



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer  
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer  
Laboratorio N° 6, 2do piso, UMIEZ

**Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del  
*Pittocaulon Praecox* (fracción 56) en células tumorales de  
mama, pulmón y cérvix.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Gallegos Calderón Andrea Helena



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Luis Sánchez Sánchez**

**CDMX, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos PAPIIT IN216718, IN226420 y IN219221, CONACyT 255881 y CONACyT 258156.

## Agradecimientos

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

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por su confianza, por permitirme entrar a su grupo de trabajo y acercarme al mundo de la ciencia e investigación.

Al Dr. Hugo López Muñoz por ser un excelente profesor y una inspiración para sus alumnos, contagiando su amor por la Biología Celular y Molecular, siendo un guía fundamental durante todo este proceso.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por siempre ayudarme a resolver mis dudas, lo cual fue fundamental para mejorar este trabajo, por sus consejos, paciencia e inspirarme a siempre ser mejor.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por su paciencia, amabilidad y su constante disposición para siempre brindarnos su apoyo.

Al Dr. Albero Monroy García, por el tiempo invertido en las observaciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Fernando Flores Guzmán, por ayudarme a mejorar este trabajo por medio de sus enseñanzas y consejos.

## Dedicatorias

A mis padres, América y Leobardo. Quiero agradecerles por todo su apoyo y cariño incondicional, sin ustedes no creo que hubiera sido posible llegar hasta aquí, les agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí, los amo.

A mi familia, porque sin importar que tan diferentes seamos, siempre nos vamos a apoyar.

A mis amigas de toda la vida, Acosta, Bety y Daniela, no hay palabras para describir lo importantes que son para mí.

A Bety y Mónica, por escucharme, aconsejarme y acompañarme en esto llamado vida. Porque somos un gran equipo y siempre estamos creciendo juntas.

A Ingrid, Isabel, Miguel y Perla, por su amistad y por aportar cosas positivas a mi vida.

A Fer y Vicente, por ser de los mejores maestros y siempre ayudarme a resolver todas mis dudas. Gracias por sus consejos y por guiarme en el mundo de la investigación, les mando abrazos infinitos.

A los bebesitos, Johnny, Gala y el Güero.

A mis compañeros de laboratorio: Bety, Conejo, Karen, Jorge, Mónica, Ulises y Uriel.

## Índice.

1. Resumen .....	7
2. Marco teórico .....	8
2.1. La célula.....	8
2.2. Ciclo celular .....	8
2.3. Muerte celular .....	10
1.3.1. Necrosis .....	11
1.3.2. Apoptosis .....	12
2.4.1. Cáncer de mama .....	17
2.4.2. Cáncer de pulmón.....	18
2.4.3. Cáncer cervicouterino .....	19
2.5. Tratamientos .....	20
2.5.1. Cirugía.....	20
2.5.2. Radioterapia .....	21
2.5.3. Quimioterapia.....	21
2.6. <i>Pittocaulon praecox</i> .....	22
3. Planteamiento del problema .....	25
4. Justificación .....	26
5. Hipótesis .....	27
6. Objetivo General .....	28
6.1. Objetivos Particulares .....	28
7. Material y Método.....	29
7.1. Cultivo de células tumorales .....	29
7.2. Preparación del compuesto.....	29
7.3. Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación de cristal violeta	29

7.4. Evaluación de la actividad necrótica, cuantificando la actividad de la enzima LDH .....	30
7.5. Evaluación de la morfología celular apoptótica por microscopía de fluorescencia con tinción de DAPI .....	31
7.6. Evaluación de muerte por apoptosis mediante inmunodetección de caspasa-3 activa por microscopía de fluorescencia .....	31
7.7. Evaluación de muerte por apoptosis mediante la inmunodetección de caspasa-3 determinada por citometría de flujo .....	32
7.8. Obtención y determinación de la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE) .....	33
7.9. Evaluación de la actividad necrótica, cuantificando la actividad de la enzima LDH en linfocitos humanos .....	34
8. Resultados.....	36
8.1. Actividad antiproliferativa de la fracción 56 de <i>Pittocaulon praecox</i> en las líneas tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1.....	36
8.2. Efecto necrótico de la fracción 56 de <i>Pittocaulon praecox</i> sobre líneas de células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1.....	37
8.3. Efecto apoptótico de la fracción 56 de <i>Pittocaulon praecox</i> en las líneas tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia .....	38
8.4. Efecto apoptótico de la fracción 56 de <i>Pittocaulon praecox</i> en las células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 mediante la inmunodetección de caspasa-3 cuantificada por citometría de flujo.....	42
8.5. Actividad antiproliferativa de la fracción 56 de <i>Pittocaulon praecox</i> en células no tumorales.	44
8.4. Actividad necrótica de la fracción 56 de <i>Pittocaulon praecox</i> en células no tumorales.....	46
9. Análisis de Resultados.....	47
10. Conclusiones. ....	50
11. Referencias.....	51
12. Apendice .....	58

## 1. Resumen

El cáncer es una enfermedad producida por la transformación maligna de las células, dando como resultado una masa anormal (tumor), caracterizada por un rápido crecimiento, invasión y destrucción de los tejidos adyacentes, así como una diseminación por todo el organismo (metástasis), que es la responsable en la mayoría de los casos de la muerte del individuo afectado. Esta enfermedad posee una alta tasa de incidencia y en México es la tercera causa de muerte, algunos de los tumores malignos más frecuentes son: el cáncer de mama, con 27 mil casos, el cáncer cervicouterino y el cáncer de pulmón con casi 8 mil casos cada uno. Desafortunadamente los quimioterapéuticos que se utilizan actualmente para erradicar esta enfermedad carecen de selectividad ya que su principal mecanismo de acción es necrótico, causando efectos secundarios graves que muchas veces deterioran la vida de los pacientes y por lo tanto resultan ser poco eficaces una vez que se ha generado metástasis. Debido a esto, surge la necesidad de estudiar nuevos compuestos con actividad antitumoral. Por ello, en este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa y necrótica de la fracción 56 del extracto con acetato de etilo de los tallos de *Pittocaulon praecox* o Palo Loco

Los resultados obtenidos muestran que la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* afecta el potencial proliferativo de las líneas celulares tumorales HeLa, MDA-MB 231, SK-LU-1, con una  $IC_{50}$  de 16.52  $\mu\text{g/mL}$ , 12.53  $\mu\text{g/mL}$  y 14.5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. La evaluación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos en las concentraciones de la  $IC_{50}$  se observó que no induce muerte necrótica, sugiriendo que los efectos secundarios relacionados con la muerte necrótica serían menores y posiblemente más tolerados. Las características morfológicas de las células tratadas con la fracción indica que el proceso de eliminación de las células es a través de una muerte apoptótica, lo cual fue confirmado al observar la presencia de caspasa-3 activa por microscopía de fluorescencia y al cuantificar las células positivas a esta caspasa mediante citometría de flujo, obteniendo los siguientes porcentajes: 41.2%, 20.8% y 9.22 para las líneas HeLa, MDA-MB 231, SK-LU-1 respectivamente. Finalmente se evaluó la actividad antiproliferativa de las  $IC_{50}$  obtenidas para cada línea en cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica y se observó que la fracción 56 tiene un efecto casi nulo sobre la proliferación de éstos. Los resultados indican que la fracción 56 presenta actividad antiproliferativa y apoptótica, con baja actividad necrótica en células tumorales, así como posible actividad selectiva, sugiriendo que esta fracción es un candidato interesante para ser estudiada en modelos *in vivo*.

## 2. Marco teórico

### 2.1. La célula

La célula es la unidad básica, estructural y funcional para la vida, que consiste en un protoplasma delimitado por una membrana celular (Campbell *et al.*, 2017; Lawrence, 2003). Cada organismo o bien es una única célula o está formado por varias células. Por lo tanto, se puede apreciar las capacidades y limitaciones de los organismos vivos si se logra comprender cómo están constituidas las células y cómo realizan las complicadas funciones necesarias para la vida (Becker *et al.*, 2007).

A pesar de su gran diversidad, las células comparten una maquinaria muy similar con la que llevan a cabo funciones básicas como: obtener energía y nutrientes de su entorno, sintetizar proteínas y otras moléculas necesarias para crecer y repararse, eliminar los desechos y responder a estímulos, como la proliferación. Esta es una de las funciones más importantes ya que de esta manera se asegura la continuidad de la vida. (Audesirk *et al.*, 2013; O'Connor y Adams, 2010).

### 2.2. Ciclo celular

“Todas las células provienen de células.” Esta noción, establecida por el médico alemán Rudolf Virchow a mediados del siglo XIX, expresa la importancia crucial de la reproducción celular para todos los organismos vivos (Audesirk *et al.*, 2013). Su propósito es la transmisión de información genética a la próxima generación, este proceso es conocido como división celular o ciclo celular y se define como una serie de eventos en donde la célula crece, duplica su material genético y se divide para dar lugar a dos células hijas (Alberts *et al.*, 2016; López, 2003; Pardee y Stein, 2009). Cabe mencionar que el ciclo celular está altamente regulado por diferentes proteínas que monitorean la integridad genética para determinar cualquier daño genético (Otto y Sicinski, 2017).

La mayoría de los autores dividen al ciclo celular principalmente en dos fases: la interfase y la fase M, pero Williams y Stoeber, (2011) mencionan que hay cuatro fases: G1, S, G2 y M. La fase G1, donde la célula puede responder al efecto de factores estimuladores o inhibidores de la proliferación, crece de tamaño, duplica sus organelos citoplasmáticos y sintetiza los ARN y proteínas requeridas para la síntesis de ADN; la fase S, en la cual las células duplican su material genético y se sintetizan histonas y proteínas asociadas con el ADN; la fase G2, en donde las

células continúan creciendo, acumulando las proteínas necesarias para la fase M, así como los lípidos necesarios para la formación de membranas, finalmente la fase M es cuando la célula se divide (Curtis *et al.*, 2013; Lodish *et al.*, 2016; López, 2003).

Es necesario controlar estrictamente el proceso del ciclo celular, por ello la transición de una fase a la siguiente se monitorea mediante mecanismos de sensores, llamados puntos de control, que mantienen el orden correcto de los eventos y son ejecutadas por proteínas especializadas. Dos grupos de proteínas son esenciales para el control del ciclo celular, las llamadas ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDK). Las cinasas son enzimas especializadas que transfieren grupos fosfato principalmente de ATP a sustratos específicos, y por lo tanto, son fosfotransferasas (Behl y Ziegler, 2014; Williams y Stoeber, 2011). Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son una familia de cinasas de serina/treonina que no tienen actividad cinasa a menos que estén asociadas con una subunidad reguladora de ciclina (Lodish *et al.*, 2016). Estas ciclinas se sintetizan y se destruyen en momentos específicos durante el ciclo celular, regulando así la actividad de la cinasa de manera oportuna (Malumbres y Barbacid, 2009).

La actividad de las CDK involucradas en la regulación del ciclo celular es inducida por señales mitogénicas que se detectan primero mediante la expresión de las ciclinas de tipo D que se unen y activan preferentemente CDK4 y CDK6 durante G1, una fase del ciclo celular en el que las células se preparan para iniciar la síntesis de ADN. El complejo ciclina D-CDK4/6 fosforila a la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (RB) permitiendo así, que el factor de transcripción E2F puedan activar una gran cantidad de genes involucrados en la progresión del ciclo celular de G1 a la fase S (Malumbres y Barbacid, 2009; Otto y Sicinski, 2017). E2F se encarga de activar las ciclinas E y A. En G1 también se forman los complejos de ciclina E-CDK2 que fosforilan varias proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular, la replicación del ADN y la duplicación del centrosoma. Durante la fase S, la ciclina E se degrada rápidamente y CDK2 se asocia con la ciclina A recién sintetizada durante las últimas etapas de la replicación del ADN, para formar complejos de ciclina A-CDK2 y de esta manera conducir la transición de la fase S a la mitosis, un período conocido como la fase G2. (Malumbres y Barbacid, 2009; Otto y Sicinski, 2017; Satyanarayana y Kaldis, 2009). La transición de G2 a la mitosis (profase, metafase, anafase, telofase) está regulada por CDK1 en asociación principalmente con la ciclina B, este complejo se transloca al núcleo y desencadena el inicio de cambios mitóticos (Figura 1) (Mendelsohn *et al.*, 2015).

Durante el proceso de replicación del ADN, este puede dañarse durante el proceso del ciclo celular, ya que las biomoléculas son altamente susceptibles a los cambios químicos como, los inducidos por la luz UV o la radiación ionizante. Para mantener la función correcta de la célula, el ADN debe mantener su integridad, estabilidad y función. Por ello existen diferentes proteínas que monitorean la correcta replicación del ADN (Behl y Ziegler, 2014). Si alguno de estos mecanismos de control detectan eventos anormales o incompletos del ciclo celular, las vías de control llevan la señal a los efectores que pueden desencadenar la detención del ciclo celular hasta que se resuelva el problema, si el daño es muy grave se induce a la célula a apoptosis (Williams y Stoeber, 2011). Una falla en la regulación en el mecanismo de control del ciclo celular lleva a una proliferación celular excesiva y como consecuencia la aparición del cáncer (López, 2003).

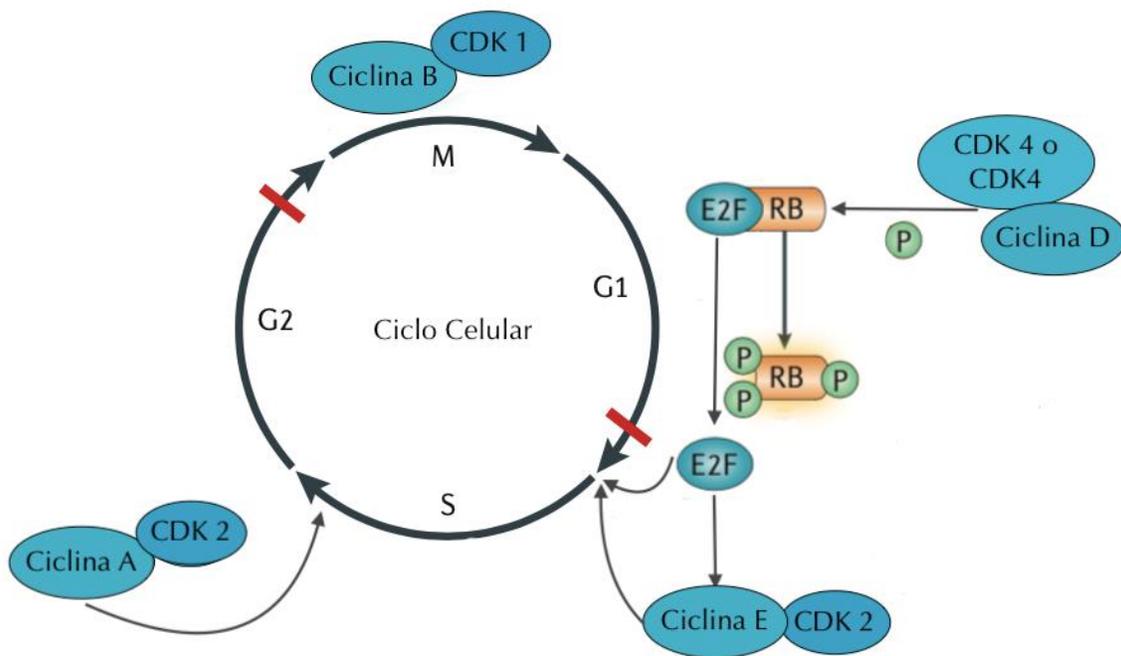


Figura 1. Progresión del ciclo celular y principales proteínas reguladoras. Las señales mitogénicas activan complejos de ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDK) que promueven la progresión de las diferentes fases del ciclo celular. (Tomado y modificado de Leemans *et al.*, 2018).

### 2.3. Muerte celular

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, aunque las células

también mueren cuando se dañan o infectan, lo que garantiza su eliminación antes de que amenacen la salud del organismo. Este proceso se encarga de regular y asegurar el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular, de esta manera se mantiene un equilibrio entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento (Alberts *et al.*, 2016; Lizarbe, 2007).

Las células inician un proceso de muerte, se involucran en un proceso que es reversible hasta que se traspasa un "punto de no retorno", pero realmente no hay un evento bioquímico definitivo que se pueda considerar como un punto de no retorno. Por esta razón el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD, por sus siglas en inglés) propone que una célula debería considerarse muerta cuando se cumple alguno de los siguientes criterios morfológicos o moleculares: la célula ha perdido la integridad de su membrana plasmática, la célula (incluido su núcleo) ha sufrido una fragmentación en cuerpos discretos y/o sus fragmentos han sido engullidos por una célula adyacente (Kroemer *et al.*, 2009). Históricamente, se han distinguido tres tipos de muerte celular en células de mamíferos, y se caracterizan de acuerdo a su morfología: necrosis, apoptosis y autofagia (Golstein y Kroemer, 2007).

### 1.3.1. Necrosis

La necrosis, es un tipo de muerte celular que generalmente ocurre en las células que no han alcanzado su tiempo de vida completo y que por medio de un estímulo externo son forzadas a interrumpir sus funciones vitales, alterándose su integridad física (Enríquez-Mejía, 2013). Esto puede ocurrir simplemente como consecuencia de un daño tan extenso que la integridad de la célula se ve afectada, originado por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y resistencia (Green y Llambi, 2015; Lizarbe, 2007).

En este tipo de muerte se considera que la célula es un sistema biológico pasivo y sigue un proceso que no requiere gasto de energía, ya que no depende de ningún mecanismo fisiológico, provocando daño directo a las membranas celulares causando la ruptura de esta y liberando el contenido citoplasmático (Elmore, 2007; Heras, 2002; Yuan y Kroemer, 2012).

Las características morfológicas de una muerte necrótica comprenden una ganancia en el volumen celular (oncosis), hinchazón de los orgánulos, rotura de la membrana plasmática y pérdida subsiguiente de contenidos intracelulares (Kroemer *et al.*, 2009). El ADN es partido en

fragmentos irregulares y debido a la pérdida de la membrana celular el contenido citoplasmático es vertido al espacio extracelular, liberando de forma incontrolada moléculas como HMGB1 y LDH desde las células moribundas hacia el espacio extracelular, produciéndose la atracción de células inmunes en el área o activa la reparación de heridas, generando un proceso de inflamación (Figura 2) (Adolfo, 2002; Enríquez-Mejía, 2013; Lee *et al.*, 2018).

Las causas que pueden provocar necrosis celular son múltiples, entre ellas cabe mencionar la falta de oxígeno (hipóxia), la isquemia, alteraciones del pH, traumatismo, exposición a radiación ionizante, la acción de sustancias químicas, altas temperaturas o estrés mecánico (Green y Llambi, 2015; Lizarbe, 2007).

Durante mucho tiempo, la necrosis se ha definido como un tipo de muerte celular que carece de las características de la apoptosis y autofagia, pero investigaciones recientes sugieren que su aparición y curso podrían estar estrictamente regulados (Golstein y Kroemer, 2007). Esto puede ser como consecuencia de un extenso cruce entre varios eventos bioquímicos y moleculares a diferente nivel celular (Festjens, 2006).

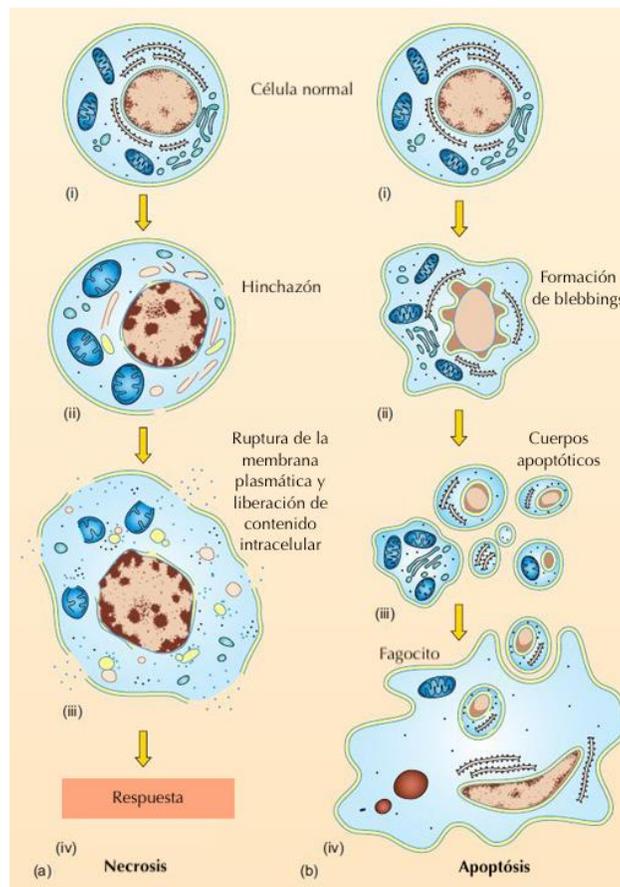
### 1.3.2. Apoptosis

En 1972 se descubrió el proceso fisiológico de apoptosis que fue dominio de estudios histológicos hasta finales de los años 80 y a principios de los 90 se caracterizaron los mecanismos genéticos y moleculares involucrados (Adolfo, 2002). La expresión "apoptosis" ha sido acuñada por Kerr JF en 1972 para describir un aspecto morfológico específico de la muerte celular, se denominó de esta manera por la raíz griega *apostatar*, que define la caída de las hojas de los árboles en el otoño (Navas *et al.*, 2009).

La apoptosis o muerte celular programada se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos (Lizarbe, 2007). Este proceso se considera un regulador clave del control del crecimiento fisiológico y la regulación de la homeostasis de los tejidos (Fulda y Debatin, 2006).

La muerte celular apoptótica se acompaña por un redondeamiento y reducción del volumen celular (compactación celular o picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrexis), pequeñas o casi ninguna modificación ultraestructural de los orgánulos

citoplásmicos, formación de protuberancias o blebbings de la membrana plasmática (manteniendo la integridad de ésta hasta las etapas finales del proceso), eventualmente, las células se rompen en pequeños fragmentos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos), que se eliminan mediante fagocitosis sin incitar una respuesta inflamatoria (Kroemer *et al.*, 2009; Lowe y Lin, 2000; Reed, 2000). Este tipo de muerte celular es más limpio que la necrosis; ya que la membrana celular no se destruye sino que engloba a los cuerpos apoptóticos o material celular y por lo tanto no se produce inflamación ya que las células fagocitarias reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos (Figura 2) (Lizarbe, 2007).



**Figura 2.** Principales características morfológicas de una célula necrótica y una apoptótica. (Tomado y modificada de <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/biology/introduction-histopathology/content-section-3.1>).

Los procesos apoptóticos pueden ser activados bien por una inducción negativa (como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean) o por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas (Jordán, 2003). En cualquier caso,

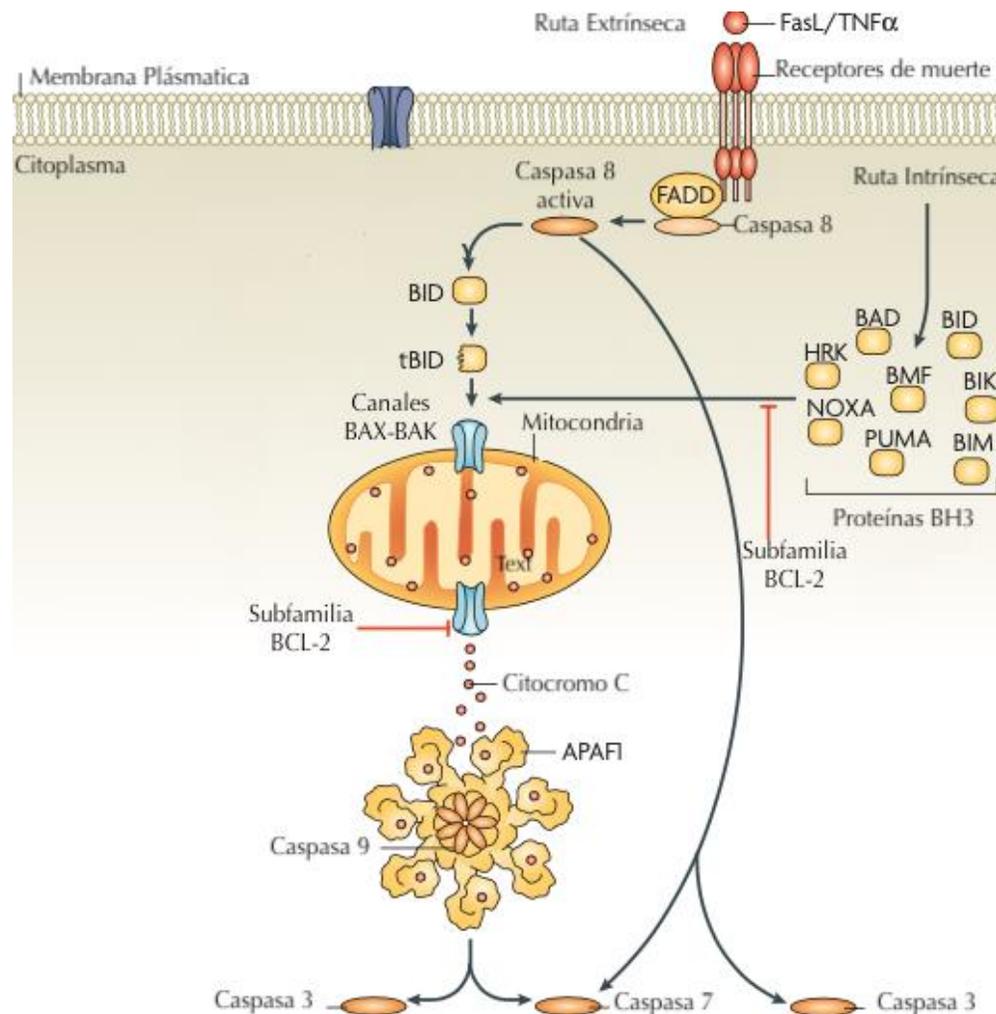
se van a activar los componentes clave de la apoptosis; las caspasas, una familia de cisteín-proteasas que degradan sus sustratos en residuos de ácido aspártico (Rojas *et al.*, 2009). Las caspasas normalmente están presentes en las células sanas como enzimas precursoras inactivas (zimógenos) con poca o ninguna actividad proteasa. Sin embargo, todos los estímulos que desencadenan la apoptosis parecen hacerlo iniciando eventos que culminan en la activación de las caspasas, aunque de maneras algo diferentes. Hasta la fecha, se han establecido firmemente tres rutas principales para la activación de caspasas asociadas a apoptosis en mamíferos (Taylor *et al.*, 2008). Independientemente que ruta se active, las caspasas pueden ser agrupadas de acuerdo a su especificidad o a su similitud en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, desde un punto de vista funcional las caspasas pueden ser vistas como caspasas iniciadoras (Caspasas 2, 8, 9 y 10) que degradan proformas inactivas de las caspasas efectoras, activándolas a su vez, o bien como caspasas efectoras (Caspasas 3, 6 y 7) que degradan otros sustratos proteicos dentro de las células para disparar los procesos apoptóticos (Figura 3) (Rojas *et al.*, 2009).

- Vía extrínseca. El término de apoptosis extrínseca se ha utilizado ampliamente para indicar los casos de muerte celular apoptótica que son inducidos por señales de estrés extracelulares, que son detectadas y propagadas por receptores transmembranales. La apoptosis extrínseca es iniciada tras la unión de ligandos específicos, tales como FAS ligando (FAS-L), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) o el miembro 10 de la subfamilia del TNF (TNFSF10/APO2-L), también conocido como TRAIL-L a los receptores de muerte FAS-R/CD95-R, TNF-R1 y TRAIL-R, -R2, respectivamente (Galluzzi *et al.*, 2012). Cuando se une el ligando a su receptor se recluta la proteína que contiene el dominio de muerte (FADD) y la pro-caspasa-8, agregándose para convertirse en el complejo de señalización inductora de la muerte (DISC) (Ouyang *et al.*, 2012). En consecuencia, el complejo proteico activa a la caspasa-8 que transduce la señal de apoptosis mediante la activación de caspasa-3 o la escisión de Bid a Bid truncada y de esta manera se activa la vía intrínseca (Chen *et al.*, 2018).

- Vía intrínseca. La vía mitocondrial de la apoptosis, también llamada vía intrínseca, es el mecanismo más común de apoptosis en los vertebrados (Green y Llambi, 2015). Esta vía es iniciada por una serie de perturbaciones microambientales como el daño del ADN, estrés del retículo endoplásmico, sobrecarga de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), entre otros y es mediada por la mitocondria en respuesta a estímulos apoptóticos de diversas proteínas que son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el

citoplasma (Galluzzi y Vitale, 2018). Las moléculas que se liberan son el citocromo c, que se combina con APAF-1 para promover la activación de caspasa-9, la cual activa a las caspasas efectoras, como la 3 y la 7 (Chen *et al.*, 2018).

La desregulación de la muerte celular está involucrada en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades humanas, más del 50 % de las neoplasias tienen defectos en la maquinaria apoptótica. Entre las mejores caracterizadas de estas anomalías están la expresión aumentada de la familia de las proteínas BCL2 y las mutaciones en el gen supresor del tumor TP53, que codifica la proteína tumoral p53. Esta proteína inicia la apoptosis en respuesta al daño del ADN por inducción transcripcional de muchas proteínas proapoptóticas, que incluyen a PUMA, NOXA, y BAX. Los defectos heredados en TP53 resultan en numerosas neoplasias (Hotchkiss, *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Rutas de señalización de la ruta intrínseca y extrínseca de la apoptosis. (Tomado y modificado de Taylor *et al.*, 2008).

## 2.4. Cáncer

El cáncer es una enfermedad producida por la transformación maligna de las células, resulta de una serie de cambios genéticos que interfieren con el control de algunos de los procesos fundamentales que lleva a cabo la célula, como son: la proliferación, la diferenciación, la muerte celular y la estabilidad genética (López, 2013). Esto da como resultado una masa anormal (tumor), caracterizada por un rápido crecimiento, invasión y destrucción de los tejidos adyacentes y una diseminación por todo el organismo (metástasis), que es la responsable en la mayoría de los casos de la muerte del individuo afectado (Granados, *et al.*, 2006). La metástasis es un paso clave en la progresión del cáncer que indica una etapa más avanzada y un peor pronóstico. Para que se lleve a cabo este proceso se observaron procesos celulares como la degradación de la matriz extracelular (MEC), la transición epitelial a mesenquimatoso (EMT), la angiogénesis tumoral, el desarrollo de un microambiente tumoral inflamatorio que han demostrado ser esenciales para la metástasis del cáncer (Su *et al.*, 2015).

Se han descrito unas 200 variedades de esta enfermedad, cuyas propiedades y tratamientos son diferentes (Pardee y Stein, 2009). Pero dependiendo del tejido de origen se encuentran tres principales subtipos: Los primeros llevan el nombre de carcinomas y proceden de tejidos epiteliales como la piel o epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales. Los sarcomas que provienen de las células del tejido conectivo como huesos, músculos y tejido adiposo. El último subtipo son las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas (Pecorino, 2008).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2018), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2018, ocasionó 9,5 millones de defunciones. En México el cáncer es la tercera causa de muertes, donde algunos de los tumores malignos más frecuentes son: el cáncer de mama, con 27 mil casos, el cáncer cervicouterino y el cáncer de pulmón con casi 8 mil casos cada uno (Ferlay *et al.*, 2018; Secretaría de Salud, 2017). Se calcula que en las siguientes dos décadas los casos nuevos de cáncer aumenten en un 70%, lo cual ha ocasionado que las acciones para su prevención y tratamiento tengan especial relevancia en los sistemas de salud, ya que al tratarse de una enfermedad crónico-degenerativa, los costos de la lucha contra ésta patología son muy altos (INEGI, 2017). A continuación, se describen algunos tipos de cáncer con alta tasa de mortalidad en México.

### 2.4.1. Cáncer de mama

La mama se compone de la glándula mamaria, que tiene entre 15 y 20 lóbulos o compartimentos separados por una cantidad variable de tejido adiposo. En cada lóbulo hay varios compartimentos más pequeños llamados lobulillos, compuestos por racimos de glándulas secretoras de leche denominados alvéolos. Cuando se produce la leche va 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 y Derrickson, 2018).

Muchos autores han definido al cáncer de mama como una enfermedad heterogénea. Esto se debe a que se puede clasificar de varias maneras; según sus características clínicas, sus características moleculares, su respuesta a los tratamientos y su tipo histológico (Li *et al.*, 2012). Sin embargo, el cáncer de mama se puede clasificar en términos generales en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo (infiltrante). El carcinoma de mama *in situ* se subclasifica además como ductal o lobular: el carcinoma ductal (el más frecuente) comienza en los ductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón y el carcinoma lobulillar comienza en los lobulillos que producen la leche materna (Guzmán-Santos *et al.*, 2012; Malhotra *et al.*, 2010).

Las etapas que se utilizan para determinar qué tan grave es el cáncer y así averiguar si el cáncer se ha propagado, se describen a continuación de acuerdo a Carswell, (2002).

- Etapa 0: El tumor puede considerarse benigno, porque no ha roto el tejido epitelial que lo rodea y no hay invasión a otras partes.
- Etapa I: Es cuando el tumor tiene menos de 2 cm de diámetro y no se ha extendido fuera de la glándula mamaria ni ha afectado los ganglios.
- Etapa II: El tumor mide de 2 a 5 cm y ya se ha extendido a los ganglios que están en la axila, pero en una cantidad menor de tres ganglios afectados
- Etapa III: Significa que el tumor ya mide más de 5 cm y se ha extendido a más de tres ganglios de la axila o a otros tejidos cercanos al pecho.
- Etapa IV: El tumor ya se ha extendido a otros órganos del cuerpo, como pueden ser los pulmones, huesos, hígado o el cerebro.

El cáncer es considerado un desorden multifactorial causado tanto por factores genéticos como no genéticos, dichos factores están asociados con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, pero la mayoría de estos factores pueden variar de una persona a otra (DeVita, *et al.*, 2015; Guzmán-Santos *et al.*, 2012). Entre los factores de riesgo que destacan son los siguientes: antecedentes familiares con cáncer de mama, mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, las hormonas reproductivas femeninas (particularmente los estrógenos endógenos), el exceso de exposición a la radiación ionizante, los estilos de vida modernos, como el consumo excesivo de alcohol y el consumo excesivo de grasas en la dieta (DeVita, *et al.*, 2015; Rojas y Stuckey, 2016; Sun *et al.*, 2017).

#### 2.4.2. Cáncer de pulmón

Los pulmones son órganos pares, de forma cónica, situados en la cavidad torácica. Dos capas de serosa, que constituyen la membrana pleural, encierran y protegen a cada pulmón. La capa superficial, denominada pleura parietal, tapiza la pared de la cavidad torácica; la capa profunda o pleura visceral reviste a los pulmones. Entre la pleura visceral y la parietal hay un pequeño espacio, la cavidad pleural, que contiene un escaso volumen de líquido lubricante, el cual reduce el rozamiento entre las membranas. Este líquido también hace que las dos pleuras se adhieran entre sí (Tortora y Derrickson, 2018).

De acuerdo con Pardo, (1988) y Felip *et al.*, (2007) existe una gran variedad de tumores pulmonares, por ello una de las clasificaciones histológicas más ampliamente utilizadas es la de la Organización Mundial de la Salud. Existen dos subtipos principales de cáncer de pulmón: el carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), que representan el 15% y el 85% de todos los cánceres de pulmón, respectivamente (Pao y Girard, 2011; Zappa y Mousa, 2016). El cáncer de pulmón de células no pequeñas se puede clasificar en tres tipos principales:

- Carcinoma de células escamosas, el cual surge de las células epiteliales de las vías respiratorias que tienen una ubicación central en los bronquios principales.
- Adenocarcinoma, que surge de células alveolares epiteliales pequeñas que secretan moco y otras sustancias. Tiende a ocurrir en la periferia del pulmón.
- Carcinoma de células grandes. Este tipo de carcinoma no cumple los criterios de un adenocarcinoma, de un carcinoma epidermoide o de un carcinoma de células pequeñas y a menudo surge en la parte central de los pulmones (Zappa y Mousa, 2016).

El factor de riesgo predominante para el cáncer de pulmón es el tabaco. Varias exposiciones ambientales adicionales como el asbesto, el arsénico, el cromo, el níquel, los compuestos aromáticos policíclicos, el radón, el cloruro de vinilo y la contaminación del aire también han sido implicados en la etiología de este tipo de cáncer, cabe mencionar que en años recientes los estudios realizados tanto en Europa como en China han proporcionado evidencia de que la contaminación del aire por partículas contribuye a la incidencia de esta enfermedad. (Roth *et al.*, 2014; Testa *et al.*, 2018).

### 2.4.3. Cáncer cervicouterino

El útero se encuentra situado entre la vejiga urinaria y el recto, tiene el tamaño y la forma de una pera invertida. Las subdivisiones anatómicas del útero son 3: el fondo uterino, el cuerpo uterino, y el cuello o cérvix, que se abre hacia la vagina (Tortora y Derrickson, 2018). El cuello uterino se puede dividir en dos partes, cada una cubierta con dos tipos diferentes de células: el ectocérvix que está recubierto de epitelio estratificado no queratinizante y el endocérvix que está recubierto por epitelio columnar (glandular) que consta de una sola capa de células cilíndricas mucosecretoras. El punto en que el epitelio escamoso se reúne con el columnar se le denomina unión escamocolumnar y cuando el epitelio columnar se sustituye por epitelio escamoso se le conoce como zona de transformación. La transformación normal de un tipo celular maduro en otro es llamada metaplasia y cuando ésta ocurre, existe siempre un potencial neoplásico (Chavaro *et al.*, 2009; De Palo *et al.*, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce dos tipos histológicos principales de cáncer invasivo: Carcinoma de células escamosas, que se origina a expensas del epitelio pavimentoso y constituye cerca del 75% de todos los casos y el adenocarcinoma que constituye cerca del 15-25% de todos los casos, su pronóstico suele ser peor que el del carcinoma de células escamosas y se produce a partir del epitelio columnar del cuello uterino (Chavaro *et al.*, 2009; Vela *et al.*, 2016).

La causa principal de las lesiones cervicales precancerosas y cancerosas es la infección por el papiloma virus humano (VPH). La mayoría de los casos se producen como resultado de una infección con el VPH 16 y 18 (Momenimovahed y Salehiniya, 2017). Cualquier mujer que sea sexualmente activa está en riesgo de infección por VPH, pero cuantas más parejas sexuales

tenga una mujer, mayor será la probabilidad de infectarse y, por lo tanto, de desarrollar cáncer cervicouterino (Spencer, 2007).

Otro factor importante es fumar, esto se atribuye a la inducción de un efecto inmunosupresor causado por los metabolitos del tabaco que podría producir un efecto perjudicial sobre la capacidad de desarrollar una respuesta inmune efectiva contra las infecciones virales. Además, los químicos que se encuentran en los cigarrillos, como la nicotina, que pueden causar daño al ADN en las células epiteliales escamosas, también se han encontrado en el moco cervical de las mujeres fumadoras (Roura *et al.*, 2014). Hay autores que consideran el bajo nivel socioeconómico como factor de riesgo, ya que el acceso a pruebas de detección preventivas periódicas, son extremadamente efectivas para detectar los primeros signos de cáncer cervical y la dificultad en el acceso a estas pruebas de detección hace vulnerable a esta población (Spencer, 2007).

## 2.5. Tratamientos

En las últimas tres décadas se han realizado importantes avances en el tratamiento del cáncer. Tanto en hombres como en mujeres, de 1992 a 2003, las tasas de mortalidad por cáncer han disminuido debido a un decremento en el consumo de tabaco, mejores técnicas de detección y avances en el tratamiento. Los enfoques principales para tratar a los pacientes con cáncer son: cirugía, radiación y quimioterapia. La elección del tratamiento depende de varios factores: el órgano o tejido en el que se originó el cáncer, el tipo de cáncer determinado por el patólogo, factores biológicos específicos analizados en el laboratorio y la etapa del cáncer determinada por el sistema TNM (Pardee y Stein, 2009). El objetivo deseable del tratamiento oncológico es erradicar la enfermedad, pero cuando esto no es posible, se aspira a prolongar la esperanza de vida (Granados *et al.*, 2016).

### 2.5.1. Cirugía

Se selecciona la cirugía si el cáncer está limitado a una zona y se prevé que podrían extirparse todas las células tumorales sin dañar excesivamente las estructuras vitales. La extirpación del tumor puede ser el único tratamiento o puede estar combinado con quimioterapia o radioterapia. Tanto la quimioterapia como la radioterapia pueden administrarse antes o después de la cirugía. Este tratamiento no se recomienda si el riesgo de la intervención quirúrgica es mayor que el riesgo que acarrea el cáncer (G. de la Garza y Juárez, 2014; Skeel y Khleif, 2011).

### 2.5.2. Radioterapia

La radiación es la propagación de energía en forma de ondas electromagnéticas o partículas subatómicas a través del vacío o un medio material. La radiación propagada en forma de ondas electromagnéticas (rayos UV, ondas de radio, luz visible, rayos gamma, rayos X, entre otros) se llama radiación electromagnética, mientras que la radiación corpuscular es la radiación transmitida en forma de partículas subatómicas (partículas alfa, partículas beta, neutrones, entre otros). La radiación puede ser ionizante o no ionizante. La radioterapia utiliza radiación ionizante con fines curativos, paliativos o adyuvantes (Granados *et al.*, 2016). La radiación ionizante puede actuar directamente sobre el ADN de la célula y causar daños, aunque también puede actuar indirectamente, donde la radiación ionizante actúa sobre el agua, que es el componente más importante del medio, dando lugar a la producción de radicales libres que son los que producen el daño al ADN (Baskar *et al.*, 2014; Rizo *et al.*, 2016).

La radioterapia se utiliza para el tratamiento de la enfermedad local o regional del cáncer y consiste en la administración de radiación ionizante para erradicar o eliminar células tumorales, sin sobrepasar los límites tolerables para los tejidos normales. Su objetivo se basa en un aumento del control local del tumor y en consecuencia, conseguir un aumento de la supervivencia (Rizo *et al.*, 2016; Skeel y Khleif, 2011). Este tratamiento puede usarse por sí solo o en conjunto con la cirugía o quimioterapia y se aplica de dos maneras: ya sea que los rayos de alta energía se dirigen desde una máquina (radiación externa) o implantes se colocan en el cuerpo cerca del tumor (American Cancer Society, 2017).

### 2.5.3. Quimioterapia

Su papel principal es tratar la enfermedad que ya no está limitada a una localización y consiste en tratar el cáncer con medicamentos de acción fuerte que por lo general se inyectan a través de una vena o se administran oralmente y en la mayoría de los casos se emplea más de un medicamento de quimioterapia (American Cancer Society, 2017). Se conoce un gran número de estos productos, que de acuerdo a su naturaleza se clasifican como: naturales, sintéticos y semisintéticos y por su mecanismo de acción se clasifican como: citotóxicos y citostáticos (G. de la Garza y Juárez, 2014).

La cantidad de fármaco administrado, así como la duración del tratamiento dependerá del grado de la enfermedad y del tipo de cáncer. En pacientes terminales o metastásicos estos compuestos suelen ser ineficientes, ya que en estas etapas se debe aumentar la dosis y duración del tratamiento y esto agrava los efectos secundarios, los cuáles también están relacionados con su alta actividad necrótica y su falta de selectividad, debido a que no sólo van a ejercer su efecto sobre las células tumorales sino también sobre las células normales con alta tasa de proliferación, como las de la médula ósea, el tracto gastrointestinal, las gónadas y los folículos pilosos. (American Cancer Society, 2017; Avendaño y Menéndez, 2008; Ferreiro *et al.*, 2003; Pardee y Stein, 2009).

Otra limitante de la quimioterapia es la resistencia de las células tumorales a los medicamentos. Después del desarrollo de un mecanismo de resistencia en respuesta a un solo fármaco, las células pueden mostrar resistencia cruzada a otros fármacos no relacionados estructuralmente, un fenómeno conocido como resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Avendaño y Menéndez, 2008).

Algunos de los quimioterapéuticos más utilizados son: antraciclinas, antimicrotúbulos (taxanos), alquilantes (ciclofosfamida), antimetabolitos (5-fluorouracilo, capecitabina), compuestos de platino (cisplatino) y sus efectos secundarios van desde las náuseas, los vómitos y la alopecia reversible hasta efectos cardíacos, insuficiencia renal o hepática, toxicidad hematológica, toxicidad gastrointestinal, toxicidad por neutropenia febril, entre otros (Al-Mahayri *et al.*, 2020).

La quimioterapia es un componente indispensable de la terapia sistémica en muchos casos de cáncer. La reducción de los efectos secundarios de ésta puede mejorar la calidad de vida de los pacientes y prevenir el rechazo del tratamiento por parte de éstos. Por ello, el desafío que aún enfrenta este tratamiento es cómo minimizar la toxicidad y maximizar la actividad antineoplásica, en este sentido, es imprescindible la búsqueda y el desarrollo de nuevos fármacos efectivos, con actividad antineoplásica y de acción selectiva.

## 2.6. *Pittocaulon praecox*

El cáncer es un problema de salud pública y a la fecha no existe un tratamiento adecuado para esta enfermedad. Sin embargo, los productos naturales aislados de plantas terrestres han ayudado a combatirlo (Loraine y Méndez-Espinoza, 2010). Los productos naturales son una rica

fuerza de compuestos con prometedor potencial terapéutico contra el cáncer, entre los cuales destacan los alcaloides de la vinca, taxanos, campotecinas, entre otros. Los sesquiterpenos representan un grupo de compuestos naturales con diversos tipos de estructuras. Entre ellos, los sesquiterpenos de tipo eremofilano, que incluyen eremofilanos, furanoeremofilanos, eremofilanólidos, se encuentran presentes en plantas de la familia Asteraceae (Agulló-Ortuño *et al.*, 2017).

El género *Pittocaulon* también conocido como “palo loco”, pertenece a la familia Asteraceae y son un grupo de plantas que se utilizan en la medicina tradicional mexicana contra el reumatismo y para curar heridas, además se ha descrito que contienen compuestos como alcaloides pirrolizidínicos, eremofilanos y flavonoides (González, 2010).

*Pittocaulon praecox* es la especie más ampliamente distribuida del género y la más estudiada química y morfológicamente. Existen varios estudios químicos de esta especie, donde se han aislado compuestos como la precoxilina, el alcaloide senecionina, eremofilanos, un furanoeremofilano, tres mezclas complejas de furanoeremofilanos, 2 glúcidos de eremofilano, 3 eremofilanólidos y 7 eremofilanos (Gonzales, 2013).

Los eremofilanos son un tipo de sesquiterpenos que se caracterizan por tener moléculas de 15 átomos de carbono, formadas por tres unidades de isopreno, cuyo esqueleto base se compone de dos anillos de seis miembros y cuatro grupos metilo, pueden tener diferentes grados de oxidación y la mayoría se encuentran como furanoeremofilano (que posee un anillo furánico en su estructura) o eremofilanoides y en algunos casos eremofilanos modificados (Figura 4). Cabe mencionar que algunos autores proponen que los eremofilanos podrían surgir de un precursor eudesmanolide (Romo de Vivar *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2016).

En la literatura se puede encontrar diversos eremofilanos con actividad biológica, una de ellas es la actividad antiproliferativa frente a células cancerosas de colon (HCT-15), de mama (MCF-7), del sistema nervioso central (U-251), de próstata (PC-5), y leucemia (K562) (Romo de Vivar *et al.*, 2008). Otro estudio fue realizado por Wang *et al.*, (2008) utilizando líneas celulares de cáncer de pulmón (A-549) y cáncer de estómago (BCG823) donde obtuvieron una IC<sub>50</sub> de 10.27 µg/mL y 31.34 µg/mL respectivamente. Beattie *et al.*, (2011) evaluó la actividad citotóxica de los aceites y compuestos puros contra células de linfoblastos de ratón P388D obteniendo una IC<sub>50</sub> de 51–110 µg/ mL, también se aisló un eremofilano el cual tuvo gran actividad reportando una IC<sub>50</sub> de

42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . McDonald *et al.*, (2004) reportó un nuevo sesquiterpeno eremofilano 07H239-A aislado de un organismo de la familia *Xylariaceae*, el cual presentó propiedades citotóxicas (con una  $\text{IC}_{50}$  de 3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en contra de una variedad de líneas celulares de cáncer, mostrando cierta selectividad en la línea de leucemia CCRFCEM ( $\text{IC}_{50}$  de 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

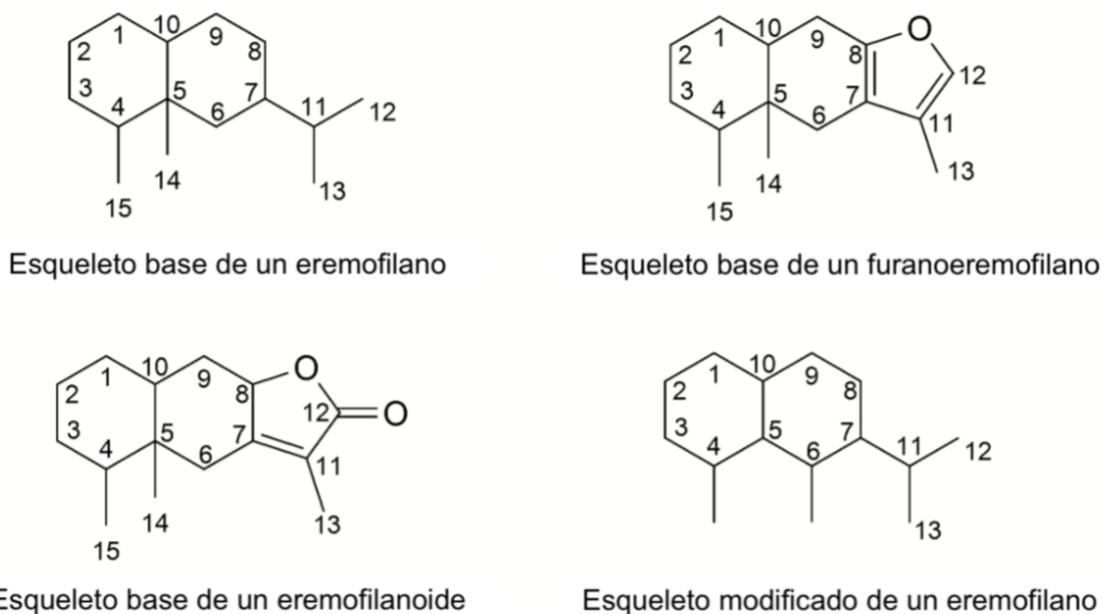


Figura 4. Tipos de esqueleto base de los eremofilanos. (Tomado y modificado de Wu *et al.*, 2016).

González (2019), reporta los componentes presentes en *Pittocaulon praecox* y su actividad citotóxica. En este estudio, a partir del tallo de la planta se obtuvo un extracto de Acetato de Etilo, del cual se obtuvieron diferentes fracciones mediante cromatografía de columna abierta y las que presentaron mejor separación y rendimiento se utilizaron para hacer pruebas de citotoxicidad, así como la identificación de los compuestos presentes en dichas fracciones. Una de las fracciones que se utilizaron en este estudio fue la 56, en la que se identificaron diferentes furanoeremofilanos y se realizaron pruebas biológicas donde se encontró que presentaba actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares U251, PC-3, K562, HTC15, MFC-7 y SK-LU y baja actividad necrótica sobre la línea HeLa.

Como se ha descrito, en la mayoría de estos reportes únicamente nos muestran las  $\text{IC}_{50}$  obtenidas de la actividad antiproliferativa de los eremofilanos sin presentar mayor información sobre su actividad antitumoral, por ello y con la intención de aportar mayor información, se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* que fue utilizada en el estudio de González (2019).

### 3. Planteamiento del problema

Los tratamientos que se utilizan actualmente para erradicar el cáncer dependen de la etapa en la que se encuentre esta enfermedad. En muchos casos, los pacientes ya están en etapas terminales o metastásicas y se recurre al uso de quimioterapéuticos. Desafortunadamente, este tratamiento resulta ser poco eficaz, ya que los fármacos empleados afectan tanto a células normales con alta tasa de proliferación, así como a las células tumorales, por lo tanto, tienen efectos secundarios graves que muchas veces deterioran la vida de los pacientes, además del desarrollo de resistencia a diversos fármacos (American Cancer Society, 2017; Avendaño y Menéndez, 2008; Pardee y Stein, 2009).

Debido a las limitantes que presenta el uso de quimioterapéuticos, surge la necesidad de estudiar compuestos que sean más específicos y que tengan actividad antitumoral. En este sentido los sesquiterpenos de tipo eremofilano (donde se incluyen los eremofilanos y furanoeremofilanos), se han estudiado por sus propiedades citotóxicas en células tumorales *in vitro*, por lo que en este trabajo se pretende estudiar el efecto antiproliferativo y apoptótico, así como la baja o nula actividad necrótica de los furanoeremofilanos presentes en la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231, SK-LU-1, así como su actividad selectiva en células no tumorales.

#### 4. Justificación

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, en 2018, ocasionó 9.5 millones de defunciones, mientras que en México, es la tercera causa de muerte, en cuanto a las defunciones por tumores malignos, de los más frecuentes en mujeres destacan el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino y en hombres el cáncer de pulmón. Cabe destacar que se calcula que en las siguientes dos décadas los casos nuevos de cáncer aumenten en un 70%.

Lo anterior indica que el cáncer representa un importante problema de salud, ocasionando que las acciones para su prevención y tratamiento tengan especial relevancia en los sistemas de salud, por eso es necesario investigar nuevos compuestos con actividad antitumoral. En este sentido, se ha encontrado que diferentes eremofilanos pueden presentar actividad antiproliferativa en células tumorales, por ello, el estudio de los furanoeremofilanos presentes en la fracción 56 resulta de sumo interés.

## 5. Hipótesis

Se ha descrito que la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* contiene furanoeremofilanos, y ha mostrado actividad antiproliferativa en algunas líneas celulares tumorales, por lo que se espera que esta fracción inhiba el crecimiento de las líneas celulares tumorales HeLa, MDA-MB 231, SK-LU-1 y presente baja actividad necrótica.

## 6. Objetivo General

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* sobre las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231, SK-LU-1, así como en cultivos celulares no tumorales.

### 6.1. Objetivos Particulares

- Determinar si la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* presenta actividad antiproliferativa en las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231 y SK-LU-1, expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir el decremento del 50% de la densidad celular ( $IC_{50}$ ) a través de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* sobre las líneas celulares tumorales, a través de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Evaluación de la actividad inductora de apoptosis de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* a través de la observación de características morfológicas típicas de células apoptóticas por microscopía de contraste de fases y tinción con el fluorocromo DAPI, así como la presencia de caspasa-3 activa mediante microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo.
- Determinar si las  $IC_{50}$  obtenidas para las células tumorales afectan el potencial proliferativo de células no tumorales mediante el marcaje con carboxifluoresceína (CFSE), así como establecer si ejercen una actividad necrótica a través de la cuantificación de la actividad de la enzima LDH.

## 7. Material y Método

### 7.1. Cultivo de células tumorales

Las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 provenientes de cáncer cervicouterino, mama y pulmón respectivamente, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se sembraron en cajas petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), en 10 mL de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina y rojo fenol con 5% de suero de neonato bovino (SNB) previamente desactivado a 57° C por 30 minutos. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Para realizar los ensayos, los cultivos se desarrollaron hasta en un 60-70% de saturación de la densidad celular.

### 7.2. Preparación del compuesto

La fracción 56 fue obtenida del Instituto de Química del laboratorio de Productos Naturales a cargo del Dr. Manuel Jiménez Estrada. Para su uso se pesó 1 mg de la fracción 56 y se disolvió en 100 µL de DMSO en tubos cónicos de plástico para microcentrífuga de 600 µL y observar que no se formen cristales en las soluciones del compuesto al ser mezclados con el medio de cultivo. A partir del stock se tomó la cantidad necesaria de compuesto para realizar las curvas dosis-respuesta y posteriormente preparar las concentraciones de la IC<sub>50</sub>.

### 7.3. Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación de cristal violeta

Se realizaron cultivos de las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231 y SK-LU-1 en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 4500 células por pozo en 100 µL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se estimularon las células a diferentes concentraciones del compuesto en RMPI al 5% de SNB. En las condiciones de control y blanco únicamente se cambió el medio por medio fresco. En el vehículo se agregó DMSO (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración equivalente a la concentración máxima empleada en la curva dosis-respuesta. Posteriormente se dejaron incubando durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas del tratamiento se procedió a

evaluar el número celular utilizando la técnica de cristal violeta, se retiró el medio de la placa y las células se fijaron con 50  $\mu$ L de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1% durante 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo se retiró el glutaraldehído, se enjuagó la placa y se dejó secar al aire, posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L del colorante cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico durante 20 minutos. Una vez transcurridos los 20 minutos se enjuagó la placa para retirar el exceso del colorante, se dejó secar al aire y se adicionaron 50  $\mu$ L de ácido acético al 10% durante 20 minutos. Finalmente se determinó la absorbancia de la solución de ácido acético a 590 nm por espectrofotometría en un lector de placas (Chromate Manager). Los datos obtenidos se analizaron en Microsoft Office Excel 2010, graficando una curva dosis respuesta, posteriormente se realizó una regresión lineal para obtener el valor de la  $IC_{50}$  (Concentración en la que disminuye el 50% del número celular).

#### 7.4. Evaluación de la actividad necrótica, cuantificando la actividad de la enzima LDH

Se realizaron cultivos de las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231 y SK-LU-1 en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 4500 células por pozo en 100  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de  $CO_2$  y una atmósfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de cultivo, un control con DMSO (Sigma-Aldrich, USA) con la concentración empleada para preparar la  $IC_{50}$  correspondiente y las concentraciones de la  $IC_{50}$  correspondientes para cada línea celular. A las 23 h de tratamiento después del tratamiento se agregaron 10  $\mu$ L de una solución de Tritón X-100 al 9 % (la dilución final es 1:9, por lo que la concentración final es de 0.9%) en RPMI-1640 durante 1 hora para lisar las células.

El efecto necrótico fue determinado mediante la liberación de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) utilizando el kit CytoTox 96 (Promega, USA). De acuerdo a las especificaciones del fabricante, una vez cumplidas las 24 horas de tratamiento, la placa de cultivo es centrifugada a 2500 rpm y 40  $\mu$ L del sobrenadante fue recuperado y transferido a una placa de 96 pozos estéril, posteriormente se adicionan 40  $\mu$ L de la mezcla de reacción del kit a cada pozo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 20 minutos. Se mide la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (Chromate Manager). Los datos obtenidos se analizaron utilizando Excel (Microsoft Office, versión 2013), tomando como

referencia el control positivo como un 100%. El análisis de las diferencias estadísticas se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de 0.05% seguido de una prueba de Tukey, en el programa SigmaPlot 12.0 para Windows.

#### 7.5. Evaluación de la morfología celular apoptótica por microscopía de fluorescencia con tinción de DAPI

Se realizaron cultivos de las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231 y SK-LU-1 en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 4500 células por pozo en 100  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de cultivo, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la IC<sub>50</sub> correspondiente, un control positivo con Camptotecina y las concentraciones de las IC<sub>50</sub> correspondientes para cada línea celular.

Una vez pasadas las 24 horas se fijaron las células con paraformaldehído al 2% por 20 minutos, posteriormente se hacen 3 lavados con PBS filtrado, cada uno de 5 minutos. Las células se permearon con Tritón X-100 al 0.1% en PBS a 4°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS filtrado durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 3  $\mu$ L/mL del fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) se dejó actuar durante un minuto a temperatura ambiente y se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS filtrado durante 5 minutos. Finalmente se agregaron 50  $\mu$ L de PBS filtrado y se observaron las células por microscopía de campo claro y epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, JAP).

#### 7.6. Evaluación de muerte por apoptosis mediante inmunodetección de caspasa-3 activa por microscopía de fluorescencia

Se realizaron cultivos de las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231 y SK-LU-1 en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 4500 células por pozo en 100  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de

cultivo, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la IC<sub>50</sub> correspondiente (1.6 µL/mL), un control positivo con Camptotecina y las concentraciones de las IC<sub>50</sub> confirmadas.

Una vez pasadas las 24 horas se fijaron las células con paraformaldehído al 2% por 20 minutos, posteriormente se hacen 3 lavados con PBS filtrado, cada uno de 5 minutos. Las células se permearon con Tritón X-100 al 0.1% en PBS a 4°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS filtrado durante 5 minutos. Posteriormente se agregan 30 µL/mL de anticuerpo primario anticaspasa-3 activa (anticuerpo producido en conejo, SIGMA) 1:500 en PBS durante 24 horas a 4°C. Se hacen 3 lavados con PBS filtrado durante 5 minutos y se agregan 30 µL/mL de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC durante 2 horas, protegiendo la placa de la luz. Se lava el anticuerpo con PBS filtrado durante 5 minutos y finalmente se agregaron 50 µL de PBS filtrado y se observaron las células en campo claro con iluminación de contraste de fases y por microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, JAP).

#### 7.7. Evaluación de muerte por apoptosis mediante la inmunodetección de caspasa-3 determinada por citometría de flujo

Se realizaron cultivos de las líneas celulares HeLa, MDA-MB 231 y SK-LU-1 en placas estériles de plástico de 6 pozos (Corning, USA) a una densidad de 200,000 células por pozo en 2.5 mL de RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de cultivo, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la IC<sub>50</sub> correspondiente, un control positivo con Camptotecina y las concentraciones de las IC<sub>50</sub> confirmadas.

Una vez pasadas las 24 horas, se recuperó el medio y se despegaron las células, pasándolas a tubos de citometría. Se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se fijaron con 500 µL de etanol al 70% en PBS a 4°C durante una hora. Se realizaron tres lavados con 1000 µL de PBS filtrado, centrifugando a 1,500 rpm durante 5 minutos. Al botón celular se le añadió 50 µL de anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (1:250) y se dejó por 24 horas a 4°C. Pasadas las 24 horas se realizaron

tres lavados con 1000  $\mu$ L de PBS filtrado y el botón fue resuspendido en 50  $\mu$ L de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC (1:250), manteniendo las muestras protegidas de la luz durante 3 horas a una temperatura de 37°C.

Las muestras fueron lavadas con PBS filtrado y se analizaron en un citómetro de flujo (BD FACS Aria II, USA). Los datos fueron procesados en el programa estadístico Flowing Software 2.5.1 para comparar la positividad de caspasa-3 entre los controles y tratamientos.

#### 7.8. Obtención y determinación de la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE)

Se obtuvieron 20 mL de sangre periférica de un voluntario aparentemente sano en tubos BD-Vacutainer® con EDTA (10.8mg/tubo) y se vertieron 5 mL en tubos cónicos de vidrio con 5 mL de Ficoll-Hysopaque (Sigma-Aldrich, USA) y 5ml de la sangre (proporción 1:1) en tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA). 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. Una vez finalizado el tiempo, se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos. Posteriormente el paquete celular (anillo) fue transferido a tubos limpios y se realizaron dos lavados con 10 mL de RPMI sin suero y se hizo un conteo con ayuda de una cámara de Neubauer.

Para determinar la proliferación de los linfocitos, éstos fueron marcados con 2  $\mu$ M de carboxifluoresceína (CSFE) en 5 mL de RPMI sin suero (Sigma-Aldrich, USA), incubando las células por 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Posteriormente se realizaron dos lavados con 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  $\mu$ 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  $\mu$ L de PHA y control +,+ (con CSFE y con 20  $\mu$ L de PHA). Los pozos con linfocitos para determinar el efecto de las IC<sub>50</sub> respectivas se mantuvieron con CSFE y con 20  $\mu$ L de PHA. La placa se incubó por 48 horas y se mantuvo en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad.

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se procedió a retirar 100  $\mu$ L/ pozo de los controles. A los controles -,- (sin CSFE y sin PHA) y +,- (con CSFE y sin PHA) se les agregó 100  $\mu$ 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 µL/ pozo de RPMI al 20% de SFB fresco con 20 µl/ml de PHA. Asimismo, para probar las IC<sub>50</sub> obtenidas en las líneas tumorales, también se les retiró 100 µl/ pozo y se agregaron 100 µL de las respectivas de IC<sub>50</sub> a una concentración 2X de la IC<sub>50</sub> de HeLa (33.04 µg/mL), MDA-MB 231 (25.06 µg/mL) y SK-LU-1, (29 µg/mL). El mismo procedimiento se efectuó para el vehículo, el cual consistió de 5 µl/ml de DMSO en RPMI al 20% de SFB y con 20 µl/ml de PHA y se mantuvieron en condiciones de cultivo por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas (72 horas de cultivo total), se cosecharon 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 500µL de verseno frío (4°C) 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 µL de PBS adicionado con 5% de SFB. Se procedió a capturar 10,000 células de la población correspondiente a células mononucleadas, en un citómetro de flujo FACS Aria-II. Los datos fueron analizados en el programa FlowJo (Becton Dickinson, (BD) Biosciences para comparar el porcentaje de proliferación de los controles con los de los tratamientos.

#### 7.9. Evaluación de la actividad necrótica, cuantificando la actividad de la enzima LDH en linfocitos humanos

Se sembró por quintuplicado 200,000 linfocitos por pozo en 200 µL de RPMI al 20% de SFB y 20 µg/ml de PHA, en una placa de 96 pozos. La placa se incubó en condiciones de cultivo por 48 horas y se mantuvo en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Al transcurrir las 48 horas, se retiraron 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% al SFB y 20 µl/ml de PHA) al 2X (el doble de concentración de las IC<sub>50</sub>) de cada una de las respectivas condiciones: Al blanco, el control positivo y el control sin tratamiento, se les agregó 100 µL por pozo de medio de cultivo. El vehículo se agregó con 5 µL/ml-pozo de DMSO. Los tratamientos con las concentraciones de las IC<sub>50</sub> consistieron de 2X para la IC<sub>50</sub> de HeLa (33.04 µg/mL), MDA-MB 231 (25.06 µg/mL) y SK-LU-1, (29 µg/mL). La placa se incubó en condiciones de cultivo por otras 24 horas.

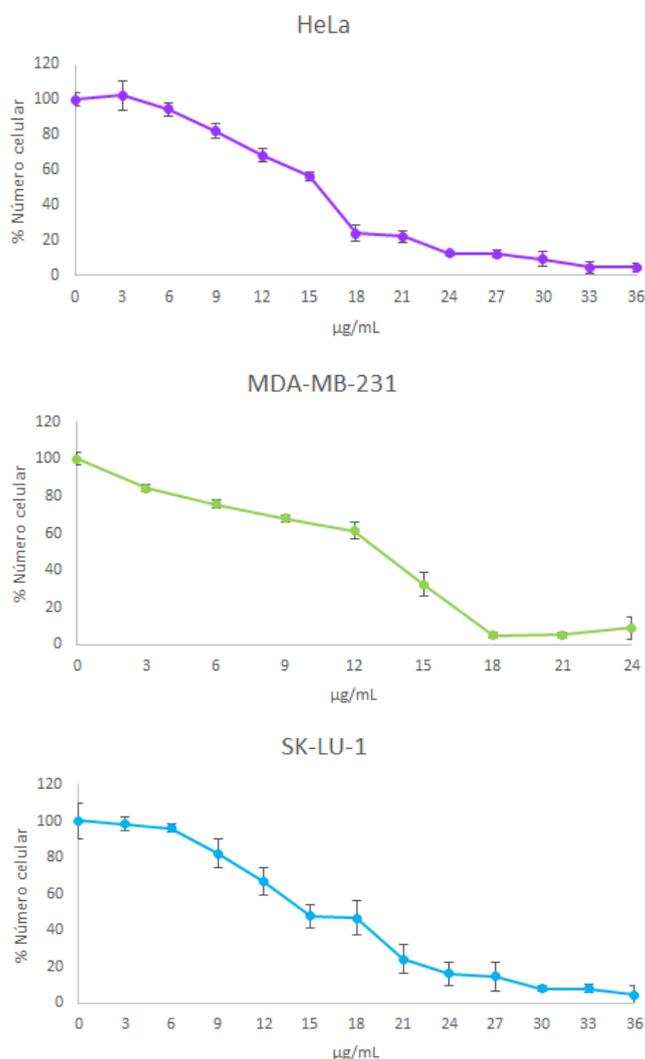
Una hora previa a la cosecha, al control positivo se le agregaron 10 µL de tritón X-100 al 9%. Al cabo de 72 horas totales de cultivo, se recolectaron 60 µL de los medios a una placa de fondo cónico en donde se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante

centrifugado de cada condición y se pasaron 40  $\mu$ L a una placa de 96 pozos de fondo plano a los cuales se les adicionaron 40  $\mu$ L de la mezcla de reacción del kit CytoTox 96 (Promega, USA) a cada pozo. La placa se debe mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 20 minutos. Se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (Chromate Manager) El porcentaje de muerte necrótica se calculó analizando los datos obtenidos en Microsoft Office Excel 2013, tomando como el 100% al control positivo tratado con tritón X-100. El análisis de las diferencias estadísticas se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de 0.05% seguido de una prueba de Tukey, en el programa SigmaPlot 12.0 para Windows.

## 8. Resultados

### 8.1. Actividad antiproliferativa de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en las líneas tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1

Con la finalidad de evaluar la actividad antiproliferativa de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en células tumorales, cultivos de células HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1, fueron tratadas a diferentes concentraciones de la fracción 56 y la actividad antiproliferativa fue expresada como la cantidad requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% del número celular ( $IC_{50}$ ) a través de la técnica de tinción con el colorante cristal violeta (Fig.5, Tabla 1).



**Figura 5.** Efecto antiproliferativo de la fracción 56 en las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, con tres repeticiones cada uno, los cuales fueron analizados con una prueba ANOVA seguido de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$  vs control).

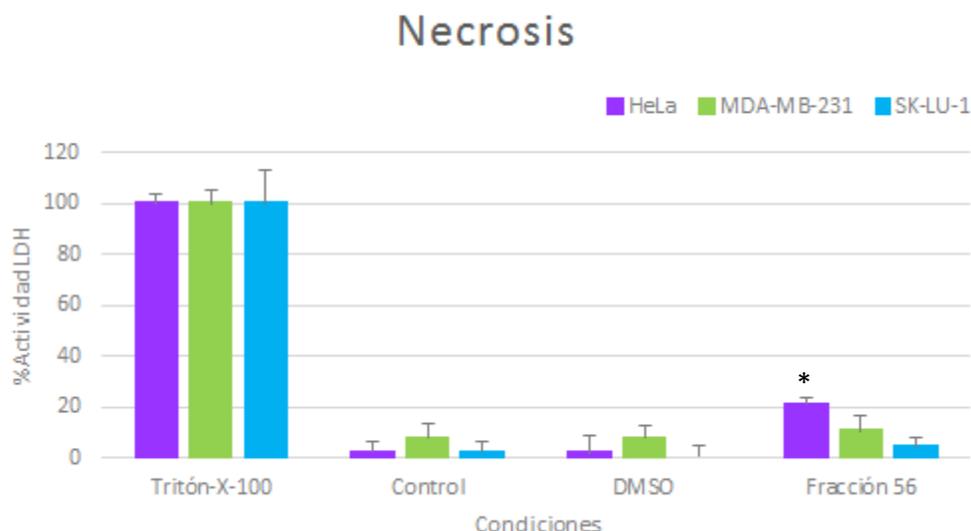
**Tabla 1.** Valores de las IC<sub>50</sub> obtenidas de la fracción 56 en las células HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 expresada en µg/mL.

Línea Celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HeLa	16.52
MDA-MB-231	12.53
SK-LU-1	14.5

Como se puede observar en la [figura 5](#), la fracción 56 presentó actividad antiproliferativa en las células tumorales HeLa, MDA-MB 231, SK-LU-1 de manera dependiente de la concentración, es decir, conforme la concentración aumentó el número celular disminuyó. La [Tabla 1](#) muestra los valores de IC<sub>50</sub> para cada línea celular, los cuales fueron muy similares, sugiriendo que las tres líneas tumorales presentan una sensibilidad similar al compuesto.

## 8.2. Efecto necrótico de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* sobre líneas de células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1

Una vez que se observó que el compuesto posee actividad antiproliferativa en las líneas celulares tumorales, cultivos de células HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 fueron tratadas a diferentes concentraciones del compuesto y la actividad necrótica fue evaluada mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 6).



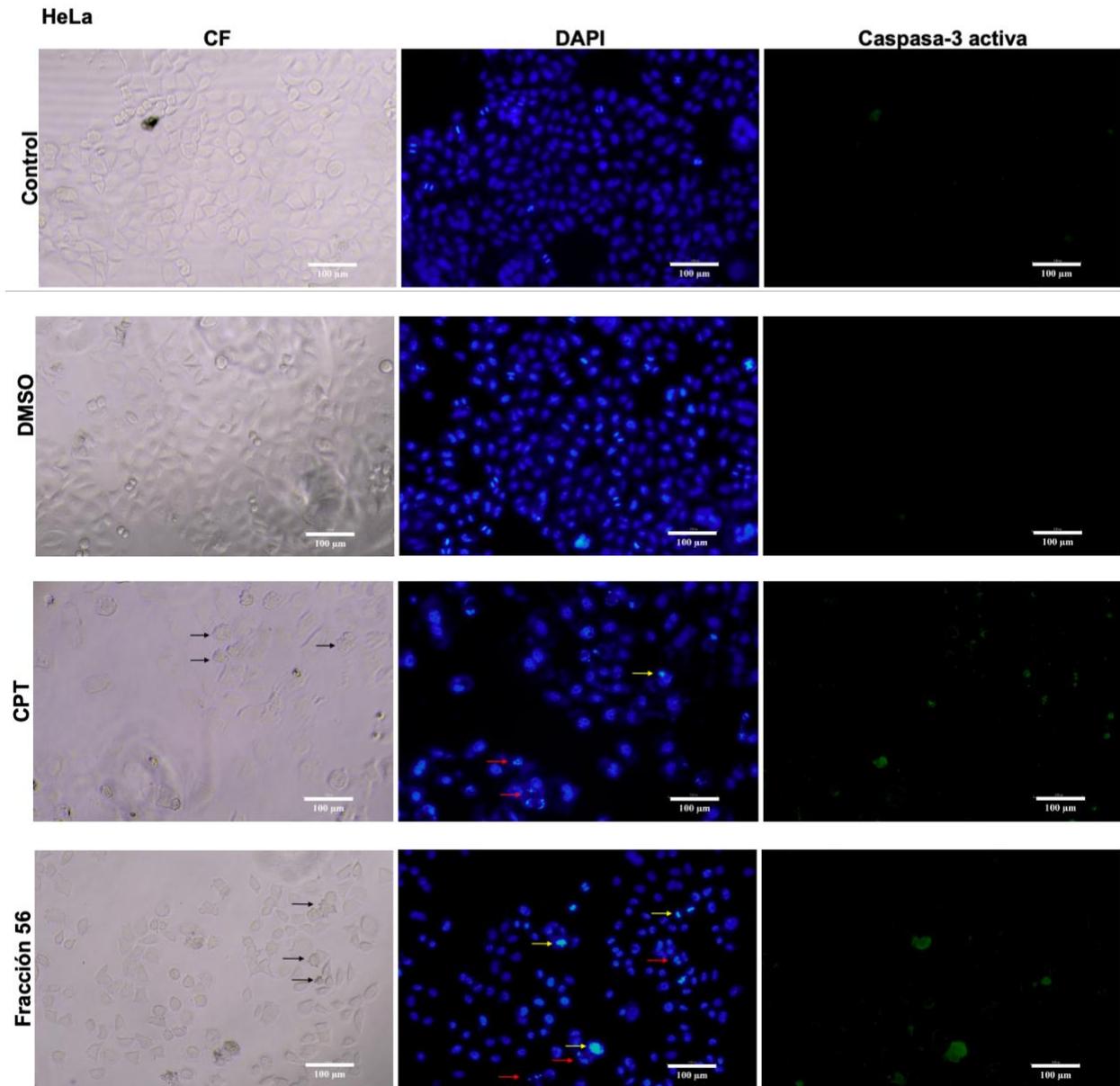
**Figura 6.** Actividad de la enzima LDH presente en los sobrenadantes de células tumorales tratadas con la fracción 56. Se cuantificó la actividad de la enzima LDH. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, con tres repeticiones cada uno, los cuales fueron analizados con una prueba ANOVA seguido de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$  vs control).

<u>Tabla 2.</u> Porcentaje de la actividad de la enzima citoplasmática LDH.	
<b>Línea Celular</b>	<b>LDH (%)</b>
HeLa	21.1
MDA-MB-231	10.7
SK-LU-1	4.3

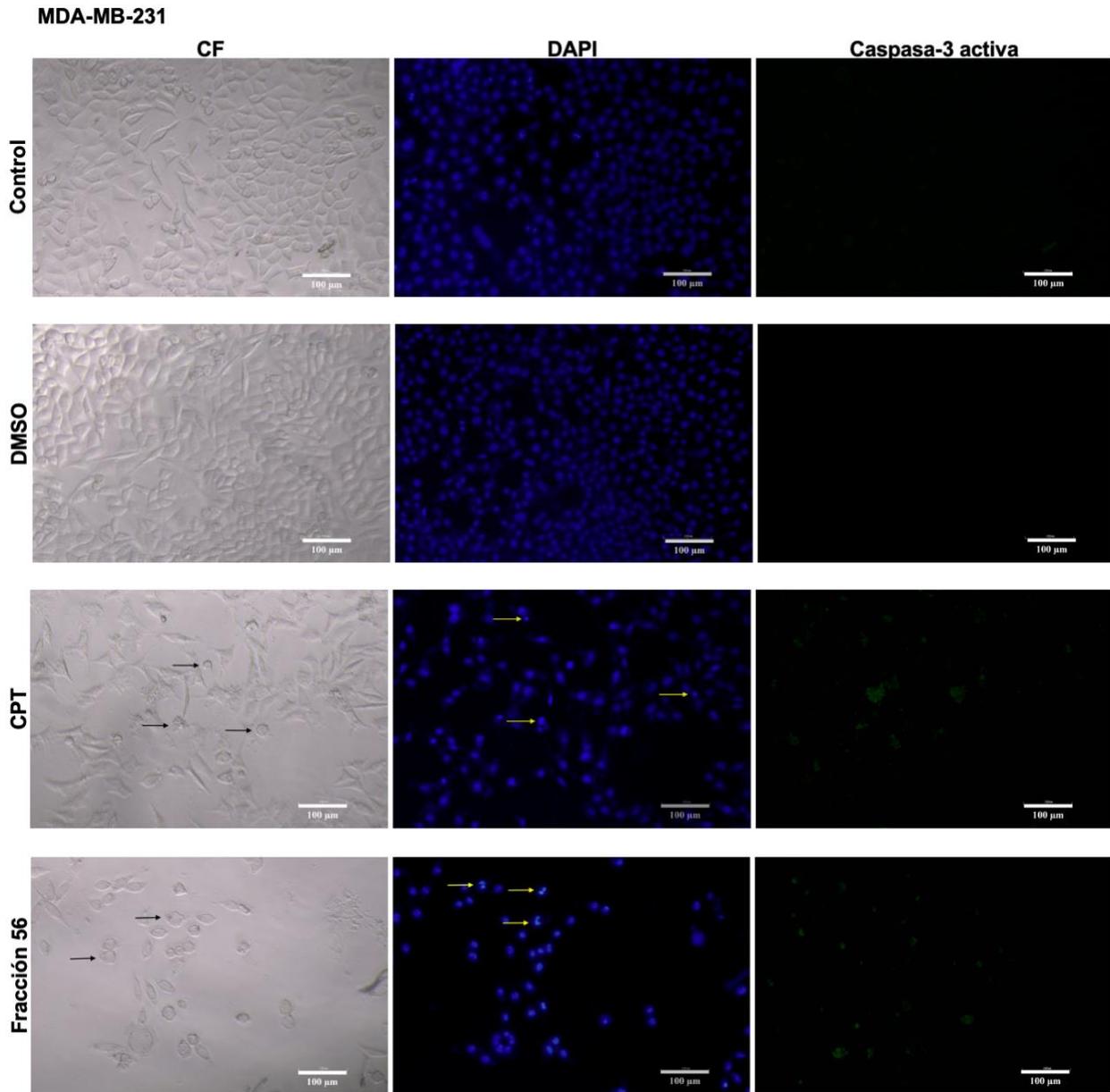
Los valores mostrados en la [figura 6](#) y la [tabla 2](#), indican que la fracción 56 no induce muerte necrótica en las líneas MDA-MB-231 Y SK-LU-1, sin embargo, en la línea HeLa se puede observar una actividad de la enzima LDH de un 21.1%, indicando que a esta concentración, el compuesto ejerce una pequeña actividad necrótica en estas células.

### 8.3. Efecto apoptótico de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en las líneas tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia

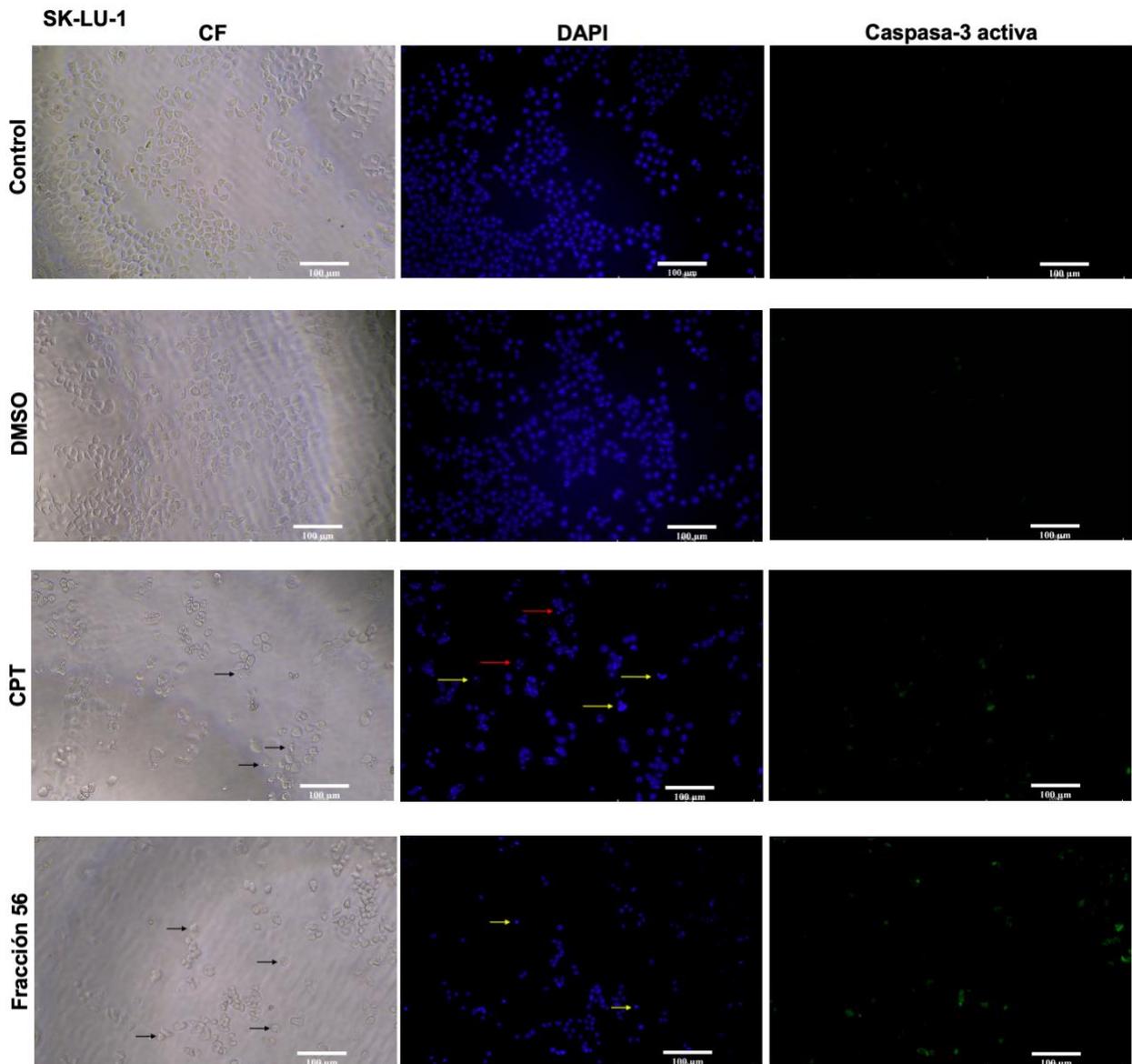
Con el propósito de evaluar si la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* induce a las células HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 a presentar características morfológicas propias de una muerte apoptótica, cultivos de células HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 fueron tratadas con sus respectivas concentraciones de IC<sub>50</sub> y teñidas con DAPI para observar contracción celular, pérdida de proyecciones citoplasmáticas, condensación de la cromatina y/o compactación nuclear y observación de cuerpos apoptóticos. Al mismo tiempo, se detectó la presencia de la caspasa 3 activa a través de la técnica de inmunocitoquímica para observar a las células positivas a esta caspasa ([Fig. 7, 8 y 9](#))



**Figura 7.** Efecto apoptótico de la fracción 56. La morfología de las células tumorales HeLa se observa en el Contraste de Fases (CF), donde las flechas negras indican cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma. El efecto de la morfología nuclear del compuesto se observa en el marcaje con DAPI, donde las flechas amarillas indican condensación de la cromatina y las flechas rojas fragmentación de la misma. La presencia de caspasa-3 es observada en la Camptotecina (CPT) (control positivo) y en la fracción 56 que presentan una marca verde.



**Figura 8.** Efecto apoptótico de la fracción 56. La morfología de las células tumorales MDA-MB-231 se observa en el Contraste de Fases (CF), donde las flechas negras negras indican cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma. El efecto de la morfología nuclear del compuesto se observa en el marcaje con DAPI, donde las flechas amarillas indican condensación de la cromatina y las flechas rojas fragmentación de la misma. La presencia de caspasa-3 es observada en la Camptotecina (CPT) (control positivo) y en la fracción 56 que presentan una marca verde.

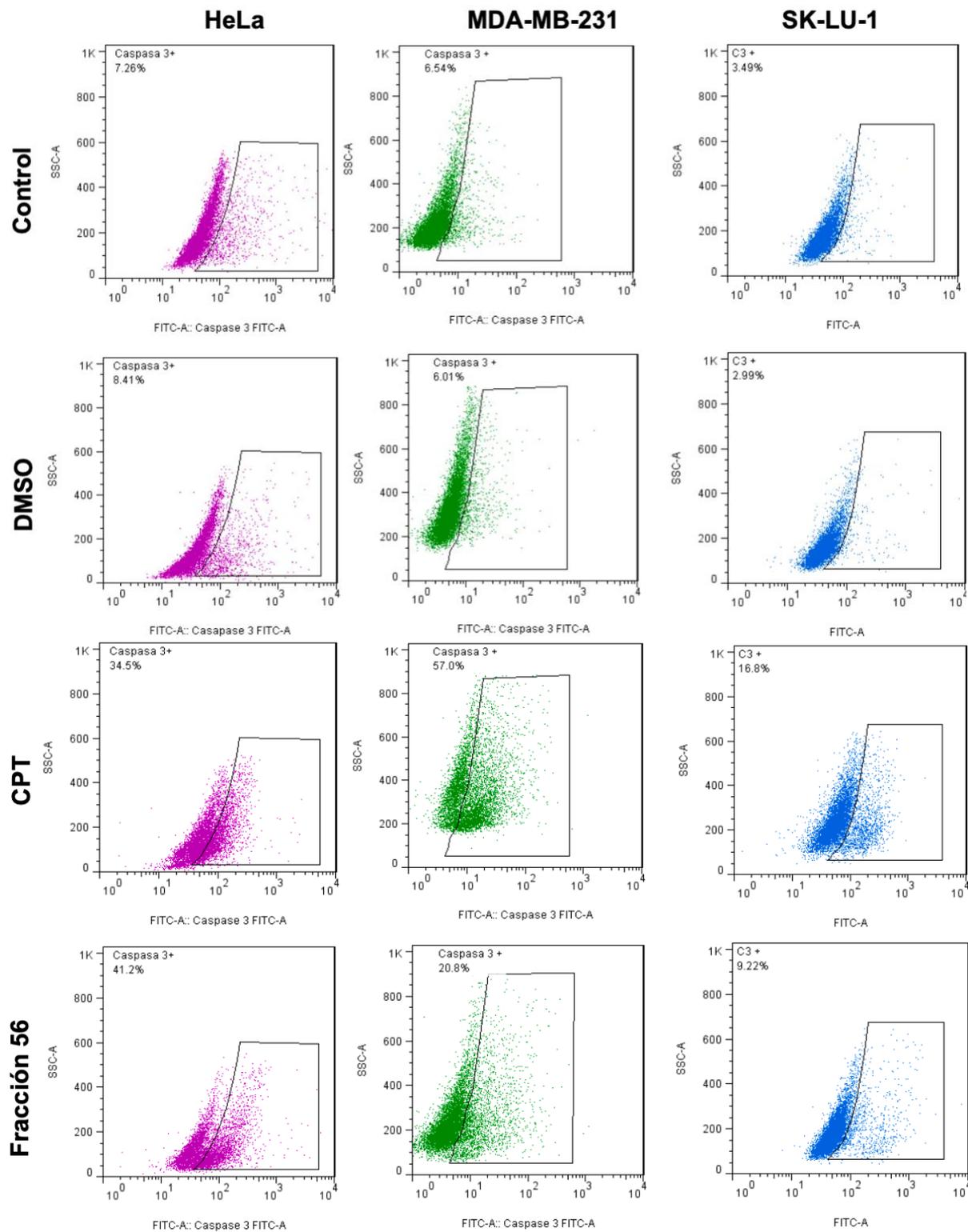


**Figura 9.** Efecto apoptótico de la fracción 56. La morfología de las células tumorales SK-LU-1 se observa en el Contraste de Fases (CF), donde las flechas negras negras indican cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma. El efecto de la morfología nuclear del compuesto se observa en el marcaje con DAPI, donde las flechas amarillas indican condensación de la cromatina y las flechas rojas fragmentación de la misma. La presencia de caspasa-3 es observada en la Camptotecina (CPT) (control positivo) y en la fracción 56 que presentan una marca verde.

Las imágenes mostradas en las [figuras 7, 8 y 9](#) indican que las células sin tratamiento (control y DMSO, contraste de fases) se encuentran adheridas a la placa, con morfología poliédrica, extendidas y conservando sus proyecciones citoplasmáticas, mientras que las células tratadas con la CPT y la fracción 56 redujeron su tamaño y perdieron sus extensiones citoplasmáticas, incluso se puede observar la formación de blebbings de la membrana plasmática. En el marcaje con DAPI, tanto el control como el DMSO muestran núcleos homogéneos con la cromatina distribuida de forma regular, pero en la CPT así como en la fracción 56 se observan núcleos heterogéneos, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, características propias de células apoptóticas. Finalmente, tanto en la CPT, así como en la fracción 56 se puede observar la presencia de caspasa-3 activa, sugiriendo, junto con los resultados morfológicos que la fracción 56 puede inducir una muerte apoptótica.

#### 8.4. Efecto apoptótico de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en las células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 mediante la inmunodetección de caspasa-3 cuantificada por citometría de flujo

Con la intención de confirmar que el compuesto induce a las células tumorales a una muerte apoptótica, cultivos de las células HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 fueron tratadas con la fracción 56 y la presencia de la caspasa 3 activa fue determinada por inmunodetección y las células positivas a esta caspasa fue cuantificada por citometría de flujo ([Figura 10](#)).



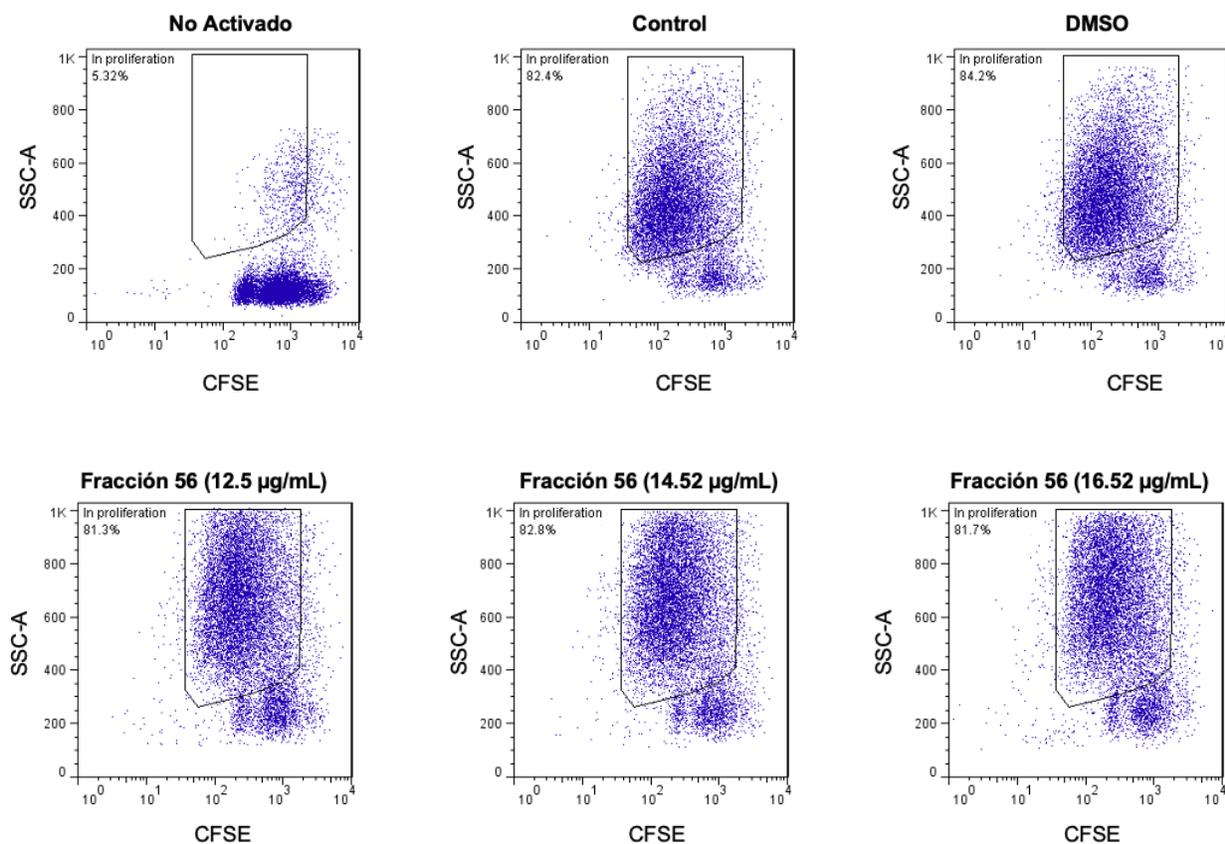
**Figura 10.** Cuantificación de células positivas a la caspasa-3 activa en las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 tratadas con la fracción 56 por citometría de flujo. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

<u>Tabla 3.</u> Porcentaje de células tumorales positivas a caspasa-3 activa.			
	<b>HeLa</b>	<b>MDA-MB-231</b>	<b>SK-LU-1</b>
<b>Control</b>	7.2 %	6.5 %	3.4 %
<b>DMSO</b>	8.4 %	6.0 %	2.9 %
<b>Camptotecina</b>	34.5 %	57 %	16.8 %
<b>Fracción 56</b>	41.2 %	20.0 %	9.2 %

Los resultados obtenidos en la [figura 10](#) y la [tabla 3](#), establecen que la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* induce a las células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 a presentar la caspasa 3 activa, indicando que las células están en un proceso de muerte apoptótica, que junto con los resultados de la morfología celular apoptótica indican que esta fracción induce a las células tumorales a ser eliminadas mediante un proceso apoptótico.

#### 8.5. Actividad antiproliferativa de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en células no tumorales.

Los resultados han demostrado que la fracción 56 presenta actividad antiproliferativa en células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1, es necesario probar su efecto antiproliferativo en células no tumorales con la finalidad de establecer si la fracción 56 presenta una acción selectiva, para ello, cultivos de células linfocíticas humanas normales fueron tratados a las 48 horas de cultivo con las concentraciones de IC<sub>50</sub> obtenidas para las células tumorales. Después de 24 horas de tratamiento se evaluó la actividad antiproliferativa por medio del marcaje con carboxifluoresceína (CSFE) y la proliferación fue cuantificada por citometría de flujo ([Figura 11](#), [tabla 4](#)).



**Figura 11.** Efecto antiproliferativo de la fracción 56 en linfocitos humanos de donadores aparentemente sanos mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CFSE), evaluada por citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con las concentraciones de IC<sub>50</sub> correspondientes a las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.

**Tabla 4.** Porcentaje de proliferación de linfocitos tratados a las concentraiones de IC<sub>50</sub> requeridas para las células tumorales.

Tratamiento	Porcentaje de Proliferación(%)
Control	82.4
DMSO	84.2
Fracción 56 (12.53 µg/mL)	81.3
Fracción 56 (14.5 µg/mL)	82.8
Fracción 56 (15.52 µg/mL)	81.7

Como se puede apreciar en la [figura 11](#) y en la [tabla 4](#), las concentraciones utilizadas en los cultivos de células linfocíticas humanas no afectaron el potencial proliferativo de estas células, sugiriendo que la actividad antiproliferativa presente en la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* podría ser de acción selectiva.

#### 8.4. Actividad necrótica de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* en células no tumorales.

Para determinar si la fracción 56 puede inducir de muerte necrótica en cultivos de células linfocíticas humanas, se trataron a las concentraciones de IC<sub>50</sub> obtenidas para las células tumorales y se evaluó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 12).

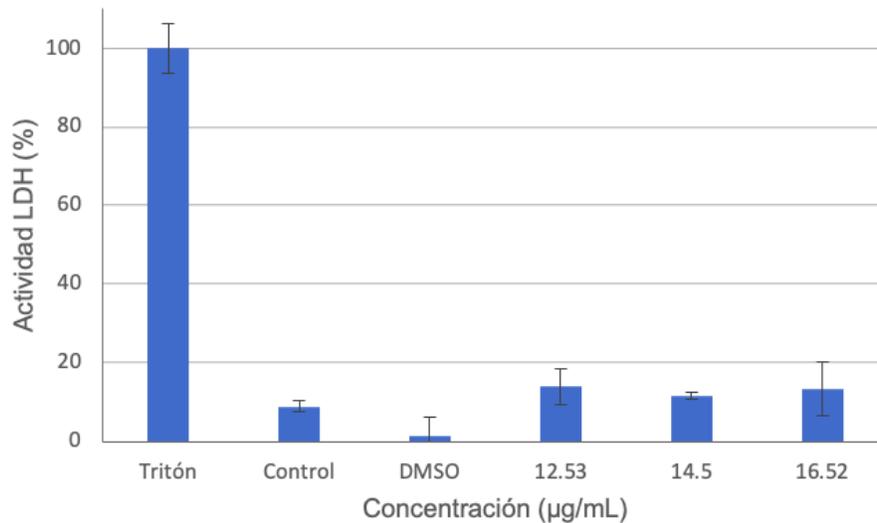


Figura 12. Actividad de la enzima LDH presente en los sobrenadantes de células no tumorales tratadas con la fracción 56. Se cuantificó la actividad de la enzima LDH. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, con tres repeticiones cada uno, los cuales fueron analizados con una prueba ANOVA seguido de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$  vs control).

Los valores mostrados en la figura 12 indican que la fracción 56 no induce a las células linfocíticas a liberar la enzima LDH de manera significativa respecto al control, sugiriendo que no presenta un efecto necrótico en dichas células.

## 9. Análisis de Resultados

Hoy en día el cáncer representa un importante problema de salud debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad, tanto a nivel mundial como nacional (Secretaría de Salud, 2017). Esto se debe a que la detección de esta enfermedad es en etapas muy avanzadas (cuando el tumor ya se ha propagado por todo el organismo) y se recurre al uso de la quimioterapia. Además, los efectos secundarios y las secuelas a largo plazo (que están asociados a la toxicidad inespecífica de los fármacos) son una fuente importante de preocupación tanto para los pacientes como para los médicos. Por ello se necesita con urgencia nuevos enfoques para mejorar la tolerancia y reducir las secuelas de la quimioterapia contra el cáncer (Avendaño y Menéndez, 2008; Nurgali *et al.*, 2018).

La valoración de extractos de plantas ha generado un fuerte interés para la búsqueda de compuestos con actividad antineoplásica, de baja citotoxicidad y de acción selectiva. De hecho, el 67% de los medicamentos contra el cáncer son productos naturales o derivados de productos naturales y más de 200 medicamentos derivados de productos naturales se encuentran en desarrollo preclínico o clínico (Ghantous *et al.*, 2010). Algunos compuestos que se encuentran en los extractos de las plantas son los sesquiterpenos y entre ellos, los sesquiterpenos de tipo eremofilano, presentes en la familia Asteraceae. Debido a las características estructurales únicas y varios grupos funcionales, estos compuestos poseen una serie de actividades biológicas como anti-hiperglucémica, fungicida, antitumoral, antibacteriano y antiinflamatorio, que han recibido un interés creciente en los últimos años (González, 2010; Hou *et al.*, 2014).

Dentro de la familia Asteraceae, el género *Pittocaulon* también conocido como “palo loco” son arbustos o árboles pequeños resinosos de tallos gruesos, hojas caducas e inflorescencias terminales corimbosas (González, 2010). Este grupo de plantas se utilizan en la medicina tradicional mexicana contra el reumatismo y para curar heridas, además gracias a diferentes estudios fitoquímicos se han aislado e identificado diferentes compuestos como los alcaloides pirrolizidínicos, eremofilanos y flavonoides, así como también se ha reportado la actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de *Pittocaulon praecox*, *Pittocaulon bombycophole* y *Pittocaulon hintonii* (González, 2010; Marín-Loza *et al.*, 2008).

*Pittocaulon praecox* es la especie más ampliamente distribuida del género y la más estudiada química y morfológicamente. Existen varios estudios químicos de esta especie, donde se han aislado diferentes compuestos como los eremofilanos (González, 2013). Entre los cuáles

González (2019), se ha identificado en la fracción 56, diferentes furanoeremofilanos. En la mayoría de los estudios realizados se muestra únicamente la actividad citotóxica de los eremofilanos sin presentar mayor información sobre su actividad antitumoral.

En este trabajo se observó que la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* posee actividad antiproliferativa sobre las células tumorales, lo cual coincide con otros estudios realizados por Beattie *et al.*, (2011) y McDonald *et al.*, (2004) que también evaluaron diferentes eremofilanos en líneas celulares tumorales y es importante mencionar que Agulló-Ortuñoa *et al.*, (2017) encontró que existe un patrón de sustitución en los C-1, C-6 y C-8 por un metoxilo, de los eremofilanos estudiados, que se piensa cumplen un papel importante en la citotoxicidad selectiva contra líneas celulares tumorales humanas, lo cual podría ser un requisito estructural biológico importante que puede proporcionar una nueva base para el diseño de nuevos compuestos antitumorales.

Adicionalmente, se encontró que las IC<sub>50</sub> obtenidas para las células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 hay un porcentaje bajo de liberación de la enzima LDH, lo cual indica que hay daño en la membrana celular y por lo tanto presenta baja actividad necrótica. Pero este porcentaje es bajo en comparación de muchos quimioterapéuticos que se utilizan hoy en día como es el caso del cisplatino que produce nefrotoxicidad (Hanigan y Devarajan, 2003). Además, una muerte necrótica puede liberar HMB1, estas moléculas liberadas reclutan células inmunes, contribuyendo a la inflamación y metástasis durante el desarrollo del tumor y la terapia contra el cáncer (Lee *et al.*, 2018).

Por estas razones se ha recurrido a buscar compuestos que tengan actividad apoptótica y en el caso de la fracción 56, además de presentar actividad antiproliferativa con baja actividad necrótica, también induce a las células tumorales a una muerte apoptótica, indicando que la fracción 56 induce a las células tumorales a ser eliminadas por un proceso apoptótico. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Fang, *et al.*, (2018), quien reportó que algunos eremofilanos eran capaces de inducir una muerte apoptótica en células tumorales ACHN. Sin embargo, como se puede observar en la [Figura 10](#), en algunos casos el porcentaje de células positivas a la caspasa-3 activa es muy bajo, sugiriendo que la apoptosis no es el único mecanismo por el cual las células tumorales son eliminadas y esto coincide con lo reportado por Yuan *et al.*, (2015), quien observó que los eremofilanos estudiados indujeron la detención del ciclo celular en la fase G2/M en las células MDA-MB-231.

Con respecto a la actividad selectiva, es relevante resaltar que la fracción 56 no afectó el potencial proliferativo de células linfocíticas, sugiriendo que esta fracción presenta una acción selectiva, la cual concuerda con el trabajo de Neganova *et al.*, (2020), donde el eremofilano estudiado no tuvo ningún efecto secundario tóxico en células sanas. La importancia de estos ensayos radica en que los quimioterapéuticos utilizados hoy en día, de acuerdo a Luna *et al.*, (2017) son poco selectivos y su aplicación indiscriminada tanto en tejidos sanos como enfermos provoca efectos secundarios devastadores que pueden ser severos y crónicos.

Como ya se ha mencionado una limitante de la quimioterapia es la resistencia de las células tumorales a los medicamentos, la cual está relacionada con la sobreexpresión de la glicoproteína-P (PGP) (Avendaño y Menéndez, 2008; Gómez *et al.*, 2002). Por esta razón, es importante mencionar que se ha encontrado que algunos eremofilanos fueron capaces de inhibir selectivamente el crecimiento tumoral de la glucoproteína-P (PGP) que sobre-expresa la línea celular KB-VIN resistente a múltiples fármacos (MDR) (Yuan *et al.*, 2015). Además, Van-Haafden *et al.*, (2011) reporta que en modelos *in vivo* se observó una diferencia entre los ratones tratados con cisplatino, los cuales se encontraban en mal estado al perder mucho peso y se terminaban sacrificando, en comparación con los ratones tratados con un eremofilanoide, que se mantuvieron por un período de tiempo mucho más largo. Estos estudios resaltan propiedades que poseen algunos eremofilanos con prometedor potencial terapéutico contra el cáncer.

La actividad selectiva de la fracción 56 aunado a su actividad antiproliferativa en las líneas tumorales, así como su baja actividad necrótica, sugiere que esta fracción es un candidato interesante para ser estudiada en modelos *in vivo* con el propósito de establecer su actividad antitumoral y su potencial terapéutico.

Para finalizar es importante mencionar que encontrar nuevos compuestos bioactivos es solo el primer paso en un camino largo y costoso para las aplicaciones clínicas. Los resultados de este trabajo fueron realizados en modelos *in vitro*, sin embargo, estos tienen que ser validados en modelos animales y finalmente en estudios clínicos.

## 10. Conclusiones.

- La fracción 56 de *Pittocaulon praecox* inhibe la proliferación de las células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 a concentraciones de IC<sub>50</sub> de 16.52 µg/mL, 12.53 µg/mL y 14.5 µg/mL para cada línea respectivamente
- La fracción 56 de *Pittocaulon praecox* posee baja actividad necrótica en células tumorales a las concentraciones de IC<sub>50</sub> determinadas para las líneas HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1.
- La fracción 56 de *Pittocaulon praecox* induce cambios morfológicos característicos de una muerte celular por apoptosis, además de la presencia de caspasa 3 activa en células tumorales.
- Las IC<sub>50</sub> de la fracción 56 de *Pittocaulon praecox* no afecta la proliferación de células linfocíticas de humanos y no induce un proceso de muerte necrótica.

## 11. Referencias

1. Adolfo, G. (2002). *Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis*. Rev. Arg. Anest, 60(6): 391-401.
2. Al-Mahayri, Z., Patrinos, G., Ali, B. (2020). *Toxicity and Pharmacogenomic Biomarkers in Breast Cancer Chemotherapy*. Front. Pharmacol, 11(445).
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P (2016). *Molecular Biology of the Cell*. (6th ed.). United States of America: Garland Science, Taylor & Francis Group.
4. Agulló-Ortuñoa, T., Díazb, C., González-Colomac, A., Reinab. M. (2017). *Structure-Dependent Cytotoxic Effects of Eremophilanolide Sesquiterpenes*. Natural Product Communications,12 (5): 663-665.
5. American Cancer Society. (2017). *Tipos comunes de tratamiento para el cáncer*. Recuperado el 12 de noviembre de 2018 de <http://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/despues-del-diagnostico/tratamientos-comunes-contra-el-cancer.html>
6. Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, B. (2013). *Biología. La Vida en la Tierra. Con Fisiología*. (9ª ed.). México: Pearson Education.
7. Avendaño, C., Menéndez, C. (2008). *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Hungary: Elsevier.
8. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., Yeoh, K. (2014). *Biological response of cancer cells to radiation treatment*. Frontiers in molecular biosciences, 1(24): 1-9.
9. Beattie, K., Waterman, P., Forster, P., Thompson, D., Leach, D. (2011). *Chemical composition and cytotoxicity of oils and eremophilanes derived from various parts of Eremophila mitchellii Benth. (Myoporaceae)*. Phytochemistry,72: 400-408.
10. Becker, W., Kleinsmith, L., Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula*. Madrid: Pearson Education.
11. Behl, C., Ziegler, C. (2014). *Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease*. Alemania: Springer.
12. Campbell, N., Urri, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., Reece, J. (2017). *Biology. A Global Approach*. (11th). USA: Pearson Education Inc.
13. Carswell, E. (2002). *Cáncer mamario: El reto de hoy*. México: Editorial Trillas.
14. Chavaro, N., Arroyo, G., Felipe, L., Walter, G., Pérez, I. (2009). *Cáncer cervicouterino*. Anales de Radiología México, 1:61-79.

15. Chen, Q., Kang, J., Fu, C. (2018). *The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis*. Signal Transduct Target Ther, 3(18): 1-11.
16. Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A., Massarini, A. (2013). *Biología*. (7ª ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
17. De Palo, G., Dexeus, S., Chanen, W. (2007). *Patología y tratamiento del tracto genital inferior*. (2ª ed.). Barcelona: Elsevier Masson.
18. DeVita, V., Lawrence, T., Rosenberg, S. (2015). *Cancer Principles & Practice of Oncology*. (10ª ed.). USA: Wolters Kluwer Health.
19. Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicol Pathol, 35(4): 495–516.
20. Enriquez-Mejía, M. (2013). *Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico*. Revisa de Medicina e Investigación, 1(1): 8-16.
21. Fang, W., et al. (2018). *Cytotoxic and Antibacterial Eremophilane Sesquiterpenes from the Marine-Derived Fungus Cochliobolus lunatus SCSIO41401*. J Nat Prod, 81: 1405–1410.
22. Felip, E., Peralta, P., Cedres, S. (2007). *Cáncer de Pulmón no microcítico*. Madrid: Arán Ediciones.
23. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F. (2018). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer. Recuperado el 30 de noviembre de 2020 de <https://gco.iarc.fr/today>
24. Ferreiro, J., García, J., Barceló, R., Rubio, I. (2003). *Quimioterapia: efectos secundarios*. Gac Med Bilbao, 100: 69-74.
25. Festjens, N., Berghe, T., Vandenabeele P. (2006). *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. Biochimica et Biophysica Acta, 1757(9-10):1371-1387.
26. Fulda, S., Debatin, K-M. (2006). *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 25(34): 4798-4811.
27. G. de la Garza, J., Juárez, P. (2014). *El Cáncer*. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León.
28. Galluzzi, L., et al. (2012). *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death and Differentiation. Nature, 19: 107-120.

29. Galluzzi, L., Vitale, I. (2018). *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death & Differentiation, 25: 486-541.
30. 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): 668-678.
31. Golstein, P., Kroemer, G. (2007). *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Elsevier, 32(1): 37-42.
32. Gómez, R., Souviron, A., Martínez, M. (2002). *La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer*. An. Med. Interna (Madrid), 19(9): 49-57.
33. González, C. (2019). *Estudio de los componentes de Pittocaulon Praecox (Palo loco) y su actividad citotóxica*. Tesis de Licenciatura. México UNAM.
34. González, K. (2010). *Estudio fitoquímico de tallo de Pittocaulon Velatum*. Tesis de Licenciatura. México: UNAM.
35. Gonzáles, K. (2013). *Aislamiento y caracterización de sesquiterpenos y otros metabolitos de Pittocaulon filare*. Tesis de Maestría. México: UNAM.
36. Granados, M., Arrieta, O., Hinojosa, J. (2016). *Tratamiento del cáncer. Oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. México: El Manual Moderno.
37. Granados, S., Quiles, J., Gil, A., Ramírez-Tortosa, M. (2006). *Lípidos de la dieta y cáncer*. Nutrición Hospitalaria, 21(2): 44-54.
38. Green, D., Llambi, F. (2015). *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 1: 1-24.
39. Guzman-Santos, K., Morales-Cordero, V., Hernández-Rodríguez, A., Gómez, E., García, F., Sanchez-Rodriguez, S. (2012). *Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común*. Archivos de Medicina, 8(1): 1-8.
40. Hanigan, M., Devarajan, P. (2003). *Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms*. Cancer Ther, 1: 47-61.
41. Heras, F. (2002). *La quimioterapia hipertérmica. Efectos sobre las células mesoteliales pleurales y bases de su aplicación en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno*. En Homenaje de Amistad (pp. 73-90). Valladolid: Nueva comunicación.
42. Hotchkiss, R., Strasser, A., McDunn, J., Swanson, P. (2009). *Cell Death*. Mechanisms of Disease, 361(16): 1570-1583.

43. Hou, C., Kulka, M., Zhang, J., Li, Y., Guo, F. (2014). *Occurrence and Biological Activities of Eremophilane-type Sesquiterpenes*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(8): 664-677.
44. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2018). *Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer (4 de Febrero)*. Recuperado el 30 de septiembre del 2018 de:  
[http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_Nal.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf)
45. Jordán, J. (2003). *Apoptosis: muerte celular programada*. *OFFARM*, 22(6): 100-106.
46. Kroemer, G., et al. (2005). *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. *Cell Death Differentiation*, 12: 1463-1467.
47. Kroemer, G., et al. (2009). *Classification of Cell Death*. *Cell Death Differentiation*, 16(1): 3-11.
48. Lawrence, E. (2003). *Diccionario Akal de Términos Biológicos*. Madrid: Ediciones Akal S.A.
49. Lee, Y., et al. (2018). *Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis*. *Oxid Med Cell Longev*, 1-28.
50. Li, C., Uribe, D., Daling, J. (2005). *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. *British Journal of Cancer*, 93: 1046 – 1052.
51. Lizarbe, M. (2007). *El Suicidio y la Muerte Celular*. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*, 101(2): 1-33.
52. Lodish, H et al. (2016). *Molecular Cell Biology*. (8th ed.). United States of America: W. H. Freeman.
53. López, H. (2003). *Células de Cáncer Cervical secretan TGF-beta que induce a los Linfocitos TCD4+ a una muerte apoptótica*. Tesis doctoral. México: UNAM
54. López, R. (2003). *La Regulación del Ciclo Celular y el Cáncer*. *Vertientes*. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 6(1): 40-44.
55. Loraine, S., Méndez-Espinoza, J. (2010). *Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(4): 18-27.
56. Lowe, S., Lin, A. (2000). *Apoptosis in Cancer*. *Carcinogenesis*, 21(3): 485–49.
57. Luna, C., Mendoza, R., Gómez, A. (2017). *Nanovectores superparamagnéticos y su uso potencial en quimioterapias selectivas*. *Ciencia UANL*, 83.

58. Malhotra, G., Zhao, X., Band, H., Band, V. (2010). *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10): 955-960.
59. Malumbres, M., Barbacid, M. (2009). *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 9(3): 153-166.
60. Marin-Loza, J., Ávila, J., Canales, M., Hernandez, T., Céspedes, C. (2008). *Antifungal and Antibacterial Activities of Endemic *Pittocaulon* spp. from Mexico*. *Pharmaceutical Biology*, 46(1-2): 66-71.
61. Mendelsohn, J., Howley, P., Israel, M., Gray, J., Thompson, C. (2015). *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
62. McDonald, L., Barbieri, L., Bernan, V., Janso, J., Lassota, P., Carter, G. (2004). *07H239-A, a New Cytotoxic Eremophilane Sesquiterpene from the Marine-Derived Xylariaceous Fungus LL-07H239*. *J. Nat. Prod.*, 67: 1565-1567.
63. Momenimovahed, Z., Salehiniya, H. (2017). *Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world*. *Biomed Res Ther*, 4(12): 1795-1811.
64. Navas, M., Alfonso, L., Guerra, I. (2009). *Apoptosis: Muerte Celular Programada. Aspectos Generales y su Relación con las Enfermedades Cardiovasculares*. *CorSalud*, 1(2): 1-9.
65. Neganova, M., et al. (2020). *Synthesis and Cytotoxic Activity of Azine Derivatives of 6-Hydroxyxanthanodiene*. *Current Cancer Drug Targets* 20: 1.
66. Nurgali, K., Thomas, R., Abalo, R. (2018). *Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?*. *Front Pharmacol*, 9(245): 1-3.
67. O'Connor, C., Adams, J. (2010). *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education.
68. Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. (2005). *Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica*. *CONABIO. Biodiversitas* 62: 12-15.
69. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018). *Cáncer. Nota descriptiva*. Recuperado el 30 de septiembre de 2018, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
70. Otto, T., Sicinski, P. (2017). *Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 17(2): 93-115.
71. Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F-T., Zhou, T-T., Liu, B., Bao, J. (2012). *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. *Cell Prolif*, 45(6):487-498.

72. Pao, W., Girard, N. (2011). *New driver mutations in non-small-cell lung cancer*. *The Lancet Oncology*, 12(2): 175–180.
73. Pardee, A., Stein, G. (2009). *The Biology and Treatment of Cancer: Understanding Cancer*. New Jersey: Wiley-Blackwell.
74. Pardo, F. (1988). *Anatomía patológica general y especial de las neoplasias*. España: Editorial Científico Médica.
75. Pecorino, L. (2008). *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. United Kingdom: Oxford University Press.
76. Reed, J. (2000). *Mechanisms of Apoptosis*. *American Journal of Pathology*, 157(5): 1415-1430.
77. Rizo, D., Nájera, A., Arenas, M. (2016). *Conocimientos básicos de oncología radioterápica para la enseñanza Pre-grado*. España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.
78. Rojas, K., Stuckey, A. (2016). *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors*. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59 (4): 651–672.
79. Rojas, M., Salmen, S., Berrueta, S. (2009). *Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación*. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*, 4(3): 92-196.
80. Romo de Vivar, A. (2008). *Química de la Flora Mexicana*. Investigaciones del Instituto de Química de la UNAM. México: UNAM.
81. Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A., Arciniegas, A., Villaseñor, J. (2007). *Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae)*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 51(3): 160-172.
82. Roura, E., et al. (2014). *Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort*. *International Journal of Cancer*, 135(2): 453–466.
83. Roth, J., Ki Hong, W., Komaki, R. (2014). *Lung Cancer*. (4<sup>a</sup> ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.
84. Satyanarayana, A., Kaldis, P. (2009). *Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. *Oncogene*, 28(33): 2925-2929.
85. Secretaria de Salud. (2017). 318. *Cáncer, tercera causa de muerte en México*. Recuperado el 30 de septiembre de 2018 de <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
86. Skeel, R., Khleif, S. (2011). *Manual de quimioterapia del cáncer*. (8<sup>a</sup> ed.). United States of America: Wolters Kluwer Health.

87. Spencer, J. (2007). *Cervical Cancer*. United States of America : Chelsea House.
88. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. (2015). *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. *Mol Cancer*, 14(48): 1-14.
89. Sun, Y., et al. (2017). *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. *Int. J. Biol. Sci.*, 13: 1387-1397.
90. Syntichaki, P., Tavernarakis, N. (2003). *The Biochemistry of Neuronal Necrosis: Rogue Biology?* *Nat Rev Neuroscience*, 4(8): 672-84.
91. Taylor, R., Cullen, S., Martin, S. (2008). *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3): 231-241.
92. Testa, U., Castelli, G., Pelosi, E. (2018). *Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells*. *Cancers*, 10 (248): 1-81.
93. Tortora, G., Derrickson, B. (2018). *Principios de Anatomía y Fisiología*. (15<sup>a</sup> ed.). China: Editorial Médica Panamericana.
94. Van-Haaften, C., Duke, C., Weerheim, A., Smit, N., Van-Haard, P., Darroudi, F., Trimbos, B. (2011). *Potent cytotoxic effects of Calomeria amaranthoides on ovarian cancers*. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(29): 3-6.
95. Vela, L., Turrado, E., Piñeiro, M., Correa, I. (2016). *El adenocarcinoma de cérvix como causa infrecuente de sangrado vaginal en la mujer joven*. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, 39 (3): 168-170.
96. Wang, C., Zhao, Y., Liu, Y., Zhang, Z. (2008). *Two New Eremophilane-Type Sesquiterpenoids from the Rhizomes of Ligularia veitchiana (Hemsl.) Greenm.* *Helvetica Chimica Acta*, 91: 1712- 1716.
97. Williams, G., Stoeber, K. (2011). *The Cell Cycle and Cancer*. *Journal of Pathology*, 226: 352-364.
98. Wua, L., Liao, Z., Liub, C., Jiaa, H., Sun J. (2016). *Eremophilane Sesquiterpenes from the Genus Ligularia*. *Chem. Biodiversity*, 13: 645 – 671.
99. Yuan, J., Kroemer, G. (2010). *Alternative cell death mechanisms in development and beyond*. *Genes Dev*, 24: 2592-2602.
100. Yuan, W., et al. (2015). *Selective cytotoxic eremophilane-type sesquiterpenes from Penicillium citreonigrum*. *J Asian Nat Prod Res*, 17(12): 1239–1244.
101. Yuyama, K., Fortkamp D., Abraham, W-R. (2017). *Eremophilane-type sesquiterpenes from fungi and their medicinal potential*. *Biol Chem*, 399: 3-27.
102. Zappa, C., Mousa, S. (2016). *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. *Transl Lung Cancer Res*, 5(3): 288-300.

## 12. Apendice

### Preparación de reactivos

- Medio de cultivo RMPI-1640

RMPI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.43 g/L
NaHCO <sub>3</sub> (SIGMA, USA)	2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. Se almacena a 4°C.

El medio de cultivo se complementa con suero de neonato 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 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 minutos. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL para su mejor 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 1000 mL de agua bidestilada.

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

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 1000 mL. Esta solución se filtra por medio de filtros de membrana

con diámetro de 42  $\mu\text{m}$ , la solución se esteriliza a una presión de 1.20  $\text{kg}/\text{cm}^2$  y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

- Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales HeLa, MDA-MB-231 y SK-LU-1 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)	0.4 g
Cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA, USA)	8.0 g
Cloruro de potasio (KCl) (SIGMA, USA)	0.4 g
Tris (SIGMA, USA)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20  $\text{kg}/\text{cm}^2$  y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento de su 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 solubiliza y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

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

- Glutaraldehído (1.1%)

A 1.57 mL de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43 mL 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 de 1 mL de DMSO. Se almacena a temperatura ambiente

- Paraformaldehído al 2%

Se calienta en baño maría a 60°C 20 mL de PBS y se agregan 0.4 g de paraformaldehído, una vez disuelto, se coloca la solución en hielo.