



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en diferenciación celular y cáncer
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer
Laboratorio No.6, 2º piso, UMIEZ

*Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del
compuesto Glaucolide E en líneas celulares tumorales*

T E S I S

Para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta

Romero Morales Beatriz Tonantzin

Director de tesis

Dr. Fernando Flores Guzmán*

*The University of Chicago Medicine & Biological Sciences

Asesor Interno: Dr. Luis Sánchez Sánchez

CDMX 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **ROMERO MORALES BEATRIZ TONANTZIN**, con número de cuenta **313052561**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **18 de febrero de 2020** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

VOCAL Dr. FERNANDO FLORES GUZMÁN*

SECRETARIO Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE Dra. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

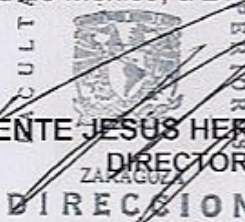
El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto Glaucolide E en líneas celulares tumorales.**

Opción de titulación: Tesis

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 21 de enero de 2020

DR. VICENTE JESUS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR
DIRECCIÓN



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

V.O. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

Las células cancerosas pueden crecer más rápido y adaptarse mejor, son una versión más perfecta de nosotros mismos.

-S. Mukherjee

Agradecimientos

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

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Al Dr. Fernando Flores Guzmán, por todas sus enseñanzas sobre lo que significa ser biólogo, por todas las aportaciones que le hizo a mi trabajo y por la paciencia brindada. Gracias por permitirme crecer como alumna e investigadora.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por aceptarme en su equipo de trabajo, por sus consejos, por confiar en mí y por acercarme a la investigación.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por ayudarme a resolver mis dudas y ser una inspiración para mi y para los futuros biólogos.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por toda su paciencia la cual fue fundamental para resolver mis dudas, por ayudarme a mejorar como persona y como profesional pero sobre todo por inspirarme a ser siempre mejor.

A la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez por sus observaciones y correcciones realizadas a este trabajo.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por ayudarme a resolver mis dudas y guiarme siempre en este camino profesional.

Al M. en C. Israel Muñoz Velasco por el apoyo técnico.

Esta tesis fue realizada con apoyo de los proyectos

PAPIIT IN216718 y IN220916

CONACyT 255881 y 253979

Dedicatorias

A mis padres, Luisa y Jesus, por todo su apoyo y amor, sin ustedes llegar a este punto de mi vida no habría sido posible. Este trabajo es por y para ustedes con todo el amor y la gratitud que se merecen. Gracias por ser mi motor todos los días, los amo.

A mi tías, Hermila, Antonia y Amelia, por estar siempre motivándome y ser mis segundas mamás, nunca encontraré la forma de agradecerles todo lo que me dan.

A mi hermana, Monserrat, y mis primos Violeta, Alejandra y David, sin duda los mejores momentos siempre son a su lado.

A mi mayor fuente de alegría, Ashley, Aime, Andreé, Karim y Nahomy.

A mi mejor amigo durante la carrera, sólo tú sabes cuánto amo la biología, gracias por todo Victor.

A mis maestros, Fer y Vicente, gracias por toda la paciencia que me dieron y por inspirarme cada día a ser una mejor bióloga, siempre les daré miles de abrazos de agradecimiento.

A Helena y Mónica, porque somos el mejor equipo y seguiremos creciendo para ser siempre las mejores, gracias por meterme al mundo de la biología molecular.

A mi familia de laboratorio, Helena, Mónica, Karen, Jorge, Conejo, Ulises, Fer y Uriel.

A Jorge, por siempre estar ahí y ayudarme a justipreciar mis acciones.

A Fer, porque sé que siempre estaremos *buscándonos*.

Índice	
1. Resumen	8
2. Marco teórico	9
2.1. La célula	9
2.2. Ciclo celular	9
2.3. Muerte celular	11
2.3.1. Necrosis	13
2.3.2. Apoptosis	14
2.4. Cáncer	18
2.4.1. Cáncer de mama	19
2.4.2. Cáncer cervicouterino	20
2.4.3. Cáncer de colon	21
2.5. Tratamientos	21
2.5.1. Cirugía	21
2.5.2. Radioterapia	22
2.5.3. Quimioterapia	22
2.6. Lactonas sesquiterpénicas	23
2.6.1. Glucólidos	27
2.6.2. Glucolide E	28
3. Planteamiento del problema	30
4. Justificación	31
5. Hipótesis	32
6. Objetivos	33
7. Metodología	35

8. Resultados	43
9. Discusión	59
10. Conclusión	63
11. Referencias	64
12. Apéndice	75

1. Resumen

El cáncer es una enfermedad con altas tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial. En México, es la tercera causa de muerte y dentro de los cánceres con mayor incidencia se encuentran el cáncer de mama, el cáncer cervicouterino y el cáncer colorrectal. Los actuales tratamientos contra el cáncer suelen ser poco eficientes, además de ocasionar diversos efectos secundarios debido a que afectan a células con altas tasas de división celular, disminuyendo la calidad de vida de los pacientes, por lo que es importante la búsqueda de compuestos que puedan ser selectivos. Al respecto, los compuestos de origen natural han tomado gran relevancia debido a sus múltiples propiedades biológicas de aplicación terapéutica. Dentro de éstos, las lactonas sesquiterpénicas han sobresalido debido a su potencial uso antitumoral. El Glaucólido E, es una lactona sesquiterpénica cuya actividad antitumoral no ha sido evaluada, por esta razón, en el presente trabajo se evaluó su actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica en las líneas CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT, provenientes de cáncer cervicouterino, mama y colon respectivamente, obteniéndose que el Glaucólido E afectó el potencial proliferativo de las líneas tumorales de manera dependiente de la dosis presentando una disminución de proliferación media (IC_{50}) de 9.91, 6.7 y 6.9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La baja o nula actividad de LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con el Glaucólido E indica que a dichas concentraciones no se presenta actividad necrótica, sin embargo, el hecho de inducir en las tres líneas tumorales morfología apoptótica, así como, el de estimular en éstas la presencia de la caspasa 3 activa, evaluada por microscopia de epifluorescencia y determinando las células positivas a ésta por citometría de flujo, sugiere que las células tumorales son eliminadas mediante un proceso apoptótico. Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que el Glaucólido E afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas de un 17 a 48%, con una actividad necrótica menor al 20% y una positividad de las células linfocíticas a la caspasa 3 activa de un 12 a 17%, sin embargo, se requiere de estudios en otros tipos celulares normales para confirmar si este compuesto presenta acción selectiva. Tomando todos los resultados, se concluye que el Glaucólido E presenta actividad antiproliferativa y apoptótica, con baja actividad necrótica tanto en células tumorales así como en células no tumorales. La baja actividad necrótica de el Glaucólido E hace de este compuesto un digno candidato para ser estudiado como un agente antitumoral con posible aplicación terapéutica.

2. Marco teórico

2.1 La célula

La célula es la unidad estructural y funcional de todos los organismos vivos (Curtis *et al.*, 2011; De la Garza & Juárez-Sánchez, 2014), y se considera la unidad de organización más pequeña que puede manifestar las propiedades del ser vivo, constituyendo tanto las formas de vida unicelulares como pluricelulares (Maillet, 2003; Campbell & Paradise, 2016).

Las células son estructuras complejas y variadas capaces no sólo de autorreplicarse sino que también responden a diferentes señales intracelulares y extracelulares que les permiten sobrevivir, crecer, diferenciarse o morir, de esta forma pueden realizar una amplia gama de tareas especializadas en organismos pluricelulares (Cooper & Hausman, 2008; Alberts *et al.*, 2015). En células eucarióticas somáticas, se lleva a cabo un estricto control de regulación de división celular, denominado ciclo celular.

2.2 Ciclo celular

El ciclo celular 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 (López-Marure, 2003), y es el mecanismo esencial por el cual todos los seres vivos se reproducen, además de mantener la homeostasis en los tejidos reponiendo aquellas células somáticas que mueren (Alberts *et al.*, 2015).

La función más básica del ciclo celular es duplicar el ADN que conforma los cromosomas y luego segregarlo en copias iguales en dos células hijas genéticamente idénticas a la célula madre. (Alberts *et al.*, 2015). De manera simplificada, el ciclo celular se divide en dos etapas: mitosis (M), que incluye el proceso de división nuclear y la citocinesis entendida como la división del contenido citoplasmático y organelos; e interfase, el interludio entre dos fases M y durante la cual ocurre la duplicación cromosómica denominada fase S (S para la síntesis de ADN en el que se duplican las cromátides hermanas de cada par de cromosomas homólogos) (Vermeulen *et al.*,

2003; Alberts *et al.*, 2015), estos procesos definen las dos fases principales del ciclo celular.

Sin embargo, la mayoría de las células requieren mucho más tiempo para crecer y duplicar su masa de proteínas y orgánulos de lo que necesitan para duplicar sus cromosomas y dividirlos, por lo que, para permitir tiempo para el crecimiento, la mayoría de los ciclos celulares poseen fases gap: una fase G1 entre la fase M y la fase S, y una fase G2 entre la fase S y la mitosis (Alberts *et al.*, 2015), en estas fases de crecimiento se sintetizan macromoléculas celulares que incluyen proteínas, ARN y membranas (Poon, 2016). Por lo tanto, el ciclo celular en células eucariotas se divide tradicionalmente en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M. En donde G1, S y G2 juntos se denominan interfase (Alberts *et al.*, 2015). Existe una fase fuera del ciclo celular llamada G0 en donde las células se encuentran en un estado quiescente no proliferativo (López-Marure, 2003).

La transición de una fase del ciclo celular a otra ocurre de manera ordenada y está regulada por diferentes proteínas celulares (Vermeulen *et al.*, 2003), de éstas se destacan las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y sus subunidades activadoras las ciclinas (Quezada, 2007) que actúan en conjunto en cada una de las fases del ciclo. De esta manera, la ciclina D-CDK4, la ciclina D-CDK6 y la ciclina E-CDK2 conducen la progresión de G1 a través del punto de restricción, lo que compromete a la célula a completar el ciclo. La fase S es iniciada por la ciclina A-CDK2, y la ciclina B-CDK1 regula la progresión a través de G2 y la entrada en la mitosis (Figura 1) (Williams & Stoeber, 2012).

Sin embargo, el control desregulado del ciclo celular es un aspecto fundamental del cáncer, debido a que en las células tumorales se acumulan mutaciones que activan protooncogenes que a su vez dan como resultado una señalización mitogénica constitutiva, es decir, señales que promueven la división celular y respuestas biológicas anormales a las señales antimitogénicas, las cuales conducen al desarrollo de una proliferación sin control (Malumbres & Barbacid, 2009; Nakayama & Nakayama, 2006).

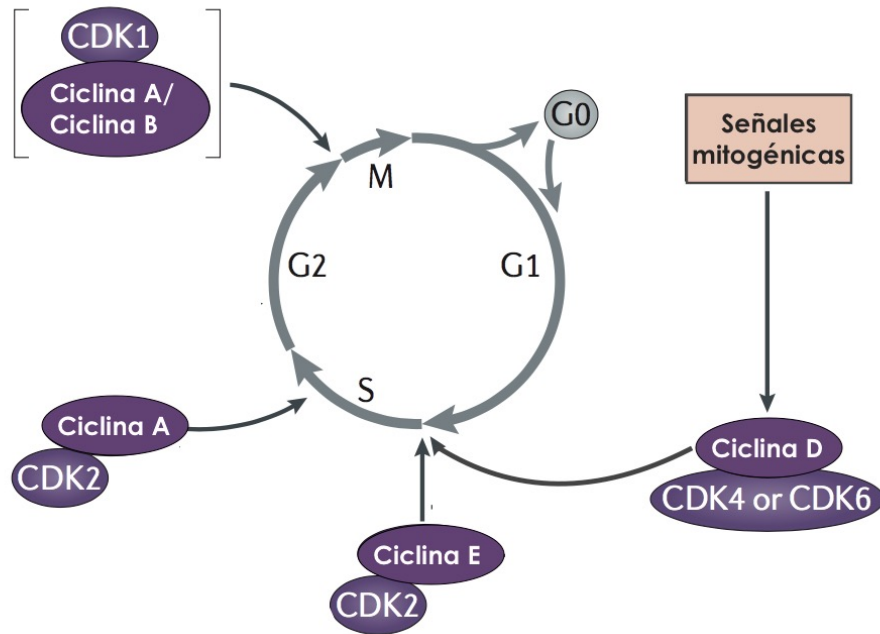


Figura 1. Ciclo celular: Fase G1, crecimiento celular; fase S, duplicación del ADN; fase G2, preparación para fase M y fase M, división del núcleo y citocinesis; y las proteínas que intervienen en su regulación. Tomada y modificada de Otto & Sicinsky (2017).

También es importante destacar que en los organismos multicelulares, la tasa de división celular está también regulado a procesos de muerte celular.

2.3 Muerte celular

El crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares no solo depende de la producción de células, sino también de los mecanismos para destruirlas (Alberts *et al.*, 2015), por lo que la muerte celular es un proceso crítico y activo que involucra factores o vías moleculares complejas que permiten mantener la homeostasis de los tejidos y eliminar células potencialmente dañinas para controlar enfermedades en organismos multicelulares (Green & Llambi, 2015; Ranjan & Iwakuma, 2016).

Las células se rigen en un proceso de muerte celular que es reversible hasta que se traspasa un denominado “punto de no retorno”. Se ha propuesto que este paso podría representarse mediante la activación masiva de caspasas, la pérdida de la integridad de la membrana externa mitocondrial o la exposición de residuos de fosfatidilserina que emiten señales para las células vecinas normales las fagociten, sin embargo, el

concepto de un punto de restricción para la muerte celular aún no se ha definido específicamente (Kroemer *et al.*, 2009).

En ausencia de un evento bioquímico claramente definido que pueda considerarse como el punto de no retorno, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD, por sus siglas en inglés) propone que una célula se considere muerta cuando se cumpla cualquiera de los siguientes criterios moleculares o morfológicos: la célula ha perdido la integridad de su membrana plasmática, la célula, incluido su núcleo, ha sufrido una fragmentación completa en cuerpos discretos "cuerpos apoptóticos" y/o su cadáver (o sus fragmentos) ha sido engullido por una célula adyacente (Kroemer *et al.*, 2005).

Históricamente se ha clasificado a la muerte celular en tres tipos morfológicamente distintos: apoptosis (muerte celular tipo I), muerte celular autofágica (tipo II) y necrosis (tipo III) (Shimizu *et al.*, 2014), las cuales pueden ejecutarse a través de vías de señalización distintas y, a veces, superpuestas, que participan en la respuesta a estímulos específicos (Green & Llambi, 2015). Sin embargo, la podemos discutir en dos modos: apoptosis, una forma programada y controlada de muerte celular, y necrosis, una forma desordenada y accidental de muerte celular (Kanduc *et al.*, 2002), cuyas morfologías son ampliamente distinguibles (Figura 2).

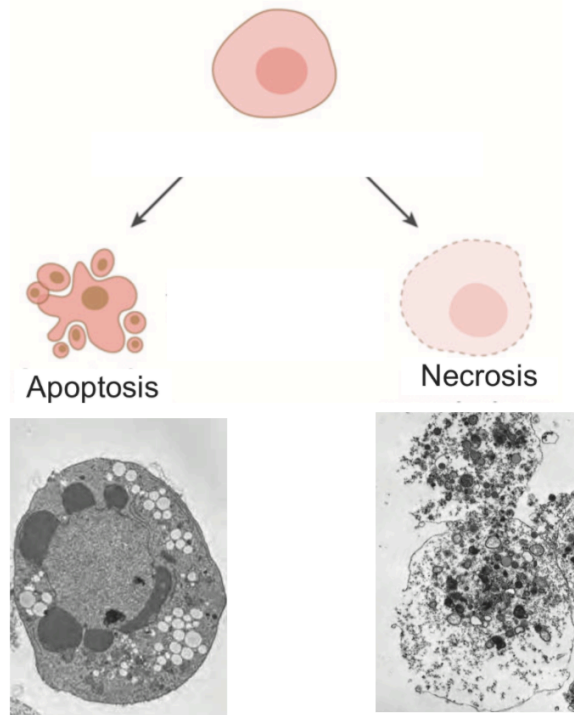


Figura 2. Diferencia morfológica entre apoptosis y necrosis. En la apoptosis se forman cuerpos apoptóticos los cuales proceden de la membrana celular así como fragmentación del ADN. En la necrosis se observa ruptura de la membrana celular con la consecuente liberación del contenido citoplasmático. Tomado y modificado de Galluzi *et al.*, (2018) & Alberts *et al.*, (2015).

2.3.1 Necrosis

La necrosis celular o muerte celular necrótica abarca una amplia variedad de procesos de muerte celular con un denominador común: la pérdida de la integridad de la membrana plasmática seguida de una fuga citoplásmica (Yuan & Kroemer, 2010). Es una alternativa a la muerte celular apoptótica y se considera un proceso en el que la célula es una víctima pasiva y sigue un modo de muerte independiente de la energía (Elmore, 2007), por lo que es considerada la muerte patológica de las células y tejidos del organismo (Lizarbe, 2007).

La apariencia morfológica de la necrosis es a menudo la de la oncosis, es decir, una morfología de muerte celular con hinchamiento citoplásmico, rotura mecánica de la membrana plasmática, dilatación de orgánulos citoplásmicos (mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi), así como condensación moderada de la cromatina (Kroemer *et al.*, 2005), además de una fragmentación inespecífica del ADN y su culminación con la salida del material intracelular al espacio extracelular atrayendo a

células del sistema inmune lo que genera un proceso inflamatorio (Ramírez-Agudelo & Rojas-López, 2010; Elena, 2002).

La necrosis puede ocurrir simplemente como consecuencia de un daño tan extenso que la integridad celular se ve alterada o por estrés mecánico (Green & Llambi, 2015), el cual puede ser ocasionado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere caída de ATP (Elena, 2002).

2.3.2 Apoptosis

La apoptosis es un programa codificado genéticamente que conduce a la muerte celular (Tait & Green, 2010), este tipo de muerte es altamente programado, por lo que juega un papel crítico en el desarrollo y la homeostasis en los tejidos normales, debido a que contribuye a la eliminación de células no deseadas y aquellas que han sido dañadas, con el objetivo de mantener el equilibrio entre la supervivencia celular y la muerte celular en metazoos (Hassan *et al.*, 2014).

El proceso de muerte celular programada, o apoptosis, se caracteriza generalmente por características morfológicas distintas a otros tipos de muerte celular y mecanismos bioquímicos dependientes de la energía (Elmore, 2007).

Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por la contracción celular, que involucra el redondeo de la célula, la retracción de los pseudópodos y la reducción del volumen celular, además de condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y fragmentación del ADN internucleosómico, poca o ninguna modificación ultraestructural de orgánulos citoplásmicos, ampollas en la membrana plasmática y mantenimiento de una membrana plasmática intacta hasta las últimas etapas del proceso, debido a que la célula muerta se empaqueta en cuerpos apoptóticos unidos a la membrana, que son engullidos y eliminados por las células vecinas o los fagocitos residentes en el tejido (Kroemer *et al.*, 2005; Ashkenazi & Salvesen, 2014).

En cuanto a sus mecanismos bioquímicos, la apoptosis generalmente se considera una muerte celular programada mediada por caspasas (Chen *et al.*, 2018), debido a que son éstas los componentes centrales de la respuesta apoptótica (Riedl & Shi, 2004).

Las caspasas son una familia conservada de cisteína proteasas que se escinden después de un residuo de aspartato en sus sustratos (Shi, 2002), organizando la apoptosis a través de la escisión de numerosas proteínas críticas estructural y funcionalmente dentro de la célula, conduciendo así al desensamblaje celular (Tait & Green, 2010; Ashkenazi & Salvesen, 2014; Schultz & Harrington, 2003).

Las caspasas son fundamentales para el mecanismo de apoptosis y generalmente se clasifican en dos categorías, las iniciadoras (caspasa 2, 8, 9 y 10, principalmente responsables del inicio de la vía apoptótica) y las caspasas efectoras o ejecutoras (caspasa 3, 6 y 7, responsable de la división definitiva de los componentes celulares) (Shi, 2002; Pistritto *et al.*, 2016).

Existen dos vías de señalización principales que desencadenan la muerte celular apoptótica: la vía mitocondrial (la intrínseca) y la vía del receptor de muerte (la extrínseca) (Green & Llambi, 2015), estas vías conducen a la activación de caspasa 3 (Majtnerová & Roušar, 2018), debido a que puede considerarse la principal caspasa ejecutora y sello distintivo de muerte celular por apoptosis (Figura 3) (Choudhary *et al.*, 2014).

2.3.2.1 Apoptosis por vía intrínseca o mitocondrial

La vía mitocondrial de la apoptosis, también llamada vía intrínseca, es el mecanismo más común de apoptosis en los vertebrados (Green & Llambi, 2015). Ésta, es activada por sensores internos en respuesta al estrés celular, como la privación de nutrientes, el daño al ADN irreparable, hipoxia, concentraciones extremadamente altas de Ca^{2+} citosólico y el estrés oxidativo severo, son algunos factores desencadenantes del inicio de la vía (Sharma *et al.*, 2019; Pistritto *et al.*, 2016).

La activación de esta vía está regulada principalmente por la familia de proteínas del linfoma de células B (BCL-2) (Sharma *et al.*, 2019), por lo que la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax, Bak) neutraliza las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1, lo que conduce a la modificación de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial de modo que las proteínas normalmente confinadas en el espacio intermembranal se extienden al citosol. Estas

proteínas incluyen los llamados factores apoptogénicos (Pistritto *et al.*, 2016), como el *citocromo-c* que se une y activa la proteína APAF1 en el citoplasma, lo cual induce un cambio conformacional que permite que APAF1 se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación de caspasa 9 (Riedl & Shi, 2004), la cual activa a las caspasas ejecutoras, principalmente caspasa 3 (Galluzi *et al.*, 2018).

2.3.2.2 Apoptosis por vía extrínseca o del receptor de muerte

La vía extrínseca es iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular detectado por receptores de membrana plasmática (Galluzi *et al.*, 2018) como son receptores de muerte de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) como Fas, receptor de TNF1, receptores de ligando inductor de apoptosis (TRAIL) relacionados con TNF, entre otros, ubicados en la superficie celular (Sharma *et al.*, 2019). Tras la estimulación del receptor de muerte por su ligando correspondiente, el mismo receptor se somete a oligomerización y un cambio conformacional para revelar su dominio de muerte citoplasmático que en conjunto con proteínas adaptadoras (FADD/TRADD) retienen al iniciador procaspasa 8 lo que da como resultado la formación del denominado complejo de señalización inductor de muerte (DISC), aumentando la concentración local de procaspasa 8 y promoviendo la autoactivación (Pistritto *et al.*, 2016), por lo que una vez activada caspasa 8, ésta activará a las caspasas ejecutoras, principalmente caspasa 3 (Galluzi *et al.*, 2018).

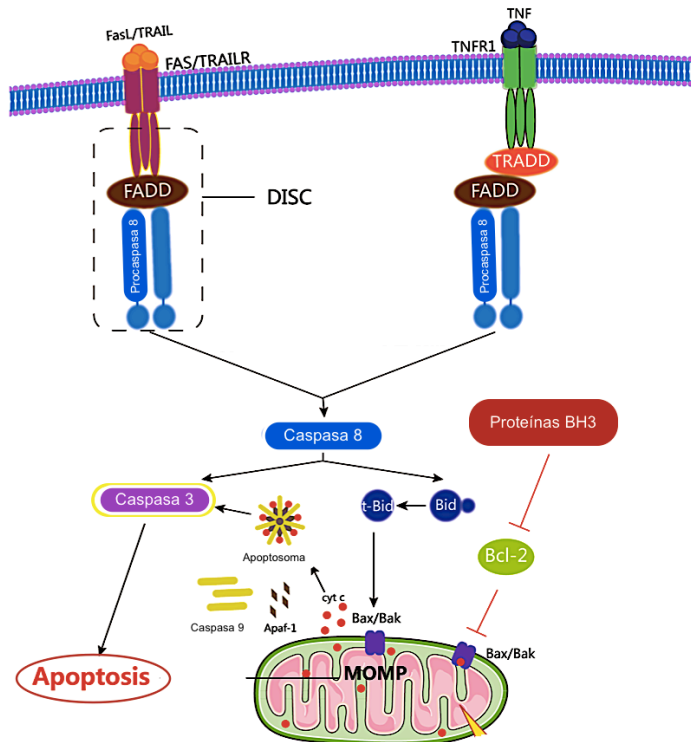


Figura 3. Vías de muerte en el proceso apoptótico. La vía extrínseca se inicia por receptores de membrana (por ejemplo, por el receptor de FAS) y por medio de la activación de la caspasa 8; mientras que la vía intrínseca (o mitocondrial) se inicia por la activación de la caspasa 9. Ambas vías confluyen en activar la enzima ejecutora de la apoptosis, la caspasa 3. Tomado y modificado de Chen *et al.*, (2018).

La desregulación de la apoptosis está implicada en la patogénesis de varias enfermedades, como el cáncer, que se caracteriza por la acumulación de células que exhiben un compromiso insuficiente de activar la maquinaria apoptótica y la evasión de la apoptosis (Sharma *et al.*, 2019), permitiendo que las células neoplásicas sobrevivan, pese a la presencia de señales de regulación, durante la vida útil prevista, subvirtiendo la necesidad de factores de supervivencia exógenos y brindando protección contra el estrés oxidativo y la hipoxia a medida que la masa tumoral se incrementa y se expande. Esto da tiempo para la acumulación de alteraciones genéticas adicionales que desregulan la proliferación celular, interfieren con la diferenciación, promueven la angiogénesis, responden a proteínas exógenas como las citocinas y aumentan la invasividad durante la progresión del tumor (Hassan *et al.*, 2014).

2.4 Cáncer

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos (De la Garza & Juárez-Sánchez, 2014). El daño mecánico invasivo de las células tumorales, destruye tejidos y órganos, nulificando la morfofisiología de dicho órgano ocasionando que sea la segunda causa de mortalidad en el mundo. Por lo que en la actualidad es un importante problema de salud (Hassanpour & Dehghani 2017).

El cáncer posee tantas manifestaciones diferentes como tejidos y tipos de células en el cuerpo humano, involucrando innumerables agentes cancerígenos endógenos o exógenos (Coleman & Tsongalis, 2017), sin embargo, se reconoce que las células cancerosas son células normales que acumulan una serie de mutaciones sucesivas en los genes (Melford, 2018) las cuales cambian las funciones celulares. Estas alteraciones afectan el ciclo celular y conducen a una proliferación anormal de las células (Hassanpour & Dehghani 2017).

Las diferentes formas de cáncer comparten mecanismos moleculares comunes, que implica la pérdida, mutación o desregulación de genes que regulan positiva y negativamente las funciones celulares, generalmente clasificados como protooncogenes y supresores de tumores (Coleman & Tsongalis, 2017), es por esto que, Hanahan & Weinberg (2000), propusieron algunas características o sellos distintivos del cáncer que permiten comprender la compleja biología del cáncer, entre los que se incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de los supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y la metástasis. Posteriormente, Hanahan & Weinberg (2011), añaden otras características que son la inestabilidad genómica, la inflamación, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción por la respuesta inmune antitumoral. Estas características han demostrado ser fundamentales en nuestra comprensión de los rasgos comunes del cáncer y, por lo tanto, en el diseño de futuros medicamentos mucho más efectivos y selectivos (Fouad & Aanei, 2017). A continuación se describen los tres tipos de cáncer predominantes en la población mexicana: cáncer de mama, cervicouterino y de colon.

2.4.1 Cáncer de mama

En la mama hay una glándula mamaria, la cual tiene entre 15 y 20 lóbulos separados por una cantidad variable de tejido adiposo. En cada lóbulo hay varios compartimientos más pequeños llamados lobulillos, compuestos por racimos de glándulas secretoras de leche denominados alvéolos insertos en el tejido conectivo. Las contracciones de las células mioepiteliales alrededor de los alvéolos ayudan a propulsar la leche hacia los pezones; cuando se produce la leche, viaja desde los alvéolos hacia una serie de túbulos secundarios y luego, hacia adentro de los conductos mamarios. Cerca del pezón, los conductos mamarios se expanden ligeramente y forman senos llamados senos lactíferos, donde se puede almacenar leche antes de ser liberada al conducto galactóforo. Por lo general, cada conducto galactóforo lleva la leche desde uno de los lóbulos hacia el exterior (Tortora & Derrickson, 2018).

El carcinoma de mama se origina del epitelio de los conductos y lóbulos mamarios (Donegan & Spratt, 1982). El cáncer de mama es actualmente el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres tanto en México como de todo el mundo. Las estrategias dirigidas a eliminar el tumor primario han mejorado notablemente, pero los tratamientos sistémicos para prevenir la metástasis son menos efectivos (Redig & McAllister, 2013).

Las fases en cáncer de mama son las siguientes:

Etapa 0. Se considera benigno porque no ha roto el tejido epitelial y no ha invadido otros órganos.

Etapa I. Tumor de menos de 2cm de diámetro que no ha afectado a los ganglios ni extendido fuera de la glándula mamaria.

Etapa II. De 2 a 5 cm de diámetro que se ha extendido a menos de tres ganglios axilares.

Etapa III. Tumor de más de 5 cm, extendido a más de tres ganglios de la axila o tejidos cercanos al pecho.

Etapa IV. Tumor extendido a otros órganos (Carswell, 2002).

2.4.2 Cáncer cervicouterino

El útero tiene la forma de una pera invertida, se encuentra situado entre la vejiga y el recto y sus subdivisiones anatómicas incluyen: una porción con forma de cúpula superior a las trompas uterinas denominada fondo, una porción central estrecha denominada cuerpo y una porción angosta inferior denominada cuello que se abre a la vagina (Tortora & Derrickson, 2018). El cuello uterino está tapizado por dos tipos de epitelio, el exocervical, que es plano pavimentoso y, el endocervical, que es cilíndrico mucosecretor. El sitio de unión de estos dos epitelios se denomina zona de unión escamocolumnar y es una área dinámica sujeta a cambios constantes relacionados con la acción de las hormonas ováricas, que transforman el epitelio cilíndrico en epitelio pavimentoso (metaplasia), debido a que en esta área hay cambios muy activos se le denomina zona de transformación, y es asiento de numerosos fenómenos proliferativos y de remodelación (Alonso *et al.*, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce dos tipos histológicos principales de cáncer invasivo, el carcinoma de células escamosas, que constituye cerca del 75% de todos los casos y el adenocarcinoma que constituye cerca del 15-25% de todos los casos (Chavaro *et al.*, 2009). En México, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer (IARC, 2018), y uno de los factores más importantes asociados a este tipo de cáncer es la infección con virus del papiloma humano (VPH) cuya presencia se relaciona con algunos mecanismos de células tumorales para favorecer su proliferación y evadir la vigilancia inmunológica (Ciaran *et al.*, 2007).

Actualmente se han descrito más de 200 tipos diferentes de VPH, 30 de los cuales están relacionados con lesiones anogenitales. (Park *et al.*, 2019). En 1974 se propuso que los VPH son capaces de inducir cáncer cervicouterino y para el año de 1984 se confirmó, cuando se descubrió el ADN proveniente de los virus tipo 16 y 18 en tumores del cuello uterino (Helt & Galloway, 2003), siendo éste el causante de dicha enfermedad desde un 90% a un 100% (Crow, 2012).

2.4.3 Cáncer de colon

El colon se divide en las porciones ascendente, transversa, descendente y sigmoidea. En consonancia con su nombre, el colon ascendente asciende por el lado derecho del abdomen, llega a la superficie inferior del hígado y continua a través del abdomen como colon transversa y cursa inferiormente hasta el nivel de la cresta ilíaca con el nombre de colon descendente. El colon sigmoideo comienza cerca de la cresta ilíaca izquierda, se proyecta en dirección medial y termina como recto (Tortora & Derrickson, 2018).

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más malignas, situada en segundo lugar después del cáncer de pulmón en varones y del cáncer de mama en las mujeres (Tortora & Derrickson, 2018). La elección del régimen en el tratamiento clínico, para este tipo de cáncer, depende del grado de diferenciación tumoral. Según las características histológicas, el grado de diferenciación del cáncer de colon incluye diferenciación alta, diferenciación moderada, diferenciación baja e indiferenciación (grado I, grado II, grado III y grado IV, respectivamente) (Qi & Ding, 2018).

2.5 Tratamientos

Actualmente, la mayoría de las estrategias de tratamiento del cáncer se basan en la extirpación de la masa tumoral, principalmente mediante cirugía. Los tratamientos químicos y físicos, como la quimioterapia y la radioterapia, también han contribuido en gran medida a la inhibición del rápido crecimiento de las células malignas. Además, estos enfoques a menudo se combinan para mejorar los índices terapéuticos (Mitra *et al.*, 2015).

2.5.1 Cirugía

Se extirpa el tumor y el tejido circundante, cuando la extirpación completa del tumor no es posible o podría causar un daño excesivo al cuerpo, puede usarse la cirugía para extirpar la mayor parte posible del tumor, que puede incluir una porción del tejido, todo el órgano o varios órganos. Además, éste puede ser el único tratamiento o puede estar combinado con quimioterapia o radioterapia (De la Garza & Juárez-Sánchez, 2014).

2.5.2 Radioterapia

La radioterapia es la terapia citotóxica más efectiva disponible para el tratamiento de los cánceres sólidos localizados (Schau & McBride, 2015), este método de tratamiento consiste en la utilización de radiaciones ionizantes para destruir las células malignas y hacer desaparecer el tumor o disminuir su tamaño, aunque el efecto de la radiación provoca también daño en las células normales (De la Garza & Juárez-Sánchez, 2014). Hay dos tipos de tratamientos de radiación que se usan actualmente: radiación de haz externo y radiación interna, llamada braquiterapia (Abshire & Lang, 2018).

La radiación sola, o en combinación con otras modalidades de tratamiento, produce mejoras significativas en las tasas de curación del tumor (Abshire & Lang, 2018).

Sin embargo, si la radioterapia es demasiado agresiva, también puede desencadenar cáncer, debido a que promueve mutaciones en células normales. Por lo tanto, puede resultar contraproducente. Además, los efectos secundarios son diversos, como la destrucción de células del folículo piloso y eliminación de células de la médula ósea. Esto lleva a la caída del cabello y recurrencia a infecciones.

2.5.3 Quimioterapia

La quimioterapia es un tipo de tratamiento que utiliza fármacos con la intención de destruir las células cancerosas (Macarulla *et al.*, 2009), la mayoría de los fármacos antineoplásicos actúan sobre el proceso de síntesis de ADN dentro de la célula cancerosa, y es por ello que la selectividad de estos medicamentos para las células cancerosas en comparación con los tejidos normales está determinada por la tasa de síntesis de ADN y la división celular (Waller & Sampson, 2018). Se conoce un gran número de estos fármacos, que por su naturaleza se clasifican en naturales, sintéticos y semisintéticos, y por su mecanismo de acción se dividen en citotóxicos y citostáticos (De la Garza & Juárez-Sánchez, 2014).

El método más simple y fácilmente disponible para administrar la quimioterapia es mediante administración sistémica, pero en algunas situaciones, se puede lograr un mayor impacto de la quimioterapia al administrar una dosis más concentrada de

agentes anticancerosos directamente en la región que contiene el cáncer (Aigner & Stephens, 2016)

Apesar de que el tratamiento del cáncer se fundamenta en tres pilares considerados ortodoxos: cirugía, radioterapia y quimioterapia, otras posibilidades de tratamiento incluyen la hormonoterapia, la inmunoterapia, las dianas o blancos terapéuticos no citotóxicos y el trasplante de médula ósea (De la Garza & Juárez-Sánchez, 2014).

En la actualidad, se utiliza la combinación de la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (mono o multidrogas). Sin embargo, no se logra curar o extender la vida de pacientes con cáncer avanzado, además de acarrear diversos efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes debido a que se destruyen aquellas células que están en división celular tanto tumorales como normales. En consecuencia, resulta primordial buscar nuevos compuestos que presenten además de actividad antitumoral, una baja actividad necrótica y selectividad, con el objetivo de no afectar a las células normales con alto índice de mitosis, como las células de la médula ósea, del folículo piloso y epitelio intestinal. Al respecto, las lactonas sesquiterpénicas han llamado la atención debido a sus propiedades antitumorales.

2.6 Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son representativas de un gran número de productos naturales que contienen 15 carbonos con una incorporación común de tres grupos isoprenilo dispuestos en varios sistemas de anillos característicos, que incluyen uno o más anillos de lactona (Ren *et al.*, 2016). Se encuentran presentes en aproximadamente 16 familias de plantas, sin embargo, prevalecen en la familia Asteraceae, donde se pueden encontrar en casi todos los géneros, especialmente en *Artemisia*, *Árnica*, *Ambrosia*, *Helenium*, *Tanacetum* y *Vernonia* (Ivanescu *et al.*, 2015).

Las lactonas sesquiterpénicas pueden clasificarse a partir de su esqueleto carbo-cíclico en varios grupos: germacranólidos, eudesmanólidos, eremofilanólidos, guaianólidos, pseudoguaianólidos y hipocretenólidos (Ghantous *et al.*, 2010), sin embargo, los germacranólidos, guaianólidos, pseudoguaianólidos y eudesmanólidos son las clases más representativas (Figura 4). Los eudesmanólidos tienen dos anillos fusionados de 6

miembros; los germacranólidos tienen un anillo de 10 miembros; los guaianólidos tienen un anillo de 7 miembros, un anillo de 5 miembros y un grupo metilo en C-4; los pseudoguaianólidos tienen un anillo de 7 miembros, un anillo de 5 miembros y un grupo metilo en C-5. Todos contienen un grupo de lactona de 5 miembros fusionados (γ lactona) con un resto carbonilo en la posición alfa (Chadwick *et al.*, 2013).

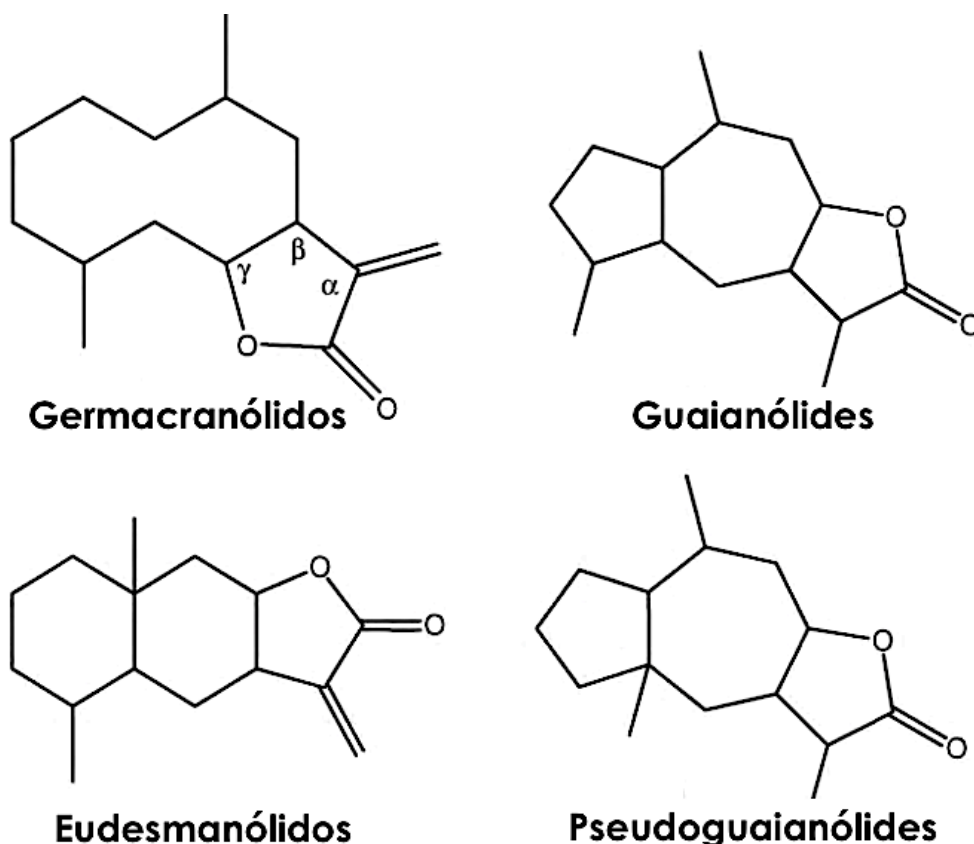


Figura 4. Grupos más representativos de las lactonas sesquiterpénicas. Tomado y modificado de Ghantous *et al.*, (2010).

Estos compuestos son los constituyentes activos de una variedad de plantas, utilizadas frecuentemente como remedios herbales, por lo que presentan una amplia gama de actividades biológicas, basadas principalmente en sus capacidades de alquilación, que subyacen en su potencial terapéutico (Amorim *et al.*, 2013). Se les han atribuido sus actividades biológicas principalmte a tres características químicas: su reactividad del centro alquilante, su cadena lateral y lipofilicidad y su geometría molecular y características electrónicas (Ghantous *et al.*, 2010)

Dentro de las diversas bioactividades realizadas por las lactonas sesquiterpénicas se incluye la citotoxicidad de las células cancerosas y la eficacia antineoplásica en estudios *in vivo* (Ren *et al.*, 2016). Actualmente, los fármacos derivados de las lactonas sesquiterpénicas thapsigargin, artemisinina y partenolida se encuentran en ensayos clínicos sobre cáncer (Ghantous *et al.*, 2010).

Sobre la base de las estructuras de varias lactonas sesquiterpénicas antitumorales, una serie de análogos que muestran una mayor potencia se han aislado como productos naturales o se han sintetizado parcialmente (Ren *et al.*, 2016) los cuáles son candidatos para el estudio de sus propiedades biológicas.

Los germacranólidos son el grupo más grande y precursores biogénicos de la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas (Ivanescu *et al.*, 2015), además de que son considerados como los más significativos con respecto a su función en los seres humanos (Chadwick *et al.*, 2013). A continuación se presenta una tabla de algunas lactonas sesquiterpénicas de tipo germacranólido de las cuales se ha probado su efecto citotóxico en diferentes líneas celulares tumorales.

Tabla 1. Efecto citotóxico de lactonas sesquiterpénicas de tipo germacranólido probadas en cáncer

Lactona sesquiterpénica	Línea celular	IC ₅₀	Autor	Técnica
Costunolide Tamaulipin A Tamaulipin B Elephantol Eupatocunin Vernomygdin	KB (Nasofaríngeo)	0.57 µg/mL 1.26 µg/mL 2.6 µg/mL 36 µg/mL 0.11 µg/mL 1.5 µg/mL	Scotti <i>et al.</i> , 2007	Evaluación de proteína total por el método de Fenol-Folin-Ciocalteu
Alantolactona	NCI - H1299 (Pulmón) Anip973 (Pulmón)	20 µM	Liu <i>et al.</i> , 2018	MTT

Extracto crudo de diclorometano obtenido de <i>Calea pinnatifida</i>	UACC-62 (Melanoma) MCF-7 (Mama) NCI-ADR/RES (Ovario) 786-O (Riñón) NCI-H460 (Pulmón) PC-3 (Próstata) OVCAR-3 (Ovario) HT-29 (Colon) K-562 (Leucemia)	13.77 µg/mL 204.85 µg/mL 228.58 µg/mL 8.41 µg/mL 44.22 µg/mL 24.35 µg/mL 28.08 µg/mL 50.45 µg/mL >250 µg/mL	Marchetti <i>et al.</i> , 2012	Ensayo de sulforhodamina B
Calealactone A 2,3-epoxycalactone A Calealactone B Calealactone C Calein D Juanislamin 2,3-Epoxyjuanislamin	U937 (Linfoma)	3.5 µM >5 µM >5 µM 1.0 µM >5 µM 3.0 µM 1.8 µM	Yamada <i>et al.</i> , 2004	MTT
Rufesolide A Rufesolide B Rufesolide C Rufesolide D	HT-29 (Colon)	3.0 µM 4.0 µM 1.4 µM 1.0 µM	Ren <i>et al.</i> , 2012	MTT
Tatridina A Diacetil tatridina A Tamirin Ineupatorólido	HL-60 (Leucemia)	9.8 µM 0.7 µM 5.1 µM 2.8 µM	Rivero <i>et al.</i> , 2003	MTT
Tatridina A Diacetil tatridina A Tamirin Ineupatorólido	U937 (Linfoma)	15.6 µM 4.3 µM 12.1 µM 2.6 µM	Rivero <i>et al.</i> , 2003	MTT

Eupakirunsin A Eupakirunsin C Eupakirunsin D	KB (Nasofaríngeo)	5.5 µg/mL 8.1 µg/mL 4.8 µg/mL	Shen <i>et al.</i> , 2005	Tinción con azul de metileno
Eupakirunsin A Eupakirunsin C Eupakirunsin D	HeLa (Cervicouterino)	8.9 µg/mL 7.1 µg/mL 5.8 µg/mL	Shen <i>et al.</i> , 2005	Tinción con azul de metileno
Carlipsine G Carlipsine H Cernuumolide I Cernuumolide J Incasitolide D	A549 (Pulmón)	10.3 µM 6.7 µM 5.2 µM 4.7 µM 4.0 µM	Zhu <i>et al.</i> , 2019	Kit de recuento celular 8 (CCK-8, por sus siglas en Inglés)
Carlipsine G Carlipsine H Cernuumolide I Cernuumolide J Incasitolide D	HL-60 (Leucemia)	6.2 µM 5.6 µM 5.0 µM 3.0 µM 5.9 µM	Zhu <i>et al.</i> , 2019	Kit de recuento celular 8 (CCK-8, por sus siglas en Inglés)

2.6.1 Glaucolidos

Dentro del grupo de lactonas sesquiterpénicas de tipo germacranólido se encuentran los denominados glaucolidos, cuyas propiedades antitumorales se describen a continuación.

Se ha descrito que 2-*epi*-glaucolide E, un análogo de glaucolido mostró una marginal capacidad citotóxica al tener una dosis efectiva de 50% (ED₅₀) de 9.4 µM en la línea celular de colon HT-29 y una inhibición del complejo NF-κB a una concentración mayor a 10 uM, sin embargo, se menciona que la configuración del compuesto a través de la adición de dos dobles enlaces endocíclicos condujo a la pérdida de citotoxicidad (Pan *et al.*, 2010).

Se reporta que el compuesto Glaucolide, presenta citotoxicidad en las líneas celulares tumorales HeLa, L929 y B16F10, con unas IC₅₀ después de 24 horas de tratamiento de

2.1+/-1.8 μ M para HeLa, y mayores a 100 μ M para L929 y B16F10; además, se evaluó la genotoxicidad utilizando células de médula ósea donde el compuesto causó daño a una concentración de 137+/-15 μ M y mostró una tendencia a dañar el ADN, sin embargo, no se evaluaron las propiedades mutagénicas. Además, se señala que la presencia de grupos *epoxi*, como en el glaucolide, podría estar relacionada con un efecto citotóxico más significativo respecto a otras lactonas sesquiterpénicas (Buskuhl *et al.*, 2010).

Al evaluar el glaucolide A, se sugirió que el grupo α -metileno- γ -lactona contribuye de manera importante a la actividad biológica (Dirsch *et al.*, 2000).

Un extracto de las hojas de *Vernonia pachyclada* de Madagascar mostró citotoxicidad moderada contra la línea celular de cáncer de ovario humano A2780, al purificarlo, se aislaron tres nuevas lactonas, el Glaucolide K, Glaucolide L y Glaucolide M, a las cuáles puede atribuírseles la actividad biológica (Williams *et al.*, 2005).

Para el compuesto Glaucolide B se ha reportado actividad genotóxica en linfocitos humanos (Burim *et al.*, 1999), además de que se ha utilizado como base para la obtención de un compuesto derivado llamado 5 β -hidroxi-hirsutinolida, del cuál se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica en cáncer de mama (MDA-MB-231), pulmón (SK-LU-1) y cérvix (CaSki), reportando una IC₅₀ de 18 μ g/mL en la línea celular MDA-MB-231, 15 μ g/mL en la línea celular SK-LU-1 y 30 μ g/mL en la línea celular CaSki. Además, no se reporta muerte necrótica en las líneas tumorales utilizadas e induce muerte apoptótica en las mismas (Flores-Guzmán *et al.*, 2019).

2.6.2 Glaucolide E

Muchas especies del género *Vernonia* han sido estudiados y casi todas contienen una alta cantidad de lactonas sesquiterpénicas oxigenadas, los más difundidos son los llamados glaucólidos (Zdero *et al.*, 1991).

El compuesto Glaucolide E, (1aR,3S,7R,10aS,10bS,E)-3-acetiloxi-8-(acetiloximetil)1-a,5-dimetil-9-oxo-1a,2,3,6,7,9,10a,10b,octahidrooxireno[2'3':9,10]ciclodocal[1,2-b]furan-7-ylmetacrilato) fue aislado de la especie *Vernonia liatroides*, la cual fue

recolectada en Ixtapan de la Sal, Estado de México, e identificado por métodos espectroscópicos (Campos *et al.*, 2003).

En cuanto a sus propiedades biológicas, el glaucolide E (Figura 5) se ha descrito como capaz de relajar el músculo liso uterino y aórtico (Campos *et al.*, 2003) además de ser probado contra siete cepas de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, en donde, también evaluaron su citotoxicidad para la línea celular hipodiploide epitelial de riñón de *Cercopithecus aethiops*, Vero; y la línea celular humana inmortalizada de linfocitos T, Jurkat, a través de un ensayo de viabilidad con resazurina, obteniendo una IC_{50} de $>400 \mu\text{M}$ para las células Jurkat y de $2.37 \mu\text{M}$ para las células Vero, adicionalmente se menciona que cumple con la regla de cinco de Lipinsky, indicando un adecuado perfil farmacocinético (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2019).

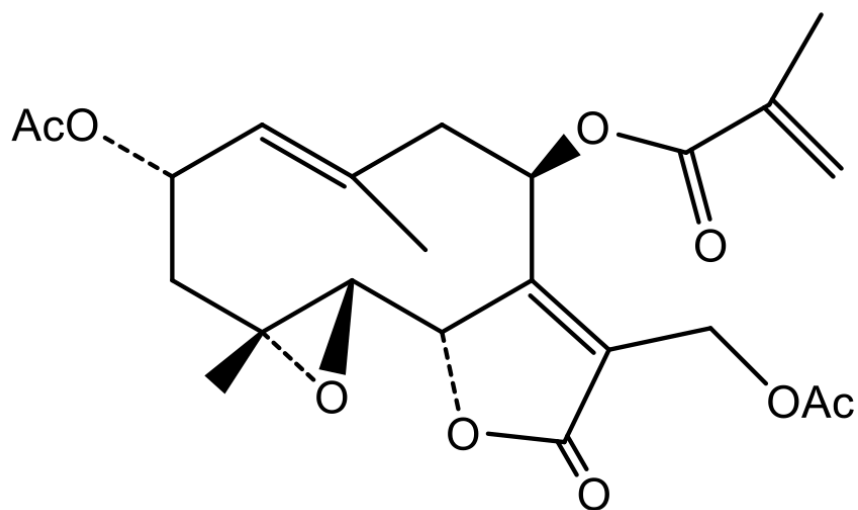


Figura 5. Estructura química del compuesto Glaucolide E

3. Planteamiento del problema

A pesar del notable desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, éste sigue siendo la segunda causa de muerte en el mundo (Gali-Muhtasib *et al.*, 2015). Además, es ampliamente conocido, que los actuales tratamientos contra el cáncer inhiben el crecimiento normal de las células no tumorales por lo que están asociadas con efectos secundarios graves y alta toxicidad, que a su vez, conducen a una baja calidad de vida (Mitra *et al.*, 2015)

En cánceres metastásicos, los regímenes de quimioterapia actualmente disponibles pueden dar lugar a varios problemas críticos, que incluyen una efectividad insuficiente, efectos adversos graves y el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos (Ren *et al.*, 2016) principalmente basados en su actividad necrótica, es por esto, que continúa la búsqueda de nuevos compuestos con capacidad antiproliferativa, inducción de muerte apoptótica y selectividad continua. En este sentido, las lactonas sesquiterpénicas se han distinguido por sus propiedades citotóxicas en diversas células tumorales *in vitro*, por lo que en este trabajo se pretende estudiar el efecto antiproliferativo y apoptótico, así como la nula o baja actividad necrótica de la lactona sesquiterpénica Glaucolide E en las líneas celulares CaSki, MDA-MD-231 y CT26-WT correspondientes a cáncer cervicouterino, mama y colon respectivamente, además de sus propiedades selectivas en células linfocíticas humanas.

4. Justificación

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la tercera en México. Dentro de los cánceres con mayor índice de mortalidad en cuanto a muerte por cáncer en las mujeres mexicanas se encuentran el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, ocupando el primer y segundo lugar respectivamente, por su parte, el cáncer colorrectal es la principal causa de muerte por cáncer en la población mexicana.

Aunado a esto, los actuales tratamientos contra el cáncer suelen ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad además de pocos selectivos, lo que conlleva al deterioro de la calidad de vida de los pacientes, es por esto que es necesario encontrar nuevos compuestos que ataquen a las células cancerosas con poco o nulo efecto necrótico en células no tumorales y en este sentido se ha encontrado que las lactonas sesquiterpénicas, como el Glaucolide E, pueden tener actividad antiproliferativa en células tumorales, por lo que resulta relevante su investigación.

5. Hipótesis

Se ha descrito que diversas lactonas sesquiterpénicas muestran actividad antitumoral en diferentes tipos celulares de cáncer, generando la posibilidad de que la lactona Glaucolide E presente actividad antiproliferativa y apoptótica en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT.

6. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la lactona Glaucolide E en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT, así como en cultivos celulares no tumorales provenientes de células linfocíticas humanas.

Objetivos particulares

- Determinar la actividad antiproliferativa de la lactona Glaucolide E, expresada como la concentración requerida del compuesto capaz de disminuir en un 50% el número celular (IC_{50}) en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT a través de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica del compuesto Glaucolide E en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT a través de la valoración de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
- Evaluar la actividad apoptótica inducida por el compuesto Glaucolide E en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT a través de la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas por contraste de fases y tinción con el fluorocromo DAPI, así como la detección de la caspasa 3 activa, mediante microscopía de epifluorescencia y la cuantificación de células positivas a esta caspasa por citometría de flujo.
- Determinar el efecto de las IC_{50} obtenidas para las líneas celulares tumorales, en la proliferación de las células linfocíticas humanas mediante el marcaje con carboxifluoresceína (CFSE).
- Determinar si las IC_{50} obtenidas para las líneas celulares tumorales, inducen muerte necrótica en células linfocíticas, mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes celulares.

- Evaluar la actividad apoptótica inducida por el compuesto Glaucolide E en células linfocíticas humanas a través de la detección de la población positiva a la caspasa 3 activa, cuantificada por citometría de flujo.

7. Metodología

7.1 Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaSki), mama (MDA-MB-231) y colon (CT26-WT) se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC) y fueron sembradas en cajas Petri de vidrio de 100 mm. Las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT se cultivaron con medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina, rojo fenol y bencilpenicilina, a 5% de suero de neonato de bovino (SNB) previamente desactivado a 57 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO₂, y una atmósfera húmeda saturante.

La línea celular CaSki positiva a VPH 16 corresponde a células humanas provenientes de carcinoma epidermoide cervicouterino, que fueron establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado (ATCC, 2012). La línea celular MDA-MB-231, son células humanas de adenocarcinoma de mama triple negativo establecido a partir de células metastásicas provenientes de un derrame pleural (ATCC, 2012). La línea celular CT26-WT es una línea celular de carcinoma de colon indiferenciado que al inocularse por vía intravenosa desarrollan metástasis pulmonar en ratones BALB/c. (ATCC, 2012).

7.2 Preparación del compuesto

En una balanza analítica se pesaron 10 mg del compuesto Glaucolide E y fue solubilizado en 100 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO), posteriormente se preparó un segundo stock tomando 10 µL de la primera preparación y se le agregaron 40 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO), teniendo una concentración de 1000 µg/50 µL. De este stock se tomaron 5µL y se añadieron 995 µL de RPMI, teniendo una concentración final de 100 µg/mL (1µg/10µL). De esta manera, la concentración de DMSO empleados en los ensayos biológicos fue menor de 0.5%.

7.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa a través de la técnica de cristal violeta

Las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 5,000 células por pozo con 100 μ L de RPMI con 5% SNB, las cuales se incubaron a 37 °C, al 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio y se trataron 6 repeticiones con las siguientes condiciones: un control testigo al cual sólo se le adicionó medio de cultivo, un control del vehículo empleado en la solubilización del compuesto (DMSO 0.5%), y diferentes concentraciones del compuesto Glaucolide E (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 μ g/mL) disuelto en medio de cultivo. Después de 24 horas de tratamiento, se evaluó la actividad antiproliferativa a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta. Brevemente, se retiró el medio y se fijaron las células con 70 μ L/pozo de glutaraldehído al 1.1% durante 20 minutos en agitación constante, cumplido el tiempo se retiró el fijador y se lavaron con agua corriente dejando secar al aire. Posteriormente, se adicionaron 70 μ L/pozo de cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6 manteniéndose por 20 minutos en agitación constante, pasados los 20 minutos, se retiró el exceso de colorante y se lavó exhaustivamente con agua corriente dejándolas secar al aire. Se agregaron 70 μ L/pozo de ácido acético al 10% por 20 minutos y se midió su absorbancia a 590nm por espectrofotometría en un lector de placas (Chromate Manager). Los datos obtenidos se analizaron en Microsoft Office Excel 2010 graficando una curva dosis respuesta y calculando la IC₅₀.

7.4 Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH)

Las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 5,000 células por pozo con 100 μ L de RPMI con 5% SNB, las cuales se incubaron a 37 °C, al 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio y se trataron 6 repeticiones con las siguientes condiciones: un control testigo al cual sólo se le adicionará medio de cultivo, un control del vehículo empleado en la solubilización del

compuesto (DMSO 0.5%), un control positivo (Tritón X-100) al 9% y la IC₅₀ respectiva para cada línea celular. Transcurridas las 24 horas de tratamiento, se recuperó el sobrenadante y se colocó en una placa de fondo cónico. Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se transfirieron 40 µL/pozo del sobrenadante centrifugado a una placa 96 pozos de fondo plano a los cuales se le adicionaron 40 µL del reactivo de LDH (LDH-Citotoxicity Assay kit Biovision: NO CatK311-400) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Chromate Manager). El porcentaje de muerte necrótica se calculó en Microsoft Office Excel 2010, el control positivo tratado con tritón X-100 fue considerado como el 100 % de actividad.

7.5 Morfología apoptótica en células tumorales por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia

Se cultivaron las tres líneas celulares en placas de 96 pozos a una densidad de 5,000 células por pozo con 100 µL de RPMI con 5 % SNB, las cuales se incubaron a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Posteriormente, se trataron las células con la concentración de IC₅₀ respectiva durante 24 horas, considerando un control testigo, un control del vehículo (DMSO 0.5%) y un control positivo (15 µg/mL de camptotecina solubilizada en medio para la línea celular CaSki, 25 µg/mL para la línea celular MDA-MB-231 y 10 µg/mL para la línea celular CT26-WT). Pasadas las 24 horas, las células se fijaron con 50 µL de una mezcla de paraformaldehído 4 %-glutaraldehído 2.5 % durante una hora y media, al término del tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS (pH 7.3). Posteriormente, las células se permeabilizaron con 30 µL de una solución de tritón X-100 al 1 % en PBS durante 20 minutos, se lavaron nuevamente 3 veces con PBS. Se agregaron 3 µL del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) en el PBS del último lavado y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente e inmediatamente se lavó tres veces con PBS. Finalmente, se observaron las células en un microscopio de contraste de fases y epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, Japón).

7.6 Cuantificación de células positivas a caspasa 3 activa por citometría de flujo (FACS) e inmunofluorescencia

Las células se cultivaron en cajas de 6 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en un volumen de 2.5 mL de RPMI-1640 al 5 % de SNB. Después de su adhesión (20-24 horas), los cultivos se trataron con la concentración correspondiente a la IC₅₀, además de un control testigo, un control del vehículo (DMSO 0.5%) y un control positivo (15 µg/mL de camptotecina solubilizada en medio para la línea celular CaSki, 25 µg/mL para la línea celular MDA-MB-231 y 10 µg/mL para la línea celular CT26-WT). Después de 24 horas, se recuperaron tanto las células adheridas como las células en suspensión y se fijaron con etanol al 70% en PBS durante 30 min a 4 °C, al término del tiempo, se lavaron cuidadosamente con PBS 3 veces por centrifugación (1600 rpm por 5 minutos). Inmediatamente se colocó el anticuerpo primario anticaspasa 3 activa hecho en conejo 1:1000 en PBS (Sigma, USA) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC contra conejo hecho en cabra 1:1000 en PBS (Sigma, USA) durante 2 horas a 37 °C protegidas de la luz; transcurrido el tiempo se lavaron 2 veces más con PBS y se evaluaron en el citómetro de flujo (FACS Aria III). Los datos fueron analizados en el programa FlowJo (Becton Dickinson, (BD) Biosciences).

Para la evaluación por microscopia de epifluorescencia, se cultivaron las células y se trataron con la concentración correspondiente a la IC₅₀, así como un control testigo, un control del vehículo (DMSO 0.5%) y un control positivo (15 µg/mL de camptotecina solubilizada en medio para la línea celular CaSki, 25 µg/mL para la línea celular MDA-MB-231 y 10 µg/mL para la línea celular CT26-WT). Después de 24 horas se retiró el medio y las células se fijaron con una mezcla de paraformaldehído 4%-glutaraldehído 2.5% durante 2 horas, al término del tiempo, se lavarán 3 veces con PBS e inmediatamente se colocó el anticuerpo primario anti-Caspasa-3 activa hecho en conejo 1:1000 en PBS (Sigma, USA) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC contra conejo hecho en cabra 1:1000 en PBS (Sigma, USA) durante 2

horas protegidas de la luz; transcurrido el tiempo se lavaron 3 veces más con PBS y se agregaron 50 μ L de PBS con los que se observaron en un microscopio de contraste de fases y epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, Japón).

7.7 Determinación de la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE)

Se obtuvieron aproximadamente 20 mL de sangre periférica de un sujeto aparentemente sano en tubos BD-Vacutainer® con EDTA. Para separar los linfocitos del resto de la muestra se colocó la sangre en tubos cónicos de vidrio de 15 mL (Pirex, USA) con 5 mL de Ficoll-Hysopaque (Sigma-Aldrich, USA) en una proporción 1:1, escurriendo suavemente por las paredes del tubo. Se centrifugaron inicialmente a una velocidad de 300 rpm por 5 minutos, aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 5 minutos), hasta alcanzar las 1500 rpm, en la cual se les mantuvo centrifugando por 20 minutos.

Se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, transfiriendo el paquete celular que se obtuvo a tubos limpios. Se realizaron dos lavados con 10mL de RPMI sin suero por tubo, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo en 5 mL de RPMI sin suero. Posteriormente se realizó un conteo con ayuda de una cámara de Neubauer.

Los linfocitos fueron marcados con 2 μ M de CSFE. Para ello, se agregaron 50 μ L de 200 μ M de CSFE en 5 mL de RPMI sin suero (Sigma-Aldrich, USA) y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados agregando 5 mL de RPMI al 5% de SFB para eliminar el exceso de CSFE. Se cultivaron en una placa de 96 pozos por quintuplicado 200,000 linfocitos por pozo en 200 μ L de RPMI con 20% de SFB con los siguientes controles: control -,- (sin CSFE y sin fitohemaglutinina PHA), +,- (con CSFE y sin PHA), control -,+ (sin CSFE y con 20 μ L/mL de PHA) y control +,+ (con CSFE y con 20 μ L/mL de PHA). Los pozos con linfocitos para determinar el efecto de las respectivas IC₅₀ se mantuvieron con CSFE y con 20 μ L/mL de PHA. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas (37°C, 5% CO₂, atmosfera punto de rocío).

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se procedió a retirar 100 μ L/ pozo de los controles. A los controles -, - (sin CSFE y sin PHA) y +, - (con CSFE y sin PHA) se les agregó 100 μ L/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco, mientras que a los controles -, + (sin CSFE y con PHA) y +, + (con CSFE y con PHA) se les agregó 100 μ L/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco con 20 μ L/mL de PHA. Asimismo, para probar las IC_{50} obtenidas en las líneas tumorales, también se les retiró 100 μ L/ pozo y se agregaron 100 μ L de las respectivas de IC_{50} a una concentración 2X de la IC_{50} de CaSki (19.82 μ g/mL); 2X de la IC_{50} de MDA-MB-231 (12.84 μ g/mL) y 2X de la IC_{50} de CT26-WT (13.80 μ g/mL). El mismo procedimiento se efectuó para el vehículo, el cual consistió de 5 μ L/mL de DMSO en RPMI al 20% de SFB y con 20 μ L/mL de PHA y se mantuvieron en condiciones de cultivo por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas (72 horas de cultivo total), se recolectaron las células en tubos de citometría y se centrifugaron por 5 minutos a 1,500 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 500 μ L/tubo de verseno frío por 5 minutos para deshacer las colonias celulares. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Finalmente, a cada uno de los tubos se les agregó 500 μ L de PBS adicionado con 5% de SFB. Se procedió a capturar 10,000 células en la población de interés, en un citómetro de flujo FACS Aria-II. Los datos fueron analizados en el programa FlowJo (Becton Dickinson, (BD) Biosciences.

7.8 Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en linfocitos humanos

Se sembró por quintuplicado 200,000 linfocitos por pozo en 200 μ L de RPMI al 20% de SFB y 20 μ g/mL de PHA, en una placa de 96 pozos. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas (37°C, 5% CO₂, atmosfera punto de rocío). Al cabo de este tiempo, se retiraron 100 μ L de medio de cultivo en todos los pozos de la placa de 96 pozos, el cual fue substituido por 100 μ L de medio (RPMI 20% al SFB y 20 μ L/mL de PHA) al 2X (el doble de concentración de las IC_{50}) de cada una de las respectivas condiciones: Al blanco, el control positivo y el control sin tratamiento, se les agregó 100 μ L/pozo de medio de cultivo. El vehículo se agregó DMSO (0.5 %). Los tratamientos con el Glaucolide E consintieron de 2X de la IC_{50} de CaSki (19.82 μ g/mL); 2X de la IC_{50}

de MDA-MB-231 (12.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 2X de la IC_{50} de CT26-WT (13.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La placa se incubó en condiciones de cultivo por otras 24 horas. Una hora previa a la cosecha, al control positivo se le agregaron 18 μL de tritón X-100 al 9%, con el objetivo de lisar las células y así liberar la enzima LDH al medio. Al cabo de 72 horas totales de cultivo, se recolectaron 60 μL de los medios a una placa de fondo cónico en donde se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C, se pasaron 40 μL a un placa de 96 pozos de fondo plano a los cuales se les agregaron 40 μL de la mezcla de reacción de LDH (LDH-Citotoxicity Assay kit Biovision: NO CatK311-400). Se incubaron por 20 minutos en condiciones de oscuridad y se evaluó la absorbancia a 490nm en un lector de placas (Chromate Manager). El porcentaje de muerte necrótica fue calculado en Microsoft Office Excel 2010, tomando como el 100% al control positivo tratado con tritón X-100.

7.9 Evaluación de la apoptosis en linfocitos humanos a través de la inmunocuantificación de caspasa 3 activa por citometría de flujo

Se cultivó por quintuplicado 200,000 linfocitos por pozo en 200 μL de RPMI con 20% de SFB y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de PHA (un activador de la proliferación de linfocitos) en una placa de 96 pozos. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas (37°C, 5% CO_2 , atmosfera punto de rocío).

Al cabo de este tiempo, se retiró 100 μL de medio de cultivo en todos los pozos de la placa de 96 pozos, el cual fue substituido por 100 μL de medio (RPMI 20% de SFB y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de PHA) al 2X (el doble de concentración de las IC_{50}) de cada una de las respectivas condiciones: Sin marca, anticuerpo secundario (Ab 2°) y control: sólo medio; vehículo: 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de DMSO; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Camptotecina (CPT); 2X de la IC_{50} de CaSki (19.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2X de la IC_{50} de MDA-MB-231 (12.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 2X de la IC_{50} de CT26-WT (13.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La placa se incubó en condiciones de cultivo por otras 24 horas. Al cabo de 72 horas totales de cultivo, se cosecharon cada una de las condiciones en tubos de citometría de flujo y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se retiraron los sobrenadantes por decantación y se resuspendieron los linfocitos con 500 μL de verseno frío por 5 minutos para deshacer las colonias celulares. Se volvió a centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante.

Brevemente, cada uno de los tubos fueron permeabilizados con 100 μ L de 0.3% de saponina (Sigma), 5% SFB en PBS por 30 minutos a 37°C; a excepción de las muestras de DMSO, CPT y las IC₅₀, a las cuales en paralelo se les adicionó el anticuerpo policlonal conejo anti-caspasa 3 (1:500, Sigma) e incubados por 30 minutos a 37°C. Las muestras fueron lavadas 2 veces con 1 mL de 0.1% de saponina (Sigma), 5% SFB en PBS. Inmediatamente, las muestras de DMSO, CPT y las IC₅₀ se incubaron con 100 μ L del anticuerpo policlonal cabra anticonejo conjugado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500, Sigma) con 0.3% de saponina (Sigma) y 5% de SFB en PBS por 30 minutos a 37°C. Brevemente, las muestras se lavaron 2 veces con 1 mL de 0.1% de saponina (Sigma), 5% SFB en PBS. Finalmente, a cada uno de los tubos se les agregó 500 μ L de PBS adicionado con 5% de SFB. Se procedió a capturar 10,000 células en la población de interés, en un citómetro de flujo FACS Aria-II. Los datos fueron analizados en el programa FlowJo (Becton Dickinson, (BD) Biosciences).

8. Resultados

8.1 Actividad antiproliferativa en células tumorales

Con el propósito de establecer si el glaucolide E presenta actividad antiproliferativa en células tumorales, los cultivos de las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT fueron tratadas a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 $\mu\text{g/mL}$ de la lactona, y la actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% en la densidad celular (IC_{50}) a través de la técnica de tinción con el colorante cristal violeta (Figura 6).

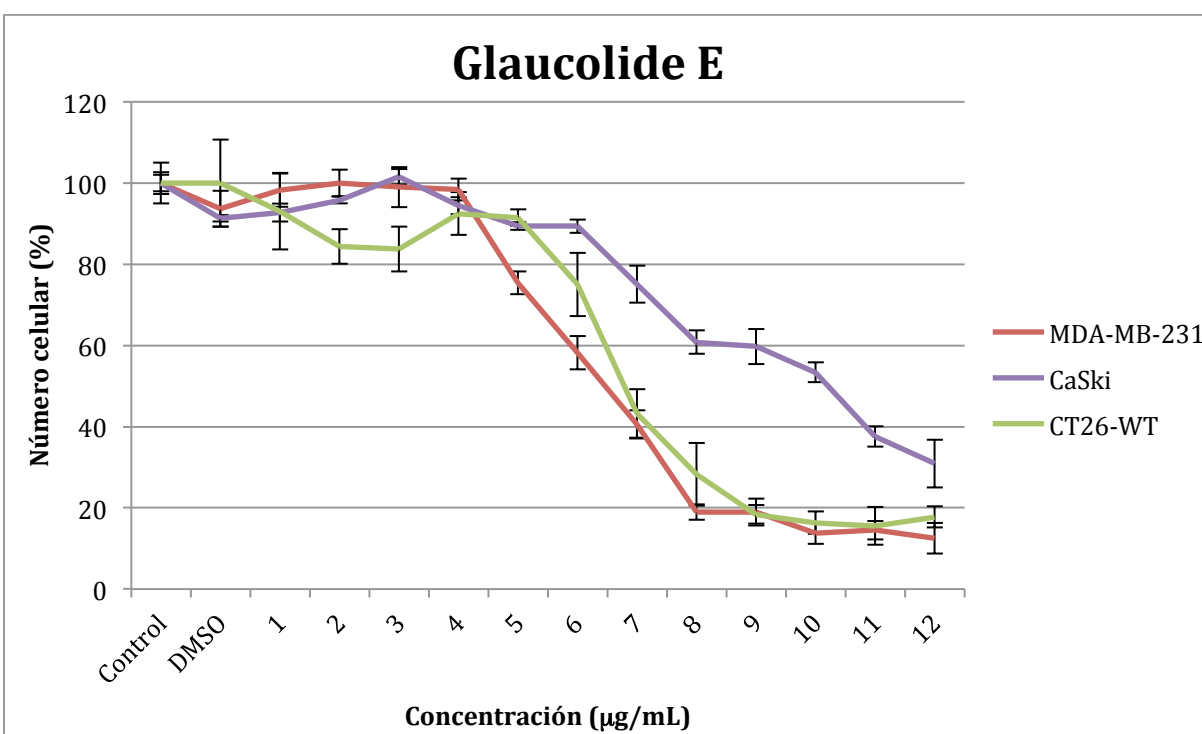


Figura 6. Efecto antiproliferativo del compuesto Glaucolide E sobre las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto por 24 horas, posteriormente el número celular fue determinado a través de la técnica de incorporación de cristal violeta. Los valores son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANDEVA ($p < 0.05$ vs control).

Los resultados obtenidos, indican que el Glaucolide E afecta el potencial proliferativo en las tres líneas celulares tumorales de una manera dependiente de la dosis, con valores de IC_{50} entre 6 y 10 $\mu\text{g/mL}$ mostrados en la tabla 2.

<i>Tabla 2. Concentración requerida de Glaucolide E para disminuir la densidad celular en un 50 % (IC₅₀)</i>		
<i>Línea celular</i>	<i>µg/mL</i>	<i>µM</i>
CaSki	9.9	22.1
MDA-MB-231	6.4	14.3
CT26-WT	6.9	15.4

Cabe destacar que la línea tumoral CaSki presentó una mayor resistencia a la inhibición de la proliferación al tratamiento con el Glaucolide E, ya que se requirió una mayor cantidad de compuesto (un 54%) con respecto a lo que se empleó en MDA-MB-231. A pesar del hecho de conocer que el Glaucolide E inhibe la capacidad proliferativa de las tres líneas tumorales, resulta necesario investigar el mecanismo a través del cual lo hace. Por lo tanto, se procedió a evaluar si el decremento en el número celular es debido a un proceso de muerte necrótico o apoptótico.

8.2 Actividad necrótica del compuesto Glaucolide E

Con la intención de investigar si el decremento en el número celular observado en las diferentes líneas celulares tumorales tratadas con el glaucolide E, es debido a la inducción de una muerte necrótica, cultivos de las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT se trataron con la lactona a las concentraciones de sus respectivas IC₅₀ y la muerte celular necrótica se determinó evaluando los sobrenadantes provenientes de estos cultivos, mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). En las células vivas, la LDH debe estar presente en el interior de la células, por lo que su presencia en el sobrenadante, es indicador de que las células ha sufrido un proceso de lisis (Figura 7; Tabla 3).

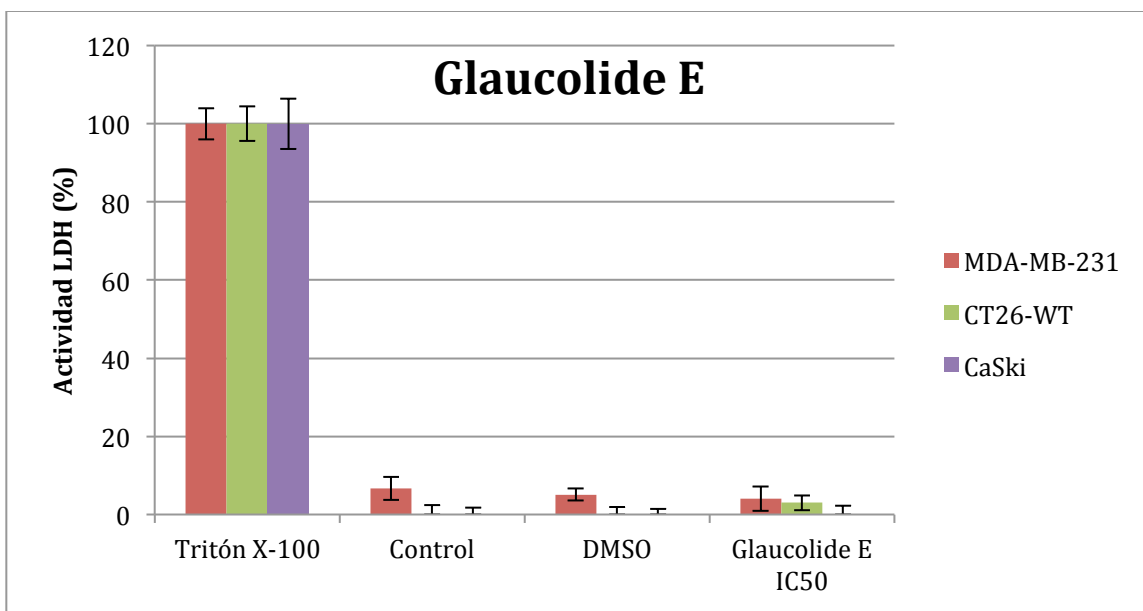


Figura 7. Actividad necrótica del compuesto Glaucolide E en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT. Las células fueron tratadas con las IC₅₀ estimadas para cada línea celular durante 24 horas. La actividad de la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares mediante el uso del kit (LDH-Citotoxicity Assay kit Biovision: NO CatK311-400). Los gráficos representan tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANDEVA ($p < 0.05$ vs control).

Tabla 3. Porcentajes de actividad de la enzima citoplasmática LDH

Línea celular	%LDH
CaSki	0%
MDA-MB-231	4.0%
CT26-WT	2.9%

Los resultados obtenidos en la figura 6 y tabla 3 indican que el glaucolide E no induce en las líneas celulares tumorales a liberar la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos, indicando que esta lactona no induce muerte celular necrótica y que su efecto antiproliferativo es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

8.3 Morfología apoptótica

La muerte celular apoptótica se caracteriza por cambios morfológicos como son la contracción celular, la condensación de la cromatina, la pérdida de prolongaciones citoplasmáticas, la compactación nuclear, la formación de cuerpos apoptóticos, entre otras. Adicionalmente, la muerte apoptótica posee características bioquímicas, entre las que se encuentra la activación de algunas caspasas. Es por ello que para la evaluación de la actividad apoptótica del compuesto Glaculide E, se trataron las líneas celulares tumorales con sus IC_{50} respectivas, posteriormente se observó su morfología a través de microscopía de contraste de fases y microscopía de epifluorescencia por tinción nuclear con el fluorocromo DAPI. De manera simultánea, se detectó la caspasa 3 activa por inmunodetección y observada por microscopía de epifluorescencia (Figuras 8, 9, 10 y 11).

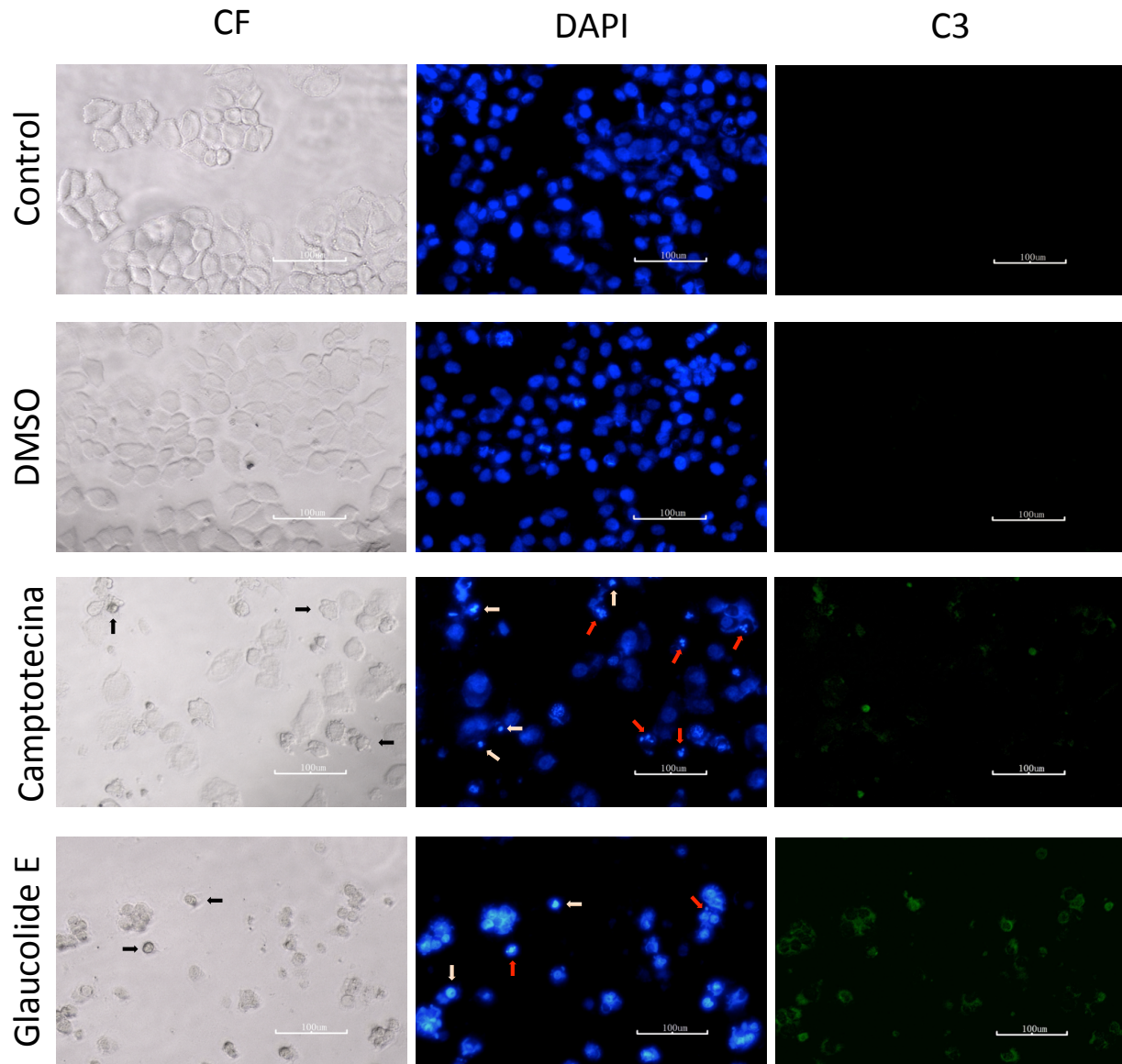


Figura 8. Efecto del Glaucolide E sobre la morfología de la línea celular CaSki y la inmunodetección de la caspasa 3 activa (C3). Las células fueron tratadas con 9.9 µg/mL de Glaucolide E durante 24 horas. Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y la caspasa 3 activa fue detectada por inmunolocalización, las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. En contraste de fases (CF) las flechas negras indican cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma, en las células teñidas con DAPI las flechas amarillas indican condesación de la cromatina y las fechas rojas fragmentación de la misma, las células positivas a caspasa 3 activa presentan una marca verde.

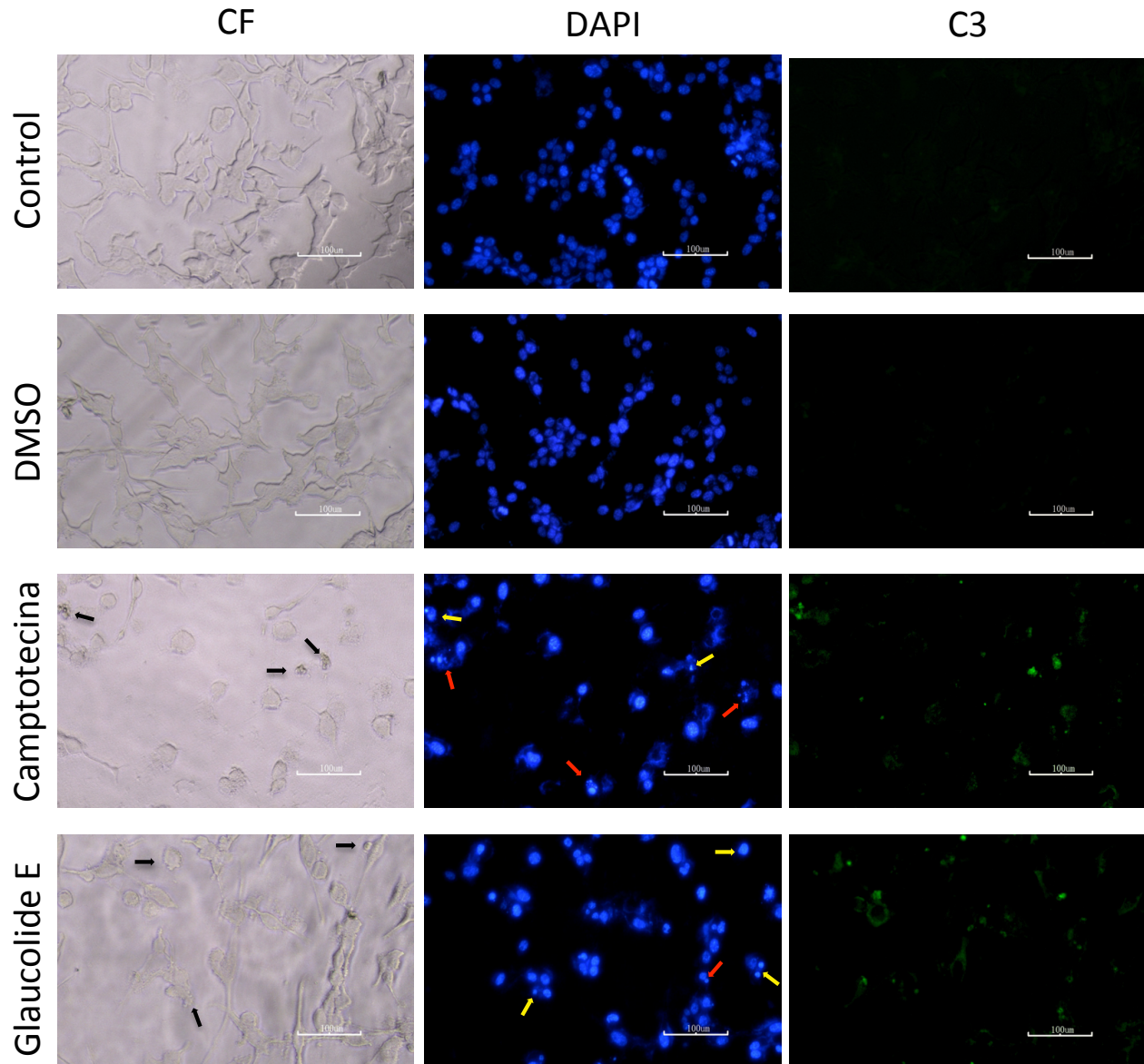


Figura 9. Efecto del Glaucolide E sobre la morfología de la línea celular CT26-WT y la inmunodetección de la caspasa 3 activa (C3). Las células fueron tratadas con 6.4 µg/mL de Glaucolide E durante 24 horas. Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y la caspasa 3 activa fue detectada por inmunolocalización, las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. En contraste de fases (CF) las flechas negras indican cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma, en las células teñidas con DAPI las flechas amarillas indican condesación de la cromatina y las fechas rojas fragmentación de la misma, las células positivas a caspasa 3 activa presentan una marca verde.

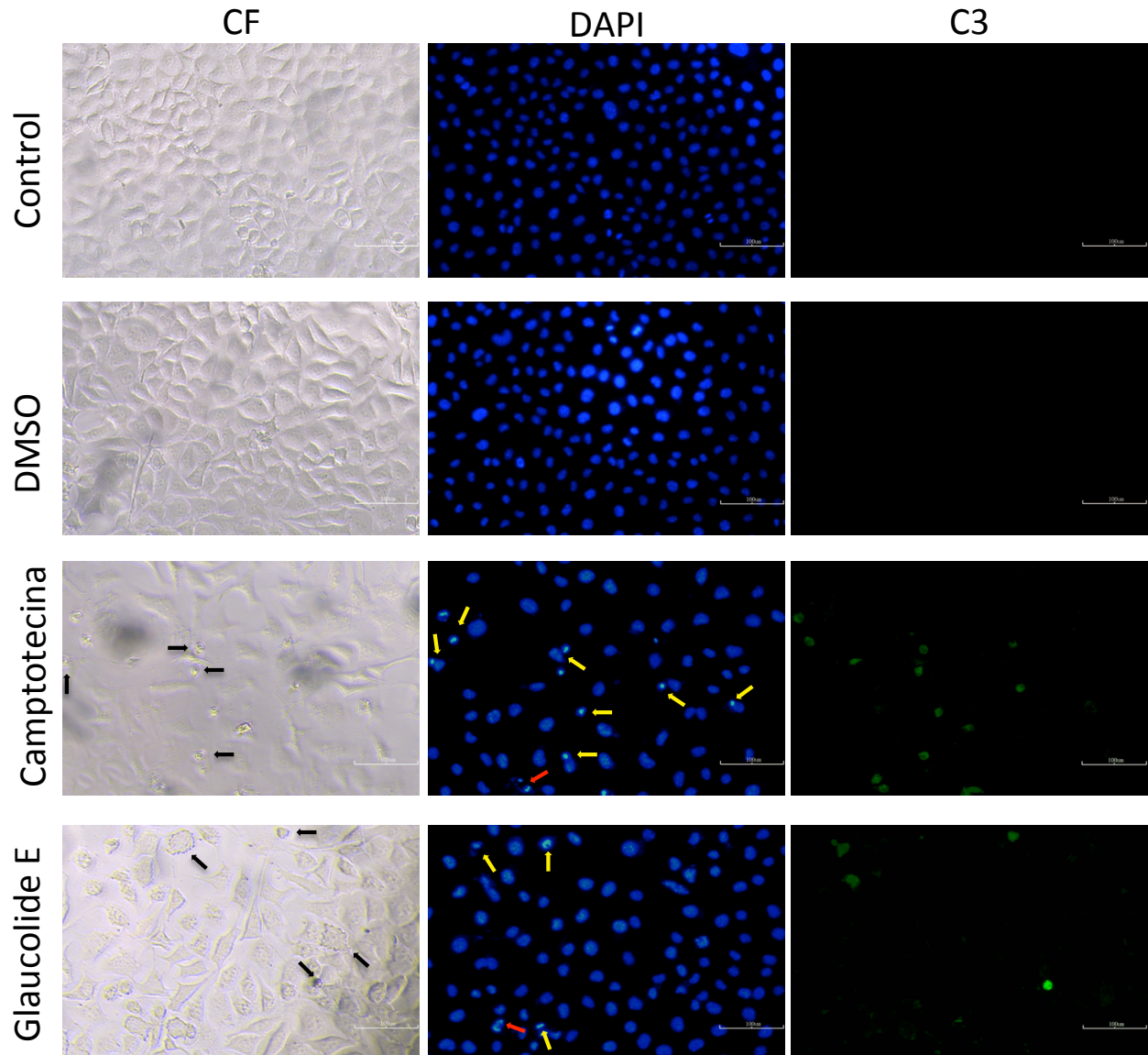


Figura 10. Efecto del Glaucolide E sobre la morfología de la línea celular MDA-MB-231 y la inmunodetección de la caspasa 3 activa (C3). Las células fueron tratadas con 6.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Glaucolide E durante 24 horas. Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y la caspasa 3 activa fue detectada por inmunolocalización, las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. En contraste de fases (CF) las flechas negras indican cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma, en las células teñidas con DAPI las flechas amarillas indican condensación de la cromatina y las flechas rojas fragmentación de la misma, las células positivas a caspasa 3 activa presentan una marca verde.

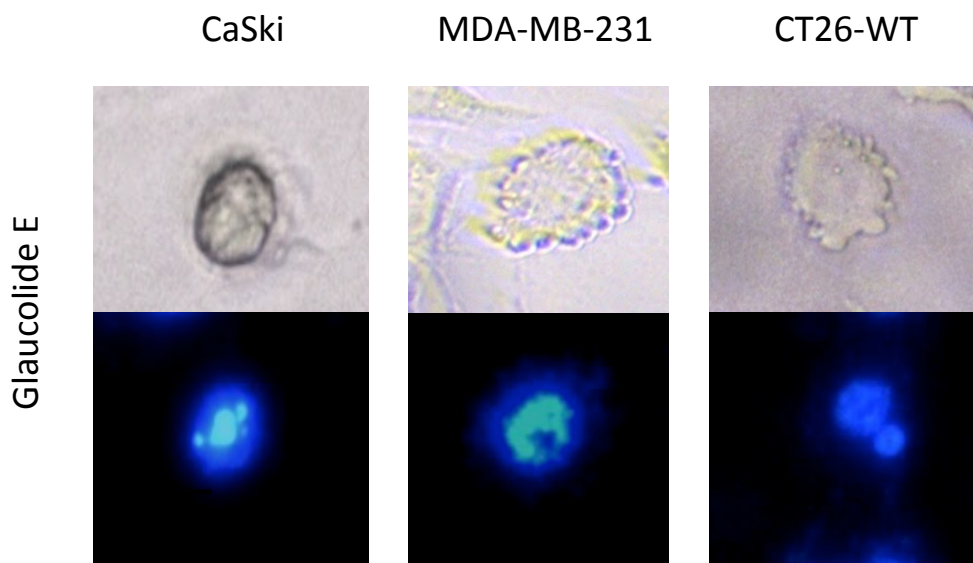


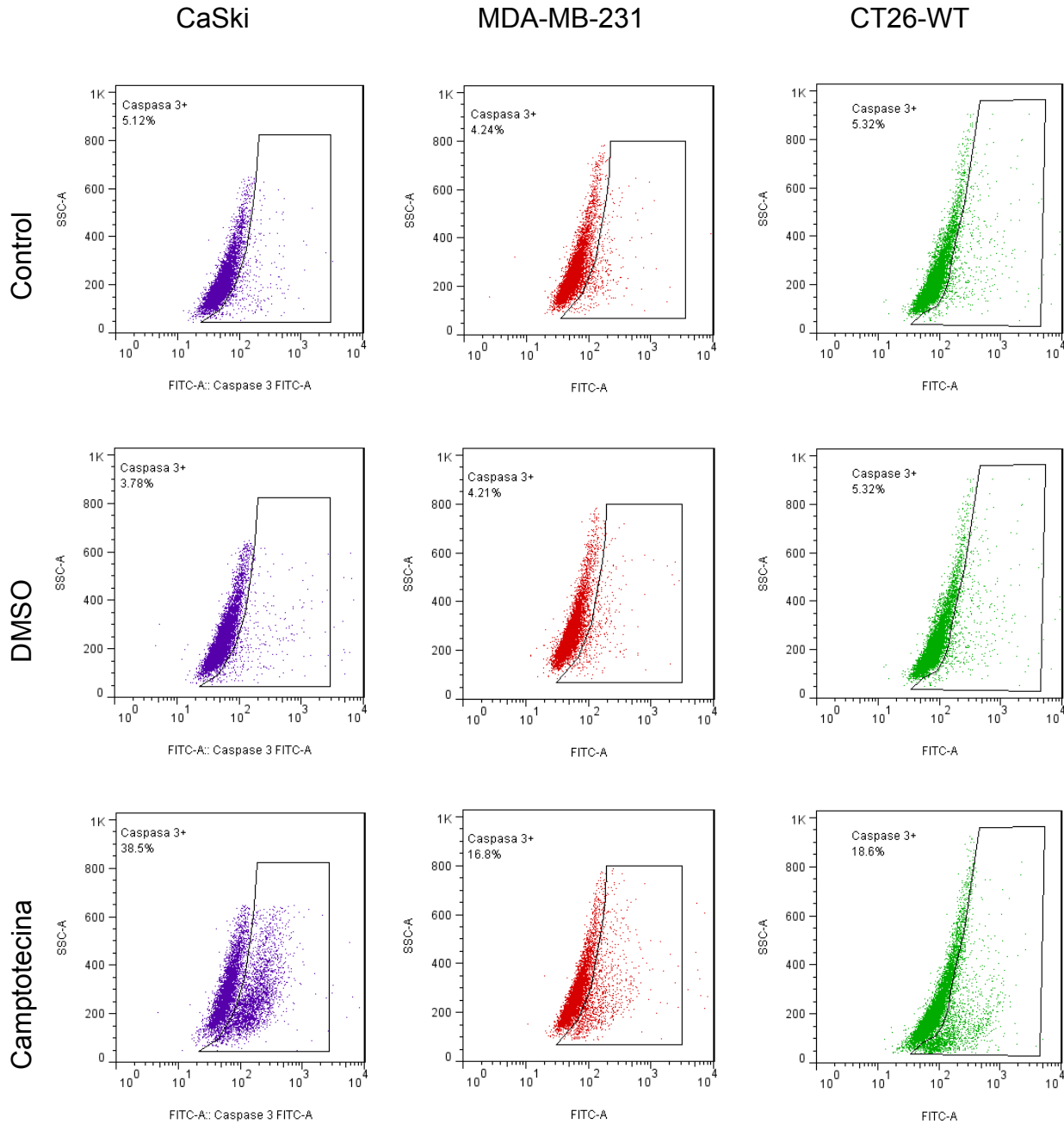
Figura 11. Efecto del Glaucolide E sobre la morfología de las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT. Las células fueron tratadas con 9.9, 6.4 y 6.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Glaucolide E durante 24 horas. Las células fueron teñidas con el fluorocromo DAPI y observadas por microscopía de epifluorescencia.

Los resultados obtenidos en las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran que las células del control y el DMSO presentan una morfología similar, en la cual, las células presentan su morfología poliédrica típica, con un citoplasma extendido y proyecciones citoplasmáticas, además de núcleos homogéneos con la cromatina distribuida de forma regular. Sin embargo, en las células tratadas con la Camptotecina y el Glaucolide E se observa un notable cambio morfológico, ya que se distingue una marcada contracción celular y pérdida de las proyecciones citoplasmáticas. Adicionalmente, se observan núcleos compactos y cromatina condensada, y en algunos casos, fragmentación de la cromatina, indicando que el compuesto Glaucolide E induce en las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT a presentar características morfológicas típicas de muerte celular apoptótica.

Con respecto a la detección de la caspasa 3 activa, en el control y en el DMSO no se observa presencia de caspasa 3 activa, mientras que en la Camptotecina y el Glaucolide E sobresale la presencia de esta caspasa, indicando que el compuesto Glaucolide E induce muerte apoptótica con la participación de la caspasa 3 activa en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT.

8.4 Células positivas a la caspasa 3 en células tumorales

Para determinar el número de células positivas a la caspasa 3 activa al ser tratadas con el Glaculide E, las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT fueron tratadas con sus respectivas IC_{50} y las células positivas a caspasa 3 activa fueron determinadas mediante inmunodetección y cuantificadas por citometría de flujo (Figura 12; Tabla 4).



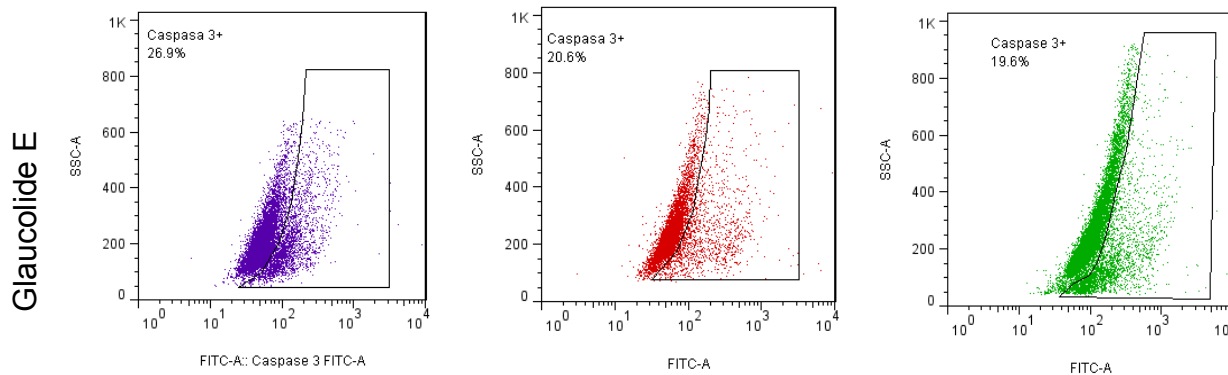


Figura 12. Detección y cuantificación de la caspasa 3 activa (C3) en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT tratadas con el compuesto Glaucolide E por citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con las IC_{50} correspondientes a cada línea celular durante 24 horas. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

Tabla 4. Porcentaje de células tumorales positivas a caspasa 3 activa

	CaSki	MDA-MB-231	CT26-WT
Control	5.1%	4.2%	4.9%
DMSO	3.7%	4.2%	5.3%
Camptotecina	38.5%	16.8%	18.6%
Glaucolide E	26.9%	20.6%	19.6%

Los resultados mostrados en la figura 12 y la tabla 4, indican que el compuesto Glaucolide E induce la presencia de la caspasa 3 activa en las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT. Estos resultados concuerdan con los cambios morfológicos descritos en las figuras 8, 9, 10 y 11, estableciendo así, que el compuesto Glaucolide E induce a una muerte apoptótica con la participación de la caspasa 3 en estas células tumorales.

8.5 Efecto antiproliferativo en células no tumorales

Dado que los resultados demuestran que el compuesto Glaucolide E presenta actividad antiproliferativa en células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT, es necesario probar su efecto antiproliferativo en células no tumorales para determinar su acción selectiva, por lo que, cultivos de una población enriquecida de linfocitos de sangre periférica humana fueron tratados a las 48 horas de cultivo con las concentraciones correspondientes de las IC₅₀ de las líneas celulares tumorales. Después de 24 horas de tratamiento (72 horas de cultivo) se evaluó su proliferación a través de la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CSFE) y la proliferación celular fue cuantificada por citometría de flujo (Figura 13, Tabla 5).

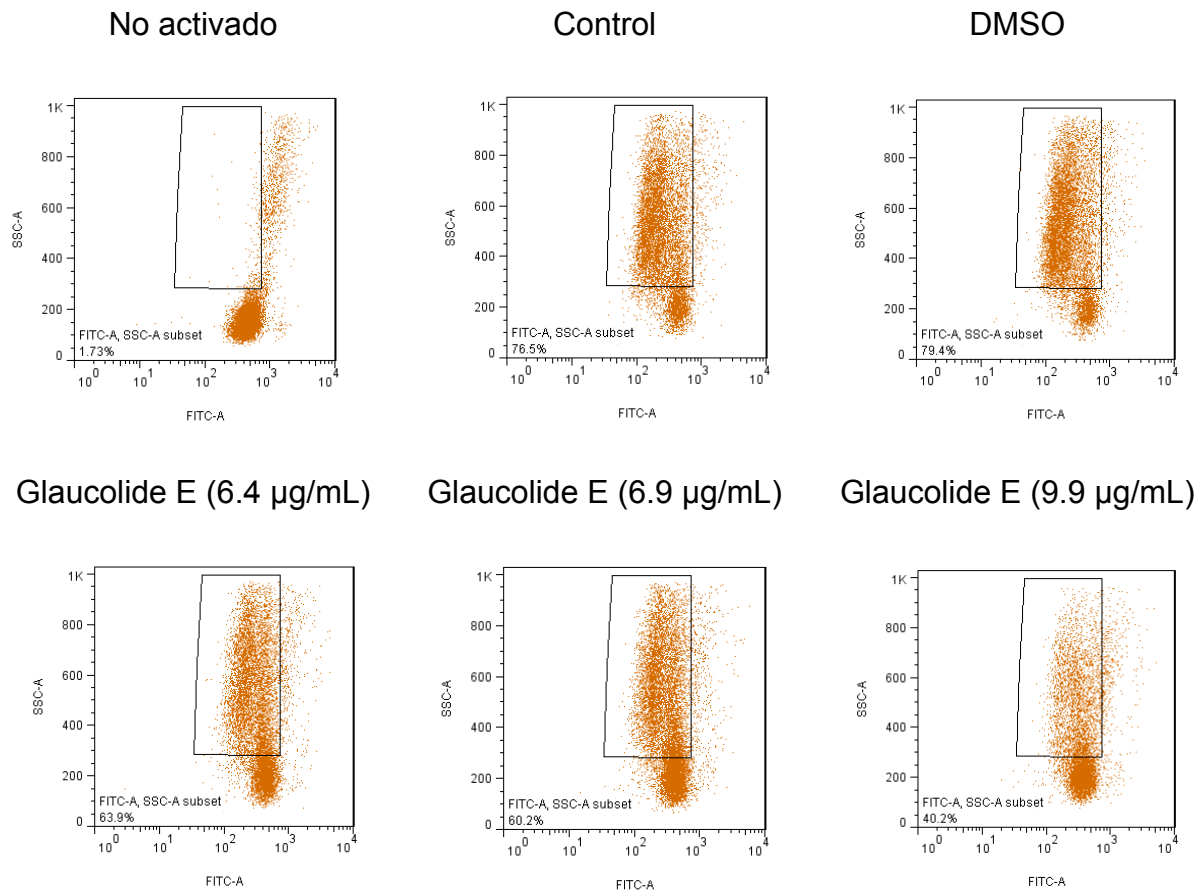


Figura 13. Efecto antiproliferativo del compuesto Glaucolide E sobre una población enriquecida de linfocitos humanos de donadores aparentemente sanos marcados con CFSE. Las células fueron estimuladas con las concentraciones de IC₅₀ correspondientes a las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT por 24 horas. Los gráficos representan uno de tres ensayos independientes.

Tabla 5. Porcentaje de proliferación de linfocitos tratados a las concentraciones de IC₅₀ requeridas para las células tumorales

Tratamiento	% de proliferación
Control	76.5
DMSO	79.4
Glaucolide E (6.4 µg/mL)	63.9
Glaucolide E (6.9 µg/mL)	60.2
Glaucolide E (9.9 µg/mL)	40.2

Los resultados obtenidos en la figura 13 y tabla 5 indican que el compuesto Glaucolide E afecta el potencial proliferativo de la células linfocíticas de un 16.5 % a un 47.45 %, sugiriendo que la acción antiproliferativa de este compuesto es dependiente de la dosis.

8.6 Actividad necrótica del compuesto Glaucolide E en células no tumorales

Con el propósito de establecer si el decremento en la proliferación celular observada en células linfocíticas humanas tratadas con el glaucolide E es debido a la inducción de una muerte necrótica, cultivos de linfocitos se trataron a las concentraciones de las IC₅₀ obtenidas para las células tumorales y se evaluó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 14; Tabla 6).

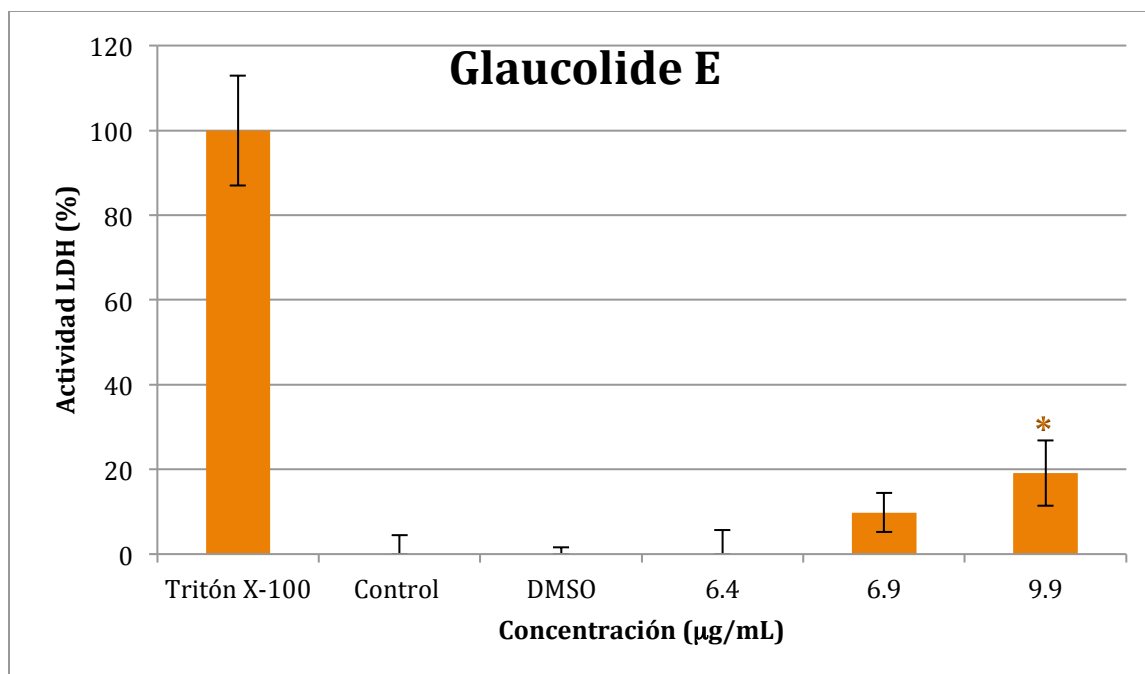


Figura 14. Actividad necrótica del compuesto Glaucolide E en linfocitos humanos de donadores clínicamente sanos. Las células fueron tratadas con las IC_{50} calculadas para las líneas celulares tumorales durante 24 horas. La actividad de la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares mediante el uso del kit (LDH-Citotoxicity Assay kit Biovision: NO CatK311-400). Los gráficos representan tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANDEVA *($p < 0.05$ vs control).

Tabla 6. Porcentaje de actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares de linfocitos humanos

Tratamientos	% LDH
Control	0
DMSO	0
Glaucolide E (6.4 µg/mL)	0
Glaucolide E (6.9 µg/mL)	9.8
Glaucolide E (9.9 µg/mL)	19.0

Los resultados obtenidos en la figura 14 y tabla 6 indican que el compuesto Glaucolide E induce muerte necrótica en un 19 % en la concentración más alta del compuesto (9.9 µg/mL) sugiriendo que este compuesto presenta una baja actividad necrótica, sin embargo, este porcentaje de muerte por necrosis no explica el porcentaje del decremento en la proliferación, indicando que la disminución en la densidad celular no solo es debido a una actividad necrótica del compuesto, por lo que es necesario evaluar otro tipo de muerte celular como la muerte celular apoptótica.

8.7 Determinación de células positivas a la caspasa 3 activa en células no tumorales

Para evaluar si el compuesto Glaucolide E induce muerte apoptótica en las células linfocíticas, se cuantificó la población celular que es positiva a caspasa 3 activa, los cultivos celulares fueron tratados con las IC₅₀ obtenidas para las líneas celulares tumorales y las células positivas a la caspasa 3 activa fueron determinadas por inmunodetección y cuantificadas mediante citometría de flujo (Figura 15; Tabla 7).

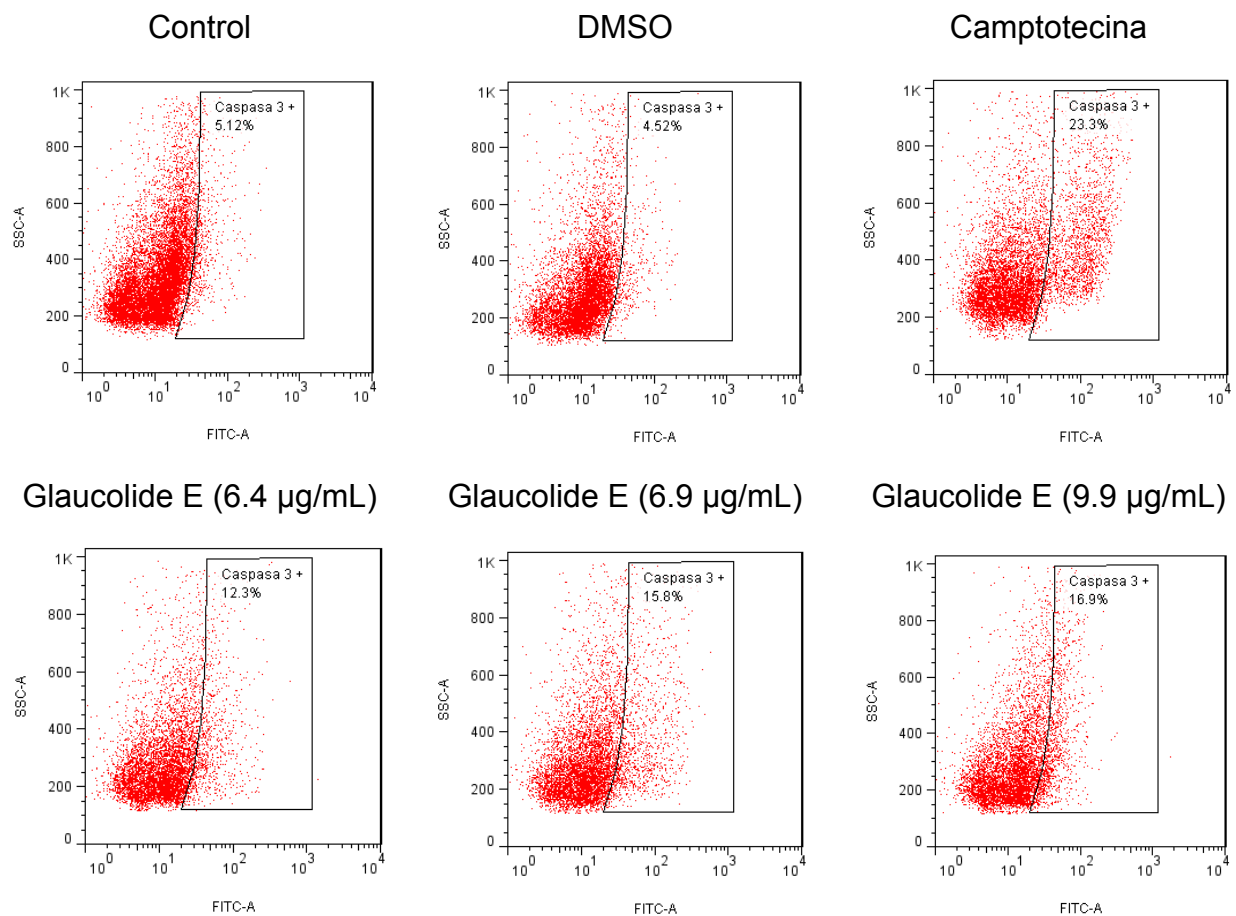


Figura 15. Detección y cuantificación de la caspasa 3 activa en linfocitos humanos de donadores clínicamente sanos, tratadas con el compuesto Glaucolide E por citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con las IC₅₀ correspondientes a cada línea celular tumoral durante 24 horas. Los valores son representativos de dos ensayos independientes.

Tabla 7. Porcentaje de células tumorales positivas a caspasa 3 activa

Tratamientos	% células positivas a caspasa 3 activa
Sin marca	0.80%
Ab 2°	0.74%
Control	5.12%
DMSO	4.52%

Camptotecina	23.3%
Glaucolide E (6.4 µg/mL)	12.3%
Glaucolide E (6.9 µg/mL)	15.8%
Glaucolide E (9.9 µg/mL)	16.9%

Los resultados obtenidos en la figura 15 y tabla 7 indican que el compuesto Glaucolide E induce muerte apoptótica con porcentajes de 12.3 hasta 16.9%. De esta manera, el porcentaje en la disminución de la proliferación, también es debido a un proceso de muerte por apoptosis.

9. Discusión

En la actualidad, el cáncer es una de las enfermedades con amplia relevancia debido a su alta tasa de mortalidad. En México, es la tercera causa de muerte sólo después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus (INEGI, 2018), aunado a que muchas de las terapias antineoplásicas son tóxicas (Weingart *et al.*, 2018). En este sentido, la quimioterapia es un campo de investigación intenso y fértil, pero al mismo tiempo, genera una amplia fuente de preocupación debido a sus múltiples efectos secundarios y secuelas a largo plazo (Nurgali *et al.*, 2018), asociados a la toxicidad inespecífica de los quimioterapéuticos (Avendaño & Menéndez, 2008). Por lo tanto, los investigadores en el campo de la quimioterapia se ocupan en buscar nuevos compuestos que sean mejor selectivos y más efectivos.

Alrededor de la mitad de los medicamentos contra el cáncer actualmente en uso clínico son de origen de productos naturales, entre éstos, las plantas han representado tradicionalmente una fuente principal de agentes anticancerígenos (Avendaño & Menéndez, 2008), de los cuáles sobresalen las lactonas sesquiterpénicas debido a sus diversas actividades biológicas y antineoplásicas (Ren *et al.*, 2016). Sin embargo, pocas revisiones se han centrado en la extracción, análisis y caracterización de lactonas sesquiterpénicas en sistemas biológicos, particularmente para definir sus actividades anticancerígenas (Ghantous *et al.*, 2010). A pesar de esto, en los últimos años se han producido cambios en el campo de la química de las lactonas sesquiterpénicas, y se han aislado nuevos compuestos biológicamente activos (Adekenov, 2017) cuyo potencial antitumoral aún se desconoce, como es el caso del compuesto Glaucolide E.

En la presente tesis, se describe que el glaucolide E tiene un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis en líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT, mostrando un mayor efecto antiproliferativo en líneas celulares CaSki (9.9 µg/mL) y MDA-MB-231 (6.4 µg/mL) en comparación con el 5β-hydroxy-hirsutinolide, un derivado de glaucolide B, cuyas IC₅₀ fueron de 30 y 18 µg/mL respectivamente (Flores-Guzmán *et al.*, 2019), requiriendo menos de la mitad del compuesto para ocasionar el mismo efecto biológico, esto debido a que la disminución de la proliferación también se le atribuyó a una muerte apoptótica. Cabe recalcar que sucede el mismo comportamiento

con otras lactonas sesquiterpénicas como el extracto crudo de diclorometano obtenido de *Calea pinnatifida* del cual se reportan IC₅₀ de 204.85 µg/mL para la línea tumoral de mama MCF-7 y de 50.45 µg/mL para la línea de colon HT29 (Marchetti *et al.*, 2012), lactonas que a pesar de pertenecer a la subclase germacranólido requieren mayor cantidad de compuesto (casi 3 veces más) en estos tipos de cáncer.

La resistencia a la inhibición de la proliferación de la línea tumoral CaSki cuando se expone con el Glaucolide E, también se ha observado con el el 5β-hydroxy-hirsutinolide (Flores-Guzmán *et al.*, 2019). Conociéndose que las lactonas sesterterpénicas son capaces de inhibir la proliferación a través del grupo α-metilo-γ-lactona, la cual se une a la cisteína 38 de la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB, sugiere que el blanco terapéutico en CaSki podría no ser dicha molécula, o que probablemente se encuentre mutada (Guzmán *et al.*, 2018), sin embargo, se requieren más estudios para apoyar esta afirmación.

A su vez, existen otras lactonas sesquiterpénicas de tipo germacranólido que presentan IC₅₀ similares. Para el cáncer de colon, se ha reportado que el 2-*epi*-glaucolide E presenta una IC₅₀ de 9.4µM en la línea celular de colon HT-29 (Pan *et al.*, 2010), así como los compuestos Rufesolide A-D con IC₅₀ de 1-4µM (Ren *et al.*, 2012), mientras que el glaucolide E obtuvo una IC₅₀ de 15.38µM para la línea celular CT26-WT. Para cáncer cervicouterino se ha reportado que los compuestos Eupakirunsin A, C y D presentan IC₅₀ de 5.8 a 8.9 µg/mL en células HeLa (Shen *et al.*, 2005), en comparación con el 9.9 µg/mL del Glaucolide E para la línea celular CaSki. A pesar de que estos compuestos presentan concentraciones similares que disminuyen la proliferación en un 50%, aún no se ha evaluado el proceso por el cual ocasiona dicha disminución.

Después de corroborar que el compuesto Glaucolide E presenta un efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer cervicouterino, se propuso investigar la causa de la disminución en el número celular, por lo que se evaluó la actividad necrótica de esta lactona, obteniendo porcentajes de muerte necrótica de 0% hasta 4%, indicando que estas células tumorales no mueren por necrosis, representando así, una importante ventaja terapéutica del compuesto, pues en caso de administrarse *in vivo*, los tumores eliminados probablemente no desencadenen en efectos secundarios atribuidos a este tipo de muerte, como puede

ser el daño tisular generado por la liberación del contenido citoplasmático y su respectiva respuesta inflamatoria (Rock & Kono, 2008).

El objetivo principal de los agentes quimioterapéuticos es inducir cambios celulares que culminen en el daño del ADN que promuevan la apoptosis (Maioral *et al.*, 2017), es por ello que las lactonas sesquiterpénicas que actualmente se encuentran en ensayos clínicos basan su mecanismo de acción en la inducción de muerte apoptótica como son la Partenolida y la Artemisinina (Jeyamohan *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2017), es por esto que se evaluó la inducción de muerte apoptótica por el glaucólido E en células tumorales. Se observaron características morfológicas propias de este tipo de muerte y se cuantificó la caspasa 3 activa por citometría de flujo, obteniendo porcentajes de 25.6% para la línea celular CaSki, de 25.1% para la línea MDA-MB-231 y de 19.6% para la línea CT26-WT, confirmando así el efecto apoptótico del compuesto sobre las células tumorales.

Sin embargo, a pesar de que la inducción de muerte apoptótica es una de las características más importantes de los quimioterapéuticos, la selectividad también cobra gran relevancia debido a que un compuesto prometedor será aquel que afecte poco o nulamente a las células normales. Es por esto que las lactonas sesquiterpénicas no siempre se han considerado favorables como potenciales agentes anticancerosos debido a su toxicidad y no selectividad (Ren *et al.*, 2016).

Asimismo, el glaucólido E fue probado en linfocitos de sangre periférica humana, en dónde inhibió la proliferación hasta en un 47.5 % a la concentración de IC₅₀ más alta (9.9 µg/mL). Sin embargo, en estudios realizados con el glaucólido B, a una concentración de 15 µg/mL inhibió por completo el crecimiento de las células linfocíticas humanas (Burim *et al.*, 1999). Ésto puede deberse a que las lactonas sesquiterpénicas gracias a su estructura química inhiben el factor de transcripción nuclear NF-κB, por lo tanto, se puede suponer que NF-κB puede estar involucrado en el efecto supresor de las lactonas sesquiterpénicas sobre la producción de citocinas y la proliferación de linfocitos (Koch *et al.*, 2001), como la Partenolida, una lactona que se considera un compuesto digno agente anticancerígeno, y a la cual se le han reportado suprime la producción de TNF-α, IFN-γ, IL-1β e IL-17, y disminuye las células Th1 y Th17 (Zhang *et al.*, 2017).

No obstante, se evaluó la actividad necrótica y apoptótica del compuesto Glaucolide E sobre las células linfocíticas humanas, obteniendo que la lactona inhibió un 40% la proliferación a través de un índice necrótico de 19% en la concentración más alta y un índice apoptótico de 12 a 17%. Es por esto, que este compuesto podría presentar una aceptable selectividad, si se compara con otras lactonas sesquiterpénicas que están en investigación clínica, como la Artemisinina, la cual se encuentra en fases avanzadas de estudio y ha exhibido resistencia en modelos de laboratorio, así como neurotoxicidad en dosis altas (Meshnick, 2002). El hecho que el Glaucolide E afecte negativamente un 40% la proliferación de una población total de linfocitos por un proceso necrótico y apoptótico, no debe descartarlo como un candidato terapéutico. En pacientes con cáncer avanzado se ha demostrado que existen linfocitos que se corrompen en favor del tumor, por lo es importante investigar que tipo de linfocitos está afectando. Además, en el campo de trasplantes de órganos no compatibles, no se ha logrado resolver bloquear la actividad anti-injerto que genera la respuesta inmune del huésped; por lo que es otro campo de investigación indispensable por explorar.

Por lo tanto, se considera que el compuesto glaucolide E es un compuesto prometedor de seguir estudiando como un potencial agente terapéutico, así como servir de molécula base del cuál podrían sintetizarse compuestos análogos que mejores su acción selectiva.

10. Conclusiones

- El compuesto Glaucolide E presenta actividad antiproliferativa contra las líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT con valores de IC₅₀ de 9.9, 6.4 y 6.9 µg/mL respectivamente.
- El Glaucolide E no induce muerte necrótica en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT.
- El Glaucolide E induce cambios morfológicos característicos de muerte celular apoptótica además de la presencia de caspasa 3 activa en las líneas celulares tumorales.
- El compuesto afecta la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana de manera dosis dependiente a concentraciones de 6.4, 6.9 y 9.9 µg/mL entre un 16.5 a 47.5 %, a través de proceso necrótico (de 0 a 19%) y apoptótico (de 12 a 17%).

11.Referencias

1. Abshire, D., & Lang, M. K. (2018). *The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer*. *Seminars in Oncology Nursing*, 34(2), 151–157pp.
2. Adekenov, S.M. (2017). *Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity*. *Fitoterapia*, 121: 16–30pp.
3. Aigner, K. & Stephens, F. (2016). *Induction chemotherapy : systemic and locoregional*. 2º Edición. Berlín: Springer. 506pp.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. 6º edición. Nueva York: Garland Science. 1342pp.
5. Alonso, P., Lazcano E. C. & Hernández-Ávila, M. (2000). *Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana. 385pp.
6. Amorim, H., Gil, R.M., Lopes, C. & Bastos, M. (2013). *Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms*. *Crit Rev Toxicol*. 43(7): 559–579 pp.
7. Ashkenazi, A. & Salvesen, G. (2014). *Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 30. 337-356pp.
8. Avendaño, C. & Menéndez, J.C. (2008). *Medicinal Chemistry Of Anticancer Drugs*. Amsterdam: Elsevier. 442pp.
9. Burim, R.V., Canalle, R., Callegari-Lopes, J.L. & Takahashi, C.S. (1999). *Genotoxic action of the sesquiterpene lactone glaucolide B on mammalian cells in vitro and in vivo*. *Genet. Mol. Biol*. 22(3): 401-406pp.
10. Buskuhl, H., De Oliveira, F., Blind, L., De Freitas, R., Barison, A., Campos, F., Corilo, Y., Eberlin, M., Caramori, G. & Biavatti, M. (2010). *Sesquiterpene*

lactones from Vernonia scorpioides and their in vitro cytotoxicity. Phytochemistry 71:1539-1544pp.

11. Campbell, A.M. & Paradise, C.J. (2016). *Cellular structure and function*. Nueva York: Editorial Momentum press: applied science. 40pp.
12. Campos, M., Oropeza, M., Ponce, H., Oropeza, J., Jimenez-Estrada, M., Torres, H. & Reyes-Chilpa, R. (2003). *Relaxation of Uterine and Aortic Smooth Muscle by Glaucolides D and E from Vernonia liatroides*. Biol. Pharm. Bull. 26(1): 112-115pp.
13. Carswell, E. (2002). *Cáncer mamario: el reto de hoy*. Ciudad de México. Trillas. 320pp.
14. Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F. & Wagstaff, C. (2013). *Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people*. Int. J. Mol. Sci. 14 : 12780-12805.
15. Chavaro, N., Arroyo-Hernández, G., Alcázar, L.F., Muruchi, W.G. & Pérez-Zúñiga, I. (2009). *Cáncer cervicouterino*. Anales de Radiología México. 1:61-79pp.
16. Chen, Q., Kang, J. & Fu, C. (2018). *The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis*. Signal transduction and Targeted therapy. 3(8): 1-11pp.
17. Choudhary, G. S., Al-harbi Sayer, & Almasan, A. (2014). *Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis*. Apoptosis and Cancer, 1219: 1–9pp.
18. Ciaran, B., Stuart, I., Lawrence, S. (2007). *The natural history of cervical HVP infection: unresolved issues*. Nat Rev.(7): 11-21pp.
19. Coleman, W.B. & Tsongalis, G.J. (2017). *The molecular basis of human cancer*. 2º edición. USA, New York : Humana Press. 873pp.

20. Cooper, G.M. & Hausman, R.E. (2008). *La célula*. 4^o edición. Madrid: Marbán libros, S.L. 820pp.
21. Crow, J.M. (2012). *HPV: The global burden*. Nature. 488(7413):S2-3.
22. Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A. & Massarini, A. (2011). *Biología*. 7^o edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 1009pp.
23. De la Garza, J.G. & Juárez-Sánchez, P. (2014). *El cáncer*. Monterrey, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. 183pp.
24. De vita, V., Lawrence, T. & Rosenberg, S.A. (2015). *Cancer: principles and practice of oncology*. 10^o edición. Nueva York: Wolters Kluwer. 1296pp.
25. Dirsch, V.M., Stuppner, J., Ellmerer-Müller, E.P. & Vollmar, A.M. (2000). *Structural requirements of sesquiterpene lactones to inhibit LPS-induced nitric oxidesynthesis in RAW 264.7 macrophages*. Bioorg. Med. Chem. 8: 2747-2753pp.
26. Donegan, W.L. & Spratt, J. S. (1982). *Cáncer de mama*. 2^o edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 483pp.
27. Elena, G.A. (2002). *Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis*. Rev Arg Anest, 60 (6): 391-401pp.
28. Elmore, S. (2007). *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol. 35(4): 495-516pp.
29. Flores-Guzmán, F., Alvarado-Sansininea, J., López-Muñoz, H., Escobar, M.L., Espinosa-Trejo, M., Tavera-Hernandez, R., Jiménez-Estrada, M. & Sánchez-Sánchez, L. (2019). *Antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activity of the bentonite transformation of sesquiterpene lactone glaucolide B to 5 β -hydroxy-hirsutinolide on tumor cell lines*. European Journal of Pharmacology, 856: 172406.

30. Fouad, WA & Aanei, C. (2017). *Revisiting the hallmarks of cancer*. [Am J Cancer Res](#). May 1;7(5):1016-1036pp.
31. Gali-Muhtasib, H., Hmadi, R., Kareh, M., Tohme, R. & Darwiche, N. (2015). *Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis*. *Apoptosis* vol.12. 1531–1562pp.
32. Galluzzi, L. & Vitale, I. (2018). *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. *Cell Death & Differentiation*. (25): 486-541pp.
33. Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N. & Darwiche, N. (2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. *Drug Discovery Today*. 15 (15/16): 668-678pp.
34. Green, D. & Llambi, F. (2015). *Cell death signaling*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Dec; 7(12): a006080.
35. Guzmán, M.L., Compadre, C.M., Ordonez, P.E., Martínez, M., Balick, M., Jones, D. & Gaudio, F.G. (2018). *Hetero substituted cyclic lactone analogues and uses thereof*. Patent Application Publication. USA: 1-18pp.
36. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). *The Hallmarks of Cancer*. *Cell*, January 7, Vol. 100. 57–70pp.
37. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The next generation*. *Cell*, March 4. Vol 144: 646 – 674pp.
38. Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. & Sakuragi, N. (2014). *Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer*. *BioMed Research International*. 2014: 1-31pp.
39. Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. (2017). *Review of cancer from perspective of molecular*. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129pp.

40. Helt, A.M. & Galloway, D.A. (2003). *Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins*. *Carcinogenesis*. (2):159-69pp.
41. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>
42. International Agency of Research on Cancer (IARC). (2018). https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=484&key=total&sex=2&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=
43. Ivanescu, B., Miron, A. & Corciova, A. (2015). *Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2015: 1-21pp.
44. Jeyamohan, S., Moorthy, R.K., Kannan, M.K., & Arockiam, A.J.V. (2016). *Parthenolide induces apoptosis and autophagy through the suppression of PI3K/Akt signaling pathway in cervical cancer*. *Biotechnology Letters*. 38(8): 1251–1260pp.
45. Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A., Natale, C., Santacroce, R., Grazia di Corcia, M., Lucchese, A., ..., Farber, E. (2002). *Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review)*. *International Journal Of Oncology* 21: 165-170pp.
46. Koch, E., Klaas, C.A., Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Vichnewski, W. & Merfort, I. (2001). *Inhibition of inflammatory cytokine production and lymphocyte proliferation by structurally different sesquiterpene lactones correlates with their effect on activation of NF- κ B*. *Biochemical Pharmacology* 62: 795–801pp.

47. Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., ..., Melino, G. (2005). *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death and Differentiation (2005) 12. 1463–1467pp.*
48. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Green, D.R., ..., Melino, G. (2009). *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. January ; 16(1): 3–11pp.*
49. Liu, J., Yang, Z., Kong, Y., He, Y., Xu, Y & Cao, X. (2018). *Antitumor activity of alantolactone in lung cancer cell lines NCI-H1299 and Anip973. J Food Biochem.;43:e12972: 1-10pp.*
50. Lizarbe, M.A. (2007). *El suicidio y la muerte celular. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat: 101 (2): 1-33pp.*
51. López-Marure, R. (2003). *La regulación del ciclo celular y el cáncer. VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 6(1):40-44pp.*
52. Macarulla, M., Ramos, F. & Taberno, J. (2009). *Comprender el cáncer. AMAT. Barcelona. 117pp.*
53. Maillet, M. (2003). *Biología celular. Barcelona, España. MASSON, S.A. 537pp.*
54. Maioral, M.F., Bodack, C.N., Stefanos, N.M., Bigolin, Á., Mascarello, A., Chiaradia-Delatorre, L.D., & Santos-Silva, M.C. (2017). *Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. Biochimie, 140: 48–57pp.*
55. Majtnerová, P. & Roušar, T. (2018). *An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. Molecular Biology Reports: 1-8pp.*
56. Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009). *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer. March (9):153-166pp.*

57. Marchetti, G., Silva, K., Santos, A., Souza, I., Tinti, S., Figueira, G., Foglio, M. & Carvalho, J. (2012). *The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from Calea pinnatifida*. Journal of Experimental Pharmacology:4 157–162pp.
58. Melford, J. (2018). *A guide to cancer: origins and revelations*. Florida: CRC Press. 212pp.
59. Meshnick, S.R. (2002). *Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity*. International Journal for Parasitology, 32(13): 1655–1660pp.
60. Mitra, A.K., Agrahari, V., Mandal, A., Cholkar, K., Natarajan, C., Shah, S., Joseph, M., My Trinh, H., Vaishya, R., ..., Pal, D. (2015). *Novel delivery approaches for cancer therapeutics*. J Control Release. 219: 248–268pp.
61. Nakayama, K.I. & Nakayama, K. (2006). *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer*. Nature Review Cancer. May (6): 369-381pp.
62. Nurgali, K., Jagoe, R.T. & Abalo, R. (2018). *Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?*. Frontiers in Pharmacology, 9(245):1-3pp.
63. Otto, T. & Sicinski, P. (2017). *Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy*. Nature Reviews; 17:93-115pp.
64. Pan, L., Lantvit, D.D., Riswan, S., Kardono, L., Chai, H., Carcache de Blanco, E., Farnsworth, N., Soejarto, D.D., Swanson, S. M. & Kinghorn, A.D. (2010). *Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpenes of Rolanda fruticosa*. Phytochemistry 71: 635-640pp.
65. Park, E., Kim, J.Y., Choi, S., Kim, D.S., & Oh, Y.L. (2019) *Carcinogenic risk of human papillomavirus (HPV) genotypes and potential effects of HPV vaccines in Korea*. Sci Rep. 9(1):12556.

66. Pistrutto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D'Orazi, G. (2016). *Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies*. *AGING*. 8 (4): 603-619pp.
67. Poon, R. (2016). *Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators*. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1342: 3-19pp.
68. Quezada, M.A. (2007). *El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias*. *ContactoS* 65: 5-12pp.
69. Qi, L., & Ding, Y. (2018). *Screening of Differentiation-Specific Molecular Biomarkers for Colon Cancer*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(6): 2543–2550pp.
70. Ramírez-Agudelo, M.E. & Rojas-López, M. (2010). *La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular*. *Atreia*, 23 (2): 166-177pp.
71. Ranjan, A. & Iwakuma, T. (2016). *Non-Canonical Cell Death Induced by p53*. *Int. J. Mol. Sci.*: 17, 2068: 2-19pp.
72. Redig, A.J. & McAllister, S.S. (2013). *Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis*. *J Intern Med*. 274(2): 113–126pp.
73. Ren, Y., Yu, J. & Kinghorn, A.D. (2016). *Development of Anticancer Agents from Plant-derived Sesquiterpene Lactones*. *Curr Med Chem*. 2016 ; 23(23): 2397–2420pp.
74. Ren, Y., Muñoz-Acuña, U., Jiménez, F., García, R., Mejía, M., Chai, H., Gallucci, J., Farnsworth, N., Soejarto, D. & Kinghorn, D. (2012). *Cytotoxic and NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens**. *Tetrahedron*; 68(12): 2671–2678pp.
75. Riedl, S.J. & Shi, Y. (2004). *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. *Nature reviews*. Nov (5):897-907pp.

76. Rivero, A., Quintana, J., Eiroa, J.L., López, M., Triana, J., Bermejo, J. & Estévez, F. (2003). *Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells*. *European Journal of Pharmacology* 482: 77–84pp.
77. Rock, K.L., Kono, H. (2008). *The inflammatory response to cell death*. *Annu Rev Pathol*; 3:99–126pp.
78. Schaeue, D. & McBride, W. H. (2015). *Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(9), 527–540pp.
79. Schultz, D. R., & Harrington, W. J. (2003). *Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level*. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(6), 345–369pp.
80. Scotti, M.T., Fernandes, M.B., Ferreira, M. & Emerenciano, V. (2007). *Quantitative structure–activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.15: 2927–2934pp.
81. Sepúlveda-Robles, O., Espinoza-Gutiérrez, B., Gomez-Verjan, J., Guzmán-Gutiérrez, S.L., De Ita, M., Silva-Miranda, M., Espitia-Pinzón, C.I., Fernández-Ramírez, F. Herrera-Salazar, A. & Resyes-Chilpa, R. (2019). *Trypanocidal and toxicological assessment in vitro and in silico of three sesquiterpene lactones from Asteraceae plant species*. *Food and Chemical Toxicology* 125: 55–61pp.
82. Sharma, A., Biose, L.H. & Shanmugam, M. (2019). *Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death*. *Cancers*. 11 (1144): 1-20pp.
83. Shen, Y., Lo, K., Kuo, Y.H. & Khalil, A.T. (2005). *Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from Eupatorium kiirunense, a Coastal Plant of Taiwan*. *J. Nat. Prod*; 68: 745-750pp.
84. Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M. & Arakawa, S. (2014). *Autophagic cell death and cancer*. *Int. J. Mol. Sci.* 2014(15). 3145-3153pp.

85. Shi, Y. (2002). *Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis*. *Molecular Cell*, March 9: 459–470pp.
86. Tait, S. & Green, D. (2010). *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. *Nature reviews*. Sep (11): 621-632pp.
87. Tortora, G.J. & Derrickson, B. (2018). *Principios de Anatomía y Fisiología*. 15^o edición. Ciudad de México: Médica panamericana. 1146pp.
88. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. & Berneman, Z. (2003). *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Prolif.* 36: 131–149pp.
89. Waller, D. G., & Sampson, A. P. (2018). *Medical Pharmacology and Therapeutics*. 5^o edición. Edinburgh : Elsevier: 631–656pp.
90. Weingart, S.N., Zhang, L., Sweeney, M. & Hassett, M. (2018). *Chemotherapy medication errors*. *The Lancet Oncology*, 19(4): e191- e199pp.
91. Williams, G.H. & Stoeber, K. (2012). *The cell cycle and cancer*. *J Pathol*; 226: 352–364pp.
92. Williams, R. B., Norris, A., Slebodnick, C., Merola, J., Miller, J.S., Adriantsiferana, R., Rasamison, V. E. & Kingston, D. (2005). *Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from Vernonia pachyclada from the Madagascar Rainforest*. *Journal of Natural Products*, 68(9): 1371–1374pp.
93. Wong, Y.K., Xu, C., Kalesh, K.A., He, Y., Lin, Q., Wong, W.S.F., & Wang, J. (2017). *Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action*. *Medicinal Research Reviews*, 37(6): 1492–1517pp.
94. Yamada, M., Matsuura, N., Suzuki, H., Kurosaka, C., Hasegawa, N., Ubukata, M., Tanaka, T., Inuma, M. (2004). *Germacranolides from Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 65 :3107–3111pp.

95. Yuan, J. & Kroemer, G. (2010). *Alternative cell death mechanisms in development and beyond*. *Genes Dev* 24: 2592–2602pp.
96. Zdero, C., Bohlmann, F., Wasshausen, D. C., Mungai, M. G. (1991). *Glaucolides from old world Vernonia species*. *Phytochemistry*. 30 (12). 4025 – 4028pp.
97. Zhang, M., Liu, R.T., Zhang, P., Zhang, N., Yang, C.L., Yue, L.T., Liu, Y., Li, X. & Duan, R.S. (2017). *Parthenolide inhibits the initiation of experimental autoimmune neuritis*. *Journal of Neuroimmunology*, 305, 154–161pp.
98. Zhu, N., Tang, C., Xu, C., Ke, C., Lin, G., Jenis, J., Yao, S., Liu, H. & Ye, Y. (2019). *Cytotoxic Germacrane-Type Sesquiterpene Lactones from the Whole Plant of Carpesium lipskyi*. *J. Nat. Prod.*; 82: 919–927pp.

12. Apendice

Preparación de reactivos

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42g
NaHCO ₃ (SIGMA, USA)	2g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de bovino (SNB), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. Se almacena a 4°C.

Desactivación del suero

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

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

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

Los reactivos en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 1N y se afora a un volumen final de 1000mL. Esta solución se filtra por medio de filtros de membrana con diámetro de 42 μm , la solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Verseno

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y CT26-WT adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

Etilen-diamen-tetra-acético EDTA (SIGMA, USA)	0.4g
Cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA, USA)	8g
Cloruro de potasio (KCl) (SIGMA, USA)	0.4g
Tris (SIGMA, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Solución cristal violeta (0.1%)

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

Hidróxido de sodio (NaOH) (SIGMA, USA)	1.98g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA)	2.14g
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	0.5g

Glutaraldehído (1.1 %)

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Camptotecina

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

Paraformaldehído/glutaraldehído

Calenta en baño maría a 60 °C 20mL de PBS y agregar 0.8 g de paraformaldehído, una vez disuelto, se coloca la solución el hielo. A la solución fría se le agrega 0.8mL de glutaraldehído y se mezcla.