



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

TESIS DE LICENCIATURA

Determinación del ARNm para citocromo c en líneas celulares de CaCu, cultivadas en presencia del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne.

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

Santiago Cruz Rubí

Directora de Tesis:

Ma. en C. Rosalva Rangel Corona

Asesora Interna:

Dra. Alejandrina Graciela Avila Ortiz



México, Distrito Federal, 2014



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **SANTIAGO CRUZ RUBÍ**, con número de cuenta **305033286**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 junio de 2014** a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. ALEJANDRINA GRACIELA AVILA ORTIZ

VOCAL Dra. ROSALVA RANGEL CORONA*

SECRETARIO Biól. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE Biól. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Determinación del ARNm para citocromo c en líneas celulares de CaCu, cultivadas en presencia del extracto de Sargassum buxifolium (Chauvin) M.J. Wynne.**

Opción de titulación: Tesis

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D.F., a 30 de mayo de 2014

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

El presente trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Oncología Celular, L 4-PB, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), perteneciente a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y el asesoramiento de la Dra. Alejandrina Avila Ortiz.

Así mismo hago mención de que este trabajo de tesis contó en con el apoyo financiero del Programa PAPIIT con clave de proyecto IN215713 y PAPIME con clave de proyecto 213312 de la DGAPA, UNAM.

"Observar la naturaleza, estudiar sus productos, buscar las relaciones generales y particulares que han ido imprimiendo en sus caracteres y, finalmente, intentar comprender el orden que hace imperar por todas partes, así como su funcionamiento, sus leyes y los medios infinitamente variados que emplea para dar lugar a este orden, es ponerse en camino de adquirir los únicos conocimientos positivos que se encuentran a nuestra disposición, por otra parte, que pueden sernos verdaderamente útiles y al mismo tiempo nos pueden proporcionar las satisfacciones más dulces y limpias capaces de aliviarnos de las inevitables penas de la vida".

Jean-Baptiste Lamarck, Filosofía Zoológica.

“La muerte no es más que un cambio de misión”

León Tolstoi

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo conjunto en la que participaron directa e indirectamente muchas personas a las cuales les estoy infinitamente agradecida. Es por ello que deseo comenzar reconociendo y agradeciendo a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme acogido y dado la oportunidad de continuar con mi formación, así mismo agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por abrirme sus puertas y a cada uno de mis maestros por introducirme a conocer el fascinante mundo de la Biología.

A mis padres, Alfredo Santiago López y Adelina Cruz Zárate, por su amor, apoyo y entera confianza depositada en mí durante mi formación, les entrego el producto de mi esfuerzo, gracias a ustedes porque a través de su ahínco me han legado una invaluable herencia, mi formación profesional.

A mi hermana Lucero Santiago Cruz, por su apoyo moral y estímulo que siempre me ha proporcionado, por estar en los buenos y malos momentos, por hacerme compañía en esas largas noches de desvelo cultivándonos para seguir con nuestros proyectos, gracias por tu amor incondicional.

Muy especialmente a mis abuelos, Alejo Cruz Hernández, Andrea Zárate Calderón, Jerónimo Santiago Moya y Juanita López Gómez, por sus sabios consejos, sus enseñanzas, sus valores, por alentarme a continuar con mis estudios y por su inmenso cariño, a ustedes queridos abuelos, gracias.

A todos mis tíos y tías, paternos y maternos, mi gratitud por el ejemplo de superación y sus consejos que me han impulsado a continuar mi camino. A mis primos y primas por el apoyo brindado, por su tiempo y por demostrarme su entero cariño y afecto, sobre todo a mis hermanos, Vicente Martínez Santiago y Jesús Raúl Martínez Santiago.

Mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, M. en C. Rosalva Rangel Corona, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por haber tenido la paciencia necesaria para guiarme y darme su confianza, por transmitirme sus conocimientos y por ser accesible en todo momento.

Gracias también a mis queridos amigos y compañeros por brindarme su apoyo y permitirme entrar en sus vidas durante estos años de convivir dentro y fuera del laboratorio, muy especialmente a Nallely, que entre lágrimas y risas supimos superar las adversidades. Agradezco también al técnico José Chavarría, quien muy amablemente tenía listo el material de trabajo, a todos ustedes gracias.

ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico, molécula compuesta por nucleótidos de desoxirribosa; contiene la información genética de todas las células vivas
- **ADNc:** ADN complementario, producto obtenido a partir de la RT
- **AIF:** (Apoptosis Inducing Factor), Factor Inductor de la Apoptosis
- **ANT:** (Adenine nucleotide translocator), Translocador de nucleótidos de adenina
- **Apaf-1:** Factor activador de apoptosis-1, Homólogo de la proteína CED-4 del *C. elegans*
- **APOPTOSOMA:** Complejo oligomérico formado por Apaf 1-citocromo c y procaspasa 9, que desencadena los procesos propios de la muerte celular
- **ATP:** Trifosfato de adenosina
- **ARN:** Ácido ribonucleico, molécula formada por nucleótidos de ribosa; transfiere instrucciones hereditarias del núcleo al citoplasma, también es el material genético de algunos virus.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero, lleva del ADN a los ribosomas el código de un gen codificador de proteína
- **ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico, se combina con proteínas para formar ribosomas, que son las estructuras que enlazan aminoácidos para formar proteínas
- **ARNt:** Ácido ribonucleico de transferencia, lleva el aminoácido correcto al ribosoma, según el código del ARNm
- **Bad:** Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, asociado a Bcl-XL /Bcl-2
- **Bak y Bax:** Miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
- **Bcl-2:** (B-Cell lymphoma 2). Miembro de la familia Bcl-2, identificada como producto del proto-oncogen Bcl-2
- **Bcl-b:** Miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2
- **Bcl-XL:** Miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1
- **Bcl-w:** Miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2
- **BH:** (Homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica
- **BH3:** Dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2
- **BH1, 2 y 4:** Dominios antiapoptóticos de la familia Bcl-2
- **Bid:** Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés *BH-3 Interacting domain Death*
- **Bim:** Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, comparte la secuencia de homología sólo en el dominio BH3
- **CaCu:** Cáncer Cérvico Uterino
- **CARD:** Dominio de reclutamiento de caspasas
- **CASPASAS:** Cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticas que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteólisis en lugares previos a aspartato
- **Ced:** (Cell Death Abnormal), Muerte celular anormal; genes que regulan la muerte celular en *C. elegans*
- **dATP:** Desoxiadenosina trifosfato. Participa en el reclutamiento y activación de la procaspasa 9
- **DD:** Dominio de muerte
- **DED:** Dominio efector de muerte
- **dNTPs:** Desoxinucleótido trifosfato
- **FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas

- **FAS:** CD95/APO-1. Miembro de la super-familia de receptores de muerte TNF
- **FASL:** Ligando del receptor de muerte Fas
- **FS:** Fosfatidilserina
- **IAP:** Inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo
- **IARC:** Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
- **LSPH:** Linfocitos de Sangre Periférica Humana
- **PARr:** Poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por las caspasas
- **PBS:** Tampón salino fosfato
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PPTM:** Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
- **Sabu(Ch)W:** Extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne
- **SFB:** Suero Fetal bobino
- **Smac/DIABLO:** Inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa, proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral que se une al TNFR-1
- **TNF-R:** Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
- **TRADD:** Proteína con dominio de muerte asociada a TNF-R1
- **TRAIL:** Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF
- **TRIAL:** Ligando inductor de apoptosis con TNR
- **VDAC:** (Voltage Dependent Anion Channel), Canal de aniones dependiente de voltaje; funciona como controlador de acceso para la entrada y salida de los metabolitos mitocondriales
- **XIAP:** proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis.
- **$\Delta\Psi_m$:** Potencial mitocondrial.

ÍNDICE

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN	11
MARCO TEÓRICO.....	13
I. Muerte Celular	13
II. Apoptosis.....	16
III. Caspasas	20
IV. Rutas de señalización del proceso apoptótico.....	22
a) Vía extrínseca o de los receptores de muerte	23
b) Vía intrínseca o mitocondrial	23
V. Disipación del potencial de membrana mitocondrial	26
VI. Familia Bcl-2	28
VII. Formación del Apoptosoma.....	30
VIII. Cáncer.....	31
IX. Cáncer Cérvicouterino	33
X. Productos Antiproliferativos Naturales	37
a) Generalidades de las algas.....	38
b) Algas Pardas.....	40
c) Género <i>Sargassum</i>	42
JUSTIFICACIÓN	46
HIPÓTESIS.....	47
OBJETIVOS	47
General	47
Particulares.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Material Biológico	48
Cultivo Celular	48
Extracción del ARN total	49
Cuantificación del ARN	50
Obtención del ADNc por RT-PCR.....	51
Retrotranscripción (RT)	51
Amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	512
Electroforesis.....	522

Análisis de las bandas por densitometría	533
RESULTADOS.....	555
Integridad del ARN total en las líneas celulares de CaCu	555
Expresión de β -actina en líneas celulares de CaCu.....	566
Expresión de citocromo c en la línea celular CALO.....	600
Expresión de citocromo c en la línea celular INBL	633
DISCUSIÓN	677
CONCLUSIONES	722
PERSPECTIVAS	722
BIBLIOGRAFÍA.....	733
APENDICE I.....	809
a. Retrotranscripción	799
b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	799
APENDICE II	80
Soluciones para cultivo	80
Reactivos Extracción ARN Total.....	80
Reactivos Retrotranscripción (RT).....	80
Reactivos (PCR).....	80
Reactivos y soluciones para electroforesis.....	80
APENDICE III.....	81
Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)	81
Solución fisiológica de Verseno.....	81
Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)	81
DNTPS 10 mM (MIX)	82
TBE 10X	82
TBE 1X	82
TBE 0.5X.....	82

RESUMEN

La investigación contra el cáncer es una de las tareas más importantes debido al incremento de este padecimiento en la población a nivel mundial. Al respecto el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) constituye una de las principales causas de muerte en el mundo, ocupando el tercer lugar de incidencia entre las neoplasias malignas en la mujer; presentando una mayor frecuencia, llegando a 40 por 100,000 mujeres en países en desarrollo (American Cancer Society, 2011). Es por ello que la búsqueda de nuevos tratamientos contra esta enfermedad, que disminuyan los efectos secundarios que presentan la mayoría de los tratamientos convencionales, ha aumentado en los últimos años. En este sentido los recursos naturales marinos, especialmente las algas, han mostrado presentar una amplia gama de metabolitos secundarios con una diversidad de actividades biológicas. En México el alga parda del género *Sargassum* se encuentra bien distribuida tanto en el litoral del Pacífico como en el Golfo de México; estudios realizados en dicho género han demostrado que los extractos obtenidos a partir del alga exhiben efectos antibacteriales, antifúngicos, anticoagulante, antioxidante, antiinflamatoria y además antitumoral (De Lara-Isassi, 1991).

Debido a que aún no se tiene documentada la actividad biológica del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (*Sabu*(Ch)) y con el propósito de estudiar el efecto apoptótico de la fracción 2 del extracto de dicha alga sobre las líneas celulares de CaCu, se evaluó la expresión del ARNm para citocromo c, una proteína proapoptótica, mediante la técnica de RT-PCR.

Se sabe que cuando el citocromo c es liberado hacia el citosol se une con una proteína denominada Apaf-1, la cual interacciona con ATP, adquiere un cambio conformacional en la cual expone sus dominios CARD, con ello activan caspasas iniciadoras y forma el complejo denominado apoptosoma, que tiene la capacidad de activar caspasa efectoras y con ello iniciar la cascada apoptótica que lleva a la muerte de la célula (Shi, 2004). Por esta razón el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la expresión del ARNm para citocromo c, para ello se realizaron cultivos de 48h y 72h con células de las líneas de CaCu, CALO e INBL, en presencia y ausencia del extracto de *Sabu*(Ch). Los resultados demuestran que dicha fracción regula positivamente la expresión del ARNm para citocromo c en la línea celular CALO a un tiempo de exposición de 48h con respecto a la línea celular INBL en la que lo hace hasta las 72h; por lo que el extracto de esta alga puede servir como un potencial terapéutico como agente contra el CaCu.

INTRODUCCIÓN

El CaCu es una enfermedad en la que se forman células malignas (cancerosas) en los tejidos del cuello uterino, por lo general evoluciona lentamente con el paso del tiempo. Antes de que el cáncer aparezca en el cuello del útero, las células del mismo atraviesan cambios llamados displasias, por lo que comienzan a desarrollarse en el tejido cervical células que no son normales. Luego, las células cancerosas comienzan a crecer y diseminarse más profundamente en el cuello uterino y las áreas cercanas. El principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de cuello uterino es el Virus del Papiloma Humano (VPH), un virus de transmisión sexual, que se transmite por contacto genital. Hay más de 100 tipos diferentes, en relación a su patogenia oncológica se clasifican en tipos de alto y bajo riesgo oncológico. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) considera que los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 son carcinógenos para los humanos (Instituto Nacional del Cáncer, 2012).

A pesar del Programa Nacional de Detección Oportuna del Cáncer, mediante la prueba de Papanicolaou y el uso de la vacuna contra el VPH, el Cáncer Cérvico uterino (CaCu) continúa siendo una de las principales causas de muerte en las mujeres mexicanas; presentando una tasa de mortalidad del 13.9 %, al día se diagnostican 4270 casos, de los cuales, al menos el 50 % de la población fallece por esta causa (INEGI, 2010).

Existen diferentes tipos de tratamientos disponibles para las pacientes con cáncer de cuello uterino, tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, sin embargo éstos tratamientos convencionales presentan diversos efectos secundarios perjudiciales para la paciente. Es por ello que en los últimos años las investigaciones se enfocan en el uso de moléculas bioactivas extraídas de algas marinas. Al respecto el género *Sargassum* ha reportado presentar un gran número de metabolitos bioactivos con propiedades antibióticas, antibacterianas, inmunorreguladora, fungicida y antiproliferativa (De Lara-Isassi, 1991).

Bajo este contexto, estudios recientes realizados en el Laboratorio de Oncología Celular 4 PB-UMIEZ, revelaron que el extracto etanólico de la fracción 2 de la especie *Sabu*(Ch), proporcionado amablemente por la Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz del Herbario de la FES Zaragoza, presentó actividad citostática en dos líneas celulares de CaCu, CALO e INBL a una dilución de 1:8123 y 1:8910, respectivamente, deteniendo el ciclo celular en la fase de síntesis (S) a CALO y en la fase G1 a la línea celular INBL; inhibe en la proliferación celular para ambas líneas. Además se realizaron ensayos con

Linfocitos de sangre periférica humana (LSPH), con el fin de saber si la fracción 2 del extracto ejercía efecto citotóxico en células normales, observando un aumento en la proliferación y activación de los mismos (Norma Luna, 2012). Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto apoptótico de dicho extracto en líneas celulares de CaCu; CALO con una estadio clínico IIB, lo cual significa que el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino a los tejidos que rodean el mismo, e INBL, con un estadio clínico IVB metastásico, en donde las células tumorales se diseminan a otras partes del cuerpo, como el hígado, los pulmones, los huesos o ganglios linfáticos distantes.

MARCO TEÓRICO

I. Muerte Celular

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo período de vida es largo, como las musculares o neuronales, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras. 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, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación, división y diferenciación celular. Se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día miles de millones de células. El recambio celular en los tejidos de un organismo se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento.

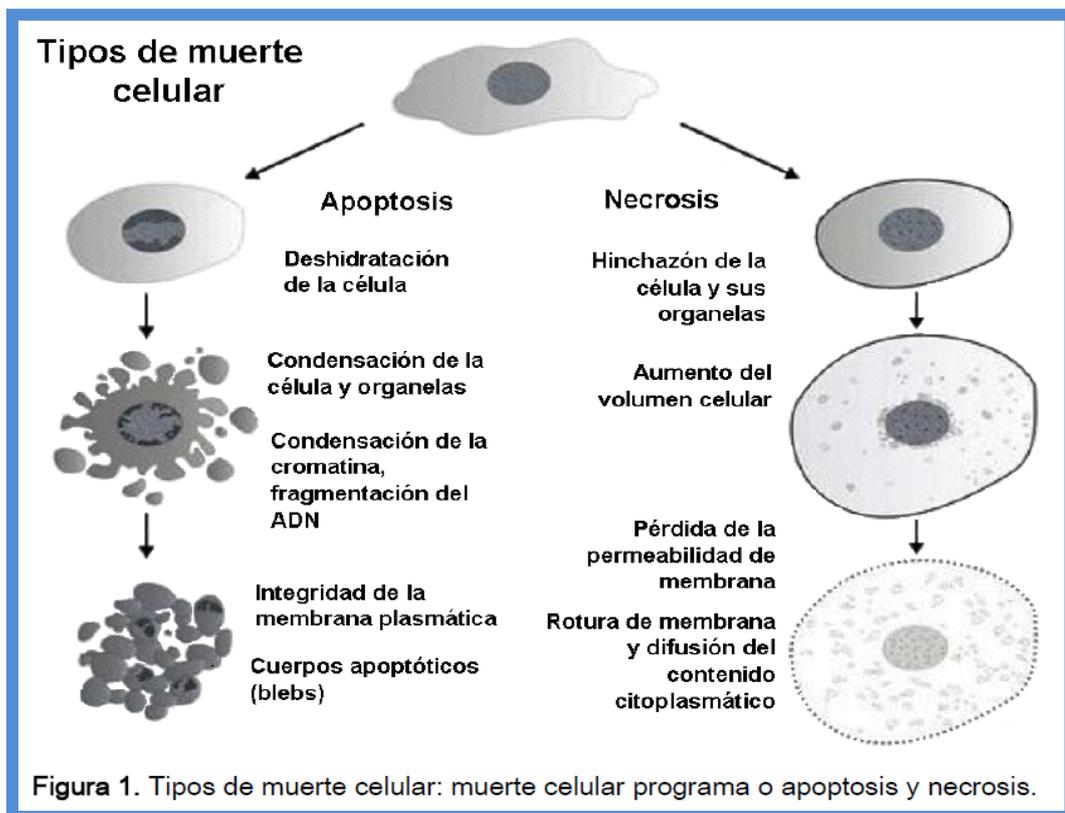
El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos definitivos impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. (Lizarbe Iracheta, 2007).

La muerte celular constituye un aspecto esencial del funcionamiento normal de los organismos multicelulares. El mantenimiento de la homeostasis de estos organismos depende de un intrincado balance entre la renovación y la muerte celular. En este sentido la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis constituyen los dos mecanismos básicos de muerte celular y pueden ser considerados como los extremos de un amplio abanico de procesos que dirigen a las células no funcionales hacia su eliminación (Proskuryakov et al., 2003; Penaloza, *et al.*, 2006) (Figura 1).

Durante la historia, la muerte celular fisiológica ha sido conocida por varios nombres. Virchow, en 1858, fue el primer investigador en describir los procesos de muerte celular y, basándose sólo en parámetros macroscópicos, los definió como degeneración, mortificación y necrosis. En 1879, utilizando observaciones microscópicas se introducen los términos *Karyorhesis* y *Karyolysis*, que hacen referencia a la desintegración y desaparición del núcleo. Diez años más tarde, Arnheim, propone los términos *piknosis* y marginación de la cromatina. Flemming, estudiando los folículos de los ovarios de los mamíferos, observó y describió la desaparición de células, denominando a este proceso *chromatolisis*, término que fue reutilizado por Gräper, en 1914, como antónimo de los procesos de mitosis. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Currie implantan el término “apoptosis”, ampliamente utilizado en nuestros días, que evoca a la caída de las hojas desde los árboles en otoño o la de los pétalos de las flores. En la última década, se ha dado un crecimiento exponencial de los trabajos de investigación realizados sobre los procesos que rodean a la muerte celular y parece que se ha llegado al consenso de englobarlos en dos grandes grupos: necrosis y apoptosis.

El término necrosis (del griego *nekrós* “muerte”) es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo que reúne los procesos violentos y catastróficos; se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia, producida por agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP, las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática, producto de un proceso osmótico desmesurado, con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Degterev A., *et al.*, 2008), lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado.

Otro tipo de muerte celular conlleva a la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca una muerte celular programada: una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada, conocido como apoptosis. Estos mecanismos fisiológicos de muerte son empleados por los organismos pluricelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas. Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al conjunto de su organismo durante su ciclo vital. La muerte por apoptosis es más limpia que la necrosis, detectándose cambios morfológicos particulares. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación, ya que la membrana celular, que no se destruye, engloba a los cuerpos apoptóticos o material celular, los cuales son, reconocidos, captados y eliminados por células fagocitarias, sin dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán Joaquín, 2003).



(J. Mora, Nancy, 2009).

II. Apoptosis

Los organismos pluricelulares están constituidos por un número determinado de células, que es característico de cada especie. Ese número resulta de la suma de dos procesos, a saber, la división celular y, la muerte de un número igual de células redundantes. La muerte celular ejerce efectos opuestos a la división celular en cuanto a la regulación del tamaño de los órganos y los tejidos; por lo tanto, la división y la muerte celular son importantes para la homeostasis del organismo (Vaux, 1999; Kroemer, 1995).

La apoptosis juega un papel esencial en la supervivencia de los seres vivos y es considerado como un componente imprescindible de varios procesos, incluyendo el recambio celular normal, el funcionamiento y mantenimiento de tejidos y del sistema inmunológico, el desarrollo embrionario normal, la metamorfosis, la eliminación de las células dañadas, infectadas, senescentes, o que simplemente necesitan ser reemplazadas (Reed, DJ, 1990).

La apoptosis 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*”. En este caso, una serie de estímulos o señales hace que la célula decida su propia muerte. Este tipo de muerte se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nematodos y los mamíferos. (Vaux, 1992; Hengartner, M.O., *et al.*, 1994).

El estudio de la apoptosis se inició en los años 1800, originalmente el concepto de muerte celular fue descrito por Carl Vogt en 1842, después de estudiar el desarrollo en ranas. La primera descripción morfológica sobre la apoptosis fue dada en 1885 por Walter Fleming, cuyos elegantes dibujos mostraron el encogimiento celular, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpo apoptóticos, los cuales ahora son aceptados como huellas de la apoptosis. El término apoptosis, del griego caída de las hojas de los árboles o los pétalos de las flores, se acuñó en 1972 por John F. Kerr, Andrew H. Wyllie y Alistair R. Currie (Kerr J.F., *et. al.*, 1972) para diferenciar la muerte que ocurre de forma natural o fisiológica durante el desarrollo de la muerte patológica por necrosis generada por un daño agudo. A partir de evidencias morfológicas obtenidas por microscopía electrónica de tejido hepático expuesto a toxinas y linfocitos tratados con hormonas, establecieron las diferencias entre dos tipos de muerte celular. También describieron los cambios estructurales característicos de la apoptosis. Proponen que la muerte por apoptosis responde a un programa de muerte

intracelular que puede ser activado o inhibido por estímulos tanto fisiológicos como patológicos. El componente inicial descrito del mecanismo molecular de la muerte celular en mamíferos fue la proteína Bcl-2 (Vaux D.L., *et. al.*, 1992), pero la primera evidencia de la existencia de un programa genético que subyace a la muerte celular fisiológica se obtuvo de los estudios realizados sobre el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. La activación y regulación de la apoptosis en seres vivos superiores depende de los correspondientes homólogos a los encontrados en dicho organismo, pero con un grado de complejidad mayor (Liu y Hengartner, 1999). *C. elegans* es un nemátodo con un genoma compuesto por 17800 genes y 1090 células somáticas que se generan en la formación de los gusanos adultos, de las cuales 131 de estas células sufren apoptosis o muerte celular programada. Estas 131 células mueren en puntos concretos durante el proceso de desarrollo, lo cual demuestra la notable precisión y control en este sistema (Formigli, *et. al.*, 2000; Sperandio, *et. al.*, 2000; Debnath, *et. al.*, 2005).

En 1986, el grupo de H. R. Horvitz inicia el estudio de los genes que aparecían alterados en nemátodos mutantes; a estos genes les denominaron *Ced* (*cell death abnormal*). Se identificaron los genes *ced-3* y *ced-4*, que activaban el proceso de muerte celular, y el gen *ced-9*, que lo inhibía. Por tanto, estos genes son responsables de que una célula viva o muera y constituyen el complejo ejecutor. Si una célula expresa los tres genes sobrevive, pero si no expresa el gen inhibidor de la muerte *ced-9*, se suicida por apoptosis. El conocimiento sobre la actuación de estos genes ha permitido establecer el dogma “central de la apoptosis”. La proteína EGL-1 (que sólo contiene un dominio BH3) se induce en las células que están destinadas a morir e interacciona con la proteína reguladora *ced-9*. Esta interacción desplaza a la proteína adaptadora *ced-4*, factor activador de una proteasa, que promueve la activación de *ced-3*. Ésta última tiene actividad proteásica y es una de las efectoras y ejecutoras de la apoptosis, que degradan a sus sustratos diana, desmantelando la compleja estructura celular y desencadenando la muerte. En vertebrados se ha descrito una ruta similar, con moléculas homólogas a las descritas en *C. elegans*. Sin embargo, el escenario es mucho más complejo, el número de éstas es superior y, además, existen mecanismos reguladores adicionales. La capacidad de Bcl-2, el homólogo del gen antiapoptótico *ced-9*, para prevenir la muerte celular programada en *C. elegans* (Hengartner, M.O., *et. al.*, 1994) y la existencia de otros genes que controlan la apoptosis equivalentes en mamíferos y *C. elegans* (Yuan J., *et. al.*, 1993) pone de manifiesto que este proceso está altamente conservado a lo largo

de la evolución, que es básico y universal. Todas las células expresan los componentes moleculares que les permiten "suicidarse" en función de las señales procedentes del entorno celular o de su interior.

Durante la apoptosis se presentan una serie de cambios en la estructura celular que afectan dramáticamente la morfología de la célula, dichos cambios muestran características morfológicas y bioquímicas propias del proceso apoptótico (Figura 2), entre ellas se encuentran la condensación rápida del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión celular de la membrana plasmática. En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN en segmentos específicos que van de los 180 a 200 kp de bases. Así mismo el citoplasma se condensa y forma vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegido por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por células aledañas o por fagocitos profesionales, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre las células. Se ha encontrado que la fagocitosis rápida de los cuerpos apoptóticos se debe al incremento en la membrana celular de fosfatidilserina, la cual es una señal para las células fagocíticas.

El proceso apoptótico suele ser dividido en tres etapas:

- 1) FASE DE INICIACIÓN: La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son en muchos casos originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de *citocromo c* de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones), pudiendo un mismo estímulo generar efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares, e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentran en diferente etapa de desarrollo.
- 2) FASE DE EJECUCIÓN: A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios

que presenta la célula durante la apoptosis, dicha maquinaria, la constituyen principalmente las caspasas.

3) FASE DE ELIMINACIÓN: La existencia de más de un mecanismo de reconocimiento asegura la remoción eficiente de células apoptóticas, disminuyendo la posibilidad de que estas células liberen su contenido citoplásmico y causen daño. Un requerimiento especial para que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas es la expresión de un ligando adecuado en su superficie celular y de su ligando en el fagocito. Se ha observado que varias moléculas de superficie en las células fagocíticas median el reconocimiento y la internalización de las células apoptóticas. Entre ellas se pueden citar algunas lectinas, integrinas, ABC transportadores, CD14 y receptores del complemento. Uno de los mecanismos más ampliamente estudiados y que al parecer es una señal que siempre está presente en las células apoptóticas, es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la membrana externa de moléculas de fosfatidilserina (FS), que de manera normal están restringidas en la membrana interna; de ésta forma la exposición de la FS es una señal suficiente para inducir la fagocitosis de las células que lo expresan (Fadok VA, 1992).



Figura 2. Cambios morfológicos y bioquímicos propios del proceso apoptótico. (J. Mora, Nancy, 2009).

III. Caspasas

Los cambios estructurales y bioquímicos que presentan las células apoptóticas son provocados por la transmisión de señales mediadas por un grupo de moléculas evolutivamente conservadas de cisteín-proteasas que cortan a la proteína diana detrás de un residuo de ácido aspártico, denominadas caspasas, las cuales coordinan y ejecutan el proceso. Las caspasas se sintetizan como proenzimas (zimógenos), denominadas procaspasas, sin actividad biológica y deben de activarse por proteólisis limitada y asociación de subunidades (Stennicke, H.R., *et al.*, 1998) para poder ejercer su acción.

En la estructura de las procaspasas se pueden distinguir tres dominios (Figura 3): el prodominio amino terminal, la subunidad grande (de aprox. 20 kDa) y la subunidad pequeña (de 10 kDa). La longitud del prodominio es muy variable y este está implicado en la regulación de la activación. En esta región se localiza un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD; *Caspase-Recruitment Domain*) o el dominio efector de muerte (DED; *Death-Effector Domain*), que típicamente facilitan la interacción con proteínas que contengan dominios iguales. Las caspasas se clasifican desde un punto de vista funcional en dos clases, aquellas caspasas que poseen un prodominio largo, parecen estar implicadas en la iniciación del proceso de apoptosis y se denominan caspasas iniciadoras o activadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10; se autoactivan e inician el proceso proteolítico sobre otras caspasas). Las caspasas con un prodominio corto se activan por las caspasas iniciadoras para ejecutar el programa de apoptosis y se las conoce como caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Éstas son, en último término, las que degradan una amplia gama de sustratos durante la apoptosis (Earnshaw W.C., *et al.*, 1999).

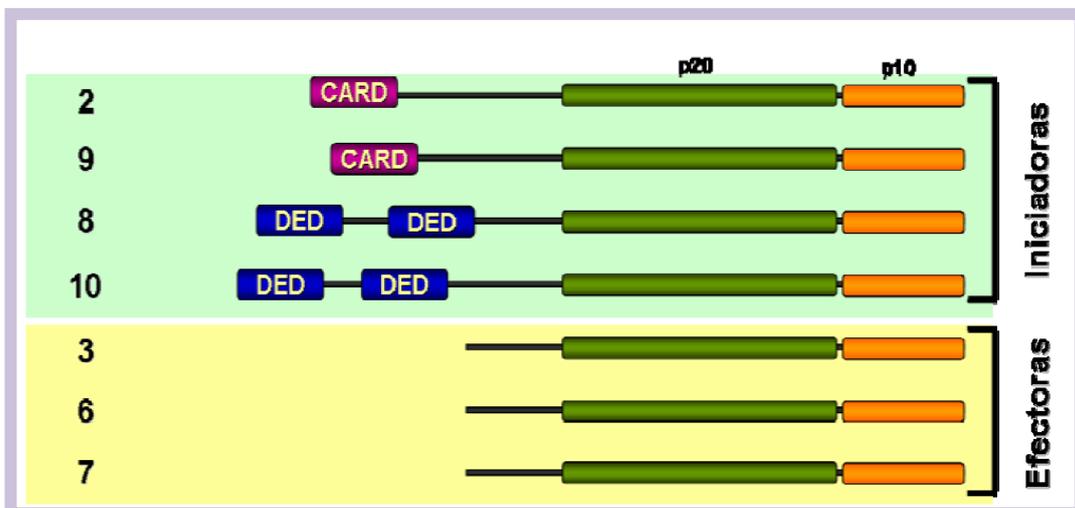


Figura 3. Estructura y clasificación de las caspasas involucradas en el proceso apoptótico. (Alcalá Sánchez, Sonia, 2008).

Estas proteasas están presentes como zimógenos inactivos en todas las células animales, pero pueden ser disparadas para asumir un estado activo, lo cual generalmente involucra su procesamiento proteolítico, en un residuo conservado de ácido aspártico (Asp), y asociación de subunidades. Las caspasas se activan una vez iniciadas las distintas vías de señalización del programa de apoptosis. La activación de cada caspasa requiere un mínimo de dos roturas proteolíticas: una, en la que se separa el prodominio del resto de la molécula, y otra, que da lugar a las subunidades grande y pequeña (Figura 4). Estos cortes, en los que están implicados residuos de ácido aspártico, ocurren de un modo ordenado y van seguidos de la asociación de dos de cada una de estas subunidades para formar una estructura tetramérica. Esta asociación puede ser homo- o heterodimérica, generando una enzima con dos centros activos y una especificidad absoluta de corte detrás de un residuo de aspártico. Todo ello implica que estas enzimas puedan ser activadas bien autocatalíticamente o bien en cascada por otras enzimas con especificidad similar. En células sanas las caspasas iniciadoras existen en forma monomérica mientras que las efectoras aparecen como dímeros preformados (Taylor R.C., *et. al*, 2008). Además, también se ha descrito que algunas caspasas se pueden activar por cambios conformacionales, como se describirá más adelante con la formación del apoptosoma, el cual activa caspasa 9 iniciadora.

La activación inicial de las caspasas es un proceso irreversible, complejo, y altamente regulado para garantizar que sólo ocurra cuando realmente sea necesario. Una de las características bioquímicas de las caspasas es su alta especificidad por los sustratos que hidrolizan. Reconocen secuencias de cuatro aminoácidos que contienen un residuo de ácido aspártico, sin embargo la estructura terciaria de las proteínas resulta determinante en el reconocimiento e hidrólisis de los sustratos. De esta manera las caspasas no hidrolizan todas las proteínas que contienen dicha secuencia y se evita una degradación aleatoria de proteínas durante el proceso de apoptosis.

La degradación proteolítica por las caspasas puede conducir a diferentes resultados dependiendo de la naturaleza del sustrato y la posición exacta del sitio de ruptura en la secuencia primaria. La forma más sencilla y probablemente la más frecuente, resulta en la pérdida o ganancia de actividad biológica (Hengartner MO, 2000). Los principales sustratos de las caspasas efectoras incluyen: proteínas cinasas (en las cuales las caspasas separan el dominio regulador autorepresivo, del dominio catalítico) y otras proteínas transductoras de señales, tales como proteínas de la matriz nuclear y del citoesqueleto, enzimas modificadoras de la cromatina (por ejemplo, la polimerasa poli ADP ribosa,

PARr), proteínas reparadoras del ADN y subunidades inhibitoras de ciertas endonucleasas, que son en parte responsables de la digestión del genoma. Estos eventos de degradación proteolítica son irreversibles y conducen a la muerte de la célula (Degterev A. y Yuan J., 2008).

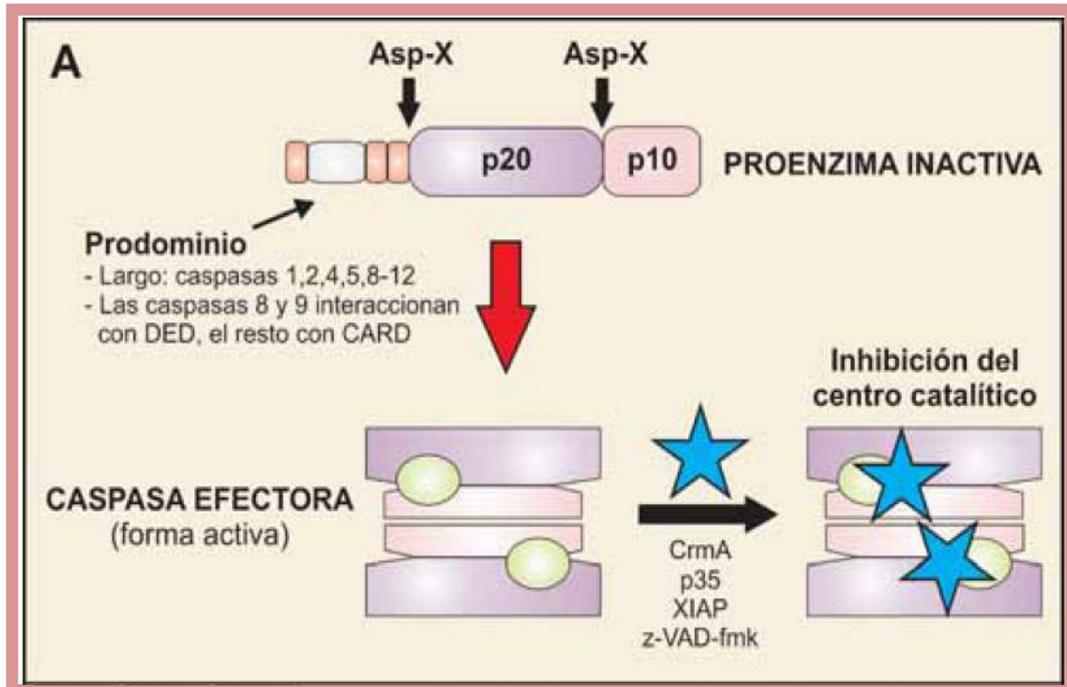


Figura 4. Mecanismos de activación de caspasas. Las caspasas se sintetizan bajo la forma de proenzimas inactivas que, en general, requiere una activación proteolítica por eliminación del prodominio y separación de las subunidades pesada (p20) y ligera (p10). Esta rotura se produce siempre detrás de residuos de ácido aspártico. Tras la digestión proteolítica, las caspasas efectoras (p.e. caspasa-3) forman un heterotetrámero activo, compuesto por dos subunidades pesadas y dos ligeras, con dos centros catalíticos por tetrámero. (Ma. Antonia, 2007).

IV. Rutas de señalización del proceso apoptótico

La apoptosis, como proceso activo dependiente de energía, se puede iniciar por una gran variedad de estímulos, intracelulares o extracelulares, participando las células en su propia muerte de una forma organizada y eficiente. Este proceso de muerte celular por apoptosis se lleva a cabo a través de una multitud de vías interconectadas y altamente reguladas. A pesar de que el modo y los mecanismos mediante los cuales puede iniciarse la muerte celular por apoptosis son muy diferentes, ambas vías convergen para producir, en última instancia, las alteraciones morfológicas y bioquímicas características del proceso. De una manera general, puede hablarse de vía extrínseca y de *vía intrínseca* (Yan and Shi, 2005).

a) Vía extrínseca o de los receptores de muerte

Una primera ruta de señalización del proceso de apoptosis tiene su origen en la membrana celular a través de lo que se conoce como vía extrínseca o de receptores de muerte. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembranal y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar el receptor. La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos a sus respectivos receptores de muerte. La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular (Figura 5). Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte (DD) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras como la proteína FADD. Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte (DEDs) capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 ó 10. La activación de la procaspasa-8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa-8 en la vía apoptótica mediada por receptores de muerte. La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras. Además, la caspasa-3 puede eliminar un dominio de la proteína Bid amplificando la señal de muerte celular causando un daño a la mitocondria (Muziño, *et al.*, 1996; Medema, *et al.*, 1997).

b) Vía intrínseca o mitocondrial

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como la activación de oncogenes o daño del ADN. El órgano mediador central de esta vía es la mitocondria, este organelo ha sumado a su papel de orgánulo generador de energía, el papel de centro de convergencia y de integración de señales de supervivencia y de muerte celular. La mitocondria cumple un papel importante en el proceso de apoptosis y lo desempeña en un doble sentido (Green and Reed, 1998): por una parte libera al citosol proteínas que desencadenan o potencian la respuesta apoptótica y por otra parte destaca la propia disfunción mitocondrial que se produce durante la apoptosis y que tiene como consecuencia el compromiso del metabolismo celular (Boyd, *et al.*, 1995).

La activación de la vía mitocondrial conlleva tres fenómenos interrelacionados que incluyen: (1) la disrupción del transporte electrónico, fosforilación oxidativa, y producción de ATP, (2) la alteración del potencial de oxido-reducción de la membrana mitocondrial, y (3) la liberación de proteínas mitocondriales al citoplasma que disparan la activación de las caspasas.

En la actualidad se sabe que en la mitocondria existe un proceso latente de transporte, conocido como “permeabilidad transicional mitocondrial”, cuya activación se presenta bajo ciertas condiciones y se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial (Verhagen, *et al.*, 2000). Se ha propuesto que esta permeabilidad mitocondrial, podría ser una de las vías de conducción de moléculas proapoptóticas. La mitocondria es un orgánulo caracterizado por la existencia de una doble membrana. Esta organelo presenta una membrana mitocondrial externa y una membrana mitocondrial interna, que dividen dos compartimentos submitocondriales: el espacio intermembrana, que es el espacio encerrado por ambas membranas y la matriz mitocondrial, que es el espacio que encierra la membrana interna. En algunos puntos del espacio intermembrana entran en contacto ambas membranas mitocondriales, la interna y la externa, formándose unas estructuras denominadas poros de permeabilidad transitoria. Los poros de permeabilidad se hallan formados por el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC, voltage dependent anion channel), que se encuentra en la membrana externa, y por el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, adenine nucleotide translocator), localizado en la membrana interna (Figura 5) (Van Gurp, *et al.*, 2003).

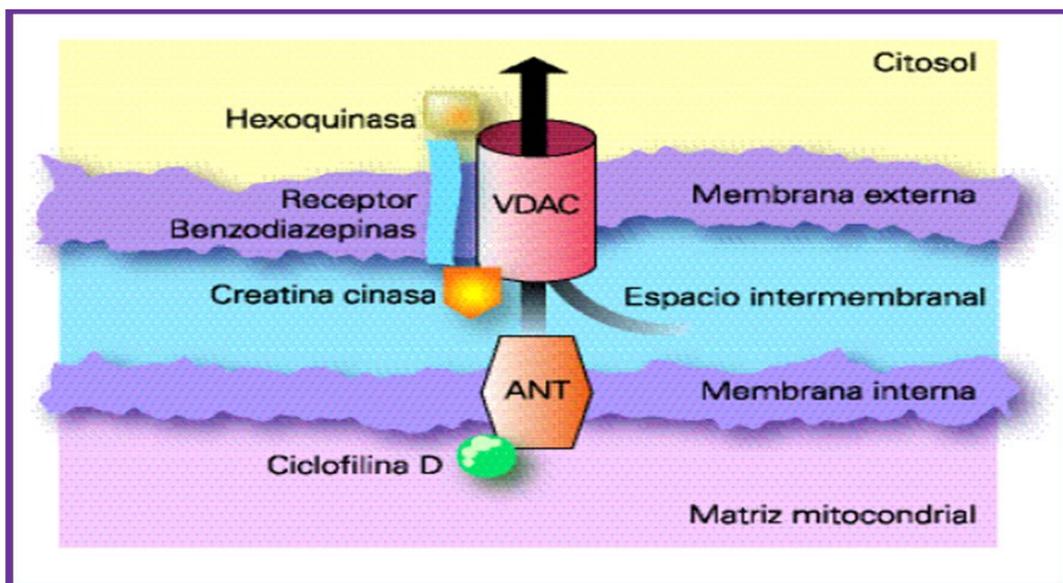


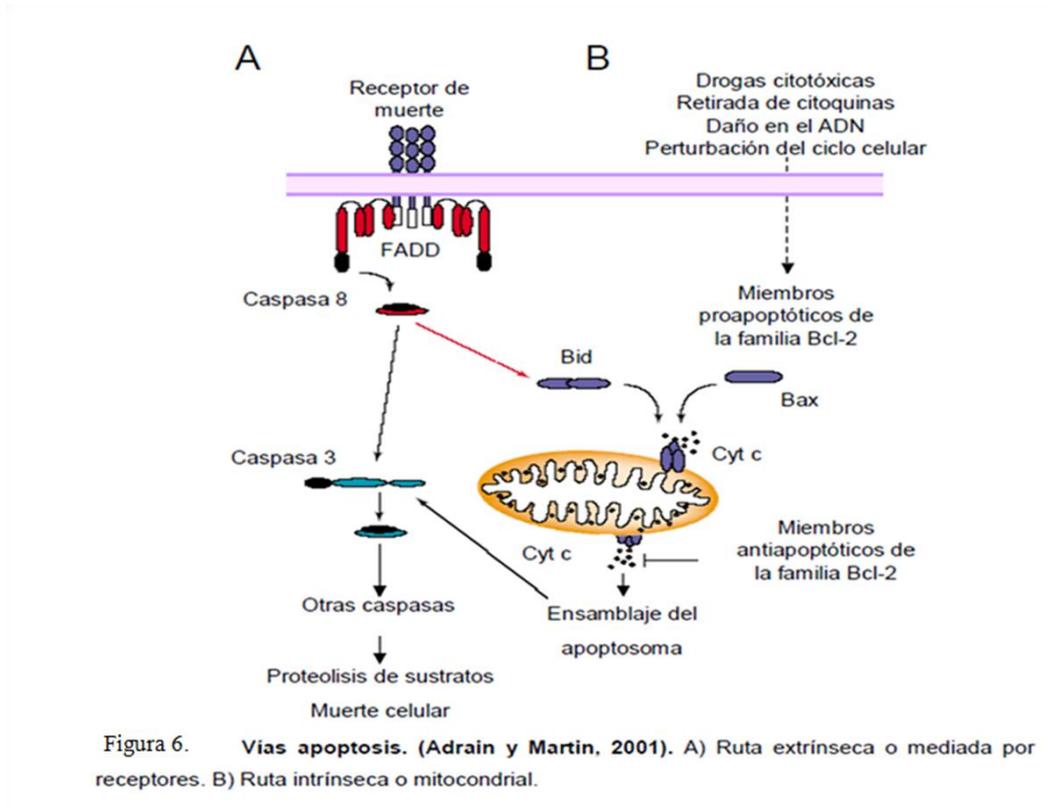
Figura 5. Estructura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. (De Tornero, *et al.*, 2002).

Muchas vías y estímulos apoptóticos convergen en la mitocondria; cuando un estímulo apoptótico alcanza a dicho organelo, los diferentes componentes proteicos pueden ensamblarse formando un poro, de un radio de 1,0 a 1,3 nm, que permite el paso de forma no selectiva, a moléculas de un tamaño inferior a 1.500 Da. Su apertura produce la permeabilización de las membranas mitocondriales, que desemboca en la liberación de moléculas que, una vez en el citosol, adquieren propiedades proapoptóticas (Ferri and Kroemer, 2001). Es por ello que el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial resulta crucial para la supervivencia y destino celular.

Se han caracterizado un total de 79 componentes de naturaleza peptídica que se liberan durante la apertura de dicho poro (Patterson, *et al.*, 2000). Entre estos componentes se incluyen enzimas catabólicos y multitud de iones y moléculas con conocida actividad proapoptótica, como el *citocromo c* (Cit c), Smac/DIABLO (Verhagen, *et al.*, 2000), Apaf-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1), factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés *apoptosis-inducing factor*) (Susin, *et al.*, 1999) entre otros. Una vez liberados al citoplasma, estos agentes pueden activar diferentes rutas de ejecución.

La liberación de *citocromo c* es considerada un paso clave y de no retorno en el inicio del proceso apoptótico. El *citocromo c* participa en la formación de una estructura citosólica denominada apoptosoma (Figura 6). Para ello se une con una gran afinidad a Apaf-1 (Zou, *et al.*, 1999), que normalmente se encuentra en el citosol en un estado inactivo (Saleh *et al.*, 1999). Al mismo tiempo se reclutan unidades de procaspasa 9, que quedan unidas a Apaf-1 (Hu, *et al.*, 1999; Jiang and Wang, 2000; Adrain and Martin, 2001). Este complejo, formado por Cit-c/APAF-1/caspasa-9, es un potente activador de caspasas, de modo que puede considerarse que opera como un enlace entre las señales iniciadoras de apoptosis que actúan sobre la mitocondria y la cascada de las caspasas (Bratton, *et al.*, 2001; Cain, *et al.*, 2002; Gerl and Vaux, 2005).

Por el contrario, AIF, una flavoproteína con homología significativa a reductasas ascorbato de plantas y NADH oxidasas bacterianas, se traslada de la mitocondria al citosol cuando existe un estímulo apoptótico apropiado, desencadenando procesos de condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, ya que interactúa de forma electrostática con el ADN, de una forma independiente a la activación de miembros de la familia de caspasas (Susin, *et al.*, 1999).



V. Disipación del potencial de membrana mitocondrial

En la mayoría de las células eucariotas existen diferencias de potencial eléctrico a través de sus membranas y también entre el citosol y el interior de los orgánulos, como es el caso de la mitocondria. Estas diferencias de potencial se deben por un lado, a la existencia de gradientes de concentración de iones como Na^+ , K^+ , Cl^- y H^+ a través de la membrana celular y por otra parte a la presencia de bombas electrógenas (Shapiro, 2000).

Las mitocondrias mantienen un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna. A la par que se mantiene un flujo de electrones a través de la membrana interna mitocondrial, se bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. De esta forma se crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna, la cual es totalmente impermeable a los protones. Este gradiente electroquímico constituye una fuerza protón-motriz de dos componentes. Por un lado consta de un componente eléctrico o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi_m$) y por otro lado consta de un componente químico o la diferencia de pH a través de la membrana interna mitocondrial. El componente eléctrico representa la mayor porción del potencial protón-motriz de la mitocondria. Es a través de este gradiente

electroquímico que la mitocondria es capaz de sintetizar ATP. Es decir que, el potencial de membrana mitocondrial surge como consecuencia de los protones bombeados fuera de la matriz mitocondrial, lo que crea un potencial negativo entre la matriz y el espacio intermembrana. Una disminución en la magnitud del potencial de membrana mitocondrial se conoce como despolarización y el incremento del mismo se conoce como hiperpolarización. El potencial puede reducirse a cero si la membrana mitocondrial se rompe o desaparecer si el metabolismo energético desaparece (Shapiro, 2000).

Los factores que regulan la formación y apertura del poro de permeabilidad son variados, entre ellos destacan el calcio, las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los miembros de la familia de proteínas de Bcl-2. La alteración de la permeabilidad mitocondrial es un acontecimiento temprano de la apoptosis que causa tanto la disipación del potencial de membrana mitocondrial como la aparición de proteínas mitocondriales apoptogénicas en el citosol (Zamzami y Kroemer, 2001). Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la permeabilidad mitocondrial, de modo que los miembros proapoptóticos tienden a alterar las propiedades de dicha membrana y favorecer tanto la disipación del potencial transmembrana como la salida al citosol de proteínas proapoptóticas. Por el contrario, los miembros antiapoptóticos tratan de que la permeabilidad de la membrana mitocondrial no se altere.

Se han propuesto diferentes modelos con el fin de explicar cómo son liberados los factores apoptogénicos, desde la mitocondria hacia el citosol, a través de la interacción de las membranas mitocondriales con las proteínas de la familia Bcl-2. Uno de los modelos propuestos para explicar la liberación de proteínas proapoptóticas postula que las proteínas tipo Bcl-2 actúan modificando la permeabilidad de los poros existentes en la membrana mitocondrial, como por ejemplo, los poros de permeabilidad transitoria (Martinou and Green, 2001; Henry-Mowatt et al., 2004).

Sin embargo, puesto que en algunas ocasiones se produce la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales sin que se detecte una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Fesik, 2000), se ha propuesto otro modelo en el que se defiende que las proteínas proapoptóticas del tipo Bax y Bak pueden formar poros en la membrana mitocondrial externa (Eskes, *et al.*, 2000) a través de los cuales se produce la salida de los factores mitocondriales. En este sentido, se ha demostrado que tras un estímulo apoptótico, la proteína Bax se oligomeriza, transloca y se inserta en la membrana mitocondrial externa. Además las proteínas proapoptóticas de tipo Bid,

inducen la oligomerización de Bax (Eskes, *et al.*, 2000). A pesar de que tBid (forma activada del factor Bid) puede formar poros *per se* al actuar directamente sobre la membrana mitocondrial, su función principal parece ser la activación de los factores de tipo Bax (Kuwana *et al.*, 2002).

VI. Familia Bcl-2

La ruta intrínseca incluye la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 que ejercen su función en la mitocondria por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Los miembros de la familia del protooncogen Bcl-2 son proteínas intracelulares que actúan como mediadores esenciales tanto en los procesos de muerte celular por apoptosis como en los procesos de supervivencia celular. Las proteínas de la familia Bcl-2 derivan su nombre del linfoma de células B2. Los miembros de esta familia tienen actividades opuestas que median la muerte y supervivencia celular. Las proteínas se pueden clasificar en subfamilias atendiendo a diferencias estructurales y funcionales. En dependencia de cómo afectan al proceso de muerte celular se describen dos tipos de proteínas: antiapoptóticas, si lo bloquean, por ejemplo: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bcl-b y Mcl-1, y las proapoptóticas si inducen el proceso de muerte celular por apoptosis, por ejemplo: Bax y Bak, entre las que también se incluyen aquellas que contienen sólo un dominio BH3, por ejemplo Bid (Figura 7) (Degterev A., *et al.*, 2008). Una característica estructural común de los miembros de esta familia es la presencia de regiones homólogas a Bcl-2 denominadas BH (*Bcl-2 Homology*; BH1-BH4). Los dominios BH carecen de actividad enzimática y están implicados en los procesos de asociación de cadenas polipeptídicas; determinan la capacidad de estas proteínas para interactuar entre ellas, formando homo y heterodímeros, o con otras proteínas no relacionadas. Sin embargo, el efecto ejercido sobre el proceso de apoptosis parece no correlacionarse con el número y tipo de heterodímeros que forman los miembros de esta familia, sino con los niveles libres de Bcl-2 y Bax (Motyl T, 1999). Los dominios BH1 y BH2 se encuentran en todas estas proteínas y la secuencia del dominio BH3 es diferente en las proteínas pro y antiapoptóticas (Taylor R.C., *et al.*, 2008). Además, BH4 está presente exclusivamente en la subfamilia antiapoptótica y es el dominio responsable de interactuar con componentes del poro mitocondrial impidiendo que se produzcan alteraciones en dichos

orgánulos asociadas con la apoptosis. De hecho, las caspasas pueden actuar sobre las proteínas antiapoptóticas eliminando el dominio BH4 de su estructura.

Dentro de los miembros proapoptóticos se encuentran las proteínas que sólo tienen el dominio BH3 (Bad, Bid, Bik y Bim); algunas de ellas poseen un dominio transmembrana. Excepto por el dominio BH3, no muestran homología con Bcl-2 y forman una subfamilia o grupo estructuralmente diverso. Se ha descrito que, para regular el inicio de la apoptosis, varias de estas proteínas se pueden activar por diferentes vías, como por ruptura proteolítica y fosforilación. Estas proteínas se pueden unir e inhibir a las antiapoptóticas y, por tanto, promover la apoptosis. En último término, actúan sobre la mitocondria induciendo la liberación de *citocromo c* y otros factores apoptogénicos, promoviendo finalmente la apoptosis (Youle R.J., *et al.*, 2008).

Bid se relaciona de forma crucial con la apoptosis mediada por receptores de muerte debido a que es fragmentado principalmente por la caspasa-8 (Li, *et al.*, 1998). El fragmento resultante de la degradación, Bid truncado (tBid), se relocaliza rápidamente en la membrana mitocondrial externa, favoreciendo la permeabilidad de la misma. Bid pueden unirse a proteínas multidominio proapoptóticas (tales como Bax y Bak), la unión de Bid a Bax o Bak promueve su inserción en la membrana y su oligomerización, resultando en un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y liberación de proteínas apoptogénicas hacia el citosol, tal como *citocromo c* (Hengartner, M.O., 2000).

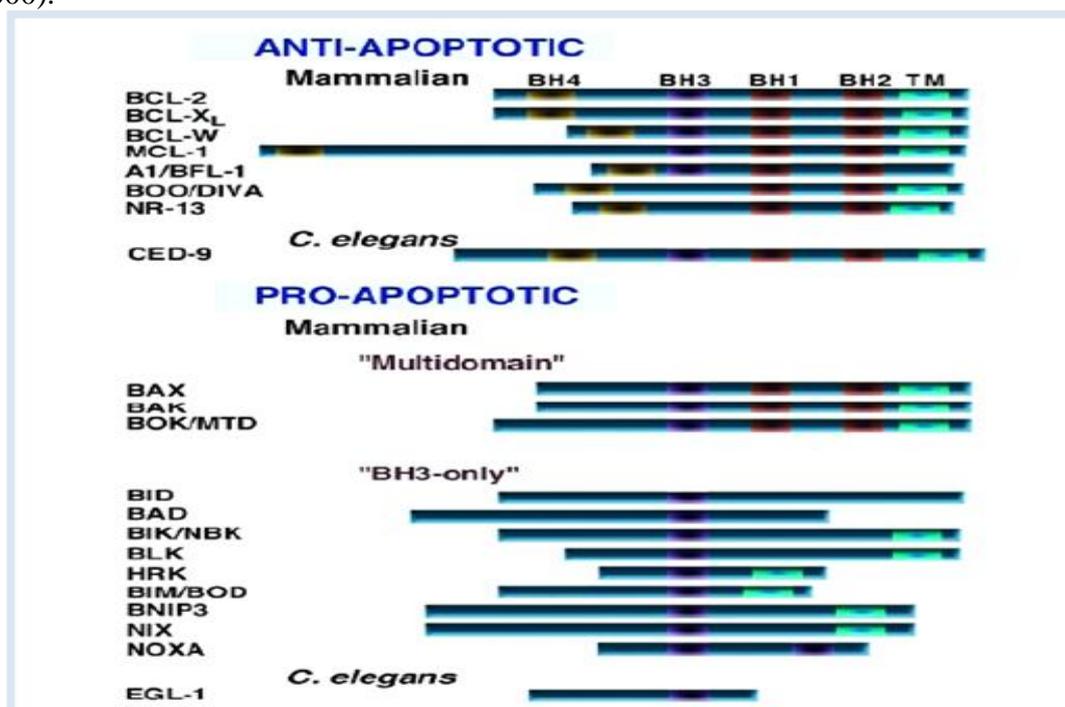


Figura 7. Resumen de los miembros anti y proapoptóticos de la familia Bcl-2. (J. Mora, Nancy, 2009).

VII. Formación del Apoptosoma

La liberación del *citocromo c* desde la mitocondria es un paso clave en el inicio del proceso apoptótico. Los mecanismos que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas del espacio intermembranal presumiblemente depende del tipo celular y de la naturaleza del estímulo apoptótico (Gogvadze, *et al.*, 2006).

Una vez en el citosol, *citocromo c* se asocia a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1) que contiene 12-13 repeticiones de unión proteína-proteína (WD40). Apaf-1 normalmente adopta una conformación autoinhibida en células, en la que el dominio CARD (N) se encuentra rodeado por los dominios WD40 (C). Esta interacción facilita la unión de ATP con Apaf-1 y la exposición de su motivo CARD N-terminal, el cual puede ahora oligomerizar, formando un eptámero, dejando expuesto su dominio CARD. El resultado de la oligomerización de Apaf-1 es un complejo capaz de reclutar varias moléculas de procaspasa 9 inactivas a través de interacciones heterotípicas CARD-CARD para formar el llamado apoptosoma. El apoptosoma entonces activa las caspasas iniciadoras (Figura 8) (Cain, *et al.*, 2002; Shi, 2004). La caspasa 9 activa, rompe y activa sucesivamente, las procaspasas 3 y 7 que son las responsables de la rotura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis. (Robertson, *et al.*, 2000). Además del *citocromo c*, la mitocondria libera una serie de proteínas que están implicadas en la ejecución de una forma alternativa de apoptosis independiente de la actividad de caspasas. Estas proteínas, tras ser liberadas al citoplasma, son transportadas al núcleo donde participan en la fragmentación de alto peso molecular del ADN (Daugas, *et al.*, 2000; Joza, *et al.*, 2001). Las proteínas que participan en la rotura del ADN son endonucleasa G (Endo G) y el factor de inducción de apoptosis (AIF), una flavoproteína de 57 kDa (Arnoult, *et al.*, 2003). Debido a diferencias en la forma y en el tamaño, así como a las cinéticas de difusión, se presume que es un poro distinto de MTP, e incluso, que es la ruptura de la membrana mitocondrial externa la que permitiría la liberación de estas dos proteínas (Springs, *et al.*, 2002; Arnoult, *et al.*, 2003).

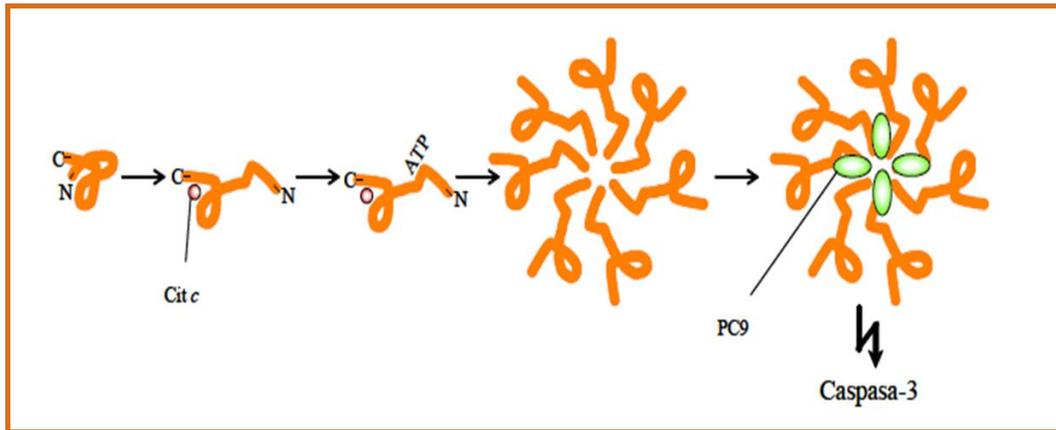


Figura 8. Modelo de actividad del apoptosoma. Papel de los dominios de Apaf-1 en el proceso de oligomerización. Apaf-1 normalmente adopta una conformación autoinhibida en células, en la que el dominio CARD (N) se encuentra rodeado por los dominios WD40 (C). La unión de Cit c a los dominios WD40 desplaza al dominio CARD, y Apaf-1 puede unir ATP o dATP. Tras la unión del nucleótido, tiene lugar un segundo cambio conformacional que permite la oligomerización de Apaf-1 para formar el apoptosoma. (Malet, Engra G., 2005).

VIII. Cáncer

Como se ha descrito, la apoptosis es un proceso de muerte celular programada, fundamental para muchos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la diferenciación, la regulación del sistema inmune y el cáncer. Un equilibrio preciso entre la proliferación y la muerte celular es necesario para la homeostasis de los tejidos, en el que las células viejas o dañadas se eliminan y son sustituidas por nuevas células. Debido a que la apoptosis desempeña un papel significativo en la supervivencia por el mantenimiento de la homeostasis de los organismos pluricelulares, el mal funcionamiento o defectos en rutas metabólicas que conducen a la apoptosis tienen un papel importante en el desarrollo de patologías, como el cáncer (Kwon, 2007).

El cáncer, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014), es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer.

De una manera específica, el término cáncer se utiliza para designar a todos los tumores malignos, y se refiere al crecimiento descontrolado de una masa de tejido, en donde las células normales se transforman en células malignas por la adquisición de mutaciones, las cuales traen como consecuencia el daño del genoma. Este daño puede ser el

resultado de un proceso endógeno o por ataques exógenos. El crecimiento excesivo y sin coordinación de los tejidos normales del cuerpo persiste una vez que ha cesado el estímulo que le dio origen. El tejido canceroso crece sin propósito, deteriora al huésped y es virtualmente autónomo, aunque depende del huésped para su nutrición y aporte vascular (Martínez, 2004, Weiss, *et al*, 2003).

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular. (Meza, Junco J, *et al.*, 2006).

En el cáncer, la apoptosis participa en la selección de las células cancerosas para fenotipos agresivos, incluyendo la selección para la resistencia a la apoptosis. Muchas terapias citotóxicas del cáncer, tales como agentes que dañan el ADN, la radioterapia y algunos de los nuevos medicamentos dirigidos, están diseñados para inducir la apoptosis y la resistencia del cáncer, y mecanismos de escape están asociados con defectos en la maquinaria apoptótica.

El cáncer es un ejemplo en el que los mecanismos normales de regulación del ciclo celular son disfuncionales, ya sea con una proliferación excesiva de células y/o disminución en procesos apoptóticos de las mismas (Rey y Cidlowski, 1998). De hecho, la supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis se cree que juega un papel central en el desarrollo y la progresión de algunos cánceres (Kerr, *et al*, 1994). Hay una variedad de mecanismos moleculares que las células tumorales utilizan para suprimir la apoptosis (Smyth, *et al.*, 2001).

Existen una clasificación del cáncer según su localización en el organismo, denominándose los subtipos: Sarcomas, carcinomas, leucemias y linfomas.

- a) Sarcomas: Presentes en tejido conectivo como hueso, cartílagos, nervios, músculo y tejido adiposo.
- b) Carcinomas: Presentes en tejidos epiteliales como la piel, epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales y los tejidos glandulares de mama y próstata.
- c) Leucemias y linfomas: Incluyen cáncer de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Los tumores o neoplasias se encuentran en todos los tipos de tejidos y pueden ser benignos o malignos (American Cancer Society, 2011).

IX. Cáncer Cérvicouterino

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) que se presenta principalmente entre mujeres con una vida sexual activa, se considera una enfermedad multifactorial de transmisión sexual aunque no exclusiva, cuyo principal agente etiológico es el virus del papiloma humano (VPH) (Zur Hausen, 1994; Lizano y García, 1997). Es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el primero reconocido por la OMS que es atribuible a una infección (Monsonogo, 2004; Pulivarthi, 2004).

Según el INEGI en el año 2010 en México, las principales causas de muerte por tumores malignos en la población femenina mayor a 20 años fueron el cáncer de Mama con 13.8% de las defunciones totales el CaCu con el 10.8%, de ésta forma el CaCu se coloca como el segundo cáncer más letal entre las mujeres mexicanas. Estadísticas de este mismo año mencionan que son tres los grupos de edad más afectados. Mujeres de entre 40 y 49 años, donde mueren 10 de cada 100 mil, esta tasa incrementa a 30 de cada 100 mil en mujeres pertenecientes al grupo de edad de entre 65 a 75 años, hasta alcanzar la máxima tasa de mortalidad en mujeres mayores de 80 años en donde 50 de cada 100 mil mueren por esta enfermedad.

El CaCu es una enfermedad neoplásica maligna, resultado de una transformación celular en la unión escamocolumnar en el epitelio del cuello uterino, cuya progresión natural lleva a la muerte; aún cuando el conocimiento de la enfermedad es incompleto, los estudios realizados han mostrado que la mayoría de estos tumores tienen inicio gradual y sus lesiones precursoras pueden mantenerse en fase reversible o *in situ* por varios años en la mayoría de las pacientes (D-zul, 2004). La historia natural del CaCu implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras llamadas lesiones precursoras o premalignas, las cuales son estrictamente intraepiteliales, es decir, se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma (Figura 9) (D-zul, 2004). Las alteraciones del epitelio maduro han sido motivo de numerosas clasificaciones, sin embargo la clasificación desarrollada en 1988, conocida como Sistema Bethesda, es hoy en día la más usada en laboratorios de análisis clínicos a nivel mundial, ya que se basa en el informe de resultados de la prueba de Papanicolaou. Éste sistema clasifica por separado las anomalías de las células escamosas y el de las células glandulares (Barbara y Zoschnick, 2001).

Las anomalías de las células y lesiones del tipo escamosas, se divide en las siguientes categorías:

- a) **ASC-US**, células escamosas atípicas de significado indeterminado, (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US*). Las células escamosas no parecen completamente normales, pero los médicos no están seguros del significado de los cambios celulares.
- b) **ASC-H**, las células escamosas atípicas de alto grado, (*Atypical Squamous Cells High, ASC-H*) no pueden excluir una lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Las células no parecen normales, pero los médicos no están seguros de los cambios celulares. Es posible que exista un riesgo mayor de que las lesiones ASC-H sean precancerosas en comparación con las lesiones ASC-US.
- c) **LSIL**, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions, LSIL*), se consideran anomalías leves causadas por una infección por VPH de bajo grado, que significa que se han observado los primeros cambios en el tamaño y en la forma de las células. Intraepitelial se refiere a la capa de células que forman la superficie del cérvix. Las LSIL a veces se clasifican como displasias leves. Éstas también pueden clasificarse como NIC-1.
- d) **HSIL**, lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions, HSIL*), son anomalías más graves que tienen una probabilidad mayor de que se conviertan en cáncer si no son tratadas. De alto grado significa que hay cambios más marcados en el tamaño y en la forma de las células anormales (precancerosas) y que las células se ven muy diferentes a las células normales. Las HSIL comprenden lesiones con displasia moderada o grave y carcinoma *in situ*. En ocasiones las lesiones HSIL se clasifican como NIC-2, NIC-3 o NC-2/3 en donde las células escamosas anormales han invadido más profundamente el cérvix, así como otros tejidos u órganos.

Las anomalías de las células glandulares se dividen en las siguientes categorías:

- a) **AGC**, células glandulares atípicas, (*Atypical Glandular Cells, AGC*), significa que las células no parecen normales, pero los médico no están seguros del significado de los cambios celulares y se clasifican en adenocarcinomas.
- b) **AIS**, adenocarcinoma endocervical *in situ*, (*Endocervical Adenocarcinoma In Situ*), significa que las células precancerosas se encuentran solamente en el tejido glandular del cérvix. El adenocarcinoma incluye no solamente el cáncer del canal endocervical mismo, sino también, en algunos casos, el cáncer endometrial, cáncer extrauterino y otros cánceres (Barbara y Zoschnick, 2001).

Se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CaCu, como el número de parejas sexuales, el inicio temprano de vida sexual activa, la multiparidad, etc. Sin embargo, el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % (Vázquez, *et al.*, 2005) de los casos.

El VPH es un ADN virus de doble cadena que induce la proliferación de células epiteliales. Existen más de 100 tipos diferentes de virus de VPH, de los cuales alrededor de 40 son capaces de infectar el tracto genital. Cada tipo varía en cuanto a una porción de su genoma y esto ha permitido que se dividan en dos grupos. Los tipos VPH de bajo riesgo, que se encuentran asociados a cambios benignos tales como condilomas, y los tipos de alto riesgo o también conocidos como oncogénicos, de los cuales se han reportado alrededor del 99% de los NIC y los cánceres cervicales. El VPH oncogénico tipo 16 representa el mayor porcentaje (50%), seguido por el VPH tipo 18 (12%), el VPH tipo 45 (8%) y el VPH tipo 31 (5%) (Alonso, *et al.*, 2000; Nazzal, *et al.*, 2006).

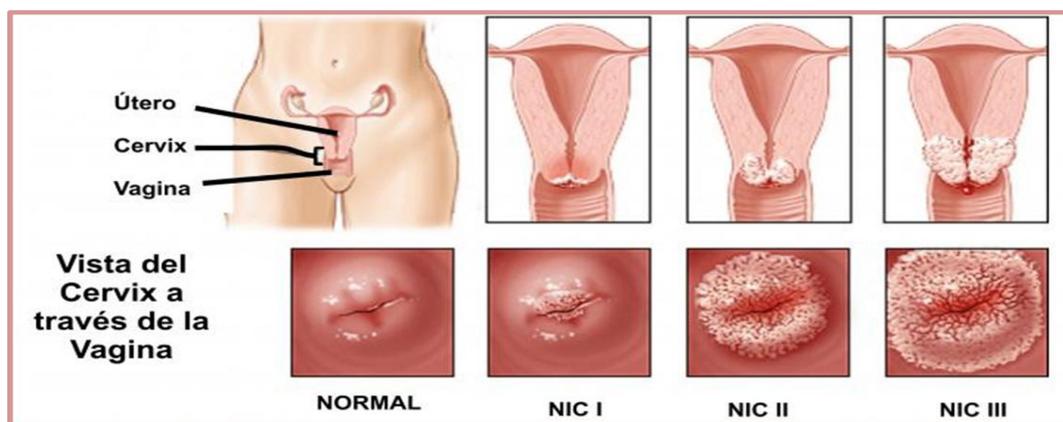


Figura 9. Progresión del Cáncer Cérico Uterino. Zona de transformación del cuello uterino, también conocido como neoplasia intraepitelial cervical. (Healthwise Incorporated, 2009).

Los papilomavirus de tipo oncogénico son pequeños virus de DNA de doble cadena, que incorporan su propio ADN dentro del genoma de las células humanas y bloquean la capacidad celular para repararse o destruirse. Todos los VPH son poseedores de distintas combinaciones de siete genes denominados (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y dos genes codificantes para unas llamadas proteínas tardías (L1 y L2) que se expresan sólo después de la infección y están implicadas en la formación de la cápside de los viriones. Los genes E6 y E7 son oncogenes conocidos de los tipos de VPH de alto riesgo, estos producen proteínas que inhiben a los genes supresores de tumores; notoriamente a p53 y Rb. La proteína E6 se une e inactiva a p53, la cual es responsable

de la reparación del ADN dañado y de la apoptosis en células humanas dañadas. La proteína E7 se une principalmente a la proteína Rb, lo que permite la liberación del factor de transcripción E2F que es responsable del paso de la fase del ciclo celular G1 hacia la fase de síntesis del ADN (fase S). Estas oncoproteínas alteran la regulación de la proliferación celular, promoviendo el crecimiento tumoral y la transformación maligna. Sin embargo, E6 y E7 tienen propiedades de trans-regulación de genes celulares independientes de su asociación con p53 y Rb que también contribuyen al avance del proceso neoplásico (Alonso, *et. al.*, 2000).

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la lesión a cáncer. Es por ello que se han implementado una amplia variedad de técnicas y métodos de diagnóstico clínico, como lo son la histopatología y métodos citológicos como el Papanicolaou, que buscan cambios en las células de la zona de transformación.

Sin embargo, en los países donde las mujeres no se pueden hacer rutinariamente las pruebas de detección, el cáncer de cuello uterino es mucho más común. De hecho, el cáncer de cuello uterino es la causa principal de muerte por cáncer en las mujeres de muchos países en vías de desarrollo. Estos casos de cáncer por lo general se diagnostican en una etapa tardía (e invasiva), en vez de en los cambios precancerosos o etapas tempranas (American Cancer Society, 2011).

Las opciones para tratar a cada paciente con cáncer de cuello uterino dependen de la etapa de la enfermedad. La etapa de un cáncer describe su tamaño, la profundidad de invasión y hasta dónde se ha propagado. Los tipos de tratamientos del cáncer de cuello uterino comunes incluyen:

- Cirugía
- Radioterapia
- Quimioterapia

Sin embargo cuando el cáncer se ha propagado de la pelvis a otras partes del cuerpo, a menudo se utiliza una combinación de tratamientos. No obstante los métodos convencionales contra el cáncer frecuentemente dañan células y tejidos sanos, los efectos secundarios son comunes entre las pacientes tales como, disminución de la respuesta inmunológica, pérdida de cabello, vómitos, mareos, por mencionar algunos (American Cancer Society, 2011).

X. Productos Antiproliferativos Naturales

Los productos naturales o metabolitos secundarios de origen marino están recibiendo una mayor atención, debido a que se ha probado que son una fuente importante de nuevas e inusuales formas de moléculas orgánicas, con actividad biológica importante. En principio, estas investigaciones se centraban en el aspecto fitoquímico de los metabolitos secundarios, sin embargo, actualmente los estudios se dirigen sobre su aplicación potencial en el tratamiento de enfermedades humanas (Ireland, *et al.*, 1993).

Una revisión que incluye a todos los organismos marinos bajo investigación, hecha por Amico (1995), indica que los metabolitos secundarios reportados durante el periodo 1973-1994 totalizan 6,363 compuestos, de los cuales, las algas, las esponjas y los celenterados aportan el 78.57 % con 5000 productos naturales aislados.

Los organismos marinos están sujetos a condiciones ambientales completamente distintas a las presentes en ambientes terrestres, éstas determinan que las rutas biosintéticas también sean diferentes (Baker, 1984), por esta razón los organismos marinos pueden generar metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas y distintas a las encontradas en ambientes terrestres. Se ha reconocido que diversos organismos marinos presentan varios compuestos prometedores, sin embargo, del total aproximadamente menos del 1 % de las especies se han investigado (Pesando, 1990).

Particularmente se han aislado 2,072 productos naturales de las algas marinas, las cuales contribuyen con la mayor cantidad de compuestos identificados.

Las algas marinas son un recurso de gran importancia; su utilización como alimento humano, forraje y fertilizante agrícola es bastante antiguo (Pesando y Caram, 1984; Robledo, 1990). En la industria, las algas se utilizan como materia prima para obtener ficocoloides como agar-agar, carragenanos y alginatos, fundamentalmente, además de laminarina, manitol, producción de vitaminas, herbicidas e insecticidas como otros productos importantes (Baker, 1984a; Dawes, 1984).

El primer reporte que se tiene sobre el uso de las macroalgas con propiedades curativas data de la antigua China, donde se usaba el alga *Digenia simplex* como vermífugo (De Lara-Isassi, *et al.*, 1989), actualmente de esta alga se obtiene el ácido kaínico que se utiliza contra la hipertensión (Der Marderosian yLiberti, 1988). En la medicina oriental, las algas cafés se han usado tradicionalmente una droga hipotensiva, a partir de ello se ha aislado un potente hipotensivo de *Laminaria angustata*, denominado laminine (Baker, 1984a). Entre las culturas orientales, las algas se han usado en la medicina

tradicional para tratar padecimientos como hemorragias, quemaduras, dolores musculares y trastornos intestinales (Chengkui y Junfui, 1984).

Shirayama en 1941 reporta el primer bioensayo en el que detecta la actividad antibacteriana del alga *Cystophyllum hakodatense*, que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* y *L. helveticus* (Pratt, *et. al.*, 1951). Esta área de investigación se ha ampliado para buscar en las algas propiedades anticuagulantes, antiagregantes, fibrinolíticas y hemaglutinantes; así como actividad antiviral y antitumoral (Yamamoto, *et. al.*, 1982). Es por ello que recientemente se ha cobrado una importancia de los estudios relacionados con la obtención de antibióticos a partir de las algas marinas, numerosas especies de algas exhiben propiedades de ésta índole, encontrándose que dependiendo de la especie de la cual provienen, éstos presentan una actividad muy específica (Rao, *et. al.*, 1988) o bien son de amplio espectro, y no se ha observado que tengan efectos secundarios, además de presentar un nulo o escaso grado de toxicidad (Pensando y Caram, 1984).

De Lara-Isassi (1991) estudió las propiedades antibióticas de veintiocho especies de algas marinas de tres localidades diferentes, dos de ellas en el Pacífico Mexicano, con el fin de tener representadas zonas templadas, tropicales y subtropicales, encontrando que las algas de zonas templadas presentan la mayor actividad antibiótica. Entre esas especies se encuentran *Dyctiota flabellata*, *Macrocystis pyrifera*, *Spyridia filamentosa* y *Sargassum acinacifolium*.

a) Generalidades de las algas

El concepto “algas” fue utilizado por primera vez por Linneo para designar a los organismos vegetales que incluyó en la clase de las criptógamas, plantas sin flores; actualmente se usa para designar a los organismos que poseen clorofila *a*, un talo no diferenciado en raíz, tallo y hojas, y que son de hábitos predominantemente acuáticos.

Las algas son un grupo grande y heterogéneo de organismos vegetales, con aproximadamente unas 50,000 especies. Desempeñan un papel ecológico importante como productores primarios de los ecosistemas donde habitan, son responsables de más del 50% de la producción primaria de todo el planeta al fijar el dióxido de carbono (CO₂) mediante la fotosíntesis y eliminar como residuo (O₂).

En relación con la morfología externa, las algas presentan una gran diversidad de formas y tamaños, que incluyen desde representaciones unicelulares microscópicas de

forma esférica, de clava o puntiaguda, como diatomeas y dinoflagelados. Mientras que otras se agrupan en colonias multicelulares de formas caprichosas de gran tamaño y grado de complejidad; incluso hay colonias membranosas, grupos filamentosos simples o conglomerados, ramificadas o sin ramificar y tubos divididos o no por paredes celulares (Hawkins, *et. al.*, 1993). Algunas colonias son simples conglomerados de células solas e “idénticas” que se quedan juntas después de dividirse, otras están compuestas de diferentes clases de células especializadas en ciertas funciones. Estas colonias llegan a ser muy complejas y superficialmente se asemejan en su estructura a las plantas superiores (Pelczar, *et. al.*, 1982), pues poseen formas arborescentes con más de 60 metros de longitud, como las especies del género *Macrocysti*, o el género *Sargassum* (Figura 10). Usualmente encontradas en aguas más cálidas, estas algas constituyen las grandes masas flotantes que componen el mar de los “Sargazo” en el continente Americano. Respecto de la coloración y a pesar de que deberían ser predominantemente de color verde como consecuencia de la presencia de clorofila, estos organismos contienen además otros tipos de pigmentos lo que hace que muchas de ellas presenten también coloraciones rojizas, azuladas, pardas y hasta ennegrecidas, debido al enmascaramiento del color verde de la clorofila por estos pigmentos accesorios.

La diversidad de algas no está solamente dada por su morfología externa, sino que también por sus características bioquímicas y fisiológicas, así como por su variabilidad genética y fenotípica que se manifiesta claramente en la capacidad de colonizar ambientes muy diversos. Así existen tanto especies dulceacuícolas, marinas y de ambientes intermedios (como lagunas costeras), como otras que habitan en ambientes extremos (continente antártico), además de aquellas asociadas con otros organismos y que forman líquenes. Viven en dos tipos de condiciones muy distintas; unas lo hacen flotando en las capas más superficiales del agua, son unicelulares y se las conoce con el nombre de algas plantónicas; las otras viven adheridas a rocas u otros sustratos, y se las conoce con el nombre de algas bentónicas (Santelices, 1991).

Dentro de las principales divisiones de algas actualmente reconocidas se pueden citar: Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucocystophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Heterokontophyta (Raphidophyta, Chrysophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta, Eustigmatophyta y Phaeophyta), Haptophyta (= Prymnesiophyta), Cryptophyta y Dinophyta (Mansilla Andrés, *et. al.*, 2004).

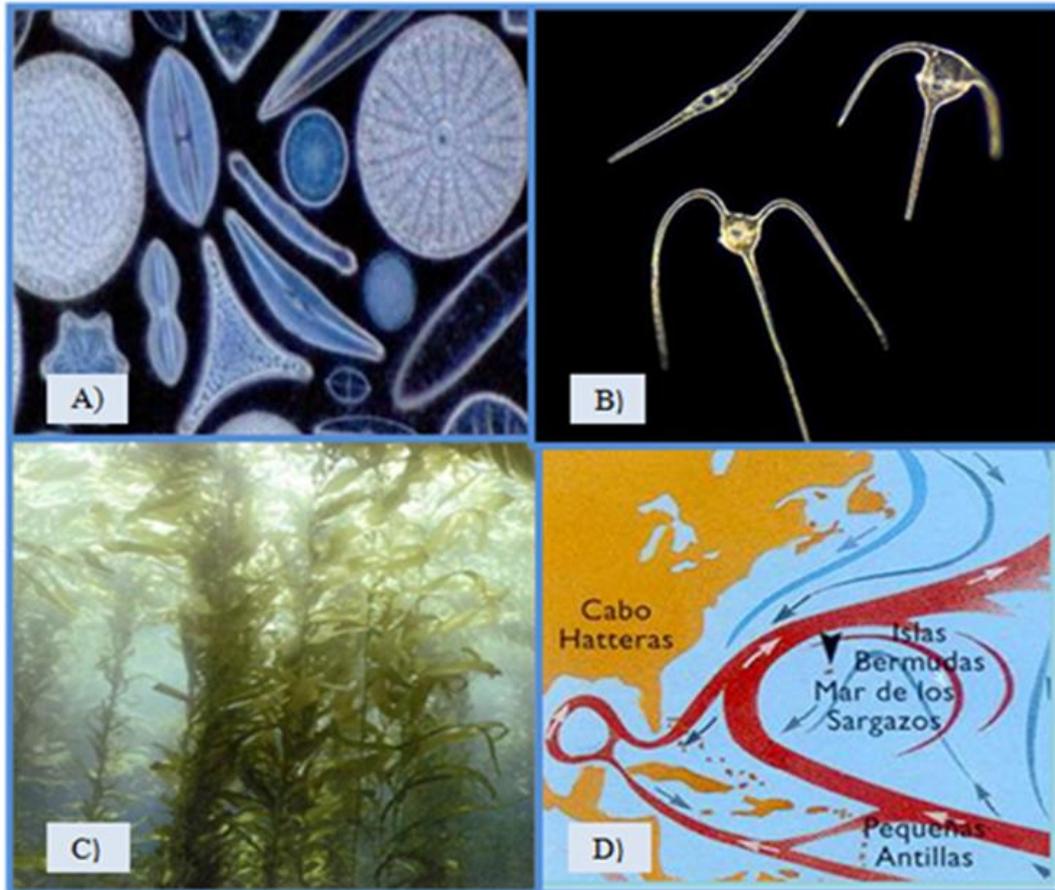


Figura 10. A) Diatomea, algas unicelulares que alcanza 20 μm de longitud. B) Dinoflagelados, algas unicelulares con flagelos. C) Género *Macrocystis*, algas pluricelulares que alcances 60 metro de longitud. D) Algas del género *Sargassum*, habitan en aguas cálidas y forman el mar de los Sargazos. (Campbell, Neil A., 2007).

b) Algas Pardas

Las algas más grandes y más complejas son las algas pardas o feofitas (del griego *phaios*, pardo); todas estas algas son multicelulares y la mayoría son marinas, son comunes particularmente en las costas templadas, donde el agua está fría. La clasificación taxonómica actual de este grupo incluye a las algas pardas como conformadas por una sola clase, Phaeophyceae, la que a su vez forma parte de la división Heterokontophyta (Mansilla, *Op. cit.*).

El color marrón u oliva característico se debe a la combinación del carotenoide *focoxantina* presente en sus plástidos con el verde las clorofilas *a* y *c*. Están formadas por un talo (del griego *thallos*, retoño), el cual hace alusión al cuerpo del alga marina, carece de raíces, tallo y hojas verdaderos (Figura 11). Un talo típico de un alga marina está compuesto de un sistema de anclaje, similar a una raíz que fija el alga, y un estípite parecido a un tallo que sostiene láminas similares a hojas. Las láminas proporcionan la mayor parte de la superficie para la fotosíntesis. La pared celular está formada por una

capa interna de celulosa y otra externa compuesta principalmente por ácido algínico y fucoidina, ambos polisacáridos. El ácido algínico puede ser encontrado combinado con iones de calcio, magnesio y fiero, formando alginatos; además contribuye a la adhesión de las células rizoidales proporcionando un buen sistema de anclaje para el disco de fijación; algunas algas pardas pueden presentar calcificación (Mansilla, *Op. cit*).

Poseen desde uno o varios cloroplastos por células los que además pueden presentar variadas formas (estrellados, cilíndricos o denticulados). Además de poseer clorofila *a* presentan también clorofila *c* y entre los pigmentos accesorios el más común es el β -caroteno, en tanto que entre las xantofilas la más frecuente es la fucoxantina. Como productos de reserva estas algas acumulan polisacáridos del tipo laminarina y manitol, que se acumula en el citoplasma, y también pueden presentar compuestos fenólicos agregados, formando vesículas de fucosano.

Las algas marinas que habitan en las zonas de las mareas deben adaptarse a la agitación del agua producida por las olas y el viento, así como también al descenso de la marea (Figura 13); para ello han desarrollado adaptaciones únicas que le permiten sobrevivir a estos cambios del ambiente. Por ejemplo, sus paredes celulares están compuestas de celulosa y polisacáridos que forman un gel que contribuye a proteger a los talos de la acción de las olas y a reducir la deshidratación cuando quedan expuestas al ambiente aéreo (Campbell, Neli A., *et. al.*, 2007).

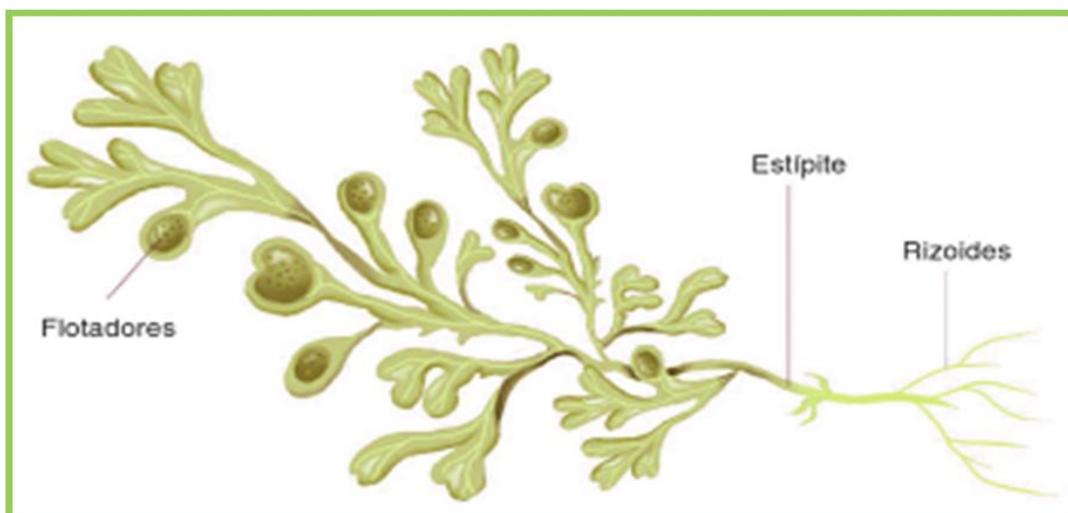


Figura 11. Estructura general de un alga parda, compuesta por rizoide: filamentos con función de anclaje, estípite: especie de tallo que sostiene a las falsas hojas y la lámina o filoide: órgano análogo a las hojas (López Moratalla, Natalia, *et. al.*, 2008).

c) Género *Sargassum*

El género *Sargassum* pertenece a la Familia Sargassaceae, del orden Fucales, de la Clase Phaeophyceae, constituye un grupo de macroalgas pardas que se encuentran distribuidas en casi todos los océanos del mundo. Cuenta con cerca de 550 especies, entre tropicales, subtropicales y templadas (Núñez y Casa, 1997, Suárez, 2008). Estas macroalgas pueden llegar a formar florecimientos masivos (bosques) y crecer en sustratos rocosos, fangosos y arenosos (Rivera y Scrosati, 2006; Rooker, *et. al.*, 2006). Entre los factores que determinan la distribución latitudinal de estas macroalgas se encuentran la temperatura y la luz, las cuales también determinan el crecimiento y la época de reproducción (Mateo-Cid, *et. al.*, 1993). Este género presenta mayor crecimiento durante los meses cálidos en las zonas templadas y en los meses fríos en zonas tropicales y subtropicales (McCourt, 1984). En México el género presenta la mayor etapa de desarrollo entre marzo y junio, cuando la temperatura del agua es baja (20-25 °C), mostrando un periodo de rápido crecimiento y producción de un máximo de biomasa (Muñeton-Gómez y Hernández-Carmona, 1993).

El género *Sargassum*, se caracteriza por exhibir una ramificación monopodial, con sistema de ramificación lateral presente en todos los miembros, los ejes principales son perennes, cortos, cilíndricos o aplanados en secciones y éstos llevan las cicatrices de las ramas de hoja caduca; de los ejes suelen originar ramas de segundo orden, cilíndricas o aplanadas, con una superficie lisa o espinoso y dísticas o dispuestas en espiral (Mattio Lydiane, *et. al.*, 2009). Este sistema tiene en su base dos estructuras en forma de hoja, el resto del sistema de ramificación consiste en vejigas de aire y receptáculos. La forma de las hojas es muy diversa, pueden ser simples, bífida o dividida, esputulada, lanceolada, ovoides, lineal o de cualesquiera forma intermedias (Figura 12). El pedúnculo es inexistente o de longitud variable, cilíndrico o aplanado, suave o "espinoso". El margen de las hojas puede ser liso, ondulado, finamente aserrado, profundamente dentado o cualquier aspecto intermedio. El nervio central puede ser corto y grueso o más delgado y llegar al ápice, o cualquier longitud intermedia. Los ápice pueden ser agudos, redondeados o truncados, simple o mostrando una depresión en forma de copa.

Además, el talo presenta un disco de fijación, con uno o varios ejes principales ramificados en "ramas" de varios órdenes que se diferencian en apéndices foliares (hojas), vesículas y receptáculos (órganos reproductivos). La forma general del talo puede ser más o menos lineal o tupida, puede medir unos pocos centímetros en hábitats

expuestos (ej. *Sargassum spinuligerum* var. *crispata* (Sonder) J. Agardh en el arrecife de Kiuva) a varios metros en áreas protegidas (ej. hasta 10 metros en *S. muticum* invasiva en Francia) (Belsher y Pommellec, 1988). Poseen un disco adhesivo discoide, cónico o rizoidal que no penetra en el sustrato. Poseen vesículas que pueden ser esféricas, ovoide, piriforme o de cualquier forma intermedia.

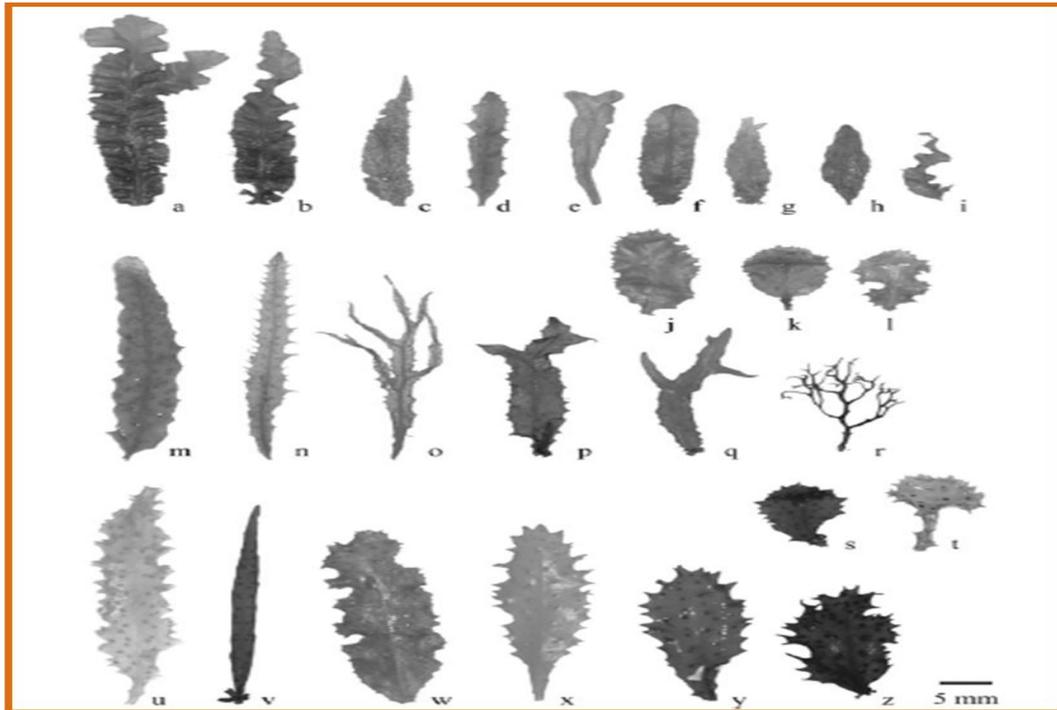


Figura 12. Morfología de las hojas (*S. subgen. Sargassum*). Las hojas pueden ser simples (ej. c, m, u), bífido (ej. e), trifido (ej. a, p), dividida varias veces (ej. o, q, r); la forma general puede ser redonda (ej. k), en forma de espátula (ej. s, x, y), cornete (ej. t), lanceolada (ej. b, c), ovoide (ej. h) u oblonga (ej. f, j, w), lineal (ej. n, v), ondular (ej. a, j, w) o estrecho en vista lateral (ej. n, v, x). La base puede ser redonda (ej. a, k) o atenuada (ej. e, n, x), simétrica (ej. v, x) o asimétrica (ej. p, s, z). El margen puede ser liso (ej. e, v), finamente serrulado (ej. d, p, w), profundamente dentado (ej. u, x, y); simple (ej. c, n, w) o doble (ej. t, y). El ápice puede ser agudo (ej. c, v), obtuso (ej. f, j, s), sencillo (ej. d, m) o con una depresión (ej. j, k). (Mattio Lydiane, 2011).

El género *Sargassum* en México se encuentra bien representado a lo largo de sus costas, en el Golfo de México y en el Caribe; en la parte litoral del Océano Pacífico, incluyendo el mar de Cortés (Suárez, 2008).

De las especies de *Sargassum* que rodean el Golfo de México se encuentran, *Sargassum vulgare*, *S. filipéndula*, *S. fluitans*, *S. natans*, (Flores, 2010). Particularmente la especie *Sargassum buxifolium* Chauvin, se distribuye en los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Veracruz (Ortega, M. Martha, *et. al.*, 2001).

Uno de los aspectos principales por lo que las algas pardas del género *Sargassum* tienen importancia económica, es por su contenido de alginatos, además se pueden obtener

otros productos industrializables como son: manitol, iodo y fucoidina (Fajardo-León, 1994; Robledo, 1990). En la búsqueda de compuestos bioactivos a nivel mundial, el género *Sargassum* ha sido investigado y se ha logrado aislar algunos compuestos como la sarganin A, sarganin B y dioctyl phthalate, presentando actividad antibacteriana prometedora (Martínez-Nadal, *et al.*, 1963, 1964).

Las algas pardas, especialmente las del Orden Dictyotales y Fucales, al cual pertenece el género *Sargassum sp.*, son una fuente principal de diterpenos complejos y metabolitos con un origen terpenoide aromático, además de ácidos grasos y fenoles (Pesando, 1990). Martínez Nadal, *et al.*, 1964, reportan que el complejo sarganin, que incluye a los dos compuestos denominados sarganin A y sarganin B descritos como ácidos grasos altamente volátiles, fue aislado de *S. natans* colectado en las costas de Puerto Rico, el cual presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas de amplio espectro; los extractos crudos obtenidos con éter etílico de *S. johnstonii*, recolectados en la costa de la India presentaron los mayores halos de inhibición, en relación a los otros solventes utilizados, en contra de las bacterias Gram positivas y Gram negativas probadas (Padmini, *et al.*, 1986). Rao, *et al.*, 1987, reportan que las fracciones A y B de *S. johnstonii* exhibieron una mayor actividad antibacteriana en contra de bacterias Gram positivas y negativas que la actividad antibacteriana generada por un número de antibióticos conocidos. En este caso, la fracción A está constituida principalmente por esteroides, mientras que la fracción B está constituida por ácidos grasos principalmente (Espinosa, Álvalos, 1993). *Sargassum thunbergii*, se utiliza en Japón como antitumoral; de *S. tortile*, Faulkner, 1974, extrajo el tocotrienol y su correspondiente epóxido. De Lara, 1991, encontró actividad en los extractos acuosos y etanólicos de *Sargassum sp.* contra *E. coli* y *Micrococcus lysodeikticus*. En *Sargassum palmeri* y *S. acinacifolium* se encontraron glucoronofucogalactanos, derivados de fucanos con propiedades anticuagulantes (De Lara, Issasi, 1991). Recientemente un grupo de investigadores obtuvo un polisacárido sulfatado del extracto *Sargassum filippendula*, que se distribuye a lo largo de la zona noreste de Brasil, el cual presentó actividad antioxidante y antiproliferativa (Silva, Costa Leandro, *et al.*, 2011).

Particularmente con este género, en el Laboratorio de Oncología Celular, L-4 PB, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental, FES Zaragoza, UNAM, se han obtenido resultados interesantes a partir del extracto etanólico de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, del cual se obtuvieron 20 fracciones a las que se les determinó la IC₅₀ con el propósito de conocer la fracción y la dilución que presentara

una mayor actividad citostática, resultó la fracción 2 la más activa para dos líneas celulares de CaCu, CALO e INBL, a una dilución de 1:8123 y 1:8910, respectivamente. Posteriormente se realizaron cinéticas de proliferación en ambas líneas celulares en presencia de la fracción 2, observándose una disminución de la misma en ambas líneas, por lo cual se decidió evaluar la dinámica del ciclo celular, observándose que la fracción 2 del extracto detuvo a las células de carcinoma de cérvix, CALO en la fase S e INBL en la fase G2/M del ciclo celular. Para comprobar si dicho extracto ejercía efecto citotóxico en células normales, se realizaron pruebas con Linfocitos de sangre periférica humana (LSPH), se observó un aumento en la proliferación y activación de los mismos (Norma Luna, 2012).

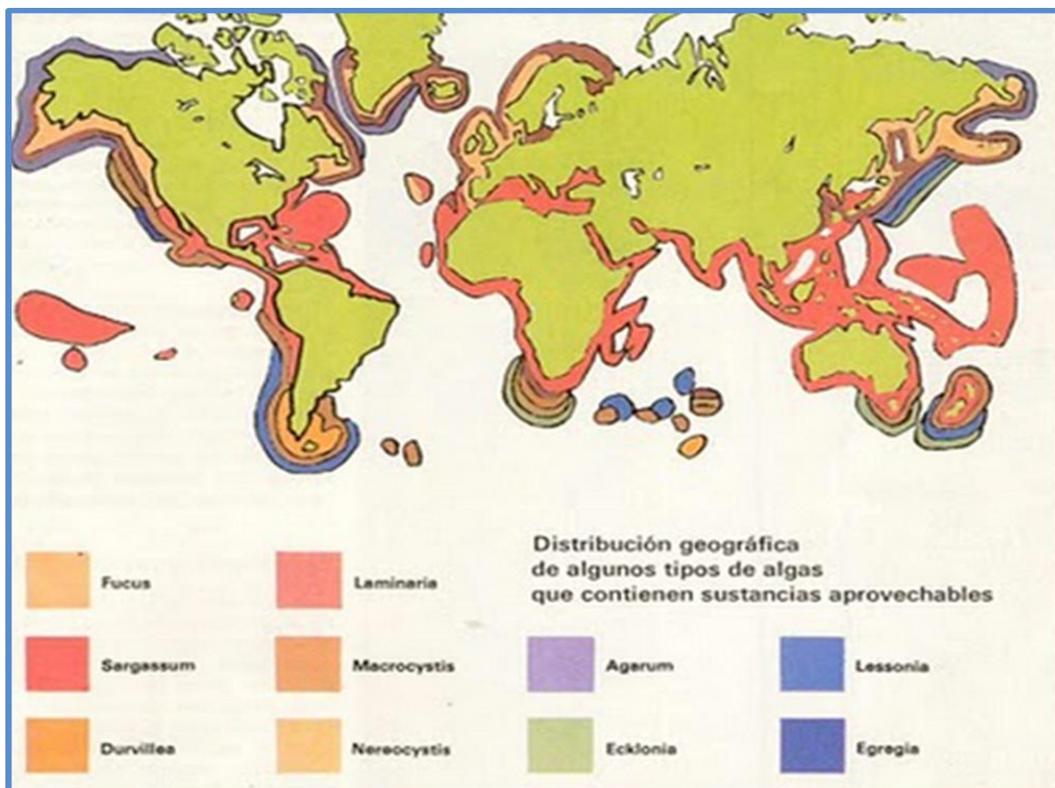


Figura 13. Distribución geográfica de algunos tipos de algas que contienen sustancias aprovechables. (<http://biogeografialgas.blogspot.mx/2010/06/mapa-de-distribucion-mundial-de-las.html>).

JUSTIFICACIÓN

El CaCu es un problema importante de salud pública en el mundo, principalmente en los países en desarrollo donde se encuentra asociado a una alta mortalidad. En México ocupa uno los primeros lugares como causa de muerte por cáncer en mujeres.

Para combatir esta enfermedad se han desarrollado diversos tratamientos que se emplean de acuerdo a la etapa clínica del CaCu, entre ellos destacan: la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la crioterapia, la quimio-radioterapia, por mencionar algunas, no obstante la gran mayoría de ellos ejercen efectos secundarios adversos en la paciente.

Por esta razón, los investigadores analizan el uso de nuevas alternativas terapéuticas, enfocadas en el uso de los recursos naturales marinos; tal es el caso del alga del género *Sargassum*, que en diversos trabajos se menciona posee metabolitos bioactivos que han mostrado tener actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral. Estudios recientes en el Laboratorio de Oncología Celular L-4 PB, UMIEZ FES-Zaragoza, UNAM, han demostrado que la fracción 2 del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (*SabuCh-W*) tiene efecto negativo sobre la proliferación de células de carcinoma de cérvix e induce su muerte mediante el arresto del ciclo celular, además ha mostrado presentar una actividad inmunorreguladora en linfocitos de sangre periférica humana (LSPH). Por esta razón, se decidió evaluar el efecto apoptótico del extracto de *SabuCh-W* en las líneas celulares de carcinoma de cérvix, CALO e INBL utilizando la técnica de RT-PCR para determinar la expresión del ARNm de citocromo c, esclareciendo la participación de esta molécula en el mecanismo de inducción de apoptosis regulado por *SabuCh-W* en células de CaCu.

HIPÓTESIS

Se sabe que la fracción 2 del extracto obtenido a partir del alga parda *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne presenta actividad antiproliferativa en células de las líneas de CaCu CALO e INBL, e induce su muerte mediante el arresto del ciclo celular. Por lo tanto, si se cultivan células de CaCu en presencia de la fracción 2 de dicho extracto se podrá determinar la expresión del ARNm para citocromo c, una proteína proapoptótica.

OBJETIVOS

General

Estudiar el papel que ejerce la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* en la regulación de la expresión del ARNm para citocromo c, molécula implicada en la muerte celular por apoptosis, en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL, mediante la técnica de RT-PCR.

Particulares

1. Obtener cultivos de líneas celulares derivadas de CaCu, CALO e INBL.
2. Cultivar las líneas celulares en presencia y ausencia de la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W*, a tiempos de 48 y 72 h.
3. Extraer, purificar y retrotranscribir el ARNm de células de las líneas CALO e INBL cultivadas en presencia y ausencia de la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* a ambos tiempos.
4. Amplificar el ADNc por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa usando el oligonucleótido correspondiente al citocromo c.
5. Analizar la expresión del producto de amplificación para citocromo c en las líneas celulares, CALO e INBL, cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* mediante el Fotodocumentador con el software de Life Science (LS) de UVP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

El material biológico consistió en líneas celulares derivadas de carcinoma de cérvix, CALO e INBL (Tabla 1), las cuales se obtuvieron del material criopreservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea celular	Estadio clínico	HPV	Características
CALO	II B	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico.
INBL	IV B	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico.

Tabla 1. Características de las líneas celulares de CaCu (CALO e INBL). (Cáceres, *et al.*, 2001; Rangel, *et al.*, 2010).

Las fracciones del extracto de *Sabu(Ch)W* fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz del Herbario de la FES Zaragoza, quien se encargó de realizar la recolecta, identificación taxonómica y obtención de las fracciones.

Cultivo Celular

Las líneas celulares, CALO e INBL, se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640^(MICROLAB), suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino)^(GIBCO), previamente desactivado, en botellas T^(CORNING) de 75 cm³ tratadas para cultivo de células adherentes en monocapa. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora^(FORM SCIENTIFIC, USA) a 37°C, con un pH de 7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO₂. Las células tumorales en fase de confluencia fueron despegadas del sustrato con 7 ml de la solución de verseno, se transfirieron a tubos cónicos^(CORNING) de 15 ml, se centrifugaron a 1500 rpm en una centrífuga clínica^(BIOHAZARD) y se reingresaron a botellas de cultivo de 75 cm³. Para comenzar el protocolo de ensayo experimental primero se determinó la densidad y viabilidad de las células tumorales, para lo cual se realizó un conteo en cámara de Neubauer^(AMERICAN OPTICAL, U.S.A.) y se evaluaron por la técnica de exclusión con azul de tripano^(SIGMA), estableciendo como valor mínimo de viabilidad 95%. A los cultivos celulares se les realizó una sincronización celular para que partieran del mismo punto del ciclo celular (G1), lo cual se logró cultivando las

células en botellas T^(CORNING) de 75 cm³ cultivándolas por 24h con medio RPMI-1640^(MICROLAB) en ausencia de SBF^(GIBCO).

El número inicial de células para cada ensayo fue de 1×10^6 por cada línea celular, éstas se cultivaron en ausencia y presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, con una dilución final en medio RPMI 1640^(MICROLAB) de la fracción 2 de 1:8123 en la línea celular CALO y 1:8910 en la línea celular INBL; los cultivos se mantuvieron en la incubadora bajo las condiciones anteriormente mencionadas, durante los tiempos de 48 y 72 h, para posteriormente realizar la extracción de RNA total.

Extracción del ARN total

Transcurridos los tiempos de cultivo en presencia y ausencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, las células se lavaron con PBS en el plato de cultivo, se despegaron del sustrato con 5 ml de la solución de verseno para ser transferidas a tubos cónicos^(CORNING) estériles de 15 ml, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante para después realizar la extracción del RNA mediante el uso de la solución TRIZOL^{TM(INVITROGEN)} de isotiocianato de guanina.

El botón celular se homogenizó en 1 ml de la solución de TRIZOLTM en tubos para micro centrífuga^(EPPENDORF) de 2 ml, dejándose reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido el tiempo, se añadieron 200 µl de cloroformo en grado para biología molecular^(SIGMA) agitando vigorosamente para formar una emulsión durante 3 minutos, para posteriormente incubar por 5 minutos en hielo (4° C). Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, con lo cual se consiguió la separación de la mezcla en tres fases (acuosa, lipídica/proteíca y orgánica), el ARN total se encuentra en la fase acuosa, la cual se aísla y se transfiere a en tubos para micro centrífuga^(EPPENDORF) de 1.5 ml, en donde se mezcló con 500 µl de isopropanol en grado para biología molecular^(SIGMA), con el fin de precipitar el ARN, incubándose durante 24 h. a -70 °C, para posteriormente centrifugar las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se eliminó, y el botón obtenido se lavó y purificó con 1 ml de etanol frío en grado para biología molecular^(J. T. BAKER) al 70 %, asegurándose de que se mezcle perfectamente bien, enseguida se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos a 4 °C dejando evaporar el etanol durante una hora y

media. El precipitado obtenido se resuspendió con 20 µl de agua libre de ARNasas^(FERMENTAS) conservándose éste stock a -70 °C.

Cuantificación del ARN

La concentración de ARN se determinó en un biofotómetro^(BIOPhotomer EPPENDORF), para normalizar las muestras e igualar concentraciones. Para ello se realizó por cada muestra una dilución 1:50 tomando 4 µl del stock de la muestra y se resuspendió en 196 µl de agua inyectable estéril^(PISA), esta dilución se colocó en una celdilla para biofotómetro^(EPPENDORF) para determinar las concentraciones de ARN (µg/ml) haciendo la lectura en el mismo a una absorbancia de 260 nm, relacionándola con la absorbancia de 280 nm para obtener un valor que nos indicara su estado de pureza. Para un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de ARN se tomó el valor de 260/280 nm superior a 1.5 e inferior a 2.0. Se aplicó la relación existente para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso ARN, de una unidad de densidad óptica equivale a 40 µg/l. Para obtener la concentración de ARN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia 260 (Volumen de disolución) (40)}}{1000} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

En donde:

Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 1:50 (4 µl de muestra más 196 µl de agua inyectable) en un volumen final de 200 µl.

40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) del ARN equivale a 40 µg/ml del biofotómetro.

Para una mayor integridad y pureza de las muestras se realizó un gel de integridad total en agarosa nativa al 1.5% con la finalidad de observar dos bandas muy notables que corresponden a la subunidad 28s y la subunidad 18s del ARN ribosomal, este par de bandas es indicativo del correcto manejo y de la no degradación de las muestras de ARN total.

Obtención del ADNc por RT-PCR

Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción es una técnica que permite la obtención de una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de la extracción del ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple, mediante la utilización de las enzimas retrotranscriptasas.

La concentración de ARN utilizado para la técnica fue de 2 µg/µl para cada una de las muestras, para lo cual, se usó un kit de RT^(PROMEGA) en el que se establecieron las siguientes condiciones para cada reacción, el cual se multiplica por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia del extracto). Para ello se utilizaron los siguientes reactivos para una reacción (1Rx): 4 µl de Amortiguador 5x el cual contiene DTT^(PROMEGA), 1.5 µl de dNTP (Desoxirribonucleótidos trifosfato)^(INVITROGEN) 10 Mm, 1 µl de Enzima MMLVRT^(PROMEGA), 2 µl de Oligo dt^(PROMEGA), 2 µg/µl de Muestra, Agua libre ARNasas^(FERMENTAS), llegando a un volumen total de 25 µl. Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y resuspendió para la incorporación de cada uno de los reactivos.

Las reacciones se colocaron en un termociclador^(EPPENDORF ESTANDAR) el cual fue programado a 42 °C durante 1 hora. El ADN complementario (ADNc) obtenido se conservó a -70°C.

Amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en Cadena de la Polimerasa aplica la bioquímica básica de la replicación del ADN con el objeto de amplificar una porción particular de ADN; es una técnica que permite amplificar un segmento de ADN que debe estar flanqueado por dos regiones de secuencia conocida, ya que éstas se usan como moldes de iniciación para realizar las copias. Permite obtener copias de forma rápida y en grandes cantidades, más de un millón de veces, de una secuencia específica de ADN, para el cual se utilizan los primers de interés (Tabla 2). La ADN-polimerasa que se emplea para amplificar el ADN ha de ser termoestable y la más usada es la polimerasa Taq (de la bacteria *Thermophilus aquaticus*), que tiene una actividad óptima a 72 °C y resiste temperaturas de 95 °C sin desnaturalizarse.

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando 2 µg/µl, las condiciones para (1Rx) se establecieron utilizando un kit de PCR GoTaq Polimerasa^(PROMEGA), las cuales se multiplicaron por el número de muestras (células

cultivadas en presencia y ausencia del extracto). Para su realización se usaron los siguientes reactivos: 5x Green que contiene MgCl₂^(PROMEGA) (6 µl), dNTP^(INVITROGEN) 10 Mm (0.8µl), Primer 1^(UNIPARS, S.A.) (Sentido) (1 µl), Primer 2^(UNIPARS, S.A.) (Antisentido) (1 µl) (Tabla 2), GoTaq Polimerasa^(PROMEGA) (0.15 µl), Muestra cDNA (4 µl), Agua libre ARNsas^(FERMENTAS) (7.05 µl), llegando a un volumen total de 20 µl. Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y resuspendió para la incorporación de cada uno de los reactivos.

El protocolo que se utilizó consistió en:

1. Fase de desnaturalización del ADN: 94 °C durante 6 min
2. Fase de alineamiento del ADN: 56.5 °C durante 2 min
3. Fase de extensión del ADN: 72 °C durante 2 min
4. Fase de disociación: 94 °C durante 45 seg
5. 30 ciclos de repetición del paso 2 al 4
6. Fase de alineamiento del ADN: 53.9 °C durante 2 min
7. Fase de extensión del ADN: 72 °C durante 7 min
8. Fase de estabilización: 20 °C durante 30 min

PRIMER	SECUENCIA	PARES DE BASES
β-actina	Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG Antisentido: GGTCTCAAACATGATCTGGG	234 pb
Citocromo c	Sentido: TTGGCAATCCGTCATCAGTA Antisentido: CCCGACAGTGCCTAGAAGAG	187 pb

Tabla 2. Secuencia, sentido y antisentido, del primer utilizado para la detección del gene de interés para evaluar apoptosis (*citocromo c*), así como β-Actina utilizado como control interno de la técnica.

Electroforesis

En la electroforesis existe un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el ánodo. La electroforesis de ácidos nucleicos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño y movilidad.

Para visualizar la expresión del producto obtenido de la PCR de cada una de las muestras se realizó una electroforesis con 4 µl del producto amplificado en un gel de agarosa al 1.5 %. Para la preparación del gel de agarosa, se pesaron 1.5 g de agarosa la

cual se diluyó con 100 ml de TBE 1X en un matraz de 150 ml. Para tener un mejor homogeneizado la dilución se calentó a 50 °C durante 4 minutos aproximadamente. Después de montar y calibrar la cámara de electroforesis se procedió a verter la dilución de agarosa más 6 µl de bromuro de etidio en grado de biología molecular^(PROMEGA) en la cámara de electroforesis, inmediatamente se colocó un peine con el número de pozos deseados de una capacidad de 15 µl cada uno.

Concluido el tiempo de polimerización de la agarosa (30' aproximadamente) se procedió a retirar el peine y montar la cámara para la corrida electroforética, en la cual se vertió 600 ml de buffer de corrida (TBE 0.5X). Posteriormente se colocaron 4 µl de muestra en los pozos al igual que 2 µl de escalera de pares de bases, GeneRuler^(THERMO SCIENTIFIC), más 2 µl de buffer de carga. El tiempo de corrida fue aproximadamente de 1 h a 80 volts.

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizó un colorante fluorescente, bromuro de etidio, el cual tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas, específicamente entre las purinas, adenina y guanina, y hacer visible la hebra en un tono naranja-rojizo al ser excitado por radiación ultravioleta (100-400nm). Para el caso de este reactivo, su excitación inicia a los 365nm y su pico de excitación es a los 510nm. Dicho efecto luminiscente fue logrado mediante un Transluminador^(UVP, EE. UU.). De este modo se visualizó el producto de amplificación (ADNc) y la identificación de los productos de interés por sus tamaños en pares de bases en relación al recorrido de cada banda con el marcador o escalera de peso molecular (GeneRuler), así como la identificación del ARNr en sus subunidades 28s y 18s.

Cabe señalar que los ensayos antes mencionados se realizaron tanto para las células cultivadas en ausencia, que sirven como controles del experimento, y células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, que corresponden a los tratamientos del experimento. La metodología antes descrita se realizó en tres ocasiones de manera independiente para confirmar que los resultados fueran confiables y reproducibles.

Análisis de las bandas por densitometría

La electroforesis de manera general es utilizada con el propósito de separar los componentes moleculares individuales del ADN, ARN o proteínas en un gel plano, expresando de forma cualitativa más que cuantitativa los resultados. Es por ello que

para el presente trabajo se utilizó el Sistema de oscuridad controlada para la adquisición y análisis de bioimágenes usadas en investigación proteómica y genómica, también conocido como Fotodocumentador, que como indica su nombre permite adquirir y analizar imágenes de una manera eficaz, está diseñado para imágenes de geles de electroforesis (ADN, ARN, proteínas), blots, membranas y placas; el análisis de imágenes detecta carriles y bandas rectas, curvas o inclinadas de forma automática o manualmente y crea histogramas para el análisis visual detallado, generando datos cuantitativos fáciles de interpretar de carriles y bandas.

Una vez que las imágenes fueron capturadas a partir del gel de electroforesis obtenido de la PCR que contiene las moléculas que han migrado, se seleccionó manualmente de la imagen, las bandas y los carriles, los cuales corresponden a las bandas de los productos amplificados así como a las bandas del marcador molecular, las bandas del gel se cuantificaron con ayuda de un software mediante la aplicación Análisis 1D de acuerdo con las instrucciones del Manual del Software del Fotodocumentador, para lo cual el software LS de UVP permite ver las gráficas de perfil (intensidad vs. posición) de uno o varios carriles en la imagen, obteniendo gráficas que nos muestran las líneas de intensidad o valor de concentración contra la posición en el carril por la banda en pixeles; esto con el propósito de proporcionar en valores numéricos la intensidad de luminiscencia y concentración, el cual es tabulado y comparado contra la escalera molecular de pares de bases^(GENRULER), que además de ofrecer los marcadores específicos de los tamaños del amplificado, también muestra concentraciones en microgramos (μg) y finalmente el resultado es arrojado en nanogramos (ng) para cada producto amplificado.

En este caso se utilizó un Fotodocumentador^(UVP, EE. UU.) Modelo DigiDoc-it[®] 120 *Imaging System* incorporado al software Doc-itLS *Acquisition and Analysis* Versión 7.1 RC3.54, al cual alimentamos y calibramos en función de los protocolos de las técnicas de RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa y los pares de bases del marcador molecular de amplificado antes mencionado. Es importante señalar que este *software* cumple con la Norma 21CFR parte once de los requisitos y reglamentos de los módulos de imágenes opcionales por software para laboratorios de investigación (170-9691).

Para el análisis de los resultados se tomó como valor significativo de variación entre cada lectura la cantidad de 0.75 ng, esto en función a lo recomendado por el manual de operación del equipo de fotodocumentación.

RESULTADOS

Con el propósito de estudiar el efecto apoptótico de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* sobre las líneas celulares de carcinoma de cérvix, se evaluó la expresión del ARNm para citocromo c. Para ello se realizaron ensayos cultivando 1×10^6 células de las líneas CALO e INBL en presencia y ausencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, utilizando las diluciones de IC50 establecidas para cada línea celular, en este caso para CALO una dilución de 1:8123 y para la línea celular INBL una dilución de 1:8910. La determinación del mensajero se llevó a cabo por medio de la técnica de RT-PCR.

Es importante aclarar que para este trabajo se realizaron cultivos de 48h y 72h para comparar los resultados con los obtenidos por Luna Cruz, 2012, quien demostró que a las 24h las células de carcinoma de cérvix cultivadas en presencia de la fracción 2 de *Sabu(Ch)W*, no presentan cambios morfológicos indicativos de muerte celular, sino hasta después de las 36 horas. Para ello inicialmente se llevó a cabo la obtención de material biológico consistente en ARNm de ambas líneas celulares.

Integridad del ARN total en las líneas celulares de CaCu

El ácido ribonucleico es una molécula formada por una sola cadena de nucleótidos de ribosa que desempeña diversas funciones, entre ellas la regulación de la expresión génica, la diferenciación celular y la síntesis proteica. El ARNm es una molécula que transfiere la secuencia de aminoácidos para formar las proteínas, desde el ADN, lugar en que se encuentra inscrita, hasta los ribosomas en el citoplasma, en donde se lleva a cabo la traducción y síntesis de la proteína. Es por tanto una molécula intermediaria entre el ADN y la proteína (Kampers, *et. al.*, 1996).

Con la finalidad de confirmar la integridad del ARN total extraído por la técnica de TRIzol™, las células de las líneas CALO e INBL fueron cultivadas a 48h y 72h en ausencia y presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Una vez extraído el ARN fue teñido con bromuro de etidio y las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, durante 60 minutos a 60 V. Al excitar el gel con luz UV observamos nítidamente las subunidades grande 28s y pequeña 18s del ARN ribosomal (ARNr). En la figura 14 se muestra la integridad del ARNm extraído de la línea celular CALO cultivada en ausencia (-) de la fracción 2 extracto (Figura. 14a) y células de la línea CALO cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto (+) (Figura. 14b), así como

el ARNm para la línea celular INBL cultivada en ausencia (-) (Figura. 14c) y presencia (+) de la fracción 2 del extracto (Figura. 14d).

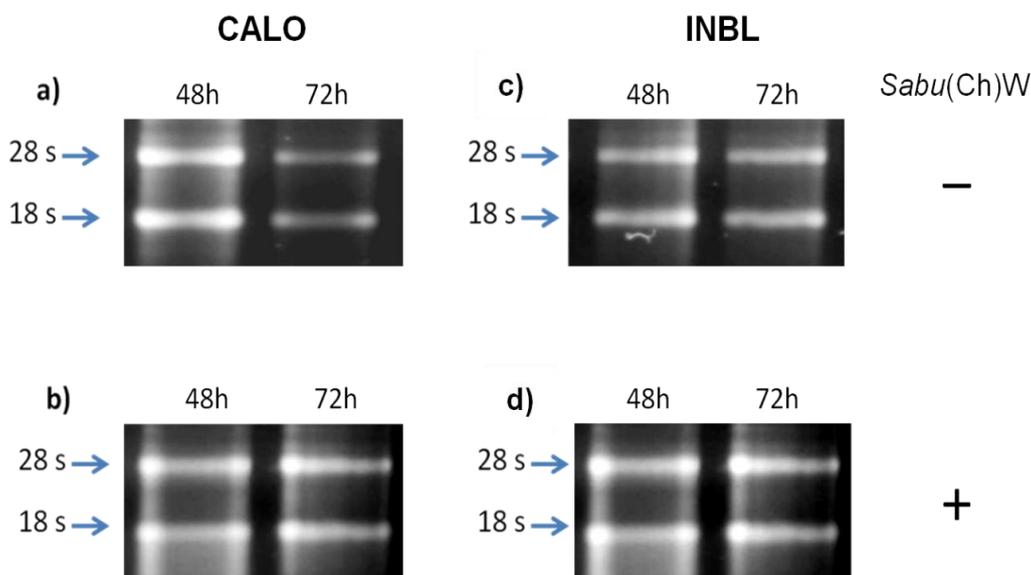


Figura 14. Integridad del ARN en líneas celulares de CaCu CALO e INBL. Se realizó la extracción del ARNm por la técnica de TRIZOLTM. ARNm de la línea celular CALO a) y b). ARNm de la línea celular INBL c) y d). Células cultivadas por 48 y 72 h en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* (+) a) y c). Células cultivadas en ausencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* (-) b) y d). Las bandas muestran la integridad de las subunidades 28s y 18s del ARNr.

Expresión de β -actina en líneas celulares de CaCu

La técnica de la PCR a partir de ARNm (RT-PCR, del inglés, *reverse transcriptase*) es un método que se emplea para la detección de ARN y tiene utilidad para analizar la expresión génica. Para ello es necesario obtener el ADNc usando la enzima transcriptasa reversa, el ADNc se amplifica posteriormente mediante la técnica de PCR, empleando los primers relativos a la secuencia del ARN que se desea analizar, en este caso el gen de β -actina.

Una vez confirmada la integridad del ARNm se procedió a llevar a cabo la retrotranscripción para obtener el ADNc de cada una de las muestras obtenidas de los cultivos a 48h y 72h en presencia (+) y ausencia (-) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. El ADNc fue utilizado para amplificar la proteína β -actina que es una proteína constitutiva de las células, la cual se encuentra en síntesis continua en células metabólicamente activas, por lo cual su mensajero está presente siempre, y su amplificación resulta ser un buen control interno de la técnica de PCR.

Los resultados muestran, para las líneas celulares CALO e INBL, una banda de 234pb que corresponde al producto de amplificación esperado para β -actina, los productos de amplificación, en ambas líneas, son homogéneos con respecto al tiempo y no muestran variación relacionada con la presencia del extracto (Figura 15).

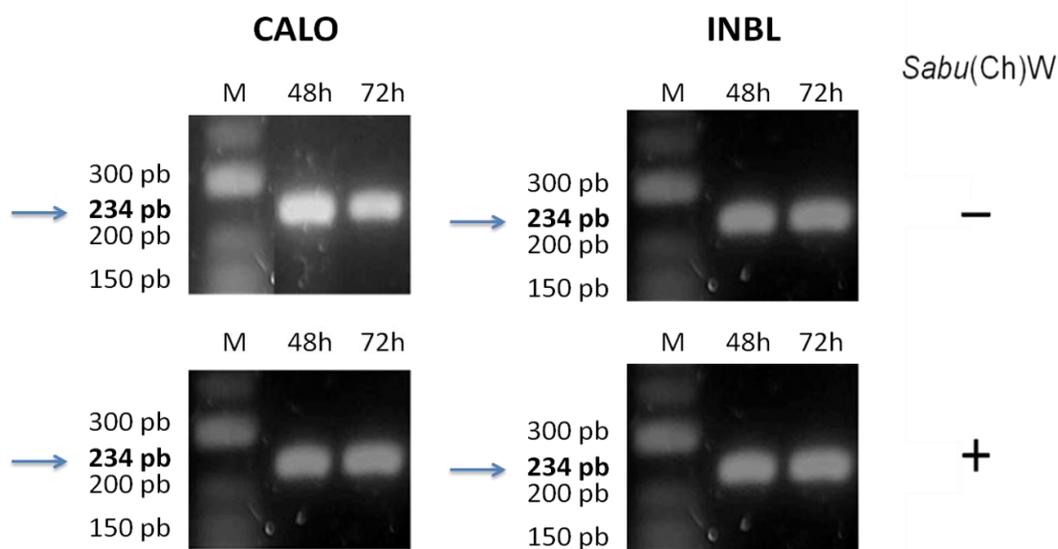


Figura 15. Expresión de β -actina en líneas celulares de CaCU CALO e INBL. Células cultivadas a 48h y 72h en ausencia (-) y presencia (+) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se observa un producto de amplificación de 234 pb para β -actina en la línea CALO **a)** y **b)** e INBL **c)** y **d)**. M: marcador molecular en pb.

Para obtener una mejor evaluación en cuanto a los cambios de la expresión en la transcripción de los ácidos nucleicos, los productos obtenidos de la RT-PCR para el gen amplificado fue cuantificado usando la técnica de densitometría por luminiscencia. Dicha técnica mide la proporción de la luz retenida en los ácidos nucleicos del amplificado, permitiendo determinar su masa de manera automatizada, minimizando el rango de error. Además, permite proporcionar datos numéricos de la concentración de cada amplificado genético. Con estos datos se puede comparar y extrapolar los resultados de una forma cuantitativa sin importar si provienen de pequeños cambios de la expresión genética. De acuerdo con el manual del software *Doc-itLS Acquisition and Analysis*, para el análisis de los resultados se tomó como un cambio significativo el valor entre cada lectura la cantidad de 0.75 ng.

En el caso de la evaluación densitométrica de los productos de amplificación del gen β -actina, los valores obtenidos son semejantes entre sí para todos los productos analizados a lo largo tiempo y sin importar que las células hayan sido cultivadas o no en presencia

de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, para los cuales se obtuvieron valores por debajo del rango establecido como valor significativo de cambio (Tabla 3).

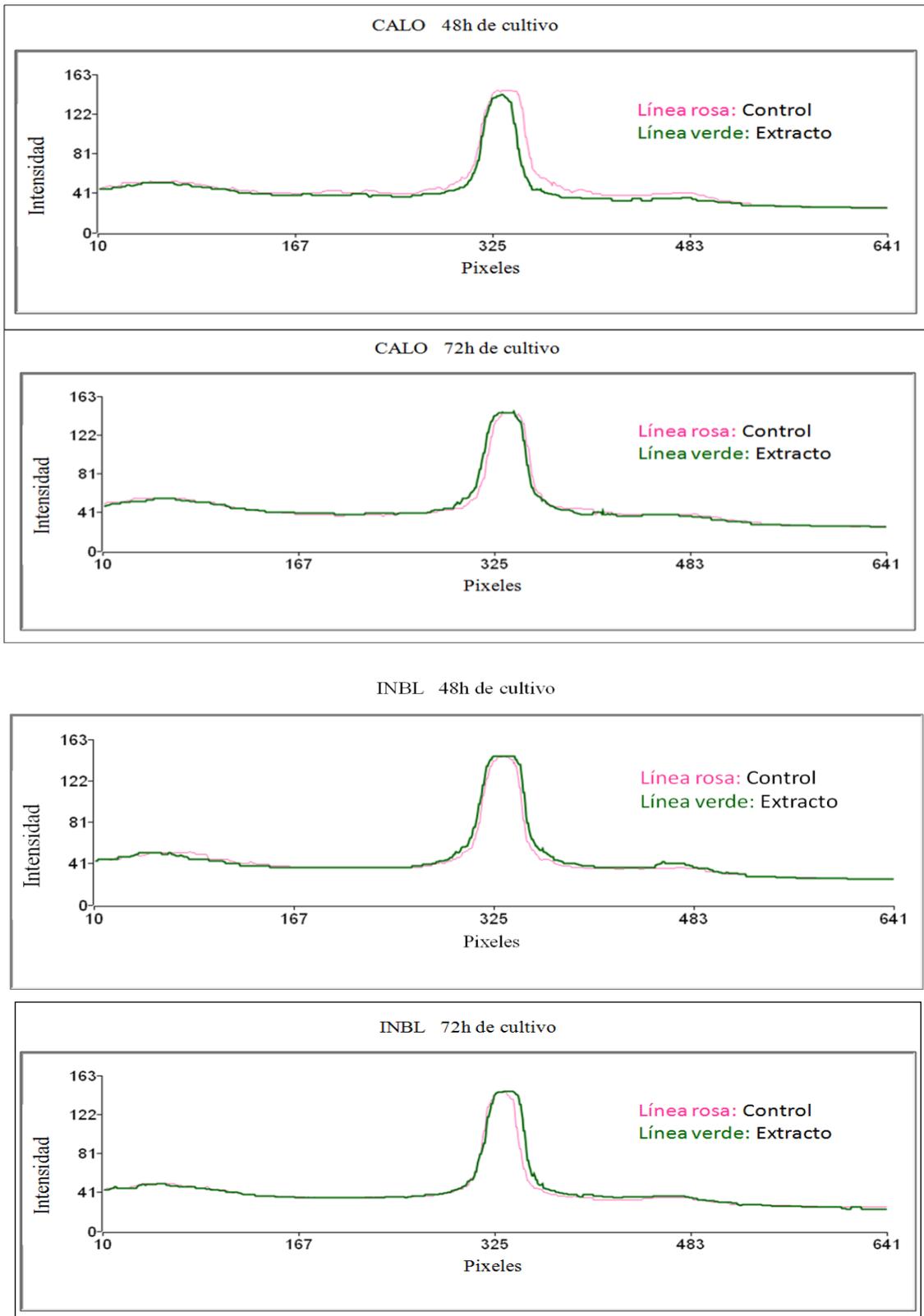
Banda	Rf	I-Max	I-Vol	Masa (ng)	Corrección de fondo	Proporción (ng)
CALO-C, 48h	0.52	149	212180	8.0	0	- 0.22
CALO-E, 48h	0.52	148	195786	7.78	0	
CALO-C, 72h	0.52	148	217589	8.04	0	- 0.1
CALO-E, 72h	0.51	147	193704	7.94	0	
INBL-C, 48h	0.51	148	209982	8.37	0	+ 0.43
INBL-E, 48h	0.51	148	225850	8.8	0	
INBL-C, 72h	0.51	148	210558	8.78	0	+ 0.24
INBL-E, 72h	0.52	149	220121	9.02	0	

Tabla 2. Análisis densitométrico, para el producto de amplificación para el gen de β -actina. (**Rf:** Línea de referencia, **I-Max:** Intensidad máxima proporcionada en lumens (lm, unidad para medir el flujo luminoso), **I-Vol:** Correlación con los valores de volumen en todas las variables, **Masa (ng):** Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, **Corrección de fondo:** Eliminación de ruido en la fotografía, **Proporción (ng):** Diferencia entre los productos de amplificación de las muestras cultivadas en ausencia (C) y presencia (E) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*). Se aprecia la cantidad en ng. de ácido nucleico que aumenta (+) o disminuye (-) entre las muestras cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2. Además se puede notar que para el gen de β -actina no existen variaciones considerables en la concentración de las muestras al ser expuestas a la fracción 2 de extracto de *Sabu(Ch)W*.

La obtención de los datos numéricos además de proporcionar información cuantitativa sobre los cambios de expresión génica, nos da la oportunidad de simplificar la información y representarla gráficamente en forma de histogramas para lograr una visualización general de la expresión del gen en las muestras, con respecto al tiempo y a la ausencia o presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Los histogramas, obtenidos del software *Doc-itLS Acquisition and Analysis* son el resultado de calcular y comparar la intensidad lumínica (lumens) y la cantidad de pixeles para cada banda contra un patrón ya conocido, que en tal caso es el peso molecular para cada banda de la escalera *GenRuler*^(THERMO SCIENTIFIC). Este marcador molecular además de suministrar información sobre la referencia del tamaño de los productos de amplificación, ofrece datos sobre la concentración de cada una de sus bandas. De tal manera que se puede utilizar como una referencia para el software.

En el caso del gen de β -actina, la representación gráfica permite apreciar que la expresión del mismo tiene un valor semejante entre cada uno de los productos de amplificación sin importar la condición de cultivo tal como se había observado en los datos de la tabla 3 y en el gel (Gráfica 1).

Histogramas que representan la expresión del ARNm de β -actina en las líneas celulares CALO e INBL



Gráfica 1. Histogramas que representan la expresión del ARNm de β -actina en las líneas celulares CALO e INBL. Se muestra la intensidad lumínica en lm y el pixelaje de cada banda amplificada para el gen de β -actina. Células cultivadas durante 48h y 72h en ausencia (línea rosa) y presencia (línea verde) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se observa que para los cultivos, en presencia y ausencia de la fracción en ambas líneas celulares, no se existe variación en la expresión de éste gen.

Después de confirmar por medio del análisis densitométrico que las condiciones de la PCR nos da un producto de amplificación homogéneo para β -actina, se procedió a amplificar el producto de interés citocromo c, con ayuda del primer específico y el ADNc de las muestras de las líneas celulares (CALO e INBL), cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de la fracción 2 del extracto *SaBu(Ch)W*.

Expresión de citocromo c en la línea celular CALO

El citocromo c es una molécula que además de participar en la cadena de transporte de electrones, también cumple un papel importante en el proceso apoptótico cuando es liberado hacia el citosol a través del poro de permeabilidad de la membrana mitocondrial, funcionando como cofactor en la formación de una estructura citosólica denominada apoptosoma, la cual inicia la activación de caspasas efectoras y culmina con la muerte celular por apoptosis; es por ello que se decidió evaluar este gen.

Los resultados de la determinación del producto de amplificación para citocromo c en células de las líneas de CaCu CALO e INBL, muestran para la línea celular CALO, estadio IIB, un producto de amplificación de 187pb que corresponde al esperado para citocromo c. Es importante destacar que las células cultivadas a 48h y 72h en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* presentan un producto de amplificación de mayor tamaño en comparación con sus respectivos controles, éstos últimos exhiben un producto de amplificación aparentemente homogéneo con respecto al tiempo (Figura 14).

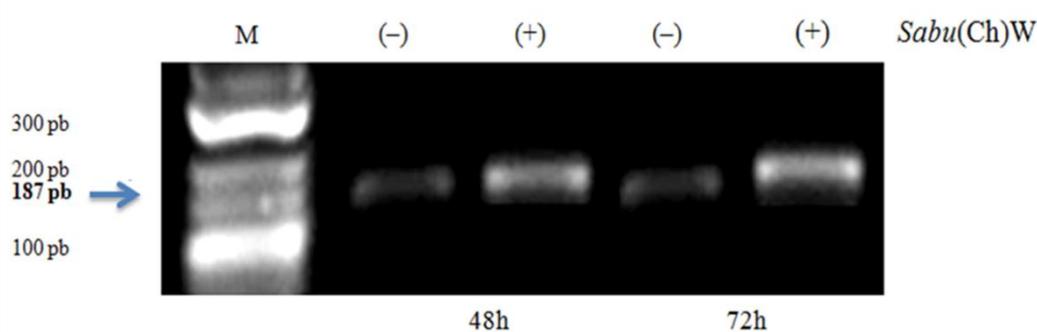


Figura 14. Expresión del mensajero para citocromo c en la línea celular CALO. Células cultivadas por 48h y 72h, en presencia (+) y ausencia (-) de la fracción 2 del extracto. Producto de amplificación de 187pb para citocromo c, obtenido por RT-PCR, donde se aprecia un aumento en la expresión del mensajero tanto a las 48h como a las 72h en células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, mientras que para los controles se observa una expresión homogénea. M: Representa el marcador de peso molecular en pb.

Una vez realizado el análisis densitométrico de las bandas con el software Doc-itLS *Acquisition and Analysis* se obtuvo la siguiente tabla que muestra el análisis densitométrico para la línea celular CALO, en donde se aprecia una tendencia positiva en la regulación de la expresión del gen para citocromo c, observándose un aumento en la transcripción del mismo en células que fueron cultivadas tanto a las 48h como a las 72 h con la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, para cada caso tenemos un aumento considerable de +17.67 ng y +17.78 ng, respectivamente.

Banda	Rf	I-Max	I-Vol	Masa (ng)	Corrección de fondo	Proporción (ng)
CALO-C, 48h	0.48	50	190271	29.89	0	+ 17.67
CALO-E, 48h	0.47	117	174454	47.56	0	
CALO-C, 72h	0.47	48	190097	29.48	0	+ 17.78
CALO-E, 72h	0.46	137	204671	47.26	0	

Tabla 3. Análisis densitométrico del producto de amplificación para el gen de citocromo c. (**Rf**: Línea de referencia, **I-Max**: Intensidad máxima proporcionada en lumens (lm, unidad para medir el flujo luminoso), **I-Vol**: Correlación con los valores de volumen en todas las variables, **Masa (ng)**: Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, **Corrección de fondo**: Eliminación de ruido en la fotografía, **Proporción (ng)**: Diferencia entre los productos de amplificación de las muestras cultivadas en ausencia (C) y presencia (E) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se aprecia la cantidad en ng de ácido nucleico que aumenta (+) o decrece (-) entre las muestras cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2. Además se puede notar que para el gen de citocromo c existen un incremento considerable en la transcripción del gen de +17.67 ng a las 48h y de +17.78 ng a las 72h en las muestras que fueron cultivadas en presencia de la fracción 2 de extracto de *Sabu(Ch)W*.

Estos valores numéricos fueron utilizados para la elaboración del histograma por medio del software, el cual permitió visualizar claramente la regulación que ejerce la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* sobre la expresión del gen de citocromo c. Las gráficas 2 y 3, representan la intensidad en lumens de las bandas para cada una de las muestras contra el pixelaje de las mismas. En ella se puede apreciar un claro aumento en la intensidad de la banda que representa la expresión del ARNm para citocromo c en células cultivadas tanto a 48h como a 72h en presencia (línea verde) de la fracción 2 del extracto en comparación con las células en ausencia (línea rosa) de la fracción 2 a los mismo tiempos.

Intensidad de la expresión del ARNm para citocromo c en la línea celular CALO a 48h de cultivo

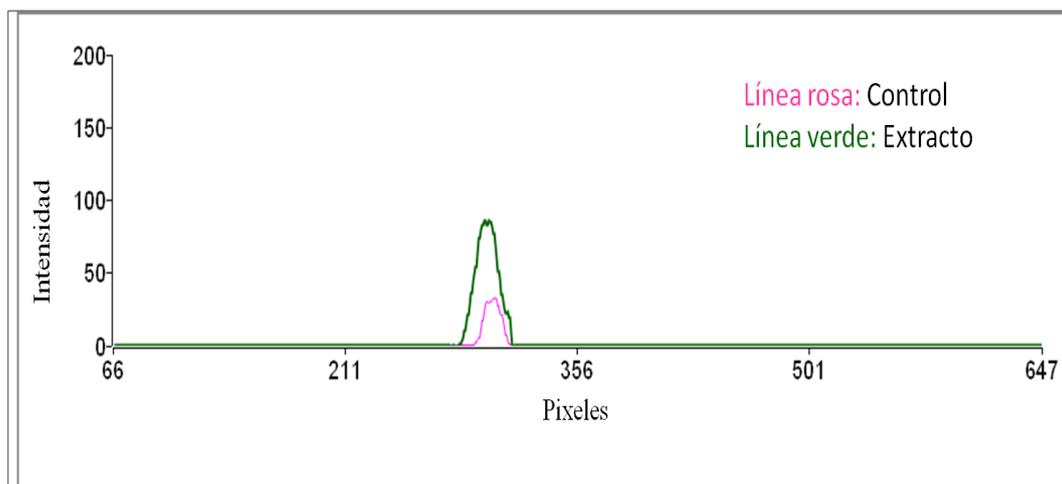


Gráfico 2. Histograma que representa la expresión del ARNm para citocromo c de la línea celular CALO a 48h de cultivo. Células cultivadas en ausencia (línea rosa) y presencia (línea verde) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se observa una mayor intensidad lumínica (lm) en la banda obtenida de células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto con 117 lm, en comparación de la banda que representan a las células control, cultivadas en ausencia de la fracción 2 del extracto con 50 lm.

Intensidad de la expresión del ARNm para citocromo c en la línea celular CALO a 72h de cultivo

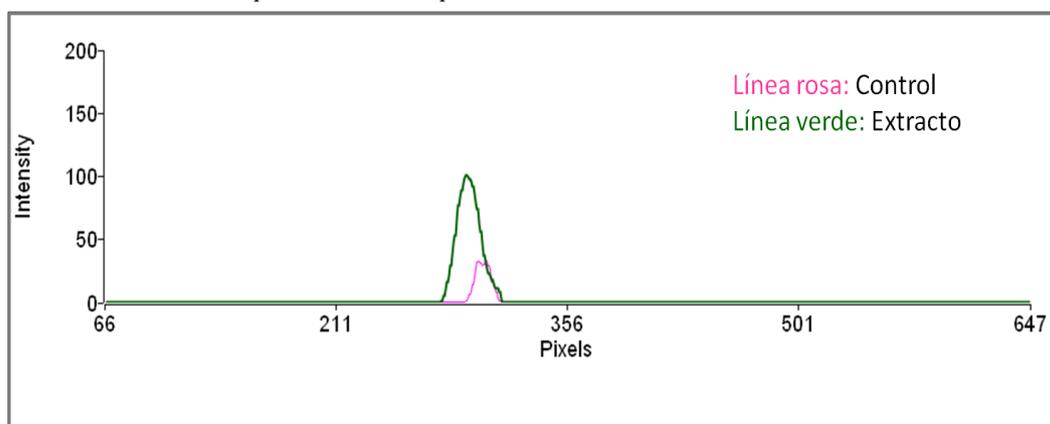
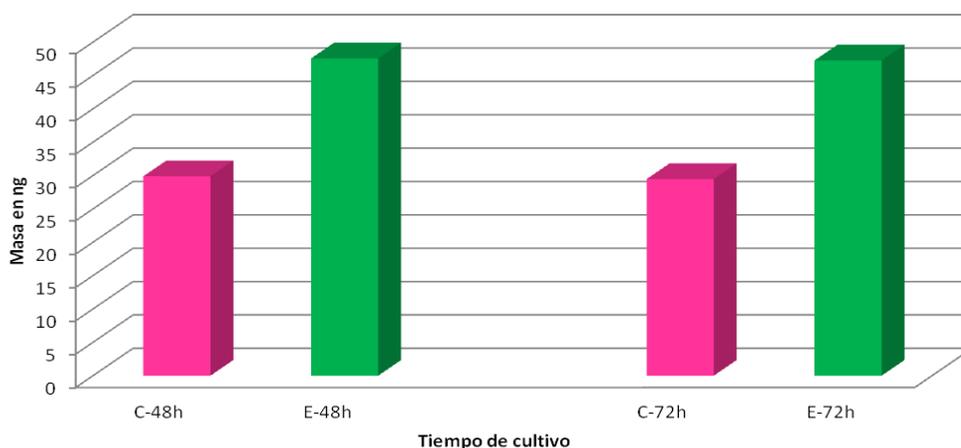


Gráfico 3. Histograma que representa la expresión del ARNm para citocromo c de la línea celular CALO a 72h de cultivo. Células cultivadas en ausencia (línea rosa) y presencia (línea verde) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se observa una mayor intensidad lumínica (lm) en la banda obtenida de células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto con 137 lm, en comparación de la banda que representa a las células control, células cultivadas en ausencia de la fracción 2 del extracto con 48 lm.

Para contar con un mejor parámetro de comparación de los resultados proporcionados en los histogramas para la densidad de los productos de amplificación de cultivos a 48h y 72h, se elaboró una gráfica que muestra la expresión del producto amplificado de citocromo c (Gráfico 4), la cual se encuentra representada por la masa en nanogramos que indica la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra; se observa que las células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* (barra verde)

tienen una mayor cantidad de masa en gramos que corresponden a 47.56 ng a 48h y 47.27 ng a 72h, en comparación con las células control (barra rosa), los cuales presentaron masas de 29.89 ng a 48h y 29.48 ng a 72h.

Expresión del ARNm para citocromo c en la línea celular CALO, expresada en nanogramos



Gráfica 4. Gráfica de la línea celular CALO que representa la expresión del ARNm para citocromo c en nanogramos. Células cultivadas en ausencia (C, barra color rosa) y presencia (E, barra color) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* a 48h y 72h, en la cual se observa la cantidad de ácido nucleico presente en las muestras representada en nanogramos de la expresión del mensajero para citocromo c. Hay un aumento en la masa para ambos tiempos de 47.56 ng y 47.27 ng, respectivamente, con respecto a los controles en los que se obtuvo una masa de 29.89 ng y 29.48 ng, sin embargo al comparar las células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto en ambos tiempos, se observa que la expresión del mensajero sólo aumentó 0.29 ng.

Expresión de citocromo c en la línea celular INBL

El material biológico de la línea celular INBL se cultivó en ausencia y presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* por 48h y 72h. Los resultados de la determinación del producto de amplificación para citocromo c en células de la línea INBL, estadio cínico IVB metastásico, también muestran un producto de amplificación de 187pb que corresponde al esperado para este gen. Para esta línea celular se aprecia una regulación positiva en la expresión del producto amplificado a las 72h, en las células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, en comparación con las células cultivadas a las 48h en presencia de dicha fracción, para el cual se observa una menor expresión del amplificado. Las células que fueron cultivadas en ausencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*, muestran un producto de amplificación homogéneo con respecto al tiempo.

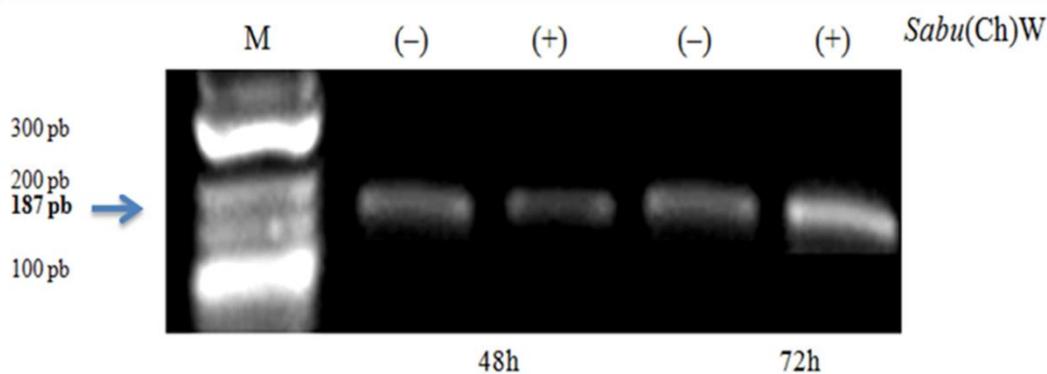


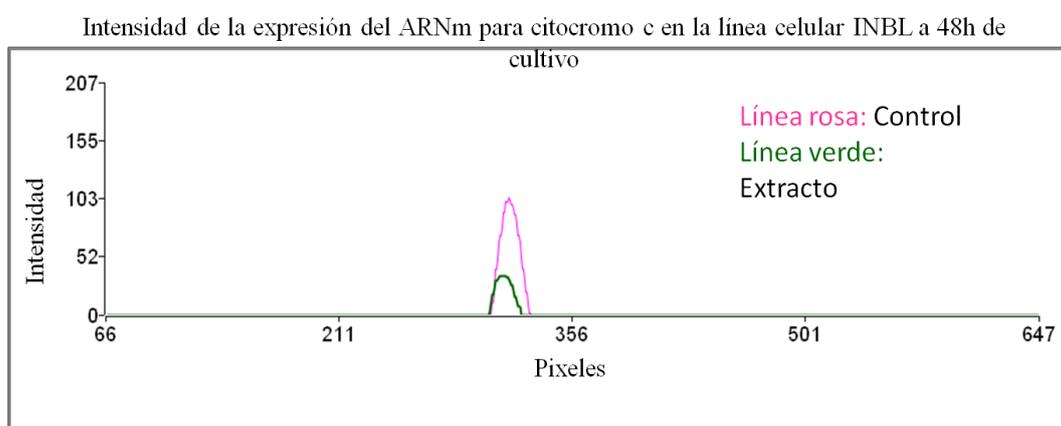
Figura 15. Expresión del mensajero para citocromo c en la línea celular INBL. Células cultivadas por 48h y 72h en ausencia (-) y presencia (+) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Producto de amplificación de 187pb para citocromo c, obtenido por RT-PCR, donde se aprecia una disminución en la expresión del mensajero a las 48h en células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* en comparación con las células sin estímulo. Mientras que a las 72h de cultivo se observa una expresión del mensajero similar con las células cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. M: Representa el marcador de peso molecular en pb.

Una vez realizado el análisis densitométrico de las bandas del amplificado con ayuda del software *Doc-itLS Acquisition and Analysis*, se obtuvo la siguiente tabla que muestra datos para la línea celular INBL, en donde se aprecia una tendencia negativa en la regulación de la expresión del mensajero para citocromo c cuando son cultivadas por 48h en presencia de la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* llegando a -6.39 ng, en contraste con los datos obtenidos para células cultivadas en presencia de la fracción 2 por 72h en donde se observa una tendencia positiva en la regulación de la expresión del mensajero para citocromo c llegando a $+0.38$ ng, aunque este valor es despreciable, se nota el aumento que existe en la expresión del mensajero al transcurrir el tiempo de 48h a 72h, siendo la diferencia en la proporción de ng entre ambos tiempos de $+7,12$ ng.

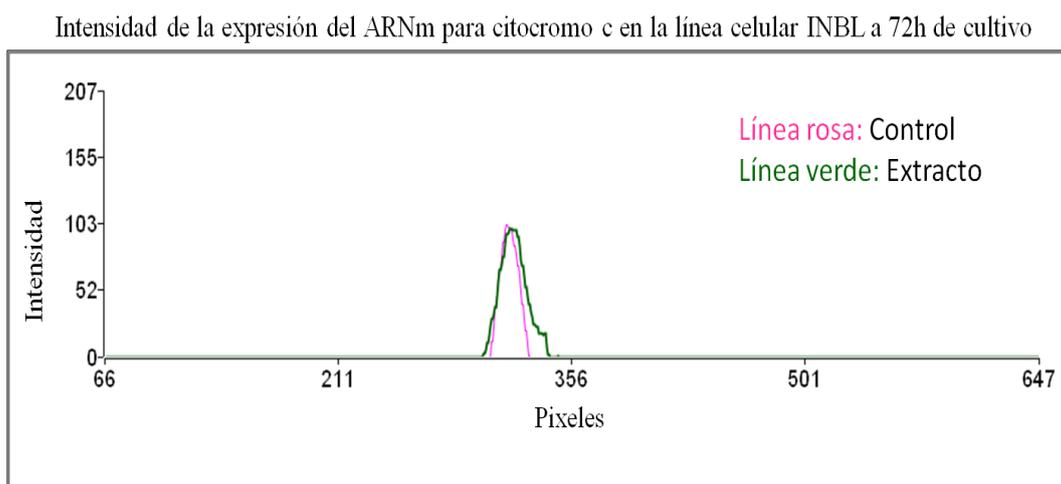
Banda	Rf	I-Max	I-Vol	Masa (ng)	Corrección de fondo	Proporción (ng)
INBL-C, 48h	0.46	103	95940	49.92	0	- 6.39
INBL-E, 48h	0.46	48	76014	43.53	0	
INBL-C, 72h	0.46	103	95940	50.27	0	+ 0.38
INBL-E, 72h	0.47	103	99766	50.65	0	

Tabla 5. Análisis densitométrico del producto de amplificación para el gen de citocromo c. (Rf: Línea de referencia, I-Max: Intensidad máxima proporcionada en lumens (lm, unidad para medir el flujo luminoso), I-Vol: Correlación con los valores de volumen en todas las variables, Masa (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, Corrección de fondo: Eliminación de ruido en la fotografía, Proporción (ng): Diferencia entre los productos de amplificación de las muestras cultivadas en ausencia (C) y presencia (E) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*). Se aprecia la cantidad en ng de ácido nucleico que aumenta (+) o disminuye (-) entre las muestras cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2.

Los valores numéricos fueron utilizados para la elaboración del histograma el cual permitió visualizar claramente la regulación que ejerce la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* sobre la expresión del gen de citocromo c en la línea celular INBL. Las gráficas 4 y 5, representan la intensidad lumínica, en lumens, de las bandas para cada una de las muestras contra el pixelaje de las mismas. En ella se puede apreciar un claro aumento en la intensidad de la banda, que representa la expresión del ARNm para citocromo c, en células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto a 72h (línea verde) con respecto a las células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto a 48h.

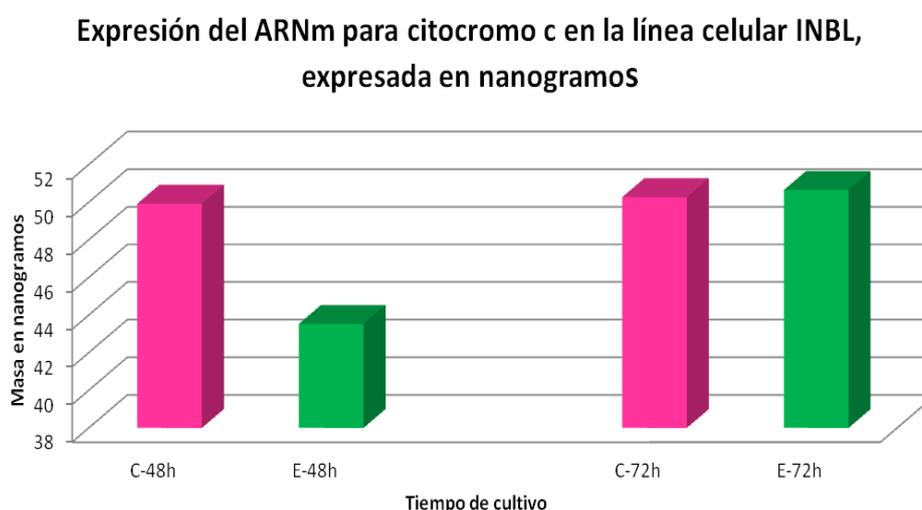


Gráfica 4. Histograma que representa la expresión del ARNm para citocromo c de la línea celular INBL a 48h de cultivo. Células cultivadas en ausencia (línea rosa) y presencia (línea verde) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se observa una mayor intensidad lumínica en la banda obtenida de células cultivadas en ausencia de la fracción 2 con 103 lm, en comparación de la banda de células cultivadas en presencia de la fracción 2 con 48 lm.



Gráfica 5. Histograma que representa la expresión del ARNm para citocromo c de la línea celular INBL a 72h de cultivo. Células cultivadas en ausencia (línea rosa) y presencia (línea verde) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Se observa una intensidad lumínica en la banda de células cultivadas en ausencia y presencia de la fracción 2 con 103 lm.

Para contar con un mejor parámetro de comparación de los resultados proporcionados en los histogramas para la densidad de los productos de amplificación de cultivos a 48h y 72h, se elaboró una gráfica que representa la masa en nanogramos del amplificado para citocromo c (Gráfica 5). Observándose que las células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* (barra verde) a un tiempo de 48h, tienen una menor cantidad de masa la cual es de 43.53 ng en comparación con las células control (barra rosa) que tuvieron una masa de 49.92 ng. Para el caso de las células cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto a un tiempo de 72h se calculó una masa de 50.65 ng con respecto al control que tuvo una masa de 50,27 ng.



Gráfica 5. Gráfica de la línea celular INBL que representa la expresión del ARNm para citocromo c en nanogramos. Células cultivadas en ausencia (C, barra color rosa) y presencia (E, barra color verde) de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* por 48h y 72h, en la cual se observa la cantidad de ácido nucleico presente en las muestras representada en nanogramos, de la expresión del mensajero para citocromo c. Hay una disminución en la masa en las células que fueron cultivadas con la fracción 2 del extracto a 48h que corresponde a 43.53 ng, con respecto a su control en el cual se obtuvo una masa de 49.92 ng; en tanto que para las células que fueron cultivadas con la fracción 2 del extracto a 72h corresponde a 50.65 ng, con respecto a su control en el cual se obtuvo una masa de 50.27 ng.

DISCUSIÓN

El cáncer de cérvix constituye un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es la segunda neoplasia que más muertes ocasiona entre la población femenina. Se estiman 500,000 casos anuales, de los cuales el 80% de ellos corresponden a países en vías de desarrollo (Secretaría de Salud de México, 2010).

De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) la incidencia estimada de CaCu en México durante el año 2008 fue de 19.2 casos por cien mil mujeres de todas las edades (International Agency for Research of Cancer, 2008).

La mortalidad por carcinoma de cérvix mostró una tendencia ascendente en el país entre 1979 y 1989, período en el que la tasa de mortalidad llegó a ser de 10.2 muertes por cada cien mil mujeres. A partir de 1990 las tasas comenzaron a disminuir de forma continua, hasta llegar a 7.2 decesos por cien mil mujeres en 2008. Este decremento se ha atribuido a la disminución de las tasas de natalidad y al incremento de la cobertura de la citología cervical realizada con la técnica de Papanicolau (Lazcano, Ponce E, *et. al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos treinta años esta enfermedad ha causado cerca de 200,000 muertes. Su más alta frecuencia y mortalidad se presenta en los estados del sur del país, particularmente en las áreas rurales, donde se ha estimado que el riesgo de morir por esta causa es tres veces mayor en comparación con las áreas urbanas (Palacio, Mejía L.S, *et. al.*, 2003).

Es por ello que en la actualidad se ha intensificado la búsqueda de nuevos procedimientos y alternativas para pacientes con esta enfermedad, ya que la mayoría de los tratamientos tradicionales, como la quimioterapia y la radioterapia son citotóxicos para las células normales y causan inmunotoxicidad, afectando no sólo a las células tumorales, sino también el estado general del paciente (Zandi, *et. al.*, 2010).

En los últimos años se ha acumulado evidencia que demuestra que muchos agentes quimioterapéuticos contra el cáncer inducen su muerte, sin embargo no se aclaran cuáles son los mecanismos que se activan para lograr esto. Por tanto, el esclarecimiento del tipo de muerte celular que se induce contra las células tumorales se plantea como una estrategia novedosa para el tratamiento del cáncer. Es por ello, que el descubrimiento y la identificación de nuevos fármacos antitumorales que tengan pocos efectos secundarios sobre el sistema inmune se ha convertido en un objetivo esencial en muchos estudios de inmunofarmacología (Xu, *et. al.*, 2009). Por lo antes mencionado investigadores en diferentes países han puesto su atención en el estudio de los

compuestos naturales de microorganismos, plantas y organismos marinos. Dirigiendo su investigación al uso de productos naturales o metabolitos secundarios de origen marino que se obtienen a partir de algas. Ya que se ha probado que éstas últimas son una fuente importante de nuevas e inusuales formas de moléculas orgánicas, con actividad biológica importante.

Los organismos marinos se encuentran sujetos a condiciones ambientales completamente diferentes a las presentes en ambientes terrestres, dichas condiciones determinan que las rutas biosintéticas también sean distintas (Baker, 1984), por esta razón pueden generar metabolitos secundarios con estructuras únicas y distintas a las encontradas en ambientes terrestres.

Al respecto existen datos que indican que los metabolitos bioactivos de las algas poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (De Lara Isassi, 1991), hecho que resulta de gran interés. Al respecto dentro de la gran diversidad de algas existentes, las algas pardas son poseedora de numerosos metabolitos de importancia farmacéutica. Existe publicaciones en las que se han probado los efecto terapéutico de diversos metabolitos extraídos de ejemplares de ciertas especies de algas del género *Sargassum* como *Sargassum natans*, *Sargassum thunbergii*, *Sargassum sp.*, *Sargassum palmeri*, *Sargassum acinacifolium*, *Sargassum micracanthum* Kuetzing, *Sargassum dentifolium* C Agardh y *Sargassum polycystum* C Agardh. Sin embargo, no existen reportes sobre la actividad terapéutica (antitumoral), particularmente de metabolitos obtenidos de algas de la especie *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (*Sabu*(Ch)W), un alga parda perteneciente al género. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto apoptótico de la fracción 2 del extracto de *Sabu*(Ch)W sobre la expresión de la molécula proapoptótica citocromo c, en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL.

Estudios previos, realizados en el Laboratorio de Oncología Celular L-4 PB, UMIEZ FES-Zaragoza, UNAM, con el extracto de *Sabu*(Ch)W, demuestran que la fracción 2 del extracto de *SabuCh*-W inhibe la proliferación de células de las líneas de carcinoma de cérvix, CALO a una dilución de 1:8123 y de la línea INBL a una dilución de 1:8910. Asimismo, resultados *in vitro* de la proliferación de estas líneas de CaCu usando las concentraciones de IC50 de la fracción 2, muestra actividad citostática, a diferencia de las demás fracciones del extracto. De esta manera se sabe que detiene a las células de la línea CALO en la fase de síntesis (S) y a las células de la línea INBL en la fase G1 (Norma Angélica Luna Cruz, 2012).

Paralelamente se realizaron ensayos para determinar el efecto de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* en células normales, para lo cual se utilizaron Linfocitos de Sangre Periférica (LSPH) de donadores normales los cuales fueron cultivados en presencia de la fracción 2 del extracto, observándose que esta fracción posee actividad inmunorreguladora sobre LSPH al inducir su proliferación. Por lo antes mencionado se decidió evaluar el efecto apoptótico de dicha fracción en líneas celulares de carcinoma de cérvix, CALO e INBL, mediante la determinación por RT-PCR, determinando la expresión del ARNm para citocromo c, se eligió dicha técnica por su alta especificidad en la amplificación de productos de interés.

Dado que una de las características que define el comportamiento de las células tumorales es la evasión de las vías de señalización de muerte celular por apoptosis, y ésta se puede evaluar por características morfológicas y bioquímicas bien definidas para una célula en apoptosis, se decidió evaluar uno de los aspectos bioquímicos que ocurre durante el proceso apoptótico, nos referimos a la expresión de citocromo c, una molécula implicada en la supervivencia y muerte celular.

Durante décadas se consideró a la mitocondria como un organelo encargado exclusivamente de oxidar sustratos, produciendo agua en un proceso acoplado a la fosforilación para la producción de ATP. En la actualidad se sabe que además de ser la productora de energía de la célula, la mitocondria almacena una gran variedad de proteínas apoptogénicas, tales como AIF, Smac/DIABLO y citocromo c, y algunas de ellas neutralizan los inhibidores endógenos de la apoptosis; asimismo en la mitocondria existe un proceso latente de transporte, conocido como “permeabilidad transitoria mitocondrial”, cuya activación se presenta bajo ciertas condiciones y se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial (Verhagen AM, *et. al.*, 2000). Se ha propuesto que ésta permeabilidad, podría ser una de las vías de transporte de moléculas propapoptóticas.

La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y la consiguiente liberación de citocromo c, proteína localizada en el espacio intermembranal de la mitocondria que normalmente funge como transportador de electrones durante la respiración celular, cumple un papel importante en la inducción de muerte ya que una vez que se libera hacia el citosol, la célula entra en un punto de no retorno para el inicio del proceso apoptótico. Una vez en el citoplasma, el *citocromo c* junto con la molécula adaptadora Apaf-1, participa como cofactor en la activación de procaspasa 9, mediante la formación del complejo llamado apoptosoma, lo que resulta en el reclutamiento y

procesamiento de la procaspasa 9 hacia su forma activa (caspasa 9) requiriendo la presencia de ATP, la activación de caspasa 9 desencadena una cascada de caspasas que conllevan a la muerte celular por apoptosis (Amarante, Mendes GP, *et. al.*, 1999).

Por esta razón pensamos que la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* está induciendo la muerte por apoptosis en ambas líneas de carcinoma de cérvix, ya que los resultados obtenidos a partir de la RT-PCR muestran una regulación positiva de la transcripción del mensajero para citocromo c en las líneas celulares CALO e INBL cuando éstas son cultivadas en presencia de dicha fracción. Además, al ser analizados los resultados obtenidos a partir del gel de electroforesis en el software *Doc-itLS Acquisition and Analysis*, se confirma que existe un aumento en la expresión del mensajero para citocromo c que para el caso de la línea celular CALO tuvo un aumento de + 17.67ng a las 48 h y llegó a +17.78ng a las 72h, con lo cual se puede establecer que hay una transcripción constante para esta línea celular que proviene de un carcinoma estadio IIB. Por otra parte el hecho de que el mensajero se esté expresando a un tiempo de 48h en la línea celular CALO, nos indica que el extracto promueve la muerte de las células por activación de apoptosis más eficientemente en células de estadio temprano.

Ahora bien los resultados obtenidos para la línea celular INBL, cuando es cultivada en presencia de la fracción 2 del extracto de *SabuCh-W* son diferentes a los descritos para la línea CALO ya que se aprecia una disminución en la masa del producto de amplificación de -6.39 ng a un tiempo de 48h y un aumento modesto de +0.38 ng a 72h, aunque este último valor es despreciable, existe un incremento muy marcado en la expresión del mensajero al transcurrir el tiempo de 48h a 72h, siendo la diferencia en la proporción de nanogramos entre ambos tiempos de +7,12 ng, llegando a tener la misma cantidad de masa que el control para dicho tiempo.

Todo ello indica que el extracto de *Sabu(Ch)W* tiene un efecto diferencial sobre las células de CaCu que depende del estadio clínico que tiene cada una de estas líneas celulares CALO (IIB) e INBL (IVB metastásico), obteniendo un mejor resultado en células tumorales de menor estadio clínico .

Estudios realizados con el extracto de otros miembros de este género de algas, indican que el compuesto denominado fucoidan presentes en algas pardas poseen una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo anticoagulante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiviral, antioxidante, inmunorregulador, antitrombótico y en particular actividad antitumoral (Aleksyenko TV, *et. al.*, 2007; Maruyama H, *et. al.*, 2006) (Jiao, G, *et. al.*, 2011; Zhuang, C., *et. al.*, 1995). Este fucoidan pertenece a una

familia de polisacáridos sulfatados que contienen L-fucosa y sulfato, junto con bajas cantidades de xilosa, ácido urónico, y galactosa. Las estructuras de los fucanos presentes en las algas marinas varían entre especies y en ocasiones entre sus diferentes estructuras (Silva Costa, *et. al.*, 2011).

Además, se ha encontrado específicamente que los polisacáridos sulfatados no fraccionados, reducen la proliferación de carcinoma de células de pulmón y células de melanoma *in vitro*, ejerce efectos inmunopotenciadores en animales portadores de tumores y activa a las células asesinas naturales (NK) en ratones que conducen a un aumento en la eficacia antitumoral (Ale, M. T., *et. al.*, 2011; Foley, S. A., *et. al.*, 2011). También se ha demostrado que el fucoïdan inhibe el crecimiento de una amplia variedad de células tumorales, entre ellas, células 4T1 de cáncer de mama; HT-29 y HCT116, células de cáncer de colon; B16, células de melanoma y HeLa, células de carcinoma de cérvix, induciendo muerte celular por apoptosis (Teruya T, *et. al.*, 2007).

Estas evidencias nos hacen pensar que el extracto de *Sabu(Ch)W*, que pertenece al mismo género de algas, puede poseer estos fucanos y que ellos son los responsables del efecto antiproliferativo y apoptótico observado en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL cuando son cultivadas en presencia de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*.

Entender los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la muerte celular y su relación con las vías de señalización, incrementa el conocimiento y comprensión sobre el diseño y la creación de nuevos y potenciales agentes terapéuticos. Es por ello que es preciso dilucidar el mecanismo de acción por el cual la fracción 2 del extracto de *Shbu(Ch)W* está llevando a cabo la regulación de proteínas implicadas en la muerte celular por apoptosis.

Se propone el uso de la fracción 2 del extracto de *Shbu(Ch)W* como alternativa terapéutica para pacientes con cáncer, ya que la aplicación del extracto de *Sabu(Ch)W* parece tener un efecto selectivo sobre células tumorales, esto contribuiría a disminuir la masa tumoral, así como los efectos colaterales, no deseados, de un tratamiento antitumoral y al mismo tiempo podría promover una respuesta inmunológica en pacientes con cáncer. Lo cual abre un campo de posibilidades para el uso de los metabolitos bioactivos de esta especie de alga, como alternativa de origen natural para el tratamiento del cáncer de cérvix.

CONCLUSIONES

La fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W* está regulando positivamente la expresión del ARNm para citocromo c en la línea celular CALO.

En la línea celular INBL, la fracción 2 regula negativamente la expresión del ARNm para citocromo c a las 48h, mientras que a las 72h de cultivo, la expresión del mensajero aumenta.

PERSPECTIVAS

Caracterización química de la fracción 2 del extracto del alga *Sargassum buxifolium* (Chauvin) J. M. Wynne.

Evaluar a 96h y 120h la expresión para el mensajero de citocromo c en la línea celular INBL.

Evaluar la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bak, Bax).

Medir el potencial de membrana mitocondrial.

Evaluar la presencia de la proteína, de citocromo c, en el citoplasma mediante citometría.

Evaluar la expresión de receptores de muerte celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Ale, M.T.; Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. (2011) Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 331–336.
- Alekseyenko TV, Zhanayeva SY, Venediktova AA, Zvyagintseva TN, Kuznetsova TA, et al. (2007). Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bull Exp Biol Med.* 143: 730–732.
- Alonso P., Lozano E. y Hernández M. (2000). Cáncer Cervico-Uterino diagnostic, prevención y control. Ed. Panamericana, 254-267.
- Amarante, Mendes GP, Green DR. (1999). The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res.* 32:1053-1061.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures.* (2011). Atlanta: American Cancer Society. p 60.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., y Youle, R.J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 22, 4385-4399.
- Barbara S., Zoschnick L. (2001). Bethesda System Terminology. *Rev. Am Fam Physician*, Nov 15; 68(10): 1992-1999.
- Baker, J.T. (1984). Modern Drug Research: The potential and the problems of Marine Natural Products: En: Natural Products and Drug Development. Alfred Benzon Symposium 20. Ed. P Krogsgaard-Larsen, S Brogger Christensen, H. Kotod. Munksgard. Copenhagen p. 139-163.
- Baker, J.T. (1984a). Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. *Hydrobiologia.* 116/117: 29-40.
- Belsher, T. & Pommellec, S. (1988). Expansion de l'algue d'origine japonaise *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, sur les côtes françaises, de 1983 à 1987. *Cahiers de Biologie Marine* 29: 221–231.
- Boise, L.H., y Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3759-3764.
- Cain, K., Bratton, S.B., y Cohen, G.M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214.
- Cai, J., Yang, J., y Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366, 139-149.
- Campbell, Neli A. y Reece, Jane B. (2007). Biología, Ed. Médica Panamericana, 7º ed., Buenos Aires, 1392 p. pp. consultadas 560-561.
- Chengkui, Z. (C. K. Tseng) y Z. Junfu (C. F. Chang). (1984). Chinese seaweeds in herbal medicine. *Hydrobiologia.* 116/117; 152-154.
- Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., y Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14, 729- 739.
- Degterev A. y Yuan J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 378-390.
- De Lara, Issasi (1991). Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas, UAM-1. *Hidrobiología.* 1(2): 21-28.

- D-zul-Rosado Karla, Puerto-Solís Maylin, González-Losa María del R. (2004). Cáncer cervico uterino: métodos actuales para su detección. *Rev. Biomed*; 15:233-241.
- Earnshaw W.C., Martins L.M. y Kaukmann S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68, 383-424.
- Espinosa, Ávalos J. (1993). Macroalgas marinas del Golfo de California. Biodiversidad Marina y Costera en México, pp. 328-357. Eds. S. I. Salazar, Vallejo y N. E. González, Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México, 885 pp.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. (1992). Exposure of phosphatidilserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*; 148:2207-2216.
- Fajardo-León, M. del Carmen. (1994). Evaluación de biomasa y determinación de especies de los mantos del género *Sargassum* spp AGARDH, 1821 (Fucales Phaeophyta) en la Bahía de la Paz, B.C.S., México, en la primavera de 1988. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. Méxio, p. 78.
- Ferri K.F. and G. Kroemer. (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways". *Nat Cell Biol*; 3(11): E255-63.
- Flores P., M. L. (2010). Fauna asociada a cuatro especies del Género *Sargassum* C. Agardh del litoral rocoso de Villa Rica, Municipio de Actopan, Veracruz, México. Tesis de Trabajo de Experiencia Recepcional. Facultad de Biología, Universidad Veracruzana.
- Foley, S.A.; Mulloy, B.; Tuohy, M.G. (2011). An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: Extraction, characterization, and apoptotic effects *in vitro*. *J. Nat. Prod.* doi:10.1021/np200124m.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., y Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757, 639-647.
- Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., y Orrenius, S. (2001). Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276, 19066-19071.
- Green, D.R., y Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Hawkins, P. R., y Griffiths, D. J. (1993). Artificial destratification of small tropical reservoir: effects upon the phytoplankton. *Hidrobiología*, 254:169-181.
- Healthwise Incorporated, (2009), http://cancer-cervix-honduras.webatu.com/1_2_-Qu-es-C-ncer-.html.
- Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000; 407:770-6.
- Hengartner, M.O. y Horvitz H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.
- Instituto Nacional del Cáncer, (2012) (<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/riesgo-causas/VPH-respuestas>).
- International Agency for Research of cancer. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/>
- Ireland, M. C.; Brent R. C.; M. P. Foster; L. A. McDonald; D. C. Radisky y J. C. Swersey. (1993). Biomedical Potencial of Marine Natural Products. En: *Marine*

Biotechnology, Vol. 1: Pharmaceutical y Bioactive Natural Products. Ed. Davis H. Attaway y Oskar R. Zaborsky. Plenum Press. New York.

- Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, S.E. (2011). Chemical structure and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs*, 9, 196–223.
- Jordán, Joaquín. (2003). Apoptosis: Muerte celular programada, OFFARM, VOL 22 NÚM 6 JUNIO 2003, 100-106.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., y Penninger, J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Kampers T., Friedhoff P., Biernat J., Mandelkow EM., Mandelkow E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Letters* 399: pp 104D.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26, 239-257.
- Klingenberg, M. (1980). The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol* 56, 97-105.
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J-L, Mignotte B. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*; 9: 1279-87.
- Kroemer, G. (1997). Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* 4, 443-456.
- Lazcano, Ponce. (1997). Mortality from cervical carcinoma in México: Impact of screening, 1980-1990. *Salud Pública México*, 97; 39; 73-266.
- Lazcano, Ponce E.; Palacio, Mejía L.S.; Allen, Leigh B.; Yunes, Diaz E.; Alonso P.; Schiavon R.; Hernández, Avila M. (2008). Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of Papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 17(10):2808-17.
- Loeffler M. and G. Kroemer. (2000). “The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. Minireview”. *Experimental Cell Research*, 256, 19–26.
- López Moratalla, Natalia. (2008). *Biología y Geología 1*, Ed. Editx, ed. 6º, México, pp. 360, pp. consultada 195.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., y Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Lizano, Soberón Marcela, Carrillo, García Adela y Contreras, Paredes Adriana. (2009). Infección por Virus del Papiloma Humano: Eidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. *Cancerología* 4; 205-216.
- Lizarbe Iracheta, María Antonia (2007), El suicidio y la Muerte Celular, *Rev. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*, Vol. 101, N°. 2, pp., 1.
- Mansilla, Andrés y Alveal, Krisler, 2004. Generalidades sobre macroalgas, Capítulo 16. *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*, pp. 351-353. (<http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/BioMarina/12.pdf>).

- Mateo-Cid, L. E., Sánchez-Rodríguez, I., Rodríguez-Montesinos, Y. E., Casas, M. M. (1993). Estudio florístico de las algas marinas bentónicas de Bahía Concepción, B.C.S., México. *Ciencias Marinas*, vol. 19, núm. 1, pp. 41-60.
- Mattio, Lydiane y Payri, Claude E. (2009). 190 Years of Sargassum Taxonomy, Facing the Advent of DNA Phylogenies, *The New York Botanical Garden 2009*, *Bot. Rev.* (2011) 77:31–70.
- Martínez-Nadal, N. G., L. V. Rodríguez y C. Casillas. (1963). Sarganin y Chonalgin, new antibiotic substances from marine algae from Puerto Rico. *Antimicrobial agents y chemotherapy*. P.p. 68-72.
- Martínez-Nadal, N. G., L. V. Rodríguez y C. Casillas. (1964). Isolation and characterization of sarganin complex, a new broad-spectrum antibiotic isolated from marine algae. *Antimicrobial agents y chemotherapy*. 13 1-134.
- Martínez M Francisco Javier (2004). Epidemiología del cáncer del cuello uterino *Medicina Universitaria*, 6(22):39-46.
- Maruyama H, Tamauchi H, Iizuka M, Nakano T (2006). The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoxanthin from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). *Planta Med.* 72: 1415–1417.
- McCourt, M. R. (1984). Seasonal pattern of abundance, distributions, and phenology in relation to growth strategies of three Sargassum species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 74: 141-156.
- Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H. y Peter M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794-2804.
- Meza, Junco Judih, Montaña, Loza Aldo, Aguayo, González Álvaro. (2006). Bases moleculares del Cáncer, *Revista de Investigación clínica: Rincón del Residente*, Vol. 58, Núm. 1, pp. 56-60.
- Motyl T. (1999) Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. *Reprod Nutr Dev.* 39, 49-59.
- Muñeton-Gómez, M. y G., Hernández-Carmona. (1993). Creimiento estacional de *Sargassum horridum* (Setchell y Gardner) Phaeophyta, en la Bahía de la Paz, B.C.S., México, *Inv. Mar. CICIMAR* 8 (1): 23-31.
- Muziño M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A. y col. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Núñez-López, R. A. y Casas-Valdéz, M. M. (1996). Fenología de las especies de *Sargassum* (Fucales: Sargassaceae) en tres zonas de Bahía Concepción, B. C. S., México. *Rev. Biol. Trop.*, 44 (2): 455-464.
- Núñez L., R. A. y Casas V., M. M. (1997). Variación estacional de la biomasa y talla de *Sargassum spp.* (Sargassaceae, Phaeophyta) en la Bahía Concepción, B. C. S., México. *Hidrobiológica*, 7: 19-25.
- Padmini S. R., P. S. Rao y S. M. Karmarkar (1986). Antibacterial substances from brown algae, II. Efficiency of solvents in the evaluation of antibacterial substances from *Sargassum johnstonii* Setchell y Gardner. *Bot. Mar.* 29: 503-507.
- Palacio, Mejía L.S.; Rangel, Gómez G.; Hernández, Avila M. y Lazcano, Ponce E. (2003). Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Pública Mexicana*; 45 Suppl 3:S315-25.

- Patterson SD, Spahr CS, Daugas E, Susin SA, Irinopoulou T, Koehler C, *et al.* (2000). Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ.* 7: 13744.
- Pelczar, M., Reid, R., y Chan, E. C. S (1982). *Microbiología*. Ed. Mc Graw Hill, 2a ed. México, pp. 288-308.
- Pesando, D. y B. Caram (1984) Screening of marine algae from the French Mediterranean coast, for antibacterial y antifungal activity. *Boat. Mar.* 27: 381-386.
- Pesando, D. y B. Caram. (1990). Antibacterial and antifungal activities of marine algae. *Introduction to Applied Phycology*, 3-26.
- Reed, D.J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 603-631.
- Rivera, M. y Scrosati, R. (2006). Population dynamics of *Sargassum lapazeanum* (Fucales, Phaeophyta) from the Gulf of California, México. *Phycologia*. Volume 45 (2), 178-189.
- Robertson, J.D., y Orrenius, S. (2000). Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30, 609-627.
- Robledo, R. D. (1990) Las macroalgas marinas, un recurso desconocido. *ICyT*. 12 (169): 3-8.
- Rooker, J. R., Turner, J. P. y Holt, S. A. (2006). Trophic ecology of *Sargassum* associated fishes in the Gulf of México determined from stable isotopes and fatty acids. *Marine Ecology Progress Serie*, Volume 313: 249-250.
- Roos, N., Benz, R., y Brdiczka, D. (1982). Identification and characterization of the pore-forming protein in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 686, 204-214.
- Santelices, B. (1991). Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. *Monografías Biológicas* 5: 1-437.
- Secretaría de Salud de Mexico. Programa de prevención y control del cáncer cervicouterino. Mexico (DF); 2000., pp. 101 (<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v37n1/13550>).
- Shapiro H.M. 2000. "Membrane Potential Estimation by Flow Cytometry". *Methods*, 21: 271-279.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 13, 1979-1987.
- Shimizu, S., y Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 577-582.
- Sierra, Mondragón Edith (2011). Participación de Caspasa 8 y 12 en la regulación de Apoptosis en líneas celulares de cáncer cérvico uterino, cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Springs, S.L., Diavolitsis, V.M., Goodhouse, J., y McLendon, G.L. (2002). The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *J Biol Chem* 277, 45715-45718.
- Stennicke H.R. y Salvesen G.S. (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*. 1387, 17-31.
- Suárez C., A. N. (2008). Fauna asociada a mantos de *Sargassum* (Ochrophyta: Fucales) en el Saluzoso, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. CICIMAR-IPN.

- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397: 4416.
- Tanveer, A., Virji, S., Andreeva, L., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Ward, J.M., y Crompton, M. (1996). Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem* 238, 166-172.
- Taylor R.C., Cullen S.P. y Martin S.J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 231-241.
- Teruya T, Konishi T, Uechi S, Tamaki H, Tako M (2007). Antiproliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* Tokida in U937 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 221–226.
- Van Gurp M., N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens and P. Vandenabeele. (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. Review". *Biochem Biophys Res Commun.*, 304(3): 487-97.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., y Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.
- Vaux D.L., Weissman I.L. y Kim S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258, 1955-1957.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. (1999) *Cell*; 96: 245-54.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102, pp. 43-53.
- Von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., y Newmeyer, D.D. (2000a). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150, 1027-1036.
- Von Ahsen, O., Waterhouse, N.J., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., y Green, D.R. (2000b). The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1192-1199.
- Yan N. and Shi Y. (2005). "Mechanisms of Apoptosis Through Structural Biology". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Vol. 21, pp. 35–56.
- Youle R.J. y Strasser A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 47-59.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M. y Horvitz H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Zamzami N. and G. Kroemer. (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens". *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 2(1): 67-71.
- Zhuang, C.; Itoh, H.; Mizuno, T.; Ito, H. (1995). Antitumor active fucoidan from brown seaweed, *Umitoranoo (Sargassum thunbergii)*. *Biol. Biotechnol. Biochem.* 59, 563–567.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., y Wang, X. (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.
- <http://biogeografialgas.blogspot.mx/2010/06/mapa-de-distribucion-mundial-de-las.html>

APENDICE I.

Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR

a. Retrotranscripción

Para el presente estudio se partió de 2µg de RNA total para todas las muestras (controles y tratamientos). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro.

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 1:50 en un volumen de 200µL.

40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/mL del biofotómetro.

$$\frac{(\text{Absorbancia 260}) (\text{Volumen de la disolución}) (40)}{1000} = 1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Teniendo los cálculos de todas las muestras, y partiendo de 2µg de RNAm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx), (Tabla 3). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener (2 controles y 2 tratamientos):

Reactivos	1RX	2RX controles	2RX tratamientos
Amortiguador 5x ^(PROMEGA)	5 µl	10 µl	10 µl
dNTPs 10 Mm ^(INVITROGEN)	1.5 µl	3 µl	3 µl
Enzima MMLV-RT ^(PROMEGA)	1 µl	2 µl	2 µl
Oligo dT ^(PROMEGA)	1.8 µl	3.6 µl	3.6 µl
Muestra	¿? µl	¿? µl	¿? µl
Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS)	¿? µl	¿? µl	¿? µl
Volumen Total	25 µl	50 µl	50 µl

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con los cDNA obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren (tabla 4), para cada primer utilizado en el presente estudio (β-actina y citocromo c).

Reactivos	1RX	4RX β-actina	4RX citocromoc
Amortiguador 5x ^(PROMEGA)	5 μ l	20 μ l	20 μ l
dNTPs 10 Mm ^(INVITROGEN)	1.5 μ l	6 μ l	6 μ l
Enzima MMLV-RT ^(PROMEGA)	1 μ l	4 μ l	4 μ l
Oligo dT ^(PROMEGA)	1.8 μ l	7.2 μ l	7.2 μ l
Muestra	¿? μ l	¿? μ l	¿? μ l
Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS)	¿? μ l	¿? μ l	¿? μ l
Volumen Total	20 μ l	80 μ l	80 μ l

APENDICE II

Reactivos y Soluciones Utilizados

Soluciones para cultivo

- RPMI-1640/10% SFB
- Solución fisiológica de verseno
- Solución de Fosfatos (PBS)

Reactivos Extracción ARN Total

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H2O inyectable
- H2O libre de RNAsas

Reactivos Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Promega)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Promega)
- DNTP'S 5mM (Invitrogen)
- Oligo dT (Promega)
- H2O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos (PCR)

- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)
- DNTP'S 10 mM (Invitrogen)
- Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)

- Primers: β - actina (1:5), Caspasa -8 (1:5), Caspasa -12 (1:5) (Unipars S.A)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga Blue/yellow 6X (promega)
- Bromuro de etidio

APENDICE III

Preparación de Reactivos y Soluciones

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El suero fetal bovino (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

Solución fisiológica de Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

- Tris base 3.04 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.04 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Etilen –diámen-tetra-acético (EDTA) 0.40 g (sigma chemical Co.U.S.A)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

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 1 litro de agua bidestilada.

- Cloruro de magnesio 0.10 g (sigma chemical Co.U.S.A)

- Cloruro de calcio 0.10 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.20 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato monoácido de sodio 2.16 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato diácido de potasio 0.20 g (sigma chemical Co.U.S.A)

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 Ibs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

DNTPS 10 mM (MIX)

Todos los nucleótido se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

- A 100µl (Invitrogen S.A de CV)
- G 100 µl (Invitrogen S.A de CV)
- T 100 µl (Invitrogen S.A de C.V)
- C 100 µl (Invitrogen S.A de C.V)

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de Rnasas para obtener 1 mL a una concentración de 10mM.

TBE 10X

- Tris base 108g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Ácido bórico 55g (sigma chemical Co.U.S.A)
- EDTA 0.5 M 40 mL. (sigma chemical Co.U.S.A)

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se almacena a Temperatura Ambiente hasta su uso.

TBE 1X

Tomar 50 mililitros de TBE 10X y diluirlo en 450mililitros de agua destilada.

TBE 0.5X

Tomar 250mililitros de TBE 1X y diluirlo en 250mililitros de agua destilada.