fase G1. Aunado a esto, datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo sugieren una inducción de muerte por apoptosis, así como la regulación positiva del ARNm la proteína proapoptótica *Citocromo c*, a partir de las 36 horas.

Tomando como base esta información, fue que en el presente trabajo se decidió cultivar las células en presencia y en ausencia del extracto a los tiempos de 36, 48 y 72, con el propósito de detectar la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, ya que se sabe que su liberación de la mitocondria se produce tiempo después de que se ha recibido el estímulo apoptótico, esto debido a su lugar de aparición en la vía intrínseca de la apoptosis y conjuntamente con *Citocromo c*.

I. Integridad del ARN en líneas celulares de Cáncer de Cérvix.

Para confirmar la integridad del ARN extraído por la técnica de Trizol, se procedió a correr las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, donde el ARN fue teñido con bromuro de etidio. Al exponer el gel a luz UV se observó nítidamente las subunidades 28s y 18s del ARN ribosomal (ARNr). Esto indica que la integridad del ARNr es aceptable y se puede contar con material confiable para realizar la retrotranscripción (Figura. 12).



II. RT-PCR del ARNm de la proteína β -actina y la proteína proapoptótica Smac/DIABLO

Una vez confirmada la integridad del ARNm se procedió a llevar a cabo la retrotranscripción (RT) para obtener el ADN complementario (ADNc) de cada una de las muestras cultivadas a los diferentes tiempos, en ausencia (-) o presencia (+) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*.

Estos ADNc se utilizaron para realizar la PCR, con la cual se evaluara la expresión del ARNm de las proteínas Smac/DIABLO y β -actina, esta última utilizada para confirmar que las condiciones de la PCR son las adecuadas y que es confiable para amplificar los demás primers, esto debido a que β -actina es una proteína constitutiva de las células, la cual se encuentra en síntesis continua en células metabólicamente activas, por lo cual su mensajero está presente siempre en las células de Cáncer de Cérvix.

II.I Expresión del ARNm de la proteína β -actina en células de Cáncer de Cérvix

Los resultados obtenidos muestran tanto para la línea celular CALO como INBL una banda de amplificación de 232pb, que corresponde al tamaño del producto esperado para β -actina. Es evidente que en ambas líneas celulares se obtuvieron bandas homogéneas de los productos de amplificación a los diferentes tiempos de cultivo, lo mismo para las células cultivadas en ausencia (-) como para las cultivadas en presencia (+) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* (Figura 13).

Expresión del ARNm de la proteína β -actina en células de las líneas CALO e INBL

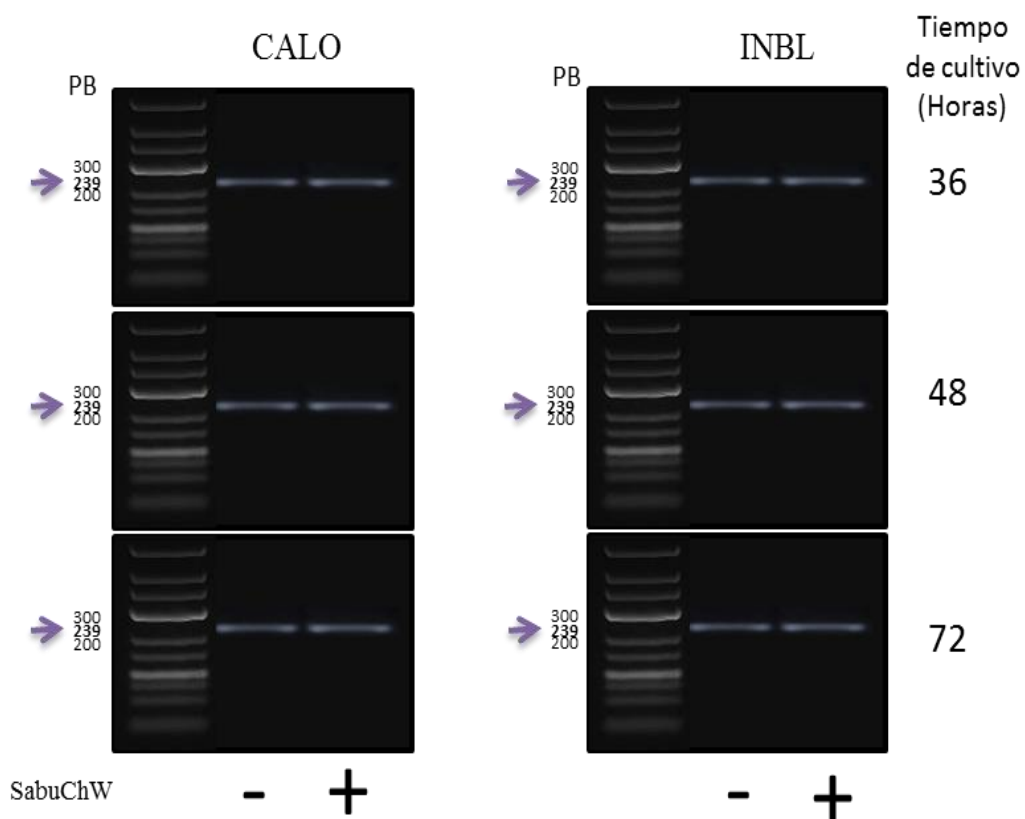
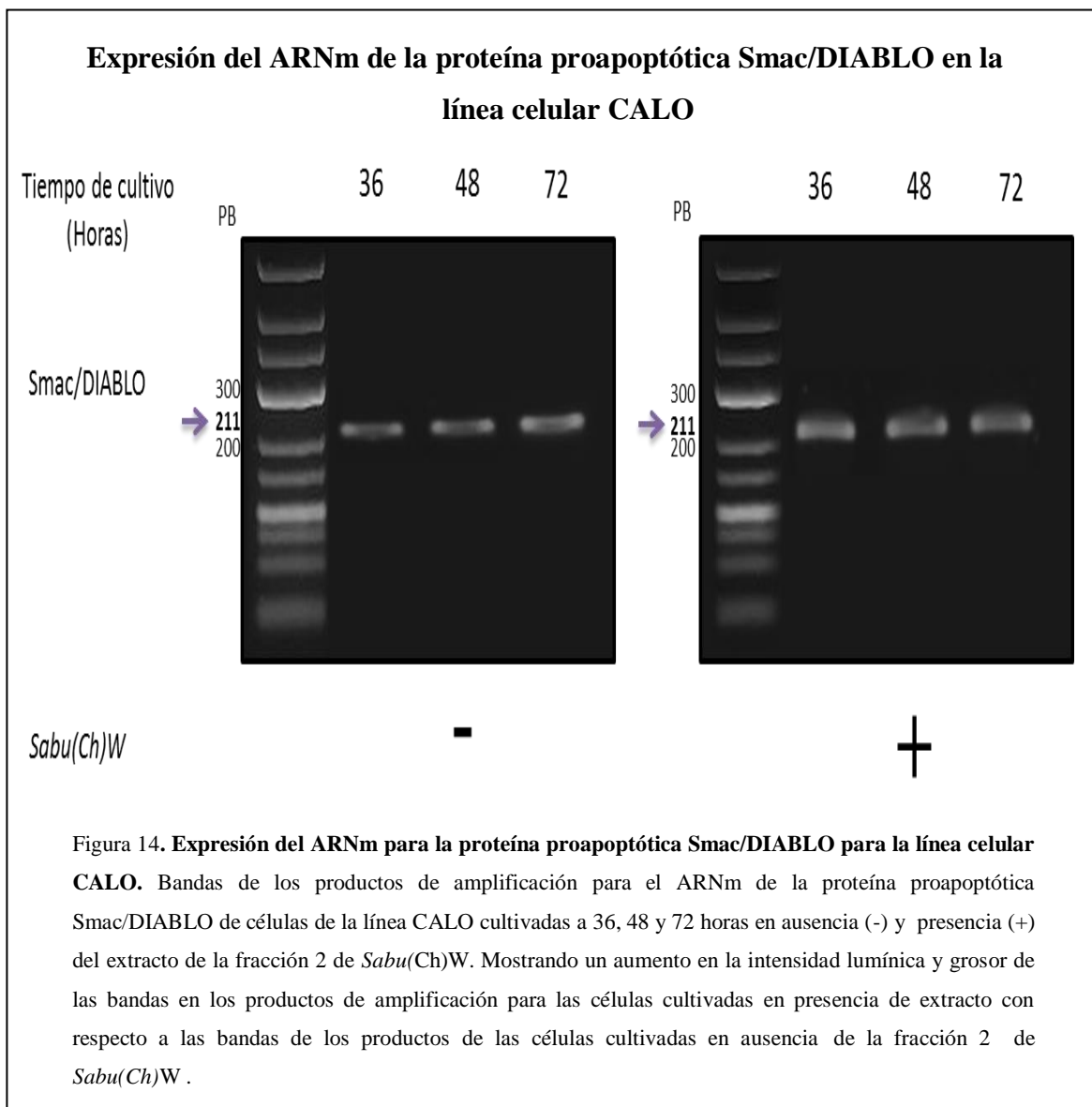


Figura 13.- **Expresión del ARNm para la proteína β -actina.** Muestra la expresión del ARNm para la proteína β -actina para las líneas celulares CALO e INBL, cultivadas a tres diferentes tiempos en presencia (+) y ausencia (-) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, mostrando bandas homogéneas para ambas líneas a los diferentes tiempos de cultivo.

II.II Expresión del ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular CALO.

Después de corroborar por medio de la expresión de β -actina que las condiciones de la PCR son las correctas, se procedió a amplificar el producto para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO. Los resultados obtenidos muestran para la línea celular CALO, una banda de amplificación de 211 pb, que corresponde al tamaño del producto esperado. Los amplificados del ARNm de las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, revelan un incremento en su intensidad lumínica y grosor de la banda directamente proporcional al tiempo, siendo más evidente a las 72 horas. Para las células cultivadas en presencia del extracto, se observó el mismo efecto con respecto al tiempo.

Sin embargo, en el momento de comparar las bandas del producto de amplificación para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/Diablo se observó una mayor intensidad lumínica y grosor en las bandas de los productos de amplificación en las células cultivadas en presencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, en comparación con los productos obtenidos de las células cultivadas en ausencia del extracto, siendo esta diferencia más notoria a las 36 horas (Figura 14).



III. Densitometría de los productos de amplificación para Smac/DIABLO con el *Software Doc-ItLS Acquisition and Analysis* en la línea celular CALO.

Dado que la evaluación de la expresión génica, producto de la RT-PCR en gel de agarosa, sólo proporciona datos cualitativos, actualmente se han desarrollado protocolos de evaluación de la expresión génica, utilizando *Software* especializado para obtener datos cuantitativos de la expresión de los productos de la PCR. Por esta razón, en el presente trabajo se realizó el análisis de los productos de amplificación obtenidos de la RT-PCR para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO fueron valorados usando la técnica de

densitometría por luminiscencia (Tabla 6). Dicha técnica cuantifica la proporción de luz retenida en los ácidos nucleicos del amplificado, permitiendo determinar su masa de manera automatizada minimizando el rango de error, además esto nos permite proporcionar datos numéricos de la concentración de cada amplificado.

De acuerdo con el *software Doc-itLS Acquisition and Analysis*, se tomó en cuenta como valor aceptable de variación entre lectura y lectura la cantidad de 0.50 ng. Este margen toma en cuenta los errores de pipeteo y llenado de las muestras.

Densitometría para los productos de amplificación de Smac/DIABLO en la línea CALO.

| Tiempo de cultivo (Horas) | CALO | Rf | I-Max | I-Vol | Mass (ng) | Corrección de fondo | Ratio (ng) |
|---------------------------|------|------|-------|--------|-----------|---------------------|------------|
| 36 | - | 0.45 | 153 | 114798 | 3.11 | 0 | 1.73 * |
| | + | 0.45 | 221 | 176452 | 4.84 | 0 | |
| 48 | - | 0.45 | 211 | 155586 | 4.16 | 0 | 0.73 * |
| | + | 0.45 | 223 | 186413 | 4.89 | 0 | |
| 72 | - | 0.45 | 233 | 184202 | 4.83 | 0 | 0.15 |
| | + | 0.45 | 229 | 184352 | 4.98 | 0 | |

Tabla 6. Valores obtenidos con el *Software Doc-ItLS Acquisition and Analysis version 7.1 RC3.54*, de los productos de amplificación del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO de las células cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, mostrando la línea de referencia (**Rf**). Intensidad máxima proporcionada en lumens (lm) (**I-Max**). Correlación con los valores de volumen de todas las variables (**I-Vol**), **Masa** (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, **Corrección de fondo**: Retoque de la fotografía, **Ratio** (ng): muestra la diferencia de la masa entre células cultivadas en presencia del extracto de *Sabu(Ch)W* (+), con respecto a las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W* (-) de la línea celular CALO. Para que la diferencia sea significativa (*) tiene que ser mayor a 0.50 ng.

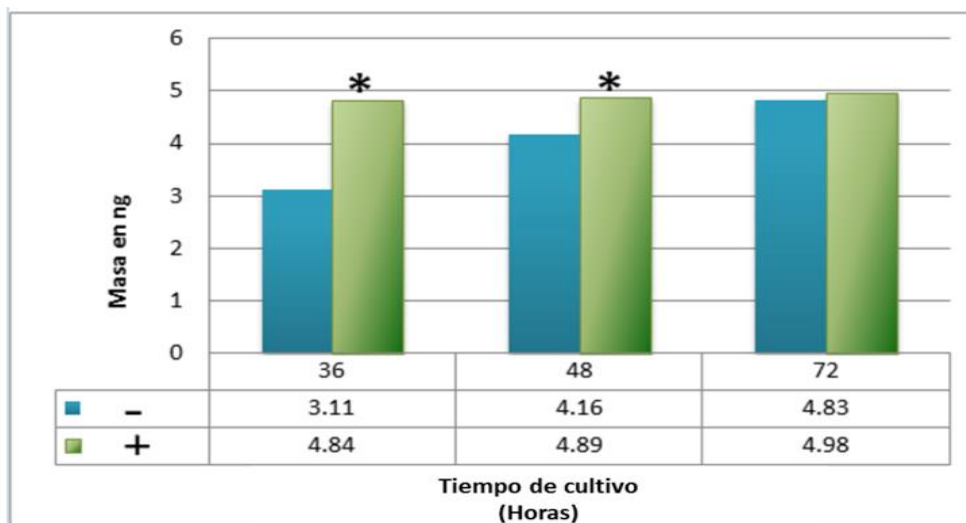
Para tener una mejor visualización de la variación entre las masas de los productos de amplificación obtenidos para Smac/DIABLO, de las células cultivadas en presencia y ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, se elaboró una gráfica de masa. Para ello se comparó la intensidad lumínica y cantidad de píxeles en el ancho de la banda con un patrón ya conocido. Dicho patrón fue la escalera de tamaños de amplificación (GENERULER 25-700PB,

HERMO SCIENTIFIC), la cual además de proporcionar referencias sobre los tamaños de los productos de amplificación, también suministra datos sobre la concentración de las bandas de éstos.

De esta manera se observa que la masa de los productos de amplificación del mensajero de las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, van incrementando su masa conforme al tiempo, mientras que para los productos de amplificación del mensajero de las células cultivadas en presencia de dicho extracto, la mayor masa se obtuvo se observa a las 36 horas sin cambios aparentes con respecto al tiempo.

Al comparar la masa de los productos de amplificación para la proteína proapoptótica Smac /DIABLO, entre células cultivadas en presencia y ausencia del extracto, y tomando en cuenta como variación significativa los 0.50 ng, observamos que estos tienen un incremento significativamente mayor cuando las, células fueron cultivadas a 36 y 48 horas en presencia del extracto de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W* (Grafica 1).

Masa de los productos de amplificación del ARNm de Smac/DIABLO en la línea CALO



Grafica 1. Muestra la masa de los productos de amplificación del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO de las células cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de *Sabu(Ch)W*, obtenidas con el *Software Acquisition and Analysis* version 7.1 RC3.54, se observa una diferencia significativa (*) en la masa del producto de amplificación para la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO en las células cultivadas en presencia del extracto a las 36 y 48 horas en comparación con la masa de los productos de amplificación de las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, siendo más notorio a las 36 horas, mientras que a las 72 horas no hay una diferencia significativa.

Después de analizar las bandas de los productos de amplificación para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, con el *software Doc-ItLS Acquisition and Analysis version 7.1 RC3.54* y hacer una comparación entre los valores obtenidos de la masa de los productos de amplificación de las células cultivadas en ausencia del extracto con la obtenida de células cultivadas en presencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W* (Ratio), se observó un aumento significativo en las masas de estas últimas a las 36 y 48 horas, siendo este aumento de 1.73 ng a las 36 horas, mientras que a las 48 horas se obtiene un aumento de 0.73 ng (Tabla 6).

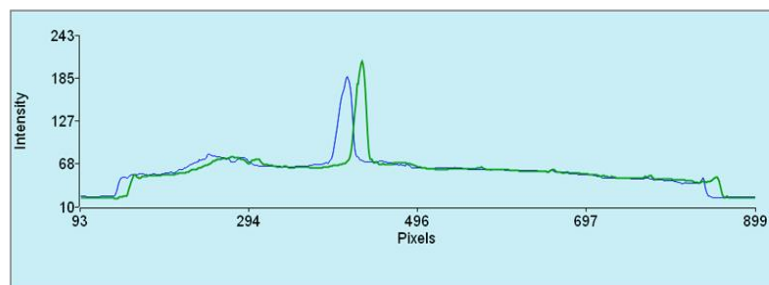
Gracias al software se pudo obtener histogramas, que tabulan y comparan la intensidad de fluorescencia y la cantidad de píxeles del área de las bandas. A continuación se presentan los histogramas de los productos de amplificación para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO (Grafica 2).

A partir de los resultados obtenidos podemos observar que a las 36 y 48 horas de cultivo en presencia del extracto de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, los productos de amplificación para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, presentan un aumento en intensidad lumínica y cantidad de píxeles en el ancho de la banda, en comparación con las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, mientras que a las 72 horas, si bien hay una intensidad lumínica muy similar, se observa una mayor cantidad de píxeles en el ancho de la banda en los productos de amplificación para la proteína proapoptótica Smac /DIABLO, en presencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*.

Histograma del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en la línea celular de Cáncer de Cérvix CALO.

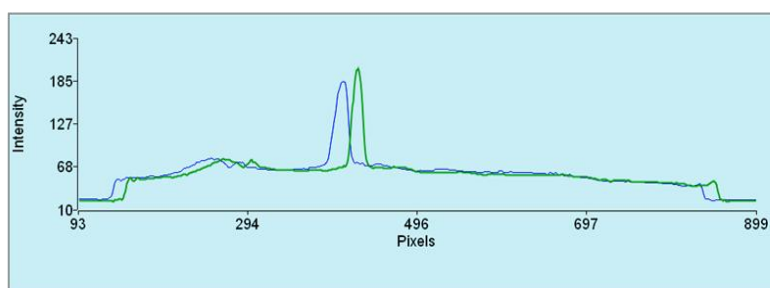
Tiempo de cultivo (Horas)

36



SabuChW

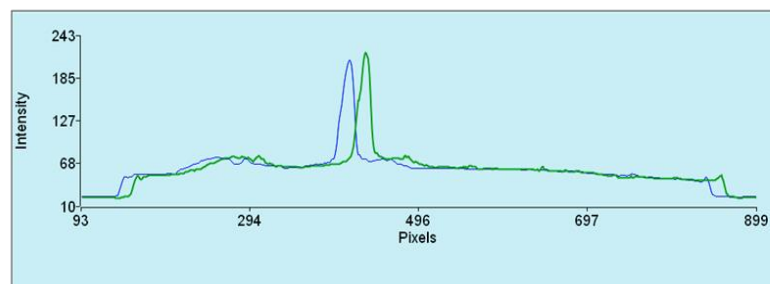
48



● -

● +

72

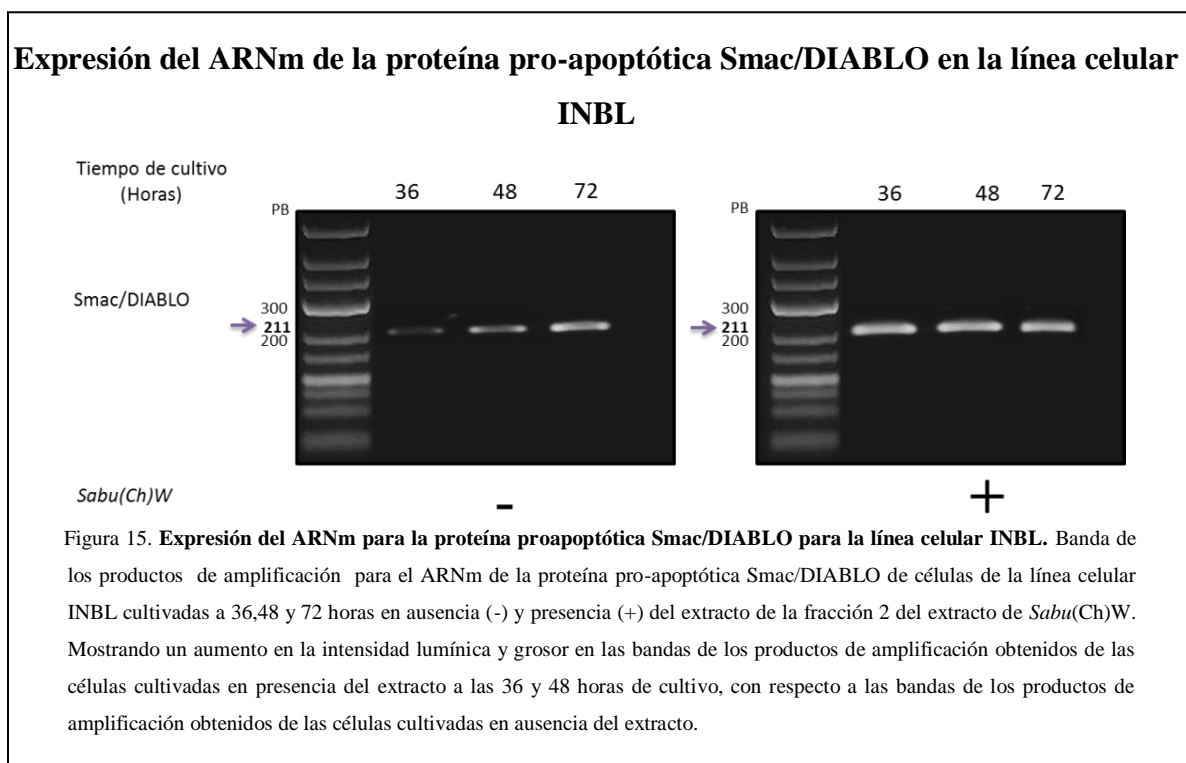


Grafica 2. Muestra el comportamiento de las bandas de los productos de amplificación del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en células de la línea de Cáncer de Cérvix CALO, cultivadas a 36, 48 y 72 horas, en presencia (+) y ausencia (-) de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*. Observando que a las 36 y 48 horas las bandas de los productos de amplificación del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO presentan una mayor intensidad lumínica y cantidad de píxeles, en comparación con las bandas de los productos de amplificación de las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*. Mientras que a las 72 horas se observa una intensidad lumínica muy similar para ambas condiciones, pero las la banda del producto de amplificación de las células cultivadas en presencia del extracto muestran una mayor cantidad de píxeles del área de la banda.

IV. Expresión del ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular INBL

De igual manera al evaluar el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en células de la línea INBL cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, se obtuvo una banda de amplificación de 211 pb, que corresponde al tamaño del producto esperado para Smac/DIABLO. Los productos de amplificación del ARNm de las células cultivadas en ausencia del extracto, muestran un incremento muy evidente, en cuanto a su intensidad lumínica y grosor de la banda, directamente proporcional al tiempo de cultivo, mientras que para las células cultivadas en presencia del extracto se observa una pequeña disminución en la intensidad lumínica y ancho de la banda con respecto al tiempo.

Sin embargo, al comparar las bandas de los productos de amplificación obtenidos de células cultivadas en ausencia de *Sabu(Ch)W*, con los obtenidos de células cultivadas en presencia del extracto, se observa que las bandas de los productos obtenidos de las células cultivadas en presencia del extracto muestran una mayor intensidad y ancho en las bandas a las 36 y 48 horas, mientras que para las 72 horas se observa una intensidad lumínica muy parecida al obtenido para las bandas de los productos de amplificación obtenidos de las células cultivadas en ausencia de *Sabu(Ch)W* (Figura 15).



Asimismo, con el propósito de obtener datos cuantitativos de los productos obtenidos de la RT-PCR para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO de la línea celular INBL estos, fueron valorados usando la técnica de densitometría por luminiscencia con el *Software Doc-ItLS Acquisition and Analysis version 7.1 RC3.54*, de igual manera para el análisis se tomó en cuenta como valor aceptable de variación entre lectura y lectura la cantidad de 0.50 ng,

Al analizar los datos obtenidos con dicho *software* y tomando en cuenta el 0.50 ng para decir que existe alguna diferencia significativa en la masa de las bandas, se observa que a las 36 y 48 horas se tiene un aumento significativo en la masa de los productos de amplificación del ARNm de Smac/DIABLO, de células cultivadas en presencia de *Sabu(Ch)W*, siendo este aumento de 2.19 ng a las 36 horas, mientras que para las 48 horas es de 1.26 ng, a diferencia de los productos de amplificación obtenidos de las células cultivadas en ausencia del extracto (Tabla 7).

Densitometría para los productos de amplificación del ARNm de Smac /DIABLO con el *Software Doc-ItLS Acquisition and Analysis version 7.1 RC3.54*, en la línea celular INBL.

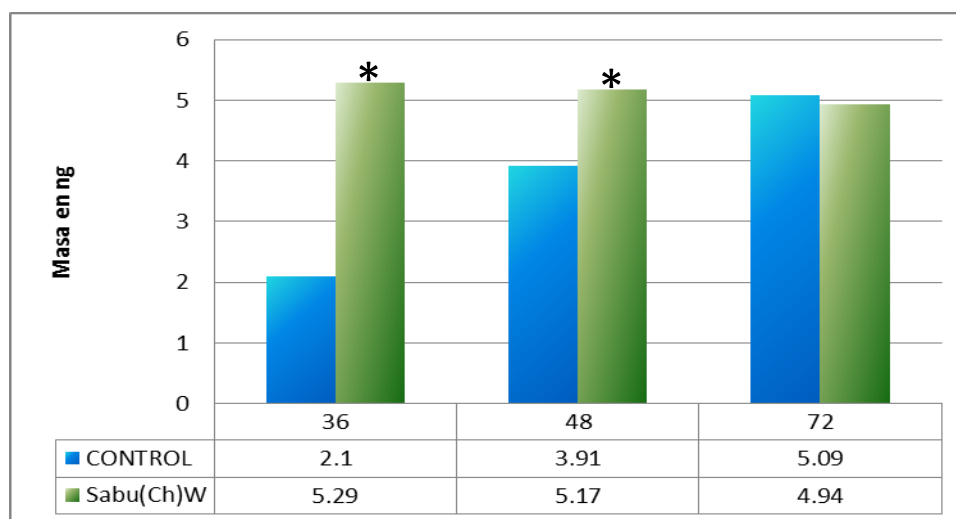
| Tiempo de cultivo (Horas) | INBL | Rf | I-Max | I-Vol | Mass (ng) | Corrección de fondo | Ratio (ng) |
|---------------------------|------|------|-------|--------|-----------|---------------------|------------|
| 36 | - | 0.45 | 152 | 113440 | 2.1 | 0 | 3.19 * |
| | + | 0.45 | 231 | 113415 | 5.29 | 0 | |
| 48 | - | 0.45 | 205 | 144809 | 3.91 | 0 | 1.26 * |
| | + | 0.44 | 226 | 195194 | 5.17 | 0 | |
| 72 | - | 0.44 | 231 | 192104 | 5.09 | 0 | -0.15 |
| | + | 0.44 | 222 | 182044 | 4.94 | 0 | |

Tabla 7. muestra los valores obtenidos con el *Software Doc-ItLS Acquisition and Analysis version 7.1 RC3.54*, mostrando La línea de referencia (**Rf**), Intensidad máxima proporcionada en lumens (lm) (**I-Max**), Correlación con los valores de volumen de todas las variables (**I-Vol**), **Masa** (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, **Corrección de fondo**: Retoque de la fotografía, **Ratio** (ng): muestra la diferencia de la masa entre células cultivadas en presencia del extracto de *Sabu(Ch)W* con respecto a las células cultivadas en ausencia de *Sabu(Ch)W* de la línea celular INBL. Para que la diferencia sea significativa (*) tiene que ser mayor a 0.50 ng.

Al graficar los valores de la masa en ng de los ácidos nucleicos obtenidos por medio de la densitometría, para los productos de amplificación para la proteína proapoptótica Smac /DIABLO, se observa como esta va incrementando conforme el tiempo para los productos de amplificación obtenidos de las células cultivadas en ausencia del extracto de *Sabu(Ch)W*, mientras que para los productos de amplificación obtenido de las células cultivadas en presencia de dicho extracto se observa como desde las 36 horas llega a un “máximo”, para después ir decreciendo levemente conforme al tiempo.

Al comparar los productos de amplificación para la proteína proapoptótica Smac /DIABLO, se observa que los productos de amplificación para la proteína proapoptótica Smac /DIABLO obtenido de células cultivadas en presencia del extracto de *Sabu(Ch)W* presentan significativamente una mayor masa que los productos de amplificación de células cultivadas en ausencia del extracto de *Sabu(Ch)W* a los tiempos de 36 y 48 horas, siendo muy evidente a las 36 horas, mientras que para las 72 horas de cultivo no se ve variación significativa (Grafica 3).

Masa de los productos de amplificación del ARNm de Smac/DIABLO en la línea INBL.



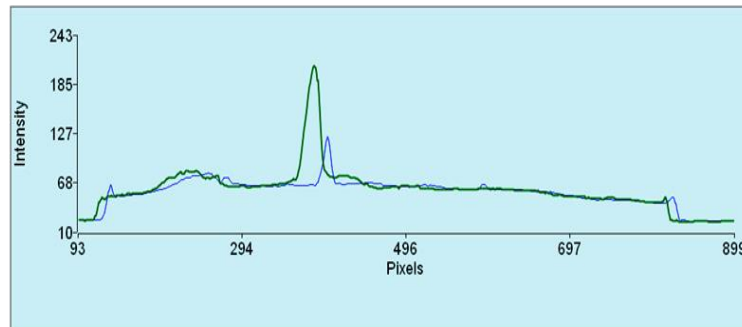
Grafica 3. Muestra la masa de los productos de amplificación de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO de las células cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de *Sabu(Ch)W*, obtenidas con el *Software Acquisition and Analysis* version 7.1 RC3.54, se observa una diferencia significativa (*) en la masa del producto de amplificación para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en las células cultivadas en presencia del extracto a las 36 y 48 horas en comparación con la masa de los productos de amplificación de las células cultivadas en ausencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, siendo más notorio a las 36 horas, mientras que a las 72 horas no hay una diferencia significativa.

Para lograr una mejor visualización de los datos arrojados por densitometría y su relación con el tiempo y las condiciones de cultivo se obtuvieron histogramas. Dichos histogramas muestran las bandas de los productos de amplificación para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, en los cuales se puede observar que a las 36 y 48 horas de cultivo en presencia del extracto se observa un aumento importante en la intensidad lumínica y cantidad de píxeles, en comparación con las bandas de los productos de amplificación obtenido de las células cultivadas en ausencia de dicho extracto, así mismo se observa que para las 72 horas a pesar de que ambas bandas presentan la misma intensidad lumínica, la cantidad de píxeles es mayor para la banda que representa el producto de amplificación para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, obtenido de las células cultivadas en ausencia del extracto (Grafica 4).

Histograma del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en la línea celular de Cáncer de Cérvix INBL.

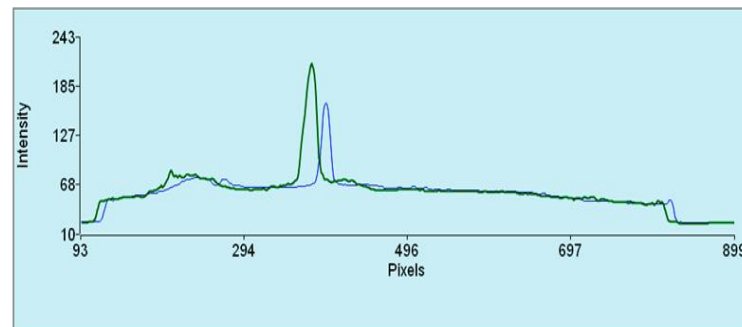
Tiempo de cultivo (Horas)

36



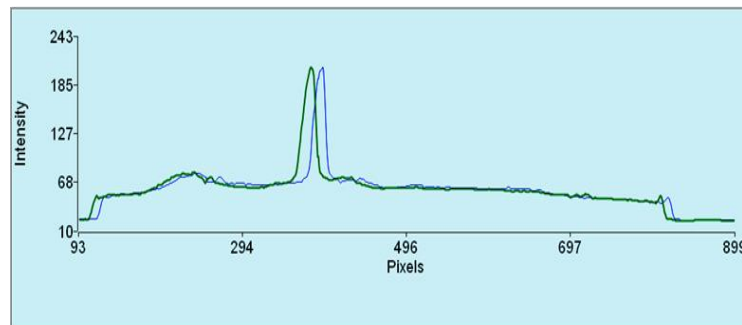
SabuChW

48



● -
● +

72



Grafica 4. Muestra el comportamiento de la intensidad de las bandas de los productos de amplificación para el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO en células de la línea INBL, cultivadas a 36,48 y 72 horas, en ausencia (-) y presencia (+) de Sabu(Ch)W, observando un aumento considerable en la intensidad de lumínica a las 36 y 48 horas, en las bandas de los productos de amplificación de las células cultivadas en presencia del extracto, mientras que para las 72 horas se observa una intensidad lumínica similar entre ambas bandas, pero se observa que la banda del producto de amplificación de las células cultivadas en ausencia del extracto presenta una mayor cantidad de píxeles.

Discusión de Resultados

A pesar de los avances en la prevención y en el desarrollo de tratamientos contra el Cáncer, este sigue siendo un problema de salud pública, colocándose así como una de las principales causas de muerte en el mundo. Hay que recordar que el Cáncer no solo es una enfermedad si no que es el nombre que reciben una variedad de por lo menos 100 enfermedades, causadas por la suma de mutaciones en la célula. Estas alteraciones le permiten proliferar descontroladamente y tener la capacidad de invadir y destruir otros tejidos. Si bien es cierto que en la actualidad existen diferentes procedimientos que resultan ser, hasta cierto punto, efectivos para tratar los distintos tipos de Cáncer, es importante subrayar que éstos suelen ser en su mayoría invasivos y con poca o nula selectividad, dañando así la salud integral de los pacientes.

Tal es caso del Cáncer de Cérvix, cuyas opciones de tratamientos actualmente disponibles se basan principalmente en tres pilares fundamentales: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, los cuales son invasivos y solo son eficientes si éstos se administran en ciertas etapas del Cáncer, teniendo mejores resultados cuando se administran en las primeras fases del desarrollo tumoral, por lo que las pacientes en etapas avanzadas suelen tener menos probabilidades de cura cuando son sometidas a estos tratamientos. Es por ello que este tipo de Cáncer sigue ocupando el segundo lugar como causa de muerte por tumores malignos en la mujer, siendo los países en vías de desarrollo como México los más afectados. Asimismo, debemos tomar en cuenta que la vacuna que promete prevenir el surgimiento de nuevos casos no muestra resultados inmediatos sino hasta después de varios años. A pesar de los grandes avances en la prevención y detección, aún falta mucho para llegar a fomentar una conciencia sobre las consecuencias que este padecimiento ocasiona en las mujeres.

Por esta razón, en los últimos años la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas de origen natural y que además presenten una selectividad, constituye una de las tendencias más importantes en la investigación actual, siendo en este contexto los metabolitos de origen vegetal los más estudiados para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo del Cáncer. En este sentido, las algas se han vuelto objeto de numerosos estudios, cuyos resultados muestran que éstas son fuente de diversos metabolitos secundarios con múltiples propiedades biológicas que van desde antibacterial,

hasta antitumoral, mostrando una gama muy extensa de compuestos bioactivos, como algunos polisacáridos sulfatados.

Por consiguiente, las algas pardas que pertenecen al género *Sargassum* se ha reportado que son fuente de diversos metabolitos bioactivos con propiedades como: antibacterial, antifúngica, anticoagulante, antioxidante, inmunoregulador, antiinflamatoria y anticancerígena, entre otras, las cuales son atribuidas a la presencia de compuestos como la sarganina, diterpenos, plastoquinonas, hidrocarburos halogenados, polifenólicos, ácido turbinarico (Oranday, 1998), fucoïdan, (Jong-young *et al*, 2014), fucosantina (Siew-ling *et al*, 2010), Heterofucan (Silva *et al.*, 2011). Además de presentar una amplia variedad de polisacáridos (Hong *et al.*, 2008).

A pesar de los numerosos estudios realizados para conocer la actividad biológica de las moléculas bioactivas, presentes en diversas especies de algas del género *Sargassum*, actualmente no existen reportes que describan los metabolitos o las propiedades biológicas que puede presentar la especie *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne [*Sabu*(Ch)W]. Por lo que nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de evaluar el efecto del extracto de *Sabu*(Ch)W, en células de Cáncer de Cérvix. Para ello se obtuvo a partir de una muestra, recolectada de la playa Muñecos en temporada de secas, un extracto rico en carotenoides cuyo fraccionamiento, de acuerdo a su proporción de xantofilas y carotenoides, proporcionó 20 eluatos, de los cuales los primeros 9 son más ricos en xantofilas que en carotenos (Figura 11) (Luna, 2012). Es importante mencionar que entre las xantofilas destacan los fucanos y sus derivados, como la fucosantina, fucoïdan y heterofucanos, reconocidos por su actividad antitumoral (Jong-young *et al*, 2014, Siew-ling *et al*, 2010, Silva *et al*, 2011, Hong Ye *et al*, 2008)

Datos previos acerca del efecto antiproliferativo de las fracciones del extracto de *Sabu*(Ch)W sobre células de las líneas de Cáncer de Cérvix CALO e INBL, determinaron que la fracción dos de dicho extracto es la que presenta una mayor actividad biológica, mostrando un efecto citostático sobre las células de las líneas CALO e INBL, a través del arresto de las células en diferentes fases del ciclo celular, la fase de arresto, parece estar relacionada con el estadio clínico del tumor del cual provienen las células de Cáncer de Cérvix (Luna 2012).

Otro dato interesante proporcionado por nuestro grupo de trabajo, demuestra que la fracción dos del *Sabu(Ch)W* induce a muerte por apoptosis a células de las líneas CALO e INBL, además de regular positivamente la expresión del ARNm para *Citocromo c* (Santiago, 2014). De igual manera, se ha probado la selectividad de la fracción dos observando que induce la formación de racimos de activación en LSPH y estimula su proliferación (Luna, 2012).

Sin embargo, no se ha esclarecido la vía molecular por la cual *Sabu(Ch)W* induce la muerte por apoptosis en células de las líneas de Cáncer de Cérvix. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión del ARNm para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, en células de las líneas CALO e INBL cultivadas en ausencia y presencia del extracto *Sabu(Ch)W*.

El principal motivo por el cual se decidió evaluar el mensajero para la proteína proapoptótica Smac/DIABLO fue su importancia en el proceso de apoptosis, ya que se sabe que Smac/DIABLO se une a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) mediante su NH terminal, a los dominios BIR2 y BIR3, los cuales son los puntos de unión de las IAP con las caspasas 3 y 7, así como a la caspasa 9 respectivamente, impidiendo de esta forma que las IAP puedan inhabilitar a las caspasas, de tal forma que las caspasas quedan libres y pueden llevar a cabo su función, promoviendo el proceso de apoptosis en la célula (Meléndez *et al*, 2008).

Asimismo, estudios recientes sobre la expresión de Smac/DIABLO han demostrado que la sobre expresión de éste sensibiliza a las células neoplásicas a la muerte por apoptosis (Martínez *et al*, 2008), esto se debe a su interacción con las IPA, sobre todo en tumores en los cuales esta descrito que están sobre expresadas las IPA. Por ejemplo, en algunos tipos de Cáncer como el renal (Kempkensteffen *et al*, 2008), en este caso el Smac/Diablo se encuentra a la baja (Mizutami *et al*, 2005). De la misma forma se presenta una disminución significativa de Smac/DIABLO durante la progresión del Cáncer de pulmón, siendo así propuesto como un nuevo marcador pronostico en el Cáncer de pulmón, (Sekimura *et al*, 2004) Estos hallazgos han impulsado el desarrollo de péptidos que posean un NH terminal muy similar a la de Smac/DIABLO, para que este pueda interactuar con las IAP de la misma forma que lo hace Smac/DIABLO. Aunado a ésto, también se ha comprobado que

Smac/DIABLO induce la activación de la vía NF- κ B llevando a muerte por apoptosis a través de la activación de caspasa 8 a través de TNF- α (Vince *et al*, 2007).

Dada la importancia de Smac/DIABLO, también se ha desarrollado la formulación de pequeñas moléculas que imitan a esta proteína, esto con el fin de utilizarlos como agentes terapéuticos, que ayudan a llevar a cabo la función de Smac/DIABLO, comprobando que estas moléculas ayudan a sensibilizar a células de linfoma de Hodgkin a la apoptosis mediada por granzima B, e inducir la activación de Caspasa 3 por medio de *Citocromo c* (Kashkar *et al* 2003). También se ha corroborado que péptidos sintéticos parecidos a Smac/DIABLO mejoran los efectos apoptóticos de los agentes quimioterapéuticos (Arnt CR. *et al* 2002 y Mizukawa K. *et al*, 2006).

Con base en lo anterior podemos subrayar que Smac/DIABLO juega un papel importante en el proceso de apoptosis, debido a su interacción con las IAP, dando lugar a una acción terapéutica, que tiene por objetivo sensibilizar a las células tumorales a muerte por apoptosis, por lo que el desarrollo de nuevos fármacos que tengan una regulación positiva sobre la expresión de esta proteína y que además, no dañen al sistema inmune serían de gran utilidad para el tratamiento del cáncer. Sobre todo para aquellos tumores en los cuales Smac/Diablo se encuentra a la baja o para provocar una mayor sensibilidad a fármacos.

La regulación positiva de *Sabu(Ch)W*, sobre el ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, se confirmó mediante el análisis densitométrico de los productos de amplificación para el ARNm de esta proteína proapoptótica, los cuales nos muestran que para las células cultivadas en ausencia del extracto de *Sabu(Ch)W*, presentan un comportamiento cíclico que va en aumento conforme al tiempo, tanto para la línea celular CALO como INBL. También se observa que no hay variaciones considerables de la expresión de este mensajero entre la expresión basal de ambas líneas lo cual ya se había descrito, por Espinoza en 2004. Quien menciona que el ARNm de Smac/DIABLO se distribuye de igual manera en Cáncer de Cérnix, entre las etapas clínicas y no existe relación con ninguna variable clínica, tal como la histología, menopausia o estado de la enfermedad, asimismo reportó que algunos tipos de Cáncer de Cérnix expresa de *novo* esta proteína.

Las células cultivadas en presencia de la fracción dos del extracto de *Sabu(Ch)W*, se observó por medio del análisis densitómetro un incremento del ARNm de Smac/DIABLO en la línea celular CALO, siendo este aumento de 1.73 ng, por otro lado para INBL el incremento fue de 3.19 ng esto demuestra que el extracto regula positivamente la expresión del mensajero para dicha proteína en estas líneas celulares, cabe destacar que la mayor regulación se da en células de un estadio avanzado, por tanto esta es más susceptible a muerte por el uso del extracto.

Esto se confirma al comparar la dilución que se necesita del extracto para que la línea celular INBL tenga alguna respuesta al *Sabu(Ch)W*, siendo está mayor (1:8910) a la utilizada para la línea celular CALO (1:8123), lo cual es sustancial, ya que se estaría tratando con mayor éxito a células de un estadio avanzado. Lo anterior cobra relevancia, si se llega a la etapa clínica aplicando *Sabu(Ch)W* como alternativa terapéutica, ya que se requiere de una menor cantidad del extracto para eliminar crecimientos tumorales de estadio avanzado lo cual es muy favorable, para las pacientes en comparación de las terapias actuales que suelen tener poco éxito en fases terminales.

Es importante subrayar que las concentraciones del extracto de *Sabu(Ch)W* utilizadas en este trabajo son menores a las empleadas para extractos obtenidos de otros miembros del mismo género, como es el caso de *Sargassum thunbergii* con propiedades citotóxica y antitumoral, que emplea una concentración de 100 µg/ml (Zhang y Yu 1997). *Sargassum filipéndula* induce a apoptosis a células de Cáncer de Cérvix (Hela) para lo cual se utiliza una concentración de 2mg / ml (Silva *et al*, 2011). *Sargassum oligocytum*, el cual fue probado en líneas celulares de Cáncer, utilizando concentraciones de entre 100 y 500 mg/ ml por kg de peso (Zandi *et al*. 2010) o *Sargassum sp.*, que presentó una actividad citotóxica en líneas de Cáncer de hígado a una concentración de entre 100 y 300 µg/µl (J.Stella *et al*, 2012), ya que en el caso del extracto de *Sabu(Ch)W* se utiliza una concentración de 7.38 µg/ml para la línea celular CALO y 6.73 µg/ml para INBL (Luna, 2012 y Santiago 2014), lo cual es un avance significativo ya que se requiere una concentración mínima de *Sabu(Ch)W* para inducir la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Smac/diablo para inducir la muerte por apoptosis de células de cáncer de cérvix.

Los reportes de los efectos del uso de Fucoïdan, que está presente en la mayoría de las algas pardas, indican que 1.0 mg/ml incrementa la población G0 / G1-fase, además de disminuir la fase S en células de la línea de hepatocarcinoma (Huh7) lo cual sugiere, que el fucoïdan, puede causar la detención del ciclo celular en la fase G0 / G1 (Negamine *et al*, 2009). También existen reportes sobre el heterofucan, los cuales muestran que una concentración de 1.0 mg/ml induce la apoptosis a células Hela (Silva *et al*, 2011). Tomando en cuenta esta información del efecto de grupos fucoïdes sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis en carcinomas, datos con una gran similitud con los resultados aquí reportados del efecto de *Sabu(Ch)W* sobre células de cáncer de cérvix, nos hace suponer que los metabolitos con la actividad citsttica e inductora de muerte pueden ser compuestos similares al fucoïdan y al heterofucan.

Como se puede observar existen una amplia gama dentro de los compuestos extraídos de las algas pardas y diversos derivados del fucoïdan, esto dependiendo de la especie de la cual se extraiga, por lo cual el compuesto extraído de *Sabu(Ch)W* al estar proporcionando dichas propiedades puede ser una molécula diferente y más eficiente que las ya conocidas, debido a que se requiere de una cantidad menor que las ya empleadas, para observar un efecto similar. Hay que recordar que la estructura de los funacanos es muy variada, por lo que deben ser estudiados como un compuesto nuevo cada vez que se asln de una fuente diferente, (Chevolot, *et al*, 1999), lo cual al caracterizar el extracto podría confirmarse o refutarse esta teoría. Por lo tanto, podría tratarse de otro compuesto ya que estamos trabajando con una especie de *Sargassum* distinta. Evidencia que apoyaría la teoría de que se puede tratar de metabolitos nuevos, esto radica en resultados (no publicados) obtenidos al utilizar el extracto de *Sabu(Ch)W* obtenido de localidades distintas del Golfo de México.

Dichos resultados muestran que los extractos obtenidos en las diferentes localidades y temporadas no se comportaban de la misma forma, lo cual sugiere que la especie recolectada en la playa Muñecos podría ser una especie endémica, para poder confirmar esto, aún falta realizar diversos estudios tanto de caracterización, como de pruebas moleculares que confirmen dicha hipótesis, la cual al ser cierta implicaría que se está trabajando con una especie endémica que posee una molécula o un conjunto de moléculas capaces de producir un efecto citostático e inductor de apoptosis en células de Cáncer de

Cérvix, arrestándolas en diferentes fases del ciclo celular de pendiendo de su estadio, para después inducir las a apoptosis, mediante la regulación de proteínas proapoptóticas como Smac/DIABLO, utilizando concentraciones de extracto menores a las ya utilizadas para otras especies de alga del mismo género, o que otros compuestos ya utilizados con los mismos efectos, Además, el extracto Sabu(Ch)W ha mostrado ser selectivo y solo tener efecto sobre células tumorales mientras que estimula la activación y proliferación de Linfocitos de Sangre Periférica Humana , por lo cual se estaría discutiendo una acción dual por parte de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*.

Conclusión

- El extracto de *Sabu(Ch)W* regula positivamente la expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, en células de las líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL, siendo esta regulación más evidente a las 36 horas tanto para CALO como para INBL.
- La concentración necesaria para llevar a cabo el proceso de inducción a muerte por apoptosis es menor para la línea celular INBL que para la línea celular CALO.
- Se requiere de una concentración menor de *Sabu(Ch)W* para llevar a cabo un efecto proapoptótico, con respecto a las concentraciones utilizadas actualmente de otros extractos de especies del mismo género o incluso que el fucoidan o heterofucoidan.

Perspectivas

- Caracterizar químicamente la Fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*.
- Evaluar la presencia de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO.
- Probar el extracto de *Sabu(Ch)W* en líneas celulares de Cáncer de Pulmón u otros tipos de Cáncer donde el ARNm de Smac/DIABLO esta disminuido.

Apéndice

Condiciones utilizadas en la técnica de RT-PCR

a. Retrotranscripción

Para la realización de dicho estudio se partió de 2µg de ARN total para todas las muestras (controles y muestras cultivadas en presencia del extracto). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$1\mu\text{g} / \mu\text{l} = [(\text{Absorbancia } 260)(\text{Volumen de la disolución})(40)]/1000$$

Donde:

Absorbancia 260: lectura dada por cada muestra en el biofotómetro.

Volumen de la disolución: se utilizó una dilución 4:196 en un volumen de 200µl.

40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/ml del biofotómetro.

Teniendo los cálculos de todas las muestras, y partiendo de 2µg de ARNm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (RX), (Tabla 8). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplica por el número total de reacciones que se requirieron (3 controles y 3 tratamientos) por línea celular.

| Reactivos | 1 Rx µl | 6Rx (controles) µl | 6 Rx (Tratamientos) µl |
|---|------------|--------------------------|------------------------------|
| Amortiguador 5x (Invitrogen, USA) | 5 | 30 | 30 |
| DNTP's (Desoxirribonucleótidos trifosfato) (Invitrogen, USA) 5µM | 1.5 | 9 | 9 |
| Enzima MMLV (RT) (Invitrogen, USA) | 1 | 6 | 6 |
| Oligo DT (PROMEGA, USA) | 1.8 | 10.8 | 10.8 |
| Agua libre de ARNasa (FERMENTAS,USA) | x | x | x |
| Muestra 2µg/ml) | X | x | x |
| Volumen Total | 20 | 120 | 120 |

Tabla 8. Condiciones para RT. Muestra las cantidades de los reactivos utilizados para realizar la RT de las muestras.

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren para cada línea celular tanto de controles como ensayos con estímulo (Tabla 9), se realizó lo mismo, para cada primer utilizado en el presente trabajo (β -actina, Smac/DIABLO).

| REACTIVOS | 1 Rx | 12 Rx | 12 Rx |
|--|------|----------|-------------|
| | | B-actina | Smac/DIABLO |
| Amortiguador 5X Green (PROMEGA,USA) | 6 | 42 | 42 |
| DNTP's 10Mm (INVITROGEN,USA) | 0.8 | 9.6 | 9.6 |
| Enzima GoTaq Polimerasa (INVITROGEN,USA) | 0.15 | 1.8 | 1.8 |
| Primer (sentido) (UNIPARS,S.A.) | 1 | 12 | 12 |
| Primer (Antisentido) (UNIPARS,S.A.) | 1 | 12 | 12 |
| Agua libre de ARNasas (FERMENTAS,USA) | 7.05 | 84.6 | 84.6 |
| Muestra de ADNc | 4 | 48 | 48 |
| Volumen Total | 20 | 240 | 240 |

Tabla 9. Condiciones para cada reacción en la técnica de PCR.

REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS.

Soluciones para cultivo

- RPMI – 1640 /10% SFB
- Solución fisiológica de verseno
- Solución de fosfatos (PBS)

Reactivos extracción ARN Total

- Trizol (invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H₂O inyectable
- H₂O libre de ARNasas

Reactivos retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Promega)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Promega)
- DNTP 5Mm (Invitrogen)
- Oligo dt (Promega)
- H₂O libre de ARNasas (Fermentas)

Reactivos (PCR)

- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)
- DNTP's 10 mM (invitrogen)
- Enzima Go Taq ADN Polimerasa 5 u/l (Promega)
- Primers: β -actina (1:5), Smac/DIABLO (1:5) (Unipars S.A.)
- H₂O libre de ARNasas (Fermentas)

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga blue/yellow 6x (promega)
- Bromuro de etidio

Preparación de Reactivos y Soluciones

○ *Desactivación del suero fetal bovino (SFB)*

El suero fetal bovino (GIBCO) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño maría a 57 °C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular

○ *DNTPs 10 Mm (mix)*

Todos los nucleótidos se encuentran a una concentración de 100mM. De los cuales se toman las siguientes cantidades:

- A 100µl (Invitrogen S.A de C.V, México)
- G 100µl (Invitrogen S.A de C.V, México)
- T 100µl (Invitrogen S.A de C.V, México)
- C 100µl (Invitrogen S.A de C.V, México)

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de ARNasas para obtener 1 ml a una concentración de 10 Mm.

○ **TBE 10 X**

- Tris Base 108 g (Sigma Chemical Co.U.S.A)
- Ácido Bórico 55 g (Sigma Chemical Co.U.S.A)
- EDTA 0.5 M 40 ml (Sigma Chemical Co.U.S.A)

Se lleva a 1000 ml con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

○ **TBE 1X**: Tomar 50 ml de TEB 10X y diluirlo en 450 ml de agua destilada.

○ **TBE 0.5X**: Tomar 250 ml de TBE 1X y diluirlo en 250 ml de agua destilada.

○ ***Solución Fisiológica de Verseno***

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

- Tris base 3.04 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de Sodio 8.00 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.04 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Etilen-díamen-tetra-acético (EDTA) 0.40 g (Sigma chemical Co.U.S.A)

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

○ *Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)*

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

- Cloruro de Magnesio 0.10 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de Calcio 0.10 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de Sodio 8.00 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de Potasio 0.20 g (Sigma chemical Co.U.S.A)

Se disuelven en 800 ml de agua bidestilada para después ajustar el pH a 7.2 – 7.4 utilizando HCL 8N y se afora a un volumen de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de auto clave a 20 lb durante 20 min, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento de uso.

Nota: El cloruro de magnesio y de Calcio solo se agregan si se requiere de un PBS enriquecido, para el mantenimiento de las células no se agregan estos 2 reactivos.

Referencias

- ❖ Amico, V., Cunsolo, F., Neri, P., Piatelli, M. 1988. Antimicrobial tetraprenyltolquinolderivatives from *Cystoseria Spinosa* var *Squarrosa*. *Phytochemistry* 27 pp 1327-1331
- ❖ Arnt C. R., Chirean M.V, Heldebrant MP, Gores J, Kaufmann SH. 2002. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and Ciap1 in situ. *J Biol Chem* 277 (46). Pp 44236-44243.
- ❖ Baker J.t. 1984. Modern Drug Research: The potencial and the problems of Marine Natural Products. En: *Natural Products and Drug Development*. Alfred Benzon Symposium 20. Ed. P Krogsgaard-Larsen, S Brogger Christensen, H. Kotod. Munksgard. Copenhagen pp.139-163.
- ❖ Baker J.T. 1984^a. Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. *Hydrobiologia*. Pp 29-40.
- ❖ Camargo C., Wiesner C., Diaz M., Tovar S. 2004. El Cáncer Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Ministerio de la Proteccion Social. Instituto de Cancerologia E.S.S. Republica de Colombia. Pp 67: 8
- ❖ Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S y Anderson K C .2003. JNK-dependent release of mitochondrial protein Smac during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* Pp:17593-17596. .
- ❖ Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. 2000. Robbins Patología Estructural Funcional, 6^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000: 5-45.
- ❖ Cotter, Thomas G .2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer* Pp. 9, 501-507.

-
- ❖ Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer .2004. Cell death: critical control points. *Cell* Pp. 116, 2, 205-219.
 - ❖ De Lara, Issasi. 1991. Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas, UAM.1 Hidrobiología, pp 21-28.
 - ❖ Du Ch, Fang M, Li Y, Li L y Wang X .2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
 - ❖ Ellya Sinurat and Endar Marraskuranto. 2012. Fucoïdan from Brown seaweed and its bioactivity. *Squalen*. Vol. 7. No. 3. Pp. 131-138.
 - ❖ Faulkner, D.J. 1993. Academic Chemistry and the discovery of bioactive marine natural products. *Marine Biotechnology*, vol. 1. Edit. David H. Attaway y Oskar R. Zaborsky. Plenum Press, New York N.Y. pp 471.
 - ❖ Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*; 73: 1907-1916.
 - ❖ Fu J Jin Y. y Arend L J. 2003. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of XIAP. *J Biol Chem* 278 Pp. 52660-52672.
 - ❖ Fu J, Jin Y y Arend L J .2003. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of XIAP. *J Biol Chem* Pp. 52660-52672.
 - ❖ Glombitza K. W., Wegner, H. S., Schulten, H. R. 1994 Antibiotics from algae. Phlorotannins from the brown alga *Cystoseira granulata*. *Pianta Medica* No.2 pp 116-120.
 - ❖ Gonzalez, G. J. 1992. Flora ficológica de México: Concepciones y estrategias para la integración de una flora ficológica nacional. *Ciencias*, No. Especial 6 pp 13-39, 6 Nov

-
-
- ❖ Guimares, Cinthya Assunca and Linden Rafael. 2004 Programmed cell death Apoptosis and alternative deathstyles *Eur. J. Biochem*; Pp. 271:1638–1650.
 - ❖ Hanahan D, Weinberg R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generati3n. *Cell* 144 vol. 5. Pp 646-674.
 - ❖ Heinz. A. H. 1979. Marine Algae and their products and constituents in Pharmacy . Marine algal Pharmaceutical Science. Heinz . A.H., Tore L., Yukin T. Ed., Walter de Gruyter, Berlin, New York.N.Y: pp 25-34
 - ❖ Hong Ye, Keqi Wang, Chuhong Zhou, Jun Liu, Xiaoxiong Zeng. 2008. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the Brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food quemistry*. vol. 111. Pp. 428-432.
 - ❖ Ireland C. B.R Copp, M.D Foster, L.A McDonald, D.C Radisky and J.C Swersey. 1993, Biomedical potencial of marine natural products. IN: Altaway, D.H. and O.r Zaborsky (eds.), *Marine biotechnology*, vol 1, pharmaceutical and bioactive Natural Products, Plenum Press, New York, pp1-43.
 - ❖ J. Stella Mary, P. Vinotha, Andrew M. Pradeep. 2012. Screening for in vitro cytotoxic activity of seaweed, *Sargassun sp*. Against Hep-2 and MCF-7 Cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Vol. 13. Pp 6073-6076.
 - ❖ Jong-Young Kwak. 2014. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar Drugs*. Vol.12. pp. 851-870.
 - ❖ Jord3n J. 2003. Apoptosis muerte celular programada. OFFARM. 3mbito Farmac3utico. Vol 22. N3 6.
 - ❖ K.N. Kim, Y.M. Ham, J. Y. Moon, M. J. Kim, D. S. Kim, W. J. Lee, N. H. Lee and C. G. Hyun. 2009. *In vitro* Cytotoxic activity of *Sargassum thubergii* and *Dictyopteris divaricata* (Jeju Seaweeds) on the HL-60 Tumor cell line. *International Journal of Pharmacology*. ISSN 1811-7775. Pp 1-9.

-
- ❖ K.Zandi, S. Ahmadzadeh, S. Tajbakhsh, Z.Rastian, F. Yousefi, F.Farshadpour, K. Sartavi. 2010. Anticancer activiti of *Sargassum oligocystum*water extract against human cáncer cell lines. European Review for medical and pharmacological sciences. Vol. 14. pp 669-673.
 - ❖ Kajiwara, T, Akakabe, Y., Matusi, K., Kodoma, K, Koga, H., y Nagakura, T. 1997. (+) - (3S,4S) - 3- Butyl - 4 - vinylcyclopentene in brown algae of the genus Dictyopteris. Phytochemistry, Vol. 45, No. 3 pp 529-532.
 - ❖ Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, Jurgensmeier JM: XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. J Exp Med 2003, 198(2):341-347
 - ❖ Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Magheli A, Schrader M, Schostak M, Miller Weikert S. 2008. Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value. Jcancer Res Clin Oncol 134 (5). Pp 543-550.
 - ❖ Koing, G. M., Wright, A.D. y Sticher, O. 1991. Diterpenes from the brown alga *Dyctiota divaricata*. Phytochemistry, Vol. 30, No. 11 pp 3679-3682.
 - ❖ Konig & Wright. 1993. Algal Secondary Metabolites. Human medicinal agents from plants. A. Douglas Kinghom, Manuel, F Balandrin Ed. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C. pp 282-286.
 - ❖ Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death.Differ: 16: 3-11.
 - ❖ Kroemer G, Levine B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat Rev Mol Cell Biol; 9: 1004-1010.
 - ❖ Kruidering M, Schouten T, Evan GI and Vreugdenhil E .2001. Caspase-mediated cleavage of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-like kinase facilitates neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem*; Pp. 276: 38417–38425.

-
- ❖ Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; Pp.171:4672-9.
 - ❖ Silva Costa, Silva Telles, Medeiros Oliveira, Duarte Barreto Nobre, Dantas-Santos, Barros Gomes Camara, Santos Pereira Costa, Almeida-Lima, Fagundes Melo-Silveira, López Albuquerque, Lisboa Leite and Oliveira Rocha. 2011. Heterofucan from *Sargassum filipéndula* Induces Apoptosis in Hela cells. Vol. 9. Pp 603-614.
 - ❖ Leyton, L. and A. F. Quest .2004. Supramolecular complex formation in cell signaling and disease: an update on a recurrent theme in cell life and death. *Biol Res*; Pp. 37: 29-43.
 - ❖ Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG: 2004. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science*, 305(5689):1471-1474
 - ❖ Lizarbe A. 2007. El suicidio y la muerte celular. Real Academia De Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Vol.101, Nº 2.
 - ❖ López Saavedra y Lizano Soberón. 2006. Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina. *Cancerologia 1*. Pp 31-35.
 - ❖ Luna N. 2012. Determinación de las fases del ciclo celular de líneas de Carcinoma de Cérvix CALO E INBL cultivadas en presencia del extracto de *Sargassum hystrix buxifolium* Chauvin. Tesis de Licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza. Pp. 13-24, 32-45.
 - ❖ Martínez M., Morán J., Maldonado V. y Meléndez J. 2004. Smac/DIABLO y su papel en la regulación de la apoptosis. *REB*. Pp. 23 ,2, 64-70.
 - ❖ Massagué J. 2009. Evolución y metástasis de Cáncer. Dossier Científico. SEBBM 160. Junio. Pp. 22.
 - ❖ Milkova T., Talev, G., Christov, R., Dimitrova • Konaklieva, S., y Popov, S. 1997. Sterols and volatiles in *Cystoseira barbata* and *Cystoseira crinita* from the Black Sea. *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 1 pp 93-95

-
- ❖ Mizukawa K, Kawamura A, Sasayama T, Tanaka K, Kamei M, Sasaki M, Kohmura E. 2006. Synthetic Smac peptide enhances the effect of etoposide-induced apoptosis in human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol*, 77(3):247-255
 - ❖ Mizutani Y, Nakanixhi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubaraa H, Mikami K, Okihara K, Kawauchi A, Bonavida B. Miki T. 2005. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and prognostic significance. *J Clin Oncol* 23 (3). Pp 448-454.
 - ❖ Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl.J. Med.* 348 (6): 518–27
 - ❖ Murakami, S., Takemoto, T. y Zhimizu, Z. 1954. Studies of the effective principles of *Digneia simplex*. *Chem. Abstr.* 48 ; 12676
 - ❖ Muruyama, K., Kimura, S., Fujimoto, K , Kida, N. 1991. Antioxidant from sea weed for food and cosmetic preparation. *Chemical Abstracts.* Vol.114 pp 162793k.
 - ❖ Negamine T., Hayakawa K., Kusakabe T., Takaba H., Nakazato K.,HHisanaga E. 2009. Inhibithor effect of fucoidan on Huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. *Journal Nutrition and Cáncer.* Vol 16 No. 3 pp 340-347.
 - ❖ New, Harold, C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* Vol. 257 pp 1064-1068
 - ❖ Norbury CJ, Zhivotovsky B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*; Pp 2797-808.
 - ❖ Nouerddine, B., Danielle , P., Puel, D. y Corrado, T. 1993. Citotoxic diterpenoids from the brown alga *Oilophus Ugufatos*. *Journal of Natural Products.* Vol. 56 No. 10 pp 1747-1752
 - ❖ Organización Mundial de la Salud (2008). La lucha contra el cáncer tiene que ser una prioridad del desarrollo. Documento revisado el 23 de diciembre de 2010, de: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2008/s09/es/index.html>.

-
- ❖ Organización Mundial de la Salud (2009). Salud de la mujer. Nota descriptiva No.334, Noviembre de 2009. Documentos revisado el 6 de enero de 2011, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/es/index.html>.
 - ❖ Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). Cáncer. Nota descriptiva No. 297. Documento revisado el 7 de enero de 2011, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
 - ❖ P. Vengadesan, S. Ahmed John. 2013. GC-MS Determination of bioactive compounds of *Sargassum wightii* from the mandapam coast tamil nadu, India. International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences 3 (3). Pp 129-133.
 - ❖ Pai-An Hwang, Chwen-Herng Wu, Shu-Yun Gau, Shih-Yung Chien, and Deng-Fwu Hwang. 2010. Antioxidant and immine-stimulanting activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum Hemiphyllum*. Journal of marine Science and Tecnology. vol. 18, No. 1 pp 41-46.
 - ❖ Pesando D y B. Caram. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. Introduction to Applied Phycology. Pp. 3-26.
 - ❖ Pham Duc Thinh, Roza V. Menshova, Scetlana P.Ermakova, Stanislav D. Anastatyuk, Bui Minh Ly and Tatiana N Zvyagintseva. 2013. Structural Chararacteristics and anticancer activity of fucoidan from the Brown alga *Sargassum mcclurei*. Mar Drugs. Vol.11. pp 1456-1476.
 - ❖ Ramírez Agudelo, M., Rojas López, M. 2010. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. Iatreia, Junio-Sin mes, 166-177.
 - ❖ Roberts D L, Merrison W, MacFarlane M y Cohen G M. 2001. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. J Cell Biol Pp.153:221-227.
 - ❖ Roberts D L., Merrison W, MacFarlane M y Cohen G M . 2001. The inhibitor of a opotosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. J Cell Biol 153 Pp. 221-227.

-
- ❖ Sánchez y Arboleda. 2008. Mitocondria y Muerte celular. NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomedicas. Vol. 6. N° 10, pp 193-197.
 - ❖ Santiago Crur R. 2014. Determinación del ARNm para *Citocromo c* en líneas celulares de CaCu, cultivadas en presencia del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin)M. J. Wynne. Tesis de Licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza.
 - ❖ Savill J, Fadok V .2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*; Pp. 407: 784-788.
 - ❖ Sekimura A, Konishi S, Mizuno K, Kobayashi Y, Sasaki H, Yano M, Fukai I, Fuji Y. 2004. Expression of Smac/DIABLO is novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep.* 11 (4). Pp 797-802.
 - ❖ Sierra E. 2011. Participación de caspasas 8 y 12 en la regulación de apoptosis en líneas celulares de cáncer Cérvico Uterino, cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza. Pp.11-18, 38-39.
 - ❖ Siew-Ling Hii, Pooi-yi Choong, Kwan-Kit Woo, Ching-Lee Wong. 2010. Stability Studies of Fucoxanthin From *Sargassum binderi*. *Australian Journal of Basic of Basic and Applied Sciences*, 4 (10). Pp. 4580-4584.
 - ❖ Song Z, Yao X y Wu M 2003. Direct interaction between survivin and Smac is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during Taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* Pp. 23130-23140.
 - ❖ Srinivasula S M, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z y Alnemri E S. 2000. Molecular determinants of the caspase-activating activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275 Pp. 36152-36157.
 - ❖ Suárez Castillo, A. N., R. Riosmena Rodríguez, M. Rojo Amaya, J. Torre Cosío, R. Rioja Nieto, A. Hudson Weaver, T. Pfister, G. Hernández Carmona, G. Hinojosa Arango, O. Aburto Oropeza, A L. Figueroa Cárdenas. 2013. Bosques de algas

pardas en el golfo de California: *Sargassum*, un hábitat esencial. CONABIO. Biodiversitas, 108:12-16

- ❖ Tatyana A. Kuznetsova, Natalya N. Besednova, Larisa M. Somova and Natalya G. Plekhova. 2014. Fucoidan extracted from *Focus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia. Mar Drugs. Vol.12. pp. 886-898.
- ❖ Tringalli, C., Oriente, J., Piatelli, M., Ceraci, C., Nicolosi, G., y Breitemaeir, E. 1988. Antimicrobial crenuladial from the brown alga *Dilophus ligulatos*. Canadian Journal Chemistry No. 66 pp 2799-2802.
- ❖ Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, Silke J, Connolly L M, Reid G E, Moritz R L, Simpson R J y Vaux D L .2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell Pp. 102:43-53.
- ❖ Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chundururu SK, McKinlay M. 2007. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF alpha, dependent apoptosis. Cell 131 (4). Pp 682-693.
- ❖ Zaldívar Lelo de Larrea Guadalupe, Martín Molina. Francisco, Sosa Ferreyra Carlos Francisco, Ávila Morales Javier, Lloret Rivas Miguel, Román Lara Monserrat, Vega Malagón Genaro. 2012. Cáncer Cérvicouterino y virus del papiloma humano.
- ❖ Zertuche, G.J. 1993. Situación actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en América Latina y el Canteo. Documento de campo No. 13 del programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia. Editor. Zertuche González pp 47-54
- ❖ Zhang EX, Yu Lj. 1997. Studies on polysaccharide from *Sargassum thumbergh* for its ability to scavenge active oxygen species chin. J. Mar Drugs 16 pp 1-4.
- ❖ Zhouyao, Z., Min, J., Yang, J., Pawliszyn, N. 1994. Solid-Phase Microextraction. Analytical Chemistry, Vol. 66, No. 17 pp 134-138 Sept 1.