



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

“Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la lactona sesquiterpénica pseudoguayanólida Hymenina en las líneas celulares CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Denisse Valeria Alvarez Lara



DIRECTOR DE TESIS: DR. Hugo López Muñoz

Ciudad de México, Mayo 2019



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 **ALVAREZ LARA DENISSE VALERIA**, con número de cuenta **311029345**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **28 de mayo de 2019 a las 11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA

VOCAL Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SECRETARIO Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE Dra. JUANA MONROY MORENO

SUPLENTE Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la lactona sesquiterpénica pseudoguayanólida Hymenina en las líneas celulares CaSKI, SK-LU-1 y MDA-MB-231.**

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 25 de abril de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

“La vida es una osada aventura o nada en absoluto”.

Helen Keller

“La ciencia es una forma de pensar, mucho más que un cuerpo de conocimiento”.

Carl Sagan

DEDICATORIA

A mis padres, Maru e Isrra. Por su apoyo y amor incondicional en cada momento de mi desarrollo, ustedes forman una parte esencial de mi vida. Mi viaje apenas comienza pero este primer triunfo es para ustedes con todo el amor y gratitud que se merecen. Los amo.

A mi familia, por ser mi mayor pilar y tesoro. Los momentos a su lado son un regalo invaluable. Especialmente a mis abuelos, que son lo más hermoso que tengo.

A Chava, por estar a mi lado en todo momento, por ser mi cómplice y mi gran apoyo. 831

A mis profesores Daniel y Rivera. Por ser una inspiración y modelo a seguir durante mi formación académica.

A mis amigos/maestros Fernando e Iván, por sus consejos y apoyo académico, por sus malas bromas y por ser muy buenos amigos.

A mis amigos, por los momentos de diversión que hicieron de esta carrera, una bonita experiencia.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Fes Zaragoza

Al Dr. Hugo López Muñoz, por darme las herramientas técnicas necesarias para la realización de este trabajo, por ayudarme a resolver mis dudas y ser una inspiración para los nuevos científicos.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por aceptarme en su equipo de trabajo, por sus consejos, por ayudarme a mejorar como persona y como profesionista, por saber orientar a los alumnos de la mejor manera posible.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes, por su amabilidad y apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Alberto Monroy García, por las observaciones y correcciones realizadas a este trabajo para mejorarlo.

A la Dra. Juana Monroy Moreno, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus acertadas correcciones.

Esta tesis fue realizada con apoyo de los proyectos: PAPIIT IN216718 y IN220916 y de los proyectos CONACyT 255881 y 253979

Tabla de contenido

Marco Teórico	2
La Célula	2
Ciclo celular	2
Muerte celular	5
Necrosis	5
Apoptosis	6
Cáncer	10
Agentes Carcinógenos	13
Epidemiología	14
Cáncer de pulmón	15
Cáncer de mama	16
Cáncer de cérvix	19
Tratamientos	22
Medicina Tradicional	24
Lactonas Sesquiterpénicas	25
Hymenina	30
Planteamiento del problema	32
Justificación	33
Hipótesis	34
Objetivo	35
Diseño Experimental	36
Resultados	41
Actividad antiproliferativa de la Hymenina en las líneas tumorales	41
Efecto necrótico de la Hymenina en las líneas tumorales	44
Inducción de muerte apoptótica de la Hymenina en las líneas celulares	45
Morfología celular	45
Detección de caspasa 3 activa por Inmunofluorescencia	45
Detección de la caspasa 3 activa por citometría de flujo	49
Evaluación del efecto en células no tumorales	51
Potencial proliferativo	51
Efecto necrótico	52
Discusión	53
Conclusiones	57
Perspectivas	57
Bibliografía	58
Apéndice	64

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos. El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada tipo de cáncer requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, sin embargo, estos tratamientos suelen ser inespecíficos y con efectos secundarios adversos que afectan la calidad de vida de los pacientes. De ahí surge la necesidad de encontrar nuevos compuestos naturales que presenten actividad antitumoral, además de ser selectivos tales como las lactonas sesquiterpénicas. Estas moléculas han llamado la atención de los científicos por el amplio espectro de actividades biológicas que presentan como antiinflamatoria, antitumoral y citotóxica. En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la lactona Hymenina en la línea de cáncer de mama "MDA-MB-231", de cérvix "CaSki" y de pulmón "SK-LU-1". Los resultados obtenidos mostraron que la Hymenina induce una disminución en el número celular del 50% (IC_{50}) a las concentraciones de 8.9, 8.7, 7.7 μ M, respectivamente. Los bajos niveles de actividad de LDH registrados en los cultivos tratados con la Hymenina indican que este compuesto es de baja actividad necrótica. La observación de características morfológicas típicas de las células apoptóticas (contracción celular, pérdida de la morfología poliédrica, pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas, condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos, etc) en los cultivos tratados con la lactona, así como la detección de la caspasa-3 activa en las tres líneas tumorales, indica que la Hymenina induce a las líneas celulares MDA-MB-231, CaSki y SK-LU-1 a una muerte por apoptosis.

Por otro lado, con la intención de evaluar si este compuesto presenta selectividad por las células tumorales, se procedió a evaluar el efecto de la Hymenina en células no tumorales, específicamente en linfocitos de sangre periférica humana, donde se obtuvo que la lactona Hymenina afecta significativamente la proliferación de las células linfocíticas tratadas con las IC_{50} correspondientes a cada línea celular, sugiriendo que el compuesto no presenta selectividad. Sin embargo, la evaluación de la presencia de la enzima LDH en los medios de cultivo mostró que no se induce en el cultivo de células linfocíticas una muerte por necrosis.

Es por estas razones que la Hymenina podría ser un buen candidato para evaluarse como un potencial agente terapéutico contra el cáncer.

MARCO TEÓRICO

LA CÉLULA

La célula es la unidad estructural, histológica y anatómica de los seres vivos y cada una de ellas se organiza en tejidos, órganos y aparatos, orientados a una función específica **(Amada, 2012)**

Las células reciben y coordinan señales del entorno y de otras células del mismo organismo, controlando así los procesos de proliferación, diferenciación, migración o muerte celular. **(Mayor, 2005)**

La proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado que implica el aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular, es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos.

La célula se reproduce mediante la duplicación de su ADN y la posterior división en dos células, con la transmisión de una copia de las instrucciones genéticas codificadas en el ADN a cada una de sus células hijas. Sin embargo, la copia no siempre es perfecta, y las instrucciones, en ocasiones, son adulteradas por mutaciones que modifican el ADN. Las mutaciones o cambios del ADN pueden generar una descendencia con modificaciones negativas (porque las células hijas son menos capaces de sobrevivir y de reproducirse), positivas (porque son más aptas para sobrevivir y reproducirse) o neutras (porque son genéticamente diferentes, pero igual de viables). La lucha por la supervivencia elimina a las primeras, favorece a las segundas y tolera a las terceras **(Alberts, 2010)**

Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso conocido como ciclo celular, el cual es una serie ordenada de eventos en donde la célula crece, duplica su material genético y se divide para dar lugar a dos células hijas. **(Jiménez, 2003)**

CICLO CELULAR

El ciclo celular está formado por las fases G1, S, G2 y M (la letra G significa intervalo o "gap", la S síntesis y la M mitosis). Específicamente durante la fase G1, la célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número; en consecuencia, la célula aumenta en tamaño. Algunas estructuras son sintetizadas por la célula; por ejemplo, microtúbulos, microfilamentos de actina y los ribosomas. También hay replicación de mitocondrias previamente existentes **(Lomanto, 2003)**

La fase S, es donde las células duplican su material genético cuando la célula adquiere el tamaño suficiente. Ésta es una acción compleja debido a la gran longitud de las hebras de ADN que forman un núcleo eucariota. Además, la replicación del ADN debe cumplir dos condiciones: una sola replicación y cometer los menos fallos posibles. Cualquier error en la copia del ADN puede llevar a daños letales para las células hijas o incluso para la totalidad del organismo. Durante la fase G2 se verifica que la duplicación del material genético haya concluido y que el ADN nuclear no presente daño, además las células continúan creciendo y se preparan para la mitosis ya que se acumulan progresivamente aquellas moléculas cuyas actividades serán necesarias durante la fase M (Megías, 2017) y finalmente la fase M, en donde se producirá la repartición equitativa del material genético; todos los organelos y la maquinaria necesaria esencial para la división de la célula progenitora en dos células hijas idénticas en contenido, aunque de menor tamaño (Figura 1)

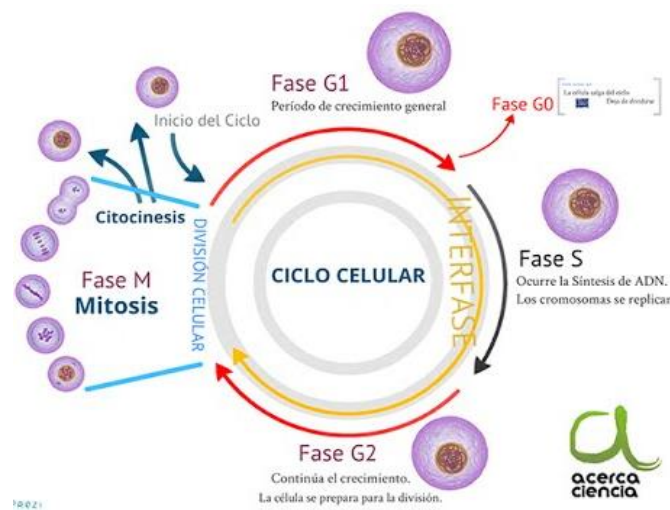


Figura 1. Esquemmatización del ciclo celular. Está comprendido por dos fases que se alternan cíclicamente llamadas interfase y fase M. La interfase se subdivide en G1, S y G2. Krumholtz, S (2015) The cell eukaryotic cycle. Recuperado de: <http://www.slk-art.com/new-page>

Existe una fase fuera del ciclo celular llamada G0 en donde las células se encuentran en un estado quiescente no proliferativo debido a la ausencia de factores de crecimiento apropiados, lo que lleva a las células a una especie de latencia en el ciclo celular, en el cual el sistema de control no avanza a través de G1. (López, 2003)

Dentro del ciclo celular, también aparece un sistema molecular, denominado punto de control o “checkpoint”, los cuales evitan la progresión del ciclo celular en presencia del ADN dañado, dando tiempo para que la reparación se produzca y se prevengan alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones posteriores. Consistentemente, los puntos de control proporcionan una barrera para el desarrollo del cáncer (Lagunas, 2014). Los puntos de control actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente; uno de ellos se encuentra en G1, justo antes de entrar en fase S y el otro en G2 antes de la mitosis.

En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, estados de las partículas, entre otros elementos necesarios para a un ciclo celular típico normal (Figura 1)

La duración del ciclo celular presenta variaciones de un tipo de célula a otra y entre las especies. Existen tres tipos o clases de células básicamente en el organismo: la primera clase con alta especialización estructural como las células nerviosas, las células musculares y los eritrocitos que maduran y pierden su capacidad de división. La segunda clase, que normalmente no se divide, pero que puede iniciar un ciclo de división celular como respuesta a un estímulo apropiado; ejemplo de ellas, los hepatocitos y linfocitos. La tercera clase de células, con un alto nivel de división celular, tales como las células epiteliales, entre otras **(Lomanto, 2003)**

La progresión del ciclo celular está controlada por múltiples factores de crecimiento, los cuales determinan el comportamiento de la célula, incluyendo la decisión de crecer, diferenciarse o morir por apoptosis. Todos estos factores actúan en el ciclo afectando las proteínas que lo regulan. Entre las proteínas regulatorias positivas más importantes se encuentran las ciclinas, que constituyen la subunidad regulatoria de otras proteínas relacionadas conocidas como proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estos complejos ciclina/CDK son los reguladores clave para la transición de una fase a otra en el ciclo celular, en los denominados puntos de restricción. Cuando las células salen del estado quiescente y entran a la fase G1, se induce la expresión de las ciclinas del tipo D y E. Al inicio de la síntesis del ADN en la fase S, se sintetiza la ciclina A seguida por la síntesis de la ciclina B, que ocurre durante el intervalo entre la fase S y la fase G2, degradándose ambas al final de la mitosis **(López, 2003)** (Figura 2)

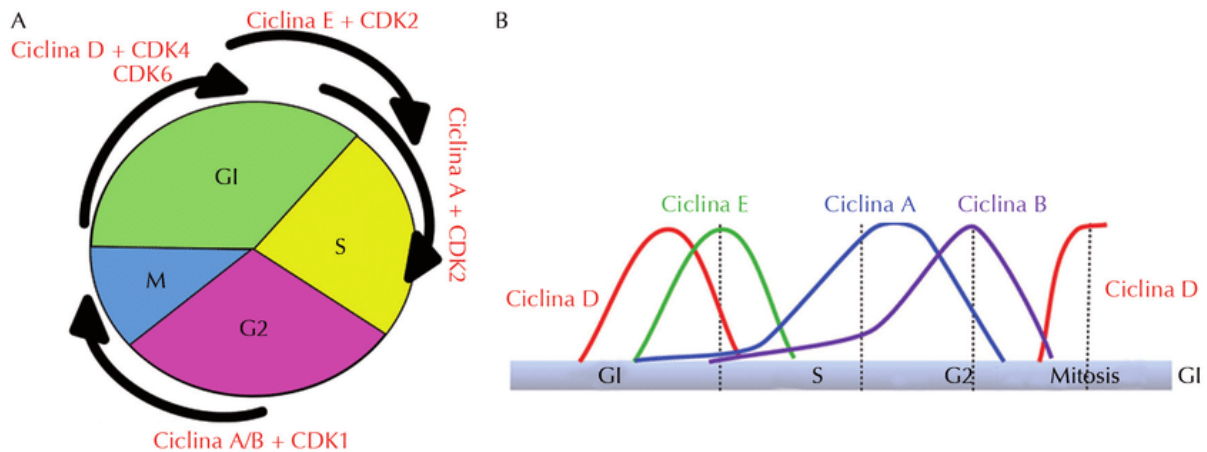


Figura 2. Complejos CDK/ciclinas en la regulación del ciclo celular. B) está indicada la concentración de cada tipo de ciclina según la cual se regulará el paso a la siguiente fase.

Durantes, D (2014) Las controladoras del ciclo. Recuperado de:

<https://investigarentiemposrevueltos.wordpress.com/2014/>

Sin embargo, cuando la célula ha sufrido un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno, donde cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (**Lizarbe, 2007**)

MUERTE CELULAR

La muerte de las células en los tejidos humanos y en otros organismos multicelulares ocurre en todo momento, desde las primeras fases del desarrollo embrionario hasta el fallecimiento, es un hecho normal y no produce alteración de las funciones. Las células se hallan inmersas en un ciclo continuo de proliferación y muerte. El equilibrio entre ambos procesos resulta fundamental para mantener el correcto funcionamiento de los tejidos. Las células que mueren por envejecimiento o por lesiones accidentales son de esta forma remplazadas por otras gracias a la multiplicación de las células vecinas, lo que permite mantener más o menos constante su número en los tejidos y órganos, existiendo una tasa o ritmo de relación proliferación/muerte que varía de un tejido a otro. (**Oropesa, 2015**)

White (1993) señaló que el control de la muerte celular es fundamental, debido a que la falta o exceso de muerte celular puede conducir a trastornos en el organismo adulto. Así, por ejemplo, alteraciones que induzcan muerte celular fuera de tiempo o de lugar producen enfermedades degenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson, ambas asociadas a muerte neuronal, mientras que una inhibición de la apoptosis puede ser crítica en el surgimiento del cáncer (**Jiménez, 2003**).

Los dos tipos de muerte celular más estudiados son: la necrosis y la apoptosis

Necrosis

La Necrosis corresponde a la destrucción patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido, provocada por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica, que causa una lesión tan grave que no puede repararse o curarse (**Oropesa, 2015**). Es un proceso pasivo, catabólico y degenerativo que no depende de ningún mecanismo fisiológico, que aparece sin participación de la célula y que afecta habitualmente a un amplio grupo celular provocando una alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática que permite la entrada anormal de iones, principalmente Ca^{+2} , al interior de la célula con acompañamiento pasivo de agua, lo que provoca edema celular con aumento progresivo de su tamaño y modificación de las estructuras citoplasmáticas: retículo endoplásmico, mitocondrias, etc., que se hinchan y estallan (**Heras, 2002**). Se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno, un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicas o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune.

Se caracteriza por que la membrana celular se rompe y se libera, al exterior el contenido citoplasmático, dentro del cual se encuentran enzimas citoplasmáticas que éstas sirven como marcadores bioquímicos de muerte necrótica, como es el caso de la determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), estas enzimas pueden provocar daños en el tejido circundante, una deficiente eliminación de las células muertas y la activación de una respuesta inflamatoria (**Lizarbe, 2007**) (Figura 3)

Apoptosis

La muerte celular programada, es una forma de suicidio celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos (**Pérez, 2012**), permite al organismo su correcta morfogénesis, así como la renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia (**De la Rosa, 2000**).

Este tipo de muerte celular conlleva a la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca una muerte celular programada. Estos mecanismos fisiológicos de muerte son empleados por los organismos multicelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas (**Lizarbe, 2007**).

Es la muerte celular que se caracteriza por el redondeamiento de la célula, una retracción de sus prolongaciones citoplasmáticas, reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (cariorexis), con escasa o nula modificación ultraestructural de los organelos citoplasmáticos, burbujas de membrana plasmática y mantenimiento intacto de la membrana plasmática hasta que el proceso haya finalizado (**De Toro, 2006**) (Figura 3)

En la apoptosis, se pueden distinguir tres fases:

- ✿ **Fase efectora**, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{++} intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas -caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular.
- ✿ **Fase degradativa**, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el ADN, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.
- ✿ **Fase de eliminación**, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas.

(Cascales, 2003)

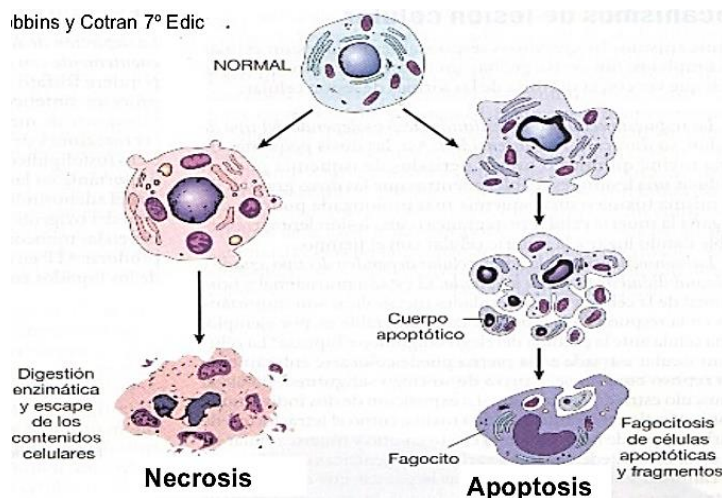


Figura 3. Tipos de muerte celular. Secuencia de cambios morfológicos que ocurren durante la muerte celular por necrosis y apoptosis. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/quest18ad09/apoptosis-y-ciclo-celular>

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis es similar en todas las células animales. Depende de una familia de proteasas que contienen una cisteína en su sitio activo y que escinden sus proteínas diana sobre residuos específicos de ácido aspártico. Por ese motivo, reciben el nombre de caspasas (c de cisteína y asp de ácido aspártico) (**Alberts, 2010**).

Aunque la familia de las caspasas comparte una estructura común, los análisis filogenéticos han demostrado la existencia de subfamilias que presentan diferentes características y que por lo tanto pueden tener distinto papel en el proceso de apoptosis. Así, las caspasas iniciadoras (caspasas -2, -8, -9, -10) presentan pro-dominios funcionales que permiten la asociación de estas moléculas con complejos de señalización; las caspasas ejecutoras (caspasas -3, -6 -7) son activadas por las caspasas iniciadoras y son las responsables de la interacción con otras moléculas que desencadenan la apoptosis. La tercera subfamilia de caspasas es la de las caspasas procesadoras de citoquinas (caspasas-1, -4, -5, -12, -13, -14) (**Medrán, 2008**)

Éstas se sintetizan en la célula como precursores inactivos o procaspasas, los cuales son activados por lo general por escisión proteolítica. La escisión de las procaspasas se produce en uno o dos residuos de ácido aspártico específicos y es catalizada por otras. Una vez activadas, las caspasas escinden y activan otras procaspasas, generando una cascada proteolítica amplificadora (**Alberts, 2010**).

Actualmente hay dos vías alternativas para activar a las caspasas: una es iniciada por señales externas al activar a un receptor de muerte en la superficie celular, denominada vía extrínseca, y la otra es disparada por cambios en la integridad mitocondrial, denominada vía intrínseca. (**Jiménez, 2003**) (Figura 4)

 Vía extrínseca

La unión de proteínas de señalización extracelulares a receptores de muerte de la superficie celular activa la vía extrínseca de la apoptosis. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana que contienen un dominio de unión al ligando, un único dominio transmembrana y un dominio de muerte intracelular, necesarios para que los receptores activen el programa apoptótico. Los receptores son homotrímeros y pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), que incluye el receptor del propio TNF y el receptor de muerte Fas. Los ligandos que activan los receptores de muerte también son homotrímeros; es decir, son estructuralmente homólogos entre sí y pertenecen a la familia del TNF de proteínas de señalización **(Alberts, 2010)**

Cuando se produce un estímulo de muerte, la unión del ligando de muerte a su receptor induce la trimerización de este último seguida del reclutamiento al oligómero de la proteína adaptadora FADD y de la unión, para su activación, de las procaspasas iniciadoras de la apoptosis, formando una estructura supramolecular que se denomina Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC). En este complejo, las procaspasas son convertidas mediante hidrólisis parcial, en caspasas activas, capaces de hidrolizar y con ello activar a las procaspasas efectoras o ejecutoras de muerte que actuarán sobre sus sustratos diana, para inducir las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis: condensación citoplasmática y nuclear, hidrólisis específica de proteínas celulares, ruptura endolítica del ADN en fragmentos oligo-nucleosómicos y condensación del contenido celular en cuerpos apoptóticos que finalmente serán fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas **(Palacios, 2011)**.

 Vía intrínseca

La vía intrínseca o mitocondrial es otra estrategia que conduce a la apoptosis, en la que la mitocondria desempeña un papel central.

Cuando las células perciben un estímulo extracelular (citotóxico, radiación UV, rayos X), o alguna señal intracelular (por ejemplo, daño del ADN, inestabilidad nuclear), la membrana externa de la mitocondria sufre cambios en su potencial de membrana y en la transición de su permeabilidad, lo que produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana **(Pérez, 2012)**; algunas de ellas son: citocromo c, Factor-1 activador de las proteasas apoptogénicas (Apaf-1), endonucleasa G, factor iniciador de la apoptosis (AIF) y Smac/Diablo (segundo activador mitocondrial de caspasa).

En el citosol, el citocromo c se une al factor activador de las proteasas apoptogénicas que, en presencia de ATP, atrae a la procaspasa iniciadora 9 para su activación en el complejo supramolecular denominado Apoptosoma. La caspasa 9 activa e hidroliza selectivamente a la procaspasa 3 para convertirla en caspasa 3 que se considera la «ejecutora central de

la apoptosis». **(Palacios, 2011)** iniciándose la serie de eventos que desembocarán en la muerte celular.

Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la vía intrínseca de la apoptosis, de forma clásica han sido clasificadas en dos grupos:

- ✿ Aquéllas con actividad antiapoptótica; En este grupo se incluyen las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BFL-1, BCL-B y A1, cuya función es protección a la célula de diversas alteraciones citotóxicas como la radiación gamma y ultravioleta. Su efecto antiapoptótico se ejerce dependiendo del número de moléculas que contrarresten su actividad.

- ✿ La segunda clase son representadas por aquéllas con actividad proapoptótica, como son Bax, Bak, Bid y Bok; tanto Bax, Bak y Bok son muy similares a Bcl-2 en secuencia y estructura, ya que comparten los motivos BH1, BH2 y BH3. Se dividen en proteínas efectoras, las cuales comprenden la proteína antagonista asesina de Bcl-2, Bak y la proteína X asociada con Bcl-2, Bax; después de su activación, Bak y Bax se homoligomerizan dentro de los poros proteolipídicos de la membrana mitocondrial externa para promover su permeabilización. **(Alberts, 2010)**

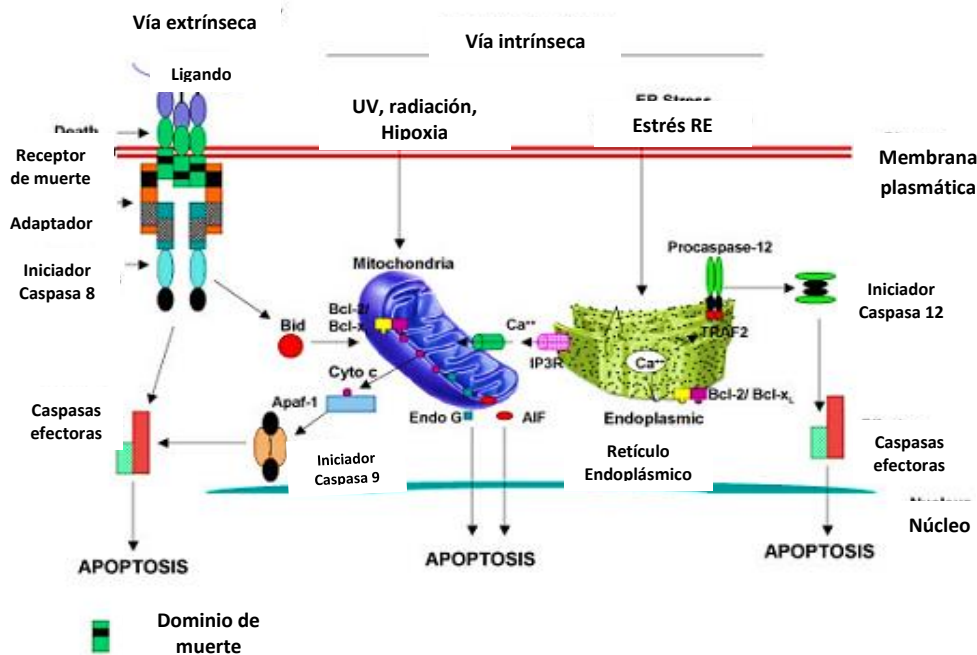


Figura 4. Vías de la apoptosis. Representación gráfica de la vía extrínseca e intrínseca la cual también puede estar mediada por el retículo endoplásmico. Gupta, S (2006). Recuperado de: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4933-3-5>

La vía mitocondrial también puede activarse por estrés del retículo endoplásmico. Se ha demostrado que el estrés del retículo, producido por alteración en la homeostasis de calcio o la acumulación de proteínas, conduce a la activación de la caspasa 12 **(García, 2003)**

La apoptosis juega un papel crucial en el control de la muerte celular cuando el daño en el ADN es irreparable. Se ha demostrado que algunas mutaciones oncogénicas, que suprimen la apoptosis conducen a la iniciación, progresión del cáncer y/o metástasis (**Palacios, 2011**)

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células, provocada por modificaciones en la información genética subyacente de las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos o neoplasias malignas que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales (**Karp, 2014**).

De acuerdo con Serrano (2009), La transformación maligna es un proceso que requiere múltiples pasos acumulativos donde el genoma de las células cancerosas incipientes adquiere alelos mutantes de protooncogenes, genes supresores de tumores y otros que controlan, directa o indirectamente, la proliferación celular (**Medina, 2009**).

Chastain (2016) señaló que las funciones celulares normales de los productos de los genes supresores de tumores son muy diversas, entre ellas la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular, la apoptosis y el mantenimiento de la integridad genómica. En cambio, los protooncogenes son reguladores importantes de muchos aspectos de la fisiología celular, entre ellos el crecimiento y la diferenciación celular. Se han identificado más de 75 protooncogenes, y sus productos incluyen citocinas y factores de crecimiento extracelulares (**Govindan, 2016**). Casi todos los tumores humanos tienen mutaciones inactivadoras en los genes que usualmente actúan en diversos puntos clave del ciclo celular para detener la progresión de una célula a través del ciclo celular si un paso previo se efectuó de modo incorrecto o si se dañó el ADN (**Lodish, 2005**)

Por otro lado, la capacidad de invasión es una característica esencial de las células cancerosas ya que les permite desprenderse de la masa original, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo. Cuanto más amplia sea la metástasis, más difícil será erradicar el cáncer (**Alberts, 2010**).

La progresión tumoral y el desarrollo de metástasis son estrictamente dependientes de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que aporten los nutrientes necesarios para la supervivencia de las células tumorales, y que proporcionen el medio de diseminación a otras regiones del organismo (**Lopez, 2009**)

Cada uno de los pasos necesarios para que se produzca metástasis, desde la aparición de las células tumorales hasta su crecimiento y proliferación en el órgano que las recibe, está dirigido por alteraciones genéticas y/o epigenéticas. Por su naturaleza sistémica y su

resistencia a ciertos agentes terapéuticos es difícilmente tratable y se considera la causa de más del 90% de las muertes debidas al cáncer.

Los pasos incluidos para el desarrollo de la metástasis son: (Figura 5)

- ❁ la activación de la transición epitelio/mesénquima (EMT), durante el cual las células cancerosas pierden tanto el contacto célula-célula como la adhesión al sustrato, adquiriendo la propiedad de movimiento
- ❁ la invasión local, para lo cual las células malignas degradan la lámina basal, que es la matriz extracelular especializada que organiza los tejidos epiteliales separándolos del estroma, que juega un papel importante tanto en la señalización como en ser reservorios de factores de crecimiento liberados por las células tumorales
- ❁ la intravasación, durante la cual las células tumorales atraviesan la pared de los vasos sanguíneos y entran en la circulación
- ❁ la capacidad de sobrevivir en el torrente circulatorio
- ❁ la extravasación, propiedad de las células tumorales de salir del torrente circulatorio, atravesando la pared de los vasos sanguíneos en el tejido de un órgano en particular
- ❁ establecimiento de las células tumorales en los tejidos del órgano donde se va a formar la metástasis, es decir de un nicho premetastásico para crear un ambiente favorable para el crecimiento de las células cancerosas

(Cano, 2012)

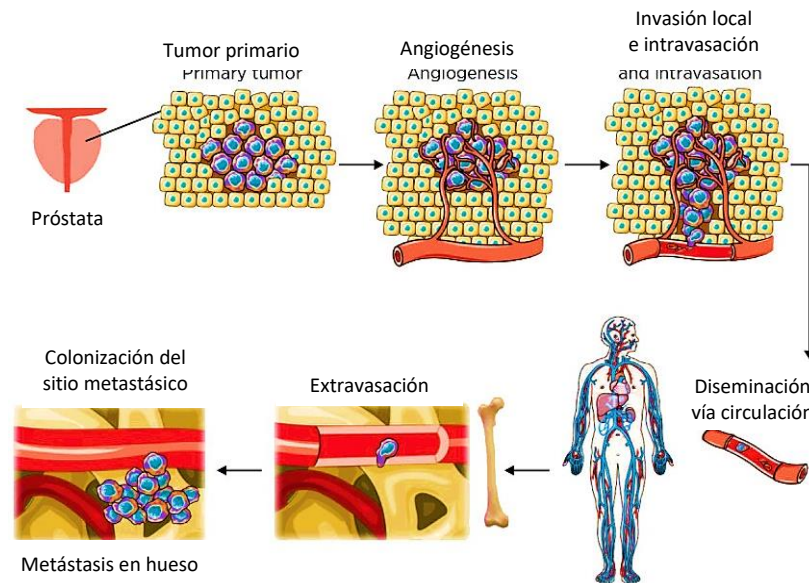


Figura 5. Etapas del proceso metastásico. La metástasis se caracteriza por una serie de pasos secuenciales: formación de tumores primarios, reclutamiento de vasos sanguíneos a través de la angiogénesis, invasión de células cancerosas del tejido local y entrada en corredores de dispersión como los vasos sanguíneos. Las células diseminadas viajan a través de la circulación y al llegar a un sitio secundario adecuado, extravasan los vasos sanguíneos y colonizan para formar metástasis. Tomada de Groot, A (2017). Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. Recuperado de: <http://mcr.aacrjournals.org/content/15/4/361>

Las células parenquimatosas de una neoplasia son similares entre sí porque todas proceden de una misma célula precursora. Las neoplasias se clasifican en benignas o malignas según el comportamiento clínico-biológico que posean:

- ✿ Las neoplasias benignas son en general masas bien delimitadas, que permanecen localizadas sin diseminarse a otros sitios, por lo tanto, se pueden curar por extirpación quirúrgica.
- ✿ Los tumores malignos, en cambio, tienden a invadir o infiltrar y destruir los tejidos adyacentes y pueden diseminarse a sitios distantes, en lugares donde normalmente no pueden crecer, lo que dificulta el tratamiento

(Ouchen, 2008)

Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en: carcinomas, sarcomas, y aquellos que no se ajustan a ninguna de las dos categorías anteriores y que comprenden todas las derivadas de las células sanguíneas y hematopoyéticas **(Jiménez, 2003)**.

Carcinoma

Es el tumor maligno que se origina en la capa que recubre (células epiteliales) los órganos. Aproximadamente el 80% de los tumores cancerosos son carcinomas.

Se clasifican en:

- ✿ Adenocarcinoma: se denomina adenocarcinoma al cáncer que se origina en el tejido glandular (glándulas), por ejemplo en los conductos o lobulillos de la mama o en la próstata.
- ✿ Carcinoma de células escamosas o epidermoide: cáncer que se origina en las células no glandulares; por ejemplo, esófago, cuello de útero, etc.
- ✿ Carcinoma de células basales: es el cáncer de la piel más común. Se origina en la capa más profunda de la epidermis (piel), llamada la capa de células basales. Por lo general se origina en áreas expuestas al Sol, especialmente la cabeza y el cuello. El cáncer de células basales crece lentamente y es poco probable que se propague a partes distantes del cuerpo.
- ✿ Melanoma: es un tumor maligno que se origina en las células que producen la coloración de la piel (melanocitos). El melanoma es casi siempre curable en sus primeras etapas. Sin embargo, es probable que se propague a otras partes del cuerpo.

Sarcoma

Se trata de un tumor maligno que se origina en los tejidos conectivos, tales como los cartílagos, la grasa, los músculos o los huesos.

Dependiendo de la célula que lo origina pueden recibir diferentes nombres, siendo los más conocidos:

- 🌸 Osteosarcoma: (osteo = hueso) Sarcoma que deriva del hueso.
- 🌸 Liposarcoma: (lipo = grasa) Sarcoma que deriva de la grasa.
- 🌸 Condrosarcoma: (condro = cartílago) Sarcoma que deriva del cartílago.
- 🌸 Angiosarcoma: (angio = Vaso) Sarcoma que deriva de los vasos sanguíneos.

(Ouchen, 2008)

Neoplasias hematológicas linfoides y no linfoides.

Con respecto a las neoplasias hematológicas, la nueva clasificación de la OMS incluye tanto las neoplasias de origen linfoide como las originadas en células sanguíneas y hematopoyéticas no linfoides. Las neoplasias originadas en células del sistema linfoide, conocidas con el término genérico de linfomas, son quizá las neoplasias que han dado lugar a clasificaciones más complejas y que más se han acercado al ideal de una clasificación histogenética con el mejor conocimiento de las características fenotípicas y de las modificaciones genéticas y moleculares que se asocian a cada tipo tumoral. El resto de neoplasias hematológicas no linfoides, de estirpe mieloide o de otras líneas menos frecuentes (mastocitos, histiocitos), han sido incluidas en la clasificación de la OMS atendiendo a criterios similares a los expuestos para la clasificación de los linfomas. Las leucemias, la principal patología de este grupo, son neoplasias de células hematopoyéticas inmaduras **(de la Peña y cols., 2012)**

Agentes carcinógenos

Cualquier agente físico, químico o biológico es definido como “carcinógeno” si produce un incremento en la incidencia de neoplasias malignas, ya sea reduciendo su tiempo de latencia o incrementando su gravedad o su capacidad de multiplicación **(Espinosa, 2006)**. Hay tres tipos de carcinógenos:

- 🌸 Químicos: tienen un espectro estructural muy amplio sin rasgos unificadores, pueden clasificarse en dos categorías generales. Los carcinógenos de *acción directa*, que no requieren de activación metabólica y los carcinógenos de *acción indirecta* son compuestos no reactivos insolubles en agua que pueden actuar como potentes inductores de cáncer sólo después de ser transformados a una forma más reactiva por los procesos metabólicos del hígado **(Lodish, 2004)**
- 🌸 Biológicos: Una pequeña pero significativa proporción de cánceres humanos, quizá un 15% del total mundial, se originan mediante mecanismos en los que participan

virus, bacterias y parásitos (**Alberts, 2010**). Algunos ejemplos son: Helicobacter Pylori (Cáncer gástrico), Virus del Papiloma Humano (Cáncer cervicouterino), virus Epstein Barr (cáncer del área de cabeza y cuello) (**Medina,2009**)

- 🌸 Físicos: El tipo más común de daño al ADN producido por radiación UV ocasiona la formación de dímeros timina-timina y la radiación ionizante produce roturas de doble hélice en el ADN. (**Lodish, 2004**)

Epidemiologia

Desde hace varias décadas los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios como causa de mortalidad a nivel mundial representando un gran desafío para las economías y sistemas de salud (**OMS, 2017**)

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, en 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. Es una enfermedad crónico-degenerativa de mayor incidencia entre los adultos, en comparación con los niños y jóvenes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) identifica que, a nivel mundial en 2015, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago (**OMS, 2015**)

La mortalidad por cáncer en México representa el 13% del total de las muertes, ocupando el tercer lugar; en orden de frecuencia por localización en ambos sexos, se localiza en pulmón, hepático, colorrectal y gástrico. El primer lugar en el hombre lo ocupa el cáncer de próstata, seguido por el cáncer de pulmón y en tercer lugar el cáncer de estómago. En las mujeres, la primera causa de mortalidad es el cáncer de mama, seguido por cáncer cervicouterino y cáncer de estómago (**Sosa, 2013**). La mortalidad por neoplasias fue mayor en mujeres (13.97%) que en hombres (10.74%). las de mujeres representan, en promedio, 51% anual; las de población económicamente activa (de 15 a 64 años) es de 43% y las de población de 65 años o más es de 54% (**Reynoso, 2014**).

Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a los cinco principales factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. (**INEGI, 2016**)

CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuente y el que mayor mortalidad ocasiona en el mundo desarrollado, principalmente en adultos mayores. En México se encuentra entre las tres principales causas de muerte por tumores malignos en adultos mayores de 35 años y es más frecuente en varones, aunque se ha reportado un incremento mundial en los casos en mujeres. Es de hacer notar que los estados de Sinaloa y Sonora son las entidades con mayor tasa de mortalidad para el sexo masculino **(Acosta, 2016)**

El cáncer pulmonar es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células, tanto pulmonares como bronquiales. Existen dos categorías de cáncer pulmonar clínicamente importantes considerando el origen y el comportamiento de las células cancerosas:(Figura 6)

- ✿ **Cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP).** Representa aproximadamente el 25% de los cánceres pulmonares y es de comportamiento muy agresivo, proliferando rápidamente. Muestra la mayor relación con el tabaquismo, ya que el 98% de los pacientes que lo presentan cuentan con historia de tabaquismo.
- ✿ **Cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP).** Constituye, aproximadamente, el 75% de los tipos de cáncer pulmonar y se divide en tres subtipos mayores:
 - **Cáncer de células escamosas (epidermoide):** Representa el 30% de todos los casos
 - **Adenocarcinoma:** Ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica (50%)
 - **Carcinomas indiferenciados,** que ocupan el 5% de los casos

(Moctezuma, 2009)

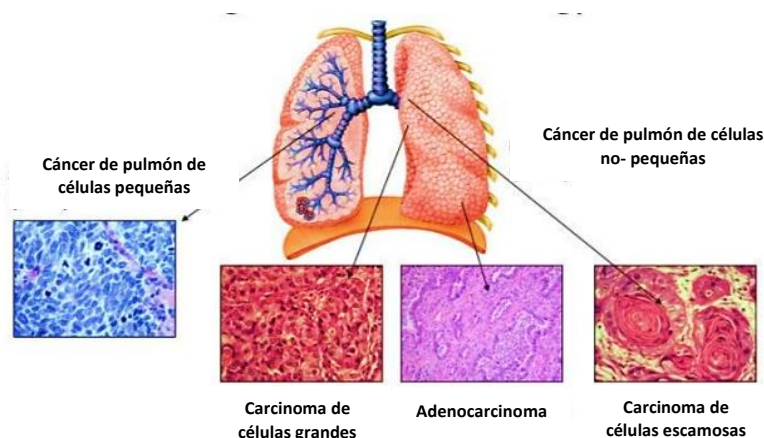


FIGURA 6. Tipos histológicos del Cáncer de Pulmón. Black, K (2017) Respiratory System Diseases. Recuperado de: <https://slideplayer.com/slide/10735109/>

El carcinógeno más importante para el cáncer del pulmón es el cigarrillo y hay vinculación directa de hasta el 90% en los hombres y 85% en las mujeres. El humo del cigarrillo contiene más de sesenta reconocidos cancerígenos, entre los más conocidos están las nitrosaminas, los benzopirenos y los radioisótopos del radón, todos ellos con la capacidad de alterar el ADN y, por consiguiente, contribuir en la carcinogénesis. El consumo de alcohol, la edad, el sexo, los antecedentes de enfermedades respiratorias crónicas, así como, la exposición laboral a sustancias cancerígenas por vía inhalatoria constituyen factores de riesgo en la aparición de esta neoplasia **(Amorín, 2013)**

De acuerdo con Martínez (2016), el cáncer de pulmón persiste como un desafío para la medicina, porque a pesar de los avances en las técnicas de diagnóstico y en los recursos terapéuticos, continúan siendo magros los resultados del tratamiento, evidenciados por las escasas curaciones en relación con la cantidad de enfermos asistidos **(Acosta,2016)**

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es sin duda alguna un problema relevante de salud pública. A nivel mundial el número de muertes por cáncer de mama cambió de 250,000 en 1980 a 425,000 en 2010 con una tasa anual de incremento de 1.8%, sin embargo, en los países de economía emergente este incremento es alrededor de 5% **(Salinas, 2014)**. En México, el cáncer de mama ocupa en la actualidad el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representa 11.34% de todos los casos de cáncer. El grupo de edad más afectado se encuentra entre los 40 y los 59 años de edad. La mortalidad por cáncer mamario se ha incrementado en 10.9% en los últimos años, de 13.06 en 1990 a 14.49 en el año 2000 **(Arce, 2011)**.

El cáncer de mama es un proceso oncológico en el que células sanas de la glándula mamaria degeneran y se transforman en tumorales, proliferando y multiplicándose posteriormente hasta constituir el tumor. **(ACV, 2011)**

Tipos de cáncer de mama

- Según el grado de invasión del tumor.
 - In situ. Se localiza dentro de los conductos galactóforos que conducen la leche hasta el pezón.
 - Invasivo o infiltrante. Rompe el conducto galactóforo e invade la grasa de la mama que rodea el conducto. Las células pueden llegar a los pequeños vasos sanguíneos y linfáticos de la mama.
- Según el lugar donde se origina el tumor y el aspecto de las células que lo forman.
 - Lobulillar. Se origina en las glándulas que fabrican la leche.
 - Ductal. Hay presencia de células anormales en el revestimiento de un conducto de la mama.

- Medular. Las células cancerosas se encuentran agrupadas.
- Coloide. Es un tipo de carcinoma ductal invasor.
- Tubular. Es otro tipo de carcinoma ductal invasor. Inflamatorio. Las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos de la piel produciendo una inflamación en la mama.

Según las características biológicas y genéticas de las células: el estado de los receptores hormonales y presencia del receptor HER2.

- Basal-epitelial. Se caracteriza por la ausencia de receptor de estrógeno (RE) y HER2 negativo.
- HER2 positivo. Se caracteriza por una elevada expresión de receptor HER2.
- Luminal A. Se caracteriza por elevada expresión de RE.
- Luminal B y C. Expresión de baja a moderada de genes específicos, incluyendo los del grupo de RE.

(Collado, 2011)

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasivo que representa el 70 al 80%, el segundo más común es el lobulillar invasivo (5-10%), difícil de diagnosticar por su diseminación difusa en vez de formar una masa, su tasa de multifocalidad y bilateralidad es alta (Huicochea, 2009)

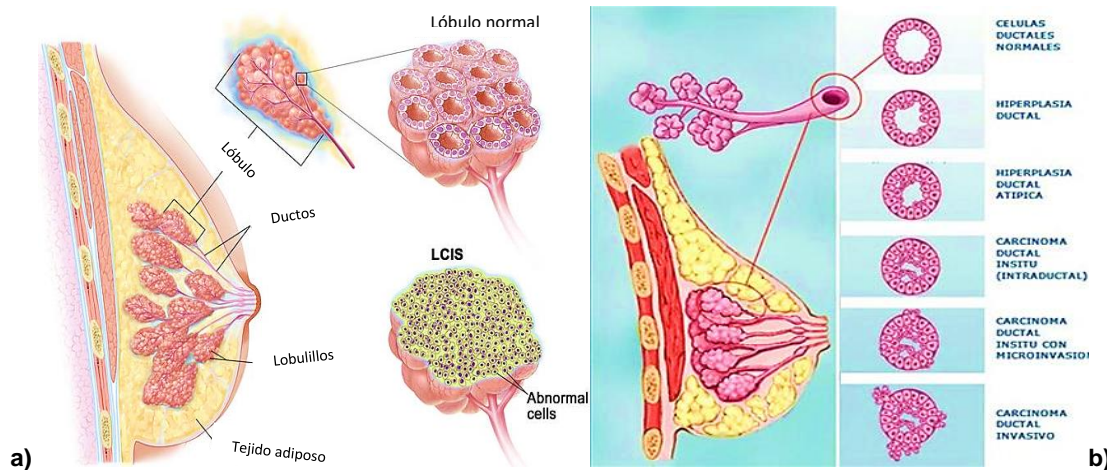


Figura 7. Tipos más comunes de cáncer de mama. a) Carcinoma lobular b) Carcinoma ductal. Winslow, T (2011). Lobular Carcinoma y Cotrina, (2014). Cáncer ductal in situ. Recuperado de: <https://www.teresewinslow.com/#/breast/> y <http://drcotrina.com/tipos-de-cancer-de-mama/>

Factores de riesgo

En la mayoría de los casos no hay un factor definido como causa. El riesgo de desarrollar un tumor de mama parece ser multifactorial, sin embargo, los factores de riesgo para padecer cáncer de mama se pueden clasificar en:

Biológicos (Cárdenas, 2013):

- Sexo femenino.
- Envejecimiento: A mayor edad mayor riesgo.
- Antecedente personal o familiar de cáncer de mama en madre, hijas o hermanas.
- Antecedentes de hallazgos de hiperplasia ductal atípica, imagen radial o estrellada, así como carcinoma lobulillar in situ por biopsia.
- Vida menstrual mayor a 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años).
- Densidad mamaria.
- Ser portador conocido de los genes BRCA1 o BRCA2

Sociales

- patrones culturales
- hábitos y costumbres
- la no lactancia materna
- dieta inadecuada
- obesidad
- Sedentarismo
- Consumo de alcohol mayor a 15 g/día

Ambientales (Peña, 2017):

- exposición a sustancias cancerígenas
- terapia de remplazo hormonal
- tabaquismo
- Exposición a radiaciones ionizantes, principalmente durante el desarrollo o crecimiento (in utero, en la adolescencia).

CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer de cuello uterino o cáncer cervical se origina en las células que revisten el cuello del útero, el cual está conformado por dos regiones anatómicas independientes y está cubierto con dos tipos diferentes de células.

- La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérnix y está recubierto por un epitelio cilíndrico secretor de moco que forma pliegues y se proyecta dentro del tejido conectivo subyacente formando complejas glándulas o criptas.
- La parte próxima a la vagina, es el exocérnix (o ectocérnix) y está recubierto de epitelio plano estratificado no queratinizado que es sensible a las hormonas

(Eurocytology, 2014)

Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado zona de transformación y es aquí donde se originan la mayoría de los cánceres de cuello uterino (ACS, 2016).

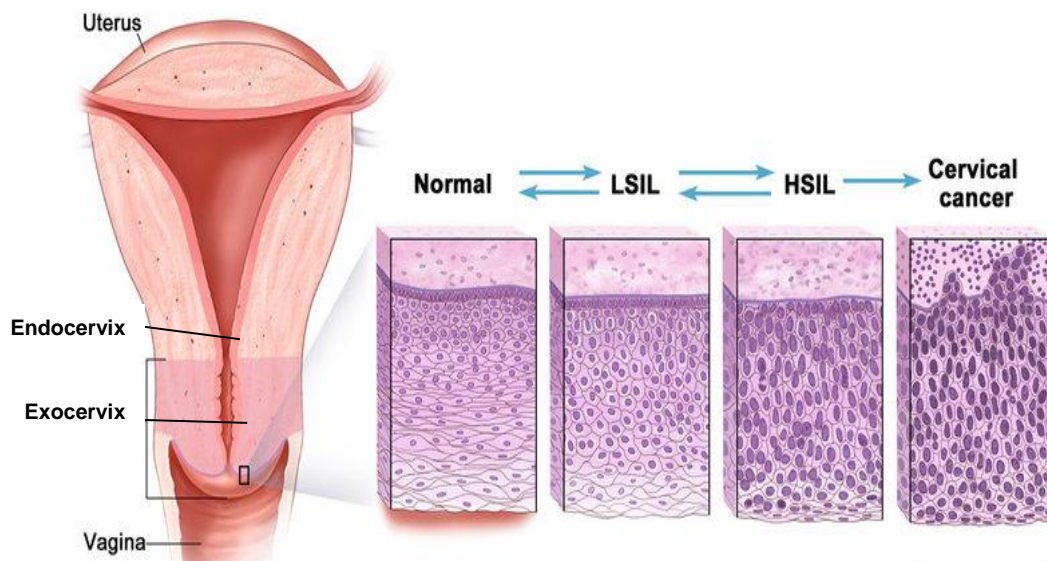


Figura 8. Esquema del aparato reproductor femenino, La zona de convergencia del endocervix y el ectocervix se denomina zona de transformación y es donde se genera el cáncer de cuello uterino. LSIL, siglas en inglés para lesiones intraepiteliales de bajo grado y HSIL para lesiones intraepiteliales de alto grado. Winslow, T (2014) Cervical changes. Modificado de: <https://www.teresewinslow.com/#/gynecologic/>

El cáncer cervicouterino (CaCu) es entonces el resultado de la progresión de leves anomalías epiteliales llamadas displasias o neoplasias intraepiteliales (NIC), de acuerdo con la clasificación de Richart (Cuadro 1), diagnóstico frecuente en mujeres entre los 20 y 30 años de edad, pasando por carcinoma in situ, entre los 25 y 35 años, a carcinoma invasivo en mujeres mayores de 40 años **(León, 2005)**

Tabla 1: Clasificaciones citológicas de acuerdo con dos autores. Modificado de Acuña (2013)

Clasificaciones citológicas	
Richart (1968)	Bethesda (2001)
NIC I	LIEBG
NIC II	LIEAG
NIC III	
CIS	
INVASOR	INVASOR

El CaCu representa un problema de salud pública al estar entre los primeros lugares de incidencia y mortalidad a nivel mundial. Siendo los países en desarrollo los más afectados frente a los países desarrollados, en relación con la alta exposición al virus del papiloma humano **(Acuña, 2013)**. Pese a los esfuerzos de detección temprana en nuestro país, la tasa de mortalidad permanece sin modificaciones importantes **(Hinojosa, 2000)**.

Los posibles mecanismos que favorecerían una mayor prevalencia de VPH incluyen la edad, el comportamiento sexual femenino o masculino, cambios del epitelio cérvico vaginal debido a la edad o relacionados con la menopausia y senescencia inmune relacionada con la edad, lo cual conduce a un aumento de la reactivación de infecciones latentes y así a un aumento en la detección de nuevos casos de infección **(Torres, 2015)**.

De acuerdo con Grillo (2008) existen más de 80 tipos distintos de VPH, de los cuales, al menos 25 afectan al tracto genital femenino y, de acuerdo a su asociación con lesiones preinvasivas y cáncer, se agrupan en: alto (tipos 16, 18, 45, 56), moderado (tipos 31, 33, 35, 51, 52) y bajo riesgo (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44), siendo el VPH 16 el responsable hasta del 50% de todos los cáncer cervicales, seguido del VPH 18 relacionado con el 14 % (Martinez,2013)

Romero (2012) Señala que en México en un estudio de metaanálisis se reportan las siguientes frecuencias de VPH de acuerdo al tipo de lesión, según la clasificación de Bethesda (Cuadro 1):

- 🌸 Sin lesiones: VPH 16 (3.4 %), VPH 33 (2.1 %), 18 (1.2 %)
- 🌸 Lesiones intraepiteliales de bajo grado (LEIBG): VPH 16 (13.1 %), VPH 33 (7.4 %) y VPH 18 (4.2 %)

- 🌸 Lesiones intraepiteliales de alto grado (LEIAG): VPH 16 (28.3 %), VPH 18 (7.4 %) y VPH 33 (6.5 %)
- 🌸 Cáncer invasor: VPH 16 (63.1 %), VPH 18 (8.6 %) y VPH 31 (5 %)

(Hernandez, 2015)

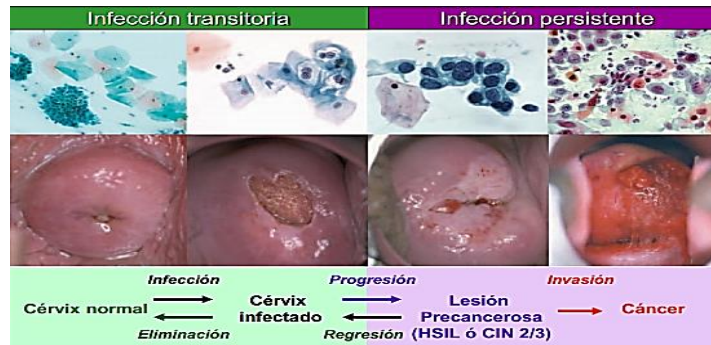


Figura 9. Historia natural del cáncer cervicouterino. Progresión de la enfermedad que va desde lesiones precancerosas hasta un tumor maligno potencialmente invasivo. Modificado de referencia 39.

Factores de Riesgo

A pesar de que el VPH es el principal agente etiológico del CaCu, estudios epidemiológicos han mostrado que sólo una pequeña fracción de mujeres infestadas con VPH eventualmente progresan a lesiones intraepiteliales de alto riesgo y carcinoma in situ, por lo que se ha asumido que otros factores actúan en conjunto con el VPH, influenciando el riesgo de transición de la infección VPH cervical a malignidades (León, 2005). Por ejemplo:

- 🌸 Tener múltiples parejas sexuales se relaciona con un exceso de riesgo de dos y hasta 10 veces mayor cuando se identificaba un mayor número de parejas (más de 10 parejas).
- 🌸 El inicio de la vida sexual antes de los 18 años se asoció con un exceso de riesgo que es entre 1.5 y 5 veces mayor
- 🌸 El primer embarazo a temprana edad presenta un impacto similar en el riesgo.
- 🌸 los embarazos múltiples (más de tres) elevan significativamente el riesgo
- 🌸 Las coinfecciones del VPH con otros agentes infecciosos de transmisión sexual, como Chlamydia trachomatis, el virus herpes simple y el VIH posiblemente condicionen un efecto sinérgico que aumente las posibilidades de alteraciones celulares que conducen al desarrollo de una neoplasia
- 🌸 Entre las mujeres usuarias de anticonceptivos orales, el riesgo de CaCU aumenta con el incremento en la duración del uso
- 🌸 El tabaquismo, ya que altas concentraciones de los constituyentes del tabaco en el moco cervical y las concentraciones séricas han mostrado una evidencia biológica en el desarrollo del CaCU

(Hernandez, 2015)

TRATAMIENTOS

La primera fase fundamental en el tratamiento del cáncer es establecer un diagnóstico basado en un examen patológico. El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada tipo de cáncer requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades **(OMS, 2018)**

El tipo de terapia más apropiada se determina en función de los objetivos planteados con el tratamiento, del tipo de tumor y su extensión, y de condiciones del paciente como su estado funcional, edad y patología concomitante. Las principales modalidades terapéuticas utilizadas solas o en combinación en el tratamiento del cáncer son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia inmunológica **(Cajaraville, 2002)**

- ✿ Cirugía: El principal objetivo de la cirugía oncológica es la extirpación completa de la enfermedad local o regional, para lograr el control local y para disminuir el riesgo de recidiva local. Para ello, se extirpa la lesión primaria con márgenes adecuados de tejido sano circundante para minimizar el riesgo de recidiva local. Antes de emprender cualquier procedimiento quirúrgico, hay que tener en cuenta el estadio de la enfermedad, los mecanismos de diseminación local, y la morbilidad y la mortalidad del procedimiento **(Traugott, 2016)**. La cirugía ofrece la mayor probabilidad de cura para muchos tipos de cáncer, especialmente aquellos que aún no se han propagado a otras partes del cuerpo, es más efectiva cuando el tumor no se ha propagado hacia otras áreas **(ACS, 2015)**.
- ✿ Radioterapia: Se usa principalmente para tratar cánceres localizados. La radiación destruye o daña las células cancerosas para impedir su crecimiento **(NIH, 2018)**. Dependiendo de la localización de la fuente radioactiva respecto el paciente, la técnica radioterápica puede ser:
 - ❖ Radioterapia externa o teleterapia (la fuente radioactiva está alejada del paciente)
 - ❖ Braquiterapia (el isótopo radioactivo se ubica en contacto directo con el tejido a tratar)
 - ❖ Metabólica (el isótopo radioactivo se administra por vía intravenosa u oral, y tras distribuirse por el organismo es captado preferentemente por órganos con tropismo por el mismo)

(Cajaraville, 2002)
- ✿ Quimioterapia: La quimioterapia es el uso de fármacos para tratar el cáncer, su objetivo es detener directamente el crecimiento celular del tumor dejándolas incapaces de duplicarse o iniciando artificialmente el proceso normal de muerte celular llamado apoptosis. Hay dos categorías amplias de fármacos quimioterapéuticos: fármacos “citostáticos”, llamados también fármacos dirigidos

o biológicos, que evitan la reproducción celular y fármacos “citotóxicos” que tienen como propósito provocar la muerte celular **(ABTA, 2014)**.

La quimioterapia tiene un papel limitado en el tratamiento primario del cáncer localizado, siendo la base del tratamiento de los tumores diseminados, en los cuales la cirugía y la radioterapia tienen escaso valor. **(Cajaraville,2002)**

La quimioterapia puede clasificarse de acuerdo:

- ❖ Al momento en el que se administra: el tratamiento puede ser neoadyuvante, adyuvante o concomitante
- ❖ La vía por la que se suministran los fármacos antineoplásicos: el tratamiento puede ser intravenosa, oral o regional
- ❖ Al modo en el que se aplica la quimio: monoterapia o poliquimioterapia
- ❖ Al tipo de agente quimioterapéutico: alquilantes, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, antimetabolitos y otros

(iTAcC. 2016)

Tipos de fármacos:

- ❖ Agentes Alquilantes: alteran las proteínas y bloquean la función del ADN. Se administran por vía Intravenosa. Los de uso más habituales son: Ciclofosfamida (Genoxal), Mecloretamina (Caryolisina), Melfalán, Tiotepa.
- ❖ Antimetabolitos: inhiben la síntesis de bases nitrogenadas y del ADN, por bloqueo enzimático, se usan además del tratamiento de tumores, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en caso de trasplantes para impedir el rechazo. Los de uso más habituales son: Metotrexate, Citarabina o 5- Fluoracilo. Se pueden administrar por vía intravenosa, intramuscular, y Oral.
- ❖ Antibióticos Antitumorales: actúan sobre el ADN/ARN inhibiendo su duplicación. Pertenecen a este grupo: Bleomicina, Adriamicina, Mitomicina.
- ❖ Alcaloides de la Vinca: suelen ser sustancias naturales a base de plantas que interfieren con la producción de las proteínas necesarias para crear nuevas células. En este grupo los más usados son: Vincristina, Vinblastina, Etopósido, y Vindesina.
- ❖ Agentes varios: son un grupo de sustancias de difícil clasificación, como son los derivados del Platino: Cisplatino, Carboplatino, Asparaginasa.

(Garcia, 2002)

- ❁ **Inmunoterapia:** La inmunoterapia se basa en el concepto de que las células inmunitarias o los anticuerpos que pueden reconocer y destruir las células del cáncer se pueden producir en el laboratorio y luego administrar a los pacientes para tratar el cáncer. Varios tipos de inmunoterapia están aprobados para su uso

o están en fase de estudio en ensayos clínicos para determinar su eficacia en el tratamiento de distintos tipos de cáncer **(LLS, 2015)**.

- Terapia dirigida: La terapia dirigida no es otra cosa que la utilización de inhibidores farmacológicos específicos para un grupo de moléculas, cuyas funciones son de singular importancia para el desarrollo y progresión tumoral, con el objetivo primordial de aumentar los efectos antiproliferativos y citotóxicos sobre las células tumorales y a la vez disminuir los efectos colaterales negativos sobre los tejidos sanos **(Fuenmayor, 2013)**.

MEDICINA TRADICIONAL

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, así mismo es catalogada como un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo, el bienestar y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta **(Jiménez, 2017)**. Es una parte de la cosmovisión indígena y representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de las plantas medicinales que los pueblos autóctonos han resguardado como un importante activo de incalculable valor para el fortalecimiento y preservación de su identidad **(Cortés, 2011)**.

La organización mundial de la salud define a la medicina tradicional como la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y mejorar o tratar trastornos físicos. La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones **(OMPI, 2015)**.

Actualmente, en México, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global **(Santillán, 2012)**.

De acuerdo con la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Akerele (1993) señala que estas plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos **(Bermudez, 2005)**

En los últimos años ha habido un notable crecimiento del interés por los fitomedicamentos, lo que no se limita solo, a los países en desarrollo, los mercados nacionales e

internacionales, sino que las autoridades sanitarias y la opinión pública se han interesado por la inocuidad y la calidad de estos medicamentos (**Escalona, 2015**). Las plantas han sido una fuente invaluable de compuestos antitumorales relevantes en la terapia anticancerosa. A pesar de esto, solo cerca del 10% de las más de 250 000 especies de plantas superiores han sido investigadas para sus propiedades farmacológicas (**Diaz, 2011**). Dentro de los compuestos de origen vegetal que más han llamado la atención de la comunidad científica, por sus propiedades antitumorales, se encuentran las lactonas sesquiterpénicas.

LACTONAS SESQUITERÉNICAS

Los sesquiterpenos son terpenoides con 15 átomos de carbono construidos a partir de tres unidades de isopreno. Se encuentran particularmente en plantas superiores y en muchos otros sistemas vivos, como los organismos marinos y los hongos. Naturalmente, se producen como hidrocarburos o en formas oxigenadas que incluyen lactonas, alcoholes, ácidos, aldehídos y cetonas. Los sesquiterpenos también incluyen aceites esenciales y componentes aromáticos con varias actividades farmacológicas (**Awouofack, 2013**).

Las lactonas sesquiterpénicas (LsS) son metabolitos secundarios que se encuentran en numerosas especies de plantas de la familia Asteraceae. Son fitoconstituyentes de bajo peso molecular, de carácter lipofílico, incoloros y amargos. Se obtienen de la parte aérea de las plantas (**Negrín, 2013**)

Una importante característica, común de las lactonas sesquiterpénicas, es la presencia de un anillo lactónico que contiene, en muchos casos, un grupo α - metilen- γ -lactona, asociado con muchas de sus actividades biológicas (**Picman, 1986**).

Las LsS se clasifican de acuerdo a su esqueleto carbocíclico, los cuales son fundamentalmente cuatro: (Figura 10)

- ✿ Germacranólidas: son compuestos con esqueleto germacrano (anillo flexible) y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8
- ✿ Eudesmanólidas: Las Eudesmanólidas están formadas por dos biciclos de seis miembros fusionados y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8
- ✿ Guayanólidas: Las guayanólidas están formadas por dos biciclos uno de cinco y otro de seis miembros fusionados y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8
- ✿ Pseudoguayanólidas: La estructura de esta familia de lactonas sesquiterpénicas es muy similar a las de las guayanólidas, la diferencia radica en la posición del grupo metilo que en las pseudoguayanólidas se encuentra en el átomo de carbono cinco mientras que en las guayanólidas este está presente en la posición cuatro. (**Ganthous, 2010**)

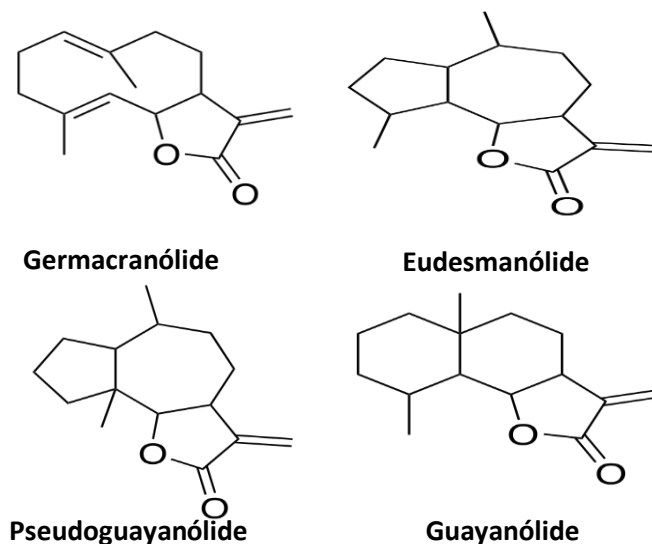


Figura 10. Clasificación de las lactonas sesquiterpénicas de acuerdo a su esqueleto carbocíclico. Las Guayanólidas y Pseudoguayanólidas comparte un esqueleto similar donde difieren en la posición de un grupo metilo, C5 en Pseudoguayanólidas y C4 en Guayanólidas.

De más de 40 tipos estructurales de lactonas sesquiterpénicas conocidas hasta la fecha, las más extendidas son aquellas con esqueleto Germacrano, seguido de Guayano, Eudesmano, y Pseudoguayano (**Adekenov, 2017**). Sin embargo, un estudio reportó que las lactonas sesquiterpénicas Guayanolides tienen los niveles de citotoxicidad más altos, seguidas de las Pseudoguayanolides (**Scotti, 2007**)

Relación estructura /actividad

La relación entre la estructura química y la actividad citotóxica de las lactonas sesquiterpénicas fue investigada en numerosos modelos tumorales. Todas las lactonas sesquiterpénicas activas poseen una fracción α -metilen- γ -lactona (Figura 11) la cual confiere su actividad biológica. Se estableció más tarde que el grupo de exometileno en la lactona es un requisito esencial para la citotoxicidad y que los cambios como la saturación o la adición al grupo metileno, resultaron en la pérdida de citotoxicidad e inhibición tumoral (**Picman, 1986**).

Recientemente, se ha demostrado que la presencia de grupos alquilantes mejora la citotoxicidad de estos compuestos. Se ha establecido que los anillos α -metilen- γ -lactonas y ciclopentenonas α , β -insaturadas presentes en lactonas sesquiterpénicas son esenciales para su actividad antitumoral in vivo, siendo esta última de mayor importancia respecto a la actividad citotóxica (**Ruiz, 2015**), por lo que cualquier cambio estructural en alguna de estas regiones, afecta significativamente la citotoxicidad de la lactona.

La estereoquímica también es importante para definir las propiedades antitumorgénicas de las lactonas sesquiterpénicas, hay estudios donde se reporta el efecto óptico del grupo OH en la actividad biológica, resultando que el isómero β -OH presenta mayor citotoxicidad que su equivalente α en células de cáncer de pulmón, células epidérmicas inmortalizadas y células de edema de ratón (**Ghantous, 2010**).

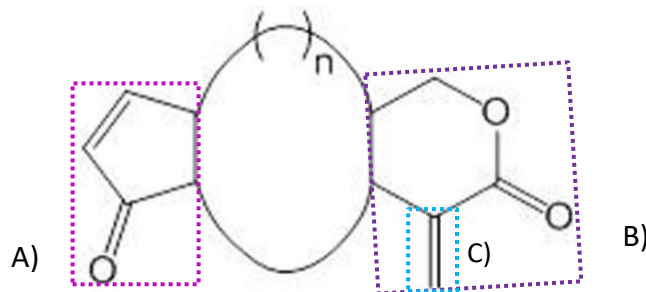


Figura 11. Estructura general de las lactonas sesquiterpénicas. A) ciclopentenona α , β -insaturada B) Anillo α -metilen- γ -lactonas C) Grupo exometileno. Modificado de referencia 87.

Aunque los mecanismos de acción exactos de las LsS aun no se entienden bien, se cree que el grupo α -metilen- γ -lactona es el responsable de sus efectos biológicos, especialmente por su actividad anticancerígena. El doble enlace exocíclico conjugado con un grupo carbonilo, es un agente alquilante fuerte y puede actuar sobre los factores de transcripción y las enzimas en el cuerpo humano causando cambios estéricos y químicos que afectan la capacidad de los objetivos para funcionar adecuadamente. En consecuencia, el grupo metileno de las LsS reacciona mediante una adición de Michael con varios nucleófilos, especialmente los grupos sulfidrilos (HS) de los residuos de cisteína en proteínas y en glutatión libre intracelular (GSH), lo que conduce a la reducción de la actividad enzimática y la alteración del metabolismo de GSH y el equilibrio redox intracelular (**Gach, 2014**).

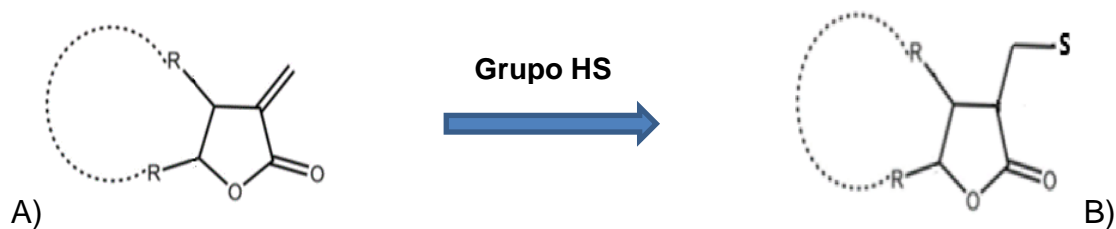


Figura 12. A) Estructura general del grupo α -metilen- γ -lactona. B) Mecanismo de acción de las LsS mediante una adición de Michael con un grupo sulfidriilo. Modificado de referencia 31

Actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas

Estas moléculas han llamado la atención de los científicos por el amplio espectro de actividades biológicas que presentan como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antibacteriana, neurotóxica y alergénica. Actualmente se realizan ensayos clínicos contra el cáncer con tres lactonas sesquiterpénicas: la artemisina, el partenolido y la tansigargina. Los estudios de relación estructura-actividad realizados a estas moléculas muestran características específicas en su estructura, que son las responsables de sus efectos antitumorales y citotóxicos **(Ruiz, 2015)**.

Dentro del grupo de las pseudoguayanólidas hay algunas que han mostrado tener una amplia variedad de actividades biológicas, resaltando aquellas con actividad antitumoral importante, tales como la Helenalina, la Tenulina, la Partenina o algunos análogos semisintéticos derivados de esta última.

La Helenalina fue descubierta como un constituyente principal de *Helenium autumnale* L. y ha sido aplicada en ratones macho BDF1 usando una sola dosis de 25 mg / kg lo cual disminuyó significativamente los niveles de citocromo P450 microsomal hepático. Por otro lado, se descubrió que la Helenalina y la Tenulina inyectadas en ratones con tumores de ascitis de Ehrlich inhibían la síntesis de ADN (incorporación de timidina en el ADN) y la Helenalina inhibía la síntesis de proteínas (incorporación de ilectina). **(Picman, 1984)**. También ha sido probada en algunas líneas tumorales con muy buenos resultados respecto a su actividad antiproliferativa (Tabla 2)

Otra lactona que ha demostrado una fuerte actividad citotóxica es la Partenina, sin embargo se ha observado puede dañar los cromosomas de linfocitos humanos principalmente al causar roturas en las cromátidas hermanas. Los autores sugirieron que la inhibición de la actividad mitótica de los linfocitos tiene lugar antes de que comience el mitotismo. Por lo tanto, parece que la alteración de la división celular resulta de alteraciones en las síntesis de ARN y ADN u otros procesos metabólicos que involucran la síntesis de ácidos nucleicos **(Picman, 1984)**.

También se ha reportado su efecto como agente causal de intoxicación severa y muerte en ganado, ya que las autopsias revelaron ulceración en el tracto alimentario y extensivos cambios patológicos en hígado, riñón y piel, además de la aparición de dermatitis de contacto en humanos **(Ramos 2001)**. Se determinó, más tarde, que la Partenina es un antígeno incompleto, que al interactuar con la dermis se une a proteínas plasmáticas como la albúmina en presencia de radiaciones ultravioletas, pasando entonces a convertirse en un antígeno completo, lo que explica que existe una reacción antígeno-anticuerpo que cause fotodermatitis. Por lo que la exposición directa y combinada de *Parthenium hysterophorus* con radiaciones solares produce reacciones de hipersensibilidad y diferentes tipos de lesiones en la piel a las personas expuestas, las cuales son más agudas en las zonas que tengan un mayor contacto con el sol **(García, 2007)**.

La partenina también ha sido probada en células tumorales pero debido a su elevada toxicidad, se han desarrollado diversos análogos semisintéticos con importantes resultados en líneas tumorales (Tabla 2)

Tabla 2: Lactonas sesquiterpénicas pseudoguayanólidas con actividad citotóxica/ antitumoral

Compuesto	Línea	IC ₅₀ (μM)	Autor
*52	A2780 (cáncer de ovario)	2.5	Pan, 2011
*58	PC-3 (cáncer de próstata)	8.7	Cheng,2012
Helenalina	WI-38 (células fibroblásticas de pulmón)	0.114	Lee, 1971
	HEp2 (carcinoma epidermoide de laringe)	0.686	
	WI8-Va2 (células. fibroblásticas de mucosa bucal)	0.266	
Cronopilina	U937 (Leucemia)	20	Cotugno, 2012
Partenina	Células de riñón bovino	11.43	Narasimhan,1984
*P16	MOLT-4 (Leucemia linfobástica aguda humana)	0.6	Goswami, 2014
	A549 (Adenocarcinoma alveolar)	4	
	HeLa (Cáncer cervicouterino)	7	
	COLO-205 (Cáncer de colon)	8	
	PC-3 (Cáncer de próstata)	5	
	CaKi-1 (Adenocarcinoma de riñón)	10	
*P19	HL-60 (Leucemia mieloide)	3.5	Kumar, 2011
	MCF-7 (Cáncer de mama)	5	
	HeLa (Cáncer cervicouterino)	12	
	hGF (fibroblastos gingiviales)	35	

*52 pseudoguayanólide aislada de *Athroisma proteiforme*; 58 pseudoguayanólide aislada de *Inula hookeri*; P16 y P19 análogos semisintéticos de las partenina

HYMENINA

Es una lactona sesquiterpénica de tipo pseudoguayanólide, cuyo nombre IUPAC es (3aS,6S,6aR,9aS,9bR)-6a-hidroxi-6,9a-dimetil-3-metileno-3,3^a,4,5,6,6a-hexahidroazuleno(4,4-b)furan-2,9(9ah,9bh)-diona, su fórmula química es C₁₅H₁₈O₄ (Figura 12)

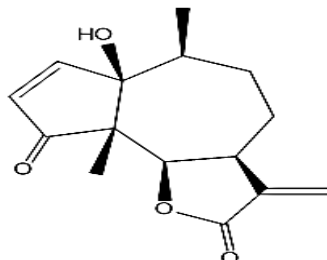


Figura 13. Estructura molecular de la Hymenina.

Esta molécula fue aislada de la especie *Parthenium hysterophorus* (Figura 13), perteneciente a la familia *Asteraceae*, es una planta herbácea con hojas alternas, profundamente disecadas, que crece hasta 2 m de altura con inflorescencias ramificadas que portan cabezuelas florales blancas y aquenios negros, ovoides y suaves. Está ampliamente diseminada en pastos, huertos de árboles frutales y áreas cultivables sobre suelos neutros y ácidos, es natural de las zonas cálidas de América del Norte (**CONABIO, 2009**). Tiene una amplia variedad de usos medicinales, los más frecuentes de esta especie se indican para los padecimientos digestivos, principalmente para la bilis y el dolor de estómago, así como para la fiebre intestinal, para infecciones cutáneas, granos, ronchas, herpes, sarna, aljorra o contra la caída del cabello (**BDMTM, 2009**).



Figura 14. *Parthenium hysterophorus*, también llamada escoba amarga. Fuente principal de la Hymenina. Lusweti, A. (2011) Factsheet. Recuperado de: [https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Parthenium_hysterophorus_\(Parthenium_Weed\).htm](https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Parthenium_hysterophorus_(Parthenium_Weed).htm)

Su principal constituyente sesquiterpenoide activo es la Partenina y su diastereoisomero la Hymenina además de coronopilina, damsina, ambrosina, hystarina, caryofilina y monoterpenos como limonero y pineno **(Polín, 2006)**. De la partenina existen algunos reportes científicos de su potencialidad como agente antitumoral en cambio de la Hymenina no hay ningún registro referente a esta potencialidad sin embargo se mostró que tiene un efecto toxico en larvas de *Tenebrio molitor*, ocasionando la muerte del 45% de las larvas al cabo de 25 días de exposición al compuesto **(Sosa, 1995)**,

También, se encontró que la Hymenina inhibe la respuesta inflamatoria en un 78% en Edema de oreja de ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol (TPA). **(Recio,200)**. Sin embargo, posteriormente se demostró que en estudios respecto a la relación estructural de las pseudoguaianolidas, el isómero β -OH (partenina) en C-1 es más activo contra el edema de oreja de ratón inducido por etil-fenilpropiolato que su equivalente α -OH (Hymenina), esto confirma la importancia de la geometría molecular en la citotoxicidad de las lactonas **(Ghantous, 2010)**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las opciones de tratamiento para el cáncer dependen principalmente de la etapa en que se encuentre la enfermedad. Los tres tipos principales de tratamiento son cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, resultan ser ineficientes en pacientes con estadios avanzados, de alto costo, muy agresivos y con fuertes efectos secundarios, esto debido a que no discriminan entre las células sanas de las tumorales. Por estas razones se ha generado la necesidad de implementar nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad.

Actualmente los compuestos de origen natural han tomado especial importancia en la industria farmacológica, principalmente aquellos con actividad antitumoral, esto como una alternativa a los tratamientos tradicionales. En ese sentido, las lactonas sesquiterpénicas, son estudiadas como buenos candidatos para ser aplicados en la terapia contra el cáncer.

En este estudio se pretende analizar el efecto de la Hymenina como molécula con actividad antiproliferativa, de baja o nula citotoxicidad, inductora de apoptosis y con acción selectiva en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), cérvix (CaSki) y pulmón (SK-LU-1) así como en células no tumorales (Linfocitos de sangre periférica humana).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, en 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Se prevé que el número de casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años.

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es el de mayor tasa de mortalidad y de mayor incidencia en hombres y mujeres. Particularmente el cáncer de mama es el tipo de cáncer más mortífero entre las mujeres de 20 a 59 años en todo el mundo mientras que el cáncer del cuello uterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la mujer.

El tratamiento oncológico mediante la administración de quimioterápicos se caracteriza por la aparición de toxicidades provocadas no sólo en las células tumorales, sino también en las células sanas, lo que genera efectos secundarios que pueden ser controlables o incluso pueden agravar el estado general del enfermo produciendo fatales consecuencias (Toral, 2018)

La gravedad y las consecuencias derivadas de estos efectos dependen de las características del paciente, del tipo, dosis y tiempo de administración de los medicamentos, sin embargo, la mayoría resultan ser necróticos y poco selectivos, esto ha suscitado que la comunidad científica se interese en encontrar nuevos compuestos, principalmente de origen vegetal, que tengan actividad antitumoral y acción selectiva con baja o nula citotoxicidad.

Dentro de los compuestos de origen vegetal, las lactonas sesquiterpénicas son un grupo con crecientes resultados en investigación básica y se les ha atribuido actividad antiproliferativa en diversas líneas tumorales, es por esto que se plantea a la Hymenina como un posible agente terapéutico contra el cáncer.

HIPÓTESIS

Existe una amplia variedad de lactonas que han sido aisladas de diferentes especies vegetales, la mayoría han mostrado tener actividades biológicas de importancia médica, tal es el caso de las lactonas pseudoguayanólidas Helenalina, Partenina o análogos semisintéticos derivados de esta última, las cuales han mostrado tener actividad antitumoral en carcinomas. Por lo que, se espera que la lactona Hymenina al pertenecer a este grupo de lactonas, presente actividad antiproliferativa y apoptótica en las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231.

OBJETIVOS

GENERAL

- ✿ Determinar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la Hymenina en cultivos de células tumorales (CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231) y no tumorales (células linfocíticas humanas)

PARTICULARES

- ✿ Determinar la actividad antiproliferativa de la Hymenina en las líneas celulares CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231, expresada como la cantidad requerida del compuesto para inducir una disminución del 50% en el número celular, mediante la técnica de incorporación de cristal violeta
- ✿ Evaluar si la Hymenina induce un efecto necrótico por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos de las células CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231
- ✿ Evaluar si la lactona Hymenina presenta un efecto apoptótico mediante el análisis morfológico de las células teñidas con el fluorocromo DAPI y detección de la caspasa-3 activa mediante microscopia de contraste de fases, epifluorescencia y por citometría de flujo.
- ✿ Evaluar si las IC_{50} obtenidas para las diferentes líneas tumorales afectan el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana
- ✿ Evaluar la actividad necrótica de la Hymenina por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en células linfocíticas humanas

DISEÑO EXPERIMENTAL

CULTIVO DE CÉLULAS TUMORALES

Se realizaron cultivos de líneas celulares provenientes de carcinoma epidermoide de cérvix positivo al VPH 16 (CaSKi), adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1) y adenocarcinoma de glándula mamaria (MDA-MB-231) las cuales fueron sembradas en cajas Petri de cristal (Pirex, USA), en 10 ml de medio RPMI-1640 (Microlab, MEX) suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina y rojo de fenol, al 5% de suero fetal bovino (SFB)(Biowest, USA) para las líneas CaSKi y SK-LU-1, y con DMEM (Sigma, USA) al 10% de suero fetal bovino (SFB)(Gibco, USA) con rojo fenol para la línea MDA-MB-231. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con una concentración del 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair, USA). Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos con un 70% de saturación.

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO.

La Hymenina fue donada por el Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química de la UNAM, para solubilizarla se utilizó como vehículo Dimetilsulfoxido (DMSO) (J.T. Baker, USA) en una disolución de 5mg/ml (stock 1), posteriormente se realizaron alícuotas de 100 µl de stock 1 en 900 µl de medio de cultivo DMEM (Sigma, USA) al 10% de SFB) y RPMI 1640 (Microlab, MEX) al 5% SFB (stock 2), finalmente se realizó una disolución de 10 µl de stock 2 en 90 µl de medio de cultivo para su posterior uso, obteniendo una concentración de 5µg/100µl (stock 3).

CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO CELULAR MEDIANTE LA TÉCNICA DE INCORPORACIÓN DE CRISTAL VIOLETA

En placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA), se sembraron 7,500 células por pozo para la línea celular MDA-MB-231, en 100 µl de medio de cultivo DMEM y 6,000 células por pozo para la línea celular CaSKi y SK-LU-1, en 100 µl de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado durante 24 horas.

Pasado el tiempo de adhesión celular, se determinaron los siguientes grupos experimentales: Un control testigo al cual solo se le realizó un cambio de medio de cultivo; nueve diluciones seriadas al 50% del stock 3 de Hymenina disueltas en medio suplementado; y un control del vehículo utilizado en la solubilización del compuesto (DMSO). El efecto en el número celular se evaluó 24 horas después de la aplicación del estímulo mediante el método de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng et al, 1989. Las células tratadas fueron fijadas durante 20 minutos con 50 µl/pozo de glutaraldehído al 1.1% (Sigma, USA); posteriormente se retiró el fijador y se realizó un lavado con agua corriente, después se dejó secar al aire, en seguida se añadieron 50 µl/pozo del colorante Cristal Violeta (Sigma, USA) al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico durante 20 minutos en agitación constante. Pasado el tiempo, se retiró el

exceso de colorante con lavados de agua y dejando secar nuevamente al aire. Posteriormente se añadieron 100 μ l de ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% y se dejó en agitación durante 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de placas Elisa (ChroMateAwarenessTechnologyInc, USA). Se graficaron las densidades ópticas como porcentaje de proliferación celular con respecto al control.

Para calcular las IC_{50} (Concentración en la que disminuye el 50 % del número celular), se procesaron los datos en el programa de computadora Microsoft Office Excel 2010. Con los datos obtenidos de las líneas celulares se realizaron confirmaciones puntuales de las IC_{50} en placas de 96 pozos, siguiendo el procedimiento anterior, y evaluándolas con el método antes descrito. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NECROTICA MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).

En placas de plástico de 96 pozos de fondo plano, se sembraron 7,500 células por pozo para la línea celular MDA-MB-231, en 100 μ l de medio de cultivo DMEM y 6,000 células por pozo para la línea celular CaSKi y SK-LU-1, en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado durante 24 horas. Pasado dicho tiempo, se les retiró el medio y fueron tratadas con la concentración correspondiente a la IC_{50} confirmada, además de un control testigo al cual sólo se le realizó un cambio de medio, un control del vehículo correspondiente (DMSO) y un control positivo de células lisadas durante una hora con Tritón X-100 al 1% en medio de cultivo fresco; durante 24 horas adicionales. Terminado el estímulo se centrifugaron las placas por 5 minutos a 1,500 rpm en frío. Se recuperó el sobrenadante en una placa de plástico de 96 pozos de fondo cónico y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 5 minutos para desechar cualquier resto celular.

Para la evaluación de la actividad necrótica se utilizó el kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity (Promega, USA), de tal modo que se transfirieron 40 μ l/ pozo por condición del sobrenadante a una placa de 96 pozos de fondo plano, se le adicionaron 40 μ l de reactivo de reacción y se dejó actuar durante 25 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente se adicionaron 40 μ l de solución de paro y se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas Elisa (ChroMateAwarenessTechnologyInc, USA). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado procesando los datos en el programa Microsoft Office Excel 2010, haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con Tritón X-100. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR EN CÉLULAS TUMORALES POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES Y TINCIÓN CON DAPI.

Se sembraron 7,000 células/ pozo en una placa de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA), en 100 μ l de RPMI-1640 suplementado para las líneas CaSKi, SK-LU-1; para el caso de la línea MDA-MB-231 se sembraron 5,000 células/pozo, dejándolas incubar

durante 24 horas. Posteriormente, se trataron las células con la concentración de la IC₅₀ correspondiente a cada línea celular, además de un control testigo al cual sólo se le realizó un cambio de medio, un control del vehículo correspondiente (DMSO) y un control positivo con 8 µg de Camptotecina por ml de medio durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, las células fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 4% y glutaraldehído al 2.5% en PBS durante dos horas, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS filtrado estéril, 50 µl por pozo. En seguida se agregaron 15 µl por pozo del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) durante un minuto. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se agregaron 15 µl de PBS para poder observarlas en un microscopio de epifluorescencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS MEDIANTE LA DETECCIÓN DE CASPASA 3 ACTIVA POR INMUNOCITOQUÍMICA

Se sembraron 7,000 células/ pozo en una placa de plástico de 96 pozos, en 100 µl de RPMI-1640 suplementado para las líneas CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231 (para este caso se sembraron 5,000 células/pozo), dejándolas incubar durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se trataron las células con la concentración de la IC₅₀ correspondiente a cada línea celular, además de un control testigo al cual sólo se le realizó un cambio de medio, un control del vehículo correspondiente (DMSO) y un control positivo con 8 µg de Camptotecina por ml de medio durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en PBS durante dos horas, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS filtrado estéril, 50 µl por pozo. En seguida las células fueron permeadas con TritonX-100 al 0.5% durante 5 minutos, nuevamente se realizaron tres lavados con PBS y se agregaron 15 µl de anticuerpo primario: anticaspasa 3 activa ((Sigma, USA) 1:1000 en PBS) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se agregaron 15 µl de anticuerpo secundario: antilgG acoplada a FITC ((Sigma, USA) 1:1000 en PBS), bajo condiciones de oscuridad durante dos horas y treinta minutos. Nuevamente se realizan tres lavados con PBS y se agregaron 15 µl de PBS para poder observarlas en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E600 (Nikon, USA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS MEDIANTE LA DETECCIÓN DE CASPASA 3 ACTIVA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En placas estériles de 24 pozos (Coming, USA) se sembraron 20,000 células/pozo en 500 µl de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado las cuales se mantuvieron en incubación por 24 horas. Pasadas las 24 horas las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: un control testigo al cual sólo se le realizó cambio de medio, un control del

vehículo correspondiente (DMSO) en el que se solubilizó la Hymenina, un control positivo con 8 μ l de Camptotecina por ml de medio de cultivo fresco y la concentración correspondiente a la IC₅₀ confirmada, además de un control sin marca y un control secundario durante 24 horas adicionales.

Después de 24 horas, se recuperó el medio y se despegaron las células con verseno pasándolas a tubos de citometría. Se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 500 μ l de PBS, en seguida, se añadieron 500 μ l de metanol y se dejó a temperatura ambiente durante una hora. Se realizaron tres lavados con PBS filtrado, centrifugando a 1,500 rpm durante 5 minutos.

Se resuspendió el botón celular en 50 μ l de anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3 humana (Sigma, USA) (1:1000 ml de PBS filtrado); y se dejó actuar durante toda la noche a 4 °C. Pasado el tiempo, se realizaron tres lavados con PBS filtrado y se resuspendió el botón en 50 μ l de anticuerpo secundario acoplado con fluorocromo FIT-C, anticuerpo de cabra anticonejo (Sigma, USA) (1:1000 en PBS). Se colocaron en una incubadora durante 2 horas, pasadas las cuales, se realizaron tres lavados y se agregaron 500 μ l de PBS filtrado para leer en un citómetro de flujo FACSAria II. Los datos fueron procesados en el programa estadístico Flowing Software versión 2.5.1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACION DE CÉLULAS LINFOCÍTICAS HUMANAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE INCORPORACIÓN DE CARBOXIFLUORESCÉINA

Se obtuvieron de 20 ml de sangre periférica de un donador aparentemente sano, en tubos Vacutainer con EDTA (BD Franklin Lakes N.J., USA), posteriormente se agregaron 5 mL de sangre a tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA) los cuales contenían previamente 5 mL de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA).

A continuación, los linfocitos se marcaron agregando 50 μ l de carboxifluoresceína (Sigma, USA) (2 μ l de CSFE/ml de RPMI- 1640 20%) durante 15 minutos protegidos de la luz. Se realizan dos lavados agregando 5ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% SFB, la muestra se centrifugó (Dinac, USA) durante 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB. Los linfocitos se activaron con fitohemaglutinina (Microlab, USA) (20 μ l de PHA / ml RPMI-1640) y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml (Corning, USA) a una densidad de 1x10⁶ células/ml de RPMI-1640 al 20% SFB y PHA.

Las células contenidas en cada uno de los tubos cónicos de 1.5ml (Nest, USA) se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en 200 μ l de RPMI-1640 al 20% de SFB considerado los siguientes tratamientos: control sin activar, control activado, control sin marca y activado, control sin activar y sin marca. Se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ a una atmósfera húmeda por 72 horas.

El cultivo se estimuló considerando las siguientes condiciones: control sin activar (con CSFE y sin PHA), control activado (con CSFE y con PHA), control sin marca y activado (Sin CSFE y con PHA), control sin activar y sin marca (Sin CSFE y sin PHA), vehículo (concentración de DMSO para obtener la IC_{50}) e IC_{50} correspondientes a cada línea tumoral del compuesto Hymenina.

Transcurridas las 24 horas se colectaron los linfocitos en tubos de citometría (un tubo por condición) y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 500µl de verseno, se realizaron dos lavados y el botón celular se resuspendió en 500µl de PBS filtrado. Finalmente, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo (BD FACS Aria II, USA) y los datos obtenidos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1.

DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR NECROSIS EN CÉLULAS LINFOCÍTICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LDH

Partiendo de los cultivos de linfocitos humanos tratados con la IC_{50} de Hymenina correspondiente por cada línea celular y el resto de las condiciones, además de un control positivo en el cual se agregó TritonX-100 al 2% durante una hora previa a la extracción.

Tras 72 horas de cultivo, se transvasaron cuidadosamente 50 µl de cada condición a una placa de 96 pozos de fondo cónico, la placa fue centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm en frío y posteriormente se tomaron 40 µl por condición y se agregaron en una placa de 96 pozos de fondo plano.

La actividad de la enzima LDH se determinó con el kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity, del cual se agregaron 40 µl de la mezcla de reacción, se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 25 minutos, en seguida se agregó la solución de paro para posteriormente evaluar a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas Elisa. Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con Tritón X-100. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos experimentales son presentados como la media de al menos, tres experimentos y fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparada con el vehículo en el que fue disuelto el compuesto, Dimetilsulfoxido, particularmente.

Resultados

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA HYMENINA EN LAS LINEAS TUMORALES

Para la evaluación del efecto antiproliferativo de la Hymenina se estimularon tres líneas celulares tumorales con diferentes concentraciones de la lactona en un rango de 0.15 a 10 $\mu\text{g/ml}$ y el número celular se determinó mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta. Los resultados indican que la Hymenina tiene un efecto dosis-dependiente sobre la proliferación celular de las líneas CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1 debido a que, al incrementar la concentración del compuesto, el número celular se ve disminuida (Figura 15).

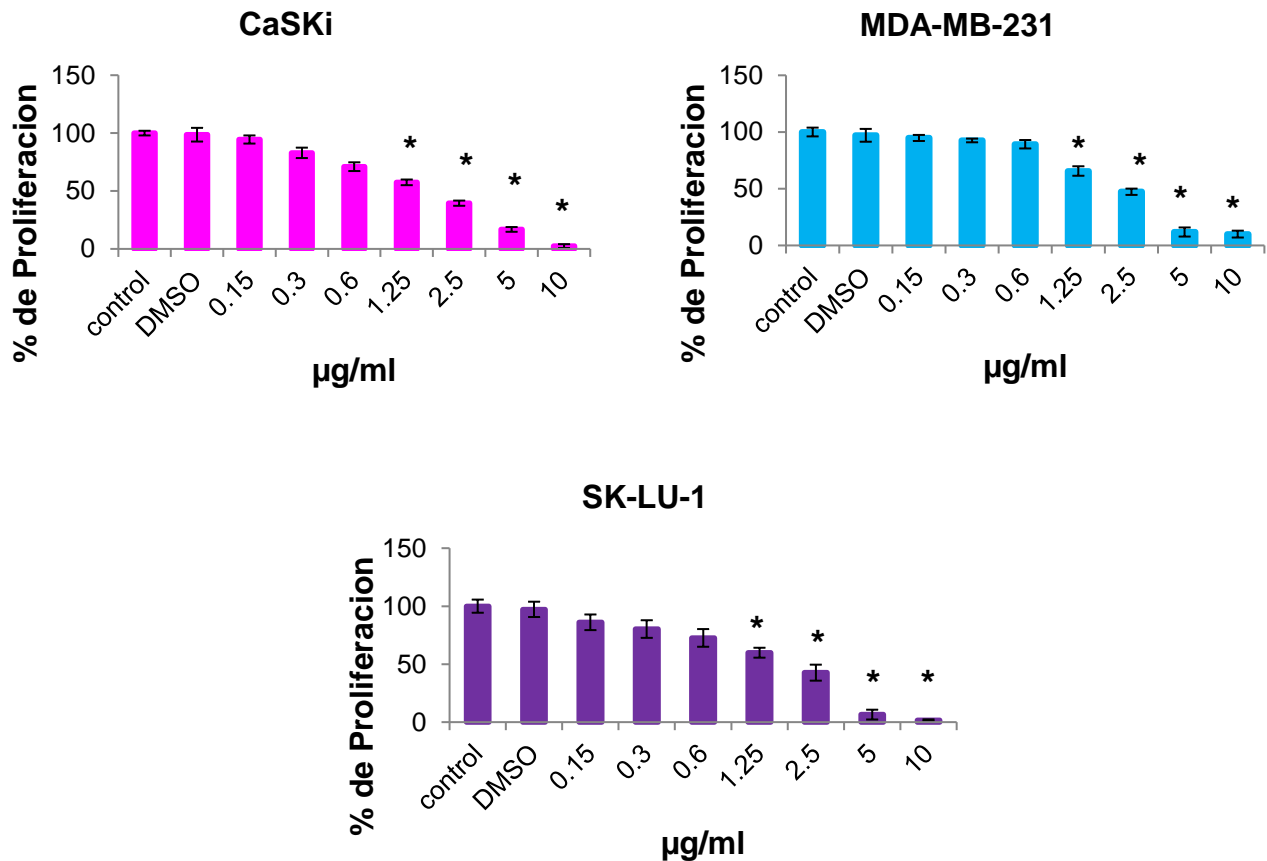


Figura 15. Curva dosis respuesta. Efecto de la lactona Hymenina sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSKi, SK-LU-1 Y MDA-MB-231. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. * $p < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$ (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Posteriormente se determinó la concentración necesaria que se requiere de Hymenina para inhibir en un 50% (IC₅₀) la proliferación de las líneas tumorales mediante la linearización de la curva de actividad y resolviendo matemáticamente la ecuación obtenida (Figura 16).

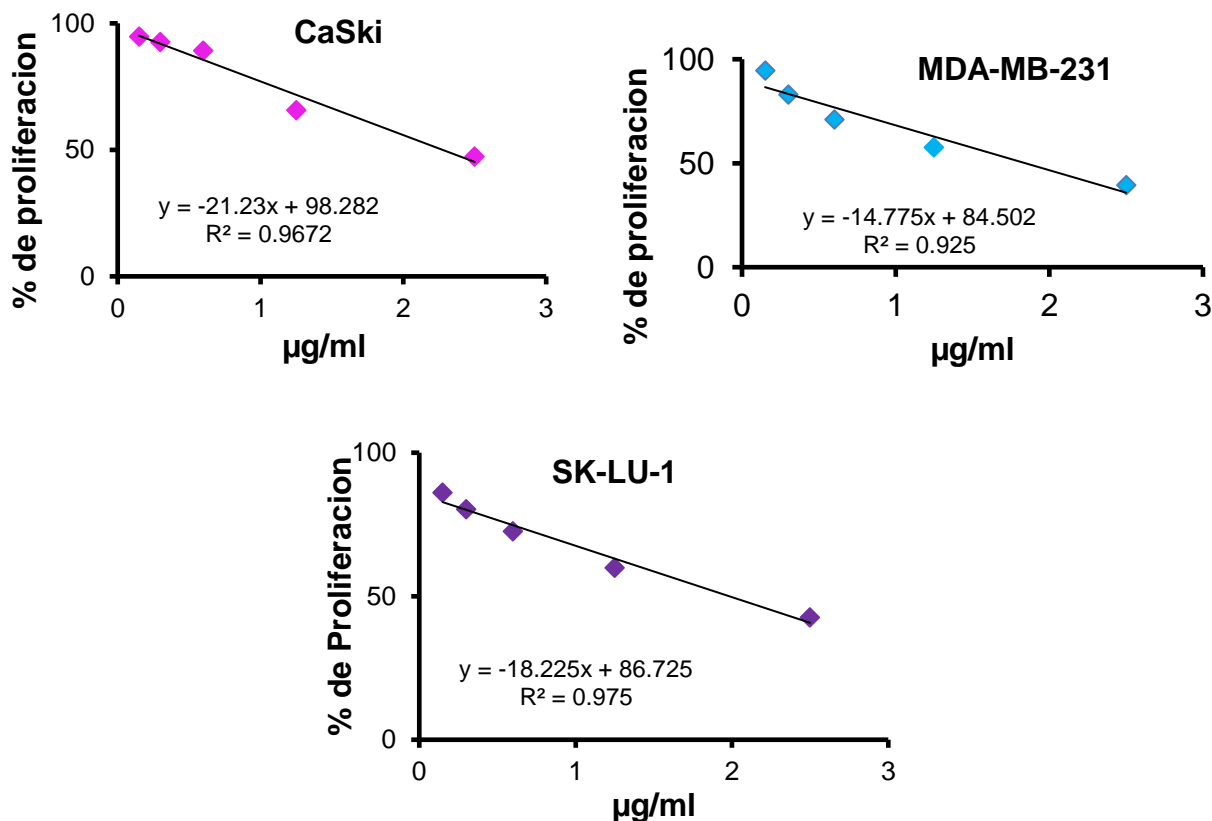


Figura 16 Linearización de la curva. Resolución matemática de la ecuación de la línea recta y determinación de la IC₅₀ matemática. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

Tras procesar los datos se determinó la IC₅₀ matemática particular a cada línea celular (ver Tabla 3)

Tabla 3. Concentración de Hymenina requerida para disminuir la población celular en un 50% para las líneas celulares CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1

Línea celular	IC 50 (µg/ml)	µM
CaSKi	2.27	8.6542
MDA-MB-231	2.33	8.882
SK-LU-1	2.01	7.662

Posteriormente se realizaron nuevos cultivos de las líneas celulares CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1, los cuales fueron estimulados con la respectiva concentración de Hymenina determinada matemáticamente con la intención de corroborar las IC_{50} (Figura 17). El número celular se determinó mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta

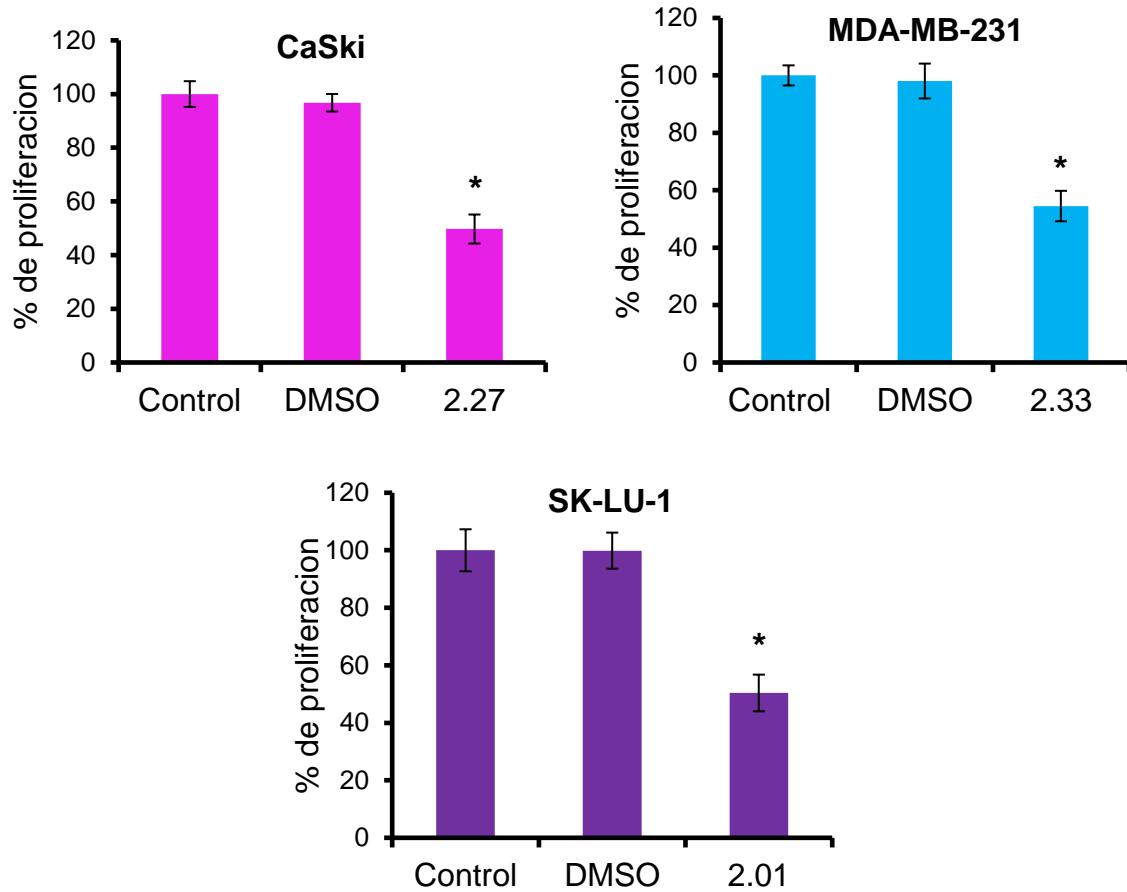


Figura 17: Confirmación del efecto antiproliferativo de la Hymenina en tres líneas tumorales con las IC_{50} correspondientes. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. * $p < 0.05$ vs. $0 \mu\text{g/ml}$ (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Una vez que se determinó la IC_{50} , se procedió a establecer si la disminución de la población está relacionada con una inducción de una muerte necrótica por parte del compuesto.

EFFECTO NECRÓTICO DE LA HYMENINA EN LAS LINEAS TUMORALES

Para la evaluación del efecto citotóxico en las líneas celulares CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1 se determinó la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares tumorales, que fueron estimuladas con sus IC₅₀ correspondientes, esto como un parámetro de medición del daño a la integridad de las membranas, la cual es una característica distintiva de la muerte necrótica. Los datos fueron procesados y se determinó el porcentaje de LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 18).

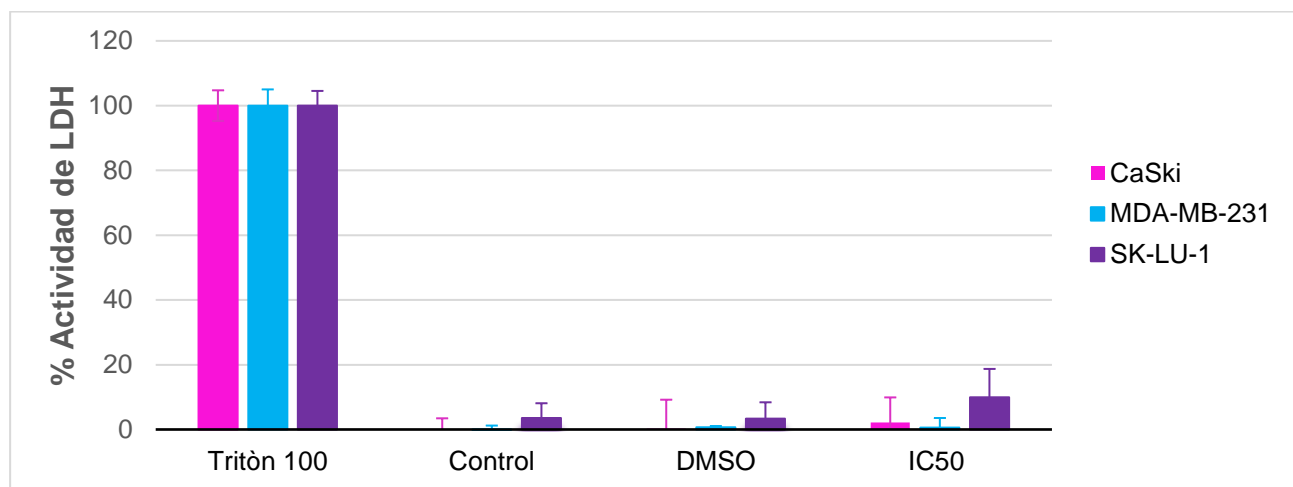


Figura 18. Porcentaje de actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales de las líneas CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU, estimuladas con la IC₅₀ correspondiente de Hymenina durante 24 horas. Los gráficos representan tres ensayos independientes. * p< 0.05 vs. 0 µg/ml (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados indican que solo se registró un incremento en el porcentaje de actividad de la enzima citoplasmática LDH en las líneas CaSKi y SK-LU de 2.19% y 9.94% respectivamente lo cual no representa una diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo (DMSO) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de activación de la enzima LDH en comparación con las tres líneas tumorales

% ACTIVIDAD DE LDH				
Línea Celular	Tritón X-100	Control	DMSO	Hymenina (IC ₅₀)
CaSKi	100±5	0±3.4	0.32±9	2.19±8
MDA-MB-231	100±5	0±1.3	0.671±0.5	0.57±3
SK-LU-1	100±4.5	3.50±4.5	3.34±5	9.94±9

Los datos obtenidos muestran que la disminución observada en el número celular de los cultivos tratados no se debe a la inducción de una muerte por necrosis, por lo que se procedió a evaluar si se está induciendo una muerte de tipo apoptótico.

INDUCCIÓN DE MUERTE APOPTÓTICA DE LA HYMENINA EN LAS LÍNEAS CELULARES

Morfología celular

Para la evaluación de la morfología celular característica de la muerte por apoptosis, se realizaron cultivos de las tres líneas celulares los cuales fueron estimulados con la concentración de Hymenina correspondiente a su IC₅₀, después fueron teñidos con el fluorocromo DAPI para, posteriormente, ser observadas en un microscopio de epifluorescencia

En las imágenes se puede apreciar que las células que no fueron tratadas, es decir en el control y en el DMSO, mantienen la estructura poliédrica típica de cada línea celular, con proyecciones citoplasmáticas, además de que se encuentran bien adheridas. Sin embargo, en las células tratadas con Camptotecina (control positivo) e Hymenina, su estructura es más esférica y de menor tamaño, lo que indica pérdida de sus proyecciones citoplasmáticas.

En las células teñidas con DAPI se pueden observar, en los controles negativos, núcleos esféricos y bien definidos, en cambio en las células tratadas con Camptotecina e Hymenina se observa una disminución del tamaño nuclear además de una mayor concentración de colorante, lo que indica una condensación de la cromatina y/o fragmentación nuclear la cual es otra característica de la apoptosis, al mismo tiempo se observa la presencia de cuerpos apoptóticos, estos cambios en conjunto no comprometen la integridad de la membrana, por lo que se genera una morfología típica de una muerte por apoptosis. (Figura 19, 20 y 21)

Detección de caspasa 3 activa por Inmunofluorescencia

Debido a que la observación de la morfología típica de la apoptosis en las líneas celulares no es lo suficientemente concluyente para asegurar que se está llevando a cabo un proceso apoptótico, es necesario determinar si la Hymenina induce la activación de caspasas efectoras, particularmente la caspasa 3, de modo que se realizaron cultivos de las tres líneas celulares, los cuales fueron estimulados con la concentración de Hymenina correspondiente a su IC₅₀ y la detección de la caspasa 3 activa fue determinada mediante la inmunomarcación de la caspasa 3 activa con anticuerpos anti-caspasa 3 y otros acoplado al fluorocromo FIT-C y fue revelada mediante microscopía de epifluorescencia. (Figura 19, 20 y 21)

Las imágenes indican que en los cultivos tratados con Hymenina se lleva a cabo la activación de la caspasa 3 de manera similar a los cultivos tratados con Camptotecina (control positivo), de modo que es posible afirmar que la lactona sesquiterpénica Hymenina induce una muerte apoptótica en las líneas celulares CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1.

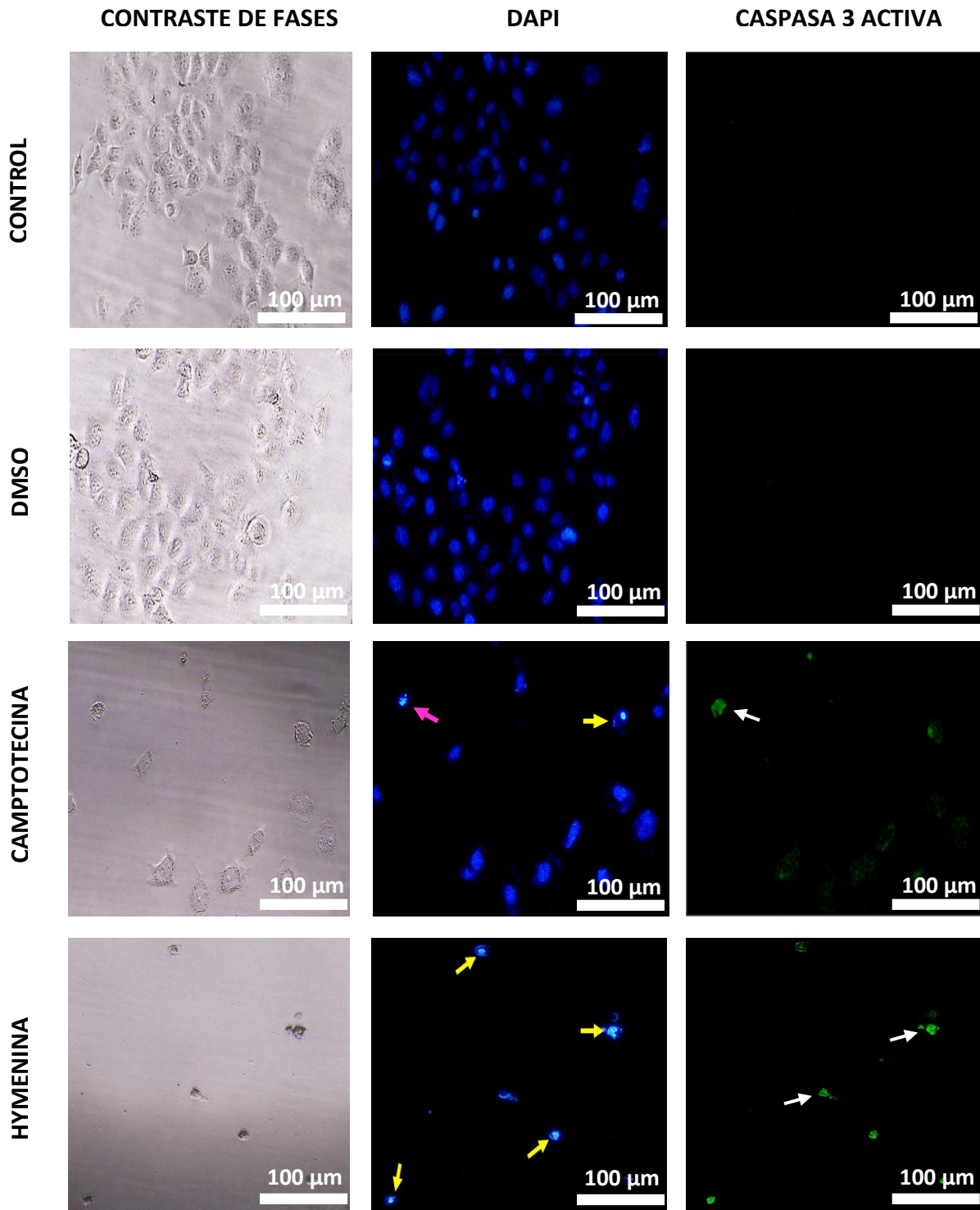


Figura 19. Efecto de la Hymenina sobre la morfología de las células de la línea CaSki, y la expresión de la caspasa 3 activa. Las células fueron tratadas con 2.27 $\mu\text{g/ml}$ de Hymenina durante 24 horas. En las **células** teñidas con DAPI, las flechas amarillas señalan a las células que presentan condensación de la cromatina, las flechas verdes indican la presencia de cuerpos apoptóticos. En las células evaluadas para la presencia de la caspasa 3 activa, aquellas que son positivas presentan una marca verde, algunas están señaladas con una flecha blanca.

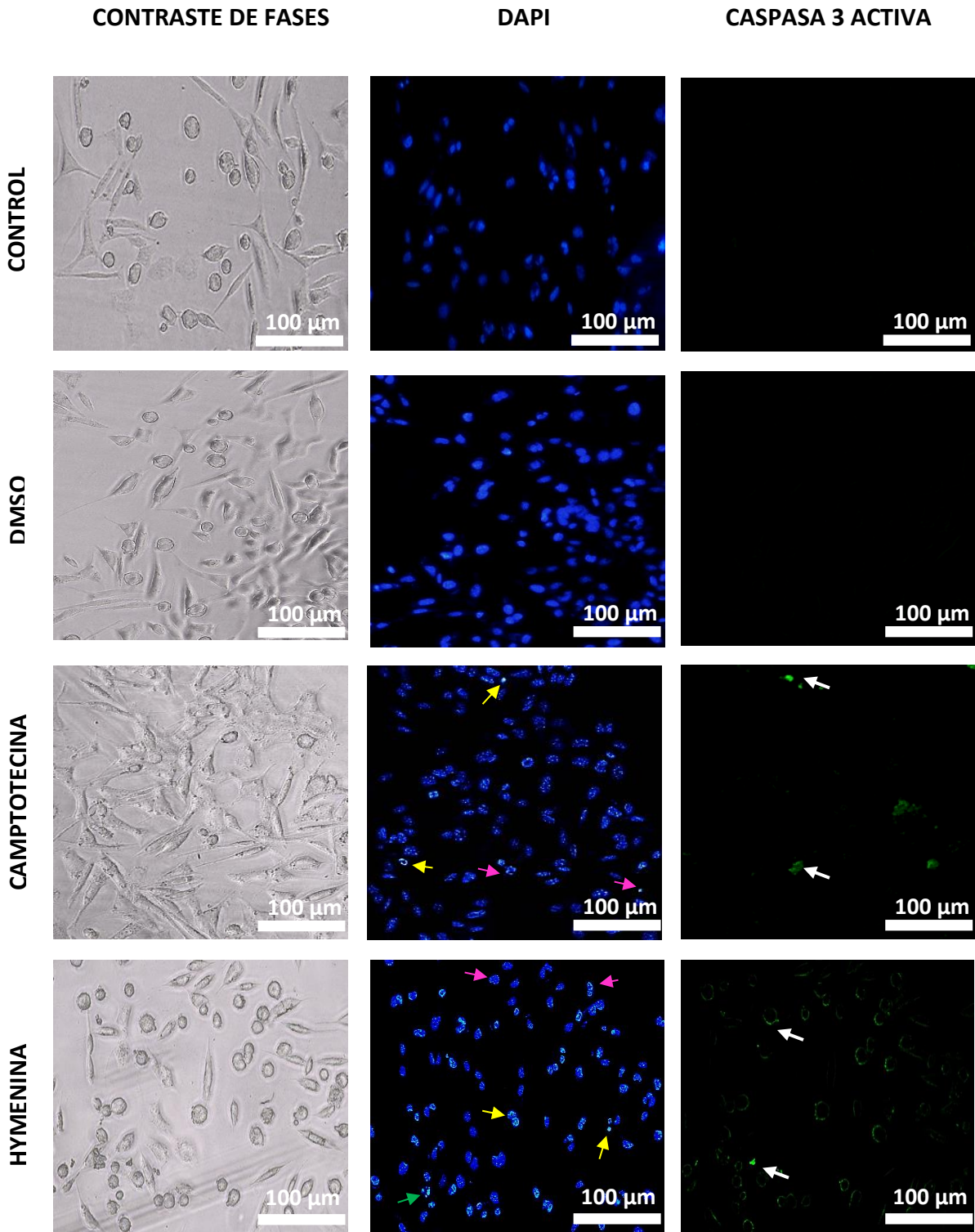


Figura 20. Efecto de la Hymenina sobre la morfología de las células de la línea MDA-MB-231 y la expresión de la caspasa 3 activa. Las células fueron tratadas con 2.33 $\mu\text{g/ml}$ de Hymenina durante 24 horas. En las células teñidas con DAPI, las flechas amarillas señalan a las células que presentan condensación de la cromatina, las flechas verdes indican la presencia de cuerpos apoptóticos y las flechas rosas muestran fragmentación nuclear. En las células evaluadas para la presencia de la caspasa 3 activa, aquellas que son positivas presentan una marca verde, algunas están señaladas con una flecha blanca.

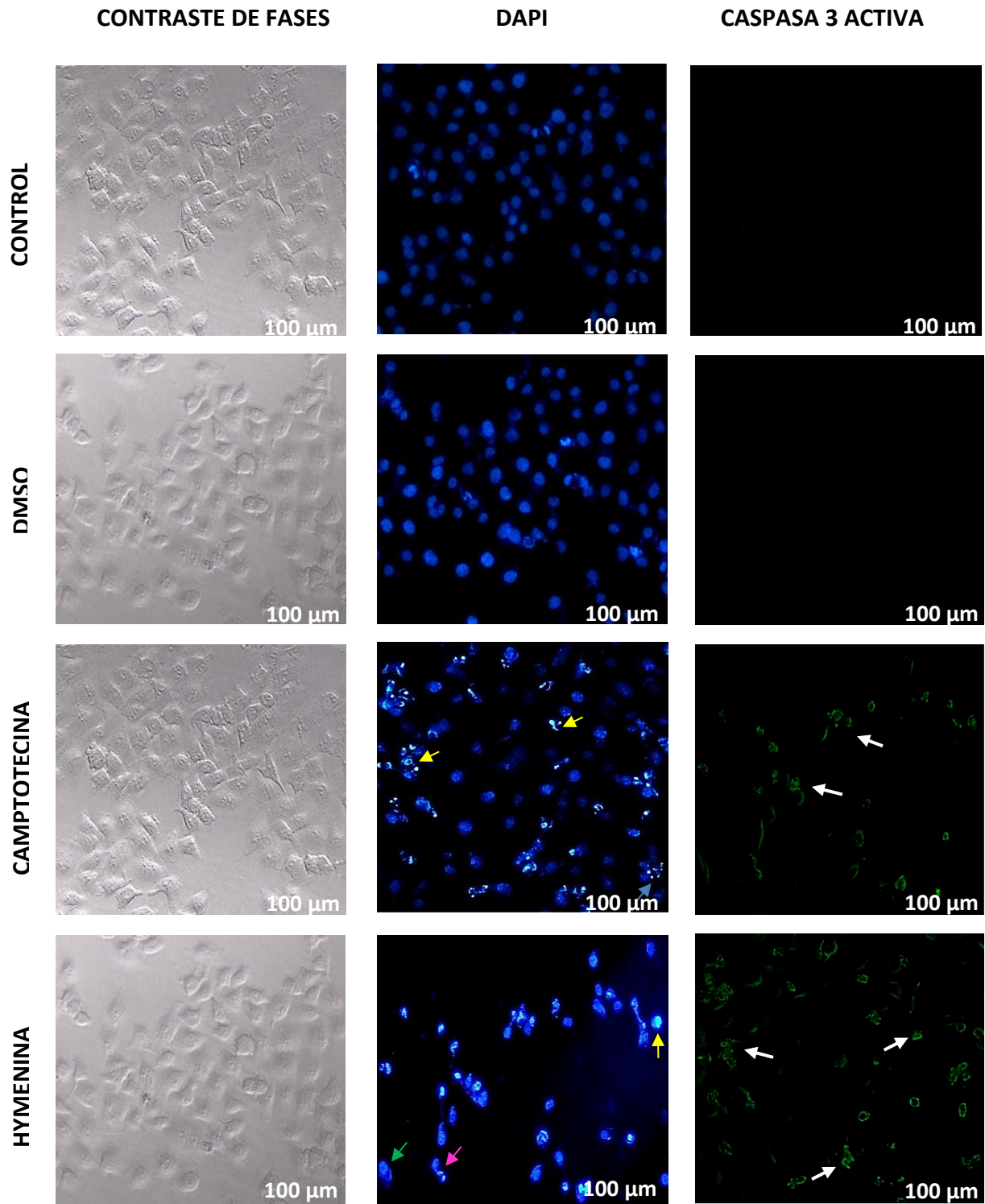


Figura 21. Efecto de la Hymenina sobre la morfología de las células de la línea SK-LU-1 y la expresión de la caspasa 3 activa. Las células fueron tratadas con 2.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hymenina durante 24 horas. En las células teñidas con DAPI, las flechas amarillas señalan a las células que presentan condensación de la cromatina, las flechas verdes indican la presencia de cuerpos apoptóticos y las flechas rosas muestran fragmentación nuclear. En las células evaluadas para la presencia de la caspasa 3 activa, aquellas que son positivas presentan una marca verde, algunas están señaladas con una flecha blanca.

Detección de la caspasa 3 activa por citometría de flujo

Tras confirmar la inducción de una muerte apoptótica por parte de la Hymenina en las líneas celulares, es necesario cuantificar la proporción de la población celular que es positiva a la caspasa 3 activa inducida por este compuesto, de modo que se realizaron cultivos de las líneas CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1, los cuales fueron estimulados con la concentración de Hymenina correspondiente a la IC₅₀ de cada línea celular y se determinó la caspasa 3 activa mediante inmunodetección, utilizando un anticuerpo específico para caspasa-3 activa acoplado al fluorocromo FIT C y las células positivas a la caspasa fueron cuantificadas por citometría de flujo.

Los resultados indican que la Hymenina induce la activación de la caspasa 3 activa (Figura 22, Tabla 5), obteniendo valores de 87.9% y 72 % para las líneas CaSKi y SK-LU-1 respectivamente, y de 28% en la línea MDA-MB-231 (Tabla 5). Confirmando así, que la lactona Hymenina ocasiona la muerte de las células tumorales mediante un proceso apoptótico dependiente de caspasa 3.

Tabla 5. Porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa

Línea \ Condición	Control	DMSO	Camptotecina	Hymenina (IC ₅₀)
CaSKi	3.62%	3.27%	81.6%	87.9%
SK-LU-1	1.80%	3.66%	68.4%	72%
MDA-MB-231	3.34 %	3.84%	37.4%	28%

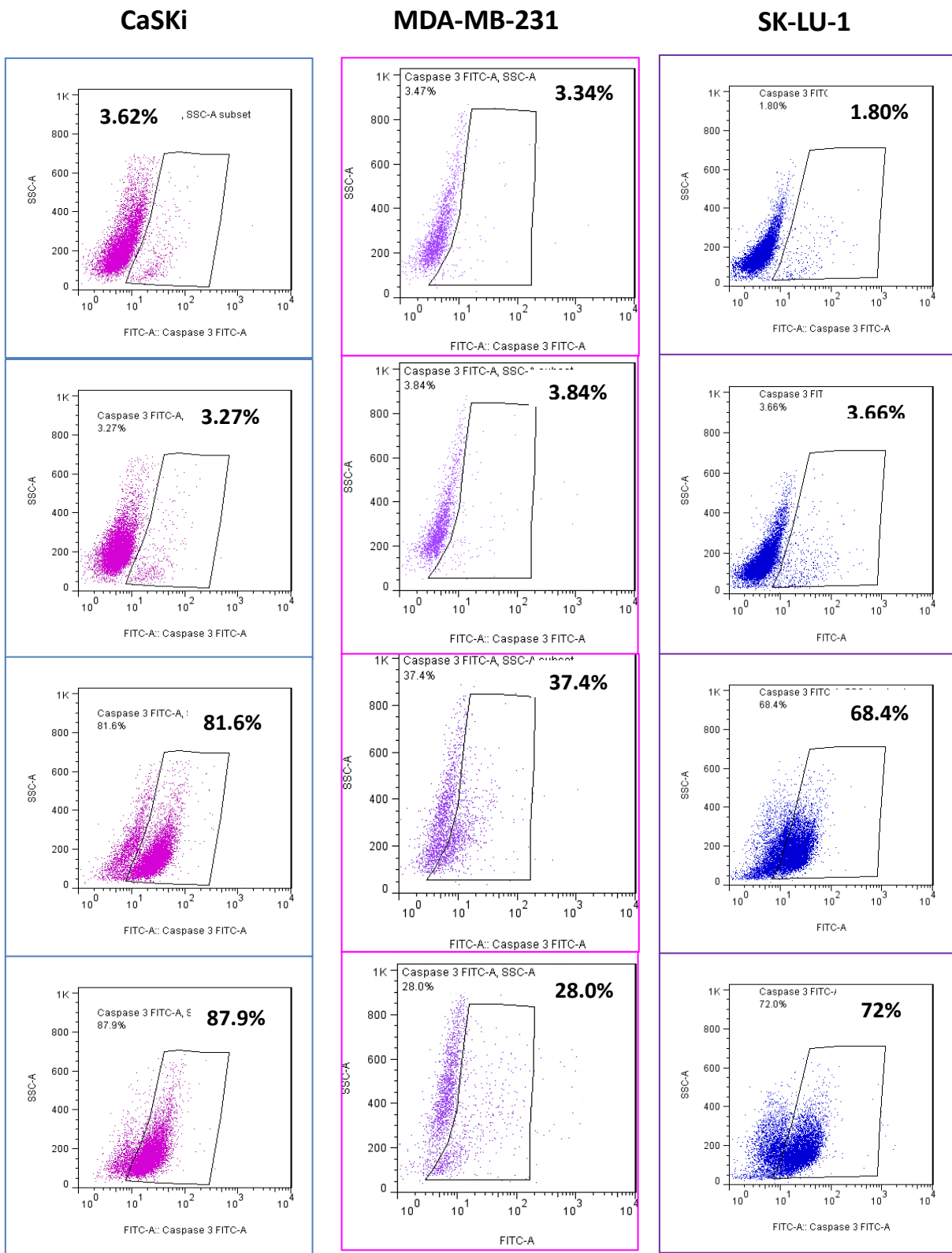


Figura 22. Detección de la caspasa 3 activa en células tumorales pertenecientes a las líneas CaSKI, MDA-MB-231 y SK-LU-1 mediante citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con la dosis correspondiente a la IC₅₀ particular a cada línea celular. Los gráficos representan tres ensayos independientes

EVALUACION DEL EFECTO EN CELULAS NO TUMORALES

Potencial proliferativo

En vista de que se ha establecido el proceso de muerte que desencadena la Hymenina en las líneas tumorales, se requiere evaluar el efecto, específicamente en el potencial proliferativo, en células no tumorales, particularmente en células linfocíticas de sangre periférica humana, con la finalidad de determinar si el compuesto posee selectividad.

Para ello, se realizaron cultivos de linfocitos humanos, los cuales fueron tratados con la concentración de Hymenina correspondiente a la IC_{50} específica de cada línea celular y para evaluar el potencial proliferativo se utilizó la técnica de marcaje con carboxifluoresceína y la proliferación celular fue cuantificada por citometría de flujo.

Los resultados indican que la lactona Hymenina afecta significativamente el potencial proliferativo de las células linfocíticas de manera dosis dependiente, esto sugiere que el compuesto no posee selectividad en la actividad antiproliferativa (Figura 23, tabla 6).

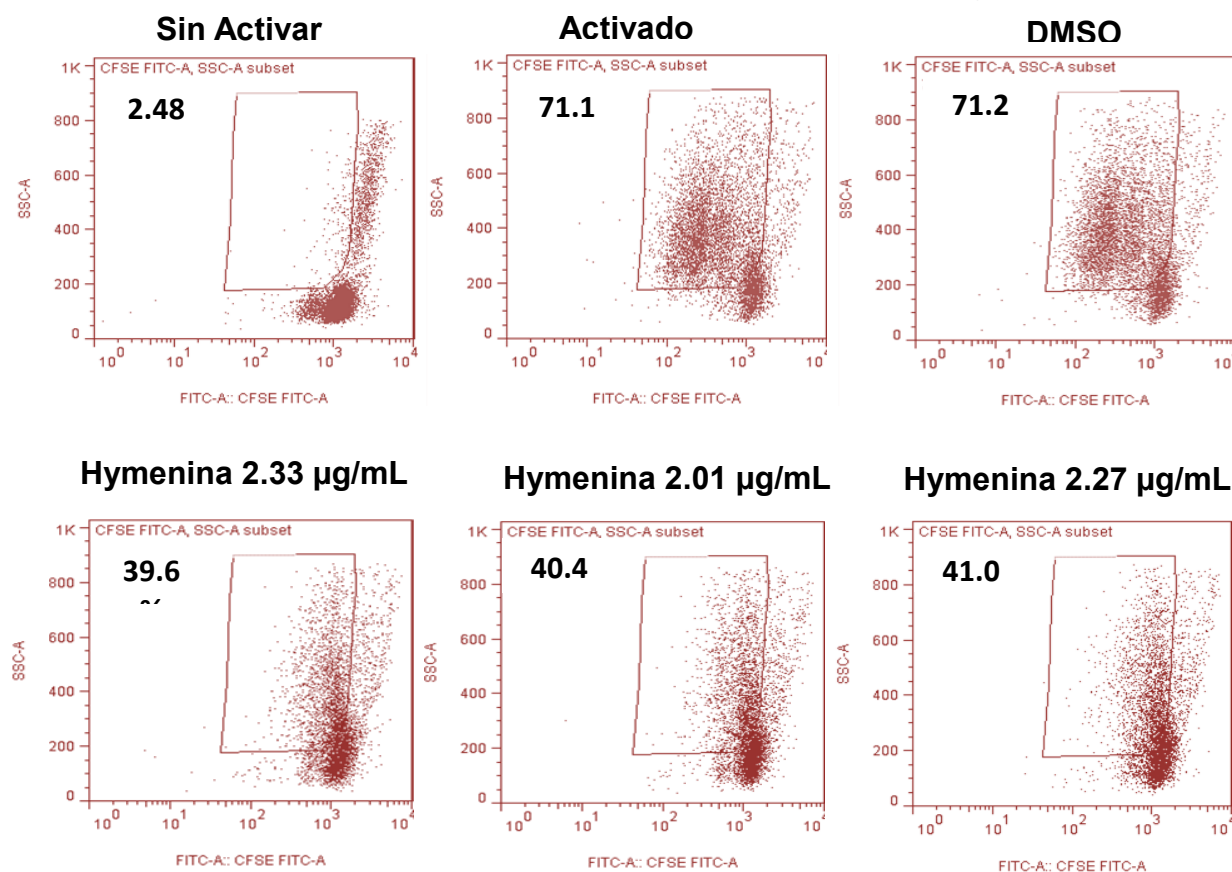


Figura 23. Efecto de la Hymenina sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas. Las células fueron estimuladas con la dosis correspondiente a la IC_{50} particular a las líneas celulares CaSKi, MDA-MB-231 y SK-LU-1. Los gráficos representan tres ensayos independientes

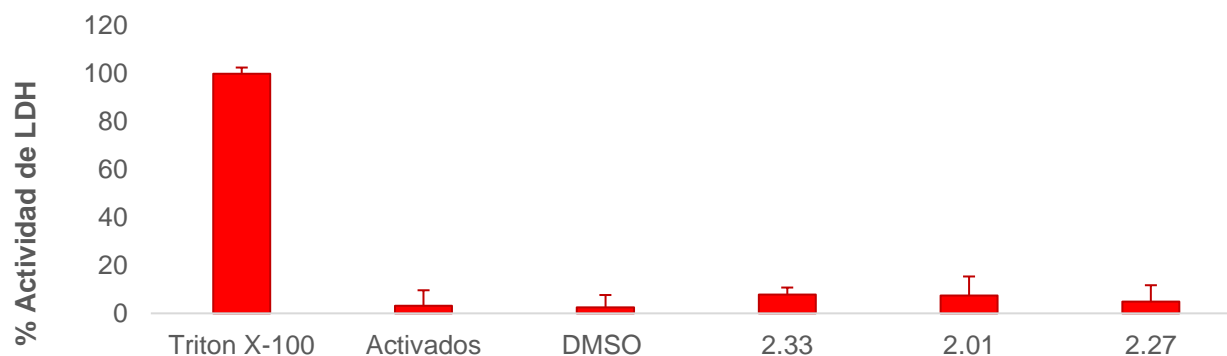
Tabla 6. Porcentaje de proliferación de linfocitos tratados a diferentes concentraciones de la lactona Hymenina.

Condición	Sin Activar	Activado	DMSO	2.01 (µg/ml)	2.27 (µg/ml)	2.33 (µg/ml)
% Proliferación	2.48	71.1	71.2	40.4	41	39.6

Efecto necrótico

Teniendo en cuenta que el compuesto si afecta el potencial proliferativo de los linfocitos, es imperativo establecer si esta disminución puede explicarse mediante una muerte necrótica inducida por la Hymenina, de modo que se evaluó la actividad de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos del mismo modo que se realizó en las células tumorales.

Obteniendo porcentajes de actividad de la LDH de 4.8, 7.4 y 7.8 correspondiente a la IC₅₀ de CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 respectivamente, estos porcentajes no son estadísticamente significativos para determinar que la disminución en el potencial proliferativo se relacione con una muerte por necrosis por lo que debe estar dado por otra causa (Fig. 24, Tabla 7).

**Figura 24.** Efecto necrótico de la Hymenina sobre los cultivos de células linfocíticas humanas. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. * $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).**Tabla 7.** Porcentaje de Actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de linfocitos humanos

% ACTIVIDAD DE LDH					
Tritón X-100	Activados	DMSO	2.27	2.33	2.01
100±2.5	3.2 ± 6.4	2.4 ± 5	4.8 ± 7	7.8 ± 3	7.4 ± 8

Discusión

Hay una urgente necesidad de búsqueda de nuevos compuestos antitumorales dado que el cáncer mata aproximadamente 7 millones de personas por año, esperándose que para el 2020 este número crezca hasta 10 millones (**Gutiérrez, 2009**), estas terapias se caracterizan por ser costosas, tener efectos secundarios no deseados y generar tumores resistentes en los pacientes, donde estos tratamientos tienen una efectividad limitada, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias, más efectivas, para el tratamiento clínico de esta enfermedad (**Parra, 2002**).

Los mecanismos de defensa de las plantas a menudo se basan en su capacidad de generar sustancias químicas que posean un efecto citotóxico o citostático lo que las convierte en una fuente de nuevas sustancias con actividad antitumoral (**Muñoz, 2016**). Los estudios de evaluación de citotoxicidad de extractos de plantas sobre células tumorales representan evidencias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. (**Díaz, 2011**)

Siendo las lactonas sesquiterpénicas un buen grupo de candidatos debido a su amplia gama de actividades biológicas, que depende de la amplia variedad de arreglos en su esqueleto carbocíclico, donde, se ha destacado la actividad antitumoral. Estos compuestos han sido evaluados en múltiples áreas, sin embargo, los resultados relevantes para este estudio son aquellos relacionados con su actividad antiproliferativa y citotóxica.

Particularmente, la Hymenina es un compuesto pobremente estudiado pero que cuenta con un gran potencial antiproliferativo, el cual depende de la dosis aplicada, ya que logra inducir una disminución del 50% de la población de células tumorales CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231 a 8.65, 7.66, y 8.88 μM respectivamente. En comparación con fármacos quimioterapéuticos sintéticos más comunes como el Cisplatino, donde la IC_{50} reportada es de 15 μM en Células de médula ósea femoral murina (**Casco, 2008**), la lactona Hymenina requiere una menor concentración para inducir una disminución del número celular en un 50% en las tres líneas celulares analizadas.

Con base en diversos estudios estructura/actividad de las lactonas sesquiterpénicas, se encontraron algunas pertenecientes al grupo de las pseudoguayanólidas con importantes resultados respecto a su actividad en células tumorales, tal es el caso de aquellas aisladas de la especie *Parthenium hysterophorus linn*; la Cronopilina, la Partenina y la Hymenina.

Respecto a la Cronopilina, fue probada en células de Leucemia y se determinó que a la concentración de 20 μM induce el arresto del 50% de las células en la fase G2/M (**Cotugno, 2012**). En cuanto a la Partenina, fue probada en células derivadas de ovario de hámster chino donde se determinó la IC_{50} de 11.43 μM y que inhibe la síntesis de ADN, RNA, de proteínas y de enzimas involucradas en el metabolismo como succinato deshidrogenasa. Además, también se reportó que ocasiona aberraciones cromosomales en esta línea celular y en linfocitos de sangre periférica (**Ramos, 2001**).

En contraste, es posible decir que la Hymenina presenta un efecto antiproliferativo superior ya que requiere una dosis menor a las mencionadas anteriormente para inducir una disminución del 50% de la población celular. Además, esta lactona no induce una muerte necrótica en los cultivos celulares. Esto sustentado en que la actividad de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH), no supera el 10% en ninguno de los casos, de manera que la disminución en el número celular debe estar vinculado a otro proceso

La relación entre la estructura química y la actividad citotóxica de las lactonas sesquiterpénicas ha sido investigada en numerosos modelos tumorales (**Picman, 1986**), en los cuales se ha determinado que esta particular capacidad puede estar vinculada a varios componentes estructurales tales como el anillo α -metilen- γ -lactona, la ciclopendenona α - β insaturada, el grupo exometileno e incluso la actividad óptica del grupo OH. Tal que, al existir algún cambio estructural en cualquiera de estas regiones, la citotoxicidad puede verse afectada de manera positiva o negativa. Este es el fundamento básico para la creación de análogos semisintéticos a partir de lactonas sesquiterpénicas.

Los compuestos orgánicos han liderado el mercado de los quimioterapéuticos desde tiempos remotos, ya que la medicina tradicional ha sido una fuente reveladora de nuevas moléculas en el descubrimiento moderno de fármacos antitumorales. Sin embargo, los compuestos inorgánicos no son ajenos a este aspecto, en tanto que la química medicinal inorgánica se ha convertido en un campo creciente de investigación y ha permitido obtener compuestos sintéticos con un papel esencial en el tratamiento del cáncer. Los compuestos semisintéticos y sintéticos con actividad antitumoral se han generado a partir de modificaciones químicas o síntesis química completa de compuestos de origen natural que se han logrado aislar, purificar y han demostrado ser citotóxicos (**Parra, 2002**); esto con la intención de potencializar la actividad biológica que presentan y disminuir los daños que causan. Ya que se han reportado compuestos análogos que presentan un potencial antiproliferativo superior a la molécula madre tras una o varias modificaciones en su estructura química. Específicamente, análogos de la Partenina, que han sido probados en células HeLa, obtuvieron una IC_{50} de 12 μ M para el compuesto P19 (**Kumar, 2011**) y una IC_{50} de 7 μ M para el compuesto P16 (**Goswami, 2014**). Sin embargo, la Hymenina sigue presentando ventajas sobre ambos compuestos debido a que su obtención es mucho menos costosa y su efecto biológico es similar o superior en ambos casos.

Por otra parte, de acuerdo con diversos estudios, se ha reportado que la Partenina (diastereoisómero β -OH de la Hymenina) presenta una elevada citotoxicidad en todos los modelos que ha sido probada, causando intoxicación severa y muerte en ganado, ya que las autopsias revelaron ulceración en el tracto alimentario y extensivos cambios patológicos en hígado, riñón y piel, además de la aparición de dermatitis de contacto en humanos (**Ramos 2001**). En células tumorales se han reportado dosis superiores (11 μ M), en comparación con la Hymenina (8.882 μ M), requeridas para inducir una disminución del 50% en el número celular, además de que la Hymenina no desencadena una muerte necrótica

en las células por lo que la disminución de la citotoxicidad confirma la importancia del arreglo estructural y la isomería geométrica en las lactonas sesquiterpénicas.

De manera que, la necrosis queda descartada como proceso responsable de la disminución en el número celular en las líneas tumorales CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231, es posible tomar en cuenta a otro tipo de muerte celular como lo es la apoptosis.

Se ha demostrado que las lactonas sesquiterpénicas inducen apoptosis IN VITRO, inhiben el ciclo celular y la proliferación, y disminuyen la metástasis en varias líneas celulares de cáncer. Además existen estudios que han intentado determinar el mecanismo de inducción de apoptosis por parte de las lactonas sesquiterpénicas y en muchas líneas celulares de cáncer, se demostró que está asociada con el agotamiento de glutatión reducido (GSH), con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), con la disipación del potencial mitocondrial transmembranal, el lanzamiento del citocromo c, y la activación de caspasas (caspasa 9 y 3) **(Gach, 2015)**

Es por esta razón que se procedió a evaluar la capacidad de la Hymenina para inducir una muerte apoptótica en las líneas tumorales CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231. Los resultados muestran que las células tratadas durante 24 h con el compuesto presentan una morfología propia de células apoptóticas, tales como condensación de la cromatina, compactación y fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. Además, se determinó que este proceso es dependiente de caspasa 3, debido a que, tras la cuantificación de las células positivas a esta enzima mediante citometría de flujo, se obtuvo un porcentaje de 87.9%, 72 % y 28% para las líneas CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231 respectivamente. Estos porcentajes son cercanos o incluso superiores al obtenido en el control positivo, de modo que se confirma la intervención de la caspasa 3 en este proceso.

Los fármacos antineoplásicos se caracterizan en su gran mayoría por ser agentes antimetabólicos, que inducen la muerte de las células cancerosas generalmente cuando se encuentran en el proceso de mitosis. Esta es la razón principal del porqué afectan también a las células sanas, induciendo daños sobre cualquier célula del cuerpo que se encuentre en proceso de división, lo que genera una serie de efectos secundarios no deseados en la mayoría de los tratamientos con quimioterapia **(Muñoz, 2016)**. Por eso, uno de los principales desafíos en la lucha contra el cáncer es el desarrollo de fármacos con toxicidad selectiva, es decir, que sean capaces de matar a las células tumorales, sin dañar a las saludables **(Ortega, 2000)**

Sin embargo, la Hymenina demostró que afecta significativamente el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas logrando, aproximadamente, un 40% de proliferación en las células tratadas con las IC₅₀ particulares a cada línea tumoral por lo que es posible decir que la Hymenina no posee selectividad. Por otra parte, cabe destacar que esta disminución en la proliferación no es provocada por una muerte necrótica, esto fundamentado en los bajos niveles de enzima LDH en los sobrenadantes celulares, por lo que este efecto puede

estar relacionado con una muerte apoptótica o incluso una detención en alguna fase del ciclo celular

Finalmente, la Hymenina es una lactona con actividades biológicas destacables en cuanto a su efecto antiproliferativo mediado por apoptosis en células tumorales y la nula inducción de una muerte necrótica, especialmente si se compara con quimioterapéuticos de uso clínico y con algunas lactonas del mismo grupo por lo que se sugiere que este compuesto podría ser un buen candidato para evaluarse como un potencial agente terapéutico contra el cáncer además de servir como molécula madre para sintetizar compuestos análogos, que podrían presentar una mejor acción selectiva sobre células no tumorales. Sin embargo, es necesario determinar la razón de la disminución en los linfocitos de sangre periférica, ya que la disminución podría estar dada por una muerte apoptótica o bien un arresto en alguna fase del ciclo celular.

Conclusiones

- ✿ La lactona Hymenina afecta la proliferación de manera dosis-dependiente de los cultivos celulares de las líneas CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231
- ✿ Las concentraciones IC_{50} obtenida fue de 2.27, 2.01, y 2.33 $\mu\text{g/ml}$ en las líneas CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231 respectivamente.
- ✿ La disminución en el número celular no está vinculado a un proceso necrótico debido a que el porcentaje de actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos no es estadísticamente significativo.
- ✿ La Hymenina induce una muerte por apoptosis dependiente de caspasa 3 en las líneas CaSKi, SK-LU-1 y MDA-MB-231 en un 87.9%, 72% y 28% respectivamente.
- ✿ En células no tumorales, la Hymenina tiene un efecto dosis dependiente, ya que a concentraciones de 2.01, 2.27 y 2.33 $\mu\text{g/ml}$, afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas en un 40, 41.4 y 39.6% en las líneas SK-LU-1, CaSKi y MDA-MB-231 respectivamente, sin embargo, no induce un efecto necrótico en este tipo celular.

Perspectivas

- ✿ Evaluar el efecto la Hymenina en el ciclo celular o como inductor de apoptosis en células linfocíticas de sangre periférica humana

BIBLIOGRAFÍA

1. ABTA. American Brain Tumor Association (2014) Quimioterapia <https://www.abta.org/wp-content/uploads/2018/03/quimioterapia.pdf>
2. Acosta, I., Remon, L., Segura, R., Ramírez, G., Carralero, A. (2016). Factores de riesgo en el cáncer de pulmón. Correo Científico Médico, Vol. 20 No.1, pp 42-55.
3. ACS. American Cancer Society (2016) ¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)? Sitio web: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.htm>
4. ACS. American Cancer Society (2015) Tipos comunes de tratamiento para el cáncer. Sitio web: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/despues-del-diagnostico/tratamientos-comunes-contr-el-cancer.html>
5. Acuña, M., Roman, E. (2013). Cáncer Cervicouterino. Septiembre, 2018, de Hospital General de México
6. Adekenov, S. (2017). Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. Fitoterapia, 121, pp 16-30.
7. Alberts B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2010). Introducción a la Biología Celular. 900pp: pearson.
8. Amada, A., Angulo, A. y Galindo, C. (2012). Biología Celular. Universidad Autónoma de Sinaloa: primera edición.
9. Amorín, E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, Vol.30 No. 1, pp 85-92.
10. Arce, C., Bargalló, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F. Cancerología 6 (2011) Instituto Nacional de Cancerología pp 77-86. Sitio Web: <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1327324685.pdf>
11. Awouoafack, M., Tane, P., Kuete, V., Eloff, J. (2013). Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa Meedicinal Plant Research in Africa, pp 33-103.
12. BDMTM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Escobilla o hierba de la hormiga. Sitio web: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Parthenium_hysterophorus&id=7530
13. Bermúdez, A., Oliveira, M., Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia, Vol. 30, No. 8, pp 453-459.
14. Cajaraville, G. (2002). Oncología. Farmacia hospitalaria, Tomo II, pp 1172-1226.
15. Cano, S. (2012). Metástasis: una perspectiva molecular. Agosto, 2018, de Universidad de Málaga Sitio web: http://www.encuentros.uma.es/encuentros138_9/metastasis.pdf
16. Cárdenas, J., Bargalló, E., Erazo, A., Maafs, E., Poitevin, A. (2013). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Colima
17. Cascales, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, Vol. 69 No. 1, pp 36- 64

18. Casco, R., Juaristi, J., Piñeyro, S. (2008) Efecto de Cisplatino en la viabilidad y proliferación celular. Argentina, Facultad de Medicina, UNNE
19. Cheng, X., Li, W., Zeng, Q., Shen, Y. (2012) Sesquiterpene lactones from *Inula hookeri*, *Planta med*, 78, pp 465-471
20. Collado, R. (2011) Hablemos del Cáncer De Mama con Roche. Sitio web: http://fecma.vinagrero.es/documentos/hablemos_de_cancer_mama.pdf
21. CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2009) Malezas de Mexico. Ficha técnica: *Parthenium hysterophorus* Linn. Sitio web: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/parthenium-hysterophorus/fichas/ficha.htm>
22. Cortés, M. (2011). Medicina tradicional indígena: efectividad a prueba. *Tukari*, Vol. 16, No. 3, pp 2-12.
23. Cotugno, R., Fortunato, R., Santoro, A. (2012) Effect of sesquiterpene lactone cronopilin on leukemia cell population growth, cell type specific induction of apoptosis and mitotic catastrophe. *Cell prolif*, 45, pp 53-65
24. De la Peña y cols. (2012) Mutagénesis y carcinogénesis química; Postgrado en Toxicología. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/102537/1/Expertox2012.pdf>
25. De la Rosa, E., Díaz, B. & Sánchez, N. (2000). Muerte celular programada: Un proceso clave en fisiología y patología. *Ciencia Al Día*, Vol. 3
26. Díaz, A., Rodríguez, H., Scull, L. (2011). Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. *Revista Cubana de Farmacia*, 45, pp 101-108
27. Elena, G.. (2002). Mecanismos de muerte celular: Apoptosis y Necrosis. Agosto, 06, 2018, de *Revista Argentina de Anestesiología* Sitio web: https://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/284/c.pdf
28. Escalona, L., Tase, A., Estrada, A. (2015). Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. *Guisa, Granma. Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Vol. 20, No.4, pp 429-439.
29. *Eurocytology* (2014). La anatomía del cuello uterino. Sitio web: <https://www.eurocytology.eu/es/course/462>
30. Fuenmayor, J., Gámez, R., Montaña, R. (2013). Anticuerpos Monoclonales en el Tratamiento del Cáncer. *Terapia dirigida para Tumores Sólidos. Revista Venezolana de Oncología*, Vol. 25, No. 4, pp. 236-254.
31. Gach, K., Długosz, A., Janecka, A. (2015). The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388, pp 477-486.
32. Garcia, D. (2007). Evaluación toxicológica a los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophoru*, L; empleando dos técnicas alternativas. (Tesis de licenciatura). Universidad Central "Marta Abrelí" de las villas. Santa Clara
33. García, M., Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la sociedad Española de oftalmología*, Vol. 78, No. 7

34. Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H. (Agosto 2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials. *Drug Discovery Today*, 15, pp.668-678.
35. Goswami, A., Shah, B. (2014) Antiproliferative potential of a novel Parthenin analog P16 as evident by apoptosis accompanied by down-regulation of PI3K/AKT and ERK pathways in human acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. *Chemico biologicals interactions*, 222, pp 60-67
36. Govindan, R. (2016). *Manual Washington de Oncología*. Estados Unidos: Wolters Kluwer.
37. Gutiérrez, A. (2009) *Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI*. España, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
38. Heras, F. (2002). La quimioterapia hipertérmica. Efectos sobre las células mesoteliales pleurales y bases de su aplicación en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno. Agosto 2018, de Hospital Clínico Universitario de Valladolid Sitio web: <http://www.felixheras.es/Comunicaciones/CAPT%20%20QUMIOTERAPIA%20HIPERT%20C9RMICA%20Protegido.pdf>
39. Hernández, D., Apresa, T., Patlan, R. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, Vol. 53, pp 154-161.
40. Hinojosa, L., Dueñas, A. (2000). Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, Vol. 46 No. 1, pp 47-57.
41. Huicochea, S., González., Tovar, I. (2009). Cáncer de Mama. *Anales de Radiología en México*, Vol 1, pp 117-126
42. Instituto Nacional del Cáncer. (2012). Tratamiento del cáncer. Agosto,6,2018, de NCI Sitio web: <https://www.cancer.gov/espanol>
43. Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Aspectos generales de la prevención del cáncer
44. INEGI (2016) Estadísticas A Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer
45. iTAcC. Instituto de Técnicas Avanzadas contra el Cáncer (2016) Quimioterapia neoadyuvante, adyuvante y concomitante, ¿qué son? Sitio web: <https://itaccancer.es/es/noticias/quimioterapia-neoadyuvante-adyuvante-y-concomitante-que-son>
46. Jiménez, A. (2017). Medicina tradicional. *Boletín CONAMED*, pp 31-34
47. Jiménez, L. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.
48. Karp, G. (2014). *Biología Celular Y Molecular*. Estados Unidos: McGraw-Hill Interamericana.
49. Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U. (1989). Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates. *Analytical Biochemistry*, 182, 16-19.
50. Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S. (2011) A novel Parthenin analog exhibits anti-cancer activity: Activation of apoptotic signaling events through robust NO formation in human leukemia HL-60 cells. *Chemico biologicals interactions*, 193, pp 204-215

51. Lagunas, M., Valle, A & Soto, I. (2014, Noviembre 13). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes*, 17, pp 98-107
52. Lee, K., Huang, E., Pagano, J., Geissman, T. (1971). Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones. *Cancer Research*, 31, pp 1649- 1654.
53. León, G., Bosques, O. (2005). Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, Vol. 31 No.1
54. Lizarbe, M. (2007). El Suicidio Y La Muerte Celular. Agosto, 06, 2018, de *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat*
55. LLS. Leukemia and Lymphoma Society (2015). Información sobre la inmunoterapia. Sitio web: https://www.llscanada.org/sites/default/files/file_assets/FS9S_Immunotherapy%20Facts_SPANISH_4_15FINAL.pdf
56. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Estados Unidos: Panamericana.
57. Lomanto, L., Ortiz, O. & Bretón, C. (2003). El ciclo celular. Sept 2018, de Universidad Autónoma de Bucaramanga Sitio web: https://www.biologia.bio.br/curso/r616_ae_c1.pdf
58. Lopez, O., Magariño, Y., Delgado, R. (2009). El proceso angiogénico y el cáncer. *Biotecnología Aplicada*, 26, pp 104-110.
59. López, R. (2003). La Regulación Del Ciclo Celular Y El Cáncer. *Vertientes*, 6, pp 40-44.
60. Martínez, M., García, F. Hernández, M., Manzanera, J.. (2002). Los Citostáticos. *Enfermería, Global*, 1, pp 1-16.
61. Martínez, S. (2013) Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina-3- glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y ViBo (Tesis de licenciatura) Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, CDMX
62. Mayor, F. (2005). Mecanismos de señalización celular: implicaciones fisiopatológicas. Agosto, 06, 2018, de Real Academia Nacional de Farmacia Sitio web: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/571/588>
63. Megías, M., Molist, P & Pombal, M. (2017). Ciclo Celular. Agosto 2018, de Universidad de Vigo Sitio web: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/atlas-celula-08-ciclo-celular.pdf>
64. Medina, E., Martínez, R. (2009). *Fundamentos de oncología*. CDMX: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, 611
65. Miguelañes, B. (2008). Muerte celular. Apoptosis y otras formas alternativas de muerte celular. Mayo 20, 2018, de Eusalud Sitio web: http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_01B.pdf
66. Moctezuma, C., Patiño, M. (2009). Cáncer de Pulmón. *Anales de Radiología en México*, Vol 1, pp 33-45
67. Muñoz, D., Cuca, L. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, Vol. 20 No. 3, pp 101-146.
68. Narasimhan, T., Harindranath, N., Premlata, S. (1985) Toxicity of the sesquiterpene lactone Parthenin to cultured bovine kidney cells, *Planta Med.*, pp 194-197

69. NIH. Instituto Nacional del Cáncer (2017) Tratamiento del cáncer. Sitio Web: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
70. OMPI. Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (2015). La propiedad intelectual y los conocimientos médicos tradicionales. Sitio web: https://www.wipo.int/edocs/pubdocs/es/wipo_pub_tk_6.pdf
71. OMS (2018) Cáncer Nota descriptiva. Sitio web: <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
72. Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer. Agosto, 06, 2018, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
73. Oropesa, M., Fernandez, A. y Sanchez, J. (2015). Vida tras la muerte celular. Agosto,06,2018, de Investigación Y Ciencia
74. Ortega, C., Diaz, M., Avalos, A., Vergara, M., Rosales, A. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. Gaceta Medica Mexicana, Vol. 137 No. 6, pp 563-577.
75. Ouchen, F. (2008). Neoplasias. Definiciones. Nomenclatura. Características Sitio web: http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_14.pdf
76. Palacios, E., Miró, M. & Boticario, C. (2011). Muerte celular y cáncer: las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. Anales de la Real Academia de Doctores de España, Vol.15 No. 2, pp. 191-215.
77. Parra, D., Ancizar, F. (2002). Evaluación in vitro de actividad antitumoral de compuestos de origen natural y sintético sobre líneas celulares neoplásicas humanas.. Agosto 2018, de Departamento de Farmacia. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sitio web: <http://www.geociencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/tesis/EVALUACION%202.pdf>
78. Pan, E., Gorka, A., Alumasa, J., Brodie, P. (2011) Antiplasmodial and antiproliferative pseudoguaianolides of *Athrosima proteiforme* from de madagascar dry forest. Nat. Prod., 74, pp 2174-2180
79. Peña, Y., Maceo, M., Ávila, D., Utria, L. (2017). Factores de riesgo para padecer cáncer de mama en la población femenina. Revista Finlay, Vol.7 No. 4, pp 283-289.
80. Pérez, J. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. Mayo 20, 2018, de Medigraphic Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revciemedhab/cmh-2012/cmh122o.pdf>
81. Picman, A. (1986). Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. Biochemical Systematics and Ecology, 14, pp. 255-281. Agosto 2018
82. Polín, Livier (2006). Aislamiento, caracterización y determinación cuantitativa de la Partenina en los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, Linn. (Tesis de licenciatura) Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Santa Clara.
83. Ramos, A., Rivero, R., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, A. (2001). Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. Mutation Research, pp. 514, 19-27
84. Reynoso, N. (2014). El cáncer en México: propuestas para su control. salud pública de México, Vol. 56, No. 5, pp 418-420.
85. Reynoso, N., Torres, J.. (2018). Epidemiología del Cáncer en México: Carga Global y Proyecciones 2000-2020. Revista Latinoamericana de Medicina Conductual, Vol.8 No.1

86. Ruiz, E. y Suarez, M. (2015). Lactonas Sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Agosto,06,2018, de Revista CENIC Ciencias Biológicas
87. Salinas, A., Juárez, A., Mathiew, A., Guzmán, F. (2014). Cáncer de mama en México: tendencia en los últimos 10 años de la incidencia y edad al diagnóstico. Revista de Investigación Clínica, Vol. 66 No. 33, pp 210-217.
88. Santillán, M. (2012). El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia. Agosto 2018, de UNAM Sitio web: [http://ciencia.unam.mx/leer/97/El uso tradicional de las plantas medicinales un aporte para la ciencia](http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales_un_aporte_para_la_ciencia)
89. Scotti, M (2007) Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. Bioorg Med Chem, pp 2927-2934.
90. Sosa, E. y García, F. (Abril-Junio 2013). Panorama epidemiológico del cáncer en México. Revista Mexicana de Anestesiología, Vol. 36. Supl. 1, pp 130-132.
91. Sosa, M., Tonn, C., Guerreiro, E., Giordano, O. (1995). Toxicidad de lactonas sesquiterpénicas sobre larvas de *tenebrio molitor* (coleoptera: tenebrionida. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 54, pp 83-88.
92. Torres, K.& Madrid, V. (2015). El virus de papiloma humano y el cáncer cervicouterino en México: una lucha continua. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 53, pp 118-120.
93. UNAM. (2009). Escobilla o hierba de la hormiga. Agosto,06,2018, de Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana Sitio web: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Escobilla o hierba de la hormiga&iid=7530](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Escobilla_o_hierba_de_la_hormiga&iid=7530)

Apéndice

Extracción de la Hymenina

796g de planta seca (*Parthenium hysterophorus*) se maceraron con EtOH, se obtuvo un macerado que se lavó con hexano para obtener un aceite 40.7g, a continuación, se disolvió en CH₃CH₂, para ser eluido en placa preparativa de Si gel. Las fracciones eluidas con C₆H₆-AcOEt, fueron recristalizadas hasta obtener la Hymenina la cual se corroboró mediante RMN y HPLC-MS.

Preparación de reactivos

- **Medio de cultivo RPMI-1640**

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2 g

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 con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado con vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero de neonato. Se almacena a 4°C.

- **Desactivación del suero**

El suero de ternera neonatada se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca en baño maría a 56°C durante 30 minutos.

- **Verseno**

Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Una vez disueltos completamente se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 mL con agua bidestilada. El verseno se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C.

La solución fue utilizada para desprender los cultivos de las líneas HeLa y CaSki.

- **Tripsina**

La tripsina se utilizó para el desprendimiento de la línea celular ViBo.

Es preparada al 0.05% en verseno en condiciones estériles.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2.16 g
Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.0 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g

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 filtra por medio de membranas con diámetro de 22 μ m. La solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C.

- **Glutaraldehído**

Se utilizan 1.57 mL de Glutaraldehído (70% v/v) se agregan 98.43 mL de agua bidestilada.

- **Solución de Cristal Violeta**

Hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A)	4.28 g
Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A)	1.0 g

Se preparan 500 mL de Cristal Violeta en una concentración de 0.1%

Previamente se prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el Cristal Violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

- **Solución de ácido acético**

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

- **Paraformaldehído**

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

- **Camptotecina**

Se disuelven 5 mg de camptotecina en 1 mL de DMSO. Se almacena a temperatura ambiente.