



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS
COMPUESTOS CAPA Y LECTINAS EN LA LÍNEA
CELULAR HELA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

LARISA ANDREA GONZÁLEZ SALCEDO

**ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA
ARCEO**

**CO-ASESOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA
TOVAR**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio del efecto citotóxico de los compuestos CAPA y lectinas en la línea celular HeLa.

Que presenta la pasante: Larisa Andrea González Salcedo
Con número de cuenta: 306524972 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Andrés Romero Rojas	
1er. SUPLENTE	M.C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mltr*

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto **PAPIIT IT202512** titulado “Estudio antigenotóxico, antiproliferativo e inhibidor de lesiones precancerosas de un grupo de análogos del éster fenético del ácido cafeico (CAPE) desarrollados en la FES-Cuautitlán”. La responsable del proyecto es la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

La alumna de la carrera de Bioquímica Diagnóstica, Larisa Andrea González Salcedo agradece la beca-tesis otorgada por el proyecto **PAPIIT IT202512**.

Créditos

Los compuestos LQM 731 y 738 fueron desarrollados y sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano

El trabajo experimental fue desarrollado en el laboratorio 9 de Toxicología Celular de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán con la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, en colaboración con el laboratorio 4 de Morfología Veterinaria y Biología Celular a cargo del Dr. Carlos Gerardo García Tovar.

Dedicatorias

A ti papá por enseñarme los valores que rigieron tu vida y que se siguen esparciendo, por tu visión crítica que espero poder alcanzar, donde sea que estés espero ser un orgullo para ti.

A ti mamá por tus consejos y tu ejemplo en salir adelante, por tus muestras de calidez humana y deseo de mejorar el mundo que te rodea.

A ti hermano por esas noches de pláticas y de reflexiones.

Agradecimientos

A la UNAM por haberme dado todo lo que tengo y por permitirme ser parte de ella.

A mis amigos por su apoyo y cariño en estos años de conocernos y el ofrecido en este tiempo de trabajo. Gracias Ilse e Ivan por sus ánimos, Alejandra por compartir traumas y penas, Cin por ese apoyo y risas. Gracias Cy por tus consejos de vida y Sherry por tus consejos sobre ciencia. Gracias Rem por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A aquellas personas que me enseñaron lo que quiero y lo que no quiero en mi vida.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por su paciencia, su apoyo y conocimiento a lo largo de la carrera y en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por sus palabras de aliento y su comprensión, por su apoyo en esos momentos de estancamiento.

A la profesora Rosalba Bonilla Sánchez por compartir su conocimiento, su entusiasmo y amor a la docencia.

A la M. en C. Maritere Domínguez Rojas por su apoyo y sus consejos, por su pasión a la ciencia y la docencia.

A mis sinodales, la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, QFB Rosalba Bonilla Sánchez, Dr. Andrés Romero Rojas, M. en C. Maritere Domínguez Rojas y Dra. Dolores Molina Jasso por su tiempo, su comprensión y apoyo en la revisión y mejora de este trabajo.

Al Dr. Francisco y al Dr. José Luis por su apoyo y disposición para resolver dudas y problemas que iban surgiendo.

A la M. en C. Cynthia Carolina Estanislao Gómez por su apoyo y asesoría en la realización de la técnica de MTT.

A mis compañeros del L-521 por su apoyo a lo largo de este proyecto.

A Izaret y Ambar por su amistad, apoyo y compañía a lo largo de la carrera.

Índice

Contenido

Créditos	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Abreviaturas	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xi
I. Resumen.....	1
II. Marco teórico.....	2
1. Generalidades	2
2. Muerte celular programada	3
2.1 Apoptosis.....	3
2.2 Autofagia	5
2.3 Apoptosis y cáncer	7
2.3.1 Regulación transcripcional y traduccional	8
2.3.2 Inducción de expresión de proteínas antiapoptóticas.....	8
2.3.4 Supresión de la expresión de proteínas proapoptóticas	8
2.3.5. Regulación post-traduccional.....	9
2.4 Autofagia y cáncer.....	10
2.5 Autofagia y apoptosis.....	11
2.6 Uso de autofagia como nueva terapia anti-cáncer	12
3. Ester Fenetílico de Ácido Caféico (CAPE)	13
3.1 Propóleo	13
3.2 CAPE	14
3.3 CAPA.....	18
3.4 CAPE y CAPA en México	19
4. Lectinas.....	22
4.1 Proteínas inactivantes de ribosoma tipo II.....	23

4.1.2. Lectinas de muérdago (<i>Viscum album</i>).....	23
4.2 Lectinas RAB y ricina.....	24
4.3 Lectinas GNA	24
4.4 Lectinas de leguminosas.....	25
4.1 Lectinas de <i>Vicia faba</i>	27
4.2 Lectinas de <i>Pisum sativum</i>	27
5. Ensayo de viabilidad celular	28
5.1 Ensayo de reducción de tetrazolio	29
5.2 Ensayo de MTT	29
III. Justificación	30
IV. Objetivos	31
V. Metodología.....	32
VI. Resultados y Discusión.....	34
VII. Conclusiones	44
VIII. Perspectivas a futuro	45
IX. Referencias.....	46

Abreviaturas

2-AAF,	2-acetil aminofluorina
5-LO,	5-lipoxigenasa
APAF-1,	<i>Adaptor protein apoptotic protease-activating factor 1</i> : Factor 1 activador de proteasas adaptador proteico apoptótico
APC,	Adenomatous polyposis coli
bCSC,	<i>breast cancer stem cells</i> : células basales de cáncer de mama
CAPA,	Caffeic acid phenethyl amide, amida fenética del ácido caféico
CAPE,	Ester Fenético del Ácido Caféico
CI₅₀,	Concentración inhibitoria 50
CM-1,	Lectinas de muérdago chino
ConA,	Concanavalina
CREF,	<i>cloned rat embryo fibroblasts</i> : fibroblastos de embrión de rata clonados
DEN,	Detilnitrosamina
DISC,	<i>Death-inducing signal complex</i> : Complejo señalizador de muerte celular
DMSO,	Dimetilsulfóxido
EAC,	Ehrlich ascites carcinoma
EpPs,	Extracto proteico de <i>Pisum sativum</i>
EpVF,	Extracto proteico de <i>Vicia faba</i>
FADD,	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> : Proteína asociada a Fas con dominio de muerte
GGT⁺,	γ -Glutamyl transpeptidasa-positiva
GST,	<i>Glutathione S-transferase</i> : glutatión S-transferasa
HO-1,	<i>Heme oxygenase-1</i> , hemo oxigenasa 1
HTS,	<i>High Throughput Screening</i> , Cribado farmacológico de alto rendimiento
HUVEC,	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> : de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano
ICH,	Intercambio de cromátidas hermanas
IM,	Índice mitótico
IR,	Índice de replicación
MAPK,	<i>mitogen-activated protein kinase</i> : proteína cinasa activada por mitógeno
MMC,	Mitomicina C
MMP-9,	Metalopeptidasa 9 de matriz
MMPs,	<i>Matrix Metalloproteinases</i> : Metaloproteinasas de matriz
MMS,	mamoesferas
MMS,	Metilmetanosulfonato
MOMP,	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> : Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
mTOR,	<i>mammalian target of rapamycin</i> : Blanco mamífero de rapamicina

mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*: complejo 1 de blanco mamífero de rapamicina

Nrf2, factor 2 relacionado a NF-E2

PAS, *Phagosome Assembly Site*: Sitio de ensamble del fagosoma

PC-3, *Prostatic Cancer-3*, Cáncer de próstata 3

PCD, *Programmed cell death*: – Muerte celular programada

PCL, *Polygonatum cyrtonema lectin*, Lectina de *Polygonatum cyrtonema*

PHA, Fitohemaglutinina

PI3K, *Phosphatidylinositol 3-kinase*: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PIP2, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

POL, *Polygonatum odoratum lectin*, Lectina de *Polygonatum odoratum*

PUMA, *p53 upregulated modulator of apoptosis*

RHEB, *Ras homologue enriched in brain*: Homólogo de Ras enriquecido en cerebro

RIPsII, Proteínas inactivantes de ribosoma tipo II

ROS, *Reactive oxygen species*: Especies reactivas de oxígeno

SCGE, *Single cell gel electrophoresis*: Electroforesis unicelular en gel

SFL, *S. flavescens lectin*, Lectina de *S. flavescens*

SMAC, *Second mitochondria-derived activator of caspases*: Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria

TGF-β, *Transforming growth factor beta*: factor de crecimiento transformante beta

TNF-α, *Tumor necrosis factor alpha*: factor de necrosis tumoral α

TSC2, *Tuberous sclerosis complex 2*: complejo 2 de esclerosis tuberosa

UVRAG, *Ultraviolet radiation resistance associated gene*: Gen asociado a la Resistencia de radiación ultravioleta

VAC, *Viscum album var coloratum agglutinin*, Aglutinina de *Viscum album*

VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*: Factor de crecimiento endotelial vascular

XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*: Proteína inhibidora de apoptosis ligada al X

Índice de figuras

<i>Figura 1. Modelo integrado de las vías de señalización de apoptosis.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Modelo integrado de vías de señalización de autofagia</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. Esquema general de la autofagia.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 4. Representación de las interconexiones moleculares entre autofagia y apoptosis.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Estructura molecular de CAPE (Domínguez, 2008).....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6. Síntesis de CAPA y análogos fluorados (Yang et. al., 2010).....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 7. Síntesis de CAPE y análogos (Boudreau et. al., 2012).....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 8. Estructura del derivado NAO1 (Paniagua, 2010).</i>	<i>20</i>
<i>Figura 9. Estructura del LQM 731.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 10. Estructura del LQM 738.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 11. Estructura del LQM 755.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 12. Resultados del efecto citotóxico del LQM 731 disuelto en 100% de DMSO en células HeLa mediante la prueba de MTT.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 13. Resultados del efecto citotóxico del LQM 731 disuelto en 50% de DMSO en células HeLa mediante la prueba de MTT.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 14. Resultados del efecto citotóxico del LQM 738 disuelto en 100% de DMSO en células HeLa mediante la prueba de MTT.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 15. Resultados preliminares del efecto citotóxico del fármaco Lyzthel en células HeLa mediante la prueba de MTT.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 16. Resultados del efecto citotóxico del fármaco Lyzthel en células HeLa mediante la prueba de MTT.</i>	<i>41</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del LQM 731 disuelto en 100% DMSO.</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 2. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del LQM 731 disuelto en 50% DMSO.</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 3. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del LQM 738 disuelto en 100% DMSO.</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 4. Resultados de la prueba preliminar de viabilidad celular con MTT del fármaco Lyzthel.</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 5. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del fármaco Lyzthel.</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 6. Cl_{50} de los compuestos estudiados.....</i>	<i>41</i>

I. Resumen

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en países en desarrollo. En 2008 se estimaron a nivel mundial 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes (GLOBOCAN, 2012). Uno de los principales problemas en la cura de esta enfermedad radica en los tratamientos, cuya alta toxicidad impide un efecto eficaz y selectivo, donde únicamente las células tumorales sean las afectadas. Por lo tanto, la investigación se ha enfocado en dos ramas: el descubrimiento de moléculas capaces de evitar la transformación de las células, y el desarrollo de fármacos que tengan como blanco única y exclusivamente las células cancerosas en base a las características únicas de ellas en comparación con células normales.

Entre estos fármacos se encuentran dos tipos diferentes: los derivados del Éster Fenético del Ácido Caféico (CAPE) y las lectinas. El CAPE ha presentado una alternativa prometedora como quimioprotector, sin embargo, su complejidad al extraerse ha generado el desarrollo de varias moléculas. Entre ellas se encuentra la línea LQM 700 sintetizada por el Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán. Por otra parte, las lectinas han sido ampliamente estudiadas por su selectividad y diversos efectos apoptóticos. El Lyzthel es un fármaco de lectinas de haba y chícharo obtenidas de especies que se dan en nuestro país, y se espera que este fármaco tenga propiedades citotóxicas en células tumorales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de los compuestos LQM 731, LQM 738 y Lyzthel mediante la prueba de reducción del tetrazolio MTT en la línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino. Para ello, se realizaron pruebas de viabilidad celular de cultivos de células HeLa en placas ELISA, exponiendo las células a los compuestos durante 24 horas. En los ensayos de los LQM 731 y 738, se evaluaron concentraciones de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por compuesto y de 0.167 a 2.664 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Lyzthel. Se evaluaron los resultados obtenidos mediante el programa GraphPad Prism 5 con ANOVA $p < 0.05$.

Se determinó que al evaluar el LQM 731 disuelto en 100% de DMSO no se puede determinar el efecto de daño generado propiamente por el compuesto 731 y el efecto generado por el mismo vehículo, con únicamente la concentración de 2.5 $\text{mg}/\mu\text{l}$ presentando diferencias significativas respecto al control positivo y control de vehículo. Al evaluarse el LQM 731 disuelto en 50% de medio, se observó que hay un efecto citotóxico considerable similar al que se genera con el control positivo con viabilidades celulares de 46.519% hasta de 25.241% a partir de la concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la evaluación del LQM 738 no se observaron diferencias significativas entre el LQM 738 y el control de DMSO lo que dificulta la determinación del daño generado por el compuesto y aquel causado por el vehículo y con sólo la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como no citotóxica. El fármaco Lyzthel presentó porcentajes de viabilidad celular de entre 30 y 40% a partir de la concentración de 1.832 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que muestra una capacidad citotóxica considerable y lo perfila como una alternativa prometedora.

Se obtuvieron las CI_{50} para los compuestos evaluados, obteniéndose de 0.7523 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el LQM 731 a 100% de DMSO y de 7.504 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para este mismo compuesto a 50%. En el caso del resultado para LQM 738, ésta fue de 0.2058 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, la CI_{50} obtenida para Lyzthel fue de 1.549 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

II. Marco teórico

1. Generalidades

El cáncer no es una enfermedad; más bien, es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división. Las células cancerosas se dividen rápida y continuamente, por lo que crean tumores que desplazan a las células normales y finalmente privan a los tejidos sanos de sus nutrientes. Las células de un tumor avanzado pueden separarse de él y viajar a sitios distantes en el cuerpo, donde se establecen y generan el desarrollo de nuevos tumores.

Las células normales crecen, se dividen, maduran y mueren en respuesta a un grupo complejo de señales internas y externas. Una célula normal recibe tanto señales estimuladoras como inhibitoras, y su crecimiento y división están regulados por un equilibrio delicado entre estas fuerzas opuestas. En una célula cancerosa, una o más señales se interrumpen, lo que hace que la célula prolifere a una velocidad anormalmente elevada. A medida que pierden sus respuestas a los controles normales, las células cancerosas pierden su forma y sus límites habituales de manera gradual, y producen finalmente una masa de células anormales; un tumor. Si las células del tumor continúan localizadas, se dice que el tumor es benigno; si las células invaden otros tejidos, el tumor es maligno. Se dice que las células que viajan a otros lugares del cuerpo, donde establecen tumores secundarios, han sufrido metástasis (Pierce, 2009).

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en países en desarrollo. En 2008 se estimaron a nivel mundial 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes. Actualmente el número de casos ha aumentado como resultado del envejecimiento y el crecimiento poblacional, así como la adquisición de algunos hábitos asociados al desarrollo de cáncer como el tabaco, el alcohol, el sedentarismo, la obesidad y la mala alimentación (Jemal et. al., 2011). De acuerdo a estadísticas del 2012, el número de casos nuevos diagnosticados fue de 65 500 hombres y 82 400 mujeres (GLOBOCAN, 2012).

En México, el cáncer ocupa la tercera causa de muerte a nivel nacional, después de enfermedades del corazón y diabetes mellitus, con 73 426 muertes reportadas en 2013. En mujeres, el total de muertes reportadas debido a cáncer fue de 37 361. En los primeros lugares se encontró cáncer de mama con 5 426 defunciones, cáncer cérvico uterino con 3 748 y cáncer de hígado y de las vías biliares intrahepáticas en tercer lugar con 3 102. En el caso de los hombres, la primera causa de muerte asociada a neoplasias es debido a cáncer de próstata con 5 889 de un total de 36 060, mientras que la segunda fue cáncer de la tráquea, de los bronquios y del pulmón con 4 191 muertes (INEGI, 2013).

La quimioterapia del cáncer tiene como finalidad causar una lesión citotóxica letal que detenga el progreso del tumor en tratamiento. El ataque suele dirigirse contra los sitios metabólicos esenciales para la multiplicación celular, por ejemplo, los precursores de purina y pirimidina disponibles para la síntesis de DNA o RNA. Lo ideal es que estos fármacos sólo interfieran con los

procesos celulares únicos de las células malignas. Sin embargo, los fármacos contra el cáncer con los que se cuenta ahora no reconocen de manera específica las células neoplásicas, sino que afectan todas las células que proliferan, tanto normales como anormales. Por este motivo casi todos los agentes antitumorales tienen una curva de dosis y reacción muy inclinada tanto para los efectos tóxicos como para los terapéuticos; en consecuencia es importante ajustar las posologías de los fármacos al estado físico del paciente (Mycek et. al., 2008).

2. Muerte celular programada

Uno de los procesos más importantes que regula el balance entre el crecimiento y muerte celular es la muerte celular programada (PCD, *Programmed cell death*). Este proceso se ha conservado evolutivamente y está altamente vinculado en cáncer, donde las células cancerosas proliferan de forma descontrolada. Existen dos formas de PCD, apoptosis y autofagia, aunque se ha sugerido en base a estudios sobre ciertos procesos necróticos programados, necroptosis (Liu et. al., 2011; Notte et. al., 2011).

Existen diferencias morfológicas entre apoptosis y autofagia. La apoptosis, considerada tipo I de PCD, presenta encogimiento de la célula, *blebbing* de la membrana y ruptura organizada del DNA para formar cuerpos apoptóticos que se fagocitan por células periféricas o fagocitos. Por otro lado, la autofagia, tipo II de PCD, depende de la presencia de autofagosomas, autolisosomas, así como un núcleo celular intacto. Aunque estos procesos tienen características morfológicas y fisiológicas distintas, existe una colaboración intrincada entre ellos. En ocasiones la apoptosis y la autofagia ejercen un efecto sinérgico, cuando en otras, la autofagia es desencadenada sólo cuando hay supresión de apoptosis. Estudios recientes han sugerido que la autofagia y la apoptosis pudieran estar interconectadas y simultáneamente reguladas por el mismo mecanismo en células tumorales. Con estos nuevos avances, recientemente se han utilizado fármacos anticancerígenos que actúen en las vías de señalización implicadas en estos dos tipos de PCD (Liu et. al., 2011).

2.1 Apoptosis

La apoptosis es un programa de suicidio celular que los organismos han desarrollado para eliminar células innecesarias o dañadas del cuerpo. Consiste en una serie de eventos celulares que lleva a la activación de caspasas iniciadoras (Caspasa-2, -8, -9, -10), cisteín proteasas, en respuesta a varios estímulos apoptóticos. Las caspasas iniciadoras escinden y activan los zimógenos de caspasas efectoras (caspasas -3 y -7), resultando en rupturas protelíticas de sustratos celulares específicos y en muerte celular (Fernald et. al., 2013).

La apoptosis se lleva a cabo mediante dos rutas: extrínseca e intrínseca como puede verse en la Figura 1. La vía extrínseca, conocida como vía de receptor de muerte, se desencadena por el receptor de muerte Fas que depende de la iniciación de la combinación entre Fas-L (ligando) y Fas. Con estímulos de muerte, Fas-L se combina directamente con Fas, para formar el complejo de muerte. Después, el complejo Fas-Fas-L recluta a la proteína asociada a Fas con dominio de muerte, FADD (*Fas-associated protein with death domain*) y a la procaspasa-8, agregándose como el complejo señalizador de muerte celular (DISC, *Death-inducing signal complex*). Esto tiene como

resultado la activación de la procaspasa-8, que a su vez desencadena la activación de la caspasa-3 para ejecutar el proceso de apoptosis (Liu et. al., 2011)

En la vía intrínseca, la mitocondria juega un papel fundamental. Cuando la célula detecta estímulos extracelulares como citotoxinas o rayos UV o X, o señales intracelulares como daño al DNA e inestabilidad nuclear, se inicia la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, *Mitochondrial outer membrane permeabilization*). MOMP desencadena la liberación de un grupo de proteínas proapoptóticas, incluyendo citocromo c y un segundo activador de caspasas derivado de mitocondria (SMAC, *Second mitochondria-derived activator of caspases*) del espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma. En el citoplasma, el citocromo c se une al factor 1 activador de proteasas adaptador proteico apoptótico (APAF-1, *Adaptor protein apoptotic protease-activating factor 1*) para formar el apoptosoma, un complejo activador de caspasa 9. SMAC aumenta la activación de caspasas inducidas por citocromo c al unirse y neutralizar la proteína inhibidora de apoptosis ligada al X, (XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), un inhibidor de las caspasas 3, 7 y 9 (Liu et. al., 2011; Fernald et. al., 2011)

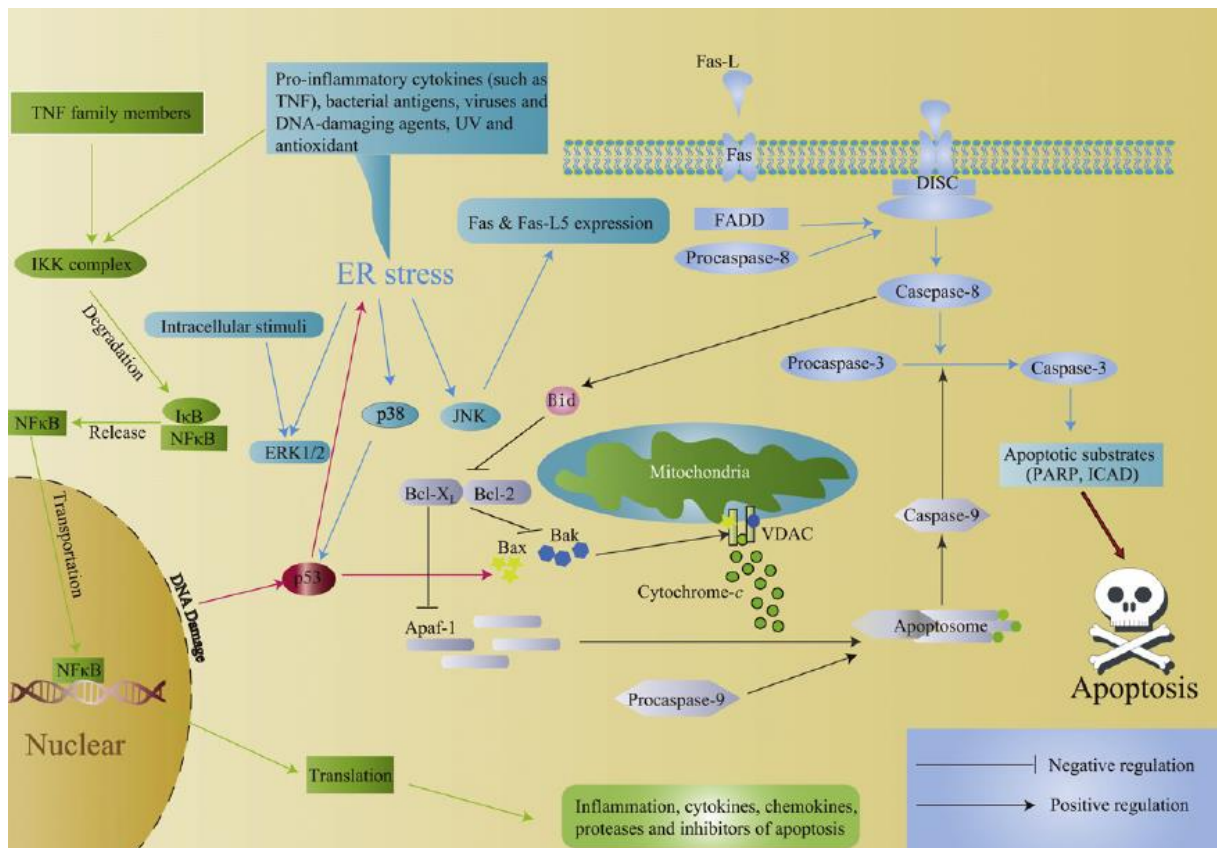


Figura 1. Modelo integrado de las vías de señalización de apoptosis. Consiste en la vía del receptor de muerte de color cian y la vía dependiente de mitocondria de color gris. Los sustratos color verde participan en la vía de señalización NFκB y los cuadros azules representan los componentes asociados con estrés del retículo endoplásmico. Otros reguladores involucrados en p53 y Bid se muestran conectando diferentes vías en esta red (Liu et. al., 2011).

2.2 Autofagia

La autofagia es un proceso fisiológico de autodigestión, en el que se degradan proteínas y organelos dañados. Sin embargo, en situaciones específicas de estrés, la autofagia participa en la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular. En este proceso, las proteínas citoplasmáticas, organelos y otros componentes celulares son rodeados por autofagosomas, que forman autolisosomas al unirse con lisosomas, resultando en la degradación de los compuestos por hidrolasas. Se ha establecido a nivel molecular el vínculo entre la autofagia y la muerte celular, como la interacción de BCL-2 y Beclin-1 (Amelio et. al., 2011).

Si bien, la autofagia es un proceso que se considera un mecanismo de supervivencia ya que permite a las células soportar estrés como falta de nutrientes, hipoxia e infección por patógenos, se ha observado que en ocasiones puede llevar a muerte celular. Cuando el estrés es muy severo o se ha sostenido durante un periodo de tiempo largo, la autofagia participa en la muerte celular. Existen tres tipos de autofagia, los cuales utilizan diferentes mecanismos para la degradación de componentes del citosol; micro-autofagia, autofagia mediada por chaperones y la macro-autofagia. Esta última es la principalmente considerada para su vinculación con muerte celular y cáncer (Notte et. al., 2011).

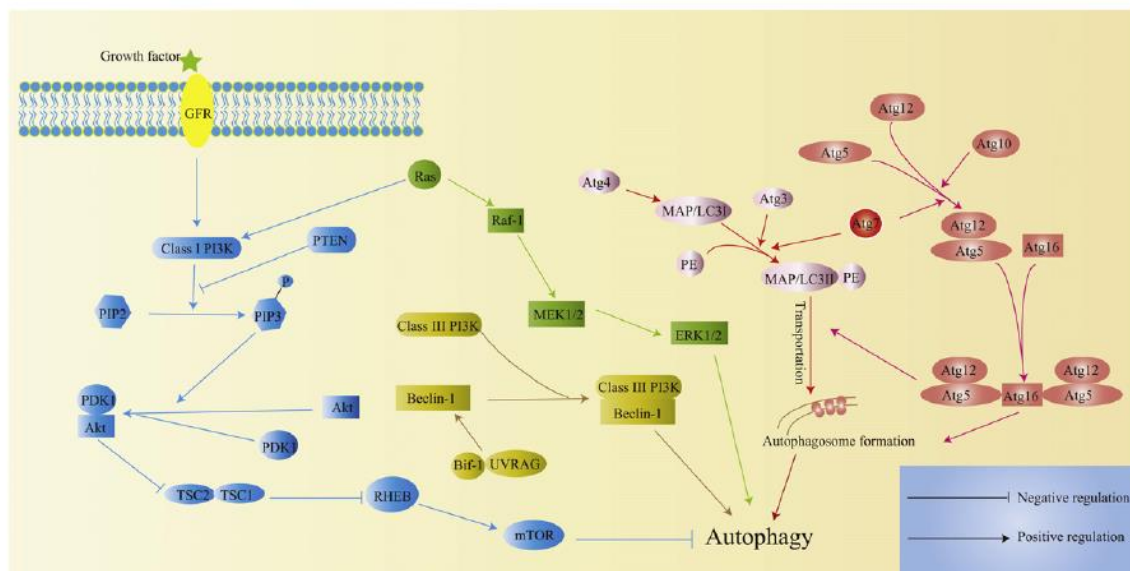


Figura 2. Modelo integrado de vías de señalización de autofagia. El eje PI3K/Akt/mTOR se encuentra de color azul, el marco regulatorio asociado a Beclin-1 está en amarillo, la vía RAF1/MEK1/2/ERK1/2 está en verde. Las dos vías de conjugación similares a ubiquitina, el sistema de unión a Atg-12 y el sistema modificante LC3 están en rojo claro y rosa, respectivamente. Atg7, de color rojo, es un regulador de ambos sistemas similares a ubiquitina. (Liu et. al., 2011).

La autofagia es un proceso altamente regulado como se observa en la Figura 2, con diversas vías de señalización que convergen en un punto específico: en la serin/treonin protein cinasa, mTOR (*mammalian target of rapamycin*: blanco mamífero de rapamicina). El mTOR es parte de un eje, el PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*, Fosfatidilinositol 3-cinasa)/Akt (*serine/threonine kinase*)/mTOR. Después de la unión entre factores de crecimiento extracelulares y sus receptores,

PI3K es activado para promover la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). Esto permite la formación del complejo Akt-PDK1 y la activación de Akt.

Akt fosforila e inactiva la subunidad 2 del complejo TSC2 (*Tuberous sclerosis complex*, complejo de esclerosis tuberosa). TSC2 es una proteína GTPasa-activante para RHEB (*Ras homologue enriched in brain*, Homólogo de Ras enriquecido en cerebro). Esta inactivación de TSC2 permite la acumulación de RHEB en su estado de unión a GTP, y por tanto activa a mTOR, desencadenando así la autofagia (Liu et. al., 2011). Existen diferentes proteínas Atg que están involucradas en el ensamble de la maquinaria de autofagia. Entre estas moléculas la proteína Beclin-1, un miembro de la familia de BCL-2 y el homólogo en mamíferos del gen de levadura Atg6, es de suma importancia. Cuando se libera de su unión con BCL-2 a nivel del retículo endoplásmico, Beclin-1 se asocia con la PI3K de clase III Vps34, UVRAG (*Ultraviolet radiation resistance associated gene*, Gen asociado a la Resistencia de radiación ultravioleta) y otras proteínas que se requieran para la nucleación de vesículas de autofagia (Notte et. al., 2011).

Posteriormente, la elongación del autofagóforo requiere de dos sistemas similares a ubiquitina. El primero conjuga Atg5 al Atg-12 similar a ubiquitina mediante las actividades similares a E1 y E2 de Atg7 y Atg10. Atg5-Atg12 conjuga oligomerizos y se localiza en la membrana externa de la membrana gastada. El otro sistema une a Atg8 (también llamado LC3) que ha sido escindida por Atg4 en fosfatidiletanolamina, que lleva a la isoforma de LC3-II. LC3-II se recluta en las membranas internas y externas de la vesícula que se está formando. Ambos complejos se requieren para la elongación membranal y su fusión a una vesícula cerrada. Una vez completo el autofagosoma, se une a un lisosoma, este proceso se observa en la Figura 3 (Notte et. al., 2011; Amelio, et.al.,2011).

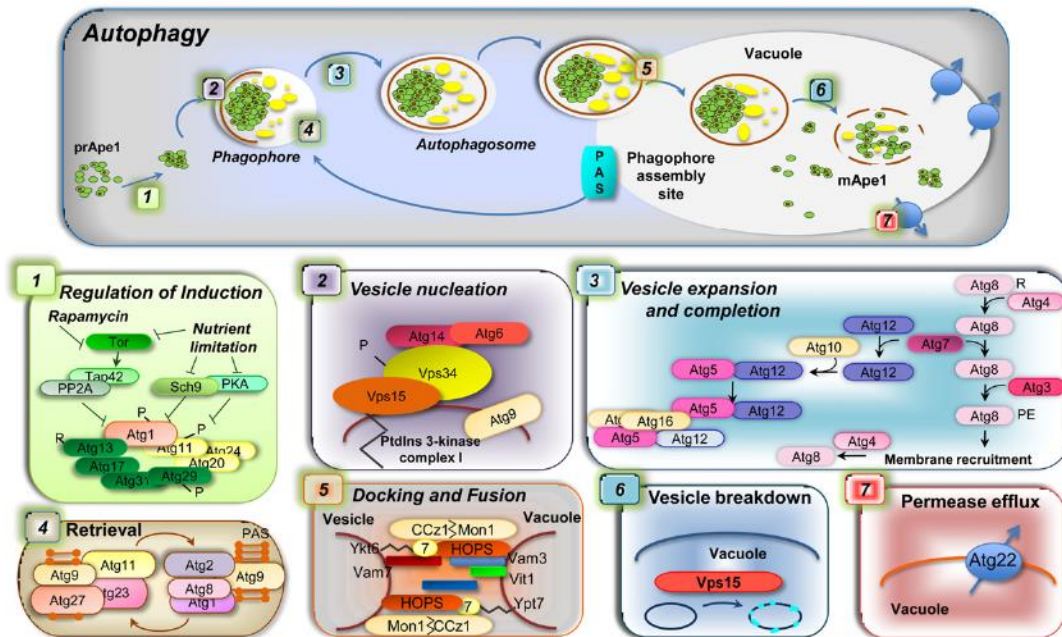


Figura 3. Esquema general de la autofagia. La autofagia se divide en siete pasos: 1) Inducción, 2) nucleación de la vesícula, 3) expansión y término de la vesícula, 4) recuperación, 5) fusión, 6) ruptura de la vesícula y 7) flujo de salida. 1) Regulación de la inducción. La activación de autofagia por falta de nutrientes o de factores de crecimiento está mediada principalmente por la inhibición de Tor. Se forma el complejo de Atg1-Atg13 río debajo de la inhibición de Tor. 2) Nucleación de la vesícula. La formación del complejo Atg1-Atg13 induce la adquisición y procesamiento del material de membrana para la formación del autofagosoma. El complejo PI3K I, consistente de Vps13, Vps34, Atg6/Vps30 y Atg14 es necesario para la nucleación. 3) Expansión y término de la vesícula. Atg8 tiene una escisión proteolítica del residuo arginina C-terminal por Atg4. Atg8 y Atg12 son activadas por Atg7 y después son transferidas a las enzimas Atg3 y Atg10 respectivamente, y son conjugadas con fostatidiletanolamina y Atg5, respectivamente. Atg8 conjugado con fostatidiletanolamina se ancla a la membrana del PAS (*Phagosome Assembly Site*, Sitio de ensamble del fagosoma) y actúa como componente del autofagosoma maduro. Atg8 es liberado de la vesícula completa por una segunda escisión dependiente de Atg4. 4) Recuperación. Involucra otras proteínas Atg. La mayoría de las proteínas Atg son solubles y fácilmente se liberan de la superficie membranal mientras que Atg9 y Atg27 son proteínas integrales de membrana. 5) Anclaje y fusión. Vam3, Vam4, Vtil y Ytg6, junto con Yot7 y HOPS tienen un papel en la fusión de membranas. 6 y 7) Ruptura y flujo hacia afuera. La lisis de la vesícula depende del pH ácido del lumen de la vacuola y de unas proteinasas, así como Atg15. Atg22 es una proteína integral de membrana en la membrana limitante y actúa mediando el flujo de aminoácidos resultantes de la degradación autofágica (Amelio et. al., 2011).

2. 3 Apoptosis y cáncer

A diferencia de las células normales, las células cancerosas están bajo constante estrés, incluyendo estrés oncogénico, inestabilidad genómica e hipoxia celular. Estos estímulos normalmente desencadenarían respuesta apoptótica, pero las células cancerosas la evaden al deshabilitar las vías apoptóticas. Se ha sugerido que la inhibición de apoptosis juega un papel fundamental en la supervivencia de células cancerosas y del desarrollo de tumores.

Las células cancerosas pueden modular las vías apoptóticas transcripcional, traduccional y post-traduccional. Esto se puede deber al aumento en la expresión de genes antiapoptóticos o la

disminución de la expresión de genes proapoptóticos. Se puede inhibir también mediante la estabilización o desestabilización de proteínas anti o pro-apoptóticas, respectivamente. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y las células cancerosas pueden utilizar uno o varios para evadir apoptosis. Debido a que hay una gran cantidad de moléculas involucradas en este proceso, sólo se mencionarán algunas implicadas utilizadas para la evasión de apoptosis.

2.3.1 Regulación transcripcional y traduccional

Las anomalías genómicas y epigenómicas son características de las células cancerosas. Entre ellas se incluyen la amplificación del número de copias de genes, delección de genes, silenciamiento por metilación de DNA y activación o inactivación de factores de transcripción involucrados en la expresión de reguladores apoptóticos, así como miRNAs que regulan negativamente la expresión de genes.

2.3.2 Inducción de expresión de proteínas antiapoptóticas

La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas en células cancerosas, especialmente de la familia de BCL-2, es fundamental para sobrepasar las señales de estrés. Las células cancerosas evitan MOMP por la amplificación de proteínas antiapoptóticas BCL-2, y la sobre-expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 está correlacionada con una prognosis pobre. Entre los genes involucrados en cáncer se encuentran BCL-2, BCL-XL y MCL-1.

Debido a que la vía (PI3K)/ATK (PI3K) está frecuentemente hiperactivada en células cancerosas por mutaciones y otros mecanismos, la regulación transcripcional de esta vía, como la activación de CREB o STAT3, podría promover la expresión de MCL-1 en células cancerosas. También se ha observado que la traducción de mRNA de MCL-1 se facilita por el complejo 1 de rapamicina (mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*).

2.3.4 Supresión de la expresión de proteínas proapoptóticas

En células normales, el estrés genotóxico y citotóxico puede inducir la expresión de genes proapoptóticos que desencadenan la apoptosis. En células cancerosas, este mecanismo se nulifica mediante la mutación o silenciamiento de estos genes clave apoptóticos.

La proteína p53 es un factor de transcripción crítico que modula la expresión de genes que desencadenan apoptosis. El gen que codifica a p53, TP53, se encuentra frecuentemente mutado o inactivado, en aproximadamente un 50% en cánceres. Esto indica que las rutas apoptóticas inducidas por este gen se pueden ver afectadas. Entre ellas se incluyen BAX, PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), NOXA y APAF-1, así como la activación de BAX.

Se ha observado que la expresión de BIM también afecta la apoptosis. BIM es una proteína BH-3 que se induce en falta de factores de crecimiento y estímulos apoptóticos, así como factores de transcripción como FOXOs, RUNX3, AP-1 y E2F1. FOXO en particular está a su vez inhibido por AKT y ERK, cinasas de prosupervivencia. En las células cancerosas, se observan niveles elevados de AKT y ERK, lo que inhibe la expresión de BIM. Si se inhibe AKT y ERK, entonces la expresión de BIM

aumentaría. Asimismo BIM tiene un papel importante en la apoptosis inducida por inhibidores de tirosin cinasa. AKT y ERK son efectores clave de cinasas oncogénicas, entre las cuales están EGFR, BCR-ABL y HER2. La inhibición de la tirosin cinasa, por lo tanto, resultaría en la supresión de AKT y ERK que por ende llevaría a la expresión de BIM.

Por otro lado, un defecto en la vía apoptótica posterior a la liberación de citocromo c podría proveer a las células cancerosas de una ventaja de supervivencia independiente de BAX y la inhibición de BAK. La expresión de algunos genes de caspasas está regulado transcripcionalmente en respuesta a E2F1 o p53. En células cancerosas en las que estas vías han sido inhibidas, se observa un compromiso en la expresión de estas caspasas, lo que resulta en protección frente a apoptosis. La pérdida de APAF-1 se ha reportado en melanoma, cáncer colorectal, cáncer gástrico y de vejiga y su pérdida está relacionada a un mal pronóstico.

2.3.5. Regulación post-traducciona

Los procesos apoptóticos también son regulados por modificaciones post-traduccionales, como la ubiquitinación y fosforilación. La ubiquitinación está implicada en la estabilidad proteica y está dinámicamente regulada mediante la vía ubiquitina/proteosoma, mientras que la fosforilación puede cambiar las funciones proteicas, así como puede influenciar la ubiquitinación de la proteína blanco para proveer de un sitio de anclaje para la ligasa E3 ubiquitina.

En células normales, los niveles de expresión de proteínas antiapoptóticas con una vida media corta, como MCL-1, pueden declinar rápidamente por la inhibición de transcripción o traducción siguiendo a un estímulo apoptótico. Así mismo una señal apoptótica puede prevenir la degradación constante de una proteína proapoptótica, resultando en la acumulación de ésta proteína. En células cancerosas, éstas desregulan este proceso al mejorar la degradación de proteínas pro-apoptóticas específicas o al promover la estabilidad de proteínas antiapoptóticas.

MCL-1 es una proteína de vida corta, estimulada por factores pro-supervivencia como citoquinas. Cuando su transcripción es suprimida siguiendo un estímulo apoptótico, los niveles de MCL-1 disminuyen, lo que facilita MOMP. La fosforilación de MCL-1 es fundamental en la estabilidad de la proteína. La fosforilación en T163, seguido de fosforilación en S155/S159 marca la proteína para degradación proteosomal, mediada por la ligasa E3 y el complejo SFC^{β-TrCP}. Sin embargo, se ha reportado que la fosforilación en T163 por ERK puede llevar a una estabilización de MCL-1. Se especula que la fosforilación de S159 siguiendo de T163 es la que determina el destino de MCL-1.

Así como las células cancerosas atenúan la degradación de MCL-1, también pueden suprimir la acumulación de proteínas proapoptóticas como BIM. BIM tiene una vida corta, al igual que MCL-1 y su estabilidad está regulada por la fosforilación de ERK en S69. La fosforilación de este sitio promueve la degradación mediante la vía de ubiquitina/proteosoma.

La degradación de BAX es importante, ya que la activación de éste está ligada directamente a MOMP. Aunque no se sabe cómo, se cree que hay un mecanismo que el equilibrio de BAX en el

citoplasma y la membrana exterior mitocondrial, lo que conlleva a la prevención de la activación de BAX en la membrana mitocondrial externa.

La fosforilación de cinasas prosupervivencia resulta frecuentemente en la supresión de la función proapoptótica de las proteínas blanco, mientras que la fosforilación de cinasas proapoptóticas, lleva a la activación de proteínas proapoptóticas o la inhibición de proteínas antiapoptóticas. La actividad proapoptótica de BAD es inhibida por cinasas pro-supervivencia, como PAK1 y AKT mientras que la fosforilación de BIM por ERK previene la interacción entre BIM y BAX (Fernald et. al., 2013).

2.4 Autofagia y cáncer

Se ha reportado que la autofagia tiene tanto un papel supresor de tumores como propiedades que promueven tumores en células cancerosas

En ratones haplodeficientes de Beclin-1 se encontró que presentaban una alta incidencia de tumores espontáneos. También se ha observado que su expresión se encuentra disminuida en melanoma y en cáncer de mama. En éste último se reporta también silenciamiento genético y epigenético. El decremento de la expresión tanto de Beclin-1 y LC-3 se observó en glioblastomas humanos. Otros genes relacionados con autofagia también se han visto alterados en diferentes tipos de tumores, entre los que destacan Atg5 en leucemia específica de NKs y UVRAG en cáncer colorrectal y gástrico.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la función supresora de tumores de la autofagia. Primero, la autofagia elimina organelos dañados que puedan producir una gran cantidad de ROS, lo que limita la inestabilidad cromosómica. Como consecuencia de la autofagia, se elimina p62, lo que previene su función como adaptador de señales de transducción en vías importantes para la oncogénesis. Finalmente, la autofagia previene la necrosis celular como respuesta al estrés metabólico. Estos mecanismos sugieren que a autofagia tiene un papel importante contra la transformación de células, en la fase temprana de la tumorigénesis.

Por otra parte, mientras los tumores crecen, las células cancerosas pudieran utilizar la autofagia como forma para sobrevivir en un microambiente limitado en nutrientes y en concentraciones bajas de oxígeno, particularmente en las regiones internas del tumor donde hay poco flujo sanguíneo. Esta habilidad para tolerar estas condiciones es útil para la diseminación y metástasis. Las células tumorales deben superar la *anoikis*, la muerte celular por desprendimiento de la matriz extracelular, para sobrevivir en su invasión al tejido sanguíneo. Una alta acumulación de LC3 con metástasis y una prognosis pobre se han observado en pacientes con adenocarcinoma colorrectal. Se cree que en estos casos, al igual que en situaciones de carencia de nutrientes, la autofagia compensa la pérdida de señales extrínsecas y promueve nutrientes y energía.

Asimismo, se ha generado una hipótesis para explicar este papel dual y paradójico. Conocida como “el modelo autofágico de tumor de estroma del metabolismo de la célula cancerosa”, sugiere que las células transformadas utilizan ROS como señal para las células del estroma para entrar en

autofagia y así obtener nutrientes. Sin embargo, no se tiene una explicación de por qué la autofagia en ocasiones actúa en la muerte celular y en otras, la previene (Notte et. al, 2011).

2.5 Autofagia y apoptosis

Debido a que tanto la apoptosis como la autofagia son mecanismos cruciales en la fisiología normal y patología, se cree que pudiera haber un vínculo positivo o negativo entre apoptosis y autofagia, un *'switch'* molecular entre ellos. En recientes estudios se ha observado que algunos reguladores importantes pueden controlar simultáneamente ambos mecanismos. También se encuentran algunos reguladores comunes como p53, el eje PI3K/Atk y la interacción entre Bcl2-Beclin-1, como se explica a continuación y puede observarse en la Figura 4.

Se cree que p53 es un importante regulador común de apoptosis y autofagia. Tiene un papel positivo en la regulación de apoptosis, pero muestra un papel dual en autofagia dependiendo de su localización celular, ya sea promoviéndola en el núcleo o inhibiéndola en el citoplasma. En activación oncogénica o en inestabilidad genómica, p53 puede ejercer su efecto pro-autofágico. Esta activación de autofagia puede promover la muerte celular de tipo II y evitar la transformación de la célula en cancerosa. Por otra parte, en mutaciones deficientes de p53, la disminución de p53 inhibe autofagia en condiciones de falta de nutrientes o estrés del retículo endoplásmico y su inhibición de autofagia bloquea la autodigestión.

Otro mecanismo importante es la vía PI3K/Atk/mTOR. Esta puede regular negativamente la autofagia en condiciones de suficientes factores de crecimiento y su activación se ha observado en diversos tipos de cáncer, como pancreático, de ovario y de estómago. Se ha estudiado que Akt inhibe la apoptosis mediante la fosforilación de Bad, permitiendo la supervivencia celular. Por otra parte, la activación de este eje puede causar los efectos inhibitorios de Akt en apoptosis y mTOR en autofagia y permitir la supervivencia de células cancerosas.

Las proteínas de la familia Bcl-2 también participan en ambos procesos. En condiciones normales, Beclin-1 está unido y es inhibido por Bcl-2 o Bcl-X_L, mediante la unión de los dominios BH3 en Beclin-1 y el dominio de unión de Bcl-2/Bcl-X_L. Bajo ciertos estímulos, sólo proteínas BH3 como Bad pueden antagonizar competitivamente la interacción entre Beclin-1 y Bcl-2/Bcl-X_L por lo que estas proteínas BH3 podrían inducir diferencialmente autofagia y apoptosis al actuar en compartimentos subcelulares distintos. Si actúan en la membrana de la mitocondria, estas proteínas BH3 pudieran desencadenar apoptosis al disminuir la actividad permeabilizante de la mitocondria causado por Bax y Bak, mientras que en retículo endoplásmico, estas proteínas promueven la formación de autofagosomas mediante la liberación de Beclin-1 de sus inhibidores.

Además de las vías clave antes mencionadas, se ha observado la vinculación entre autofagia y apoptosis en diversas vías de señalización. El estrés del retículo endoplásmico se ha considerado como un mediador importante entre ambos tipos de muerte celular y sus vías de señalización mediante PERK, IRE1 y ATF6 pueden desencadenar señales pro-apoptóticas vía la activación de moléculas como CHOP, JNK o algunas proteínas de la familia Bcl-2. Este estrés también puede promover la formación del autofagosoma con la conversión de LC3 mediante la vía PERK-eIF2a o

IRE1-JNK. En un estudio se reportó que la muerte autofágica requiere los genes atg7 y Beclin-1, así como la inhibición de caspasa-8. También se ha reportado que la escisión de Beclin-1 mediado por caspasas inhibe su actividad pro-autofágica. Sin embargo, el fragmento terminal de Beclin-1 resultante adquiere una nueva función y puede amplificar la apoptosis mediada por mitocondrias al inducir la liberación de factores pro-apoptóticos (Liu et. al., 2011).

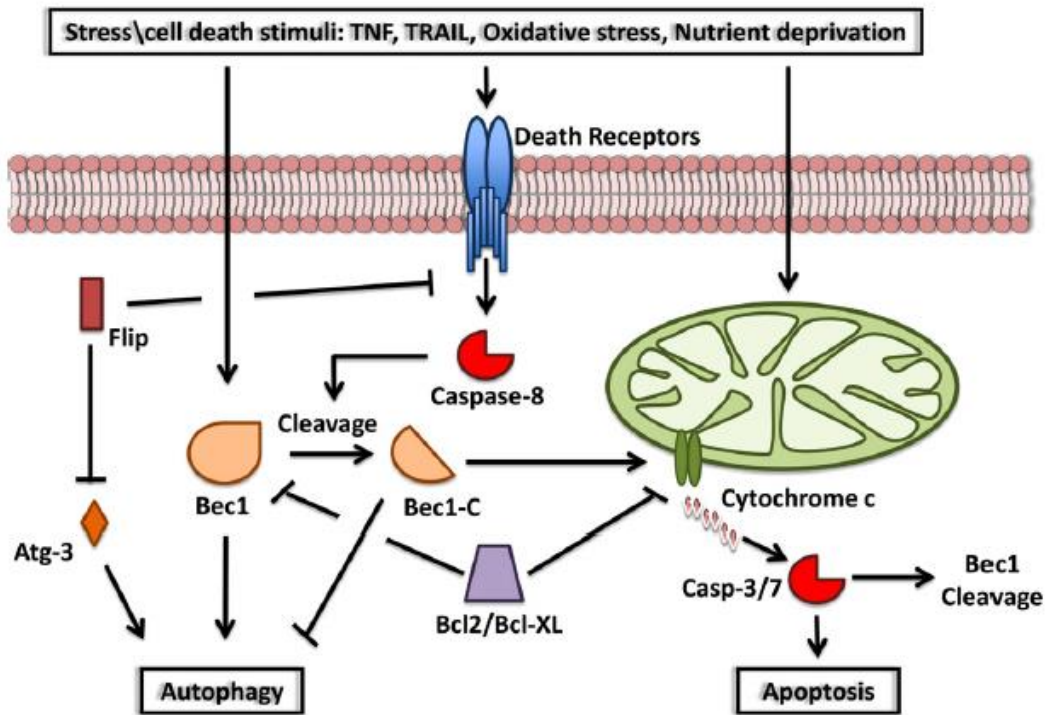


Figura 4. Representación de las interconexiones moleculares entre autofagia y apoptosis. Beclin-1 es un punto crucial de interconexión. La escisión dependiente de caspasas de Beclin-1 reprime la activación de autofagia y promueve apoptosis vía el fragmento Becl1-C. Bcl2/Bcl-XL actúan como factores anti-autofágicos y anti-apoptóticos por interacciones específicas inhibitorias. cFLIP reprime la vía de receptor de muerte y contrarresta la elongación del autofagosoma (Amelio et. al., 2011).

2.6 Uso de autofagia como nueva terapia anti-cáncer

Debido a su papel en la muerte de células cancerosas, se ha empezado a diseñar fármacos para inducir autofagia y eliminar las células cancerosas. Entre los blancos más estudiados se encuentran la vía Akt-mTOR, al observarse que las proteínas Akt, PTEN y mTOR así como unos de los blancos de mTOR están sobreexpresados o mutados en diferentes tipos de cáncer. Algunos inhibidores de mTOR se han desarrollado como tratamiento contra el cáncer. Entre estos se encuentran everolimus y temsirolimus, utilizados contra cáncer renal y linfoma de células de manto. El everolimus induce autofagia in vivo, con reducción de masa tumoral en leucemia y tumores pancreáticos. Su utilización en conjunto con etopósido, cisplatino o doxorubicina han producido efectos cooperativos antitumorales por activación de p53, lo que transactiva genes cuyos productos activan autofagia como AMPL, ULKs, DAPK2 y TSC2 (Notte et. al, 2011).

El premetred y los inhibidores multikinasa como sorafenib actúan sinérgicamente promoviendo autofagia que lleva a la activación de la vía intrínseca de apoptosis. Obatoclax, un inhibidor de Bcl-2, promueve tanto apoptosis como autofagia en cáncer de pulmón no microcítico y en leucemia linfoblástica aguda (Amelio et. al., 2011). Otros fármacos inductores de autofagia también ya se han utilizado en terapia. La rapamicina y sus análogos RAD001, CCI-779 y AP23573, así como imatinib han mostrado actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer. Por otra parte, debido a su papel dual, inhibidores de autofagia pudieran utilizarse para evitar su implicación para la supervivencia de células tumorales. Entre los blancos propuestos se encuentran Atg3, Atg6, Atg10 y Atg12. En experimentos donde se ha realizado silenciamiento de estos genes, importantes en la formación del autofagosoma, se ha observado una sensibilización de las células cancerosas.

Cabe destacar que fármacos utilizados en la medicina china tradicional se han estudiado por su papel tanto en apoptosis como en autofagia. Las lectinas de muérdago se han utilizado como terapia alternativa. La lectina de *Phaseolus coccineus* se ha reportado que induce autofagia y apoptosis mediante el bloqueo de las vías de señalización de Ras-Raf y PI3K/Akt y se ha sugerido que puede inducir ambos procesos mediante la vía ROS-p38-p53. La Concanavalina A se ha vinculado a propiedades inductoras de autofagia en vías mitocondriales mediadas por BNIP3 en células de hepatoma humano. La oridonina es un principio activo diterpenoide aislado de una hierba tradicional china y presenta propiedades antitumorales al tener de blanco el complejo CDKs-ciclinas, induciendo apoptosis mediante el incremento de expresión de Fas/Fas-L y la inducción de autofagia al suprimir la vía Ras/PI2K/Akt, promover p38 y JNK (Liu et. al., 2011).

3. Ester Fenólico de Ácido Caféico (CAPE)

3.1 Propóleo

El propóleo es una resina recolectada por *Apis mellifera* de los brotes de árboles que después utilizan para recubrir partes, así como sellar grietas en los panales. El propóleo se ha utilizado en remedios caseros desde el año 300 A.C. En los últimos años, se han descubierto una gran cantidad de propiedades biológicas del propóleo. Entre éstas figuran actividad citotóxica, antiherpes, antimicrobial, secuestrador de radicales libres, y actividad anti-VIH. Debido a estas propiedades, el uso del propóleo se ha extendido a alimentos y bebidas con el fin de prevenir enfermedades y mejorar la salud.

El propóleo es una mezcla compleja, contiene aproximadamente 50% de resina y bálsamo, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de impurezas. Su composición es variable, dependiendo de las especies de plantas creciendo cerca de los panales, la estación del tiempo, iluminación, altitud y disponibilidad de alimentos. Sin embargo, las principales clases de compuestos que se encuentran en el propóleo son compuestos flavonoides, fenólicos y aromáticos (Toreti et. al, 2013).

3.2 CAPE

El éster fenético del ácido caféico o CAPE es un compuesto natural que se encuentra en el propóleo. Es un polvo color blanco, es soluble en etanol, DMSO y acetato de etilo (50mg/mL). Su fórmula molecular es $C_{17}H_{16}O_4$ con un peso molecular de 284.31g/mol. Posee propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antineoplásicas y antioxidantes (Domínguez, 2008; Ozturk et. al, 2012).

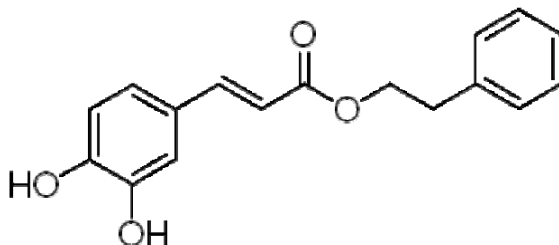


Figura 5. Estructura molecular de CAPE (Domínguez, 2008).

CAPE es un inhibidor específico de NF- κ B, suprime la vía lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios a concentraciones de μ M y a concentración de 10μ M bloquea la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive oxygen species*) en neutrófilos humanos y el sistema xantina/xantina oxidasa. CAPE inhibe a la xantina oxidasa al unirse a su región molibdo proteína del sitio activo. La inhibición de la xantina oxidasa, que metaboliza bases púricas y pirimídicas, detiene la ruta de rescate de nucleótidos, por lo tanto presenta actividad anticancerígena en todos los tipos celulares (Ozturk et. al., 2012).

En un ensayo de peroxidación lipídica de membranas de eritrocitos, DNA plásmido pBR322 y daño proteico inducido por el iniciador hidrocloreto 2,2'-azobis(2-amidinopropano) y H_2O_2 , se observó la formación de hidroperóxidos y ruptura de DNA mediante las técnicas de electroforesis alcalina celular y electroforesis de SDS-PAGE. Los resultados obtenidos indicaron que CAPE y sus ésteres de ácido polifenólico relacionados tenían efectos remarcables en la peroxidación lipídica de membrana de eritrocitos, ruptura de cadena de DNA celular y fragmentación de proteínas (Wang^a et. al., 2008).

CAPE y otros ésteres de ácido caféico inhiben lesiones preneoplásicas de colon inducidas por azoximetano y las actividades enzimáticas de ornitina decarboxilasa, tirosin cinasa y lipoxigenasa asociadas con cáncer de colon.

Se ha sugerido que CAPE induce apoptosis. CAPE suprime la transformación celular inducida por 12-O-tetradecanilforbol-13-acetato e indujo apoptosis en células epidermales JB6 C1 41 de ratón; en tratamiento de líneas celulares tumorales mutantes de p53, NCI-H358 y SK-OV-3 y deficientes en p53 (p53(-/-)) y células CI 4I CAPE indujo la escisión de la caspasa-3 así como fragmentación de DNA. Se cree que p53 está involucrado en fases tempranas de la inducción de apoptosis por CAPE, ya que la escisión de caspasa-3 sólo se observó en células expresando p53 silvestre (p53(+/+)) y en

células C1 41. Asimismo, CAPE pudiera inducir apoptosis mediante vías dependientes e independientes de p53.

En otro estudio para comprender el mecanismo de citotoxicidad diferencial inducido por CAPE, se utilizaron fibroblastos de embrión de rata clonados (*cloned rat embryo fibroblasts*, CREF) no tumorigénicos y células CREF transformadas con adenovirus (Wt3A). Mediante estudios de degradación de DNA de longitud nucleosomal, marcaje in-situ de extremos 3'OH y citometría de flujo buscando poblaciones hipodiploides celulares, se encontró que la muerte celular inducida por CAPE en las células Wt3A transformadas fue por apoptosis y que este efecto se debe a la regulación del estado redox a nivel de GSH de las células. Otro estudio demuestra que en células CREF transformadas por oncogenes, revertidas por oncogenes y células CREF transformadas resistentes a CAPE se encontró una relación directa entre los efectos citotóxicos de CAPE y la inducción de fragmentación de DNA y apoptosis, así como un patrón de citotoxicidad inducida por CAPE que se asemeja a apoptosis en la expresión del fenotipo de las células transformadas.

Otra característica importante que se ha observado es que CAPE pudiera tener la particularidad de tener como blanco específico células transformadas progresadas y suprimir su crecimiento y toxicidad, lo que permitiría identificar vías bioquímicas importantes para mediar la transformación celular y la progresión de un estado transformado (Ozturk et. al., 2012).

Un producto CAPE dimerizado biomiméticamente, el lignan benzol[k,1]xanteno, mostró efectos inhibitorios relacionados con dosis en un ensayo de angiogénesis midiendo el crecimiento de vasos sanguíneos. Este lignano inhibió además la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) en cultivo celular de ovario (Basini et. al., 2012). En otro ensayo de formación *in vitro*, se utilizó VEGF para inducir proliferación y migración de células endoteliales de vasos de cordón umbilical y fibroblastos así como un tratamiento con CAPE. CAPE suprimió la inducción de formación y proliferación ocasionada por VEGF (Izuta et. al, 2009).

En estudios para determinar el efecto de CAPE en metaloproteinasas de matriz (MMPs, *Matrix Metalloproteinases*), se observó que hubo disminución en los niveles de MMP y de mRNA inhibidor de MMP-2 en células humanas de fibrosarcoma HT1080 tratadas con CAPE medidas por RT-PCR. En análisis de zimografía de gelatina se mostró regulación negativa de la expresión de MMP-2 y MMP-9 en células HT1080 tratadas con CAPE, así como inhibición de la actividad de MMP-2 e invasión, motilidad, migración celular y formación de colonias de células tumorales. Asimismo, ensayos de citotoxicidad en cultivo celular de adenocarcinomas de colon tratados con CAPE mostró un decremento dependiente de dosis en la viabilidad celular, en la invasión celular en un 47.8% y de la expresión de MMP-2 y MMP-9.

En modelos de inducción a fenotipo invasivo de células de adenocarcinoma de pulmón A549 inducidos mediante el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , *Transforming growth factor beta*), CAPE suprimió la motilidad celular potenciada por TGF- β y la activación inducida por TGF- β de Akt, así como de LY294002. LY294002 es un inhibidor específico de la vía PI3K/Akt. Estos

descubrimientos sugieren que CAPE puede ser utilizado como agente quimio protector así como agente terapéutico anti-metastásico (Ozturk et. al., 2012).

Se cree que CAPE inhibe el crecimiento de células tumorales mediante vías de estrés oxidativo conectadas a vías independientes a p53 y que inhiben procesos oxidativos mediante el decremento de generación intracelular de H₂O₂ así como disminución del nivel de GSH en células A549 de cáncer de pulmón. El agotamiento de reservas de GSH (glutación reducido) puede hacer a las células más susceptibles a apoptosis inducida por estrés oxidativo (Chen et. al., 2004).

En el caso de cáncer de próstata, se ha observado que CAPE inhibe la activación de NF-κB en células PC-3 (*Prostatic Cancer-3*, cáncer de próstata) al bloquear la habilidad de paclitaxel y del factor de necrosis tumoral α (TNF-α, *Tumor necrosis factor alpha*) para activar a NF-κB. Este efecto se ha asociado con la reducción en los niveles celulares de los inhibidores de proteínas apoptóticas cIAP-1, cIAP-1 y XIAP, que son una familia de homólogos estructurales de inhibidores de caspasas.

En estudios sobre el efecto de CAPE en células de melanoma, se sugirió que CAPE suprime la ruptura de la cadena de DNA inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS). En un estudio con células de melanoma SK-MEL-28 se encontró que la IC(50) de CAPE era de 15μM. En esta misma línea se encontró que CAPE causa selectivamente incremento en la formación de ROS y el agotamiento de GSH que expresaban tirosinasas normales.

En células SK-MEL-28, así como B16-F0, B16F10, SK-MEL-5 y MeWo, así como en ensayos *in vivo* de modelos de tumores B16-F0 en ratones C57BL/6, CAPE a 10mg/kg/día llevaba a disminución de GSH celular, aumento de 10-25 veces en la formación de ROS en células B16-F0, un aumento de apoptosis de 5-7 veces en células B15F0 e inhibición del crecimiento del tamaño del tumor.

Por otra parte, las tirosinasas, altamente presentes en células de melanoma, activan CAPE a una O-quinona que reacciona con GSH para formar un conjugado CAPE-SH y este papel se cree que es importante para la toxicidad celular inducida. Como un inhibidor de glutatión S-transferasa (GST, *Glutathione S-transferase*) en presencia de tirosinasa, el tratamiento de CAPE mostró un porcentaje de inhibición de GST de 70-84%, mientras que el conjugado CAPE-SG y la quinona de CAPE mostraron una inhibición del 85% de GST por mecanismos reversibles e irreversibles. Análisis de docking computacional sugieren que CAPE se une al sitio activo catalítico de GST. Esto indica que las quinonas formadas por CAPE así como los conjugados con GSH pueden tener un papel importante en la inhibición selectiva de GST en células SK-MEL-28 (Ozturk et. al., 2012).

Boudreau y cols. refirieron que el CAPE inhibe la producción de leucotrienos en macrófagos peritoneales de ratón, basados en sus características anti-oxidantes y anti-inflamatorias. Estas actividades son de importancia ya que se ha demostrado un papel potencial de la 5-lipoxigenasa (5-LO) y su sobreexpresión en cáncer de próstata, así como la importancia de regulación de 5-LO en el desarrollo de leucemia de células madre. En sus experimentos encontraron que el CAPE era más potente que el zileuton, fármaco por excelencia para la inhibición de la actividad de 5-LO y la biosíntesis de leucotrienos en leucocitos humanos polimorfonucleares estimulados, aunque presentaban igual actividad en sangre total. También se encontró que el grupo éster fenetílico de

CAPE era esencial para la inhibición efectiva y que el grupo fenetil es necesario para la inhibición tanto de la biosíntesis de leucotrienos como de la actividad de 5-LO. También se observó inhibición de la conversión de ácido araquidónico a leucotrienos, así como la inhibición del 55% de ácido araquidónico liberado a concentración de 1 μ M, sugiriendo que CAPE bloquea la biosíntesis de leucotrienos mediante la inhibición de la activación de la fosfolipasa A2 grupo IVA (Cpla2 α) así como de 5-LO. Esta inhibición se da por un mecanismo no competitivo (Ozturk et. al., 2012; Boudreau et. al., 2012).

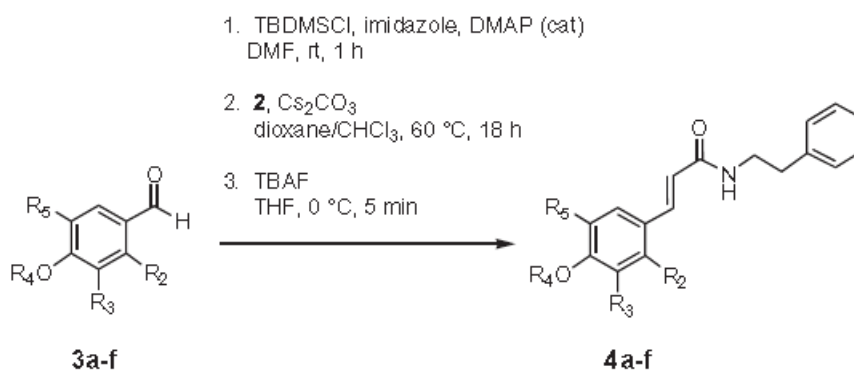
Omene y cols. realizaron experimentos utilizando células basales de cáncer de mama (bCSC, *breast cancer stem cells*) aisladas de la línea celular MDA-231. Se replicó el proceso de auto-renovación, una característica de las CSC responsable de regenerar masas tumorales y de la recurrencia del cáncer. Este proceso consistió en sembrado en ausencia de suero y crecimiento como mamoesferas (MMS) que cuando se disociaron en células, formaron otra vez MMS. Después se expusieron las MMS a CAPE para ver el efecto de éste en el proceso de auto-renovación a dosis de 0-40 μ M. Esta renovación en ausencia de suero fue inhibida en una manera dependiente de dosis, con la dosis más alta de CAPE alcanzando una inhibición del 97%. Este efecto también se observó a concentraciones de 40 μ M en agar suave, donde se presentó inhibición de formación de colonias progenitoras a las cuatro semanas de estar en agar suave, que es un indicativo de potencial maligno, y de crecimiento clonal. Esto indica el potencial como agente terapéutico, al poder inhibir características asociadas con un potencial maligno inherente de las células (Omene et. al., 2012).

En estudios de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC, *Human umbilical vein endothelial cells*) se mostró efecto citoprotector de CAPE contra lesiones oxidativas inducidas por menadiona, una quinona simple en una forma dependiente de dosis. Se encontró que CAPE indujo la expresión de HO-1 (*Heme oxygenase-1*, hemo oxigenasa 1), incremento observado mediante RT-PCR y Western Blot. Este efecto de inducción de HO-1 se había observado en astrocitos, pero confirmado en HUVEC con los resultados obtenidos de este experimento. La vía de señalización involucrada en la inducción de HO-1 por compuestos polifenólicos electrofílicos se ha atribuido a la activación del factor 2 relacionado a NF-E2 (Nrf2). Se sugiere que los antioxidantes polifenólicos interaccionan con los grupos tiol de Keap1, que libera a Nrf2 del complejo Nrf2/Keap1. Éste es translocado al núcleo, donde forma heterodímeros con Maf, se une al elemento de respuesta antioxidante ARE y acelera la transcripción de HO-1. En el experimento no se observó inducción de genes de fase II excepto HO-1, lo que indica que esta regulación positiva de HO-1 es suficiente para proveer protección frente al estrés oxidativo, pero pudieran encontrarse otros genes expresados que ejercieran efectos protectores. Sin embargo, lo obtenido de este ensayo recalca la importancia de inducción de HO-1 por actividades transcripcionales, lo que indica que el efecto citoprotector de CAPE no sólo está limitado a su actividad antioxidante vinculada con su estructura. En otro ensayo de antioxidantes, CAPE y el ácido caféico redujeron el nivel basal intracelular de especies reactivas de oxígeno en dos horas (Wang^b et. al., 2008).

3.3 CAPA

Debido a la fácil hidrólisis de CAPE en plasma por actividad estearasa en células y sangre, se han sintetizado nuevos compuestos derivados amídicos de CAPE (CAPA, *Caffeic acid phenethyl amide*), ya que las amidas han sido asociadas con energías hidrolíticas mayores de activación comparado con los ésteres, lo que evita su degradación por hidrólisis.

Los primeros experimentos sobre la actividad citoprotectora de los compuestos CAPA *in vitro* surgieron en 2010. En este contexto, se encontró que parte del grupo hidroxilo en el catecol de CAPA posiblemente contribuía a la actividad antioxidante del compuesto. Los CAPA también han sido de interés en un esfuerzo por reducir la citotoxicidad de CAPE. Las concentraciones tóxicas de CAPE se han reportado a 40µM y 60µM. En un ensayo con análogos CAPE y análogos CAPA sintetizados por el grupo del Dr. Yang se encontró variabilidad en citotoxicidad de CAPA, con los análogos 4b, 4d, 4e y 4f (Figura 6) no mostrando citotoxicidad a ninguna concentración hasta 60µM y la amida 4c siendo citotóxica en las concentraciones utilizadas en la experimentación, aunque con una toxicidad menos aparente a las 5 horas de incubación. De estos compuestos, los compuestos amida 4b y 4c presentaron actividad citoprotectora significativa, e orto-fluorofenol 4e presentó citoprotección intermedia y los análogos monometilados y dimetilados 4d y 4f no fueron citoprotectores (Yang et. al., 2010).



Compuesto	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Rendimiento (%)
a (CAPA)	H	H	H	OH	14
b	F	H	H	OH	7
c	H	OH	H	F	15
d	H	OMe	H	F	22
e	H	H	H	F	8
f	F	H	Me	OMe	63

Figura 6. Síntesis de CAPA y análogos fluorados (Yang et. al., 2010).

Los resultados obtenidos de este experimento sugirieron al igual que otros estudios que el grupo catecol y sus propiedades antioxidantes y de secuestradores de radicales están relacionadas con protección contra H₂O₂ en compuestos CAPE. Sin embargo, se observó un comportamiento diferente en los compuestos CAPA. El compuesto 4c con funcionalidad catecol no fue citoprotector, mientras el compuesto 4e éster mostró citoprotección pese a la falta de grupos hidroxilo fenólico

libres. En los compuestos CAPA y CAPE se observó aumento en el porcentaje de citoprotección desde 1 a 20uM, y después se observó un declive a 40uM. En el caso de CAPE, esto se debe a la citotoxicidad previamente mencionada. Sin embargo, en CAPA aun cuando no hay citotoxicidad a 40uM, se presentó este fenómeno. Esto indica que los compuestos CAPA no presentan una diferencia significativa en actividad citoprotectora en condiciones experimentales 2mM de H₂O₂ en concentraciones de 5 y 20uM pero que son menos citotóxicos que CAPE. Asimismo, se observó que CAPA es estable en condiciones ácidas de 0.1M HCl pH ~ 1, pero se hidroliza en pH de 10 (Yang et. al., 2010).

Boudreau realizó síntesis de análogos amida, debido a la poca estabilidad de CAPE en el plasma. El compuesto 9 amida comparado con el CAPE presentó una menor potencia en la inhibición de la actividad 5-LO en ensayos de ruptura celular, pero una efectividad moderadamente superior en la inhibición de leucotrienos en linfocitos PMNL estimulados y en sangre completa. La potencia del compuesto 9 de inhibición comparado con CAPE se sugiere que se debe a la presencia de la unión amida. Sin embargo, el compuesto 9 presenta actividad inhibitoria en la conversión de ácido araquidónico a leucotrienos (Boudreau et. al, 2012).

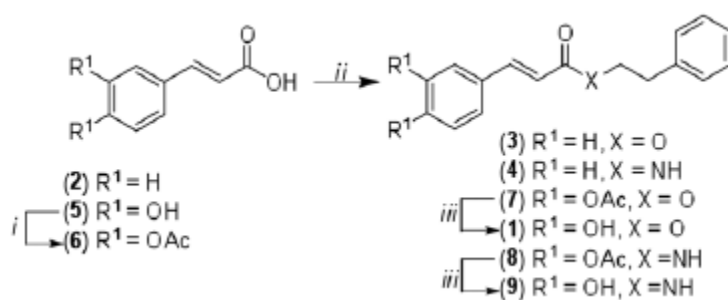


Figura 7. Síntesis de CAPE y análogos (Boudreau et. al., 2012).

3.4 CAPE y CAPA en México

En los estudios de CAPE en un modelo de hepatocito resistente del Dr. Saúl Villa expuesto a DEN (Dietilnitrosamina) y CAPE, se encontró que CAPE redujo la inducción de focos de hepatocitos alterados de GGT⁺ (γ-Glutamil transpeptidasa-positiva) en un 59%, lo que previno daño característico del tratamiento con DEN. CAPE modificó la actividad enzimática asociada con CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2 t CYP2E1 en una forma dependiente del tiempo. Los metabolitos producidos en la bioactivación de DEN inducen mutaciones en el DNA e incrementan el estrés oxidativo que desencadena múltiples vías de señalización que culminan en la producción de células iniciadas. Esto requiere de la activación de DEN en α-hidroxinitrosaminas que se descomponen en etil-diazohidróxidos y pares separados de nitrógeno. Éstos forman diazoalcanos o carbocationes y la alquilación de nucleófilos, todos especies muy reactivas que inducen cáncer.

La reducción de CAPE de los focos de hepatocitos afectados GGT⁺ indica que se está interfiriendo con la actividad iniciadora de DEN. Al ser DEN necesario junto con 2-AAF (2-acetil aminofluorina)

para la inducción de cáncer, la falta de DEN resulta en una reducción drástica de GGT⁺. Mediante detección del daño tisular causado por el carcinógeno a las 24 se confirmó que CAPE interfirió con la iniciación celular, protegió el tejido de necrosis mediante un posible bloqueo de actividad de DEN en la etapa de iniciación.

Durante el experimento se observó actividad enzimática disminuida asociada con CYP1A1/2 y CYP2B1/2 a las 12 horas de administración. Esto sugiere que CAPE puede modular la actividad de las isoformas CYP involucradas en la biotransformación de DEN. Sin embargo, se requieren de más experimentos para caracterizar las isoformas de CYP involucradas en la bioactivación, ya que la especificidad de sustratos para los CYPs puede sobrelaparse y más de uno pudiera estar involucrado en el metabolismo de DEN, además de los antes mencionados (Beltrán et. al., 2008).

Paniagua estudió el efecto genotóxico de un derivado amida del CAPE sintetizado por el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC dirigido por el Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano. Este compuesto fue el N[2-clorbencil]cinamida (NA01) y se analizó mediante electroforesis unicelular en gel (SCGE) en cultivo de linfocitos humanos. Se evaluaron concentraciones entre 10 y 100µg/mL a 4 y 6 horas encontrando que el NA01 presenta actividad genotóxica en el cultivo, pero menor a la genotoxicidad inducida por el compuesto MMS (Metilmetanosulfonato) utilizado como control positivo en el estudio. También se observó un ligero aumento en la citotoxicidad comparado con un control, pero que no rebasó el 5% (Paniagua, 2010).

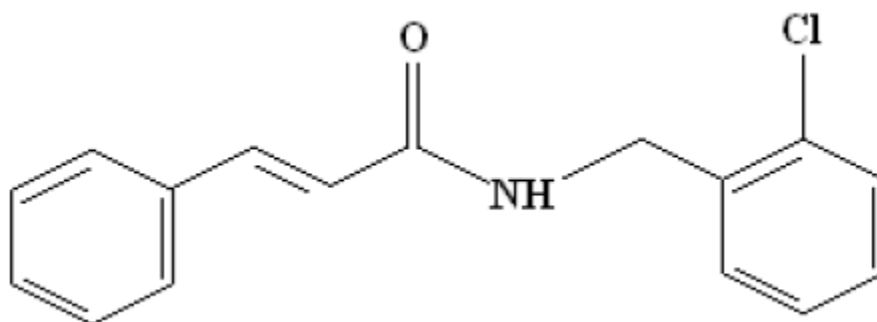


Figura 8. Estructura del derivado NA01 (Paniagua, 2010).

El diseño y la síntesis de otros análogos amida de CAPE fueron realizados por el Dr. Ángeles y su grupo de colaboradores del mencionado laboratorio y constituyeron así la línea LQM 700 conformada por 30 compuestos derivados que se evaluaron biológicamente de inicio mediante las técnicas de MTT y CV a concentración de 100µM en líneas MDA-MB 231, HeLa y PC-3. De aquí fueron elegidos los tres compuestos con mayor actividad citotóxica para subsecuentes estudios, estos fueron el LQM 731, LQM 738 y LQM 755 (Ruiz, 2012).

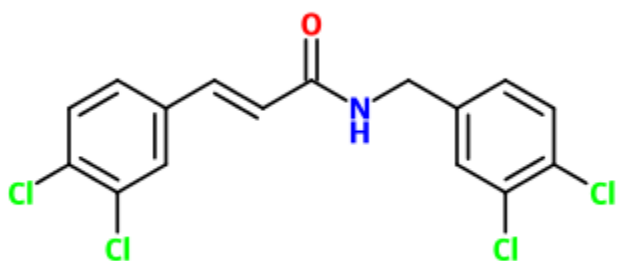


Figura 9. Estructura del LQM 731.

A partir de estos experimentos, se han realizado pruebas *in vivo* con los LQM 731, 738 y 755 en ratones. Hernández en 2013 evaluó el efecto antígenotóxico del LQM731 en ratones Balb C a dosis de 20mg/Kg y 40mg/Kg retando frente a un mutágeno, la Mitomicina C, en dosis de 2mg/Kg mediante la técnica de SCGE. Se encontró que a las 3 horas posteriores a la administración, las dosis disminuyen el daño al DNA causado por MMC en células de hígado en un 91.7% con la dosis de 20mg/Kg y en un 89.7% con dosis de 40mg/Kg. En células de riñón, la dosis de 20mg/Kg redujo el daño en un 90.2% y en 88.1% con la dosis de 40mg/Kg. A las 18 horas, se observó un mínimo daño causado, aunque la dosis de 40mg/Kg se reportó como tóxica (Hernández, 2013).

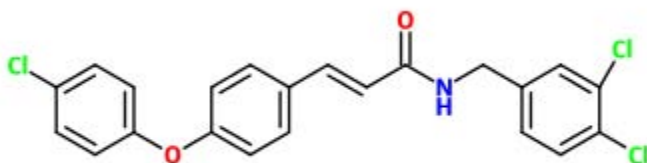


Figura 10. Estructura del LQM 738.

Cruz en 2014 evaluó el LQM 738 en ratones machos CD1 mediante SCGE a dosis de 20mg/Kg y 40mg/Kg , frente a MMC 2mg/Kg en células de riñón e hígado. A las 3 horas de la administración, la dosis de 20mg/Kg se reportó que no causa daño al DNA en los tejidos estudiados. Sin embargo, la dosis de 40mg/Kg presentó ligera genotoxicidad en riñón. En su evaluación antígenotóxica, la dosis de 20mg/Kg de LQM 738 redujo el daño en un 88.42% en células de hígado y en un 57.6% en células renales, mientras que la dosis de 40mg/Kg se reportó como no efectiva para reducir el daño ocasionado por MMC (Cruz, 2014).

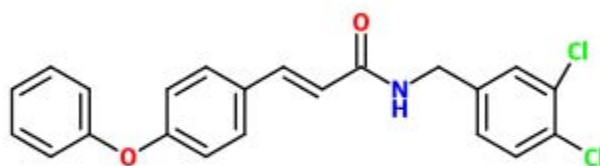


Figura 11. Estructura del LQM 755.

Aguilar evaluó el efecto antígenotóxico LQM755 por SCGE en ratones macho CD1 a dosis de 20mg/Kg y 40mg/Kg frente a dosis de 2mg/Kg de MMC a 3 y 18 horas. Para el reto a las 3 hrs, se reportó que la dosis de 20mg/Kg disminuyó el daño al DNA en un 60% en células de hígado y en un 65% en células de riñón. La dosis de 40mg/Kg disminuyó el daño en un 73% en células de hígado y en un 56% en células de riñón. A las 18 hrs, se observó que en ambas dosis se aumentó el daño ocasionado por el LQM 755 (Aguilar, 2014). En resumen de estos estudios, parece muy alentador el efecto de reducción de daño al material genético por estos compuestos CAPA.

4. Lectinas

Las lectinas de plantas son una clase de proteínas de unión a carbohidratos distribuidas en una variedad de especies de plantas. Reconocen específicamente y se unen a varias estructuras de azúcares, desencadenando diversos procesos celulares. De acuerdo a su estructura, se pueden dividir en “merolectinas”, “hololectinas”, “quimerolectinas” y “superlectinas” (Lui et. al., 2010). Las lectinas se han también clasificado de acuerdo a sus especificidades para unión de carbohidratos, como:

1. Homólogos de aglutinina *Agaricus bisporus*
2. Amarantinas
3. Homólogos de chitinasa Clase V con actividad de lectina
4. Familia Cianovirinas
5. Familia EEA (Aglutinina de *Euonymus europaeus*)
6. Familia GNA (Aglutinina de *Galanthus nivalis*)
7. Proteínas con dominios heveina
8. Jacalinas
9. Proteínas con dominios de lectinas de leguminosas
10. Dominios LysM
11. Familia Nictaba (antes conocida como lectinas *Cucurbitaceae phloem*)
12. Familia Ricina (Fu et. al., 2011; Wu et. al, 2013)

La primer lectina de planta fue la Ricina, descubierta en 1888 en extractos de semillas de *Ricinus communis*. En 1963 se observó que las lectina de plantas tenían la característica de distinguir entre células normales y cancerosas al haber alteraciones en la superficie de éstas últimas. Los glicoconjugados de las superficies celulares participan en las interacciones célula-célula, entre las cuales destacan el reconocimiento, la comunicación y adhesión. Durante la diferenciación celular y

transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas se ve alterada y es en estas alteraciones que radica su detección (Castillo et. al., 2005).

En las últimas dos décadas, las lectinas se han utilizado como herramientas de reconocimiento para diferenciar tumores malignos de benignos y el grado de glicosilación asociado con metástasis, debido a sus propiedades de unión específicas a carbohidratos. Por otra parte, diversas lectinas, como las obtenidas de muérdago, han sido adoptadas para terapia alternativa de cáncer y se han utilizado en Europa como adyuvantes en quimioterapia y radioterapia para reducir los efectos secundarios ocasionados por estos tratamientos. Recientes estudios han demostrado también que las lectinas presentan actividad anti-tumoral en diferentes células cancerosas (Liu et. al., 2011). A continuación se mencionarán las lectinas más estudiadas así como los mecanismos por los cuales están implicadas en la muerte de células cancerosas.

4.1 Proteínas inactivantes de ribosoma tipo II.

Se sabe que los RIPsII ejercen actividad antitumoral en células cancerosas en diferentes maneras al tener de blanco estadios distintivos de las vías apoptóticas. Entre ellos se encuentran la señalización caspasa-8/FLICE independiente de receptor de muerte y vías independientes de p53, así como vías mitocondriales y de receptor de muerte y generación de ROS por activación de caspasas y activación de la vía SEK/JNK.

En ensayos clínicos se observó que las células tumorales tratadas con RIPsII mostraron niveles de mitosis reducidos, así como apoptosis y necrosis, así como prolongación de supervivencia en ratones tratados (Liu^a et. al., 2010).

4.1.2. Lectinas de muérdago (Viscum album)

Las lectinas de muérdago son un tipo de proteínas inactivantes de ribosoma tipo II (RIPsII) que se aislaron por primera vez en muérdago europeo (Fu et. al., 2011). Consisten en una cadena A que comprende de tres dominios individuales distintivos y una cadena B que contiene dos dominios con configuración similar. Se cree que la cadena B pudiera tener un papel importante en determinar la citotoxicidad selectiva para células tumorales mediante reconocimiento e internalización vía receptores putativo (Liu^a et. al., 2010). La cadena A, por otra parte, presenta aparentemente actividad citotóxica al inhibir la síntesis proteica intracelularmente al interactuar con el ribosoma 28S mediante actividad de N-glicosidasa. Por lo tanto la actividad citotóxica de estas lectinas requiere de ambas cadenas (Fu et. al., 2011). Las ML se han clasificado en tres principales tipos: ML-I, ML-II y ML-III, aunque las diferencias entre cada una no se han estudiado a profundidad (Yau et. al., 2015). La lectina más estudiada es ML-I.

Las proteínas ML-I ejercen efectos citotóxicos en células tumorales y desencadenan una vía apoptótica independiente de receptor de muerte pero mediada por mitocondria. ML-I induce apoptosis al activar la caspasa-8 vía la vía extrínseca apoptosis en células T de Leucemia Jurkat y cooperan con TNF- α mediante regulación negativa de Bcl-2. También puede romper MMP y

activar caspasa-3, induciendo apoptosis mediante la vía dependiente de Apaf-1 en células de adenocarcinoma humanas con p53 mutado (Liu^a et. al., 2010; Jiang et. al., 2015).

ML-II posee funciones anticancerígenas al activar cinasas reguladas por señales extracelulares y p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, proteína cinasa activada por mitógeno) (Liu et. al., 2010). También se ha observado que activa vías de señalización involucradas en SAPK/JNK y p38 o que inhibe la vía ERK 1/2 en células humanas de leucemia monoblástica (Jiang et. al., 2015).

Entre las lectinas tipo ML-II se encuentran las de muérdago coreano (*Viscum album* L. coloratum). Estas lectinas mostraron mayor citotoxicidad que las de muérdago europeo, mediante un mecanismo de apoptosis mediado por endonucleasas dependientes de Ca^{2+}/Mg^{2+} (Pryme et. al., 2006). La lectina purificada se conoce como VAC (*Viscum album* var coloratum agglutinin, Aglutinina de *Viscum album*) (Yau et. al., 2015). VAC es una lectina específica de galactosa y N-acetil-D-galactosamina y hasta ahora la única ML indicada en inducir autofagia en células cancerosas. VAC se ha reportado que incrementa la expresión de mTORC1 fosforilado, PI3KCIII, Beclin-1, Atg12 y LC3 activo, lo que señala que puede inducir la expresión de factores de supervivencia (Liu et. al., 2013). También se ha observado que induce apoptosis mediante regulación negativa de Bcl-2 y regulación positiva de caspasa-3, así como de regulación de telomerasa en células de hepatocarcinoma (Pryme et. al., 2006). Estudios con extractos han mostrado que el extracto de viscotoxina auxilia en la citotoxicidad mediada por células NK y linfocitos T citotóxicos para el incremento de lisis de las células blanco. Pueden inducir desestabilización de la membrana celular (Tabiasco et. al., 2002).

Por otra parte, las lectinas de muérdago chino 1 (CM-1) han sido reportadas en tener actividad anti-neoplásica en cáncer de colon mediante la regulación negativa de la expresión miR-135a&b y aumentando la expresión de APC (Adenomatous polyposis coli), su gen blanco. Esto resulta en la disminución de la actividad “río abajo” de la vía Wnt (Fu et. al., 2011). La señalización Wnt controla los niveles de β -catenina, afectando la expresión de genes. Esta interferencia se ha correlacionado con el 90% de los casos de cáncer de colon (Yau et. al., 2015).

4.2 Lectinas RAB y ricina

La lectina RAB (*Rice bran agglutinin*, Aglutinina de salvado de arroz) contribuye a la condensación de cromatina, fragmentación nuclear, liberación de DNA y externalización de fosfatidilserina membranal en células U937 de leucemia monoblástica humana. Se ha observado experimentalmente que la ricina induce muerte celular mediante vías apoptóticas en células de linfoma de Hodgkin L540 mediante la regulación positiva de caspasa 8 y río abajo de caspasas 3/7, así como ejercen efectos sinérgicos con otros agentes antitumorales (Liu^a et. al., 2010).

4.3 Lectinas GNA

Las lectinas de ajo, aisladas de *Allium sativum* (*Allium sativum*-L) poseen efectos citotóxicos. Esta lectina inhibe la síntesis de DNA en células HL60 y U937 e induce apoptosis en las últimas a concentraciones menores a 100 μ g/mL. También se observa que es altamente resistente a

digestión in vitro con proteasas como pepsina, quimotripsina o tripsina, lo que indica que pudiera resistir proteólisis en el intestino, aunque aún no se sabe si es absorbida por las células epiteliales intestinales (Karasaki et. al., 2001).

La lectina *Polygonatum cyrtonema* (PCL) es una lectina de manosa/ácido siálico aislada de los rizomas de *Polygonatum cyrtonema* Hua, una planta utilizada frecuentemente en la medicina China tradicional. Se sintetiza como un polipéptido de 160 aminoácidos con una señal de secuencia N-terminal de 28 residuos y un polipéptido de ruptura en el C-terminal de 22. Una vez realizadas las rupturas, se obtiene un polipéptido maduro de 110 aminoácidos. Para conformar la estructura secundaria, se generan β -hoja plegadas conectadas por giros y vueltas (Liu et. al., 2013).

Las subunidades de PCL se unen a manosa. Estas subunidades tienen un sitio de unión a azúcar, denominado SBS I y contienen un motivo de unión a manosa conservado QDXNXVXT característico de las lectinas tipo GNA. Las subunidades tienen además otros sitios de unión, SBS II y SBS III. Estos tienen el motivo de unión a manosa con algunos residuos modificados lo que les permite unir a otros azúcares como el ácido siálico (Wang et. al., 2011).

PCL se ha reportado tener actividad tumoral en células cancerosas pero con baja citotoxicidad en células normales. Se ha observado que PCL induce apoptosis mediante vías dependientes de caspasas en células L929, la vía de ROS Mitocondrial-p38-p53 en células A375 y mediante el bloqueo de las vías Ras-Raf y PI3K-AKT en células L929. PCL también regula Bax, BCL-XL y BCL-2, que se observa en apoptosis en células A375. La interacción de PCL en las vías ROS-p38-p53, así como Ras-Raf y PI3K-AKT también se han observado que conllevan a muerte celular por autofagia, por lo que PCL puede inducir muerte celular de los dos tipos y que tanto el proceso apoptótico como autofágico pueden estar vinculados en la interacción de PCL. (Liu et. al., 2009; Liu^b et. al., 2010; Zhang et. al., 2010). En células A375 PCL induce autofagia mediado por mitocondria, con cambios estructurales autofágicos, cambios en la proporción de LC3-II/LC3-I y el incremento de Beclin1. (Zhang et. al., 2010).

Otra lectina tipo GNA es POL (*Polygonatum odoratum* Lectin), de unión específica a manosa. POL ha sido referida por Liu y colaboradores en 2009 en inducir apoptosis mediante vía dependiente de caspasas en células L929. Este proceso de apoptosis se inició mediante la vía de receptor de muerte al incrementar los niveles de FasL y FADD resultando en la activación de caspasa 8. Por otra parte, POL indujo al colapso de MMP, a la liberación de citocromo c y las activaciones de las caspasas 9 y 3 (Fu et. al., 2011). POL también se reportó como inhibitoria de células A549 de cáncer de pulmón mediante la supresión de la vía AKT-NF- κ B así como inducción de autofagia en estas células por el bloqueo de la vía AKT-mTORC. En células MCF-7 de cáncer de mama, POL indujo tanto apoptosis como autofagia mediante la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK (Fu et. al., 2011; Yau et. al., 2015).

4.4 Lectinas de leguminosas

Las lectinas de leguminosas son las más estudiadas por la base molecular de sus interacciones proteína-carbohidrato y en años recientes, el mayor interés de esta familia yace en su aplicación

como agente anti-tumoral al unirse específicamente a glicoconjugados en la superficie de células cancerosas (Liu et. al., 2011).

La concaivalina (ConA) es una lectina obtenida de *Canavalia ensiformis*, el frijol de machete, con especificidad en unión manosa/glucosa y dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ (Li et. al., 2011). Es la primera lectina de leguminosas reportada en ser purificada y cristalizada (Liu et. al., 2013). El monómero de ConA contiene 237 aminoácidos que forman dos β -hoja plegadas antiparalelas, empalmadas de tal forma que una β -hoja plegada “frontal” curvada consistiendo en siete hebras se alinea con una β -hoja plegada “trasera” plana de seis hebras. Estas dos hojas están conectadas por otra β -hoja plegada de 5 hebras “techo” desde el frente hasta la trasera. Dos monómeros ConA forman un dímero al acomodarse de forma adyacente, antiparalela y espalda con espalda. También se pueden acomodar dos dímeros para formar un tetrámero, aunque la ConA natural es un dímero (Li et. al., 2011).

Se ha encontrado que ConA puede llevar al colapso potencial de la transmembrana mitocondrial, a la liberación de citocromo c y activación de caspasas, desencadenando un proceso de apoptosis mediado por mitocondria en células de melanoma A375 humanas y en células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano, así como en células PU5-1.8 de macrófagos murinos y en células A375 de melanoma humano. (Liu et. al., 2013; Liu et. al., 2011). ConA se une directamente a la región extracelular de SHPS-2. SHPS-2 es una glicoproteína transmembranal multifuncional y su interacción con ConA lleva a la activación de AKT y secreción de MMP-9, metalopeptidasa-9 de matriz. También induce apoptosis al modificar la proporción de Bax/Bcl-2, inhibiendo la expresión de AKT y activando la vía de señalización FoxO1a-BIM en células de cáncer de ovario SKOV3 (Jiang et. al., 2015). Asimismo, se ha reportado que ConA regula positivamente a COX-2 y regula negativamente la expresión de AKT vía IKK/NK- κ B en células de glioblastoma U87 (Liu et. al., 2013).

En células deficientes en p53, ConA induce la expresión y activación de p73 y con ello apoptosis mediada por esta proteína y siguiendo la vía de señalización FoxO1a-BIM ya mencionada (Li et. al., 2011).

Estudios recientes también han mostrado el papel de ConA en muerte celular por autofagia. En células HepG2 se observó que ConA es internalizada como resultado de una unión con un residuo de manosa en glicoproteínas de membrana. Esta internalización se da mediante endocitosis mediada por clatrina. ConA se acumula rápidamente en la mitocondria, incrementando el cambio de potencial de membrana, lo que desencadena el proceso de autofagia (Chang et. al., 2007). Esto conlleva a la formación de LC3-II, vesículas de doble membrana, inducción de BNIP3 y organelos vesiculares ácidos. La señal de AKT también es alterada al regular negativamente la AKT fosforilada (Liu et. al., 2011).

ConA puede también activar el sistema inmune como un mitógeno de células T y estimular la producción de citosinas dentro de la masa tumoral, así como el reclutamiento de linfocitos (Chang et. al., 2007; Liu et. al., 2011). Después de la destrucción de células cancerosas mediante ConA, antígenos de células de hepatoma son procesadas y presentadas a linfocitos T CD4 y CD8,

estableciendo así inmunidad específica, lo que conlleva a resistencia del mismo tumor genotípico (Li et. al., 2011).

La lectina *S. flavescens* (SFL, S.flavescens lectin) puede inducir muerte celular de tumores mediante una vía apoptótica dependiente de caspasas, posiblemente mediante la vía de receptor de muerte. La lectina obtenida de *Phaseolus coccineus* L (*Phaseolus multiflorus* willd) induce apoptosis dependiente de caspasas en fibrosarcoma murino. Esta lectina tiene especificidad con el ácido siálico (Liu et. al., 2010).

4.1 Lectinas de *Vicia faba*

En 1999 se realizaron estudios con las lectinas de *Vicia faba*, VFA, en la proliferación celular, adhesión celular, incorporación de aminoácidos y en la diferenciación de tres líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colorrectal LS174T, SW1222 y HT29. Se observó agregación a 10µg/mL y la diferenciación morfológica relacionada con la adhesión de la molécula epCAM se incrementó. La proliferación de las células estudiadas fue alterada en una forma dosis-dependiente y reversible y la incorporación de aminoácidos se incrementó (Castillo et. al., 2005).

Macías obtuvo el extracto proteico de *Vicia faba* (EpVf) y realizó ensayos genotóxicos y antígenotóxicos para evaluar el efecto de éste en el DNA mediante la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), obteniendo además el Índice mitótico (IM) y el Índice de Replicación (IR). Reportó un IM de 0.50, lo que indica que no posee la capacidad de inducir a los linfocitos a la concentración de 1mg/mL pero sí a la concentración del extracto de 6mg/mL con un IM de 20.0. En el ensayo antígenotóxico utilizando MMC como mutágeno, encontrando que el EpVF mostraba diferencias significativas frente al control positivo, y que éste es capaz de contrarrestar el efecto producido por la MMC y permitiendo que las células entraran en mitosis. El IR obtenido no varió en concentraciones ni en tratamientos, mientras que el promedio de ICH de 5.84 indica que no induce la formación de intercambios de cromátidas hermanas y por tanto, no posee efectos genotóxicos en linfocitos y que es capaz de revertir el daño ocasionado por MMC. Finalmente, en el extracto se aislaron e identificaron 12 proteínas por electroforesis SDS-PAGE de las cuales se encontró a la lectina VFA en el EpVF y se cree que ésta ejerció el efecto antígenotóxico en el estudio (Macías, 2009).

4.2 Lectinas de *Pisum sativum*

En 1974 se aislaron proteínas del chícharo verde *Pisum sativum*, encontrando que la lectina del chícharo es una molécula tetramérica de dos subunidades α y dos subunidades β . Posee propiedades similares a Con A, como aglutinación de linfocitos y eritrocitos y propiedades mitogénicas (Trowbridge, 1974).

Kabir y colaboradores evaluaron el efecto de las lectinas de chícharo en células EAC (*Ehrlich ascites carcinoma*) mediante la prueba de MTT. La lectina mostró un efecto inhibitorio de 11.7-84% en un rango de concentraciones de 8 a 120µg/mL. En ratones adultos suizos albinos, la lectina de chícharo mostró un porcentaje de inhibición de las células EAC in vivo de 63 y 44% a dosis de

2.8mg/kg/día y 1.4mg/kg/día, respectivamente durante cinco días consecutivos. Al ser inyectada en ratones con células EAC durante 10 días, se observó un aumento significativo de la hemoglobina y conteo de glóbulos rojos (RBC) con disminución de los niveles de glóbulos blancos (WBC) que tendían a valores normales. Mediante microscopía óptica y de fluorescencia, se determinaron cambios morfológicos característicos de apoptosis en las células EAC tratadas provenientes de ratones. Se observó que la inhibición del crecimiento celular de la lectina se redujo considerablemente en presencia de inhibidores de caspasas. Por otra parte, el tratamiento por la lectina de chícharo indujo un arresto en la fase G₂/M de las células EAC y evaluación de la expresión por RT-PCR de los genes Bcl-2, Bcl-X y Bax mostró un aumento intensivo de la expresión de Bax y una casi nula expresión de Bcl-2 y Bcl-X en las células tratadas con las lectinas durante cinco días consecutivos (Kabir et. al., 2013).

Arreguín realizó una serie de pruebas en linfocitos humanos para determinar las características del extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs). Reportó que este extracto no posee capacidad mitogénica, comparado con la Fitohemaglutinina (PHA), pero que puede potencializar el efecto de esta lectina. Mediante la técnica de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH), se realizó un ensayo de genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto a diferentes concentraciones de EpPs, utilizando MMC como mutágeno. En el ensayo genotóxico se obtuvieron IMs de 24 a 28.5 en concentraciones de 1, 2 y 3mg/mL, lo que indica que el EpPs no interfiere en la división celular. Respecto al IR, se reportó una disminución con respecto al control en las concentraciones de 1 y 6mg/mL y 4 intercambios por metafase, lo que indica que el EpPs no genera daño al DNA. En el ensayo antigenotóxico, se observó que presentaron un aumento de 20-32 en el IM en comparación al control positivo y con un IR similar al ensayo genotóxico. En lo que respecta a la frecuencia de ICHs, se encontró que hay una relación entre la concentración del EpPs y su capacidad para contrarrestar el daño ocasionado por MMC, con la concentración de 3mg/mL generando una frecuencia de 23.84 (Arreguín, 2012).

5. Ensayo de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular se utilizan para estudiar un conjunto de compuestos para determinar si las moléculas de prueba tienen efectos en la proliferación celular o para mostrar efectos citotóxicos directos que lleven a muerte celular. En ellos, es importante calcular la cantidad de células viables remanentes al final del experimento. Existe una variedad de métodos utilizados para estimar el número de células eucariotas viables.

Entre ellos se encuentran ensayos de reducción de compuestos o actividad de proteasas. Estos ensayos, de forma general, miden un aspecto del metabolismo o actividad enzimática como un marcador de células viables. Requieren de la incubación de un reactivo con una población de células viables para convertir un sustrato en un producto de color o fluorescente que puede ser detectado en un lector de placa. Bajo condiciones de cultivo estándar, la incubación del sustrato con células viables resultará en la generación de una señal proporcional al número de células viables presentes. Cuando las células mueren, pierden rápidamente la capacidad de convertir el sustrato a un producto. Esta diferencia es la base de los ensayos de viabilidad celular.

5.1 Ensayo de reducción de tetrazolio

Existe una variedad de compuestos tetrazolio que se han utilizado para detectar células viables. Entre los más comunes se encuentran: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos se clasifican en dos categorías:

Los cargados positivamente, que penetran con facilidad las células eucariotas viables, y los cargados negativamente, que no penetran las células con facilidad. Estos compuestos necesitan de un aceptor de electrones intermediario que pueda transferir electrones del citoplasma o membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio en el compuesto colorido.

5.2 Ensayo de MTT

El ensayo de reducción de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) fue el primer ensayo de viabilidad celular homogéneo desarrollado para una placa de 96 pozos. Este ensayo permitía el cribado farmacológico de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*). El sustrato de MTT se prepara en una solución fisiológica balanceada, se añade a las células en cultivo en concentraciones de 0.2-0.5mg/mL y se incuba de 1 a 4 horas. La cantidad de formazán, directamente proporcional al número de células viables, se mide al registrar los cambios a una absorbancia de 570nm utilizando un espectrofotómetro lector de placas.

Las células viables con un metabolismo activo convierten el MTT en un producto formazán de color morado, con una absorbancia máxima cerca de los 570nm. Cuando las células mueren, pierden la habilidad de convertir el MTT en formazán, por lo que la formación de color sirve como una forma de marcar únicamente las células viables. El mecanismo celular de la reducción del MTT en formazán aún no se ha descubierto del todo, pero se cree que involucra una reacción con NADH o moléculas reductoras similares que transfieren electrones al MTT.

El producto formazán se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células, así como también se encuentra depositado cerca de la superficie celular y del medio de cultivo. Debe ser solubilizado antes de medir absorbancias. Entre los métodos de solubilización se encuentran el uso de: isopropanol acidificado, DMSO (dimetilsulfóxido), dimetilformamida, SDS y combinaciones de detergentes y solventes orgánicos (Riss et. al., 2004).

III. Justificación

El cáncer es un tema de alta importancia debido a que afecta tanto a los países de primer mundo, como a aquellos en vías de desarrollo. Es una enfermedad que no distingue entre edades, razas ni estratos sociales. Como se ha mencionado, la incidencia de casos es muy alta, en nuestro país ocupa la tercera posición en causa de muerte y cada año se diagnostican más casos. Es una enfermedad producto del aumento de la esperanza de vida así como la culminación de otros factores, como malos hábitos alimenticios, exposición a sustancias cancerígenas, el componente genético del individuo, entre otros.

Uno de los principales problemas radica en los tratamientos, cuya alta toxicidad impide un efecto eficaz y selectivo, donde únicamente las células tumorales sean las afectadas. Por otra parte, aún si un grupo de individuos presenta el mismo tipo de cáncer, no necesariamente reaccionarán favorablemente a un tratamiento. La prognosis varía de individuo a individuo y hasta la fecha el concepto de fármacos individualizados y preparados en base al componente genético de cada persona no se ha vuelto una realidad. Por lo tanto, la investigación se ha enfocado en dos ramas: el descubrimiento de moléculas quimioprotectoras, es decir, capaces de evitar la transformación de las células, y el desarrollo de fármacos que tengan como blanco única y exclusivamente las células cancerosas en base a las características únicas de ellas en comparación con células normales. Es decir, se ha enfocado en prevención temprana del cáncer y en tratamientos selectivos.

Entre estos fármacos se encuentran dos tipos diferentes: los derivados del Ester Fenílico del Ácido Caféico (CAPE) y las lectinas. El CAPE ha presentado una alternativa prometedora como quimioprotector, sin embargo, su complejidad al extraerse ha generado el desarrollo de varias moléculas. Entre ellas se encuentra la línea LQM 700 sintetizada por el Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán. Estos compuestos, derivados amidados, en lugar de ésteres han sido evaluados en modelos de ratón y han mostrado efectos antígeno-tóxicos pero se debe evaluar su efecto citotóxico.

Por otra parte, las lectinas han sido ampliamente estudiadas por su selectividad y diversos efectos apoptóticos. Las lectinas obtenidas del muérdago se están utilizando como adyuvantes en la quimioterapia. El Lyzthel es un fármaco de lectinas de haba y chícharo obtenidas de especies que se dan en nuestro país, y se espera que este fármaco tenga propiedades citotóxicas en células tumorales.

Por estas razones, en este trabajo experimental se evaluaron los efectos citotóxicos de los compuestos LQM 731 y 738, así como el fármaco Lyzthel con lectinas de haba y chícharo en la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa mediante la prueba de MTT.

IV. Objetivos

Objetivo General

1.- Evaluar el efecto citotóxico de los compuestos CAPA LQM 731, LQM 738 y del fármaco experimental Lyzthel mediante la prueba de reducción del tetrazolio MTT en la línea celular HeLa, para caracterizar *in vitro* su potencial quimioprotector.

Objetivos Particulares

1.- Estudiar la acción citotóxica de los compuestos CAPA LQM 731 y LQM 738 disueltos en DMSO, comparando su acción en función de sus características estructurales.

2.- Estudiar la acción citotóxica del fármaco experimental Lyzthel .

3.- Determinar estadísticamente la CI_{50} de cada uno de los compuestos.

V. Metodología

Procedencia de las células HeLa

Las células HeLa utilizadas en todos los experimentos realizados fueron adquiridas en In Vitro S.A. de C.V. quien testifica la autenticidad de la colonia celular.

Experimentos con Células HeLa

Se incubaron células HeLa con medio DMEM, con 10% Suero Fetal Bovino HyClone y 0.5mL/100mL de antibiótico Estreptomicina/Penicilina a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Se realizaron pases cada tercer día con 80% de confluencia.

Preparación de reactivos

Se prepararon soluciones stock de 1mg/mL de los LQM 731 y 738, diluidos en 100% DMSO grado Biología Molecular. A partir del stock, se preparó una solución de LQM 731 de 200µg/mL, diluido en 50% DMSO y 50% Medio de cultivo. En el caso del LQM 738, se preparó una solución 200 µg/mL en 100% DMSO.

Prueba de MTT

Para realizar las pruebas de MTT, previo a la preparación de la placa, se tripsinizaron (0.5X) cajas Petri con 80% de confluencia y se resuspendieron en 3mL de medio DMEM. La suspensión se pasó a tubos Eppendorf de 1.5mL estériles y se tomaron 10µl por duplicado para contabilizar en placas de lectura para contador celular. A partir de la concentración celular de la suspensión, se tomaron los microlitros equivalentes a 10000 células que se agregaron por pozo en placas ELISA de 96, y cada pozo se aforó con medio a un volumen de 200µL

Pasadas 24 horas de incubación, se retiraron los medios y se colocaron: 200 µl de medio para los controles negativos, el equivalente a X% de H₂O₂ para los controles positivos, aforando a 200µl con medio. Para las pruebas de los LQM 731 y 738, se tomaron microlitros de soluciones de 200µg/mL de compuesto aforando a 200µl con medio de tal forma que se trabajaron concentraciones de 2.5 µg/mL hasta 20µg/mL por compuesto.

En el caso del compuesto Lyzthel, se realizaron dos determinaciones. En la primera, se aumentó de 1µl en 1µl el compuesto sin diluir, aforando a 200µl con medio. En la segunda, se aumentó de 5µl en 5µl la cantidad de compuesto sin diluir, iniciando de 5µl hasta los 50µl, aforando a 200µl con medio. Las placas se incubaron por 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se agregó por pozo 20µl de reactivo MTT 5mg/mL en PBS. Se agitaron las placas y se incubaron en oscuridad a 37°C durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se agregaron 100µl de DMSO 100% Grado Biología Molecular por pozo. Se agitó la placa y se leyó en EPOC Marca BIOTECK a 570nm.

Análisis de resultados

Las pruebas se realizaron por triplicado. A partir de los valores de las lecturas del espectrofotómetro se calculó el porcentaje de viabilidad celular. Se consideró el promedio de las mediciones de las células sin tratamiento como el 100% de viabilidad por estudio. Después, se convirtieron los resultados de absorbancia en porcentaje de viabilidad siguiendo la fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia de células tratadas}}{\text{Absorbancia del promedio de controles}} \times 100$$

Una vez obtenidos los datos en porcentaje de viabilidad, se promediaron entre repeticiones.

Se diseñó la curva dosis respuesta considerando el rango de concentración utilizada y el porcentaje de viabilidad obtenido. Con los resultados obtenidos, se calculó el IC₅₀. Mediante el programa GraphPad Prism 5, se realizó una regresión no lineal del logaritmo de la concentración y el porcentaje de viabilidad obtenido para cada compuesto y condición para obtener la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀).

VI. Resultados y Discusión

Los compuestos CAPA elaborados por el grupo de investigación del Dr. Enrique Ángeles Anguiano han mostrado ser una alternativa prometedora como quimioprotector en los ensayos *in vivo* en modelos de ratón. Los trabajos de Hernández, Cruz y Aguilar en 2013 y 2014 han demostrado que los LQM 731, 738 y 755 tienen capacidad antigenotóxica, lo que los hace atractivos como compuestos de prevención de cáncer. Otra característica de los compuestos CAPA diseñados por el Dr. Yang es su capacidad citoprotectora y toxicidad menor que la de compuestos CAPE. Algunos de los análogos fluorados de CAPA mostraron gran capacidad citoprotectora y baja o nula citotoxicidad (Yang et. al., 2010).

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la capacidad citotóxica de los compuestos LQM en líneas celulares HeLa. Los compuestos LQM son insolubles en agua, característica fisicoquímica importante que ha limitado su implementación en cultivo celular. De los tres compuestos el LQM 731 es el más soluble en agua mientras que el LQM 755 es el menos soluble, necesitando aceite de maíz como solvente (Aguilar, 2014). Estos compuestos son altamente solubles en DMSO y etanol, así como cloroformo y éter etílico, que por sus características imposibilita su implementación en cultivo celular. En pruebas preliminares cuyos resultados no se reportan en este trabajo, se encontró que estos compuestos tienen mayor estabilidad al estar solubilizados en DMSO. El uso de etanol implica que pasado un periodo de tiempo, los compuestos LQM 731 y 738 tienden a precipitarse en forma de cristales largos. Esta precipitación afecta no sólo en la concentración efectiva en los pozos de placa ELISA, sino que también implica un posible daño mecánico de los cristales en la línea celular, generando citotoxicidad que no se debe al efecto propiamente químico del compuesto. A lo largo del desarrollo experimental, se buscó la metodología experimental más adecuada para realizar la determinación de la citotoxicidad, debido a las características particulares de los compuestos LQM. Se realizaron pruebas con nanopartículas, así como la utilización de diferentes concentraciones de trabajo. Por las características de solubilidad, se utilizaron únicamente los LQM 731 y 738 y se utilizó DMSO como solvente.

Sin embargo, el empleo de DMSO como solvente no garantizó que los compuestos no se precipitaran en los pozos durante la experimentación. Previa a la evaluación con MTT, se realizó un ensayo a diferentes concentraciones de LQM para determinar la concentración máxima en que el compuesto se podía encontrar sin precipitarse en el medio, determinándose así la concentración de 20mg/μl. El compuesto 731 se trabajó en dos formas, la primera en su disolución en 100% de DMSO y en otro ensayo disolviéndose en 50% de DMSO y 50% del medio de cultivo utilizado. El compuesto 738 por su solubilidad únicamente se trabajó partiendo de una solución de 100% de DMSO, ya que concentraciones menores de éste generaban cristales.

En la Tabla 1 se observan los resultados de la prueba de MTT del LQM 731 disuelto en 100% de DMSO.

Tabla 1. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del LQM 731 disuelto en 100% DMSO.

Tratamiento	% de viabilidad	STD	Error estándar
Sin tratamiento	100.00	8.077	3.298
H ₂ O ₂ (Ctrl positivo)	19.115	0.722	0.295
DMSO	27.389	14.808	6.045
LQM731 2.5 ug/mL	47.071	18.815	7.681
LQM731 5 ug/mL	33.532	16.133	6.586
LQM731 7.5 ug/mL	21.633	8.733	3.565
LQM731 10 ug/mL	19.126	5.311	2.168
LQM731 12.5 ug/mL	20.131	7.764	3.170
LQM731 15 ug/mL	19.375	7.964	3.251
LQM731 17.5 ug/mL	19.867	6.463	2.639
LQM731 20 ug/mL	17.713	6.531	2.666

La figura 12 muestra la gráfica de estos resultados, reportándose en porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo.

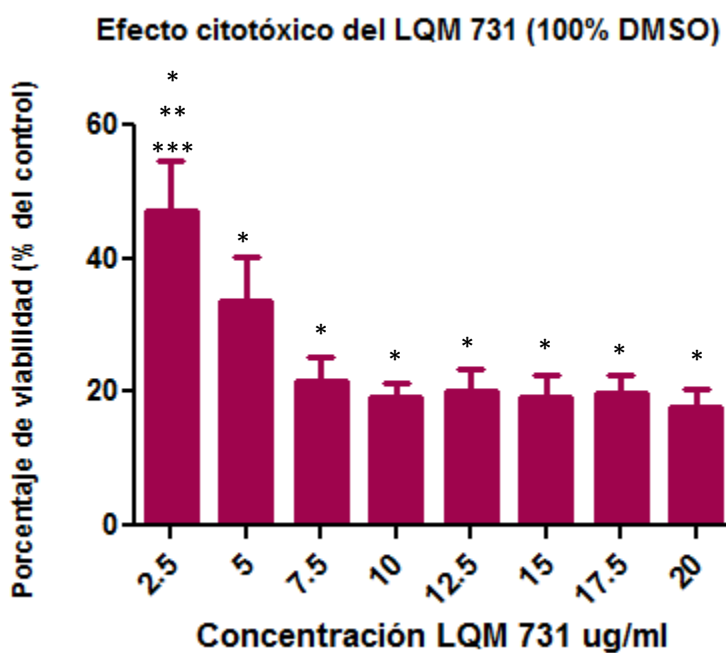


Figura 12. Resultados del efecto citotóxico del LQM 731 disuelto en 100% de DMSO en células HeLa mediante la prueba de MTT.

*Diferencias consideradas significativas respecto al control negativo (ANOVA, $p < 0.05$)

**Diferencias consideradas significativas respecto al control positivo (ANOVA, $p < 0.05$)

***Diferencias consideradas significativas respecto al control de vehículo DMSO (ANOVA, $p < 0.05$)

En esta gráfica se observa una tendencia sigmoide y donde las ocho concentraciones estudiadas de 2.5 a 20mg/ μ l, las cuales se incrementaron de 2.5 en 2.5 mg/ μ l, presentan una diferencia significativa de efecto citotóxico respecto a las células HeLa sin tratamiento con viabilidades celulares menores al 50% y la mayoría oscilando entre el 19 y 20% de viabilidad celular. Por otra parte, se observa que únicamente la concentración de 2.5mg/ μ l presenta diferencias significativas respecto al control positivo así como al control de vehículo de DMSO. Esto indica que el daño citotóxico ocasionado a partir de la concentración de 5mg/ μ l y en concentraciones ascendentes es muy semejante al daño generado tanto por el DMSO como el H₂O₂. De tal forma, se presume que en este ensayo no se puede determinar el efecto del daño generado propiamente por el compuesto 731 y el efecto generado por el mismo vehículo. Estos resultados preliminares condujeron a repetir la prueba disminuyendo la cantidad de DMSO.

En la figura 13 se representan de forma gráfica los resultados reportados en la tabla 2 refiriendo el porcentaje de viabilidad celular de las células HeLa frente al LQM 731 disuelto en 50% de DMSO.

Tabla 2. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del LQM 731 disuelto en 50% DMSO.

Tratamiento	% de viabilidad	STD	Error estándar
Sin tratamiento	100.000	7.555	4.362
H ₂ O ₂ (Ctrl positivo)	17.013	1.661	0.959
DMSO	21.806	6.524	4.613
LQM731 2.5 ug/mL	69.565	7.814	5.525
LQM731 5 ug/mL	59.431	3.801	2.688
LQM731 7.5 ug/mL	55.620	0.888	0.628
LQM731 10 ug/mL	51.919	0.193	0.136
LQM731 12.5 ug/mL	33.742	5.972	4.223
LQM731 15 ug/mL	33.175	15.313	10.828
LQM731 17.5 ug/mL	23.938	6.553	4.634
LQM731 20 ug/mL	22.549	5.592	3.954

En la gráfica 13 se continúa observando una tendencia sigmoide; sin embargo, ésta no es tan marcada como la presente en la figura 12. En la gráfica 13 se puede observar que únicamente 4 concentraciones evaluadas, desde 12.5 hasta 20 μ g/mL presentan una disminución de viabilidad celular con diferencia significativa con respecto al control negativo, lo que señala estas concentraciones como citotóxicas a las células HeLa. Asimismo, al no presentar diferencia con respecto al control positivo, se puede comparar el daño ocasionado por estas concentraciones como similar al ocasionado por H₂O₂. Esto nos indica que a partir de la concentración de 12.5 μ g/mL hay un efecto citotóxico considerable similar al que se genera con el control positivo con viabilidades celulares de 46.519% hasta de 25.241%.

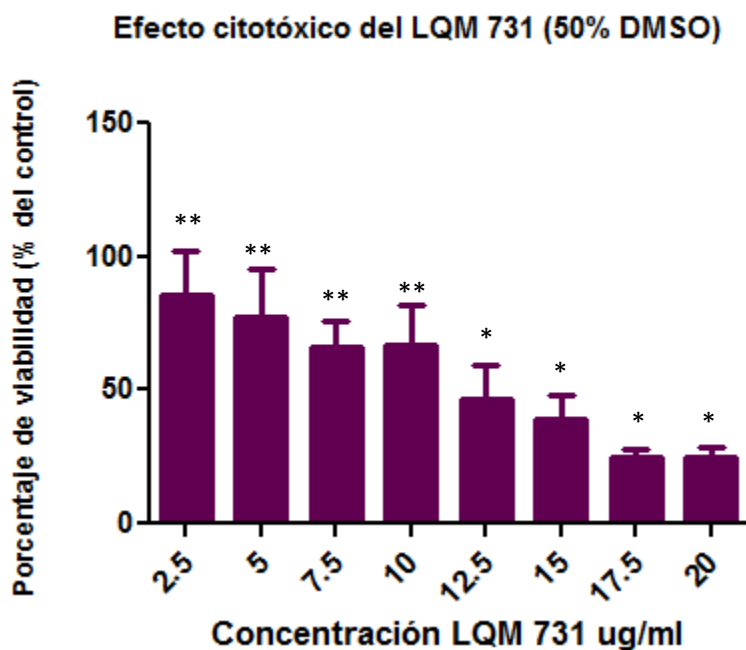


Figura 13. Resultados del efecto citotóxico del LQM 731 disuelto en 50% de DMSO en células HeLa mediante la prueba de MTT.

*Diferencias consideradas significativas respecto al control negativo (ANOVA, $p < 0.05$)

**Diferencias consideradas significativas respecto al control positivo (ANOVA, $p < 0.05$)

Se puede destacar la diferencia considerable en citotoxicidad a diferentes concentraciones de DMSO, ya que en concentraciones altas de éste, el efecto citotóxico se puede observar incluso en concentraciones de 5, 7.5 y 10mg/ μ l que resultan ser comparativamente no tan citotóxicas cuando se encuentran disueltas en 50% de DMSO. Por lo tanto, se pudiera sugerir que la citotoxicidad observada en concentraciones con 100% de DMSO se debe en parte al vehículo.

Con respecto a los resultados del LQM 738, éstos se pueden observar en la Tabla 3 y la Figura 14. Similar a los resultados obtenidos para el LQM 731 a 100% de DMSO, el compuesto 738 presenta citotoxicidad respecto al control negativo en todas las concentraciones analizadas. A partir de la concentración de 15mg/ μ l se observa la mayor citotoxicidad, con viabilidad del 21.647% y las concentraciones de 17.5 y 20mg/ μ l presentan porcentajes similares. De todas estas concentraciones, sólo una es menos tóxica que la observada con el control positivo, siendo la concentración de 2.5mg/ μ l. Por otra parte, no se observan diferencias significativas entre el LQM 738 y el control de DMSO lo que dificulta la determinación del daño generado por el compuesto y aquél causado por el vehículo. A diferencia del LQM 731, una solución de LQM 738 disuelta en 50% de medio y 50% de DMSO es inestable y el compuesto no se puede disolver debido a su mayor hidrofobicidad con respecto al LQM 731. Por esta característica, no fue posible trabajar en otras condiciones para discernir entre los efectos del LQM 738 y aquellos del DMSO.

Tabla 3. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del LQM 738 disuelto en 100% DMSO.

Tratamiento	% de viabilidad	STD	Error estándar
Sin tratamiento	100	6.709	2.739
H ₂ O ₂ (Ctrl positivo)	21.928	1.700	0.694
DMSO	28.922	8.141	3.324
LQM738 2.5 ug/mL	51.231	29.846	12.185
LQM738 5 ug/mL	40.969	18.339	7.487
LQM738 7.5 ug/mL	30.045	15.230	6.218
LQM738 10 ug/mL	28.895	13.260	5.414
LQM738 12.5 ug/mL	29.258	16.763	6.844
LQM738 15 ug/mL	21.647	8.159	3.331
LQM738 17.5 ug/mL	22.173	8.330	3.401
LQM738 20 ug/mL	24.774	11.106	4.534

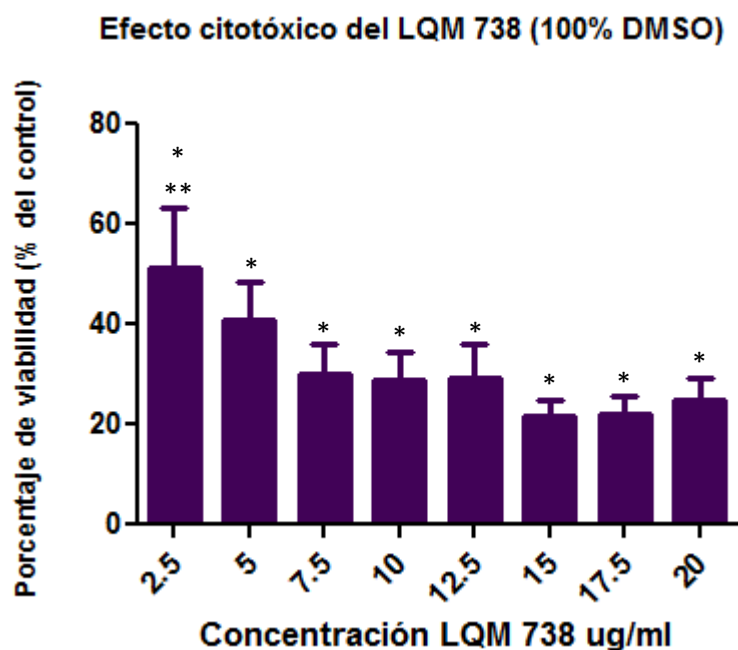


Figura 14. Resultados del efecto citotóxico del LQM 738 disuelto en 100% de DMSO en células HeLa mediante la prueba de MTT.

*Diferencias consideradas significativas respecto al control negativo (ANOVA, $p < 0.05$)

**Diferencias consideradas significativas respecto al control positivo (ANOVA, $p < 0.05$)

Para el análisis del fármaco experimental Lyzthel, que contiene lectinas de chícharo y haba, se realizó una prueba preliminar para determinar el rango a utilizar en el experimento. En la tabla 4 y figura 15 se reportan estos resultados.

Tabla 4. Resultados de la prueba preliminar de viabilidad celular con MTT del fármaco Lyzthel.

Tratamiento	% de viabilidad	STD	Error estándar
Sin tratamiento	100.000	8.936	5.159
H ₂ O ₂ (Ctrl positivo)	33.841	2.319	1.339
0.033 µg/mL Lyzthel	112.895	18.787	10.847
0.067 µg/mL Lyzthel	111.096	19.642	11.340
0.100 µg/mL Lyzthel	95.382	2.087	1.205
0.133 µg/mL Lyzthel	90.499	8.999	5.195
0.167 µg/mL Lyzthel	85.978	9.052	5.226
0.200 µg/mL Lyzthel	89.751	3.189	1.841
0.233 µg/mL Lyzthel	78.979	4.748	2.741
0.266 µg/mL Lyzthel	86.426	15.487	8.942
0.300 µg/mL Lyzthel	110.711	13.450	7.765
0.333 µg/mL Lyzthel	107.835	15.220	8.788
0.366 µg/mL Lyzthel	89.396	8.588	4.958
0.400 µg/mL Lyzthel	88.771	11.287	6.517
0.433 µg/mL Lyzthel	87.270	3.493	2.017
0.466 µg/mL Lyzthel	90.368	5.753	3.322
0.500 µg/mL Lyzthel	85.520	9.242	5.336
0.533 µg/mL Lyzthel	78.199	18.756	10.829

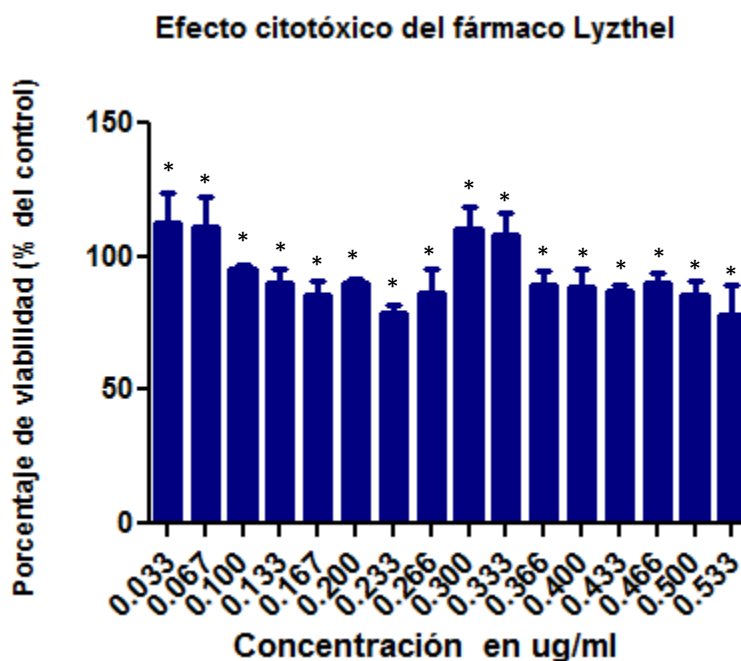


Figura 15. Resultados preliminares del efecto citotóxico del fármaco Lyzthel en células HeLa mediante la prueba de MTT.

*Diferencias consideradas significativas respecto al control positivo (ANOVA, $p < 0.05$)

En las primeras concentraciones evaluadas, en un rango de 0.033 a 0.533µg/mL, no existe diferencia significativa entre las células sin tratamiento y las células tratadas con Lyzthel. Debido a esto, se amplió el rango utilizado desde 0.167 a 2.664µg/mL de Lyzthel como se observa en la tabla 5 y figura 16.

Tabla 5. Resultados de la prueba de viabilidad celular con MTT del fármaco Lyzthel.

Tratamiento	% de viabilidad	STD	Error estándar
Sin tratamiento	100.000	5.165	2.109
H ₂ O ₂ (Ctrl positivo)	33.528	3.173	1.295
0.167 µg/mL Lyzthel	96.553	14.120	8.152
0.333 µg/mL Lyzthel	79.369	14.841	8.569
0.500 µg/mL Lyzthel	76.061	10.317	5.956
0.666 µg/mL Lyzthel	70.243	9.332	5.388
0.833 µg/mL Lyzthel	57.002	9.909	5.721
0.999 µg/mL Lyzthel	53.596	5.029	2.903
1.166 µg/mL Lyzthel	51.006	7.466	4.310
1.332 µg/mL Lyzthel	57.243	11.130	6.426
1.499 µg/mL Lyzthel	63.647	15.000	8.660
1.665 µg/mL Lyzthel	53.373	10.382	5.994
1.832 µg/mL Lyzthel	47.969	3.506	2.024
1.998 µg/mL Lyzthel	44.433	6.157	3.555
2.165 µg/mL Lyzthel	35.774	5.294	3.056
2.331 µg/mL Lyzthel	34.720	5.789	3.342
2.498 µg/mL Lyzthel	33.018	7.108	4.104
2.664 µg/mL Lyzthel	38.163	9.419	5.438

En esta segunda prueba se observa que a partir de la concentración de 0.500µg/mL hasta la más alta de 2.664µg/mL se observan diferencias significativas entre las células sin tratamiento. Asimismo, se observa que el daño ocasionado por Lyzthel a partir de las concentraciones de 1.832µg/mL no presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo, lo que nos indica daños considerables a estas concentraciones, que se ven reflejados en porcentajes de viabilidad que oscilan entre 40 y 30% de viabilidad celular.

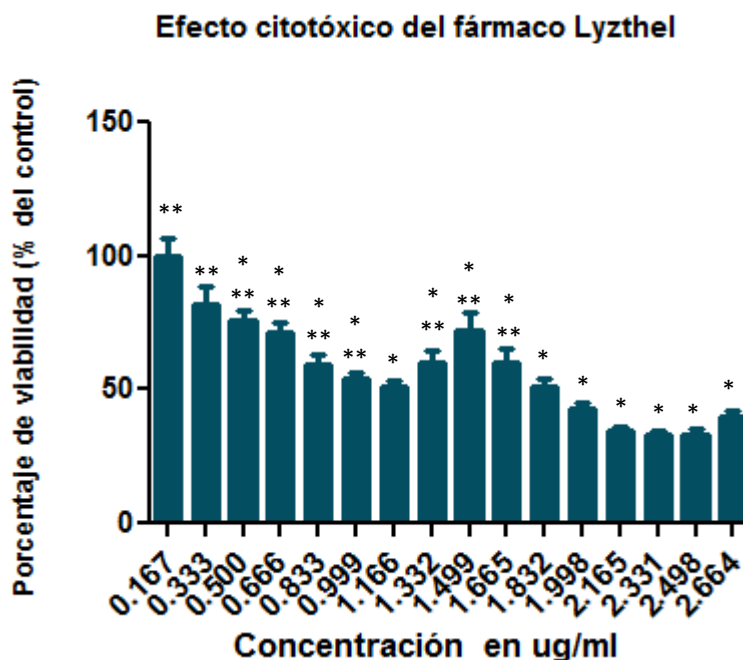


Figura 16. Resultados del efecto citotóxico del fármaco Lyzthel en células HeLa mediante la prueba de MTT.

*Diferencias consideradas significativas respecto al control negativo (ANOVA, $p < 0.05$)

**Diferencias consideradas significativas respecto al control positivo (ANOVA, $p < 0.05$)

Con los resultados obtenidos, se realizó el cálculo de la CI_{50} de los compuestos evaluados, como se reporta en la tabla 6.

Tabla 6. CI_{50} de los compuestos estudiados.

Compuesto	CI_{50}	R^2
LQM 731 100% DMSO	0.7523µg/mL	0.9149
LQM 731 50% DMSO	7.504µg/mL	0.9062
LQM 738	0.2058µg/mL	0.7062
Lyzthel	1.549µg/mL	0.7412

Respecto a lo obtenido por regresión no lineal de los datos para el LQM 731, se observó que el 731 con 100% de DMSO presentó una CI_{50} de 0.7523µg/mL. Como se puede observar en la figura 12, la concentración más baja, de 2.5µg/mL, presenta en un inicio una viabilidad inferior al 50%. Es por lo tanto razonable considerar que la CI_{50} se encuentre fuera del rango de concentraciones estudiado, lo que concuerda con el dato obtenido por regresión no lineal y cuya R^2 de 0.9149 respalda que el modelo se ajusta a este comportamiento. Debido a que no se estudiaron concentraciones entre 0 y 2.5µg/mL, no es posible dilucidar cómo es el comportamiento de la gráfica, por lo que se tendrían que evaluar concentraciones inferiores para determinarlo. Por otra parte, el comportamiento se modificó al evaluar el LQM 731 a 50% de DMSO. Como se puede

corroborar en la figura 13, se amplió el rango con viabilidades superiores al 50% y de acuerdo a los cálculos para obtener la CI_{50} , se observa que ésta es de 7.504, aproximadamente 10 veces mayor al producido por el LQM 731 al 100%. La R^2 comprueba que estos datos se ajustan al modelo, por lo que se puede asumir que esta diferencia en daño citotóxico está dada por la diferencia en concentración del solvente DMSO, donde a mayor concentración de DMSO, mayor efecto citotóxico.

En el caso del compuesto 738, sólo se hizo una evaluación. La CI_{50} calculada para estos resultados, en la tabla 3 es de 0.2058 μ g/mL, con una R^2 menor que pudiera indicar un problema durante la realización del experimento. Sin embargo, al igual que lo observado en el caso de la figura 12 y los resultados del 731 a 100% de DMSO, se observa un comportamiento del efecto citotóxico superior al 50% en la concentración más baja evaluada. Esto indica que entre el rango de 0 y 2.5 μ g/mL se encuentra la CI_{50} para el 738, que coincide con el resultado obtenido mediante regresión no lineal.

Una de las grandes dificultades en este experimento fue la solubilidad de los LQM700's. Al ser muy insoluble en agua, fue necesario trabajar con concentraciones altas de DMSO, en un rango de 0.64M y 1.4M.

En un estudio trabajando con líneas celulares HeLa se reporta que en los controles de células HeLa se observó una viabilidad del 73.13% utilizando una concentración de DMSO de 1.4 μ M a las 24 horas de exposición (Şimşek et. al., 2015). Por lo tanto, era de esperarse que concentraciones mayores generaran un daño mayor a las células.

Durante el desarrollo experimental, se utilizaron nanopartículas para disolver el compuesto 731. Los sistemas de distribución de fármacos a nanoescala han mostrado la habilidad para encapsular una variedad de agentes terapéuticos como moléculas pequeñas hidrofílicas y/o hidrofóbicas, fármacos basados en péptidos y ácidos nucleicos. Al encapsular las moléculas en un transportador, se mejora la solubilidad y estabilidad de los fármacos (Dinarvand et. al., 2011). Las nanopartículas sintetizadas fueron de PLGA. Éstas han sido estudiadas por su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y fuerza mecánica. Son fáciles de acoplar a mecanismos de distribución para el transporte de diversos agentes activos como vacunas, péptidos, proteínas y micromoléculas (Dinarvand et. al., 2011).

Sin embargo, por falta de un método de cuantificación de los LQM, no se pudo continuar con este procedimiento. Al verse una interferencia del DMSO en las pruebas de citotoxicidad de los compuestos, este trabajo resalta la necesidad de buscar otras alternativas para mejorar la solubilidad de los LQM. Entre ellas se podría volver a trabajar con nanopartículas y enfocarse en la implementación de una técnica de cuantificación de los compuestos. De esta forma, se podrían realizar estudios de citotoxicidad en células HeLa y otras líneas celulares y así evaluar propiamente el efecto citotóxico de los compuestos.

En el caso de las lectinas de chícharo y haba, en la tabla 6 se refiere la CI_{50} de Lyzthel obtenida de los resultados del segundo ensayo de citotoxicidad, reportándose de 1.549 μ g/mL con una R^2 de 0.7412, la cual nos indica de posibles cuestiones a nivel experimental que sin embargo, indican

que se sigue el comportamiento de una gráfica sigmoidea. Kabir reportó que rangos de concentraciones de 8 a 120µg/mL de lectina de chícharo mostraban efectos inhibitorios de 11.7-84% en células EAC (Kabir et. al., 2013). Estudios citotóxicos de lectinas de haba no han sido reportados. Sin embargo, se observa una diferencia entre la IC₅₀ de Lyzthel y los rangos reportados por Kabir, necesitándose una menor concentración de fármaco Lyzthel para causar daño citotóxico. Esto se pudiera deber a diversos factores: el primero, que Lyzthel está compuesto tanto por lectinas de chícharo como de haba mientras que Kabir y colaboradores en 2013 evaluaron únicamente lectinas de chícharo. También se debe mencionar que las líneas celulares son distintas. Como se ha descrito en los diversos estudios citotóxicos de lectinas en diferentes líneas celulares, existe la posibilidad que las lectinas de chícharo y haba sean más citotóxicas en células HeLa que en células EAC. Al no tenerse estudios comparativos de los efectos de las lectinas aisladas y administradas en conjunto, no se puede determinar a qué grado cada tipo de lectina influyó en la citotoxicidad en células HeLa.

Es importante señalar que en la actualidad los estudios de las lectinas de chícharo y haba son limitados. Arreguín (2012) y Macías (2009) realizaron estudios de genotoxicidad y antigenotoxicidad de extractos proteicos mas no de las lectinas aisladas. Por otra parte, los estudios de citotoxicidad de estas lectinas frente a líneas celulares son menores, en especial comparado a la investigación de las lectinas de muérdago, que son de las más estudiadas y utilizadas, inclusive como adyuvantes en quimioterapia y radioterapia (Liu et. al., 2011). Sin embargo, de los resultados obtenidos, se observa que la administración conjunta de estas lectinas y sus nulas características citotóxicas en linfocitos como lo reportado por Arreguín y Macías muestran que las lectinas de chícharo y haba son alternativas prometedoras a continuar estudiando. Para ello es necesario que se realicen estudios de citotoxicidad por separado para determinar qué tan citotóxica es cada tipo de lectina en células HeLa y si existiera un sinergismo al administrarse juntas.

VII. Conclusiones

Se evaluó el efecto citotóxico de los compuestos LQM 731 y 738 mediante la prueba de MTT en la línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino encontrándose que la citotoxicidad presentada por estos compuestos pudiera ser tanto del LQM como del vehículo en el que se disuelve. Se determinó la CI_{50} aproximada para el LQM 731 a 100% y 50%, siendo éstas de 0.7523 μ g/mL y de 7.504 μ g/mL, respectivamente. La CI_{50} para el LQM 738 es de 0.2058 μ g/mL.

Se evaluó el efecto citotóxico del fármaco Lyzthel mediante la prueba de MTT en la línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino encontrando que el rango de concentraciones 0.500-2.664 μ g/mL presenta citotoxicidad estadísticamente significativa frente a células sin tratamiento. La CI_{50} de Lyzthel en células HeLa es de 1.549 μ g/mL.

VIII. Perspectivas a futuro

8.1 Mejorar la solubilidad de los compuestos LQM731 y 738 para facilitar tanto su administración como su evaluación en cultivos celulares.

8.2 Continuar con el desarrollo de un método de cuantificación y elaboración de nanopartículas para los compuestos LQM731, 738 y potencialmente 755 para aumentar la solubilidad de éstos.

8.3 Evaluar los LQM 731 y 738 con estas mejoras en solubilidad para determinar su citotoxicidad.

8.4 Realizar estudios antigenotóxicos y genotóxicos en cultivo celular de los LQM 731 y 738.

8.5 Continuar los estudios citotóxicos de Lyzthel en nuevas líneas celulares malignas así como en linfocitos.

8.6 Realizar estudios de Lyzthel de citotoxicidad y genotoxicidad *in vivo*.

8.7 Evaluar el potencial sinérgico de las lectinas de chícharo y haba en modelos *in vivo* e *in vitro*.

IX. Referencias

1. Aguilar R.K.L. 2014. Evaluación del efecto genotóxico y antigenotóxico del análogo del éster fenetílico derivado del ácido caféico LQM 755 mediante electroforesis unicelular en ratones CD1. Tesis de Licenciatura BQD. FES-Cuautitlán. UNAM.
2. Amelio I., Melino G. y Knight R.A. 2011. Cell death pathology: Cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **414**:277-281.
3. Arreguín B.Y. 2012. Extracción, identificación y evaluación antigenotóxica del extracto proteico de *Pisum sativum* mediante la técnica de intercambios de cromátides hermanas *in vitro* en linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura QFB. FES-Cuautitlán. UNAM.
4. Basini G., Baioni L., Bussolati S., Grasselli F., Daquino C., Spatafora C. y Tringali C. 2012. Antiangiogenic properties of an unusual benzo[k,l]xanthene lignan derived from CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester). *Investigational New Drugs*. **30**: 186-190.
5. Beltrán R.O., Alemán L.L., Salcido N.M., Hernández G.S., Fattel F.S., Arce P.E., Arellanes R.J., García R.R., Vázquez V.P., Sierra S.A. y Villa T.S. 2008. Evidence that the Anticarcinogenic Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Resistant Hepatocyte Model Involves Modifications of Cytochrome P450. *Toxicological Sciences*. **104**(1):100-106.
6. Boudreau L.H., Maillet J., LeBlanc L.M., Jean-Francois J., Touaibia M., Flamand N., y Surette M.E. 2012. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Amide Analogue Are Potent Inhibitors of Leucotriene Biosynthesis in Human Polimorphonuclear Leukocytes. *PLoS One*. **7**(2): 1-7.
7. Castillo V.A. y Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*. **57**(1):55-64.
8. Chang C.P., Yang M.C., Liu H.S., Lin Y.S. y Lei H.Y. 2007. Concanavalin A Induces Autophagy in Hepatoma Cells and Has a Therapeutic Effect in a Murine *In Situ* Hepatoma Model. *Hepatology*. **45**(2):286-296.
9. Chen M.F., Wu C.T., Chen Y.J., Keng P.C. y Chen W.C. 2004. Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *Journal of Radiation Research*. **45**:253-260.
10. Cruz V.L. 2014. Evaluación de la capacidad genotóxica y antigenotóxica del compuesto LQM738 análogo del CAPE mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel, en ratones CD1. Tesis de Licenciatura QFB. FES-Cuautitlán. UNAM.
11. Dinarvand R., Sepehri N., Manoochehri S., Rouhani H. Y Atyabi F. 2011. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*. **6**:877-895.
12. Domínguez R.M. 2008. Efecto del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares *in vitro*. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.
13. Fernald K. y Kurokawa M. 2013. Evading apoptosis in Cancer. *Trends in Cell Biology*. **23**(12):620-633.

14. Fu L., Zhou C., Yao S., Yu J., Liu B. y Bao J. 2011. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **43**:1442-1449.
15. GLOBOCAN, 2012. Consultado de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx Revisado el 26/07/2015.
16. Hernández C.M.L. 2013. Evaluación del efecto antígenotóxico del compuesto LQM731, análogo del éster fenético del ácido caféico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Tesis de Licenciatura QFB. FES-Cuautitlán. UNAM.
17. INEGI, 2013. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484> Revisado el 26 de julio de 2015.
18. Izuta H., Shimazawa M., Tsuruma K., Araki Y., Mishima S. y Hara H. 2009. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **9**:45.
19. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. y Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *Cancer Journal of Clinicians*. **61**(2):69-90.
20. Jiang Q.L., Zhang S., Tian M., Zhang S.Y., Xie T., Chen D.Y., Chen Y.J., He J., Liu J., Ouyang L. y Jiang X. 2015. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*. **48**:17-28.
21. Kabir S.R., Nabi M.M., Haque A., Zaman R.U., Mahmud Z.H. y Reza M.A. 2013. Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in vivo in mice. *Phytomedicine*. **20**:1288-1296.
22. Karasaki Y., Tsukamoto S., Mizusaki K. Sugiura T. y Gotoh S. 2001. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Research International*. **34**:7-13.
23. Li W., Yu J., Xu H. y Bao J. 2011. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **414**:282-286.
24. Liu B.^a, Bian H. y Bao J. 2010. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer letters*. **287**:1-12.
25. Liu B.^b, Wu J., Li J., Liu J., Li W., Li C., Xu H. y Bao J. 2010. *Polygonatum cyrtoneuma* lectin induces murine fibrosarcoma L292 cell apoptosis and autophagy via blocking Ras-Rad and PI3K-Akt signaling pathways. *Biochemie*. **92**:1934-1938.
26. Liu B., Zhang B., Min M., Bian H.J., Chen L.F., Liu Q. y Bao J. 2009. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L292 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1790**:840-844.
27. Liu J., Lin M., Yu J., Liu B. y Bao J. 2011. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Letters*. **300**:105-114
28. Liu Z., Luo Y., Xhou T.T, y Zhang W.Z. 2013. Could plant lectins become promising anti-tumor drugs for causing autophagic cell death? *Cell Proliferation*. **46**:509-515.
29. Macías C.A. 2009. Estudio del efecto antígenotóxico, de proteínas extraídas de semillas de *Vicia faba* (haba), mediante el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas *in vitro*, así

- como su separación e identificación electroforética mediante SDS-PAGE. Tesis de Licenciatura QFB. FES-Cuautitlán. UNAM.
30. Mycek M.J., Harvey R.A. y Champe P.C. 2008. Farmacología. Segunda edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México, D.F. pp.445.
 31. Notte A., Leclere L. y Michiels C. 2011. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochemical Pharmacology*. **82**:427-434.
 32. Omene C.O., Wu J. y Frenkel K. 2012. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Investigational New Drugs*. **30**:1279-1288.
 33. Ozturk G., Ginis Z., Akyol S., Erden G., Gurel A. y Akyol O. 2012. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Review of melanomas, lung and prostate cancers. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **16**:2064-2068.
 34. Paniagua G.M.L. 2010. Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto NA01 polifenólico derivado del CAPE mediante el ensayo de SCGE in vitro. Tesis de Licenciatura QFB. FES Cuautitlán. UNAM.
 35. Pierce B.A. 2009. Genética. Un enfoque conceptual. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Pp.625.
 36. Pryme I.F., Bardocz S., Pusztai A. y Ewen S.W.B. 2006. Suppression of growth of tumour cell lines *in vitro* and tumours *in vivo* by mistletoe lectins. *Histology and Histopathology*. **21**:285-299.
 37. Riss T.L., Moravec R.A., Niles AL., Benick H.A., Worzella T.J. y Minor L. 2004. Cell Viability Assay en Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Maryland, EUA.
 38. Ruiz, S.M. 2012. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de compuestos derivados del Éster Fenílico del Ácido Cafeico (CAPE), en diferentes líneas celulares de cáncer. Tesis de Licenciatura. Química Industrial. FES-Cuautitlán. UNAM.
 39. Şimşek E., Arslan A.E., Imir N., Koçak O., Kuruoglu A. y Fiskin K. 2015. Dimethyl sulfoxide-caused changes in pro- and anti-angiogenic factor levels could contribute to an anti-angiogenic response in HeLa cells. *Neuropeptides*. Obtenido en línea el 18 de Agosto de 2015 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143417915000682>
 40. Tabiasco J., Pont F., Fournié J.J. y Vercellone A. 2002. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. **269**:2591-2600.
 41. Toreti V.C., Sato H.H., Pastore G.M. y Park Y.K. 2013. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013**:1-10
 42. Trowbridge, I.S. 1974. Isolation and Chemical Characterization of a Mitogenic Lectin from *Pisum sativum*. *The Journal of Biological Chemistry*. **249**(18):6004-6012
 43. Wang S., Yu Q., Bao J. y Liu B. 2011. *Polygonatum cyrtoneuma* lectin, a potential antineoplastic drug targeting programmed cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **406**:497-500

44. Wang T.^a, Chen L.X., Wu W.M. Long Y. y Wang R. 2008. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **86**:279-287.
45. Wang X.^b, Stavchansky S., Zhao B., Bynum J.A., Kerwin S.M y Bowman P.D. 2008. Cytoprotection of human endothelial cells from mtenadione cytotoxicity by caffeic acid phenethyl ester: The role of heme-oxygenase-1. *European Journal of Pharmacology*. **591**:28-35.
46. Wu L. y Bao J.2013. Anti-tumor and anti-viral activities of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)-related lectins. *Glycoconjugate Journal*. **30**:269-279.
47. Yang J., Marriner G.A., Wang X., Bowman P.D., Kerwin S.M., Stavchansky S. 2010. Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) fluorinated derivatives: Comparison of cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl (CAPE). *BMC*. **18**: 5032-5038.
48. Yau T., Dan X., Wing N.C.C. y Bun N.T. 2015. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*. **20**:3791-3810.
49. Zhang Z., Peng H., Li C., Liu J., Zhou T., Yan Y. , Li Y. y Bao J. 2010. *Polygonatum cyrtoneuma* lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis via a caspase-dependent pathway as compared to *Ophiogon japonicus* lectin. *Phytomedicine*. **18**:25-31.