



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y
Cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Laboratorio N° 6, 2do piso, Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Experimental-Zaragoza

**Actividad antitumoral de la lactona
Glaucólido B en cultivos de células
tumORALES**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta

Espinosa Trejo Mayra.

Asesor: Dr. Luis Sánchez Sánchez



CDMX, SEPTIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna ESPINOSA TREJO MAYRA, con número de cuenta 311060083, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día 04 de septiembre de 2018 a las 17:00 hrs., para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

VOCAL Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE Dra. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

SUPLENTE Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

El título de la tesis que presenta es: Actividad antitumoral de la lactona Glucólido B en cultivos de células tumorales.

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 06 de agosto de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

“Si buscas resultados distintos no hagas siempre lo mismo”

Albert Einstein

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton

“Nadie puede construir un mundo mejor sin mejorar a las personas, cada uno tiene que trabajar para su propia mejora”

Marie Curie

“Aprender a dudar es aprender a pensar”

Octavio Paz

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Virginia por cuidarme siempre, por apoyarme todo el tiempo y darme siempre fuerza para continuar. Gracias, por ser la mamá más maravillosa y esforzarte conmigo, por poder llegar juntas hasta dónde ahora me encuentro, gracias a tu apoyo cumpliré un sueño, continúa inspirándome.

A mi papá, Martín por ser un pilar importante para lograr mis metas y por brindarme los recursos para salir adelante. Gracias, por tu paciencia me hace muy feliz compartir este logro contigo y que la vida nos permita continuar caminando juntos.

A mis hermanos, Marisol, Martín, José y Josué, sin duda han sido mis compañeros en todo momento, mis cómplices desde niños, son mi alegría y me satisface compartir la vida junto a ustedes, no hay felicidad más inmensa que la que me invade cuando estamos juntos.

A mí familia, por brindarme palabras de aliento, apoyo y creer en mí.

A mi novio, Alejandro eres una persona increíble, que me ha apoyado en todos los sentidos. Gracias, por motivarme a ser siempre mejor, gracias por tu paciencia al fin cumpliré mi sueño y lo cumplirás conmigo.

A mis amigos, Iván, Denisse, Salvador, Sergio, Jesús, Alejandro, Nayeli, Alberto, Josué, Karen, Sofía, Brenda e Izcoatl por compartir buenos momentos y conocimientos. Gracias por su apoyo dentro y fuera de la escuela.

AGARDECIMIENTOS

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo en el laboratorio, por su paciencia y disposición para llevar a cabo el desarrollo de mi tesis. Agradezco los consejos y apoyo que me brindo y sobre todo gracias por la motivación y por compartir sus conocimientos. Tengo una gran admiración por su equipo de trabajo.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por compartir sus conocimientos además de sus observaciones para fortalecer mi trabajo. Gracias por la inspiración, pocas personas logran motivarnos a ser mejores.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por aportarme conocimientos, por brindarme su tiempo para las observaciones y fortalecimiento de mi trabajo.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química por donar el compuesto para llevar a cabo esta tesis.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón y a la Dra. Yolanda Córdoba Galaviz, por su colaboración durante la revisión de mi tesis, gracias por las observaciones y sobre todo por su atenta amabilidad y disposición para atender mis dudas.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (Laboratorio N° 6 segundo piso, UMIEZ) perteneciente a la Unidad de Investigación y Diferenciación del Cáncer, con apoyo de los proyectos CONACyT 253979 y 255881 así como de los proyectos PAPIIT IN216718 y IN220916

Índice

1.	Resumen.....	1
2.	Marco teórico.....	2
2.1.	La célula.....	2
2.2.	Muerte celular.....	3
2.3.	Cáncer.....	6
2.4.	Cáncer cervicouterino	7
2.5.	Cáncer de Pulmón	9
2.6.	Cáncer de mama	10
2.7.	Tratamientos	11
2.8.	Compuestos de origen natural.....	13
2.9.	Lactonas	13
2.10.	Antecedentes	15
3.	Hipótesis.....	17
4.	Objetivos	18
5.	Planteamiento del problema	19
6.	Justificación	20
7.	Materiales y método	21
8.	Resultados	26
9.	Discusión	35
10.	Conclusiones.....	38
11.	Bibliografía	39
12.	Anexos.....	42

1. Resumen

El cáncer, es una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, el cáncer de mama, pulmón y cuello uterino son de los mayormente frecuentes. En México, las mayores tasas de mortalidad se deben a l cáncer de pulmón, próstata, gástrico, mama y cervicouterino.

En la actualidad los tratamientos más utilizados contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia y son efectivos cuando el cáncer es detectado en etapas tempranas, sin embargo, resultan ser ineficientes en estadios avanzados. Los fármacos utilizados para el tratamiento contra el cáncer presentan un mecanismo de acción que induce daño en el ADN celular o componentes que participan en el mecanismo que regula la división celular, generando en las células una muerte necrótica, que produce efectos secundarios en los pacientes. Ante esta situación, surge la necesidad de buscar nuevos compuestos de origen natural que sean selectivos y presenten baja citotoxicidad para combatir el cáncer. Al respecto, las lactonas sesquiterpénicas han generado un fuerte interés debido a sus diversas actividades biológicas, destacando la actividad antitumoral. No obstante que las lactonas han sido fuertemente estudiadas, aún existen lactonas cuya actividad antitumoral no ha sido evaluada. Al respecto el Glaucólido B es una lactona de la cual existe poca evidencia de sus propiedades biológicas, por lo cual en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del Glaucólido B sobre la línea de cáncer cervicouterino (CaSki), mama (MDA.MB-231) y pulmón (SK-LU-1), con el fin de aportar información acerca de este compuesto los resultados obtenidos mostraron que el Glaucólido B afecta la proliferación celular de manera dosis dependiente, con una IC50 de 30, 18 y 15 $\mu\text{m}/\text{ml}$ respectivamente. El efecto necrótico del compuesto fue evaluado cuantificando la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares, obteniendo que el Glaucólido B induce una baja o nula actividad necrótica en las tres líneas celulares, indicando que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. A l respecto, las células tratadas con Glaucólido B generaron cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, contracción celular y perdida de prolongaciones citoplasmáticas, que en conjunto con la positividad de la caspasa-3 activa, indican que el Glaucólido B induce a las células a muerte apoptótica. Respecto a las células no tumorales, el Glaucólido B afectó la proliferación de las células linfocíticas a las concentraciones de 15, 18 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de manera significativa, sugiriendo que la actividad antiproliferativa del Glaucólido B no es selectiva, sin embargo, la nula actividad de LDH registrada en los sobrenadantes de los linfocitos tratados con el compuesto, indica que el decremento en el número celular es debido a una muerte diferente a la necrótica. Estos resultados permiten establecer que el Glaucólido B podría ser un buen candidato para evaluarse como un agente con potencial terapéutico contra el cáncer.

2. Marco teórico

2.1. La célula

La célula es la unidad mínima de un organismo capaz de actuar de manera autónoma. En su interior tiene lugar numerosas reacciones químicas que les permiten crecer, producir energía y liberar residuos. Este conjunto de reacciones se llama metabolismo (Cooper, 2009).

Las células de un organismo pluricelular deben funcionar en conjunto de manera que se dividan solo cuando el organismo necesite más células, ya sea para permitir el crecimiento de los tejidos o reponer las células perdidas. En consecuencia, para que una célula animal se divida o crezca no es suficiente la presencia de nutrientes, sino también las señales químicas provenientes de otras células, generalmente las células vecinas. La mayoría de las moléculas de señalización extracelular que afectan la división, el crecimiento y la supervivencia celular son proteínas solubles secretadas por otras células o la matriz extracelular. La mayoría de estas moléculas estimula uno o más de estos procesos celulares tales como el ciclo celular (Alberts *et al.*, 2006).

Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos que incluyen el nacimiento, crecimiento y la división de una célula cualquiera (López y Lizano, 2006). Las células duplican y transmiten la información contenida en su material genético (ADN) generación tras generación a través del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2006).

El ciclo celular se divide en cuatro fases morfológicamente no muy bien diferenciadas, pero molecularmente bien delimitadas y en el siguiente orden de secuencial: G1, S G2 y M. Las fases G1 y G2 (gap o intervalo) implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte la fase S de síntesis consiste en la replicación de ADN para heredar a cada célula hija la misma carga genética. Y la fase M (mitosis) o división celular implica la división de todo el material celular para originar dos células hijas. Dependiendo de la estirpe o de las condiciones de su ambiente, la célula puede iniciar los preparativos para una nueva división o bien mantenerse en un estado de quiescencia denominado fase G0. Coloquialmente se dice que las células en G0 se “han salido” del ciclo celular, lo cual implica que son viables y funcionales, pero que han dejado de dividirse (Alberts *et al.*, 2006). Cuando una célula presenta alteraciones como mutaciones, está intentará reparar dichas alteraciones; sin embargo, muchas veces los daños no son reparados y la célula induce una muerte programada conocida como apoptosis.

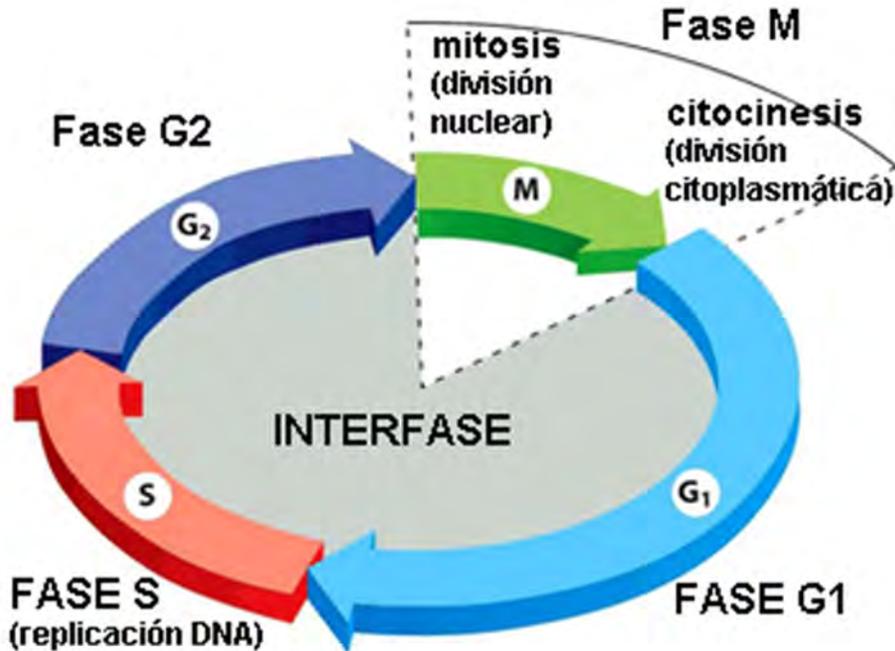


Fig.1. Ciclo celular. Se observan cada una de las etapas que comprende el ciclo, así como algunas características propias de cada una de las fases (tomadas y modificadas de https://www.ecured.cu/Ciclo_celular).

2.2. Muerte celular

Las células de un organismo pluricelular son miembros de una comunidad muy organizada. La cantidad de células que componen esta comunidad está regulada, en forma estricta no solo por el control de la velocidad de división celular, sino también por el control de muerte celular. Las células que ya no son necesarias son eliminadas mediante la activación de un programa de muerte intracelular. En consecuencia, este proceso se denomina muerte celular programada, aunque con mayor frecuencia también se le designa con el nombre de apoptosis. En otros casos las células mueren cuando las estructuras que han constituido dejan de ser necesarias. Las células que mueren como resultado de una lesión aguda, en general aumentan de volumen y estallan, lo cual implica que su contenido se derrama sobre células vecinas, este proceso se conoce como necrosis celular (Lizarbe., 2007).

Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible.

Este daño está desencadenado por cambios ambientales como temperaturas extremas y traumatismos mecánicos (Alberts *et al.*, 2006).

Apoptosis

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica. A diferencia de la necrosis, las células que mueren por apoptosis no provocan daños a células adyacentes. Una célula en vía de apoptosis se retrae y se condensa, el citoesqueleto se colapsa, la membrana celular se desensambla y el ADN nuclear se fragmenta (Lizarbe., 2007).

En ocasiones las células pueden presentar ciertas mutaciones, provocado que el proceso de muerte programada no se leve acabo, continuando su división y generando células anómalas.

Vías de activación de la apoptosis

En mamíferos se han descrito dos vías principales de apoptosis: vía extrínseca, activada por los receptores de superficie ("receptores de muerte"); y la vía intrínseca, inducida por estrés celular, promoviendo la salida de factores apoptóticos mitocondriales, donde participa miembros de la familia de Bcl-2, denominados ("los guardianes de la integridad mitocondrial")(Figura 2) (Elmore, 2007; Pérez & Lie, 2012).

Vía extrínseca: receptores de muerte celular.

La vía extrínseca o de los receptores de muerte se activa cuando un ligando se une a sus correspondientes receptores.

Se han identificado dos familias de receptores con estas características: los receptores de muerte de la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF, (Jordán, 2003; Guido & Joris, 1995; Cascales, 2003).

La vía apoptótica desencadenada por la activación de los receptores de muerte provoca la formación del complejo de señalización inductor de muerte, llamado DISC (por sus siglas en ingles). El complejo DISC está formado por la unión de las proteínas adaptadoras: dominio e muerte asociada a TNFR1 (FADD y TRADD, por sus siglas en inglés, respectivamente) mediante su dominio de muerte (DD, por sus siglas en ingles) y, por interacciones homólogas, se recluta en el DISC ala procaspasa-8, que también contiene una DD. Posteriormente, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa (caspasa iniciadora) es liberada del DISC al citoplasma, formando un heterotetrámero de 2 subunidades pequeñas y 2 grandes (Sánchez & Diosado, 2003).

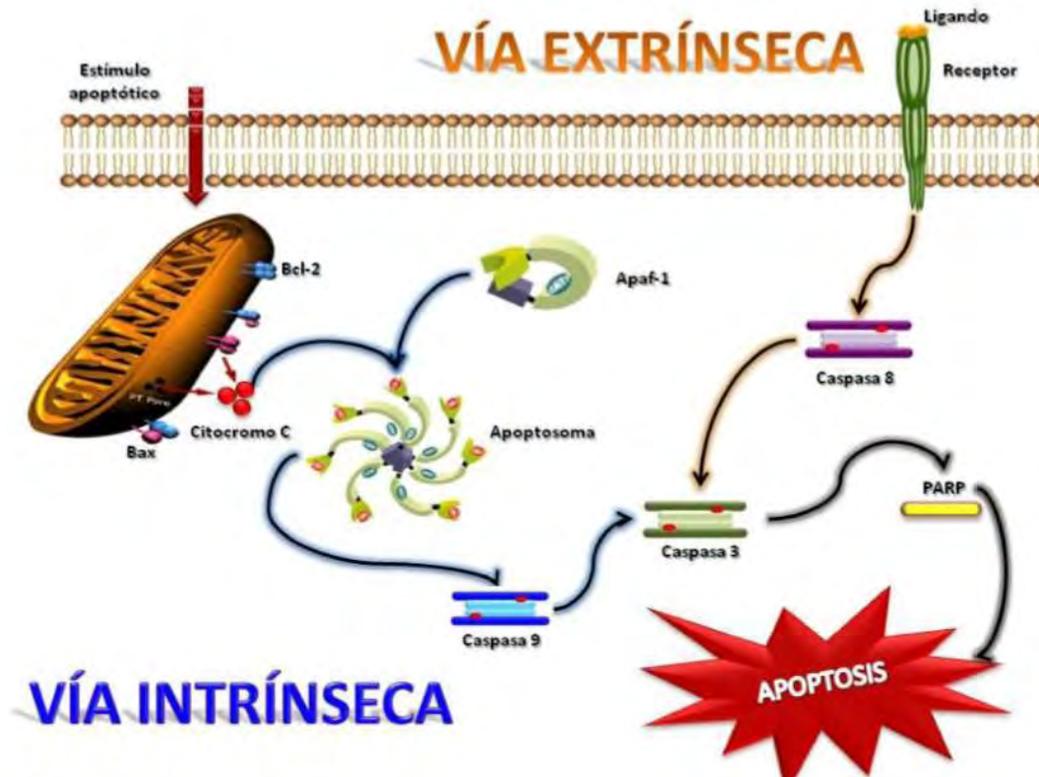


Fig.2. Vías de activación de la apoptosis. La vía extrínseca es mediada por receptores de muerte y la unión a su ligando. La vía intrínseca es mediada por estímulos externos agentes tóxicos o daños al DNA. (Tomado y modificado de http://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/pcd-apoptosis)

Vía intrínseca: inicio de la señal de apoptosis en la mitocondria.

La vía intrínseca o mitocondrial se ejecuta en respuesta a estímulos externos, agentes tóxicos o daño en el ADN. En este proceso, las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, que darán lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consiguiente liberación de moléculas como citocromo c que, una vez en el citosol, se asocia con (Apaf-1 por sus siglas en inglés) posibilitando el reclutamiento de la proenzima de la caspasa-9, a través del dominio de reclutamiento de caspasa (CARD, por sus siglas en inglés), formando el llamado apoptosoma, complejo que permitirá la activación de la caspasa-9 y su función sobre las caspasas efectoras, como la caspasa-3 y -7, que inician la proteólisis de los diferentes sustratos celulares. Otra de las moléculas liberadas es: Smac/DIABLO, la cual se une a proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs, por sus siglas en inglés) impidiendo la unión de las caspasas; y, la endonucleasa G, responsable de la degradación del ADN que se transloca a núcleo tras su liberación de la mitocondria

y está involucrada en la fragmentación de ADN y en la generación de típico patón en escalera (Sánchez & Diosado, 2003).

Aunados a lo anterior, hay una ruptura la cadena de transporte de electrones, liberándose iones superóxido y se hiperpolariza la membrana mitocondrial interna (que puede terminar con la dilatación de la matriz y la ruptura de la membrana). Además, se abren los poros mitocondriales permitiendo la entrada de agua y solutos a la matriz, produciéndose un choque osmótico y la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés), que se transloca al núcleo y provoca la condensación y rotura del ADN en fragmentos de alto peso molecular (50 Kb). A nivel de la membrana celular, AIF activa a la flipasa e inhibe a la translocasa haciendo que la fosfatidilserina que en células normales se encuentran en la cara interna de la membrana se exponga ahora al exterior. La actividad de AIF es inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2, pero no por los inhibidores de caspasas, es decir su efecto es independiente de las caspasas. También se induce la activación de Bax que puede formar un canal en la membrana mitocondrial (Cascales, 2003).

2.3. Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo (OMS, 2016).

El cáncer es una enfermedad compleja, que implica ante alteraciones genéticas que interfieren con las funciones celulares encargadas de regular la proliferación, apoptosis y envejecimiento. Aunado a lo anterior, la alteración de los mecanismos reparadores del ADN, fomentan la acumulación de mutaciones, dando lugar a independencia a los factores de crecimiento, ausencia en la inhibición dependientes de cambios en la organización del citoesqueleto (Grillo *et al.*, 2008).

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y nacional, destacando entre los principales de tipos de cáncer más frecuentes el cáncer cérvico-uterino, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama.

Factores de riesgo del cáncer

Los mecanismos por los que se produce y desarrolla el cáncer no se conocen con exactitud. Se piensa que puede ser debido a mutaciones espontáneas de los genes o por la acción de algún factor externo. A los agentes externos se les denomina factores carcinógenos. Son sustancias que, en contacto con un organismo, son capaces de generar en él enfermedades cancerosas. Su naturaleza es variada, habiéndose encontrado factores físicos químicos y biológicos (ACCE, 2017).

1. Factores químicos

La mayoría de los carcinógenos químicos son el resultado de actividades industriales. Además, de su composición, la capacidad de una sustancia para producir cáncer va a depender de la concentración y del tiempo de exposición a dicha sustancia. Algunos de los agentes con actividad carcinogénica más comunes son: amianto, arsénico, benceno, cadmio, mercurio, níquel, plomo, hidrocarburos clorados.

2. Factores físicos

Entre los agentes físicos destacan las radiaciones ionizantes (rayos X), las radiaciones no ionizantes (rayos UV) y las radiaciones que emite la propia corteza terrestre (radón). Otra fuente de agentes físicos cancerígenos es la provocada por accidentes nucleares (ACCE, 2017).

3. Factores biológicos

En los últimos años los agentes biológicos están tomando cada vez más protagonismo en la carcinogénesis humana. Hoy en día sabemos que el 18% de los tipos de cáncer son atribuibles a infecciones persistentes provocadas por virus, bacterias o parásitos, entre los cuales destacan el virus del papiloma humano (cáncer de cuello uterino), el virus de la hepatitis B (cáncer de hígado) y *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago) (ACCE, 2017).

4. Otros factores

El consumo de tabaco y alcohol, el tipo de dieta y la falta de actividad física son también factores de riesgo para el desarrollo de cáncer en todo el mundo. Algunas infecciones crónicas también constituyen factores de riesgo, y son más importantes en los países de ingresos medios o bajos (OMS, 2014).

2.4. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervical o cáncer de cuello de útero, incluye las células malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina. El cuerpo del útero (parte superior) es el lugar dónde se desarrolla el feto. El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocervix. La parte próxima a la vagina, es el exocervix (o ectocervix). Los dos tipos de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (en el exocervix) y las células glandulares (en el endocervix). El punto en el que estos tipos celulares se encuentran se llama *zona de transformación* (Figura 3) La ubicación exacta de la zona de transformación cambia a medida que envejece y al dar a luz. La mayoría de los tipos de cáncer de cuello uterino se originan en las células de la zona de transformación (ASC, 2016).

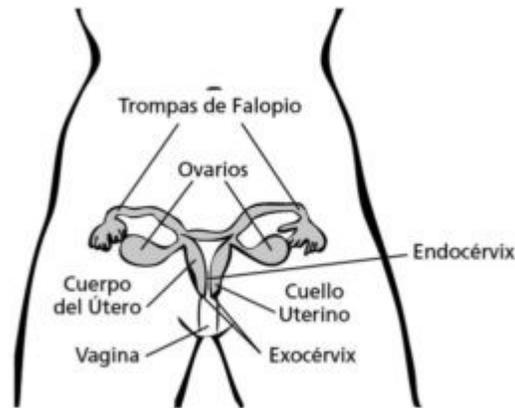


Fig.3. Zona de transformación. La parte más cercana al cuerpo del útero se llama endocérnix. La parte próxima a la vagina, es el endocérnix. Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado zona de transformación. (Tomado y modificado de: <http://oncologiaysalud.com/que-es-cancer-de-cuello-uterino-cervical/>).

Factores de riesgo: Existen factores de riesgo propios del desarrollo de cáncer cérvicouterino:

1. Múltiples compañeros sexuales
2. Edad temprana en la primera relación sexual
3. Elevado número de partos (más de 3)
4. Infección persistente con el virus del papiloma humano (VPH), de alto riesgo (VPH 16 o 18)
5. Uso de contraceptivos orales
6. Fumar

La infección genital con el (VPH) es principalmente vía transmisión sexual; es la infección viral más frecuente en el mundo. Aunado a lo anterior, es el factor de riesgo más importante para desarrollar lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. No obstante, menos de 5% de las mujeres infectadas con el VPH desarrollarán cáncer cervicouterino. La mayoría de los casos de cáncer de cérvix y sus lesiones precursoras se relacionan con la infección por serotipos de alto riesgo del VPH, sobre todo el VPH-16 y el VPH-18. Se trata de un virus de transmisión sexual, y de ahí que la enfermedad sea más frecuente en mujeres que tuvieron múltiples parejas sexuales o que empezaron a tener relaciones sexuales precozmente. (Grillo *et al.*, 2008).

En 2012, más de 83.000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer cérvico-uterino y casi 36,000 fallecieron por esta enfermedad en la Región de América. Si se

mantienen las tendencias actuales, el número de muertes en América aumentará en un 45% en el 2030.

La tasa de mortalidad es 3 veces mayor en América Latina y el Caribe que en Norteamérica, evidenciando enormes desigualdades en salud.

La vacunación contra el VPH de mujeres adolescentes puede prevenir cerca del 70% de los casos de cáncer cérvicouterino (OMS, 2016).

2.5. Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón es un conjunto de enfermedades derivadas del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio, en particular del tejido pulmonar; es uno de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial (OMS, 2016).

Las células cancerosas del pulmón se pueden diseminar al separarse de un tumor pulmonar. Pueden viajar a través de los vasos sanguíneos o vasos linfáticos para llegar a otras partes del cuerpo. Después de la propagación, las células cancerosas pueden adherirse a otros tejidos y crecer para formar nuevos tumores que pueden dañar estos tejidos (NHI, 2012).

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más comunes en el mundo. Es la principal causa de muerte por cáncer entre los hombres y las mujeres en Estados Unidos.

Factores de riesgo

1. Fumar
2. La exposición a altos niveles de contaminación
3. Exposición a radiaciones
4. Exposición a asbesto

Los síntomas comunes del cáncer de pulmón incluyen:

1. Una tos que no desaparece y empeora con el tiempo
2. Dolor constante en el pecho
3. Tos con expectoración con sangre
4. Problemas repetidos por neumonía o bronquitis
5. Inflamación del cuello y cara
6. Fatiga

Existen dos tipos de cáncer pulmonar clínicamente importantes considerando el origen y el comportamiento de las células cancerosas: cáncer pulmonar de células pequeñas y cáncer pulmonar de células no pequeñas. Cada uno de ellos crece y se disemina de un modo distinto y se trata de una forma diferente. El tratamiento también depende del estadio o de qué tan avanzado se encuentre. El tratamiento puede incluir quimioterapia, radiación y cirugía (Moctezuma y Patiño, 2009).

2.6. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios.

Existen dos tipos principales de cáncer de mama: el carcinoma ductal infiltrante, que comienza en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón, es por mucho el más frecuente (aproximadamente el 80 % de los casos); y, el carcinoma lobulillar infiltrante (10 a 12 % de los casos), que comienza en partes de las mamas llamadas lobulillos, que producen la leche materna. Los restantes tipos de cáncer de mama no superan en conjunto el 10 % de los casos (Coleman, 2005).

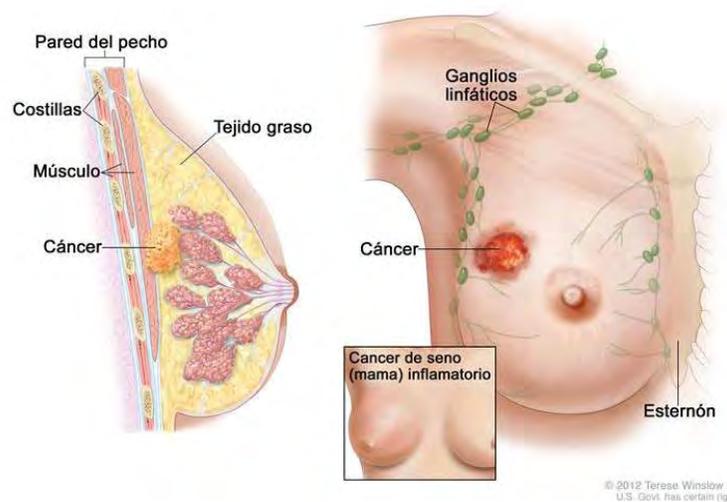


Fig.4. Anatomía de la mama femenina. Se muestran los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos, los conductos y otras partes internas de la mama. Tomado y modificado de: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cancer-de-mama-en-estadio-iiib>.

Factores de riesgo:

1. Edad avanzada
2. La primera menstruación a temprana edad,

3. Edad avanzada en el momento del primer parto o nunca haber dado a luz
4. Antecedentes familiares de cáncer de mama
5. Consumir hormonas tales como estrógeno y progesterona.
6. Mutaciones genéticas heredadas (5 a 10 % de los casos de cáncer de mama están asociados a este factor) (Coleman, 2005)

En el 2012, más de 408.000 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de mama en América, y 92.000 fallecieron a causa de esta enfermedad.

Las proyecciones indican que el número de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en las Américas aumentará en un 46% en el 2030.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de América Latina y el Caribe (ALCA), tanto en número de casos nuevos como en número de muertes. La proporción de mujeres fallecidas por cáncer de mama con menos de 65 años es más alta en ALCA (57%) que en Norteamérica (41%) (OMS, 2016).

2.7. Tratamientos

Los tratamientos actuales para combatir el cáncer son clasificados por sus métodos de acción y encontramos tres principales tipos de tratamientos.

Procesos Quirúrgicos

Éstos varían según el lugar dónde este localizado el cáncer y lo avanzada que se encuentre la enfermedad. Puede implicar la extirpación de una sección focalizada del órgano o tejido. El proceso de recuperación varía según el tipo de cirugía requerida. (Berek, 2005).

Quimioterapia

Es un tratamiento que consiste en impedir la reproducción de las células cancerosas, a través del consumo de fármacos. Dichos fármacos se denominan medicamentos citostáticos o citotóxicos. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se suministre. Debido a su especificidad afecta otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentra en división activa. Por lo tanto, la quimioterapia es la utilización de diversos fármacos que tiene propiedad de interferir en el ciclo celular, ocasionando la destrucción de células. En algunas ocasiones la quimioterapia se utiliza en conjunto con tratamientos de radiación (Chabner, 2000).

Algunos de los efectos secundarios de este tratamiento incluyen:

- Náuseas y vómito
- Cansancio
- Úlceras en la boca
- Pérdida de cabello y uñas
- Diarrea

Radiación

El objetivo de la terapia con radiación es eliminar las células cancerosas, reducir el tamaño del tumor para facilitar el proceso de extirpación y/o aliviar algunos de los síntomas relacionados al cáncer. Esto se logra mediante la administración de rayos gamma de gran potencia dentro del organismo, en la zona específica del padecimiento. Sin embargo, esta terapia no es de carácter selectivo, debido a la naturaleza de la radiación que también afectan a todas aquellas células que se encuentren en proliferación, tal es el caso de la piel, el cabello, uñas y las mucosas que revisten el tracto gástrico debido a que el blanco de esta terapia es la descomposición o desnaturalización de la molécula de ADN, llevándolas a un proceso de muerte debido a la incapacidad de la célula de poder reparar dicho daño (Berek, 2005).

Algunos efectos secundarios relacionados a la radiación incluyen:

- Diarrea
- Cansancio
- Pérdida de apetito y náuseas.

Inmunoterapia

La inmunoterapia, también denominada terapia biológica, es un tipo de tratamiento para el cáncer que estimula las defensas naturales del cuerpo a fin de combatir el cáncer. Utiliza sustancias producidas por el cuerpo o fabricadas en un laboratorio para mejorar o restaurar la función del sistema inmunitario. La inmunoterapia puede funcionar de las siguientes maneras:

- Al detener o retrasar el crecimiento de las células cancerosas
- Al impedir que el cáncer se disemine a otras partes del cuerpo
- Al ayudar al sistema inmunitario para que funcione mejor a la hora de destruir las células cancerosas

Existen dos tipos principales de inmunoterapia:

Anticuerpos monoclonales: Son versiones hechas por el hombre de las proteínas del sistema inmunológico. Las proteínas pueden ser muy útiles en el tratamiento del

cáncer porque pueden ser diseñados para atacar una parte muy específica de la célula cancerosa (ACS, 2007).

Otras inmunoterapias no específicas: Estos tratamientos aumentan el sistema inmunológico de una manera general, esto puede ayudar a sistema inmunológico a atacar las células cancerosas (ACS, 2007).

Debido a la ineficiencia de los quimioterapéuticos que se utilizan actualmente en etapas avanzadas de la enfermedad y a que producen efectos secundarios en los pacientes, surge la necesidad del estudio de nuevos quimioterapéuticos, principalmente productos de origen natural entre los cuales destacan las lactonas sesquiterpénicas.

2.8. Compuestos de origen natural

Muchos compuestos derivados de plantas han sido utilizados como medicamentos, ya sea en su forma original o semisintético. Metabolitos secundarios de las plantas también pueden servir como precursores de drogas, prototipos de medicamentos y sondas farmacológicas. En la actualidad encontramos fármacos a partir de plantas, que ya son medicamentos aprobados y compuestos actualmente en ensayos clínicos. Hay también varios extractos de plantas o "fitomedicamentos" en ensayos clínicos para el tratamiento de diversas enfermedades.

A lo largo de la historia se han identificado infinidad de compuestos en plantas. En la familia Compositae (Asteraceae), representada en Canarias por unos 32 géneros, los compuestos químicos que predominan son fundamentalmente lactonas sesquiterpénicas (Bhat *et al*, 2005).

Debido a la ineficiencia de los quimioterapéuticos que se utilizan actualmente en etapas avanzadas de la enfermedad y a que producen efectos secundarios en los pacientes, surge la necesidad del estudio de nuevos quimioterapéuticos, principalmente productos de origen natural entre los cuales destacan las lactonas sesquiterpénicas.

2.9. Lactonas

Estos antecedentes generan un gran interés en el desarrollo de nuevas terapias cuyo mecanismo de acción está basado en nuevas drogas o compuestos con actividad antitumoral. Actualmente hay un gran interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal, y particularmente en las lactonas, las cuales han sido descritas con actividad antimicrobiana, fungicida, antiviral, antitumoral, entre otros. (Bhat *et al*, 2005).

En los últimos años, el uso de agentes naturales para prevenir el desarrollo o la repetición de diferentes tipos de cáncer, lo cual ha sido aceptado ampliamente como una opción realista para controlar la enfermedad. Los compuestos que contienen el grupo α -metileno- γ -butirolactona han atraído mucha atención durante años ya que es un potente receptor para nucleófilos que pueden inhibir las enzimas que contienen centros nucleofílicos esenciales, como grupos amino (-NH₂) y tiol (-SH) (Salinas, 2002).

Lactonas sesquiterpénicas (LsS) son compuestos cíclicos con al menos un anillo que tiene involucrado un grupo carbonilo y oxígeno (más de 100 de familias taxonómicas).

La familia *Compositae* cuenta con especies importantes de uso medicinal como *Árnica montana*, *Artemisa annua* y *Tanacetum partherium* las cuales contiene lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas presentan estructuras que parecen tener un origen común, habiéndose formado en procesos biogénéticos estrechamente relacionados y que permiten proporcionar caracteres químicos útiles dentro de la tribu. Así podemos clasificarlas en tres grandes grupos: lactonas tipo germacranolida, lactonas tipo eudesmanolida y lactonas tipo guayanolida. (Figura 5).

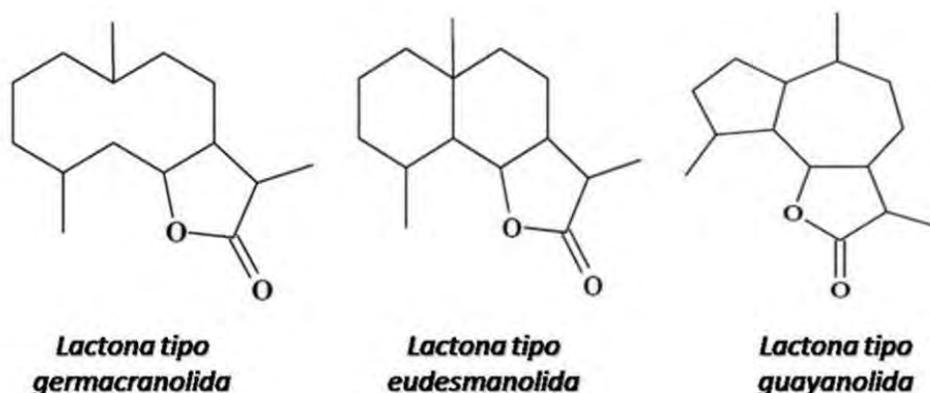


Fig.5. Clasificación de las lactonas de acuerdo a su estructura. Tomado y modificado de: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/lactonas-sesquiterp%C3%A9nicas-diversidad-estructural-y-sus-actividades-biol%C3%B3gicas-sesquiterpene>

Glaucólido B

Glaucolide B es una lactona sesquiterpénica de tipo Germacranolida, aislada de *Vernonia eremophila*. (Asteraceae) y tiene actividades antifúngicas, antimicrobianas y analgésicas (Regislaine, 2000)

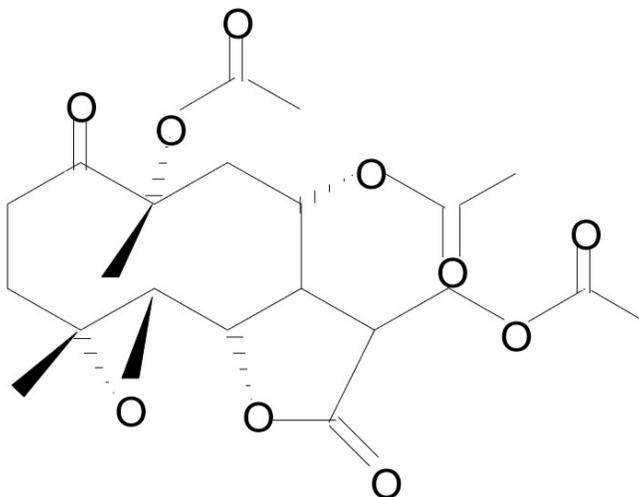


Fig. 6. Estructura del Glaucolide B

2.10. Antecedentes

La LsS Partenólida induce apoptosis en células de cáncer de colón y cáncer de mama (Siyung Zhang *et al* 2005), también se sabe que la LsS Partenólida induce apoptosis selectiva en células de linfocitos B de leucemia crónica *in vitro* (Steele, et al,2006).

La lactona arglanina presenta efecto sobre el potencial proliferativo y ciclo celular de células tumorales de cervix humano (Ortega, 2009).

Las LsS asteriscunolida A (As) y tanapsina (Ta) presentan efecto sobre el potencial proliferativo sobre líneas de cáncer de melanoma (SK-MEL-1), leucemias((HL-60, U937, Molt-3) y cáncer de pulmón (A549).

	<i>As</i> (μM)	<i>Ta</i> (μM)
<i>HL-60</i>	5,2 \pm 1,3	14,3 \pm 1,6
<i>HL-60/Bcl-X_L</i>	7,3 \pm 0,8	16,9 \pm 3,0
<i>U937</i>	5,4 \pm 0,7	11,5 \pm 2,1
<i>U937/Bcl₂</i>	14,8 \pm 1,6	15,4 \pm 4,7
<i>Molt-3</i>	4,9 \pm 1,7	8,2 \pm 1,7
<i>SK-MEL-1</i>	6,8 \pm 2,8	11,8 \pm 3,4
<i>A549</i>	>30	>100

Tabla 1. Efecto de las lactonas sobre la proliferación de células tumorales humanas. Las células se cultivaron durante 72 horas y el valor de la IC50 se determinó mediante un ensayo colorimétrico con MTT. Tomado y modificado de: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/lactonas-sesquiterp%C3%A9nicas-diversidad-estructural-y-sus-actividades-biol%C3%B3gicas-sesquiterpene>.

3. Hipótesis

Se ha descrito que las lactonas Partenólida, Astericuniloda y Tanapsina de tipo germacranólida pueden inhibir la proliferación e inducir muerte por apoptosis en líneas celulares de cáncer colón, mama y leucemias, generando la posibilidad que la lactona Glaucolide B de tipo germacranólida inhiba la proliferación e induzca muerte apoptótica en las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231.

4. Objetivos

Objetivo General

Determinar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la lactona Germacranólido Glaucolide B, en las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231, así como en células linfocíticas no tumorales.

Objetivos particulares:

Realizar cultivos de las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA, así como de células linfocíticas humanas, provenientes de sangre periférica.

Determinar la actividad antiproliferativa de la lactona Glaucolide B, expresada como la concentración requerida del compuesto, capaz de disminuir en un 50% el número celular (IC50) en las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231, a través de la técnica de cristal violeta.

Evaluar si el Glaucolide B induce a las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA a una muerte necrótica a través de la valoración de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH), en los sobrenadantes celulares.

Establecer si el Glaucolide B induce a las células CaSki, SK-LU-1 y MDA a una muerte apoptótica, a través de la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas teñidas con el fluorocromo DAPI, así como la detección de la caspasa 3 activa, mediante microscopía de campo claro y epifluorescencia y por citometría de flujo respectivamente.

Determinar el efecto de las IC50 obtenidas para las líneas celulares tumorales, en la proliferación de las células linfocíticas provenientes de sangre periférica, mediante el marcaje con carboxifluoresceína.

Determinar la presencia de necrosis en las células linfocíticas con las IC50 obtenidas para las líneas celulares tumorales mediante la detección de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

5. Planteamiento del problema

En la actualidad la mayoría de los compuestos que son utilizados para el tratamiento del cáncer, suelen ser ineficientes y fuertemente necróticos en los pacientes, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas que permitan dar un tratamiento adecuado a esta patología. En los últimos años se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes antitumorales, entre éstos figuran las lactonas, sin embargo, son pocos los estudios que se tiene sobre las lactonas sesquiterpénicas (LsS) y en particular sobre la lactona sesquiterpénica Glaucolide B, por lo que resulta de gran interés realizar la valoración de la actividad antitumoral de la lactona Glaucolide B en líneas celulares provenientes de cáncer de mama, pulmón y cérvico-uterino.

6. Justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte en México y el mundo. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia fueron los de pulmón, próstata, colon, de mama, pulmón, cuello uterino y estómago. Además, el número creciente de resultados en investigación actual que emplean compuestos de origen vegetal y que han sido propuestos en terapias alternativas están orientados hacia la quimioprevención y tratamiento del cáncer. Dentro de este grupo encontramos las LsS a las cuales se les ha atribuido un efecto antiproliferativo en células tumorales, sin embargo, la mayoría de los estudios son sobre leucemias y melanomas, por lo cual es necesario generar información acerca de la lactona Glaucolide B sobre células de cáncer de pulmón, cervicouterino y mama.

7. Materiales y método

Cultivo de líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231.

Las líneas celulares de cáncer de pulmón (SK-LU-1), mama (MDA-MB-231) y cérvix (CaSki), fueron obtenidas de la American Type Culture Collection. (ATCC). Las células Sk-LU-1 y CaSki se cultivaron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio RPMI 1640 (Laboratorios Microlab) con L-glutamina, rojo fenol y bencilpenicilina, a 5% de suero de neonato de ternera (SNT) previamente desactivado a 57°C por 30 minutos. Las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio D-MEM (Laboratorios Microlab), a 5% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuair, US) a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂, y una atmósfera húmeda saturante.

Preparación del compuesto

El compuesto Glaucólido B, fue donado por el Dr. Manuel Jiménez Estrada, Investigador del Instituto de Química, UNAM.

En una balanza analítica se pesaron 5mg de la lactona Germacranólido B y se solubilizó en 250 µL de Dimetil Sulfoxido (DMSO) y se mantuvo a temperatura ambiente. De esta solución se tomaron 50 µL y se añadieron 950 µL de medio de cultivo al 5% de suero (Neonato de ternera o fetal bovino), con la intención de tener 1 µg/ µL. De esta solución, se tomaron los microgramos necesarios para llevar a cabo los ensayos experimentales.

Evaluación de proliferación mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.

Las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 µl de RPMI 1640 al 5% de SNT (células SK-LU-1 y CaSki) para MDA-MB-231 se agregaron 100 µl de medio D-MEM con 5% de SFB y se incubaron a 37°C, a 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda por 24 h. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y las células se estimularon a diferentes concentraciones partiendo de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/ml del compuesto en RPMI-1640 al 5% de SNT o en D-MEM al 5% de SFB, y se incubaron durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas de tratamiento, se retiró el medio de cultivo e inmediatamente fueron fijadas con 50 µl de glutaraldehído al 1.1 (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 min en agitación constante; al término se lavó la placa con agua corriente y se dejó secar al aire, posteriormente se añadieron 50 µl de colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) en solución amortiguadora de ácido fórmico PH 6, en agitación constante durante 20 minutos.

Se eliminó el exceso de colorante lavando la placa al chorro de agua y se dejó secar al aire. Posteriormente se agregaron 100 µl de ácido acético (J.T. Baker, USA) al 10% y se dejó en agitación constante durante 20 min, con la intención de solubilizar el colorante incorporado. Finalmente, la absorbancia fue determinada en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 570 nm.

Una vez obtenidas las absorbancias se procedió a realizar una curva dosis-respuesta, tratando a las células a diferentes concentraciones del compuesto. Posteriormente los datos fueron linealizados y mediante la ecuación de la recta, se determinó la concentración a la cual se disminuye en un 50% la población celular, concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) así como su coeficiente de correlación.

Determinación de muerte celular por necrosis mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa.

Las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 µl de RPMI 1640 al 5% de SNT (células SK-LU-1 y CaSki) para MDA-MB-231 se agregaron 100 µl de medio D-MEM con 5% de SFB y se incubaron a 37°C, a 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control basal, únicamente con medio de cultivo el cual fue utilizado como blanco en la reacción colorimétrica y al que solo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco, un control positivo, en el cual las células fueron lisadas durante una hora con 100 µl de una solución al 2% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) en RPMI-1460 o DMEM. Un control con el vehículo empleado (DMSO) y los tratamientos con las diferentes concentraciones del compuesto. Pasadas las 24 horas se transfirieron 60 µl del medio de cultivo a una placa cónica de 96 pozos (Corning Incorporat, USA) y se centrifugaron (Centrifuga Orto alresa, digicen 21 R) A 1500 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente del sobrenadante se transfirieron 40 µl de medio de cultivo a una placa de 96 pozos y se adicionaron 40 µl de la mezcla de reacción del kit Cytotox 96® Non- Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) a cada pozo, la placa se mantuvo a temperatura ambiente, protegida de la luz durante 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 490 nm.

Determinación de la morfología apoptótica mediante la tinción de DAPI por microscopia de fluorescencia

Se sembraron células de las tres líneas tumorales CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 sobre cubreobjetos limpios y estériles en placas de 24 pozos (Corning, USA) a una densidad de 15000 células/pozo con un volumen de 500 µl de medio RPMI o DMEM suplementado con 5% de SNT y/o SFB respectivamente, se incubaron por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se retiró el medio y se trataron con las siguientes

condiciones: control (se cambió el medio de cultivo por medio fresco), Vehículo (concentración de DMSO utilizada para la obtención de la IC₅₀ diluido en medio de cultivo), control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma- Aldrich, USA) 10 µl/ml, y las concentraciones correspondientes de las IC₅₀ de cada línea celular. Después de las 24 horas del estímulo se retiró el medio de cultivo y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 20 minutos en agitación constante. Al término se realizaron tres lavados cuidadosamente con PBS filtrado. Posterior se agregaron 10µl/ml de fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma- Aldrich, USA) sobre cada cubreobjetos y se dejó actuar durante un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas dos veces con PBS filtrado y se montaron sobre portaobjetos con medio para fluorescencia VECTASHIELD Mounting Medio (VECTOR LABORATORIES, USA). Las muestras fueron selladas con resina acrílica transparente y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Detención de caspasa-3 activa mediante citometría de flujo

Se sembraron células de las tres líneas tumorales CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 sobre cubreobjetos limpios y estériles en placas de 24 pozos (Corning, USA) a una densidad de 15000 células/pozo con un volumen de 500 µl de medio RPMI o DMEM suplementado con 5% de SNT y/o SFB respectivamente, se incubaron por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se retiró el medio y se fueron tratadas con las siguientes condiciones: control (se cambió el medio de cultivo por medio fresco), Vehículo (concentración de DMSO utilizada para la obtención de la IC₅₀ diluido en medio de cultivo), control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma- Aldrich, USA) 10 µl/ml, y las concentraciones correspondientes de las IC₅₀ de cada línea celular. Todas las condiciones fueron incubadas por 24 horas.

Después de las 24 horas se recuperó el medio y se despegaron las células de cada condición en tubos cónicos de 15ml y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se fijaron con 500 µl de metanol al 50% diluido en PBS durante una hora a 4°C. Al término de este tiempo, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se realizaron tres lavados con PBS filtrado, considerando que al término de cada lavado se centrifugaron durante 5 minutos y se retirará el sobrenadante. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 50µl de anticuerpo 1° (1:500µl de PBS filtrado) policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (Abcam, USA), las muestras se dejaron a 4°C por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se realizaron tres lavados con PBS filtrado, considerando que al término de cada lavado se centrifugaron durante 5 minutos y se retirará el sobrenadante. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 50µl de anticuerpo 2° acoplado al fluorocromo FIT-C (1:500µl de PBS filtrado) IgG anticonejo (Sigma-Aldrich, USA)

las muestras se mantuvieron, en la oscuridad durante 3 horas a una temperatura de 37°C. Finalmente las muestras se lavaron 3 veces con PBS filtrado y los botones fueron resuspendidos en 500µl de PBS, para así analizar las muestras en el citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA). Los datos obtenidos serán procesados en el programa Flowing Software 2.5.1 Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Proliferación de linfocitos con carboxifluoresceína

Se obtuvieron 25ml de sangre periférica de un donador aparentemente sano en tubos vacutainer con heparina (BD Franklin Lakes N.J., USA)

En cuatro tubos cónicos de vidrio de 15ml (Pirex, USA), se colocaron 6ml de Ficoll Hystopaque (Sigma- Aldrich, USA), a continuación se agregaron lentamente por la pared del tubo 6ml (obteniendo una concentración 1:1 de Ficoll:sangre). Se centrifugaron las muestras a 300 rpm durante 10 minutos, la velocidad se incrementaba gradualmente 300 rpm cada 5 minutos, hasta llegar 1500 rpm donde se dejó centrifugar por 20 minutos más. Las células fueron separadas por gradiente de densidad, una vez obtenidos los diferentes componentes celulares, se recolectaron los anillos de linfocitos evitando extraer ficoll y otras células diferentes a los linfocitos. Los anillos se colocaron en dos tubos cónicos de vidrio de 15ml y se agregaron 5 ml de RPMI-1640 sin suero, Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se realizaron dos lavados, se retirará el sobrenadante y los botones fueron resuspendidos en un volumen total de 5 ml de RPMI-1640.

Posteriormente los linfocitos se marcaron agregando 50 µl de carboxifluoresceína al 2µM, (Sigma-Aldrich, USA), durante 5 minutos protegidos de la luz. A continuación, se realizaron dos lavados agregando 5ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos posterior fueron resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% SFB. Después fueron activadas con fitohematoglutinina (20µl/ ml RPMI-1640), se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml (Corning, USA) y se sembraron en una placa de 96 pozos con una densidad de 200,000 células/pozo en 200µl de RPMI-1640 al 20% de SFB. Se dejaron incubar a 37°C a una atmosfera húmeda por 72 horas.

Tras las 72 horas las células fueron estimuladas considerando los siguientes tratamientos: control sin activar (con CSFE y sin PHA), control activado (con CSFE y con PHA), vehículo (concentración de DMSO para obtener la IC₅₀) e IC₅₀ correspondientes a cada línea tumoral. Se dejaron incubar a 37°C a una atmosfera húmeda por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se colectaron los linfocitos en tubos de citometría (un tubo por condición) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el

sobrenadante y adicionaron 500 μ l de verseno, se realizaron dos lavados, y el botón celular fue resuspendido en 500 μ l de PBS filtrado. Finalmente, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA) y los datos obtenidos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1 Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Prueba LDH en linfocitos

Transcurridas las 24 horas se centrifugaron la placa a 1500 rpm durante 5 minutos, y se recolectaron los linfocitos de uno de los controles (células marcadas y activadas con medio de cultivo RPMI-1640 con 20% SFB) se lisaron con una solución al 2% de Tritón X-100 (Sigma- Aldrich, USA). Se transfirieron 60 μ l del medio de cultivo a una placa cónica de 96 pozos (Corning Incorporat, USA) y se centrifugaron (Centrifuga Orto alresa, digicen 21 R, USA) a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente del sobrenadante se transfirieron 40 μ l de medio de cultivo a una placa de 96 pozos y se adicionaron 40 μ l de la mezcla de reacción del kit Cytotox 96® Non- Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) a cada pozo, la placa se mantuvo a temperatura ambiente, protegida de la luz durante 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 490 nm.

8. Resultados

Actividad antiproliferativa de la lactona Glaucólido B

Con la intención de establecer si el compuesto Glaucólido B presenta actividad antiproliferativa en células tumorales, cultivos de las líneas celulares CaSki, Sk-LU-1 y MDA-MB-231 fueron tratadas con el compuesto a diferentes concentraciones por 24 h y el número celular fue evaluado por la técnica de tinción con cristal violeta (Fig.6).

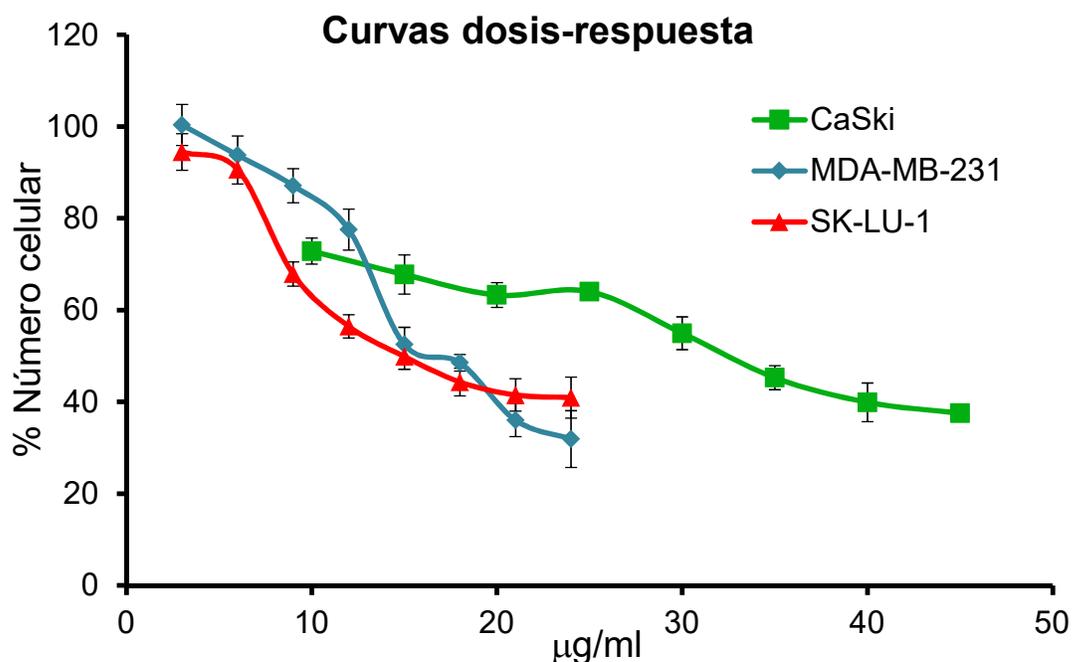


Fig.6. Actividad antiproliferativa de la Lactona Glaucólido B sobre las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 Y CaSki. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto durante 24 horas. El número celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos establecen que la lactona Glaucólido B afectó la proliferación de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto, el número celular disminuye. De igual manera se observa que las células CaSki requieren del doble de la concentración de Glaucólido B que las otras líneas celulares, sugiriendo que estas células son menos sensibles al compuesto. Los valores de IC_{50} se muestran en la tabla 2.

línea celular	IC50 $\mu\text{g/ml}$	IC50 μM
SK-LU-1	15	33.98
MDA-MB-231	18	41.03
CaSki	30	69.97

Tabla.2. Concentración requerida para abatir en un 50% la población celular con el compuesto Glaucólido B.

Actividad necrótica de la lactona Glaucolide B

Con el propósito de evaluar si el Glaucolide B genera una muerte celular necrótica en las células tumorales, cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, SKLU-1 y CaSki fueron tratados a la concentración de sus respectivas IC_{50} y la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos tratados y tomada como un parámetro de pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática, así como un marcador de muerte necrótica (Fig7).

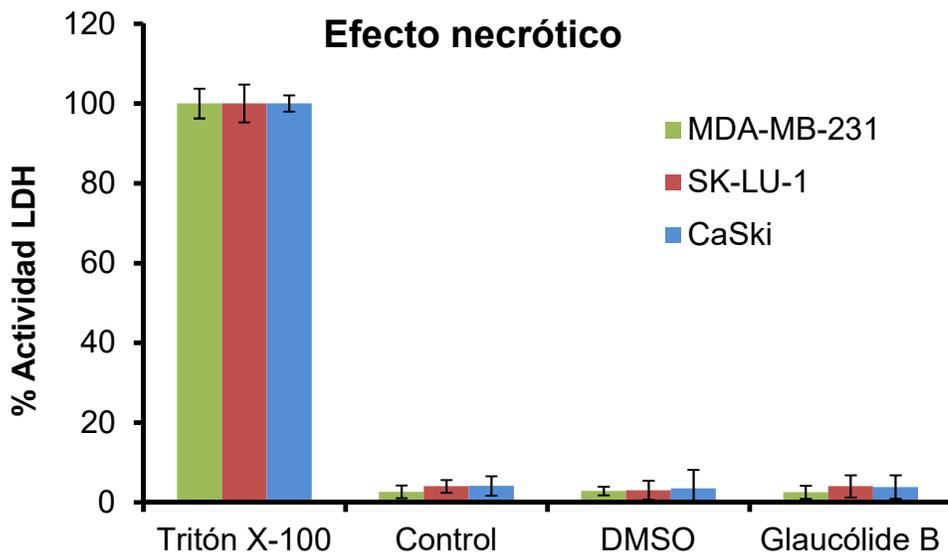


Fig.7. Porcentaje de actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes provenientes de los cultivos MDA-MB-231, SK-LU- y CaSki tratadas con la lactona Glaucólido B. El control positivo es representado por el Tritón X-100 que muestra la máxima actividad de LDH. No se presenta diferencia significativa en las barras de error ($p < 0.05$), (ANDEVA seguido de la prueba de Tukey).

Los resultados mostrados en la figura 7 muestran que no hay actividad de LDH en los sobrenadantes de las células tumorales, estableciendo que el Glaucólido B no induce la ruptura de la membrana plasmática de las células tumorales y que el decremento observado en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. En la tabla 3 se observan los porcentajes de cada línea celular.

% Actividad LDH

Línea celular	Control	DMSO	IC 50
SK-LU-1	4	3	4
MDA-MB-231	3.1	2.3	2.1
MDA-MB-231	1.44	2.7	3.8

Tabla 3. Porcentaje de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de células MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki Tratados con las IC₅₀ correspondientes a cada línea tumoral.

Muerte apoptótica en células tumorales: evaluación de la morfología celular.

Con la finalidad de determinar si la Lactona Glaucólido B induce una muerte apoptótica, cultivos de las líneas MDA-MB-231, SKLU-1 y CaSki fueron sembrados en cubreobjetos y tratadas con las IC₅₀ correspondientes durante 24 h. Las características morfológicas propias de esta muerte (condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos) fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia, mediante la tinción con el fluorocromo DAPI (Figuras 8, 9 y 10).

MDA-MB-231

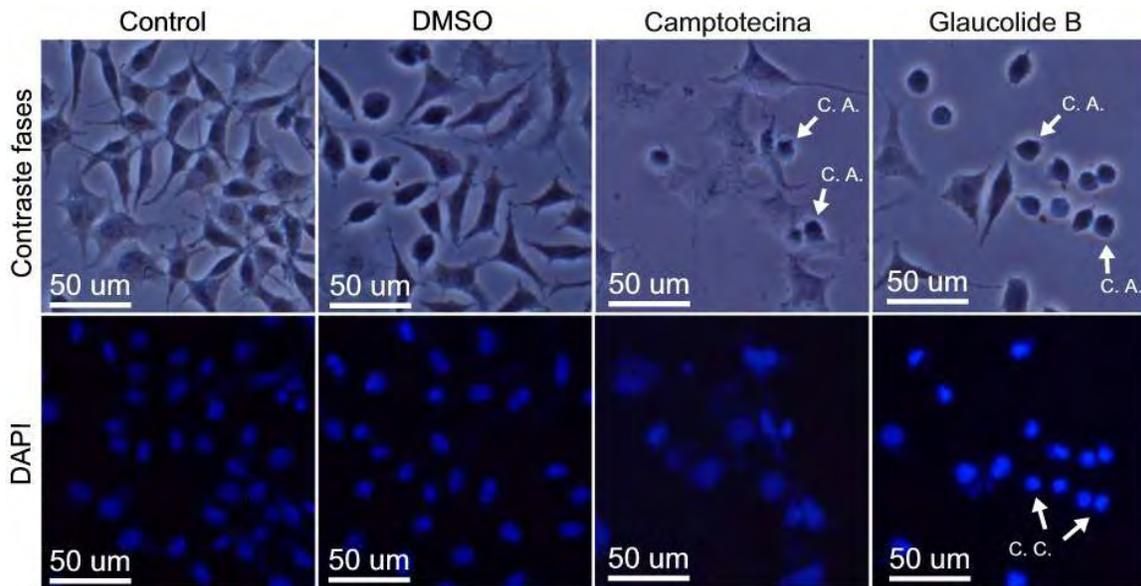


Fig.8. Efecto de la lactona Glaucólido B en la morfología celular de las células MDA-MB-231. Se sembraron 15,000 células por pozo sobre cubreobjetos y se trataron con la IC₅₀ correspondiente por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI y observadas en microscopio de epifluorescencia (Nikon, Japón). Las flechas indican cuerpos apoptóticos (C. A.), condensación de la cromatina (C. C.) y fragmentación nuclear (F. N.).

SK-LU-1

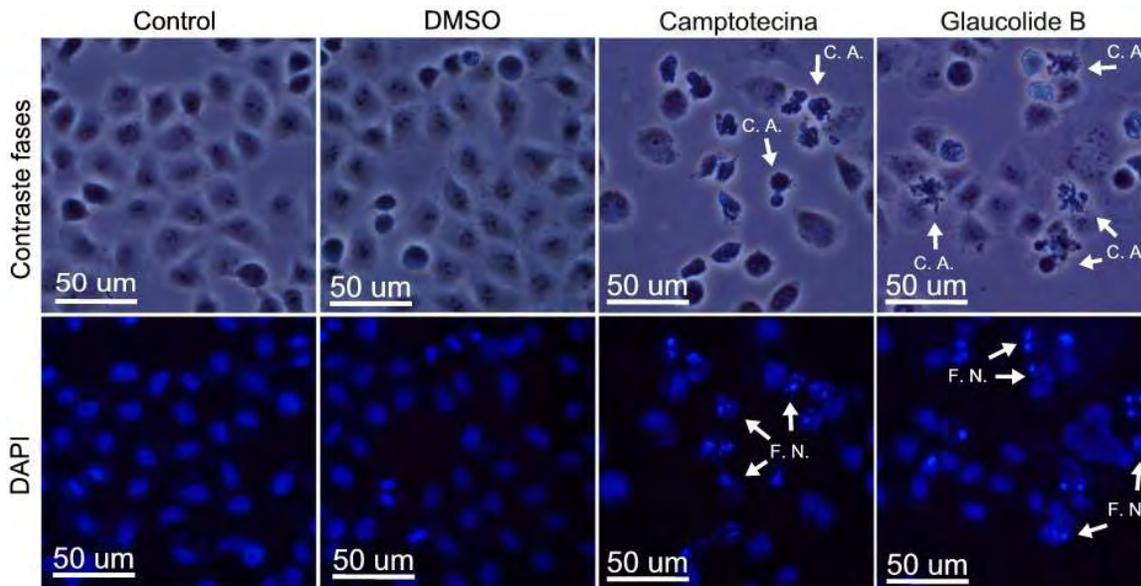


Fig.9. Efecto de la lactona Glaucólido B en la morfología celular de las células SK-LU-1. Se sembraron 15,000 células por pozo sobre cubreobjetos y se trataron con la IC₅₀ correspondiente por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI y observadas en microscopio de

epifluorescencia (NIKO, Japón). Las flechas indican cuerpos apoptóticos (CA), condensación de la cromatina (CC) y fragmentación nuclear (FN).

CaSki

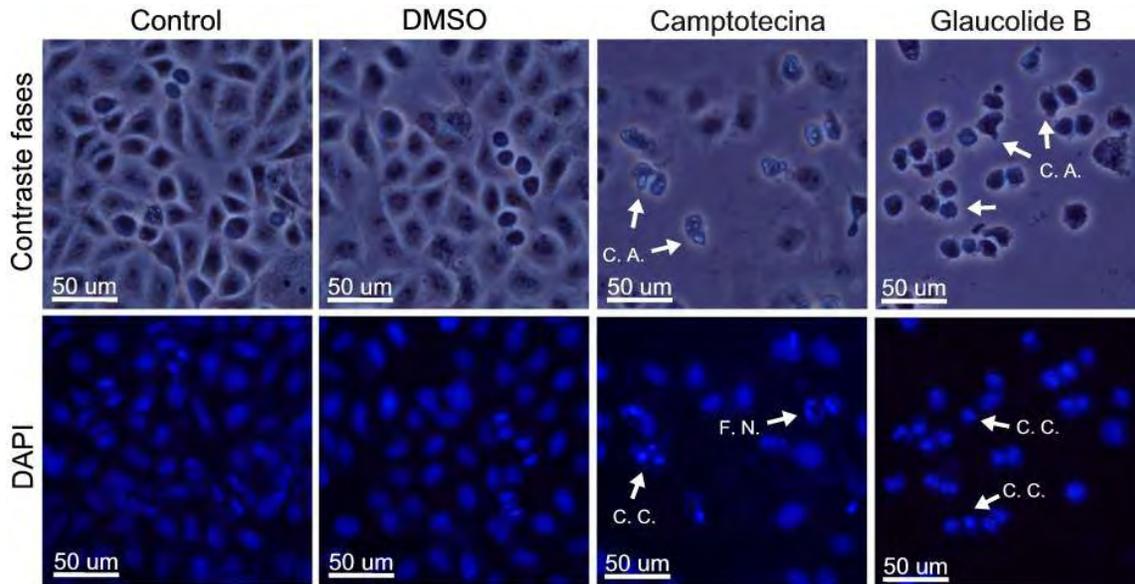


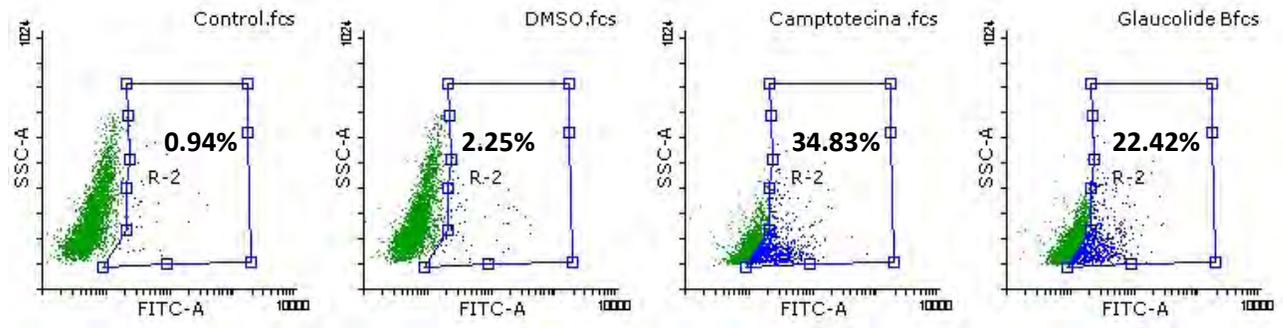
Fig.10. Efecto de la lactona Glaucólido B en la morfología celular de las células CaSki. Se sembraron 15,000 células por pozo sobre cubreobjetos y se trataron con la IC₅₀ correspondiente por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI y observadas en microscopio de epifluorescencia (Nikon, Japón). Las flechas indican cuerpos apoptóticos (CA), condensación de la cromatina (CC) y fragmentación nuclear (FN).

Los resultados observados en las figuras 9, 10 y 11 establecen que el Glaucólido B induce en las tres líneas tumorales a presentar una morfología característica de células apoptóticas, como disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, así como fragmentación del ADN, sugiriendo que la Lactona Glaucólido B induce a las tres líneas celulares a una muerte por apoptosis.

Cuantificación de caspasa-3 activa por citometría de flujo

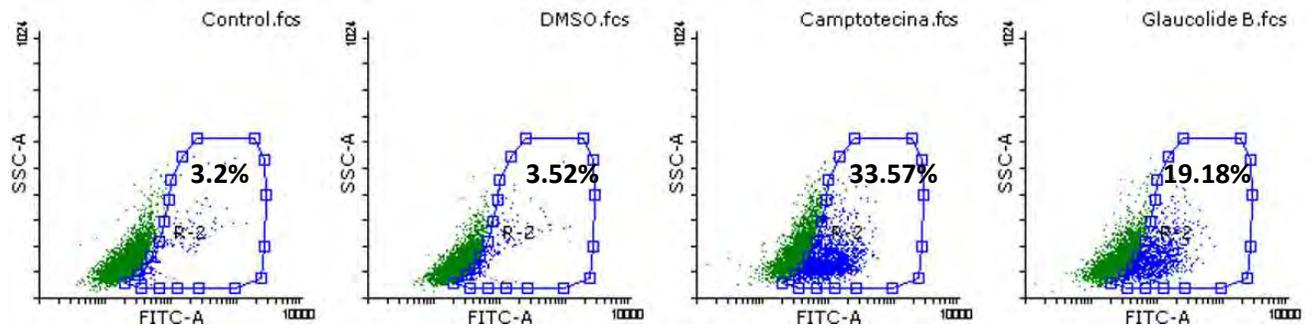
Con la finalidad de confirmar si la Lactona Glaucólido B induce una muerte apoptótica, las líneas celulares MDA-MB-231, SKLU-1 y CaSki, fueron tratadas con el compuesto a sus respectivas IC₅₀ y la caspasa-3 activa fue determinada por inmunocitoquímica y las células positivas fueron cuantificadas mediante citometría de flujo (Figura 11).

MDA-MB-231



SK-LU-1

34.83%



CaSki

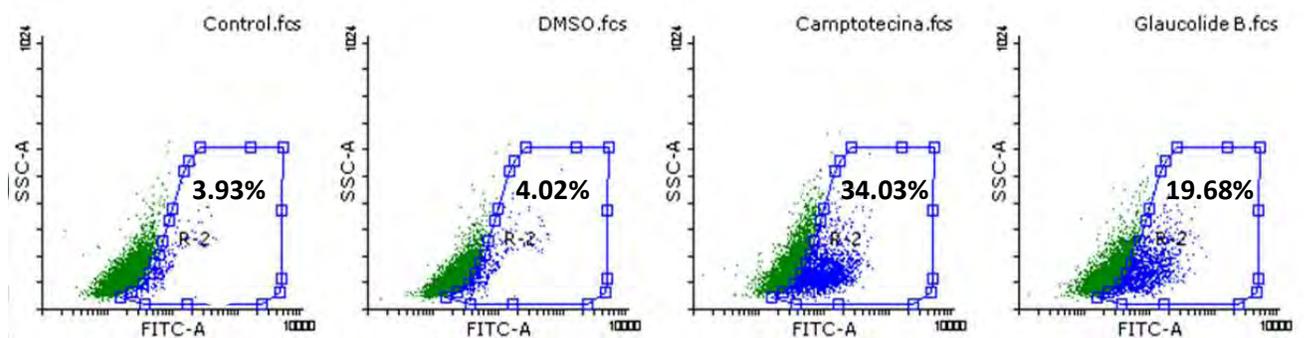


Fig.11. Detección de la caspasa-3 activa en las líneas tumorales MDA-MB-231,SK-LU-1 y CaSki, tratadas con el compuesto Glaucólido B, mediante citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Los datos obtenidos en la figura 11 muestran que el Glaucólido B induce a las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki a presentar la caspasa-3 activa con un 22%, 19.18% y 19.68% respectivamente, confirmando que el Glaucólido B induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis, dependiente de caspasa-3.

Actividad antiproliferativa de linfocitos humanos

Una vez establecido que la lactona Glaucólido B presenta actividad antiproliferativa sobre las líneas tumorales MDA-MB-231, SKLU-1 y CaSki, induciendo una muerte apoptótica, se determinó si este compuesto afecta a las células no tumorales. Para ello, cultivos de linfocitos humanos, provenientes de sangre periférica, fueron tratados con la lactona Glaucólido B a las concentraciones 15, 18 y 30 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas y la proliferación celular fue evaluada mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CFSE) y cuantificada por citometría de flujo (Figura 12 y tabla 4).

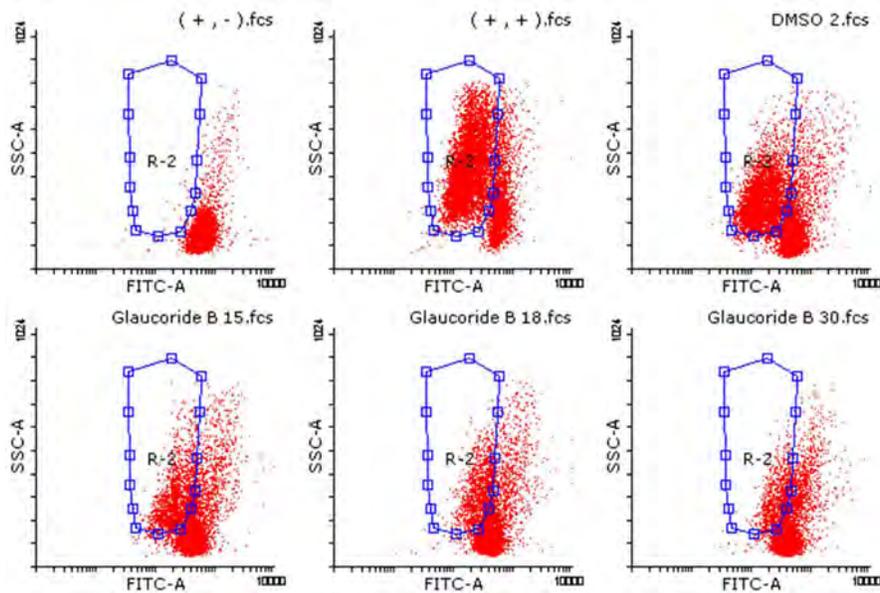


Figura.12. Efecto del Glaucólido B sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas obtenidas de sangre periférica humana. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, activados con fitohematoglutina (PHA) y marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y se estimularon con el compuesto a concentraciones de 15, 18 y 30 $\mu\text{g/ml}$ por 24h. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres ensayos independientes.

% Proliferación de linfocitos.

Condición	(+,-)	(+, +)	DMSO	15 µg/ml	18 µg/ml	30 µg/ml
%Proliferación	0.23	71.76	60.21	24.19	19.89	16.98

Tabla 3. Porcentaje de proliferación de linfocitos tratados a diferentes concentraciones del compuesto.

Los resultados mostrados en la figura 12 y tabla 3 establecen que el Glaucólido B afecta el potencial proliferativo de manera significativa a las concentraciones de 15, 18 y 30 µg/ml, sugiriendo que la actividad antiproliferativa de esta lactona no es selectiva.

Actividad necrótica en células no tumorales

Con la finalidad de determinar si la lactona Glaucólido B induce a las células linfocíticas a una muerte necrótica, cultivos de linfocitos fueron tratados con Glaucólido B a concentraciones de 15, 18 y 30 µg/ml por 24 horas y la actividad de la enzima citoplasmática LDH fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares. (Figura14).

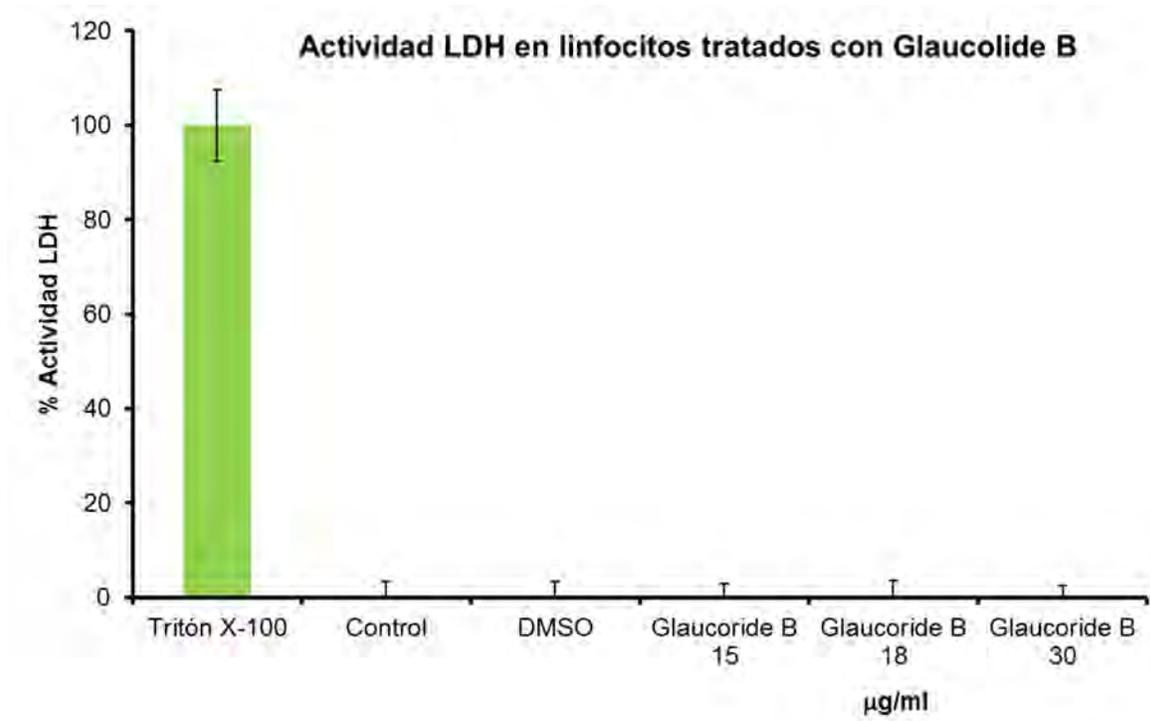


Fig.14. Inducción de muerte necrótica por Glaucolide B en cultivos de linfocitos provenientes de sangre periférica humana. La grafica representa uno de tres ensayos independientes. No se presenta diferencia significativa en las barras de error ($p < 0.05$), (ANDEVA seguido de la prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos en la figura 13 muestran que el Glaucolide B en los linfocitos humanos a las concentraciones de 15, 18 y 30 µg/ml no induce a una muerte celular necrótica, sugiriendo que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a una muerte necrótica.

9. Discusión

México posee una larga tradición herbolaria. Las plantas con propiedades de uso medicinal ascienden a más de tres mil, y la efectividad de muchas de ellas aún no ha sido probada (Linares, 2002). Por tanto, en los últimos años surge un gran interés por descubrir alternativas naturales para la prevención y cura de algunas enfermedades graves como el cáncer. Al respecto, ha sido observado que varios compuestos como es el caso de las lactonas de algunas plantas poseen un gran potencial antitumoral.

Las lactonas sesquitérpenicas se encuentran clasificadas en un grupo importante de productos de origen natural, que son extraídas de muchas especies de plantas de uso medicinal, principalmente provenientes de la familia Compositae.

En el presente trabajo fue evaluada la actividad antiproliferativa, apoptótica y necrótica de la lactona sesquitérpenica Glaucólido B, sobre tres líneas tumorales, si bien se tiene información acerca de las propiedades biológicas de algunas lactonas para el Glaucólido B esa información es escasa, de ahí la importancia de este trabajo.

Los efectos antiproliferativos en las líneas de células de cáncer podrían estar asociados, a la unión covalente de las lactonas sesquitérpenicas a grupos sulfídricos libres en proteínas, que podría las funciones de varias macromoléculas, dando como resultado que las lactonas pueden interferir con algunos procesos biológicos claves, tales como, señalización celular, proliferación celular, muerte celular (apoptosis) y respiración mitocondrial, entre otros que dejan ver su diversa actividad farmacológica. (Schmidt, 2001).

Las concentraciones de IC₅₀ para las líneas celulares MDA-MB-231 y SKLU-1 fueron muy similares (18 y 15 µg/ml respectivamente), sugiriendo que presentan una similar sensibilidad al compuesto, mientras que para las células CaSki, la IC₅₀ fue de 30 µg/ml, indicando que esta línea es dos veces menos sensible al compuesto que las células MDA-MB-231 y SKLU-1.

Con respecto a la actividad necrótica del Glaucólido B en las células tumorales, es de llamar la atención que este compuesto no induzca a las células tumorales a una muerte necrótica, ya que los efectos colaterales que presentan los quimioterapéuticos aplicados al tratamiento contra el cáncer, están fuertemente relacionados con la actividad necrótica de estos compuestos, sugiriendo que si el Glaucólido B no genera necrosis en las células tumorales, los efectos secundarios esperados para este compuesto podrían ser bajos o poco significativos.

El principal objetivo de los nuevos agentes quimioterapéuticos es inducir cambios celulares que culminan en daño al ADN. En respuesta al daño, las células tienen mecanismos de señalización que pueden restaurar y promover la supervivencia celular o iniciar la muerte celular programada. Entre los diversos tipos de muerte

celular, la apoptosis es de las más estudiadas. La búsqueda de compuestos anticancerígenos que inducen la muerte celular por apoptosis es altamente deseable, ya que este tipo de muerte genera una reacción inflamatoria mínima. (Franzoni *et al.*, 2017).

En cuanto a la muerte apoptótica, las células presentan características comunes típicas tales como la contracción celular, condensación de la cromatina y núcleos fragmentados (Ding *et al.*, 2017; Elmore, 2007).

Para observar si la muerte inducida por el Glaucólido B dependía de la apoptosis se observaron las características morfológicas de los cultivos de células tumorales, los resultados, muestran que la lactona Glaucólido B induce una muerte apoptótica sobre las líneas tumorales MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki, después de las 24 horas del tratamiento con el compuesto, observando condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

Al respecto, se ha informado que algunas lactonas como la Partenólida conducen una muerte apoptótica mostrando características propias de este tipo de muerte, observado condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y pérdida de la integridad de la membrana (Siyuan Zhang, *et al.*, 2005).

De acuerdo a la literatura, algunas lactonas pueden desencadenar la apoptosis agotando la proteína intracelular GSH y la perturbación del equilibrio REDOX, promueve el estrés del retículo endoplásmico que responde liberando Ca^{2+} al citosol, aumento en la activación de la caspasa 8 y la división de Bid. Acción sobre las proteínas Bcl.2 en la ruta de apoptosis mitocondrial (Schmidt, 2001).

Otra de muerte apoptótica, como ya se hizo mención anteriormente es la activación de la caspasa-3, en las líneas MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki, estimuladas con la lactona Glaucólido B, se observó después de 24 horas la expresión de caspasa3 con porcentajes de 22.42, 19.18 y 19.68 respectivamente. Confirmando así que la muerte que se lleva a cabo en las tres líneas tumorales es apoptótica.

Se sabe que un nuevo compuesto prometedor en terapia contra el cáncer no solo se basa en su capacidad para inducir la muerte de las células tumorales, también en su selectividad, es decir, en su capacidad para afectar mínimamente a las células normales (Lyss, 1998). En cuanto a su selectividad en un estudio se realizó la evaluación de proliferación celular en linfocitos determinado que las concentraciones de Glaucólido B superiores a 15 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo inhibieron casi por completo el crecimiento celular (Regislaine, 2000).

Nuestros resultados muestran también una disminución de la proliferación de células linfocitarias humanas no tumorales de manera dosis dependiente al ser tratadas con la lactona Glaucólido B. Es relevante destacar, que la citotoxicidad en las células linfocíticas no tumorales es nula, debido a que no se detectó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos, pudiendo ser que las células

linfocitarias no tumorales, presenten un efecto distinto a la muerte necrótica. Se sabe que la Lactona Esferocefalina induce a células HeLa y CaSki a salir de fase G2/M del ciclo celular (Lozada, 2013).

A pesar de que esta lactona afecta la proliferación de células no tumorales es importante destacar que el Glaucólido B podría ser empleado para tratar enfermedades autoinmunes o linfomas, atacando a las células cancerosas sin generar daños tan severos que comprometan la calidad de vida de los pacientes, a comparación de lo que ocurre con la quimioterapia, los compuestos utilizados en la actualidad para el tratamiento contra el cáncer son altamente necróticos y presentan citotoxicidad, como consecuencia se generan efectos secundarios que comprometen más la vida de los pacientes.

Se sugiere que el compuesto Glaucólido B podría servir de molécula modelo para sintetizar compuestos derivados, que podrían presentar una mejor acción selectiva sobre células tumorales, además de analizar qué induce el decremento en la proliferación en los linfocitos.

10. Conclusiones

La lactona sesquiterpénica de tipo Germacranolide Glaucólido B presenta actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, pulmón SK-LU-1 y Cérvico-uterino CaSki con una IC₅₀ de 18 µg/ml, 15 µ/ml y 30 µg/ml respectivamente.

La lactona sesquiterpénica de tipo Germacranolide Glaucólido B no presenta un efecto necrótico sobre las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, pulmón SK-LU-1 y Cérvico-uterino CaSki.

La lactona sesquiterpénica de tipo Germacranolide Glaucólido B genera características morfológicas propias de la apoptosis, así como la inducción de la caspasa-3 activa en 19.18 y 19.68% para las líneas tumorales MDA-MB-231, pulmón SK-LU-1 y Cérvico-uterino CaSki respectivamente, tratadas con las IC₅₀ correspondientes.

La lactona sesquiterpénica de tipo Germacranolide Glaucólido B afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas a las concentraciones de 18 µg/ml, 15 µ/ml y 30 µg/ml, sin inducir una muerte necrótica.

11. Bibliografía

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jhonson A, Lewis J., (2008). *Biología Molecular de la Célula*. New York : Omega. pp.1728.
- American Cancer society . (2016). *Cáncer cervical*. Consultado 6 febrero 2018, [cáncer society Sitio web: https://donate3.cancer.org/?campaign=search&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=%5BB%5D+MX+American+Cancer+Society](https://donate3.cancer.org/?campaign=search&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=%5BB%5D+MX+American+Cancer+Society).
- American cáncer society (2007) *Causas del cáncer*. Consultado 12 de enero, [cáncer society sitio web: en https://scholar.google.com.mx/scholar?q=american+cancer+society&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart](https://scholar.google.com.mx/scholar?q=american+cancer+society&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart).
- Asociación española contra el cáncer (2011). *Cáncer de mama y sus causas*. Consultado 10 de febrero 2018, *Ciencia española* Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009739X02719556>.
- American cáncer society. (ACS) (2016). *Lung cancer Risk factors*. Consultado 23 enero 2017, *cáncer society* Disponible en: <https://www.cancer.org/es/quienes-somos/datos-sobre-la-sociedad-americana-contra-el-cancer.html>.
- Balunas MJ. 2005. *Drug discovery from medicinal plants*. New York: Life Sciences;78(5):431-441
- Bhat B.A., Dhar K.L., Puri S.C., Qurishi M.A., Khajuria A. Gupta A. y Qazi G.N. (2005). *Isolation, characterization and biological evaluation of datura lactones as potential inmunomodulators*". New York: *Bioorganic & Medical Chmmiestry*, pp. 677.
- Berek Jonathan S. y Hacker Neville F. 2005 *“Ginecología oncológica práctica”*. México: Mc Graw Hill. 4ª ed, pp. 908.
- Cascales Angosto M. (2003). *Bases moleculares de la apoptosis*, *Anal. México: Real Acad. Nal. Form: 36-69*.
- Chabner B. A. y Collins J. M. 2000, *“Cancer Chemotherapy. Principles & Practice”*.Philadelphia: Lippincott Company Philadelphia. New York, pp. 545.

- Coleman R., 2005 Bisphosphonates in breast cancer. New York: Ann Oncol, pp. 695.
- Cooper G.M, Hausman R. 2009 "The cell: a molecular approach". Washington, D.C: ASM Press; Sunderland, Mass. : Sinauer Associates. pp. 820.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A review of programmed Cell Death. Toxicologic. Pathology. New York: Omega, 35 (4): 495-516.
- Franzonie Maioral M., Nascimento Bodadak C., Marcell Stefnes N., Bigolin A., Mascarello A., Chiaradia-Delatore L., Augusto Yunes & Santos Silva M., (2017). Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. New York: Biochimie 140: 48-57.
- Grillo C, Martínez M, Morales B. (2008). Virus del papiloma humano: Aspectos moleculares y cáncer de cérvix. Revista colombiana de Obstetricia y Ginecología, 35, 310-315.
- Jordan J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada, vol 22, Núm 6.
- Linares M. y Flores B. 2002" Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales", México: Instituto de biología UNAM.
- Lizarb. El e Irracheta M.A. (2007). El suicidio y la muerte celular, REV. Real Academia de Ciencias. Extractos Naturales. España. Burguera, 1-33.
- Lozada.E. 2013 "Efecto antiroliferativo y/o apaoptótico de la lactona Esferocefalina sobre líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino" Tesis de licenciatura FES Zaragoza UNAM México, pp 51.
- Lyss G. 2001. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappa B by directly targeting. New York Journal of Biological Chemistry.
- Moctezuma Velazco C.R., & Patiño Zarco M. (2009). Cáncer de pulmón. México, RADIOLOGÍA; 1:33-45.
- National Cancer Institute (NHI). (2012). Lung cancer. Consultado 3 mayo del 2018. Cancer Institute, página web: <https://www.cancer.gov/espanol/instituto>.

- Organización Mundial de la Salud 2016, consultada 28 abril 2018. OMS, sitio web : <http://www.who.int/gho/es/>.
- Organización Mundial de la Salud 2016, consultada 14 marzo 2018. OMS, Sitio web: <http://www.unaids.org/es/aboutunaids/unaidscosponsors/who>.
- Ortega C. 2009." Efecto de la lactona Arglanina sobre el potencial proliferativo y ciclo celular de células tumorales de cérvix humano (ViBo, CaLo y CaSki)" Tesis de licenciatura FES Zaragoza UNAM México, pp 68.
- Regislaine V. Burim, Renata Canalle João L. Callegari Lopes and Catarina S. Takahashi. 2000. GENOTOXIC ACTION OF THE SESQUITERPENE LACTONE GLAUCOLIDE B ON MAMMALIAN CELLS. New York: Genetics and Molecular Biology 22; 401-406.
- Salinas A., 2002. Esteroles, Flavonoides y Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Xanthium spinosum* Asteraceae. México: Actafarm 293-300
- Sánchez Torres L. E., & Diosado Vargas F. (2003). Apoptosis the phenomenon and its determination, México: Omega, 4(1):49-62.
- Siyuan Z., Yen-Kim W., Con-Nam O. y Han-Ming S. 2005. "Anti-cancer Potencial of sesquiterpene lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms".New York: Vol. 5 249 pp.
- Schmidt TJ. 2001. Helenanolide-type sesquiterpene lactones Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. New York: Bioorganic & Medicinal Chemistry ;5(4):645-653.
- Steele A. J., Jones D. T., Ganeshaguru K., Duke V. M., Yogashangary B. C., North J. M., Lowdell M. W., Kottaridis P. D., Mehta A. B., Prentice A. G., Hoffbrand A. V. y Wickremasinghe R. G. 2006. "The sesquiterpene lactone parthenolide induces selective apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro". Leukemia Nature Publishing Group Vol. 20 pp. 1079.

12. Anexos

Preparación de reactivos

Medio de cultivo DMEM

DMEM (GIBCO, USA)	13.44g
NaHCO ₂ (SIGMA, USA)	3.7g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (SNT), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de ternera (SNT) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57°C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL para su mejor uso y manipulación.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1000mL de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (SIGMA, USA)	8.00g
Cloruro de potasio (SIGMA, USA)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA)	0.20g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora a un volumen final de 1000 mL. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana con diámetro de 22 µm, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Verseno

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales CaSki y HeLa adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

EDTA (SIGMA, USA)	0.4g
NaCl (SIGMA, USA)	8g
KCl (SIGMA, USA)	0.4g
Tris (SIGMA, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza en autoclave a 20 lbs. durante 20 min.

Solución cristal violeta (0.1%)

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

NaOH (SIGMA, USA)	3.96g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA)	4.28MI
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	1g

Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforado a 500 mL con agua bidestilada. Una vez preparada la solución debe ser filtrada.

Glutaraldehído

A 1.57 mL de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4°C.

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2 %)

Paraformaldehído al 2 % en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60°C. Se almacena a 4°C.