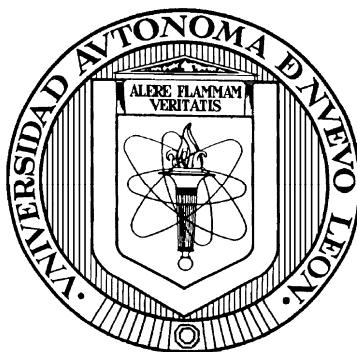


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y CITOTÓXICO
IN VITRO DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1, EL COMPUESTO
HS01 DE LA PLANTA *Hibiscus sabdariffa* Y LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-
IL-18.**

Por

EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA

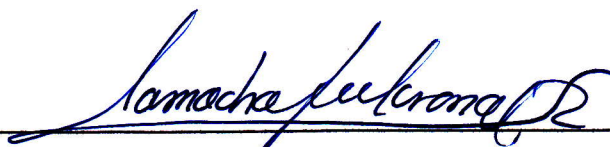
**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Agosto, 2011

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevo a cabo en los laboratorios de Ingeniería Genética y Genómica de la Facultad de Ciencias Químicas de nuestra Universidad Autónoma de Nuevo León, y en la División de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y CITOTÓXICO
IN VITRO DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1, EL COMPUESTO
HS01 DE LA PLANTA *Hibiscus sabdariffa* Y LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-
IL-18”**

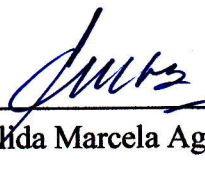
Revisado por Comité de Tesis



Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona



Dra. Elizabeth Orozco Beltrán

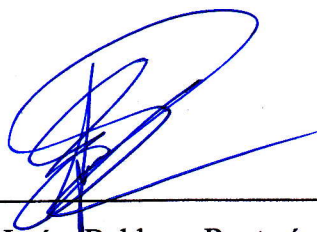


Dra. Edda Marcela Aguilar Bravo

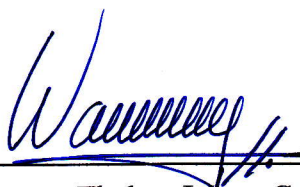
Agosto, 2011

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y CITOTÓXICO
IN VITRO DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1, EL COMPUESTO
HS01 DE LA PLANTA *Hibiscus sabdariffa* Y LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-
IL-18”**

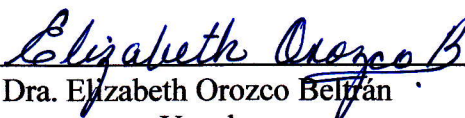
Aprobado por Comité de Tesis



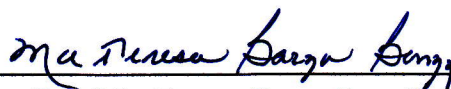
Dr. Isaías Balderas Rentería
Presidente



Dra. Susana Thelma López Cortina
Secretario



Dra. Elizabeth Orozco Beltrán
Vocal



Dra. Ma. Teresa Garza González
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Agosto, 2011

RESUMEN

QFB. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

Fecha de Graduación: Agosto 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y CITOTÓXICO *IN VITRO* DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1, EL COMPUESTO HS01 DE LA PLANTA *Hibiscus sabdariffa* Y LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-IL-18.

Número de páginas: 149

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El cáncer representa un problemática mundial. Tan solo en 2007 la organización mundial de la salud reportó 7.9 millones de defunciones, siendo la principal causa de muerte a nivel global. Los tratamientos contra el cáncer suelen ser invasivos, dolorosos y presentan múltiples efectos adversos, además de no ser siempre efectivos, lo que ha llevado a buscar nuevas terapias, fármacos y procedimientos que puedan ayudar al tratamiento contra esta enfermedad. En este proyecto estudiamos nuevos compuestos con posible actividad anticancerígena, uno de ellos es la porfirina no simétrica A3B NS1 un agente fotosensibilizador. También se analizó un compuesto obtenido a partir de extractos de la planta *Hibiscus sabdariffa* aún no caracterizado al cual se le asignó arbitrariamente la clave Hs01. Finalmente, se llevó a cabo la creación de una proteína quimérica mediante la fusión de dos proteínas, la IL-18 humana y la proteína E2 del virus del papiloma humano. Se evaluó el efecto citotóxico y anticancerígeno de los compuestos *in vitro* sobre células Chang y Hela, utilizamos la vincristina un fármaco antineoplásico como referencia. También se realizó la determinación del índice apoptótico del compuesto que presentó una mayor citotoxicidad en este caso la porfirina no simétrica A3B NS1 por medio de la técnica de T.U.N.E.L.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró la creación de la proteína quimérica (E2-IL-18) así como la determinación del efecto citotóxico y anticancerígeno de los compuestos. El compuesto Hs01 no presentó un importante efecto anticancerígeno comparado contra la vincristina. La proteína quimérica E2-IL-18 presentó un efecto citotóxico considerable sobre las líneas celulares estudiadas. Por otra parte la porfirina no simétrica A3B NS1 presentó un efecto anticancerígeno importante similar a los mostrados en otros estudios con diferentes porfirinas, también se observó la presencia de apoptosis inducida por el tratamiento con la porfirina en células Hela lo cual concuerda con estudios que indican que el tratamiento con porfirinas induce apoptosis y por consiguiente muerte celular. En este trabajo, hemos aportado hallazgos importantes en la búsqueda de nuevas terapias, fármacos y procedimientos que puedan ayudar al tratamiento contra cáncer.

FIRMA DEL ASESOR:


Dr. Isaías Balderas Rentería

DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS ABUELOS

A MÓNICA LOERA

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y la presente investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de la maestría.

Al Dr. Isaías Balderas Rentería mi asesor de tesis por su apoyo y confianza durante todo este tiempo y además por darme la oportunidad de trabajar a su lado así como compartir sus conocimientos conmigo.

A la Dra. Susana Thelma López Cortina mi asesora de tesis por su apoyo en la realización de la presente investigación.

A la Dra. Pilar Carranza y la QBP. María del Consuelo Coronado Martínez por su apoyo para la realización de gran parte de esta investigación así como sus enseñanzas.

A mi comité tutorial: Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona, Dra. Elizabeth Orozco Beltrán y Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros del INGGEN: Raúl Favela, Ivette Aldama, Olivia Flores, Héctor Ramírez, Raúl Reyna, José Ángel Merino y Sonia Lozano, gracias por su amistad, ayuda, consejos y por todos los momentos que vivimos en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales: Juan Manuel Favela, Nallely Sandoval y a la maestra Patricia Esquivel.

A mis compañeros de generación de la Maestría en Ciencias.

¡MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL CÁNCER.....	1
1.1.1 El cáncer una problemática mundial.....	1
1.1.2 Generalidades del cáncer.....	2
1.2 LA GENÉTICA DEL CÁNCER.....	5
1.2.1 Activación de oncogenes.....	6
1.2.2 Inactivación genes supresores de tumores.....	7
1.2.3 Acumulación de mutaciones.	10
1.2.4 Predisposición hereditaria.....	11
1.2.5 Inestabilidad genética.....	13
1.2.6 Desregulación de los microARN's.....	16
1.2.7 Cambios epigenéticos.....	20
1.3 PRINCIPALES CAUSAS DEL CÁNCER.....	24
1.3.1 Factores químicos.....	24
1.3.2 Factores físicos.....	28
1.3.3 Factores biológicos.....	31
1.3.4 Envejecimiento.....	33
1.4 MECANISMOS DE EVASIÓN Y DISEMINACIÓN DE LAS CÉLULAS CANCERÍGENAS.....	35
1.4.1 Resistencia a los fármacos.....	35
1.4.2 Evasión de la apoptosis.....	35
1.4.3 Telómeros y telomerasa.....	37
1.4.4 Metástasis.....	38
1.4.5 Angiogénesis tumoral.....	38
1.5. TERAPIA ANTICANCERÍGENA.....	40
1.5.1 Quimioterapia.....	41
1.5.2 Radioterapia.....	45
1.5.3 Cirugía.....	46
1.5.4 Inmunología.....	47

1.5.5 Otras terapias.....	51
1.6. ANTECEDENTES.....	54
1.6.1 Terapia fotodinámica.....	54
1.6.2 Fitoterapia.....	61
1.6.3 Ingeniería de Proteínas, Proteínas recombinantes y quiméricas.....	66
1.7 JUSTIFICACION.....	68
1.8 HIPÓTEIS.....	69
1.9 OBJETIVOS.....	70
1.9.1 Objetivo general.....	70
1.9.2 Objetivos específicos.....	70
2. METODOLOGÍA.....	71
2.1 CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA (E2-IL-18).....	72
2.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	72
2.1.1.1 Extracción de ADN de células Hela para obtención del gen E2.....	72
2.1.1.2 Aislamiento de monocitos, inducción de monocitos y extracción de ARN y retrotranscripción para la obtención del gen IL-18 humana.....	73
2.1.2 DISEÑO DE PRIMERS PARA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS.....	75
2.1.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERES POR PCR.....	76
2.1.3.1 Amplificación del gen E2 por PCR.....	76
2.1.3.1 Amplificación del gen IL-18 por PCR.....	77
2.1.4 PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS PARA SU INSERCIÓN AL VECTOR.....	79
2.1.4.1 Digestión del producto amplificado del gen E2 con las enzimas de restricción Kpn I y Taq I.....	79
2.1.4.2 Digestión del producto amplificado del gen IL-18 con las enzimas de restricción Xba I y Taq I.....	80
2.1.5 PREPARACIÓN DEL VECTOR PLASMÍDICO pThioHis B.....	82
2.1.5.1 Preparación de bacterias calcio competentes <i>E. coli</i> TOP 10.....	82
2.1.5.2 Transformación bacteriana para propagación del vector.....	83
2.1.5.3 Propagación de las bacterias clonadas para obtención del vector.....	83

2.1.5.4 Extracción del vector de interés en las baterías clonadas.....	84
2.1.5.5 Digestión del vector pThioHis B con las enzimas de restricción Kpn I y XbaI.....	84
2.1.6 CLONACIÓN MOLECULAR.....	86
2.1.6.1 Reacción de ligación de los insertos y el vector.....	86
2.1.6.2 Transformación bacteriana por células calcio competentes con el vector recombinante.....	87
2.1.6.3 Caracterización de las clonas recombinantes.....	87
2.1.7 EXPRESIÓN PILOTO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA.....	87
2.1.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA EXPRESADA EN LAS CLONAS RECOMBINANTES.....	88
2.1.8.1 Cuantificación de las proteínas presentes en las muestras.....	88
2.1.8.2 Preparación de las muestras.....	88
2.1.8.3 Preparación y electroforesis del gel.....	89
2.1.8.4 Tinción del gel.....	89
2.1.9 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE FUSIONADA A LA TIOREDINA.....	90
2.1.9.1 Preparación de la muestra para cromatografía de afinidad.....	90
2.1.9.2 Cromatografía de afinidad.....	90
2.1.9.3 Elución de la proteína quimérica.....	91
2.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.....	91
2.2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA CON LA VINCRISTINA.....	91
2.2.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DEL COMPUESTO Hs01 DE LA PLANTA <i>Hibiscus sabdariffa</i>	93

2.2.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1.....	92
2.2.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2- IL-1.....	95
2.2.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO EN CÉLULAS HELA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LA PORFIRINA NO SIMETRICA A3B NS1 POR MEDIO DEL ENSAYO DE T.U.N.E.L.....	96
2.2.6 MANEJO DE LOS RESIDUOS.....	98
3. RESULTADOS.....	99
3.1 CLONACIÓN DE LA PROTEINA QUIMÉRICA (E2-IL-18).....	100
3.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	100
3.1.1.1 Aislamiento del ADN de células Hela para obtención del gen E2.....	100
3.1.1.2 Aislamiento de monocitos y extracción de ARN para obtención del gen IL-18.....	101
3.1.2 DISEÑO DE PRIMERS PARA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS.....	102
3.1.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERES POR PCR.....	104
3.3.1 Amplificación del gen E2 por PCR.....	104
3.3.2 Amplificación del gen IL-18 por PCR.....	105
3.1.4 PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS PARA SU INSERCIÓN AL VECTOR.....	106
3.4.1 Digestión del producto amplificado del gen E2 con las enzimas de restricción Kpn I y Taq I.....	106
3.4.2 Digestión del producto amplificado del gen IL-18 con las enzimas de restricción Xba I y Taq I.....	106
3.1.5 PREPARACIÓN DEL VECTOR PLASMÍDICO pThioHis B.....	107
3.1.5.1 Extracción del vector pThioHis B después de su propagación.....	107
3.1.5.2 Digestión del vector pThioHis B con las enzimas de restricción Kpn I y XbaI.....	108

3.1.6 CLONACIÓN MOLECULAR.....	109
3.1.6.1 Transformación bacteriana por células calcio competentes con el vector recombinante.....	109
3.1.6.2 Caracterización de las clonas recombinantes.....	109
3.1.7 EXPRESIÓN PILOTO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA.....	111
3.1.8 ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	111
3.1.9 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE FUSIONADA A LA TIOREDINA.....	112
3.2 RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA.....	113
3.2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA CON LA VINCRISTINA.....	113
3.2.2 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DEL COMPUESTO Hs01 DE LA PLANTA <i>H. sabdariffa</i>	115
3.2.3 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1.....	117
3.2.4 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2- IL-18.....	119
3.2.5 ÍNDICE APOPTÓTICO EN CÉLULAS HELA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LA PORFIRINA NO SIMETRICA A3B NS1 POR MEDIO DEL ENSAYO DE T.U.N.E.L.....	121
4. DISCUSIÓN.....	122
4.1 EL COMPUESTO HS01 DE LA PLANTA <i>H. sabdariffa</i>	122
4.2 LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1.....	123
4.3 LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-IL-18.....	126
5. CONCLUSIONES.....	127
6. PERSPECTIVAS.....	129

6.1 EL COMPUESTO HS01 DE LA PLANTA <i>H. sabdariffa</i>	129
6.2 LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1.....	130
6.3 LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-IL-18.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	132
APÉNDICE A. LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	140
APÉNDICE B. MATERIALES.....	142
APÉNDICE C. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.....	145

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro I. Genes supresores de tumores.....	8
Cuadro II. Principales cánceres hereditarios y los genes involucrados.....	12
Cuadro III. MiARNs sobreexpresados/reprimidos en varios tumores comparado con tejidos normales.....	19
Cuadro IV. Hipermetilación de genes supresores de tumores en varios tipos de cáncer.....	22
Cuadro V. Sustancias químicas que producen cáncer en humanos.....	25
Cuadro VI. Virus humanos asociados con el desarrollo de cáncer.....	32
Cuadro VII. Reguladores endógenos de la angiogénesis.....	40
Cuadro VIII. Principales efectos secundarios provocados por los fármacos antineoplásicos.....	44
Cuadro IX. Principales anticuerpos monoclonales usados en el tratamiento contra el cáncer.....	49
Cuadro X. Principales inmunoterapias aprobadas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.....	51
Cuadro XI. Reactivos utilizados para la amplificación del gen E2 por PCR.....	76
Cuadro XII. Temperaturas y tiempos utilizados en el programa ingresado al termociclador para la amplificación del gen E2.....	77
Cuadro XIII. Reactivos utilizados para la amplificación del gen IL-18 humana por PCR.....	78
Cuadro XIV. Temperaturas y tiempos utilizados en el programa ingresado al termociclador para la amplificación del gen IL-18 humana.....	78

Cuadro XV. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Kpn I del gen E2.....	80
Cuadro XVI. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Taq I del gen E2.....	80
Cuadro XVII. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Xba I del gen IL-18.....	81
Cuadro XVIII. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Taq I del gen IL-18.....	82
Cuadro XIX. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Kpn I del vector pThioHis B.....	85
Cuadro XX. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Xba I del vector pThioHis B.....	85
Cuadro XXI. Componentes de la reacción de ligación entre el plásmido pThioHis B y los genes E2 e IL-18.....	86
Cuadro XXII. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry de las muestras de la expresión piloto de la proteína.....	111
Cuadro XXIII. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry de las muestras de la purificación de la proteína recombinante quimérica...	112
Cuadro XXIV. Estandarización de la citotoxicidad con la vincristina en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	114
Cuadro XXV. Estandarización de la actividad anticancerígena con la vincristina en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	114
Cuadro XXVI. Determinación de la citotoxicidad del compuesto Hs01 de la planta <i>H. sabdariffa</i> en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	115

Cuadro XXVII. Determinación de la actividad anticancerígena del compuesto Hs01 de la planta <i>H. sabdariffa</i> en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	116
Cuadro XXVIII. Determinación de la citotoxicidad de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	117
Cuadro XXIX. Determinación de la actividad anticancerígena de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	118
Cuadro XXX. Determinación de la citotoxicidad de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	119
Cuadro XXXI. Determinación de la actividad anticancerígena de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Hela mediante el ensayo de WST-1....	120

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Alteraciones genéticas implicadas en el cáncer.....	5
2. Sitios donde la lisina puede ser acetilada o metilada. (*Indica el grado de metilación de la lisina mono, di o trimetilada).....	23
3. Ejemplos de compuestos químicos orgánicos que pueden causar cáncer en humanos.....	26
4. Estructuras generales de los agentes fotosensibilizadores de segunda generación.....	55
5. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica en el tumor.....	57
6. Porphirina no simétrica A3B NS1 (5,10,15-Tri(p-clorofenil)-20-(2-hidroxi,3-metoxifenil)-21H,23H-porfirina).....	60
7. Estructuras químicas de los principales polifenoles presentes en <i>H. sabdariffa</i>	63
8. Electroforesis de la extracción de ADN genómico de células Hela.....	100
9. Monocitos en suspensión después de su aislamiento.....	101
10. Electroforesis de la extracción de ARN de monocitos inducidos con LPS.....	101
11. Secuencia espaciadora entre los genes (final E2 y principio IL-18) que genera un polipéptido espaciador en la proteína quimérica así como la fusión de los genes.....	103
12. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del gen E2 (1100 pb) del VPH.....	104
13. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del gen IL-18 (490 pb) humana.....	105

14. Digestión de los genes E2 (KpnI y TaqI) e IL-18 (TaqI y XbaI) con sus respectivas enzimas de restricción y su posterior purificación.....	106
15. Representación grafica de la digestión de los genes E2 e IL-18.....	107
16. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN plasmídico.....	107
17. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pThioHis B digerido con las enzimas de restricción Kpn I y Xba I.....	108
18. Representación grafica de la digestión del plásmido pThioHis B.....	108
19. Esquema de clonación.....	109
20. Electroforesis de la extracción del vector pThioHisB-E2-IL-18 presente en las clonas positivas	110
21. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de la confirmación de la integración de los genes E2 y IL-18 en la clona recombinante. A) Amplificación de los genes E2 e IL-18 por separado. B) Amplificación de la integración de los genes E2 e IL-18.....	110
22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras tomadas en la expresión piloto de la proteína quimérica.....	111
23. Estandarización de la citotoxicidad con la vincristina en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	114
24. Estandarización de la actividad anticancerígena con la vincristina en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	114
25. Determinación de la citotoxicidad del compuesto Hs01 de la planta <i>H. sabdariffa</i> en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	115
26. Determinación de la actividad anticancerígena del compuesto Hs01 de la planta <i>H. sabdariffa</i> en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	116

27. Determinación de la citotoxicidad de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	117
28. Determinación de la actividad anticancerígena de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	118
29. Determinación de la citotoxicidad de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Chang mediante el ensayo de WST-1.....	119
30. Determinación de la actividad anticancerígena de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Hela mediante el ensayo de WST-1.....	120
31. Determinación del índice apoptótico de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Hela por el ensayo de T.U.N.E.L.....	121
32. Fotografía del control en el ensayo de apoptosis.....	121
33. Fotografía del tratamiento con NS1 en el ensayo de apoptosis.....	121

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER

1.1.1 El Cáncer una Problemática Mundial.

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial con 7.6 millones de defunciones; que representan el 13% del total de muertes ocurridas en el año 2008.¹

Aproximadamente el 72% de las defunciones por cáncer ocurridas en 2008 se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030.¹

Por otro lado, en México se reportó en el 2008 que los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte con 67,047 casos (12.5%), inferior a los decesos de las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas.²

1.1.2 Generalidades del Cáncer.

El cáncer es un proceso patológico que tiene como principal alteración la proliferación continua e incontrolada de las células dañadas. La pérdida generalizada del control del crecimiento está dada por alteración de los sistemas reguladores de la célula, lo cual desencadena el proceso canceroso.³

Existen muchos y diferentes tipos de cáncer, dado por la proliferación anormal en los distintos tipos de células del cuerpo, pero conviene distinguir entre tumores benignos y malignos. Un tumor benigno es aquel que no invade el tejido sano adyacente y el cuál es confinado en un solo sitio. Un tumor maligno tiene la capacidad de invadir tejido sano y de propagarse por el cuerpo por un proceso llamado metástasis, solo a éstos se les denomina cáncer y son los más peligrosos que generan muchas muertes a nivel mundial. Todos los cánceres se clasifican de acuerdo al tipo de célula de la cual que proceden y conforme a esto, existen cuatro tipos principales: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. Los carcinomas son tumores que comienzan en los tejidos que recubren los órganos del cuerpo e incluyen aproximadamente el 90% de los cánceres humanos. Los sarcomas son tumores que se originan en los huesos, músculos, cartílagos, tejido fibroso o adiposo (graso). Las leucemias son cánceres de la sangre o de los órganos generadores de la sangre. Los linfomas afectan el sistema linfático, tanto los vasos como a los ganglios linfáticos.³

A nivel celular, el desarrollo del cáncer se considera un proceso de múltiples etapas constituido por la mutación y la selección de aquellas células con capacidad cada vez mayor de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis. El primer paso es la

iniciación del tumor, este se debe a una alteración genética que provoca la proliferación anormal de una célula. La proliferación celular da lugar a una población monoclonal de células tumorales. La progresión del tumor es la siguiente etapa en el desarrollo tumoral, ésta se debe a mutaciones adicionales en las células neoplásicas. Estas mutaciones le pueden conferir una ventaja selectiva a la célula. En la etapa final del desarrollo del cáncer las células tumorales logran separarse del tumor e ingresar a la circulación linfática y sanguínea y se extienden a sitios distantes del cuerpo, donde se establecen tumores secundarios fatales ya que no son susceptibles a extirpación quirúrgica, dando lugar a la metástasis.^{3,4}

Las células cancerosas presentan alteraciones en los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular normal. Las principales características de las células cancerosas respecto de las células normales son las siguientes:

- Inhibición dependiente de la densidad. Las células normales proliferan en cultivo hasta alcanzar una densidad celular determinada y a partir de ahí permanecen en reposo. Las células tumorales siguen proliferando independientemente de la densidad celular alcanzada.
- Cambios en el citoesqueleto. La distribución y la actividad de los microfilamentos y microtúbulos suelen cambiar en algunos tipos de cáncer. Cambios en el citoesqueleto pueden modificar la adhesión celular y el movimiento.
- Adhesión y movimiento celular. La reducción de la adhesión entre dos células y entre célula y matriz extracelular permite la formación de grandes masas de

células. Las células cancerosas no muestran inhibición por contacto, y así pueden continuar creciendo aún cuando están rodeadas por otras células. Estas alteraciones en la adhesión celular también tiene efecto en la habilidad de las células para moverse. Las células cancerosas tienen la habilidad de poder moverse y migrar para así poder propagarse.

- Producción de enzimas. Las células cancerosas frecuentemente secretan enzimas que les permite invadir los tejidos vecinos, como la colagenasa.
- Estimulación autocrina del crecimiento. Las células cancerosas producen factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación.
- Angiogénesis. Las células cancerosas tienen la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos por medio de la secreción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento del endotelio vascular. Los nuevos vasos son indispensables para la nutrición de las células tumorales y de la metástasis.
- Diferenciación defectuosa. Se asocia a una proliferación anormal, en la que no se completa el programa de diferenciación natural y las células cancerosas se bloquean en un estado temprano de diferenciación manteniendo una tasa de proliferación activa continua.
- Evasión de la apoptosis. Muchas células cancerosas no sufren apoptosis, por lo que tienen ciclos vitales más largos en comparación con las células normales.^{3,5}

1.2 LA GENÉTICA DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad genética que surge de la acumulación de alteraciones estructurales o funcionales en el ácido desoxirribonucleico (ADN) celular. El desarrollo del cáncer es un proceso multifactorial en el cual las células se transforman progresivamente en “malignas” a través de la acumulación de alteraciones (véase figura 1).

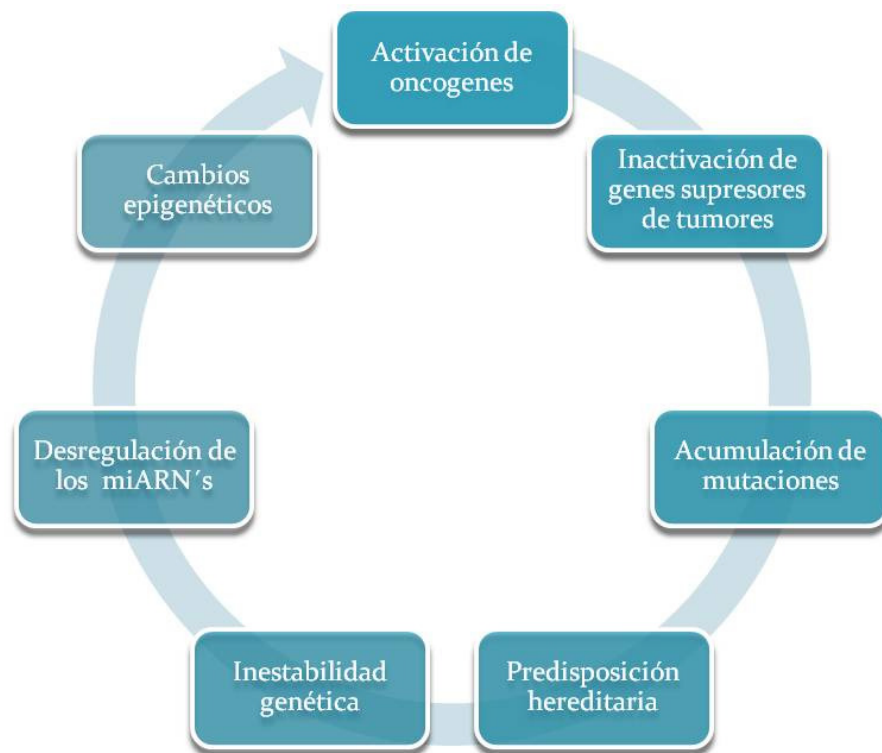


Figura 1. Alteraciones genéticas implicadas en el cáncer.^{6, 8, 11}

1.2.1 Activación de oncogenes.

Los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y desencadenan la conversión de una célula a un estado maligno. Los oncogenes provienen de protooncogenes, estos son genes que controlan los procesos de proliferación y diferenciación en células normales.⁶

Existen diferentes mecanismos por los cuales un protooncogen se transforma en un oncogén. Los protooncogenes pueden ser activados por los siguientes mecanismos moleculares:

- Mutaciones puntuales. Estas mutaciones suponen el cambio de un aminoácido por otro en posiciones críticas de la proteína, generando una alteración estructural importante, de modo que su actividad biológica puede variar o anularse.
- Deleciones. Las deleciones parciales de secuencias de ADN del protooncogen generan proteínas incompletas con actividad alterada o nula.
- Translocaciones. La translocación produce un protooncogen truncado que a veces no afecta a su parte codificante, de modo que la proteína es la misma, pero puede modificar su expresión, mientras que en otros casos la translocación provoca la aparición de una nueva proteína.
- Amplificación. La amplificación génica consiste en la repetición del número de copias del protooncogen, aumentando la concentración de la proteína codificada.
- Sobreexpresión. El aumento en los niveles de transcripción se traduce en una sobreexpresión de la proteína codificada por ese protooncogen.⁷

Los productos oncogénicos pueden ser clasificados en:

- Factores de transcripción. Estos pueden activar o reprimir genes implicados en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis.
- Re-modeladores de la cromatina. Las modificaciones en el grado de compactación de la cromatina desempeñan un papel fundamental en el control de la expresión génica, la replicación y reparación del ADN y la segregación de los cromosomas.
- Factores de crecimiento. La activación constitutiva de un factor de crecimiento puede contribuir a la transformación maligna.
- Receptores de factores de crecimiento. Estos se encuentran alterados en algunos tipos de cáncer. Por lo general la alteración de éstos provoca que el receptor este activo constitutivamente.
- Transductores de la señal. Muchos oncogenes codifican miembros de las vías de transducción de señales. Por lo general la alteración de éstos provoca que la vía se encuentre activa constitutivamente.
- Reguladores de apoptosis. Miembros de la familia BCL2, BCL-XL y BCL2 inhiben la apoptosis y se encuentran sobreexpresados en vario tipos de cáncer.⁷

1.2.2 Inactivación de genes supresores de tumores.

Los genes supresores de tumores representan un mecanismo opuesto de control del crecimiento celular, normalmente inhibiendo la proliferación celular y el desarrollo del tumor. En muchos tumores, estos genes están ausentes o inactivados, por lo cual no pueden llevar a cabo su función, lo que contribuye a la proliferación anormal de las

células tumorales. Los estudios moleculares han identificado hasta la fecha más de 17 genes supresores de tumores implicados directamente en el cáncer humano (véase cuadro I). Ellos codifican para una serie de proteínas localizadas en distintas regiones dentro de la célula, tanto en el citoplasma como en el núcleo.^{8,9}

Cuadro I. Algunos genes supresores de tumores.⁸

Gen	Función	Tipo de cáncer
p53	Factor de transcripción, puede detener la división celular e inducir apoptosis.	Presente en más del 50% de todos los cánceres.
RB	Co-represor transcripcional, control del ciclo celular.	En la mayoría de los cánceres.
INK4a (p16)	Inhibidor de Cdk.	En la mayoría de los cánceres.
ARF	Antagonista de MDM2.	En la mayoría de los cánceres.
APC	Proteína de señalización.	Cáncer colorectal.
PTCH	Receptor de la vía de señalización Hedgehod.	Rabdomiosarcoma, meduloblastoma y carcinoma de células basales.
DPC4	Factor de transcripción.	Cáncer pancreático y de colon.
NF1	Proteína activadora GTPasa de Ras.	Sarcomas y gliomas.
ATM	Sensor de daño al ADN.	Cáncer linfoproliferativo.
BRCA1 y BRCA2	Reparación de ADN.	Cáncer de mama y ovario.

El gen supresor de tumores p53 es uno de los ejemplos más importantes de este grupo de genes, considerado por varios autores como el guardián del genoma. El producto de este gen se activa cuando la célula va a dividirse, para vigilar el correcto funcionamiento de los acontecimientos que conducen a la división celular. Si el material genético de la célula se daña o si algún sistema de control se desregula, la proteína p53 lo detecta e intenta corregirlo. Si la lesión no es grave, la proteína p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. Si la proteína p53 estima que el daño es irreparable entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis. Si este gen sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte programada, tampoco se encarga de reparar los daños en el ADN y da lugar al inicio del proceso tumoral.^{8, 10}

Otro ejemplo de este grupo de genes es el gen supresor de tumores RB, el producto de este gen interviene durante la primera parte de la fase G1 del ciclo celular, durante este periodo el producto de este gen se une al factor de transcripción E2F. Este complejo tiene dos funciones en; primer lugar, muchos de los genes cuyos productos son esenciales para la fase S de dicho ciclo dependen de la actividad del factor E2F, por tanto el RB, mediante el secuestro de este factor de la transcripción garantiza que la fase S no pueda ser iniciada, en segundo lugar, el complejo E2F-RB reprime la transcripción de otros genes. En el punto de restricción de la fase G1 del ciclo celular o cerca del mismo, el RB es fosforilado por el complejo quinasa/ dependiente de ciclinas y esta fosforilación causa la liberación del factor E2F por el RB, el cual entonces activa los genes cuyas funciones son requeridas para la fase S. El retinoblastoma (tumor en la retina) es causado por la pérdida de ambas copias del gen RB en la banda q14 del

cromosoma 13. En la forma hereditaria un cromosoma tiene una deleción en esta región y la segunda copia es perdida por deleción somática en el individuo. En la forma esporádica, ambas copias se pierden por eventos somáticos individuales.⁹

1.2.3 Acumulación de mutaciones.

La acumulación de mutaciones es otra alteración genética que tiene lugar en las células neoplásicas. La alteración en un solo gen suele no ser suficiente para dar lugar al cáncer. Para la progresión hacia la malignidad y la invasión son necesarias más mutaciones. Por lo tanto, el riesgo de desarrollar cáncer depende no solo de las mutaciones que inician la tumorigénesis, sino también de las mutaciones posteriores que conducen a la progresión del tumor.¹¹

El análisis genético de las células neoplásicas ha demostrado que el cáncer es un proceso que implica la acumulación de sucesivas mutaciones en uno o varios genes de distintos tipos (oncogenes, genes supresores, genes de susceptibilidad, genes de los sistemas de reparación del ADN, entre otros) y la subsiguiente selección clonal de las células portadoras de las mutaciones, esto conduce a que estas células alteren su comportamiento incrementando su capacidad de proliferación y de invasión.¹²

El proceso comienza con una mutación individual en una sola célula del organismo, esta mutación inicial contribuye a incrementar la tasa de crecimiento de la célula portadora con respecto a las vecinas, favoreciendo la aparición y selección de un nuevo clon de células con una más elevada tasa de división, como consecuencia de su mayor velocidad de división, la tasa de mutación de las células portadoras de la mutación comienza a ser mayor a la de la células normales, provocando así la aparición y

acumulación de una serie de nuevas mutaciones en su descendencia. La mayoría de estos cambios normalmente provocan la muerte de la célula, sin embargo, estocásticamente alguna de las mutaciones son capaces de mantener la viabilidad celular y conferir a la célula una mayor velocidad proliferativa, por lo que sus descendientes terminan siendo mayoritarias en el tumor. Este proceso puede repetirse numerosas veces, obteniendo en cada paso clones celulares con mayor capacidad de división e invasión, a este proceso se le denomina selección clonal.¹²

1.2.4 Predisposición hereditaria.

Se denomina cáncer hereditario al que se desarrolla en pacientes portadores de mutaciones específicas presentes en sus células germinales y en consecuencia en todas las restantes células somáticas (véase cuadro II). La proporción directa de cánceres hereditarios en la población es pequeña. En general se estima que alrededor de 1% de todos los cánceres son verdaderamente hereditarios.¹³ Aunque este riesgo es variable según el tipo de cáncer, por ejemplo está presente en el 5 % del cáncer de ovario, del 5 al 10 % en el cáncer de mama, el 25 % para el carcinoma medular de tiroides y del 40 a 50% para el retinoblastoma.¹⁴

Cuadro II. Principales cánceres hereditarios y los genes involucrados.¹³

Tipo de cáncer	Gen
Cáncer de mama y ovario	BRCA1, BRCA2
Cáncer colorectal	MADH4
Cáncer pancreático	DPC4
Retinoblastoma	RB1
Melanoma	CDKN2A
Leucemia	ATM
Leucemia, linfoma	BLM
Cáncer hepático	HPA
Glioma	NF1

Predisposición al cáncer hereditario por lo general se produce debido a alteraciones en la línea germinal de genes supresores de tumores u oncogenes. Los cánceres hereditarios son generalmente genéticamente dominantes a nivel familiar pero recesivos a nivel celular. Un alelo mutado se trasmite de uno de los padres, por lo tanto, la predisposición se hereda como un rasgo dominante. Sin embargo el desarrollo del tumor requiere de los dos alelos mutados. Entonces el siguiente paso para el desarrollo del tumor es una mutación somática en el alelo normal, dando lugar a la pérdida de la función del gen y la replicación incontrolada, dando lugar a la formación del cáncer.¹⁴

Un ejemplo de predisposición hereditaria al cáncer, lo constituyen los genes supresores de tumores BRCA1y BRCA2, que se estima que están presentes en el 2% de todos los cánceres de mama. El riesgo de por vida de contraer cáncer de mama en los

portadores de estos genes mutados es de hasta un 80%, y de cáncer de ovario de hasta 60% para el gen BRCA1 y un 40% para el gen BRCA2.^{14, 15}

1.2.5 Inestabilidad genética.

La adquisición de inestabilidad genética es un paso crucial en el desarrollo del cáncer, pues se cree que es un punto crítico es este proceso multi-etapa del cáncer ya que favorece la acumulación de mutaciones características del estado canceroso. La hipótesis del fenotipo mutador plantea que la inestabilidad genética surge a principios de la tumorigénesis e incrementa la subsecuente aparición de mutaciones y lesiones genéticas. Las mutaciones en los genes de estabilidad genética (fidelidad de la replicación, reparación del ADN, segregación cromosómica, vigilancia de daños y genes de respuestas celulares como apoptosis) puede tener diversas manifestaciones, tales como mutaciones puntuales, inestabilidad de microsatélites y la pérdida de la heterocigosidad. La inestabilidad genética se puede clasificar en dos grandes grupos, la inestabilidad a nivel cromosómico y a nivel nucleotídico.¹⁶

La inestabilidad cromosómica define la existencia de una tasa acelerada de alteraciones cromosómicas, que dan lugar a:

- La ganancia o pérdida de cromosomas completos (aneuploidía). Más de 100 genes que conducen a la inestabilidad cromosómica se han identificado en levaduras, incluidos los que afectan los microtúbulos, cinetocoros, la condensación de cromosomas, la cohesión de cromátidas hermanas, y sitios de control de la mitosis, alteraciones en estos genes conducen a la aneuploidía. Estos cambios se encuentran en casi todos los tumores. Un ejemplo es la pérdida

del cromosoma 10 en los glioblastomas y la pérdida del cromosoma 7 en los carcinomas papilares renales.

- **Translocaciones cromosómicas.** Dos patrones de translocaciones se han observado en los cánceres humanos. El primer patrón de tipo complejo es observado en muchos tumores, éste puede dar lugar a ganancia o pérdida de material cromosómico, así como la generación de productos génicos nuevos, y es probable que sea un componente importante en muchos tumores. El segundo patrón de tipo simple, es caracterizado por reordenamientos distintivos de segmentos cromosómicos. Los análisis moleculares han determinado los puntos de interrupción en muchas translocaciones y han demostrado que en general estos eventos ocurren dentro de los mismos segmentos en una pequeña porción de ADN. Los reordenamientos en general, conducen a la activación de un oncogén a través de su colocación con un fuerte promotor o su fusión con otro gen.
- **Duplicaciones cromosómicas.** La amplificación génica es un proceso importante en los cánceres humanos, ya que está claramente asociada con la progresión del tumor. La amplificación de oncogenes se produce en la etapa tardía de los cánceres, y la amplificación de los genes implicados en el metabolismo o en la inactivación de las drogas antineoplásicas es común en muchos cánceres y desencadenan la resistencia a los agentes quimioterapéuticos.
- **Deleciones cromosómicas.** La pérdida de un cromosoma puede poner de manifiesto genes recesivos, además de causar un desequilibrio cromosómico.¹⁷.

El otro gran grupo de inestabilidad genética es la inestabilidad a nivel nucleotídico, estas afectan a una solo base o a algunas pocas bases en el ADN. La inestabilidad a este nivel se produce por los defectos en la reparación del ADN y los defectos en la replicación del ADN. La primera línea de defensa contra la inestabilidad genética es la notable fidelidad de las ADN polimerasas y los complejos multienzimáticos que replican el ADN. Ya que mutaciones en los sitios de la polimerización producen cambios en esa fidelidad de la replicación, así como mutaciones en los sitios de revisión de la correcta replicación, tiene implicación en la inestabilidad genética y por consiguiente en el proceso canceroso.¹⁹

Los defectos en la reparación del ADN, otra forma de inestabilidad genética, se pueden clasificar en reparación por escisión de un solo nucleótido y en reparación en mismatch. La reparación por escisión de un solo nucleótido es responsable de reparar los daños causados por muchos mutágenos. Las personas que nacen con defectos en los genes de reparación de un solo nucleótido desarrollan un síndrome conocido como Xeroderma pigmentosa, estas personas tienen una alta susceptibilidad a desarrollar cáncer en las zonas que están expuestas al sol. La reparación de ADN en mismatch tiene un papel central en el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante la reparación de los errores de la replicación del ADN y la inhibición de recombinación entre secuencias homólogas. Defectos en este sistema de reparación resulta en la inestabilidad de los microsatélites (presentes en el 85% de los pacientes de cáncer colorectal hereditario no asociado a pólipos), que se caracteriza por la expansión o contracción del número de repeticiones en tándem, debido al deslizamiento de la polimerasa sobre los microsatélites, estos se producen en todo el genoma. La deficiencia en el sistema de

reparación en mismatch dan lugar a cánceres colorectales, del endometrio y gástricos. También aumentan la probabilidad de mutaciones en los genes que contienen secuencias repetitivas que regulan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis.^{17, 18}

1.2.6 Desregulación de los microARN's.

Los microARNs son ARNs regulatorios no codificantes con un tamaño de 17-25 nucleótidos, estos regulan negativamente al ARNm diana ya sea inhibiendo su traducción o mediando su degradación.²⁰

Los miARNs juegan un papel importante en el control de numerosos procesos biológicos, tales como el desarrollo, la diferenciación, proliferación y apoptosis. La expresión desregulada de los miARNs ha sido descrita en una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer. Existe evidencia que los miARNs están expresados de forma aberrante en el desarrollo del cáncer, la invasión y la metástasis.²¹ Los miARNs pueden actuar como oncogenes ó como supresor de tumores, la represión de la expresión de miARNs con actividad supresora de tumor puede aumentar la traducción de oncogenes y por lo tanto la formación en exceso de proteínas oncogénicas dando lugar a la formación de tumores. Por otro lado la sobreexpresión de miARNs oncogénicos puede bloquear genes supresores de tumor y también llevar a la formación de tumores.²²

La biogénesis de los miARNs comienza con la síntesis de un transcrito largo llamado pri-miARN. Generalmente el pri-miARN es transcrito por la ARN polimerasa II y este mantiene las características del ARNm como lo es el capuchón en 5' y la cola poli A en 3'. En el núcleo el pri-miARN es procesado a pre-miARN(70-90 nucleótidos) por la ARNsa III (Drosha) y DGCR8. El pre-miARN es exportado al citoplasma por la

exportina 5 y es convertido a miARN dúplex maduro por otra ARNsa III (Dicer). Las dos cadenas del dúplex son separadas por la RNA helicasa en el momento específico de ensamblaje del miARN. Los eventos moleculares durante el ensamblaje aun no están del todo claros.^{22, 23}

La expresión aberrante de los miARNs puede surgir a través de diferentes mecanismos:

- Anormalidad genómica. La formación de tumores suele estar acompañada de aberraciones cromosómicas, tales como deleciones, amplificaciones, translocaciones, etc. Los niveles de miARNs se correlacionan con estos cambios.
- Factores epigenéticos. Los factores epigenéticos también pueden alterar la expresión de los miARNs. En muchos tipos de cáncer, la hipermetilación de las islas CpG en regiones promotoras resulta en silenciamiento hereditario de la transcripción de genes supresores de tumores.
- Regulación transcripcional. Los factores de transcripción pueden inducir la expresión de miARNs activando la transcripción de pri-miARNs. Muchos factores de transcripción de miARNs han sido descubiertos en algunos tipos de cáncer.
- Regulación en el procesamiento de los miARNs. El procesamiento del miARN y la estabilidad del mismo son los factores más importantes que determinan los niveles de expresión. En general los miARNs disminuyen en los cánceres con respecto a los tejidos normales.

Es sencillo implicar a los miARNs en el cáncer, si el blanco directo de un miARN es un oncogén o un gen supresor de tumores. Los miARNs regulan la expresión de su ARNm diana, de este modo si se sobreexpresa o se reprime la expresión del miARN, por consiguiente existirá mayor o menor cantidad del producto génico del ARNm diana.²⁰

Si los perfiles de expresión global son comparados entre los cánceres y los tejidos normales, muchos miARNs y ARN's mensajeros se encuentran desregulados. Por consiguiente es muy probable que la carcinogénesis o la progresión de un cáncer sea el resultado de los cambios en todo el miARNoma y no de un cambio en un solo miARN que regula a un oncogén o gen supresor de tumor diana.^{21, 23} Algunos miARNs desregulados aparecen en los cánceres con mayor frecuencia que otros miARNs (véase cuadro III).

Cuadro III. MiARNs sobreexpresados/reprimidos en varios tumores comparado con tejidos normales.²⁰

miARN	Sobreexpresado/reprimido	Tipo de cáncer
<i>let-7</i>	Sobreexpresado	Cáncer de colon
	Reprimido	Cáncer de próstata
	Sobreexpresado	Cáncer pancreático
	Sobreexpresado	Hepatocarcinoma celular
	Reprimido	Cáncer de pulmón
miR-9	Reprimido	Cáncer de mama
	Sobreexpresado	Neuroblastoma
miR-21	Sobreexpresado	Cáncer de mama
	Sobreexpresado	Cáncer cervical
	Sobreexpresado	Cáncer colorectal
	Sobreexpresado	Cáncer de pulmón
	Reprimido	Adenomas en pituitaria
	Sobreexpresado	Tumor pancreático
miR-34s	Reprimido	Cáncer de pulmón
	Reprimido	Neuroblastoma
miR-100	Sobreexpresado	Tumor pancreático
miR-122	Reprimido	Hepatocarcinoma celular
miR-205	Sobreexpresado	Cáncer de pulmón

1.2.7 Cambios epigenéticos.

La epigenética se refiere a los cambios heredables reversibles en la función de los genes que ocurren sin modificaciones en la secuencia de ADN. Los principales tipos de información epigenética son: la metilación de la citosina del ADN por medio de la ADN-metiltransferasa y la modificación de histonas. Las modificaciones químicas del ADN y sus proteínas asociadas determinan la expresión selectiva de genes. Las modificaciones epigenéticas del genoma regulan muchos procesos celulares. La alteración de las modificaciones epigenéticas o la pérdida de su control, pueden causar enfermedades como el cáncer y contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por lo anterior, se ha propuesto que la identificación de los patrones epigenéticos heredables tales como la metilación del ADN y la acetilación de histonas sería una herramienta útil en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades causadas por errores epigenéticos.^{24, 25}

La hipometilación del ADN fue la primera anomalía epigenética reconocida en tumores humanos. La pérdida de la metilación se debe principalmente a hipometilación de secuencias repetitivas del ADN y desmetilación de regiones codificantes e intrones lo que provoca versiones alternativas del ARNm transcrito. Durante el desarrollo de un tumor, el grado de hipometilación del ADN genómico se incrementa como progresa la lesión, desde una proliferación benigna de células hasta un cáncer invasivo. Tres mecanismos han sido propuestos para explicar la contribución de la hipometilación del ADN en el desarrollo de una célula de cáncer: generación de inestabilidad cromosómica, reactivación de elementos transposicionables, y pérdida de impresión. Baja metilación

de ADN puede favorecer recombinación mitótica, llevando a deleciones y translocaciones, y también puede promover redistribución cromosómica.^{24, 26}

La hipometilación en regiones codificantes, puede fomentar la formación y progresión de los tumores de diversas formas. Algunos de los genes reguladores que se encuentran hipometilados muestran aumento en la transcripción, la hipometilación y la sobreexpresión, estos genes reguladores hipometilados están implicados en la carcinogénesis. La hipometilación de secuencias repetitivas de ADN en tándem puede promover la formación o progresión del tumor, por fomentar el reordenamiento del ADN.²⁶

La hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras de genes supresores de tumor es otra anormalidad epigenética, este cambio epigenético puede afectar genes involucrados con el ciclo celular, reparación de ADN, el metabolismo de la carcinogénesis, interacción célula- célula, apoptosis, y angiogénesis, los cuales están involucrados en el desarrollo del cáncer. Los perfiles de la hipermetilación de las islas CpG en genes supresores de tumores son específicos de el tipo de cáncer (1,4) (véase cuadro IV).^{24, 27}

Cuadro IV. Hipermetilación de genes supresores de tumores en varios tipos de cáncer.²⁴

Tipo de cáncer	Genes
Cáncer de colon	hMLH1, p16INK4a, p14ARF, RARB2, SFRP1.
Cáncer de mama	<i>BRCA1</i> , E-cadherina, <i>TMS1</i> y receptor de estrógenos
Glioma	Enzimas de reparación del DNA; MGMT, EMP3 y THBS1
Cáncer de hígado	SOCS1 and GSTP1
Cáncer de ovario	BRCA1
Cáncer de próstata	GSTP1

La modificación de histonas es otro mecanismo epigenético que se ve afectado en algunos tipos de cáncer. Las histonas son proteínas que conforman el núcleo del nucleosoma, se componen de un dominio globular C-terminal y una cola no estructurada N-terminal. Las colas N-terminal de las histonas pueden someterse a una variedad de modificaciones post-traduccionales covalentes como la metilación, acetilación, ubiquitinación y la fosforilación en residuos específicos. Estas modificaciones regulan procesos celulares como la transcripción, replicación y reparación del ADN. La mayoría de estas modificaciones tienen lugar en lisinas, argininas y serinas en las colas de las histonas.²⁸

La acetilación de las lisinas está asociada con la expresión de genes activos y la cromatina relajada. La enzima acetiltransferasa de histonas utiliza la acetilcoenzima para adicionar grupos acetilo a lisinas en las colas de las histonas. Acetilación de la histona se produce en los residuos de lisina en las histonas H2B, H3 y H4 (véase figura 2). Una vez

1.3 PRINCIPALES CAUSAS DEL CANCER

La transformación de una célula normal en una célula tumoral es un proceso que abarca varias fases y suele consistir en una progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Esas modificaciones son resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y los siguientes factores: físicos, químicos o biológicos.¹ Las sustancias que causan cáncer se denominan carcinógenos, estos se han identificado mediante estudios en experimentos *in vivo* e *in vitro*, además de análisis epidemiológicos de la frecuencia del cáncer en la población humana.³

1.3.1 Factores químicos.

Muchos cánceres humanos están asociados a la exposición a carcinógenos químicos (véase cuadro V). Generalmente hay un periodo largo de tiempo entre los primeros eventos que incluyen la exposición inicial a los carcinógenos, la aparición de daños en el ADN y la fijación de las mutaciones y la posterior aparición del tumor. El daño sobre el ADN es un importante paso en este proceso cancerígeno. Los carcinógenos químicos pueden ocasionar los siguientes daños al ADN; la formación de aductos con el ácido nucleico, rearrreglos cromosómicos, deleciones y roturas en la cadena del ADN.³⁰

Cuadro V. Algunas sustancias químicas que producen cáncer en humanos.^{30, 31}

Carcinógeno químico	Tumor
Humo del cigarro	Cáncer de pulmón y otros.
Benceno	Leucemias.
Aflatoxinas	Cáncer de hígado.
Bencidina	Cáncer de vejiga.
Asbesto	Mesotelioma pleural.
Pesticidas	Linfoma, cáncer de mama, cáncer de estomago, entre otros.
Alcohol	Cáncer esofágico, cáncer de hígado.

Entre los carcinógenos químicos se encuentran compuestos orgánicos e inorgánicos, fibras y partículas, y compuestos biológicos como las hormonas.³¹ La diversidad de productos químicos orgánicos que se ha demostrado que pueden causar cáncer es muy amplia (véase figura 3).

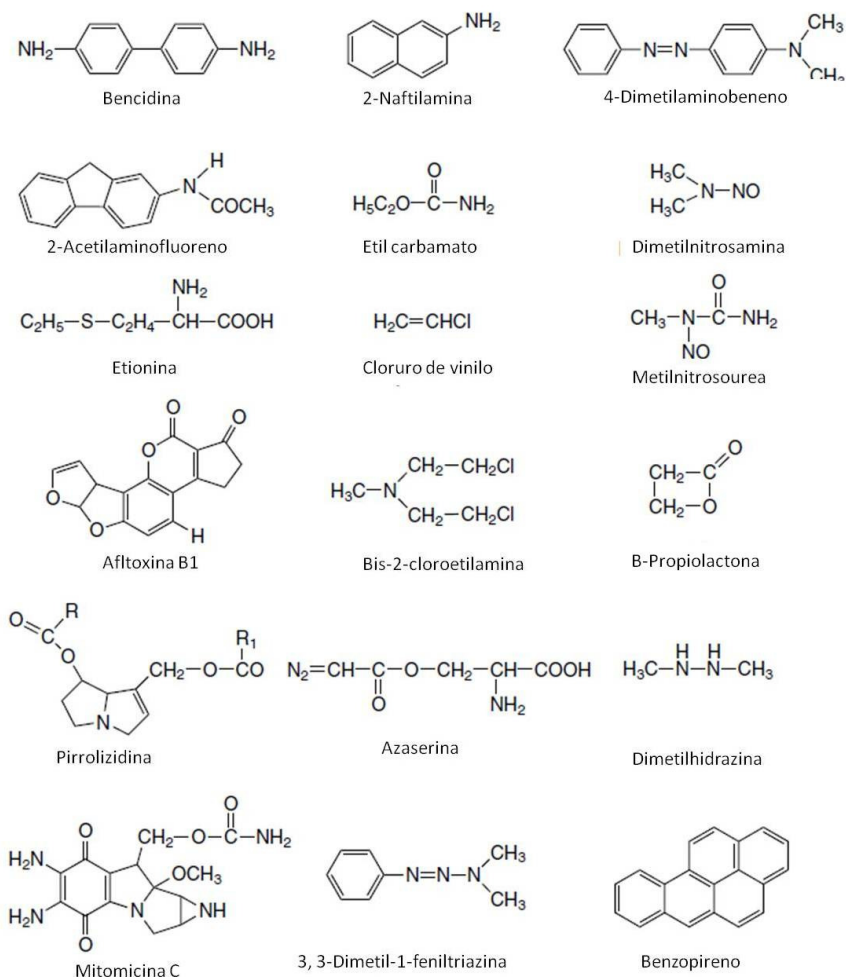


Figura 3. Algunos compuestos químicos orgánicos que pueden causar cáncer en humanos.³¹

Una de las primeras sustancias que se descubrió que podían causar cáncer fueron los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHA's por sus siglas en ingles). Estas sustancias químicas son los principales componentes de alquitranes de hulla y el hollín, la aplicación sobre la piel de roedores mostró que son poderosos cancerígenos. Muchos de los PHA's han sido identificados e incluyen al benzopireno, criseno, 1-nitropireno, dibenzoantraceno, entre otros. Los PHA's forman aductos con el ADN y de esta forma

producen cambios sobre la molécula de ADN, provocando aberraciones en el proceso de replicación y transcripción por lo cual se pueden producir mutaciones y de esta manera conducir a cáncer esofágico y cáncer del pulmón.^{30, 31} Estos compuestos se encuentran en el humo del cigarro, y estos entre otros compuestos (nitrosoaminas, aminas aromáticas, aldehídos, árenos y otros compuestos orgánicos) también presentes en el humo del cigarro son los responsables de producir cáncer en humanos. El tabaquismo es la principal causa de cáncer de pulmón, se estima que alrededor del 90% de defunciones masculinas y el 75 al 80% de defunciones femeninas, en los Estados Unidos son causadas por este hábito. A nivel mundial el tabaquismo provoca a más de un millón de defunciones cada año.³²

Otro ejemplo de sustancias químicas orgánicas que producen cáncer son las aflatoxinas estas son generadas por algunos hongos. Las aflatoxinas tienen efectos tóxicos inmediatos, actúan como inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. El principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinogénicos es el hígado. De hecho, la aflatoxina B1 es uno de los hepatocarcinógenos más potentes que se conocen, capaz de inducción de tumores en roedores, peces, aves y primates, incluidos los seres humanos. Éstas también inducen tumores en riñón, colon y pulmón.^{30,}

33

Otra sustancia química orgánica asociada con el cáncer es el alcohol (etanol), se ha establecido como causa de cáncer de la cavidad oral, faringe, esófago, hígado, colon y recto. El alcohol actúa como un disolvente que mejora la absorción de cancerígenos en la mucosa. El etanol puede facilitar la absorción de carcinógenos, especialmente el humo del tabaco, a través de las membranas celulares que se encuentran dañadas por el efecto

directo del alcohol. Otro mecanismo por el cual el etanol ejerce su efecto es la alta concentración del mismo sobre el epitelio, que altera la motilidad del esófago y puede producir reflujo que puede llevar a esofagitis y posteriormente a la neoplasia. Sin embargo, hay una creciente evidencia de que el acetaldehído, en vez del etanol mismo, es responsable del efecto co-cancerígeno de las bebidas alcohólicas. El acetaldehído es generado en la mucosa por alcohol deshidrogenasa del propio organismo o por bacterias presentes en el tracto digestivo. El acetaldehído es altamente tóxico, mutágeno y cancerígeno. Éste participa en muchos sitios de síntesis y reparación de ADN y esto puede en consecuencia desarrollar tumores. La unión al ADN puede dar la formación de aductos estables, un mecanismo por el cual el acetaldehído podría desencadenar la aparición de errores en la replicación y por consiguiente sufrir mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores.^{34, 35}

Entre los cancerígenos inorgánicos se encuentran el cadmio, cromo, níquel, arsénico, entre otros. La exposición al cadmio se ha asociado con el cáncer de próstata, pulmón y testículo. El cadmio afecta la progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación, vías de reparación del ADN, así como la apoptosis. El cadmio también induce la sobreexpresión de los siguientes protooncogenes C-FOS, C-MYC, C-JUN y algunos factores de transcripción, y estos promueven la proliferación de las células y el desarrollo de tumores. Se han observado también roturas de cadena sencilla en el ADN debido a la generación de especies reactivas de oxígeno.³⁶

1.3.2 Factores físicos.

Entre los factores físicos destacan las radiaciones ionizantes como los rayos X y rayos gamma entre otros, y las radiaciones no ionizantes como los rayos ultravioleta.

La radiación ionizante tiene suficiente energía para quitar electrones a átomos y moléculas (ionización). Cuando las moléculas están ionizadas son inestables y pasan por cambios químicos. Esto le pasa a la molécula de ADN, por lo cual puede sufrir mutaciones, roturas ya sea de una sola hebra o ambas o entrecruzamiento entre ellas, también puede presentarse transposición, sin embargo, la célula posee sistemas enzimáticos de reparación de ADN, si estos sistemas no son capaces de reparar el daño, estos daños conducen a la formación de cáncer o a la muerte celular. Además de los efectos directos de la radiación ionizante sobre el ADN, esta también puede provocar la formación de radicales libres en los tejidos, por lo cual estos radicales pueden interactuar con la moléculas de ADN y algunas macromoléculas y de esta forma conducir a alteraciones moleculares, la combinación de los daños directos inducidos por la radiación más los daños generados a partir de especies reactivas secundarias derivadas de acontecimientos posteriores a la ionización (daños indirectos), son la causa por la cual el ADN es dañado, dando lugar a las aberraciones antes mencionadas.³⁷

Cabe señalar que la cantidad de daño en la célula está relacionada con la cantidad de radiación que recibe. En general, el riesgo de padecer cáncer por exposición a la radiación aumenta según aumenta la dosis de la misma. Del mismo modo, cuanto más baja es la exposición, menor es el incremento en el riesgo. Sin embargo no existe un umbral debajo del cual se considere que la radiación ionizante es completamente segura. La leucemia es el tipo de cáncer más comúnmente inducido por la radiación ionizante, la glándula tiroides y la médula ósea son dos de los tejidos más sensibles a la radiación.³⁷

Algunos otros tipos de cáncer que están muy relacionados con la exposición a la radiación incluyen:

- Cáncer de pulmón
- Cáncer de piel
- Cáncer de tiroides
- Mieloma múltiple
- Cáncer de mama
- Cáncer de estómago.³⁸

Las principales fuentes de radiación ionizante a las cuales están expuestas las personas son las siguientes:

- La radiación de fondo natural. Proviene de los rayos cósmicos de nuestro sistema solar y de elementos radioactivos presentes en la tierra.
- La radiación médica. se usa en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades.
- La radiación sintética, no médica. Proviene principalmente de fuentes ocupacionales, como las plantas de energía nuclear.³⁷

Los rayos ultravioleta una forma de radiación no ionizante, proveniente principalmente del sol, aunque también pueden provenir de fuentes sintéticas tales como camas solares y sopletes. Por lo general, los rayos UV tienen suficiente energía para dañar el ADN de las células, por lo cual pueden causar cáncer. Sin embargo, debido a que no tienen suficiente energía para penetrar profundamente en el cuerpo, su efecto principal se presenta en la piel. La mayoría de los cánceres de piel son el resultado directo de exposición a los rayos UV de la luz solar. Tanto el cáncer de células basales como el de células escamosas tienden a detectarse en las partes del cuerpo que han sido expuestas al sol y su incidencia está asociada con la exposición al sol durante toda la

vida. El riesgo de melanoma, un tipo de cáncer de piel muy grave pero menos común, también está asociado con la exposición al sol, aunque no de manera rotunda.^{37, 39}

La principal alteración sobre el ADN de la radiación UV es la dimerización de pirimidinas lo que causa distorsión en la doble hélice del ADN impidiendo la correcta replicación y transcripción de ADN. Otras alteración provocadas por la luz UV son: entrecruzamiento entre proteínas y ADN, roturas de cadena sencilla y la formación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno) generados por sensibilizadores endógenos como las riboflavinas o las porfirinas, estas especies reactivas de oxígeno generadas juegan un papel importante en el daño celular, dando lugar a la peroxidación lipídica y a la oxidación individual de las bases del ADN.³⁹

1.3.3 Factores biológicos.

Las infecciones por virus, bacterias y parásitos son reconocidas como un factor de riesgo para varios tipos de cáncer en seres humanos. A nivel mundial, las infecciones virales se relacionan con el 15% al 20% de todos los cánceres. Algunas infecciones pueden causar la inflamación a largo plazo, suprimir el sistema inmunológico de una persona, o afectar directamente el ADN celular.^{40, 41}

Cuadro VI. Virus humanos asociados con el desarrollo de cáncer.⁴²

Virus	Tumor
Virus del papiloma humano tipo 16/18	Cáncer de cérvix.
Virus de hepatitis B	Hepatocarcinoma
Virus de hepatitis C	Hepatocarcinoma
Virus Epstein-Barr	Carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt y linfoma de Hodking's.
Virus herpes humano tipo 8	Sarcoma de Kaposi.
Virus linfotrópico humano de células T tipo I	Leucemia de células T

El paso de la infección viral a la tumorigénesis es un proceso lento e ineficiente, y solo una minoría de personas infectadas progresa hacia el cáncer, y por lo general el proceso dura algunos años o décadas. La infección viral no siempre es suficiente para generar el cáncer, se requiere de otros factores tales como inmunosupresión del huésped, mutaciones somáticas adicionales, predisposición genética y la exposición a agentes cancerígenos, todos estos factores juegan un papel importante en el desarrollo de un tumor en las infecciones virales.⁴²

Algunas infecciones bacterianas están asociadas con algunos tipos de cáncer. *Chlamydia pneumoniae* es un tipo de bacteria que puede causar infecciones en los pulmones. Los estudios exploran la posibilidad de que este germen pueda aumentar el riesgo de cáncer de pulmón. *Chlamydia trachomatis* es una clase relativamente común de bacteria que puede infectar el sistema reproductor femenino. Generalmente se propaga a través del contacto sexual. Es muy común en las mujeres jóvenes que son

sexualmente activas, y puede persistir durante años a menos que sea detectado y tratado. Algunos estudios sugieren que las mujeres con la infección por *C. trachomatis* tienen un mayor riesgo de cáncer cervical que las mujeres sin infección. Los estudios no han demostrado que la *C. trachomatis* por sí sola pueda causar cáncer, pero puede trabajar junto con el VPH de algún modo para promover el cáncer.⁴⁰

La bacteria *Helicobacter pylori* induce inflamación gástrica crónica en todas las personas infectadas, que con el tiempo dependiendo de la susceptibilidad del individuo, puede progresar a la atrofia, metaplasia, displasia y finalmente al cáncer gástrico. Más de la mitad de todos los casos de cáncer de estómago se cree que están vinculados con la infección por *H. pylori*. Sin embargo, la mayoría de las personas que tienen estas bacterias en el estómago nunca desarrollan cáncer, de hecho la infección por *H. pylori* conduce a cáncer gástrico en sólo el 0,1-0,5% de la sujetos infectados, esto pone de relieve la importancia de otros factores en el desarrollo del cáncer, como la susceptibilidad genética del huésped y factores ambientales que entran en contacto con el huésped y que influyen en el desarrollo del cáncer.^{43, 44}

1.3.4 Envejecimiento.

El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer. La incidencia de cáncer aumenta espectacularmente con la edad, muy probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo de tipos específicos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad.¹

Se han propuesto tres hipótesis para explicar la asociación entre el cáncer y el envejecimiento.

1. En la primera hipótesis se establece que esta asociación es consecuencia de la duración de la carcinogénesis. Como se sabe la carcinogénesis consta de varias etapas, durante las cuales se produce la transformación neoplásicas de las células, se dice que puede transcurrir entre 10 y 20 años para que se lleve a cabo este proceso.
2. La segunda hipótesis propone que los cambios que se producen en el medio interno del organismo de forma progresiva, relacionados con la edad, proporcionan un ambiente favorable para la aparición de nuevos tumores. Se ha demostrado que, con la edad existe un aumento de los radicales libres endógenos en el organismo. Estos radicales libres contribuyen a la inducción del cáncer mediante la producción de mutaciones en el ADN. Además el sistema inmune se encuentra disminuido con la edad, por lo cual los sistemas de inmunovigilancia pueden fallar y no ser capaces de eliminar a los primeros clones de células malignas.
3. En la tercera hipótesis postula que los tejidos envejecidos experimentan cambios similares a los primeros cambios que aparecen durante la carcinogénesis.⁴⁵

1.4 MECANISMOS DE EVASIÓN Y DISEMINACIÓN DE LAS CÉLULAS CANCERÍGENAS

1.4.1 Resistencia a los fármacos.

La resistencia a los fármacos por parte de las células neoplásicas es un problema frecuente en el tratamiento del cáncer. Existen varios mecanismos de resistencia a los fármacos, por ejemplo:

- La célula puede impedir la entrada de los fármacos y por consiguiente no llevar a cabo su acción.
- La célula puede bombear los fármacos hacia el exterior por sistemas de transporte.
- Los fármacos pueden ser enzimáticamente inactivados como por ejemplo la conjugación con glutatión.
- La actividad del fármaco puede ser reducida, ya sea por mutaciones o por la expresión alterada de la diana del fármaco.
- La célula puede producir defectos en la apoptosis y de esa manera evadir la muerte celular que provocaría el fármaco.⁴⁶

1.4.2 Evasión de la apoptosis.

La apoptosis es una forma de muerte celular que está regulada genéticamente, durante la apoptosis se presentan diversas características morfológicas que incluyen condensación celular y nuclear, formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación del ADN. En los organismos multicelulares, la homeostasis es llevada a cabo por un balance

entre la proliferación y la muerte celular; la apoptosis es el principal proceso que mantiene este balance. Alteraciones en la apoptosis pueden contribuir a la patogénesis de ciertas enfermedades como el cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes y desórdenes neurodegenerativos. Defectos en las vías de inducción de apoptosis pueden eventualmente conducir a una expansión de las células neoplásicas. La resistencia a la apoptosis también puede aumentar la evasión de las células tumorales de la vigilancia del sistema inmunológico. Como la quimioterapia y la radiación actúan principalmente como inductores de la apoptosis, y por consiguiente defectos en esta vía, puede hacer que las células cancerosas adquieran resistencia a la terapia. Por lo tanto la resistencia a la apoptosis de las células tumorales es una característica esencial en el desarrollo del cáncer.^{47,48}

La resistencia a la apoptosis por parte de las células cancerosas se puede llevar a cabo por los siguientes mecanismos:

- Expresión de proteínas anti-apoptóticas. El gen BCL 2 una proteína anti-apoptótica se encuentra sobreexpresada en muchos tumores y está relacionada con la malignidad del tumor. Otras proteínas anti-apoptóticas están involucradas en la resistencia de los tumores hacia la apoptosis.
- Otro mecanismo por el cual los tumores interfieren con la apoptosis es la expresión de receptores solubles que actúan como señuelos para proteína apoptótica CD95, hasta la fecha se han encontrado dos receptores solubles el receptor soluble sCD95 y DcR3, estos inhiben competitivamente la vía de señalización de CD95, el receptor sCD95 se encuentra expresado en varios tumores.

- La inactivación de genes pro-apoptóticos. En ciertos tipos de cáncer BAX un gen que pertenece a la familia de genes pro-apoptóticos se encuentra mutado. La expresión del receptor de DC95 se reduce en algunos tumores como en el hepatocarcinoma, cáncer de colon, melanoma y otros tumores.
- Alteración en la vía de p53. Como p53 tiene una función central en la inducción de apoptosis, alteraciones en esta vía influyen en la sensibilidad a la apoptosis de las células neoplásicas.⁴⁸

1.4.3 Telómeros y telomerasa.

Los telómeros constituyen estructuras especializadas que forman los extremos de los cromosomas eucariontes que participan en funciones celulares como la mitosis, la estabilidad cromosómica y el tiempo de vida de las líneas celulares. Recientemente se ha demostrado su relación con algunas enfermedades, especialmente con el cáncer. Su función más notoria es la de servir como un reloj mitótico que mide y regula el número de las divisiones celulares. Los telómeros se acortan con cada división celular y el número de divisiones que la célula puede experimentar se correlaciona con la longitud de los telómeros. Esta función de los telómeros los relaciona con el desarrollo de las células tumorales, en muchos tumores se encuentra expresada la enzima telomerasa que es la encargada de replicar los telómeros. En diversos estudios se muestra que la telomerasa presenta una actividad aumentada en cáncer de mama, próstata y otros. La determinación de la actividad de telomerasa pudiera ser utilizada para el diagnóstico del cáncer y los inhibidores de la enzima pudieran ser usados como agentes antineoplásicos con una selectividad para las células neoplásicas.^{49, 50}

1.4.4 Metástasis.

El proceso consiste en una serie de pasos los cuales deben llevarse a cabo con éxito para dar lugar a la metástasis del tumor. Estos incluyen la migración de las células del tumor primario hacia los vasos sanguíneos o linfáticos, la supervivencia de las células en la circulación, la localización en un nuevo tejido, la extravasación en el tejido circundante, la iniciación y el mantenimiento del crecimiento y la vascularización del tumor metastásico. Debido a esta capacidad de propagación, el cáncer es una enfermedad potencialmente mortal.⁵¹

Cuando el cáncer se detecta en una fase temprana, antes de que se haya extendido, a menudo se puede tratar con éxito. Sin embargo, cuando el cáncer se detecta después de que se sabe se ha producido metástasis, los tratamientos son mucho menos exitosos. La mayoría de las muertes por cáncer se deben al desarrollo de metástasis, por consiguiente, es muy importante prevenir la metástasis para disminuir la morbilidad y la mortalidad de los pacientes con este padecimiento.⁵¹

Las células cancerosas para propagarse requieren de motilidad y de la capacidad para degradar tejidos, la motilidad es asociada con el factor de motilidad autocrino y el factor de crecimiento hepático y la capacidad de degradar tejidos se asocia a las enzimas de degradación como la serina proteasa, la tiol-proteasa, metaloproteasa y heparanasa.⁵²

1.4.5 Angiogénesis Tumoral.

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un proceso normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo también es un proceso fundamental en la transformación maligna del

crecimiento tumoral. La angiogénesis tumoral es la proliferación de una red de nuevos vasos sanguíneos que penetra dentro del tumor, proporcionando nutrientes y oxígeno y removiendo productos de desecho.⁵³

En muchos tipos de tumores la masa tumoral se expande más allá de la capacidad de nutrición y oxigenación de los vasos existentes, lo que da lugar a la disminución de oxígeno y nutrientes y la acumulación de desechos metabólicos, esto es considerado el primer paso en el proceso de angiogénesis tumoral. El segundo paso es la respuesta de las células tumorales a este daño, por lo cual, secretan factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG), factor básico de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento placentario y el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, estos actúan activando las células endoteliales promoviendo su migración hacia el tumor. En el tercer paso las células endoteliales proliferan y se establecen en el tumor y finalmente en el cuarto paso del proceso los factores angiogénicos siguen influyendo en la formación de los vasos sanguíneos.^{53, 54}

La angiogénesis es un proceso altamente regulado donde activadores e inhibidores angiogénicos (véase cuadro VII) están en equilibrio, más sin embargo no es suficiente la sobrerregulación de los activadores angiogénicos, si no también se requiere de una baja expresión de los inhibidores angiogénicos. El control de la angiogénesis del tumor es una parte integral de la respuesta de defensa del huésped al crecimiento del tumor. Pérdida de los inhibidores de la angiogénesis endógenos, tales como la endostatina y la trombospondina-1, conduce a aumento de la angiogénesis tumoral y acelera el crecimiento tumoral. En cambio, cuando se altera la angiogénesis y la expresión de los

inhibidores de la angiogénesis endógenos se incrementa, los tumores pueden entrar en un período de latencia.^{53, 54}

Cuadro VII. Algunos de los reguladores endógenos de la angiogénesis.^{54, 55}

Activadores	Inhibidores
VEFG	Interleucinas 10 y 12
Angiogenina	Inhibidor tisular
Angioestatina	Metaloproteasa
Factor de necrosis tumoral α	p53 y RB
Factor de crecimiento epidérmico	Endostatina
Interleucinas 1, 6 y 8	IFN α
Captensina	Angiopoyetina II
Endotelina	Angiotensina
Eritropoyetina	Caveolina 1 y 2

Varios estudios indican que los activadores de la angiogénesis juegan un papel importante en el crecimiento y diseminación de los tumores. El VEGF y sus receptores se encuentran expresados en casi la mitad de los cánceres estudiados. Se sabe también que los niveles de factores angiogénicos en tejidos reflejan la agresividad con la que las células tumorales se propagan, y por lo tanto tienen un valor predictivo.⁵³

1.5 TERAPIA ANTICANCERÍGENA

El programa de tratamiento contra el cáncer depende del tipo de cáncer y del estadio del mismo. Con frecuencia, el objetivo del tratamiento es curar el cáncer. En otros casos, el objetivo es controlar la enfermedad o reducir los síntomas el mayor tiempo posible. La mayoría de los planes de tratamiento incluyen cirugía, radioterapia o

quimioterapia. Algunos comprenden terapia hormonal o terapia biológica. Los efectos secundarios son frecuentes ya que los tratamientos para el cáncer generalmente dañan células y tejidos sanos. Los efectos secundarios dependen fundamentalmente del tipo y extensión del tratamiento. Es posible que los efectos secundarios no sean los mismos para todos los pacientes que reciben el tratamiento, y los efectos pueden cambiar de una sesión de tratamiento a otra.⁵⁶

1.5.1 Quimioterapia.

La quimioterapia consiste en administrar un fármaco o combinación de fármacos que hay que elegir en función del tipo de tumor, de su localización y estadio o de la edad del paciente. La mayoría de los medicamentos antineoplásicos destruyen las células del tumor, alterando la síntesis o la función de los ácidos nucleicos (ADN ó ARN), también pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. Frecuentemente, la quimioterapia se administra como una combinación de antineoplásicos para aprovechar los distintos mecanismos de acción de cada fármaco. Además, así disminuye la posibilidad de que el tumor presente resistencia a los antineoplásicos a largo plazo.^{57, 58}

Los fármacos antineoplásicos según su acción, pueden clasificarse en:

- Agentes alquilantes. Estos actúan mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleófilicas presentes en las células, especialmente las bases nitrogenadas del ADN. De este modo, bloquean la replicación del ADN celular y la transcripción del ARN y, por lo tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas. Ejercen su acción durante todo el ciclo celular,

pero son más activos sobre las células en rápida división. Ejemplos: bisulfan, ciclofosmadida, clorambucilo, carmustina, dacarbacina, etc.

- Antimetabolitos. Estos fármacos presentan una estructura análoga a pirimidinas, purinas y al folato, que son componentes del metabolismo intermediario celular, de modo que interfieren en su metabolismo y en la síntesis de ácidos nucleicos. Ejercen su acción principalmente sobre tumores de crecimiento acelerado. Los fármacos de este tipo más habituales son: metotrexato, citabirina, 5-fluoroacilo y la 6-mercaptopurina.
- Antibióticos antitumorales. Son sustancias naturales producidas principalmente por hongos capaces de alterar el crecimiento de otras células vivas, estas actúan principalmente sobre ADN y ARN inhibiendo su replicación. Pertenecen a este grupo de antineoplásicos la bleomicina, doxorubicina, actiomicina D, mitomicina, entre otros.
- Inhibidores mitóticos. Son principalmente alcaloides extraídos de plantas y otros compuestos derivados de fuentes naturales. Estos fármacos pueden detener la mitosis o a las enzimas que sintetizan las proteínas necesarias para la división celular. Ejemplos: alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina) que se unen a la tubulina y bloquean su capacidad de polimerizarse para formar los microtúbulos por lo cual se detiene la división celular, y los taxanos (paclitaxel y docetaxel) estos se unen a la tubulina favoreciendo la polimerización de los microtúbulos que son muy estables pero poco funcionales de manera que detienen la división celular.

- Inhibidores de la topoisomerasa. Estos medicamentos inhiben a la topoisomerasa por lo cual las dos hebras del ADN no pueden ser separadas en el momento de la replicación, resultando en la muerte celular. Ejemplos de estos fármacos son: el irinotecan y topotecan que inhiben a la topoisomerasa I, el etopósido y el tenipósido que a su vez inhiben a la topoisomerasa II.
- Derivados del platino. El cisplatino y el carboplatino al activarse intracelularmente, quedan libres dos valencias del ión platino, que forman dos enlaces estables con componentes del ADN. El resultado es la alteración de la configuración tridimensional del ADN, la producción de errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas se separen para la replicación, conduciendo a si a la muerte celular.
- Hormonas esteroideas y sus antagonistas. La Prednisona un corticoide suprarrenal inhibe la proliferación leucocitaria, por lo cual se utiliza para tratar leucemias y linfomas. El tamoxifeno un antiestrogenico suprime los efectos promotores del crecimiento de los estrógenos por lo que es usado para tratar el cáncer de mama estrógeno dependiente. El etenil estradiol y el dietilestilbestrol dos estrógenos se utilizan en el tratamiento contra el cáncer de próstata por su capacidad de inhibir el crecimiento del tejido prostático.^{57, 58, 59}

Aunque la quimioterapia se administra para destruir las células neoplásicas, también las células normales pueden ser afectadas. Las células normales que presentan más probabilidad de sufrir daño son las células que se dividen con mayor rapidez como las células de la medula ósea y las células de la sangre, células de los folículos pilosos, las

que revisten el tracto digestivo, y las que recubren el tracto reproductivo. El daño a estas células da cuenta de muchos de los efectos secundarios de los fármacos antineoplásicos (véase el cuadro VIII). Los efectos secundarios son diferentes para cada medicamento, así también difieren sobre la dosis administrada y la forma de administración de la droga.⁵⁸

Cuadro VIII. Principales efectos secundarios provocados por los fármacos antineoplásicos.⁵⁸

Efecto secundario	Descripción
Alopecia	Debido al daño sobre las células del folículo piloso.
Nauseas y vomito	Debido principalmente a la irritación que provocan en el tracto digestivo.
Anemias	Debido al daño sobre los eritrocitos.
Fatiga, dolor de cabeza, dificultad para respirar, irritabilidad, hipotensión, palidez y disminución de la frecuencia cardiaca y respiratoria.	Producidos a consecuencia de la anemia.
Hepatotoxicidad	Se asocia a casi todos los citotóxicos dado que este el órgano que se encarga de metabolizar la mayoría de los antineoplásicos.
Carcinogénesis	En algunos casos se desarrolla una segunda neoplasia debido al efecto citotóxico y mutagénico de los citostáticos.
Inmunodeficiencia	Debido a la neutropenia.
Otros	Diarrea, constipación, estomatitis, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad cardiovascular, etc.

1.5.2 Radioterapia.

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer que consiste en haces de radiación de energía elevada (radiación ionizante) dirigidos a órganos o partes específicas del cuerpo. Esta radiación daña el material genético presente en las células cancerosas, lo que las destruye e impide su diseminación. La radiación mata primero a las células que se dividen rápidamente y por el contrario no funciona tan rápido sobre las células que se dividen lentamente y como las células cancerosas tienden a dividirse más rápido y crecen fuera de control es por eso que resultan con más daño que las células normales. Puesto que la radiación se distribuye específicamente en la región del cáncer (tratamiento local), los efectos sobre las células sanas se reducen a un mínimo. La radioterapia disminuye el tamaño de los tumores, en algunos casos, puede erradicarlos. La radiación puede usarse para reducir su volumen, lo que permite su extirpación quirúrgica que no sería posible de otro modo.^{60, 61}

En ocasiones la radioterapia se usa junto con la quimioterapia para aumentar las posibilidades de curar el cáncer. Existen dos tipos de radioterapia la interna y la externa. La radioterapia externa consiste en la administración de haces de radiación ionizante dirigidos al tumor. La radioterapia interna consiste en la introducción de pequeñas cantidades de material radiactivo aplicado sobre el tumor.^{60, 61} Los efectos adversos provocado por la radioterapia es debido al daño que puede llegar a causar sobre los tejidos normales, comúnmente se presentan enrojecimiento de la piel cerca del lugar irradiado, infertilidad si se irradian los órganos reproductivos, náuseas, vómitos, diarrea si se trata el intestino, alopecia si el tratamiento se dirige a la cabeza, etc.^{60, 61}

1.5.3 Cirugía.

La cirugía es la forma de tratamiento más antigua contra el cáncer. La cirugía también juega un papel importante en el diagnóstico del cáncer, así como evaluar en qué etapa se encuentra el cáncer. La cirugía ofrece posibilidades de cura para muchos tipos de cáncer, sobre todo aquellos que no se han diseminado a otra parte del cuerpo y se encuentran en etapas tempranas del desarrollo del tumor de ahí la importancia del diagnóstico oportuno.⁶²

Las cirugías implicadas en el cáncer se pueden dividir en:

- La cirugía preventiva. Se usa para evitar que el cáncer ocurra. Muchos cánceres de colon pueden evitarse extirpando los pólipos precancerosos antes de que se vuelvan malignos.
- La cirugía de diagnóstico (biopsia). En este procedimiento, el cirujano extirpa parte o todo un tumor para examinarlo y determinar si el crecimiento es canceroso.
- La cirugía de estadiaje: Cirugía para determinar la extensión de un cáncer así como la etapa del proceso canceroso.
- La cirugía curativa. Implica simplemente la extracción de un tumor canceroso.
- La cirugía reconstituyente. Devuelve al cuerpo a su apariencia o funcionamiento normal o casi normal después de un tratamiento anticanceroso.
- La cirugía paliativa. Se usa sólo para aliviar el dolor, incapacidades u otras complicaciones resultantes de los cánceres avanzados. Puede mejorar la calidad de vida pero no es una cura o tratamiento anticanceroso.⁶²

1.5.4 Inmunología.

La inmunoterapia es un tratamiento que se basa en estimular el sistema inmunológico natural del paciente para hacerlo más eficiente en reconocer y atacar las células cancerosas. Existen dos tipos principales de inmunoterapia: la activa y la pasiva. En la inmunoterapia activa se estimula el propio sistema inmune del paciente para combatir a las células cancerosas y en la inmunoterapia pasiva se utilizan los componentes del sistema inmunológico (como anticuerpos) obtenidos en el laboratorio. También se puede clasificar la terapia inmunológica en específica y no específica, la inmunoterapia específica actúa contra una célula en específico (célula cancerosa) o un antígeno de la célula cancerosa, los anticuerpos monoclonales y la vacunas contra el cáncer son dos tipos de inmunoterapia específica, mientras que la inmunoterapia no específica actúa estimulando el sistema inmune de manera muy general solo aumentando la eficiencia del sistema inmunológico. Las interleucinas, los interferones, el factor estimulante de colonias de granulocitos son ejemplos de inmunoterapia no específica.^{63,}

64

Los anticuerpos monoclonales son la forma más utilizada de inmunoterapia contra el cáncer, este tipo de tratamiento es considerado como inmunoterapia pasiva. Este tratamiento no requiere del sistema inmune del paciente para comenzar a actuar contra las células neoplásicas. Es primordial la identificación de antígenos específicos en las células cancerosas para poder producir un anticuerpo monoclonal específico contra ese antígeno y de esa manera pueda actuar solo contra las células cancerígenas y no sobre células normales.⁶³

Existen dos tipos de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer, los anticuerpos monoclonales desnudos son aquellos sin ningún tipo de medicamento o material radiactivo unido al anticuerpo y actúan uniéndose a su antígeno en las células cancerosas y sirven como marcador para el sistema inmune para que pueda atacar a las células neoplásicas y algunos anticuerpos monoclonales desnudos pueden bloquear por sí mismos a las células cancerosas porque se une a antígenos específicos que son proteínas necesarias para el desarrollo de la célula neoplásica, y los anticuerpos monoclonales conjugados son aquellos a los cuales se le ha unido una droga, partícula radiactiva o alguna toxina, estos se utilizan como medio de transporte de las sustancias conjugadas a ellos, es una forma de bio-dirigir estas sustancias hacia el tumor por lo cual se pueden lograr mejores resultados con menos efectos adversos.⁶³

En los últimos 10 años, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos de América ha aprobado varios anticuerpos monoclonales para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (véase cuadro IX).

Cuadro IX. Principales anticuerpos monoclonales usados en el tratamiento contra el cáncer.⁶³

Anticuerpo monoclonal	Antígeno diana	Tratamiento
Rituxan ®	CD 20	Linfoma no-Hodgkin´s
Herceptin ®	HER-2	Cáncer de mama
Mylotarg ® *	CD 33	Leucemia mieloide aguda
Avastin ®	VEFG	Cáncer de colon y recto
Erbix ®	EGFR	Cáncer de cuello, cabeza y colon
Vectibix ®	EGFR	Cáncer colorectal
Campath ®	CD 52	Leucemia linfocítica
Zevalin ® *	CD 20	Linfoma de células B

* Anticuerpo monoclonal conjugado

Las vacunas contra el cáncer es otra forma de inmunoterapia, este tratamiento es considerado inmunoterapia activa ya que está destinado a activar el propio sistema inmunológico para que responda de mejor manera contra las células neoplásicas. Las vacunas que se aplican en cáncer son diferentes a las vacunas normales que buscan la prevención de la enfermedad, las vacunas que se emplean en el cáncer tienen el objetivo de conseguir que el sistema inmunológico ataque a una enfermedad que ya existe, es decir que aumenta la respuesta inmune sobre las células cancerosas que ya están presentes en el cuerpo para tratar de erradicarlas. Los adyuvantes son compuestos conocidos por aumentar la respuesta inmune y ahora se están estudiando como posibles adyuvantes en vacunas para potenciar el efecto de las mismas.⁶³

El interferón α (IFN α) es un tipo de inmunoterapia no específica que se usa para tratar el cáncer. El IFN α frena el crecimiento de las células cancerosas, disminuye la velocidad de angiogénesis, causa un mayor producción de antígenos en las células neoplásicas y potencia la eficacia de las células asesinas naturales. El IFN α asido aprobado por la FDA para el tratamiento contra los siguientes tipos de cáncer:

- Leucemias de células pilosas
- Leucemia mielógena crónica
- Linfoma folicular no-Hodgkin's
- Linfoma de células T cutáneo
- Cáncer de riñón
- Melanoma
- Sarcoma de Kaposi.^{63, 64}

La FDA ha aprobado varias inmunoterapias para el tratamiento del cáncer, en el cuadro X se muestran las principales inmunoterapias aprobadas para su uso contra cáncer.

Cuadro X. Principales inmunoterapias aprobadas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.⁶³

Tipo de cáncer	Tipo de inmunoterapia
Cáncer de mama	Anticuerpos monoclonales (Herceptin [®] y Avastin [®]), vacuna usando como antígeno la proteína HER2.
Cáncer cervical	Vacunas que previenen la infección con el VPH tipo 16/18 (Gardasil [®] y Cervarix [®]).
Cáncer colorectal	Anticuerpos monoclonales (Avastin [®] , Erbitux [®] y Vectibix [®]) y vacunas de células autólogas y alogénicas.
Cáncer de riñón	IL-2, IFN α y el anticuerpo monoclonal (Avastin [®]).
Leucemias, linfomas y mielomas.	IFN α y anticuerpos monoclonales (Rutuxan [®] , Zevalin [®] y Campath [®]).
Cáncer de pulmón	Anticuerpo monoclonal (Avastin [®]), GVAX una vacuna celular autóloga y BLP25 una vacuna de una proteína antigénica.

1.5.5 Otras terapias.

La terapia fotodinámica se basa en la administración sistémica de agentes fotosensibles que se distribuyen en los tejidos y principalmente en el tejido neoplásico. Estos agentes fotosensibles son activados por medio de la aplicación de luz a una determinada longitud de onda (640nm-850nm), interactuando con el oxígeno presente en la célula y de esta manera generar especies reactivas de oxígeno (radicales OH, oxígeno singulete, peróxidos) que dañan las macromoléculas presentes en la células y así contribuir a la muerte de las células neoplásicas. Una ventaja notable de esta terapia es que solo se activan los agentes fotosensibles donde es irradiada la luz y por tal motivo los efectos secundarios son bastante leves.^{65, 66}

La terapia fotodinámica ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de cáncer de pulmón, obstrucción de cáncer de pulmón, cáncer de esófago, así como para queratosis actínicas premalignas y la degeneración macular relacionada con la edad. Los medicamentos aprobados por la FDA para la terapia fotodinámica son el Photofrin[®], Foscan[®] y Visudyne[®]. Diversos estudios han demostrado cierta eficacia en el tratamiento de una variedad de condiciones malignas y premalignas de cabeza y cáncer de cuello, cáncer de pulmón, mesotelioma, próstata y tumores cerebrales.^{65, 66}

La anti-angiogénesis es una terapia dirigida que se basa en la administración de fármacos u otras sustancias con la finalidad de detener la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor, si el tumor no tiene abastecimiento de nutrientes simplemente no puede crecer y esta es la finalidad de esta terapia. Muchos fármacos anti-angiogénesis atacan la vía del factor de crecimiento endotelial (VEGF por sus siglas en inglés), Avastin[®] un anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento endotelial evitando que se una a su receptor en la célula endotelial. Otras drogas como Sutent[®] y Nexavar[®] son moléculas pequeñas que se adhieren al receptor del VEGF evitando de esa forma que se active y genere nuevos vasos sanguíneos.⁶⁷

La terapia dirigida contra el cáncer interfiere con procesos celulares, bloqueando enzimas específicas y los receptores de factores de crecimiento que participan en la proliferación de las células cancerosas. Las terapias dirigidas que han sido aprobadas por la FDA son:

- El dasatinib (Sprycel®) fue aprobado para tratar a algunos pacientes con leucemia mieloide crónica o con leucemia linfoblástica aguda. Es un fármaco de molécula pequeña que inhibe varias enzimas tirosinas quinasa.
- El nilotinib (Tasigna®) fue aprobado para tratar a algunos pacientes con leucemia mieloide crónica. Es otro fármaco de molécula pequeña que inhibe las tirosinas quinasa.
- El temsirolimus (Torisel®) fue aprobado para tratar a pacientes con carcinoma de células renales avanzado. Este fármaco es un inhibidor específico de una serina-treonina-quinasa llamada mTOR, la cual se activa en las células de tumores y estimula el crecimiento y proliferación de estos.
- La romidepsina (Istodax®) fue aprobada para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T en pacientes que han recibido antes al menos una terapia sistémica. Este fármaco inhibe una clase de histonas desacetilasas e induce la apoptosis celular de tumores.
- La tretinoína (Vesanoid®) fue aprobada para inducir la remisión en algunos pacientes con leucemia promielocítica aguda. Este retinoide se une a los receptores de ácido retinoico y los activa.⁶⁸

1.6 ANTECEDENTES

La problemática que representa el cáncer a nivel mundial ha llevado a un amplio estudio de este, tanto en el campo de la identificación de los mecanismos de la enfermedad, así como en el desarrollo de nuevos medicamentos y nuevas terapias que ayuden a tener un mejor resultado en el tratamiento del mismo.

1.6.1 Terapia Fotodinámica.

La terapia fotodinámica es una terapia emergente en el tratamiento del cáncer, esta ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas, vejiga, esófago, queratosis actínica y degeneración macular asociada a la edad, esta terapia se basa en la administración sistémica de agentes fotosensibilizadores (PS por sus siglas en ingles). Los PS's son activados por la aplicación de luz a una determinada longitud de onda, interaccionan con oxígeno molecular dando lugar a la formación de radicales de oxígeno tóxicos que conducen a la muerte celular. La terapia fotodinámica es selectiva ya que solo se elimina a las células donde la radiación es aplicada, por consiguiente los efectos adversos son mínimos, además esta terapia puede ser aplicada en repetidas ocasiones ya que al no estar destinada al ADN es poco probable que se generen segundas neoplasias.^{69, 70}

Los primeros agentes fotosensibilizadores aprobados para su uso fueron una forma purificada de derivados de hematoporfirina que consiste en una mezcla de porfirinas. Aunque estos agentes fueron exitosamente utilizados, presentan una serie de desventajas como una gran extensión de fotosensibilidad en la piel y poca selectividad entre las células cancerosas y las normales. De esta forma es como aparece la segunda generación

de agentes fotosensibilizadores, entre los que se cuentan las clorinas, porfirinas, bacterioclorinas y ftalocianinas (véase figura 4). Estos presentan una ventaja significativa pues poseen una mejor absorción de la luz a una mayor longitud de onda lo que incrementa la profundidad a la cual puede aplicarse la terapia y también presentan una mayor absorción por las células cancerosas que las células normales por lo que las hace más selectivas. Algunos PS's de segunda generación han sido conjugados o empaquetados en moléculas acarreadoras que pueden liberar específicamente a los PS's en los tejidos tumorales, es así como surgen los agentes fotosensibilizadores de tercera generación. Las moléculas acarreadoras incluyen anticuerpos monoclonales, liposomas y polímeros.^{71, 72, 73}

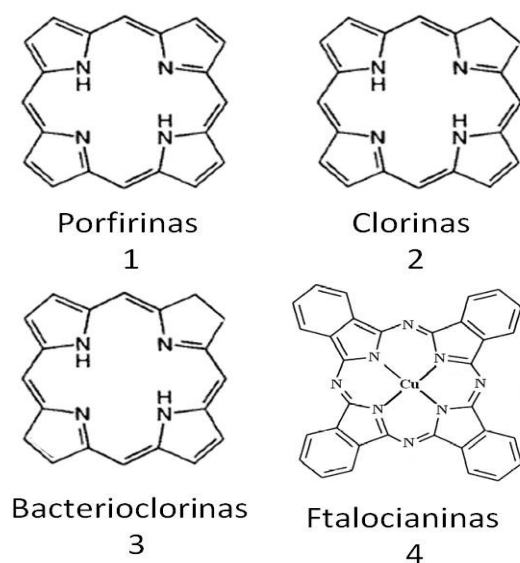


Figura 4. Estructuras generales de los agentes fotosensibilizadores de segunda generación.⁷⁴

El Photofrin[®] (porfímero sódico) fue el primer agente fotosensible aprobado en Canadá en 1993 para el tratamiento de cáncer de vejiga, posteriormente fue aprobado por la FDA en E.U.A. y otros organismos de salud en el mundo para su uso en el tratamiento de cáncer de esófago, esófago de Barrett, cáncer de pulmón de células no pequeñas. El Foscan[®] (temoporfirina) aprobado por la unión europea en el año 2001 para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. El Levulan[®] (ácido aminolevulínico) y el Visudyne[®] (verteporfin) también han sido aprobados respectivamente para el tratamiento de queratosis actínica y degeneración macular asociada a la edad.^{74, 75}

Como ya se mencionó anteriormente la terapia fotodinámica se basa en la captación selectiva del fotosensibilizador por parte de las células cancerígenas, seguida de la irradiación de luz de baja energía a una determinada longitud de onda para que penetre en el tejido y active al PS, que a su vez produce especies reactivas de oxígeno que provocan la muerte celular. El mecanismo para que esto se logre es el siguiente; primero el PS absorbe la luz y un electrón se mueve y se genera una molécula en estado singulete excitado de corta duración, esto es seguido por un cruce entre sistemas, lo que produce un cambio en el espín dando lugar a un estado triplete con una vida media más larga. El PS en estado triplete transfiere su energía a un oxígeno en estado basal, por lo cual se produce la especie reactiva oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). El $^1\text{O}_2$ puede matar directamente a las células tumorales por la inducción de necrosis y apoptosis, también puede causar la destrucción de la microvasculatura del tumor y además produce una respuesta inflamatoria importante que atrae a los leucocitos como las células dendríticas y neutrófilos (véase figura 5). El $^1\text{O}_2$ puede dar lugar también a la formación de otros tipos

de especies reactivas de oxígeno que incluyen al anión superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo, que contribuyen en la muerte celular de las células cancerígenas. El mecanismo de acción de la Terapia Fotodinámica depende de varios factores incluyendo el genotipo celular, la dosis del PS, los niveles de ATP y la localización del fotosensibilizador.^{73, 76, 77}

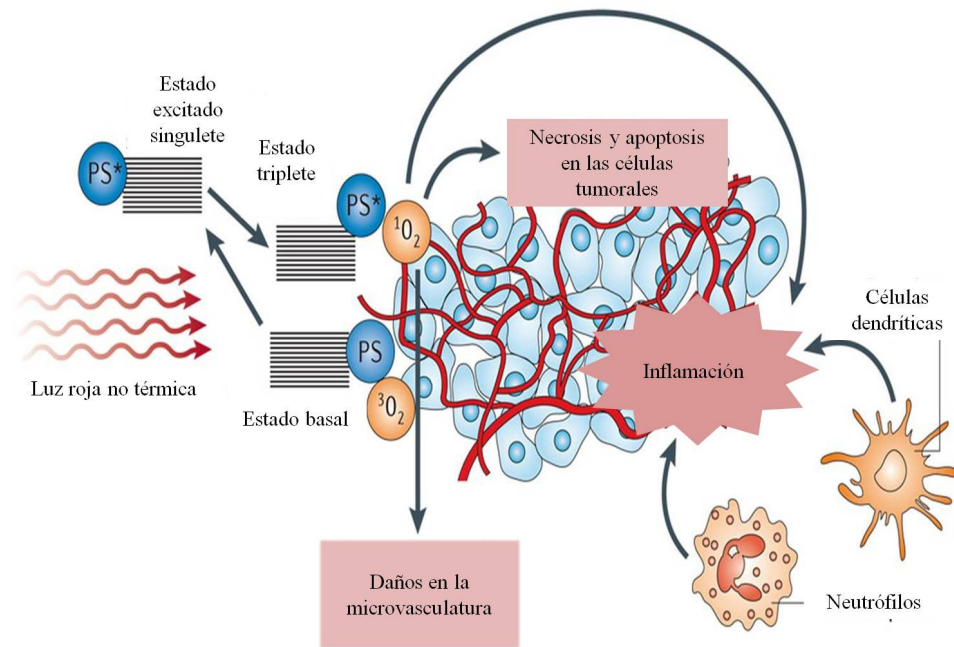


Figura 5. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica en el tumor.⁷⁶ PS
(agente fotosensibilizador por sus siglas en inglés).

Los mecanismos por los cuales los fotosensibilizadores se distribuyen preferencialmente hacia las células tumorales no son comprendidos completamente. Se cree que las propiedades del tejido tumoral pueden contribuir a esta selectividad, al presentar un pH del líquido intersticial ligeramente ácido debido a la presencia del ácido láctico, esto favorece la captación celular. Muchos fármacos fotosensibilizadores

presentan una alta afinidad por la lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en ingles) en plasma por lo cual, esto implicaría una biodistribución dirigida por la LDL, ya que se ha demostrado que la mayoría de las células tumorales presentan un elevado número de receptores de la LDL. La estructura anormal del estroma del tumor que se caracteriza por un gran espacio intersticial, el sistema vascular agrietado, el drenaje linfático comprometido, una gran cantidad de colágeno (donde el PS puede unirse) y una gran cantidad de lípidos (generalmente los PS son hidrofóbicos) también favorece la distribución selectiva de los PS.^{78, 79}

Debido al tiempo corto de vida (< 0.04 microsegundos) y al limitado radio de acción ($< 0.02\mu\text{m}$) del $^1\text{O}_2$, el daño en los tejidos está estrechamente relacionado con la localización de los PS's. La mayoría de los fotosensibilizadores se localizan selectivamente a nivel intracelular en los lisosomas, en las membranas y en las mitocondrias. En particular el daño sobre las mitocondrias es uno de los daños más importantes en la terapia fotodinámica ya que esto puede producir la muerte celular programada (Apoptosis), se sabe también que la liberación de citocromo C y otros factores mitocondriales al citosol pueden desencadenar la apoptosis. Marchetti y cols.,⁸⁰ señalaron que la protoporfirina se une al receptor periférico de benzodiazepinas que se encuentra en la mitocondria, Tshida y cols.,⁸¹ encontraron una relación entre la eficacia de los agentes fotosensibilizadores y su unión al receptor de benzodiazepinas, lo que sugiere que los PS más eficaces se unen al receptor de benzodiazepinas, por lo que se especula que esta unión pueda iniciar una apertura de poros en la mitocondria, seguido de la liberación de factores pro-apoptóticos. Los cambios inducidos en la membrana plasmática y en las membranas de los organelos celulares por la terapia

fotodinámica pueden desencadenar efectos de largo alcance, este daño implica la transducción de señales por lo que se aumenta la expresión de las proteínas de respuesta al estrés, así como los genes que regulan la apoptosis y posiblemente la sobreexpresión de citoquinas.^{78, 79}

Las porfirinas (agente fotosensibilizador) son compuestos que presentan una coloración intensa, su estructura química consiste en un macrociclo aromático formado por cuatro unidades de pirrol unidas entre sí por cuatro grupos metino (véase figura 4, 1), estas participan en una serie de procesos biológicos en los seres vivos tales como biocatálisis, la transferencia electrónica, la fotosíntesis, el transporte y activación de oxígeno. Las porfirinas presentan una cavidad interior donde puede insertarse un ion metálico, esta característica es importante, ya que esto sirve de núcleo para diversos materiales biológicos como la hemoglobina, clorofila, citocromos y la vitamina B12.⁷¹

Las porfirinas son uno de los agentes fotosensibilizadores más estudiados hasta el momento. El Photofrin[®], el Foscan[®] y el Visudyne[®] son medicamentos fotosensibilizadores que se derivan de las porfirinas. Banfi y cols.⁷⁰ sintetizaron porfirinas y clorinas tomando como base el anillo de la tetraaril porfirina/clorina, el objetivo de este estudio fue evaluar si estos agentes fotosensibilizadores presentaban mejor penetrabilidad en los tejidos neoplásicos y una mayor actividad fotodinámica, la actividad fue medida en una línea celular de adenocarcinoma de colon humano. La mayoría de estos compuestos presentaron una mayor actividad comparada contra el Photofrin[®], la muerte celular se produjo principalmente por apoptosis. En otro estudio sobre porfirinas (Cheng-Liang y cols. 2008) se sintetizaron porfirinas y evaluaron la captación intracelular y la localización de las mismas en células Hela mediante la

determinación de la emisión de la fluorescencia, algunos compuestos estudiados se localizaron en la mitocondria y otros en los lisosomas, los más efectivos fueron los que se localizaron en la mitocondria, y la fototoxicidad de los mismos en células Hela fue medida con el ensayo de MTT formazan. Los estudios con porfirinas continúan con el objetivo de producir agentes fotosensibilizadores con mejores características de penetrabilidad, localización y por supuesto de actividad fototóxica.⁷²

En este proyecto se analizó una porfirina no simétrica A3B (agente fotosensibilizador), a esta se le asigno la clave NS1 (véase figura 6), esta fue sintetizada y proporcionada para este trabajo por la Dra. Susana Thelma López Cortina. La porfirina NS01 tiene un peso molecular de 764.096 y una formula empírica $C_{45}H_{29}Cl_3N_4O_2$, es un sólido de color morado.

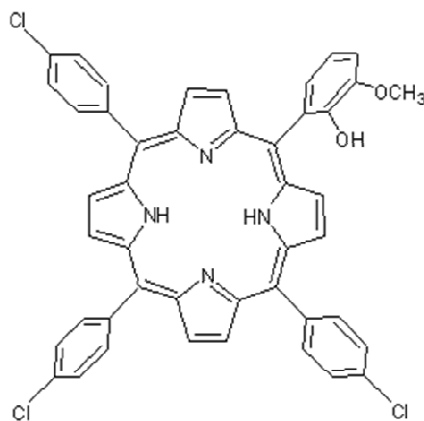


Figura 6. Porphirina no simétrica A3B NS1 (5, 10, 15-Tri (p-clorofenil)-20-(2-hidroxi, 3-metoxifenil)-21H,23H-porfirina).

1.6.2 Fitoterapia.

La Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de las plantas medicinales y sus derivados con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para aliviar o para curar las enfermedades. Las plantas son una fuente importante de agentes anticancerígenos ya que más del 50% de los antineoplásicos tienen un origen en un producto natural ó bien son productos semisintéticos derivados de un producto natural ó productos semisintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural.^{59,82}

Los primeros agentes antineoplásicos obtenidos de las plantas fueron la vincristina y la vinblastina obtenidos de la planta *Catharanthus roseus* en el año 1958. La vinolberina y la vindesina son dos compuestos semisintéticos obtenidos de modificaciones químicas de la vincristina y la vinblastina. Estos fármacos son alcaloides que se unen a la tubulina inhibiendo su polimerización e interrumpiendo la formación de los microtúbulos. El etopósido y el tenipósido son dos glucósidos semisintéticos derivados de la epipodofilotoxina que fue aislada de las raíces de *Podophyllum emody* y *P. peltatum*, estos dos agentes antineoplásicos actúan inhibiendo a la topoisomerasa II. Los taxanos el paclitaxel y docetaxel se unen a los microtúbulos volviéndolos muy rígidos y de esta manera impiden la división celular, estos agentes citostáticos provienen de la corteza de la planta *Taxus brevifolia*, estos fármacos se utilizan para el tratamiento del cáncer de ovario, pulmón, mama, colon y el sarcoma de Kaposi. Otros fármacos antineoplásicos que tienen su origen en las plantas son: homoharringtonina y la harringtonina obtenidos las semillas de *Cephalotaxus harringtonina* var *drupasea*, la eliptina alcaloide obtenido de las hojas de *Ochrosia elliptica*, las cobretastantinas aisladas de *Combretum caffrun*,

los ácidos betulínico, ursólico y oleanólico aislados de las plantas *Betula spp* y *Syzygium clavifloru*, entre otros son utilizados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.^{59, 82}

En este proyecto se analizó un compuesto aún no caracterizado al cual se le asignó arbitrariamente la clave Hs01, obtenido a partir del extracto metanólico de *Hibiscus sabdariffa*, una planta conocida como Hibisco. El *H. sabdariffa* es una planta que pertenece a la familia de las Malváceas, ésta es ampliamente cultivada en África, sureste de Asia y algunos países tropicales de América. Los cálices de color rojo se consumen en forma de infusión en todo el mundo como una bebida fría ó como una bebida caliente (véase figura 7). El consumo diario de esta bebida, llamada "flor de jamaica" en México y "Sobo" en Nigeria, es alta debido a que trasmite una sensación de frescura. Los usos tradicionales de esta infusión son: antiséptico, astringente, afrodisiaco, digestivo, diurético y laxante suave. También presenta acción hipolipemiante, hepatoprotectora, actividad antioxidante y actividad antitumoral e inducción de apoptosis.^{83, 84, 85, 86}

Sayago S. y cols., en su artículo del 2007 presentan la composición de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), esta contiene: proteína (9.87%), grasa (0.59%), cenizas (9.75%), azúcares solubles (4.38%), fibra dietética total (33.9%), fibra dietética soluble (4.9%) y fibra dietética no soluble (29.04%). El color rojo característico de la flor de jamaica se debe a la presencia de abundantes pigmentos de los cuales la mayor parte son compuestos fenólicos. Los polifenoles extraídos de *H. sabdariffa* representan cerca del 2% del peso seco de la planta, los principales compuestos fenólicos presentes son: los ácidos hidroxibenzoicos (32.6%), ácidos hidroxicinámicos (30.6%), antocianidinas (30.8%) y flavonoides (5.87%). Las principales antocianidinas reportadas son la delfinidina-3-glucósido (véase fig. 7, 1) y la cianidina-3-sambubiosido (véase fig. 7, 2);

algunos flavonoides como gossipetin (véase fig. 7, 5), hibiscetin (véase fig. 7, 4) y sus respectivos glucósidos, también se encuentran presentes el ácido protocatéquico (véase fig. 7, 3) y el eugenol, así también esteroides como el β -sitoesterol y el ergosterol. La actividad antioxidante y la actividad anti-genotóxica de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica han sido reportados.^{84, 87}

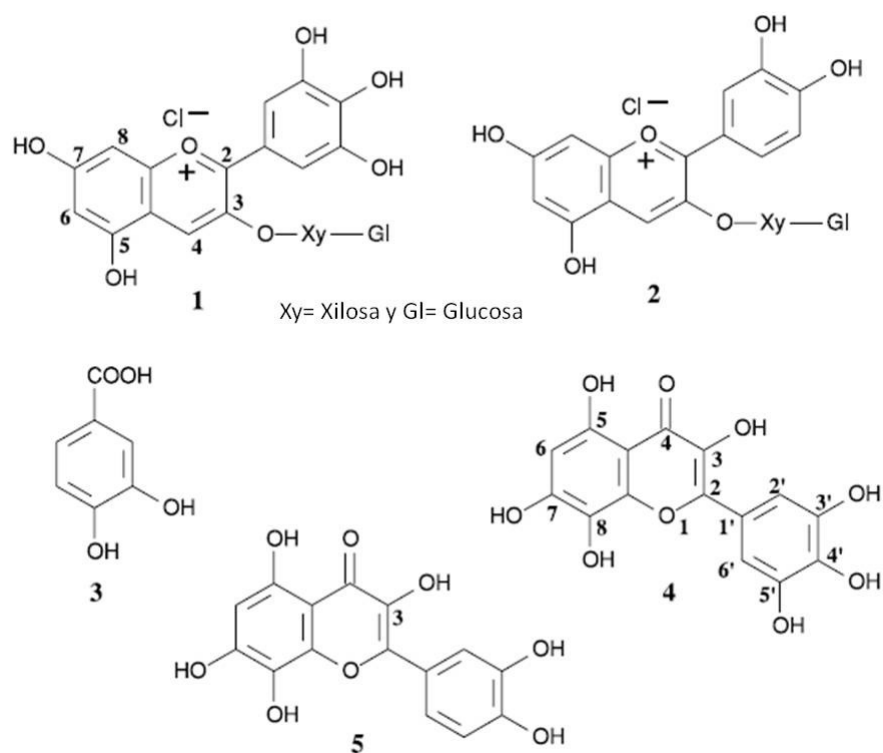


Figura 7. Estructuras químicas de los principales polifenoles presentes en *H. sabdariffa*.⁸⁵

La inyección intravenosa de los extractos acuosos de los cálices de *H. sabdariffa* a ratas y gatos anestesiados mostraron la reducción de la presión arterial en forma dosis-dependiente, se postuló que la acción hipotensora de los extractos puede estar mediado por un colinérgico y/o un mecanismo histaminérgico, así también esta acción puede deberse a un efecto directo vaso-relajante, otro posible mecanismo es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I, estos efectos se le atribuyen principalmente a flavonoides y antocianinas. En un ensayo clínico con 54 pacientes con hipertensión arterial esencial moderada, se reportó que el consumo diario de un extracto acuoso de *H. sabdariffa*, resultó en aproximadamente una reducción del 11% en la presión arterial sistólica y diastólica, 12 días después del inicio del tratamiento, se postuló que la acción hipotensora se debe probablemente a un efecto diurético, vasodilatador y/o un efecto sobre la enzima convertidora de angiotensina I. También se observó acción hipolipemiante, antiinflamatoria, antipirética, hepatoprotectora, renoprotector y acción hipoglucemiante.^{85, 86}

Existen algunos reportes sobre la actividad anticancerígena de extractos de *H. sabdariffa*, también algunos de los compuestos aislados de esta planta han sido probados contra líneas celulares cancerígenas.^{96, 101} Extractos metanólicos de planta presentan citotoxicidad sobre células Hep3 B (Carcinoma Hepatocelular) y HL-60 (Leucemia Humana). Otros estudios con extractos metanólicos de *H. sabdariffa* han mostrado que son capaces de reducir la capacidad mutagénica del 1-nitropireno, aminas heterocíclicas, tetraciclina y acetato metilazoximetanol.^{85, 89, 90}

Antocianinos y el ácido protocatéquico son dos de los compuestos presentes en la flor de jamaica que más han sido estudiados como agentes quimiopreventivos, es decir

protegen a los tejidos del daño inducido por compuestos carcinogénicos. Se ha demostrado que el ácido protocatéquico protege del daño de diversos compuestos carcinogénicos, incluyendo la dietilnitrosamina en el hígado,⁹¹ 4-nitroquinolina-1-óxido en la cavidad oral,⁹² azoximetano en el colon,⁹³ N-metil-N-nitrosourea en tejido del estómago glandular⁹⁴ y N-butil- N-(4-hidroxibutil) nitrosamina en la vejiga.⁹⁵ El ácido protocatéquico también inhibe la progresión de las células de leucemia humana (HL-60) sus datos sugieren que este compuesto es un inductor de apoptosis vía reducción del retinoblastoma y fosforilación y expresión de Bcl-2.⁹⁶ La quimioprevención del ácido protocatéquico es debida principalmente a su actividad antioxidante, de esta manera previene el daño oxidativo al ADN y la peroxidación lipídica.⁹⁷ Un estudio reciente ha demostrado que el ácido protocatéquico inhibe la replicación de ADN vía inhibición de la topoisomerasa I.⁹⁸

Se ha demostrado que los antocianinos presentes en la flor de jamaica presentan un efecto protector contra los compuestos carcinogénicos, incluidos el ter-butil-hidroperóxido y 2, 4-dinitrofenilhidrazina que inducen daño hepático.^{99, 99} También se ha reportado que inhiben la proliferación e inducen apoptosis en células de adenocarcinoma gástrico humano.¹⁰¹ La delphinidina-3-sambubiosido un antocianino aislado de *H. sabdariffa* induce apoptosis en células de leucemia humana (HL-60), datos moleculares muestran que este compuesto induce la pérdida del potencial de membrana en la mitocondria, la liberación de citocromo C desde la mitocondria, la generación de especies reactivas de oxígeno, la actividad de la caspasa-3 y la fragmentación del ADN.¹⁰²

1.6.3 Ingeniería de Proteínas, Proteínas Recombinantes y Quiméricas.

Una más de las terapias a estudiar en este proyecto es la terapia con proteínas recombinantes. Gracias a la tecnología del ADN recombinante, a través de la ingeniería genética, ha permitido el desarrollo de la clonación molecular que ha sido una herramienta útil con la cual se ha logrado producir proteínas con interés farmacológico especialmente para el tratamiento del cáncer. En la actualidad existen diversas proteínas recombinantes que se utilizan en el tratamiento contra el cáncer, estas incluyen al IFN α y la Interleucina-2 (clonadas en *E. coli*), vacunas contra el VPH (clonado en células eucariotas que expresan la proteína de la cápside L1), entre otros. También se han creado proteínas recombinantes quiméricas, es decir se fusionan dos o más proteínas con el objetivo de combinar actividades y potenciar su acción para aplicarlas en el tratamiento contra el cáncer. Algunos ejemplos incluyen la quimera recombinante de la IL-13 y la exotoxina de *Pseudomonas* probadas en una línea celular de glioma maligno y una línea celular de neuroblastoma, la quimera recombinante del factor de crecimiento transformante y la exotoxina de *Pseudomonas* evaluando su actividad citotóxica en líneas celulares de tumores cerebrales.^{103, 104}

Es por eso que se realizó la creación de una proteína quimérica que estará constituida de dos proteínas fusionadas, la IL-18 y la proteína E2 del virus del papiloma humano, con el objetivo de poder combinar sus funciones y lograr que esta quimera pueda ser candidata para el tratamiento contra el cáncer de cérvix.

La proteína E2 del Virus del Papiloma Humano es una proteína responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN del virus del papiloma humano. El

producto del gen E2 del VPH, de aproximadamente 1100 pb, es una proteína nuclear de 45 kDa. La proteína E2 se divide en tres dominios funcionales. El extremo amino terminal, es el dominio de activación, responsable de regular la transcripción y replicación viral. El dominio central o bisagra da estabilidad al complejo E2-ADN. El dominio carboxilo terminal tiene la función de dimerización y unión al ADN.¹⁰⁵

Las funciones de regulación dependen de la concentración intracelular de E2, a concentraciones altas de E2 existe baja expresión viral, mientras que a concentraciones bajas de E2 existe alta expresión viral. E2 también tienen una función antiproliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis en células de carcinoma cervicouterino, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7 (genes implicados en la tumorigénesis viral, las proteínas de estos genes bloquean a la proteína p53 y RB respectivamente), así como por el consecuente aumento de P53. E2 también causa arresto del ciclo celular ya que se reprime la transcripción de E7 y por consiguiente se aumentan los niveles de la proteína RB hipofosforilada lo que ocasiona el arresto del ciclo celular en la fase G1 en las células neoplásicas de cérvix. La pérdida de expresión E2 también se ha implicado en el desarrollo de cáncer cervicouterino inducido por el VPH.^{105, 106, 107, 108}

La IL-18 humana es una citocina proinflamatoria que induce la producción de INF γ , células T, células B y macrófagos activados, aumenta la actividad citotóxica de las células asesinas naturales e inhibe la producción de IL-10. La IL-18 humana ha demostrado tener la capacidad de suprimir el crecimiento tumoral e inhibir la angiogénesis.^{109, 110}

El gen de la IL-18 humana presenta 579 nucleótidos, los cuales codifican un precursor polipeptídico de 193 aminoácidos. Este precursor, es digerido posteriormente por acción de una caspasa en el aminoácido 36 para producir una proteína madura de 157 aminoácidos y un peso molecular de 18 kDa. Pro-IL-18 es producida por múltiples tipos de células, incluyendo macrófagos, las células dendríticas, células del endotelio vascular, y las células epiteliales intestinales Solo el péptido maduro presenta acción biológica.^{109, 111}

1.7 JUSTIFICACIÓN

El cáncer a nivel nacional y mundial presenta una alta incidencia ocupando el primer lugar a nivel global y tercer lugar a nivel nacional como causa de muerte. Por otro lado, los seres humanos vivimos en un mar de agentes nocivos que nos pueden provocar cáncer, tales como agentes químicos, físicos y biológicos. Aunado a ello, los tratamientos contra el cáncer suelen ser invasivos, dolorosos y presentan múltiples efectos adversos además de no ser siempre efectivos. Esto ha llevado a los científicos del mundo a buscar nuevas terapias, fármacos y procedimientos que puedan ayudar al tratamiento contra esta enfermedad.

Por esta razón se propone estudiar y evaluar el efecto anticancerígeno y citotóxico *in vitro* del compuesto Hs01 de *Hibiscus sabdariffa*, la proteína quimérica (E2-IL-18) y una porfirina no simétrica A3B NS1 para determinar su utilidad en el tratamiento del cáncer.

1.8 HIPÓTESIS

“La actividad anticancerígena *in vitro* del compuesto Hs01 de *H. sabdariffa*, la proteína quimérica E2- IL-18 y la porfirina no simétrica A3B NS1 es significativamente mayor a la de la vincristina”

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto citotóxico y anticancerígeno *in vitro*, del compuesto Hs01 de *H. sabdariffa*, la porfirina no simétrica A3B NS1 y la proteína quimérica E2-IL-18 y comparar sus efectos contra la vincristina.

1.9.2 Objetivos específicos.

1. Estandarización de los métodos de evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de los compuestos de estudio.
2. Construcción de la proteína quimérica E2-IL-18
3. Determinación de la actividad anticancerígena y citotóxica de la porfirina no simétricas A3B NS1.
4. Determinación de la actividad anticancerígena y citotóxica del compuesto Hs01 de *H. sabdariffa*.
5. Determinación de la actividad anticancerígena y citotóxica de la proteína quimérica (E2-IL-18).
6. Determinación del índice apoptótico del compuesto que presente la mayor actividad citotóxica.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

La estrategia general del estudio fue la siguiente, primero realizamos la clonación de la proteína quimérica E2- IL-18 para ello se realizó la obtención del material genético, para obtener el gen E2 del VPH se realizó una extracción de ADN de un cultivo de células Hela (ATCC: CCL-2) y para la obtención del gen de la IL-18 humana se realizó extracción de ARN total y su posterior retrotranscripción de monocitos humanos inducidos con LPS obtenidos de sangre periférica de un voluntario. Seguido a la obtención del material genético se procedió a la amplificación de los genes, estos fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para lo cual se diseñaron primers específicos para cada gen, estos primers además de amplificar los genes cuentan con sitios de reconocimiento para un par de enzimas de restricción para lograr la clonación molecular, después de obtener los genes por PCR se realizó la digestión de los mismos con las enzimas de restricción así también se digirió el vector de clonación pThioHis-B, posteriormente se ligaron los genes al vector de expresión, una vez realizado esto el vector clonado fue introducido a la cepa bacteriana *Escherichia coli* TOP 10 mediante transformación por calcio competencia, después se tomó una clona

positiva y se realizó un estudio de expresión de la proteína quimérica, para posteriormente purificar la proteína quimérica con una cromatografía de afinidad.^{112, 113, 114, 115}

Una vez obtenida la proteína quimérica y teniendo el compuesto Hs01 y la porfirina A3B NS1 realizamos los ensayos de citotoxicidad y actividad anticancerígena de las muestras en células Chang (ATCC: CCL-13) y en células Hela (ATCC: CCL-2) respectivamente.⁷⁰ También se realizó la determinación del índice apoptótico del compuesto que presento una mayor citotoxicidad en este caso la porfirina no simétrica A3B NS1 por medio de la técnica de T.U.N.E.L.

2.1 CLONACION DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA (E2-IL-18)

2.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

2.1.1.1 Extracción de ADN de células Hela para obtención del gen E2.

Se tomaron 3×10^6 células Hela, y se introdujeron en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml, se les añadió 300 μ l de buffer TSNT y se mezcló por inversión, seguido de esto se agregaron 300 μ l fenol seguido de agitación por inversión, después se añadieron 100 μ l de cloroformo y nuevamente se agitó con ayuda del vortex. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, una vez realizado esto se añadió 1 ml de etanol absoluto grado molecular, después se centrifugó 10 min a

14000 rpm, y se decantó el etanol, después se lavó el precipitado con 500 µl de etanol al 70%, luego se centrifugó 5 min a 12000 rpm, se decantó el etanol y la pastilla se secó al aire 5 min y finalmente se disolvió en agua estéril. Para comprobar la identidad e integridad del ADN se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0.01% de bromuro de etidio y en buffer de corrida TBE 1x, con 5 µl de la solución de ADN y 2 µl de buffer de corrida, la muestra se aplicó en el pocillo correspondiente y se procedió a conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder manteniendo el voltaje a 70 v durante 5 min para permitir que la muestra entre en el carril correspondiente, después se aumentó el voltaje a 120 v y se mantuvo por 25 min para permitir que la muestra migre en el gel, el gel se observó y fotografió en el fotodocumentador.

2.1.1.2 Aislamiento de monocitos, inducción de monocitos y extracción de ARN y retrotranscripción para la obtención del gen IL-18 humana.

Para el aislamiento de monocitos se realizó extracción de sangre periférica venosa de un voluntario a un tubo con anticoagulante, en tubo falcón de 15 ml se colocaron 3.5 ml del reactivo polimorfoprep, en este tubo se depositaron 5 ml de sangre extraída, el tubo se centrifugó 40 min a 5,000 rpm, las células se separan debido a la diferencia de la densidad y a la osmolaridad, con ayuda de una pipeta Pasteur se extrajeron los monocitos, estos se colocaron en tubo nuevo y se les agregó 2 ml de solución de Hank's esto con el objetivo de lavar los monocitos, después del lavado se centrifugó la suspensión con los monocitos por 15 min a 5,000 rpm y posteriormente se decantó el sobrenadante, se agregó 1 ml de medio de cultivo MEM y se resuspendieron las células,

dicha suspensión se pasó a una caja de cultivo y se le agregaron 3 ml de cultivo MEM fresco y después se incubó 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Terminado el periodo de incubación se realizó la inducción de los monocitos para que expresaran la IL-18 humana. La inducción se realizó de la siguiente manera, se agregó 1 ml de LPS a una concentración de 10 µg/ml y se incubó por 4 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Una vez terminado el periodo de inducción se realizó la extracción del ARN total con trizol. Los monocitos inducidos se transfirieron a tubo falcón de 15 ml y se centrifugaron 5 min a 5,000 rpm, el sobrenadante fue descartado, a la pastilla de monocitos se le añadió 500 µl de reactivo trizol y se mezcló con ayuda de un vortex 2 veces por 30 s y después se dejó reposando a temperatura ambiente 5 min, posteriormente se le añadieron 300 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s, se dejó reposar 3 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le añadió 500 µl de isopropanol y se mezcló por inversión y se incubó por 10 min, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, el ARN precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70% y después se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se descartó, la pastilla se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente, finalmente el ARN se disolvió en 50 µl de agua estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La retrotranscripción se realizó de la siguiente manera, la reacción se preparó inicialmente en 2 tubos de PCR por separado, en el tubo 1 se colocaron 9 µl del ARN extraído más 1 µl de random primers, en el tubo dos se colocaron 4 µl de buffer 5X, 1 µl

de random primers, 1 µl de dNTP's (200 µM), 1 µl de inhibidor de ARNsas y 0.8 µl de ditiotreitól (DTT). Los tubos se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se mezcló el contenido de los dos tubos y se calentó a 65°C por 5 min. Después se procedió a disminuir la temperatura a 37°C por 10 min, una vez transcurrido este tiempo agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa y se incubó por 50 min a 37°C. Finalmente se incrementó la temperatura a 95°C por 5 min para inactivar la enzima y se almacenó a -20°C hasta uso.

2.1.2 DISEÑO DE PRIMERS PARA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS

El diseño de los primers utilizados para la PCR se efectuó de la siguiente manera: se utilizó el portal del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, y con ayuda de la base de datos GenBank, e introduciendo las palabras clave “human”, “mRNA” e “IL-18”, se obtuvo la secuencia con la clave E17135 correspondiente al mRNA de la Interleucina 18 humana, y para la obtención de la secuencia del gen de E2 se introdujo las siguientes palabras clave “HPV”, “mRNA” y “E2”, se obtuvo la secuencia con la clave AY262282 correspondiente al mRNA del gen E2 del VPH. Los primers diseñados fueron analizados en los siguientes programas en línea Oligo Analyzer 3.1, Oligo Calculator y PCR Optimization.

2.1.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERES POR PCR

2.1.3.1 Amplificación del gen E2 por PCR.

Para la obtención del gen E2 que codifica para la proteína E2 activa, se empleó el ADN obtenido de las células Hela, este se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La PCR se realizó de la siguiente forma, en tubo de 200 µl se agregaron los reactivos en las cantidades presentadas en el cuadro XI. El tubo con la mezcla de reacción se colocó en el termociclador, y se ingresó el programa, éste consiste de las temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación, el cual se muestra en el cuadro XII. Los pasos 2 al 4 se repitieron durante 30 ciclos. Posterior a la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la identidad de la amplificación.

Cuadro XI. Cantidad de reactivos utilizados para la amplificación del gen E2 por PCR.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTP's 2.5 mM	1
Primer Forward	1
Primer Reverso	1
Taq ADN polimerasa	1(5u)
ADNc	3
Agua mQ estéril	14

Cuadro XII. Temperaturas y tiempos utilizados en el programa ingresado al termociclador para la amplificación del gen E2.

No. Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	5
2	95	1
3	60	1
4	72	1
5	72	10

2.1.3.2 Amplificación del gen IL-18 por PCR.

Para la obtención del gen IL-18 que codifica para la proteína IL-18 activa, se empleó el ADNc obtenido por retrotranscripción, éste se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La PCR se realizó de la siguiente forma, en tubo de 200 µl se agregaron los reactivos en las cantidades presentadas en el cuadro XII. El tubo con la mezcla de reacción se colocó en el termociclador, y se ingresó el programa, éste consiste de las temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación, el cual se muestra en el cuadro XIV. Los pasos 2 al 4 se repitieron durante 30 ciclos. Posteriormente a la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la identidad de la amplificación.

Cuadro XIII. Cantidad de reactivos utilizados para la amplificación del gen IL-18 humana por PCR.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTP's 2.5 mM	1
Primer Forward	1
Primer Reverso	1
Taq ADN polimerasa	1(5u)
ADNc	5
Agua mQ estéril	12

Cuadro XIV. Temperaturas y tiempos utilizados en el programa ingresado al termociclador para la amplificación del gen IL-18 humana.

No. Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	5
2	95	1
3	60	1
4	72	1
5	72	10

2.1.4 PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS PARA SU INSERCIÓN AL VECTOR

2.1.4.1 Digestión del producto amplificado del gen E2 con las enzimas de restricción Kpn I y Taq I.

Después de comprobar la amplificación por electroforesis, se procedió a realizar la digestión del fragmento amplificado con las enzimas de restricción Kpn I y Taq I, cuyos sitios de restricción fueron incluidos en el diseño de primers para la amplificación del gen E2. Primero se realizó la digestión con la enzima Kpn I, en el cuadro XV se muestran los componentes de la reacción de digestión la cual fue incubada durante 2 h a 37°C. Al término de la incubación, se procedió a correr un gel de agarosa al 1%, del cual se extrajo la porción del fragmento correspondiente al inserto en la migración, y posteriormente el ADN fue purificado con ayuda de las columnas NucleoSpin® Extrac, una vez concluido, el fragmento purificado fue digerido con la segunda enzima de restricción Taq I, en el cuadro XVI se muestran los componentes de la reacción de digestión la cual fue incubada 2 h a 65°C. El fragmento fue purificado de la misma manera. Al término de la digestión se procedió a la ligación de los fragmentos con el vector de expresión.

Cuadro XV. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Kpn I del gen E2.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2
Seroalbúmina bovina	0.5
Agua mQ estéril	1.5
Enzima Kpn I	1
Gen E2	15
Total	20

Cuadro XVI. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Taq I del gen E2.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2
Seroalbúmina bovina	0.5
Agua mQ estéril	1.5
Enzima Taq I	1
Gen E2	15
Total	20

2.1.4.2 Digestión del producto amplificado del gen IL-18 con las enzimas de restricción Xba I y Taq I.

Después de comprobar la amplificación por electroforesis, se procedió a realizar la digestión del fragmento amplificado con las enzimas de restricción Xba I y Taq I, cuyos sitios de restricción fueron incluidos en el diseño de primers para la amplificación del

gen IL-18. Primero se realizó la digestión con la enzima Xba I, en el cuadro XVII se muestran los componentes de la reacción de digestión la cual fue incubada durante 2 h a 37°C. Al término de la incubación, se procedió a correr un gel de agarosa al 1%, del cual se extrajo la porción del fragmento correspondiente al inserto en la migración, y posteriormente el ADN fue purificado con ayuda de las columnas NucleoSpin® Extrac, una vez concluido, el fragmento purificado fue digerido con la segunda enzima de restricción Taq I, en el cuadro XVIII se muestran los componentes de la reacción de digestión la cual fue incubada 2 h a 65°C. El fragmento fue purificado de la misma manera. Al término de la digestión se procedió a la ligación de los fragmentos con el vector de expresión.

Cuadro XVII. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Xba I del gen IL-18.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2
Seroalbúmina bovina	0.5
Agua mQ estéril	1.5
Enzima Xba I	1
Gen IL-18	15
Total	20

Cuadro XVIII. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción Taq I del gen IL-18.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2
Seroalbúmina bovina	0.5
Agua mQ estéril	1.5
Enzima Taq I	1
Gen IL-18	15
Total	20

2.1.5 PREPARACIÓN DEL VECTOR PLASMÍDICO pThioHis B

2.1.5.1 Preparación de bacterias calcio competentes *E. coli* TOP 10.

En una caja petri con agar LB se inocularon bacterias *Escherichia coli* de la cepa TOP 10 incubándose a 37°C durante toda la noche, posteriormente se transfirió una colonia a un tubo de ensayo con 4 ml de caldo LB y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante toda la noche. Concluido el periodo de incubación se inoculó 1 ml de este cultivo en 50 ml de caldo LB en un matraz de 250 ml, incubándose a 37°C por 5 h con agitación a 250 rpm. El contenido del matraz se vació en 4 tubos falcón de 15 ml frío y estériles, utilizando las mismas proporciones para cada tubo. Los tubos fueron centrifugados por 5 min a 7,000 rpm desechándose el sobrenadante. El proceso fue ejecutado en hielo y en condiciones de asepsia. Las pastillas celulares se resuspendieron en 10 ml de CaCl₂ 100 mM con la ayuda de un vortex, posteriormente se incubó por 5

min en hielo y se centrifugó por 5 min a 7,000 rpm, repitiéndose este último paso. Finalmente se resuspendió la pastilla en 1 ml de CaCl₂ 100 mM haciéndose alícuotas de 200 µl para conservarlas a 4°C hasta su uso.

2.1.5.2 Transformación bacteriana para propagación del vector.

Se utilizaron las bacterias competentes *E. coli* de la cepa TOP 10 para introducirles el plásmido pThioHis B, se mezclaron 80 ng del mismo con 200 µl de bacterias incubándose por 30 min en hielo, después de este periodo se les produjo un choque térmico incubando 90 s a 42°C e inmediatamente después se pasó a hielo por 2 min. Después del choque térmico se agregó 1 ml de caldo LB a temperatura ambiente, posteriormente se incubó 1 h a 37°C con agitación a 250 rpm. Finalmente se vaciaron 300 µl del contenido del tubo en una caja petri con agar LB con ampicilina (25 µg/ml) después se incubó toda la noche a 37°C, para que sólo las bacterias que adquirieron el plásmido que les proporcionaría resistencia al antibiótico pudieran crecer.

2.1.5.3 Propagación de las bacterias clonadas para obtención del vector pThioHisB.

Las colonias portadoras del plásmido fueron propagadas en tubos con 4 ml de caldo LB con ampicilina (25 µg/ml) a 37°C por 16 h, con lo cual se logró extraer el plásmido pThioHis B para prepararlo para la inserción de los genes.

2.15.4 Extracción del vector pThioHis B de las bacterias clonadas.

Se tomaron 1.5 ml de cultivo propagado y se centrifugaron por 1 min a 12,000 rpm, el sobrenadante fue descartado, quedando la pastilla celular a la cual se le agregó 300 µl de reactivo TENS agitándose por 10 s con ayuda de un vórtex. Posteriormente se le adicionaron 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 4.8-5.2 agitándose nuevamente por 10 s con ayuda de un vórtex, enseguida se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm, el sobrenadante fue separado a un tubo nuevo al cual se le añadió 900 µl de etanol absoluto. El tubo se mantuvo a -20°C durante 2 h para después centrifugarlo por 15 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se descartó, el precipitado fue lavado con 500 µl de etanol al 70% eliminado así el exceso de sales al descartar el sobrenadante, finalmente se disolvió el precipitado en 50 µl de agua mQ estéril.

2.1.5.5 Digestión del vector pThioHis B con las enzimas de restricción Kpn I y XbaI.

Después de comprobar la extracción del vector pThioHis B, se procedió a realizar la digestión del vector con las enzimas de restricción Kpn I y Xba I, cuyos sitios de restricción se encuentran en el sitio de corte múltiple presente en el vector. Primero se realizó la digestión con la enzima Kpn I, en el cuadro XIX se muestran los componentes de la reacción de digestión la cual fue incubada durante 2 h a 37°C. Al término de la incubación, se procedió a correr un gel de agarosa al 1%, del cual se extrajo la porción del fragmento correspondiente al vector en la migración, y posteriormente el ADN fue purificado con ayuda de las columnas NucleoSpin® Extrac, una vez concluido, el vector purificado fue digerido con la segunda enzima de restricción Xba I, en el cuadro XX se

muestran los componentes de la reacción de digestión la cual fue incubada 2 h a 37°C. El vector fue purificado de la misma manera. Al término de la digestión se procedió a la ligación de los fragmentos con el vector de expresión.

Cuadro XIX. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción

Kpn I del vector pThioHis B.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2
Seroalbúmina bovina	0.5
Agua mQ estéril	1.5
Enzima Kpn I	1
Vector pThioHis B	15
Total	20

Cuadro XX. Composición de la reacción de digestión con la enzima de restricción

Xba I del vector pThioHis B.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2
Seroalbúmina bovina	0.5
Agua mQ estéril	1.5
Enzima Taq I	1
Gen IL-18	15
Total	20

2.1.6 CLONACIÓN MOLECULAR

2.1.6.1 Reacción de ligación de los insertos y el vector.

El gen amplificado IL-18 y gen E2 previamente digeridos con sus respectivas enzimas de restricción, así como el vector plasmídico pThioHis B, digerido con sus respectivas enzimas de restricción, fueron unidos covalentemente en una reacción catalizada por la ADN ligasa, dando como resultado una molécula recombinante que consta del plásmido pThioHis B más los insertos correspondientes al gen E2 e IL-18. En el cuadro XXI se muestran los componentes de la reacción de ligación. La proporción molecular de los insertos con respecto al vector se mantuvo en una relación molecular 3:1.

Cuadro XXI. Componentes de la reacción de ligación entre el plásmido pThioHis B y los genes E2 e IL-18.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	4
pThioHis B	8
ADN ligasa	2(10u)
E2	10
IL-18	10
Agua	16
Total	50

2.1.6.2 Transformación bacteriana por células calcio competentes con el vector recombinante.

Se introdujo el plásmido recombinante a bacterias competentes *E. coli* de la cepa TOP 10, mezclando 80 ng del mismo con 200 µl de bacterias y se siguieron los pasos especificados en la sección 2.5.2. Finalmente se aislaron las bacterias que crecieron en el medio con ampicilina para su caracterización.

2.1.6.3 Caracterización de las clonas recombinantes.

Se efectuaron los siguientes pasos con el objetivo de caracterizar las clonas recombinantes portadoras de la proteína quimerica E2-IL-18:

- Propagación de las clonas (referirse al apartado 2.5.3 para su descripción).
- Extracción y purificación del plásmido recombinante (referirse al apartado 2.5.4 para su descripción).
- Amplificación de los genes por PCR (referirse a los apartados 2.3.1 y 2.3.2 para su descripción).
-

2.1.7 EXPRESIÓN PILOTO DE LA PROTEINA QUIMÉRICA

Para el estudio de expresión se tomó una clona recombinante la cual fue inoculada en 4ml de caldo LB con ampicilina (25 µg/ml) e incubada toda la noche a 37°C y agitación a 250 rpm. Concluido este periodo de incubación se inoculó 1 ml de este cultivo en 50 ml de caldo LB con ampicilina (25 µg/ml), cuando el cultivo llego a una densidad óptica de 0.5 en este punto se tomo una muestra de 5 ml y se registro como tiempo 0, esta se centrifugó por 2 min descartando el sobrenadante, en este punto se

añadió el inductor de la expresión IPTG hasta tener una concentración final de 5 mM continuando la incubación a 30°C y tomando muestras a las 2, 4 y 6 horas siguiendo los pasos anteriores. Una vez colectadas las muestras, se les agregaron 500 µl de buffer TEimidazol sometiéndolas a lisis por medio de tres sonicaciones de 10 s con un homogeneizador positrón. El lisado se separó por centrifugación en dos fases, una soluble y una insoluble y se les añadió inhibidor de proteasas.

2.1.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA EXPRESADA EN LAS CLONAS RECOMBINANTES

2.1.8.1 Cuantificación de las proteínas presentes en las muestras.

Determinamos la concentración de proteínas en las muestras mediante el método de Lowry y cols.¹¹⁶

2.1.8.2 Preparación de las muestras.

En tubos de microcentrifuga se mezclaron 40 µl de cada muestra con 10 µl de buffer de muestra, posteriormente se calentaron por 5 min a 100°C en un baño de agua y de ellos se colocaron un volumen correspondiente a 10 µg de proteínas totales.

2.1.8.3 Preparación y electroforesis del gel.

Se elaboró el gel de poliacrilamida al 13% para correr las muestras y poder observar la presencia de la proteína quimérica. El gel separador se elaboró de la siguiente forma se mezcló 2.925 ml de agua, 2.5 ml de una solución de acrilamida/Bis al 30%, 1.875 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 150 µl de SDS al 10%, 200 µl de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 25 µl de TEMED. El gel concentrador se preparó con 5.1 ml de agua, 1.3 ml de acrilamida/Bis al 30%, 1 ml de buffer Tris-HCl 1 M pH 6.8, 75 µl de SDS al 10%, 150 µl de PSA al 10% y 20 µl de TEMED.

Se armaron los vidrios vaciándose primero el gel separador y una vez polimerizado se vació el gel concentrador. Una vez polimerizado el gel se colocaron las muestras en los carriles y se corrió la electroforesis vertical por 2 h a 150 v. Posteriormente se realizó la tinción del gel.

2.1.8.4 Tinción del gel.

Una vez concluida la electroforesis los vidrios se desensamblaron, el gel fue fijado con una solución de fijación por 10 min, después se colocó el gel en una solución de azul de Coomassie para que las muestras se tiñeran, posteriormente el gel fue desteñido con una solución de lavado hasta que solo se observen las bandas de las muestras.

2.1.9 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE FUSIONADA A LA TIOREDOXINA

2.1.9.1 Preparación de la muestra para cromatografía de afinidad.

Para la purificación se tomó una clona recombinante la cual fue inoculada en 4 ml de caldo LB con ampicilina (25 µg/ml) e incubada toda la noche a 37°C y agitación a 250 rpm. Concluido este periodo de incubación se inoculó 1ml de este cultivo en 50 ml de caldo LB con ampicilina (25 µg/ml), cuando el cultivo llegó a una densidad óptica de 0.5 en este punto se añadió el inductor de la expresión IPTG hasta tener una concentración final de 5 mM continuando la incubación a 30°C por 4 h, el cultivo fue recolectado en 4 tubos falcón de 15 ml y se centrifugaron por 1 min a 7,000 rpm para sedimentar las bacterias. La pastilla bacteriana fue resuspendida en 10 ml de buffer de unión pH 7.8 y las células fueron lisadas con ayuda de un homogeneizador positrón. Para proceder a realizar la cromatografía, el lisado fue clarificado al hacerlo pasar a través de papel filtro Whatman #1 y conservado en hielo hasta su uso.

2.1.9.2 Cromatografía de afinidad.

El gen de la tioredoxina presente en el pThioHis B fue mutado para crear un dominio de unión al níquel, con el objetivo de favorecer la sencilla purificación de la proteína expresada con ayuda de las resinas de intercambio iónico ProBond™. La columna ProBond™ se lavo dos veces con 7 ml de agua mQ estéril y 3 veces con 7 ml de buffer de unión, posteriormente se agregaron 5 ml del lisado resuspendiendo la resina por inversión y agitándose por 10 min. Enseguida se añadieron los 5 ml del lisado

restantes y se lavó 2 veces con 4 ml de buffer de unión pH 7.8 para asegurar la unión de la proteína a la resina. La columna se lavó con 4 ml de buffer de lavado por 5 veces hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.01 a 280 nm.

2.1.9.3 Elución de la proteína quimérica.

Se resuspendió la resina en 5 ml de buffer de imidazol 50 mM, rodando la columna para una mejor agitación, y se centrifugó por 2 min para sedimentarla. El sobrenadante se eluyó y se recolectó. El proceso fue repetido para las diferentes concentraciones de imidazol (200 mM, 350 mM y 500 mM). A los sobrenadantes colectados se les determinó la concentración por el método de Lowry. La muestra que mostró una concentración mayor se utilizó para la prueba de actividad biológica.

2.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

2.2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA CON LA VINCRISTINA

Los métodos de evaluación de la actividad anticancerígena y la citotoxicidad fueron estandarizados con ayuda del fármaco antitumoral vincristina además de utilizarlo también como referencia en los ensayos, la actividad anticancerígena fue evaluada en células Hela (ATCC: CCL-2) y la citotoxicidad fue evaluada en células Chang (ATCC: CCL-13). Para la realización de la estandarización se tomó un cultivo de las dos líneas

celulares al 85% de confluencia, estas células fueron despegadas de la caja por la adición de 0.5 ml de una solución de tripsina al 0.25% y su posterior incubación de 5 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células fueron recuperadas y se centrifugaron 8 min a 1000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de medio MEM y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer, finalizado el conteo celular se realizó una suspensión celular que contenía 50,000 células por ml, el ensayo fue realizado colocando 5,000 células en 100 µl por pozo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Terminado este periodo se añadieron 100 µl con la concentración deseada de la vincristina. Posteriormente se incubaron 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Una vez incubado se reemplazó el medio que contiene la vincristina con 100 µl de medio de cultivo MEM fresco y después se añadieron 10µl del reactivo de WST-1 [2-(4 Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] y se incubaron por 2 horas 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y finalmente se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA. Se utilizó tritón al 1% como control positivo, las células sin tratamiento como control negativo; de blanco se utilizó medio de cultivo MEM y el reactivo de WST-1. Cada muestra fue realizada por triplicado y el ensayo se repitió dos veces más.

Las concentraciones que se utilizaron de vincristina) fueron 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0.1 µg/ml, para realizar estas diluciones se utilizó un stock de 1,000 µg diluido en 1 ml de agua estéril y las diluciones fueron preparadas con medio de cultivo MEM.

2.2.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DEL COMPUESTO Hs01 DE LA PLANTA *H. sabdariffa*

Se tomó un cultivo de células Chang (ATCC: CCL-13) y un cultivo de células Hela (ATCC: CCL-2) al 85% de confluencia, estas células fueron despegadas de la caja por la adición de 0.5 ml de una solución de tripsina al 0.25% y su posterior incubación de 5 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células fueron recuperadas y se centrifugaron 8 min a 1000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de medio MEM y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer, finalizado el conteo celular se realizó una suspensión celular que contenía 50,000 células por ml, el ensayo fue realizado colocando 5,000 células en 100 µl por pozo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Terminado este periodo se añadieron 100 µl con la concentración deseada de la muestra a analizar. Posteriormente se incubaron 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Una vez incubado se reemplazó el medio que contiene la muestra con 100 µl de medio de cultivo MEM fresco y después se añadieron 10µl del reactivo de WST-1 y se incubaron por 2 horas 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y finalmente se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA. Se utilizó tritón al 1% como control positivo, las células sin tratamiento como control negativo; de blanco se utilizó medio de cultivo MEM y el reactivo de WST-1. Cada muestra fue realizada por triplicado y el ensayo se repitió dos veces más.

Las concentraciones del compuesto que se utilizaron fueron de 4,000 µg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml y 0.4 µg/ml, para realizar estas diluciones se utilizó un stock de 40,000 µg diluido en 1 ml de medio MEM, las diluciones fueron preparadas con medio de cultivo MEM.

2.2.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1

Se tomó un cultivo de células Chang (ATCC: CCL-13) y un cultivo de células Hela (ATCC: CCL-2) al 85% de confluencia, estas células fueron despegadas de la caja por la adición de 0.5 ml de una solución de tripsina al 0.25% y su posterior incubación de 5 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células fueron recuperadas y se centrifugaron 8 min a 1,000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo MEM y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer, finalizado el conteo celular se realizó una suspensión celular que contenía 50,000 células por ml, el ensayo fue realizado colocando 5,000 células en 100 µl por pozo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Terminado este periodo se añadieron 100 µl con la concentración deseada de la muestra a analizar. Posteriormente se incubaron 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Una vez concluido el periodo de incubación las células se irradiaron con luz visible por 2 h con una lámpara (BELGIUM B6 085, 120 v, 60 Hz y 0.26 A). Posteriormente se incubaron 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂, este procedimiento fue para la porfirina activada con luz visible, pero también se probó la porfirina sin activación con luz visible para lo cual después de agregar las muestras se incubó 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Terminado este tiempo

se reemplazó el medio que contiene la muestra con 100µl de medio cultivo MEM fresco y después se añadió 10 µl del reactivo de WST-1 y se incubaron por 2 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y finalmente se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA. Se utilizó tritón al 1% como control positivo, las células sin tratamiento como control negativo; de blanco se utilizó medio de cultivo MEM y el reactivo de WST-1. Cada muestra fue realizada por triplicado y el ensayo se repitió dos veces más.

Las concentraciones de la porfirina no simétrica A3B NS1 que se utilizaron fueron 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0.1 µg/ml, para realizar estas diluciones se utilizó un stock de 1,000 µg diluido en 1ml de acetona y las diluciones fueron preparadas con medio de cultivo MEM.

2.2.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2- IL-18

Se tomó un cultivo de células Chang (ATCC: CCL-13) y un cultivo de células Hela (ATCC: CCL-2) al 85% de confluencia, estas células fueron despegadas de la caja por la adición de 0.5 ml de una solución de tripsina al 0.25% y su posterior incubación de 5 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células fueron recuperadas y se centrifugaron 8 min a 1,000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de medio MEM y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer, finalizado el conteo celular se realizó una suspensión celular que contenía 50,000 células por ml, el ensayo fue realizado colocando 5,000 células en 100 µl por pozo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Terminado este periodo se añadieron 100 µl con la

concentración deseada de la muestra a analizar. Posteriormente se incubaron 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Una vez incubado se reemplazó el medio que contiene la muestra con 100 µl de medio de cultivo MEM fresco y después se añadió 10 µl del reactivo de WST-1 y se incubaron por 2 horas 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y finalmente se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA. Se utilizó tritón al 1% como control positivo, las células sin tratamiento como control negativo; de blanco se utilizó medio de cultivo MEM y el reactivo de WST-1.

Las concentraciones de la proteína quimérica E2-IL-18 que se utilizaron fueron 50 µg/ml, 25 µg/ml, 1.5 µg/ml y 6.25 µg/ml, las diluciones fueron preparadas con medio de cultivo MEM. Cada muestra fue realizada por triplicado y el ensayo se repitió dos veces más.

2.2.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO EN CÉLULAS HELA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1 POR MEDIO DEL ENSAYO DE T.U.N.E.L.

Se tomó un cultivo de células Hela y se ajustó la densidad celular a 500,000 células/ml, tres ml de esta suspensión se pasaron a una caja de cultivo y se incubaron 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y después de este periodo se agregó la porfirina a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó el cultivo 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂, terminado este periodo las células fueron irradiadas con luz visible por 2 h con una lámpara (BELGIUM B6 085, 120 v, 60 Hz y 0.26 A). Una vez concluida la irradiación el cultivo fue incubado por tres horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂, después las células fueron levantadas de la caja de cultivo mediante la incubación de 5 min a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ con 0.5 ml de tripsina al 0.25% y finalmente las células fueron resuspendidas en PBS a una concentración de 1.5

millones de células/ml, y después del tratamiento se paso a realizar el ensayo de marcaje de T.U.N.E.L. En este ensayo se realizó un control negativo en las mismas condiciones el cual fue las células Hela sin recibir la dosis de porfirina.

Para realizar la detección de la apoptosis primero se prepararon portaobjetos con una capa de poli-l-lisina para que las células se puedan adherir al portaobjetos, se aplicaron 200 µl de una solución de poli-l-lisina al 10% sobre la superficie de la laminilla, una vez que la solución se evaporó, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y posteriormente se dejaron secar durante 30 min. Una vez listas las laminillas se procedió a fijar las células a éstas, se aplicaron 200 µl de la suspensión celular sobre los portaobjetos y se dejó secar durante 15 min, después de este tiempo las células fueron fijadas sumergiendo los portaobjetos en un buffer de formalina al 10% durante 25 min. Después de este periodo se lavaron por inmersión en PBS por 5 min a temperatura ambiente éste lavado se realizó dos veces, después de lo cual las células fueron permeabilizadas por inmersión de los portaobjetos en una solución al 0.2% de Tritón X-100 en PBS por 5 min, después se lavó dos veces con PBS por 5 min.

Una vez que las células fueron adheridas y permeabilizadas, se procedió con el marcaje, primero las células fueron cubiertas con 100 µl de buffer de equilibrio por 10min, después se agregaron 100 µl del mix de reacción (98 µl de buffer de equilibrio, 1 µl de mix de nucleótidos biotinilados y 1 µl de enzima deoxinucleótidil terminal transferasa), los portaobjetos fueron cubiertos con un cubreobjetos de plástico para asegurar la distribución del mix de reacción, los portaobjetos se incubaron 60 min a 37°C., para que se lleve a cabo la reacción, concluida la incubación se retiraron los cubreobjetos de plástico y la reacción fue detenida por inmersión de los portaobjetos en

una solución 2X de SSC por 15 min. Posteriormente los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS por 5 min, se bloquearon las peroxidasas endógenas con una solución al 0.3% de peróxido de hidrogeno por 3 min, enseguida los portaobjetos fueron lavado 3 veces con PBS por 5 min, concluido el lavado se agregaron 100 µl de solución 1:500 de estreptavidina-HRP y se incubó por 30 min, luego los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS por 5 min, después de lo cual se procedió a realizar la reacción de coloración con 100 µl de solución DAB por 10 min. Los portaobjetos se lavaron varias veces con agua destilada y posteriormente se realizo la observación al microscopio para determinar el índice apoptótico, se contaron 8 campos y se calculó el porcentaje de las células apoptóticas tanto del control como de las células tratadas.

2.2.6 MANEJO DE LOS RESIDUOS

Se manejaron residuos tanto químicos como biológicos que se dispusieron en diversos contenedores como:

- A. Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.
- D. Tóxicos inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas liquidas, bases orgánicas y aminas.
- E. Muy tóxico, cancerígeno orgánico.
- Contenedor rojo. Residuos punzocortantes biológico-infeccioso.
- Contenedor amarillo. Residuos de órganos, tejidos, célula biológico-infecciosa.

Que se encuentran estratégicamente ubicados en el laboratorio de uso. Al final, el material biológico restante y físico reusable será esterilizado mediante calor húmedo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 CLONACIÓN DE LA PROTEINA QUIMÉRICA (E2-IL-18)

3.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

3.1.1.1 Aislamiento del ADN de células HeLa para obtención del gen E2.

Se logró obtener el ADN genómico de las células HeLa, en la figura 8 se muestra una fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de algunas muestras de ADN extraído de estas células.

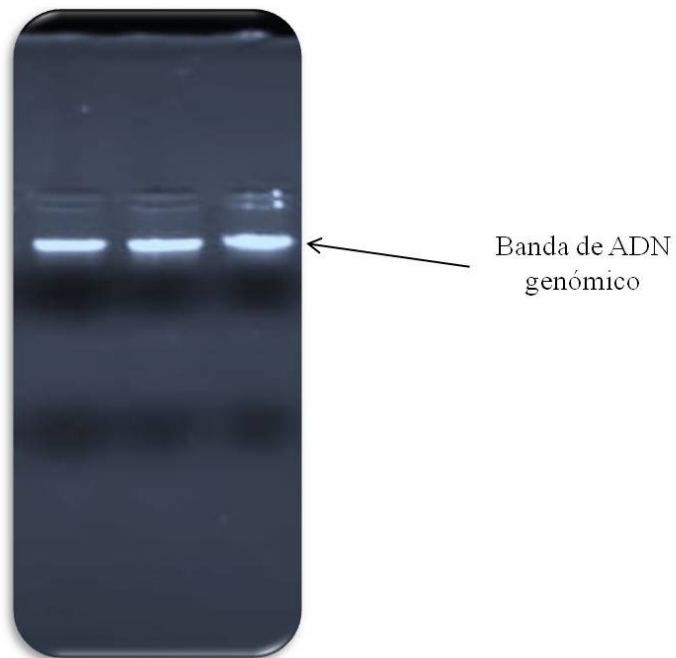


Figura 8. Electroforesis de la extracción de ADN genómico de células HeLa.

3.1.1.2 Aislamiento de monocitos y extracción de ARN para obtención del gen IL-18.

Se logró obtener el ARN total de los monocitos inducidos previamente con LPS, en la figura 9 se muestra una fotografía tomada a los monocitos en suspensión después de ser aislados los cuales fueron utilizados para la producción del gen IL-18 y en la figura 10 se muestra una fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de algunas muestras de ARN extraído de los monocitos después de ser inducidos, donde se puede observar la integridad del ARN al obtener las bandas características del ARN ribosomal sin degradación.

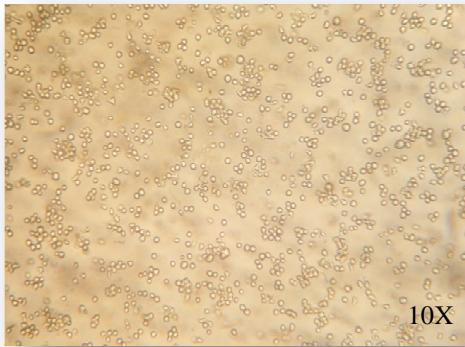


Figura 9. Monocitos en suspensión después de su aislamiento.

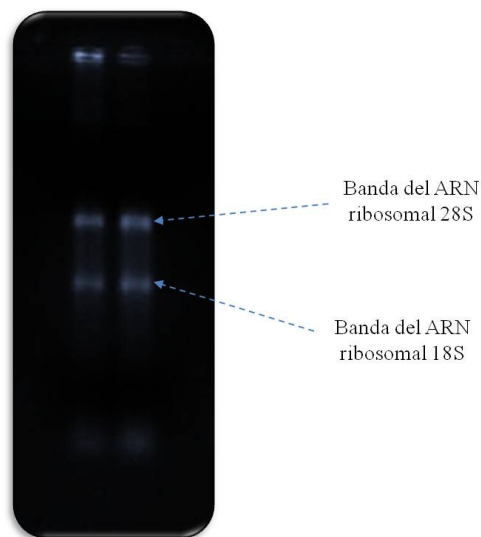


Figura 10. Electroforesis de la extracción de ARN de monocitos inducidos con LPS.

3.1.2 DISEÑO DE PRIMERS PARA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS

De acuerdo a los pasos mostrados en el apartado 2.2 se generaron los primers que flanquean las secuencias de los genes E2 del VPH e IL-18 humana. Se presentan a continuación la secuencias de los primers diseñados, estos se presentan en dirección 5'-3', incluyendo los nucleótidos que corresponden a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Kpn I (GGTACC), Xba I (TCTAGA) y Taq I (TCGA) en *itálicas* y *subrayadas*. Los primers fueron diseñados también para proveer de un espaciador entre las dos proteínas que consta de 7 residuos de aminoácidos alifáticos, esto con el objetivo de permitir que las proteínas se puedan ensamblar de la mejor manera posible para que puedan conservar su actividad (véase figura 11).

Gen E2

Primer Forward (Kpn I)

GGG GTA CCC ATG GAG ACT CTT TGC C

Primer Reverso (Taq I)

GGT CGA GAC GGC GCC TAT AGA CAT AAA TCC

GEN IL-18

Primer Forward (Taq I)

TCT CGA TCC TAG TTT ACT TTG GCA AGC TT

Primer Reverso (Xba I)

GCT CTA GAC TAG TCT TCG TTT TGA ACA G

Se presenta las secuencias de los genes amplificados, las secuencias coloreadas corresponden a las regiones donde los primers se anclan, también se presenta la fusión de las secuencias y el espaciador.

1 atggagactc tttgccaacg tttaaatgtg tgtcaggaca aaatactaac acattatgaa
61 aatgatagta cagacctacg tgacatata gactattgga aacacatgcg cctagaatgt
121 gctatttatt acaaggccag agaaatggga tttaaacata ttaaccacca agtggtgcca
181 acgctggctg tatcaaagaa taaagcatta caagcaattg aactgcaact aacgttagaa
241 acaatatata actcacaata tagtaatgaa aagtggacat tacaagacgt tagccttgaa
301 gtgtatttaa ctgcaccaac aggatgtata aaaaaacatg gatatacagt ggaagtgcag
361 tttgatggag acatatgcaa tacaatgcat tatacaaact ggacacatat atatattgt
421 gaagaagcat cagtaactgt ggtagagggt caagttgact atfatggttt atattatgt
481 catgaaggaa tacgaacata tttgtgcag tttaaagatg atgcagaaaa atatagtaaa
541 aataaagtat gggaagtca tgcgggtggt cagtaatat tatgtctac atctgtgtt
601 agcagcaacg aagtatcctc tctgaaact attaggcagc acttgccaa ccaactccgc
661 ggcaccata ccaaagccgt cgcttgggc accgaagaaa cacagacgac tatccagcga
721 ccaagatcag agccagacac cggaaacccc tgccacacca ctaagttgtt gcacagagac
781 tcagtgaca gtgctcaat cctactgca ttaacagct cacacaaagg acggattaac
841 tgtaatagta aactacacc catagtacat ttaaaagggt atgctaatac tttaaaatgt
901 ttaagatata gatttaaaaa gcattgtaa ttgtatactg cagtgtcgtc tacatggcat
961 tggacaggac ataatgtaa acataaaagt gcaattgta cacttacata tgatagtga
1021 tggcaacgtg accaattttt gtctcaagt aaaataccia aactattac agtgtctact
1081 ggatttatgt ctata ggc gcc gtc t /cg atc cta gtt tacittgcea agcttgaatc
taaattatca gtcataagaa atttgaatga ccaagttctc
61 ttcattgacc aaggaaatcg gcctctattt gaagatatga ctgattctga ctgtagagat
121 aatgcaccc cggaccatatt tattataagt atgtataaag atagccagcc tagaggtatg
181 gctgtaacta tctctgtgaa gtgtgagaaa atttcaactc tctctgtga gaacaaaatt
241 atttcttta aggaaatgaa tctctctgat aacatcaagg atacaaaaag tgacatcata
301 ttcttcaga gaagtgtccc aggacatgat aataagatgc aatttgaatc ttcacatac
361 gaaggatact ttctagcttg tgaaaaagag agagaccttt taaactcat tttgaaaaaa
421 gaggatgaat tgggggatag atctataatg ttaactgtc aaaacgaaga c

Secuencia del gen E2

Fusión de los genes

Secuencia del gen IL-18

E2		Espaciador						IL18	
Ile	Gli	Ala	Val	Ser	Ile	Leu	Val	Tir	
5' ATA	GGC	GCC	GTC	T/CG	ATC	CTA	GTT	TAC 3'	
3' TAT	CCG	CGG	CAG	AGC/	TAG	GAT	CAA	ATG 5'	

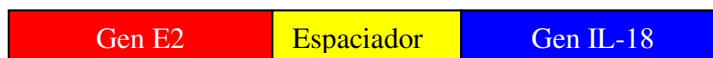


Figura 11. Secuencia espaciadora entre los genes (final E2 y principio IL-18) que genera un polipéptido espaciador en la proteína quimérica así como la fusión de los genes.

3.1.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS POR PCR

3.1.3.1 Amplificación del gen E2 por PCR.

El producto de amplificación presentó un tamaño de 1100 nucleótidos (véase figura 12) que corresponde al tamaño esperado para el gen E2 del VPH. En el carril 1 se muestra el marcador de pares de bases que presenta una escalera de fragmentos de 100 en 100 pb que van desde las 100 pb hasta las 1000pb, en los carriles 2, 3, 4 se muestran tres amplificaciones del gen E2.

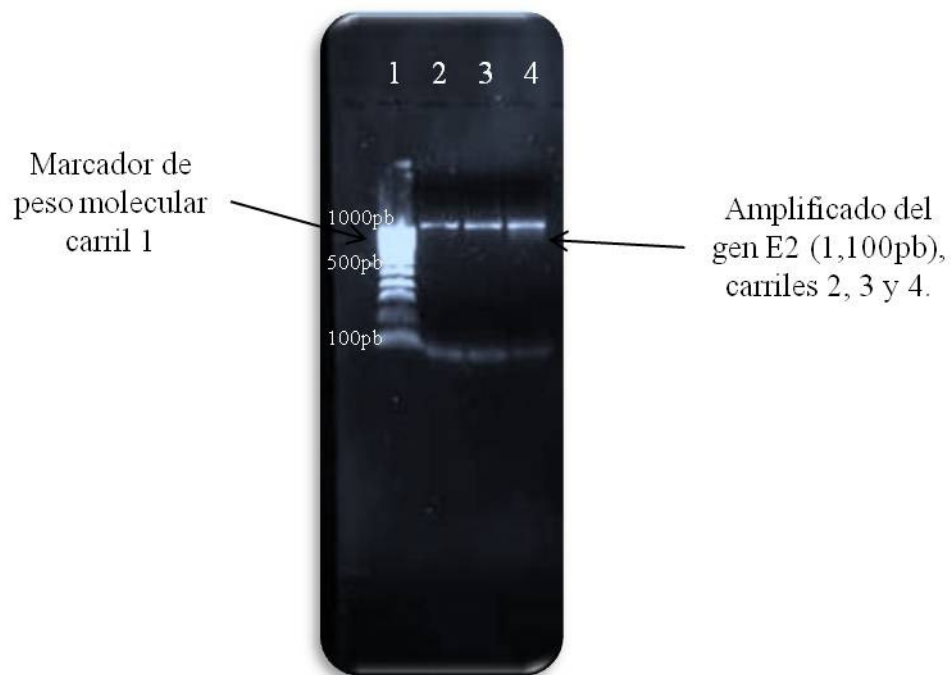


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del gen E2 (1,100 pb) del VPH.

3.1.3.2 Amplificación del gen IL-18 por PCR.

El producto de amplificación presentó un tamaño de 490 nucleótidos (véase figura 13) que corresponde al tamaño esperado para el gen IL-18 humana. En el carril 1 se muestra el marcador de pares de bases que presenta una escalera de fragmentos de 100 en 100 pb que van desde las 100 pb hasta las 1,000 pb, en el carril 2 se muestra el gen IL-18 amplificado.

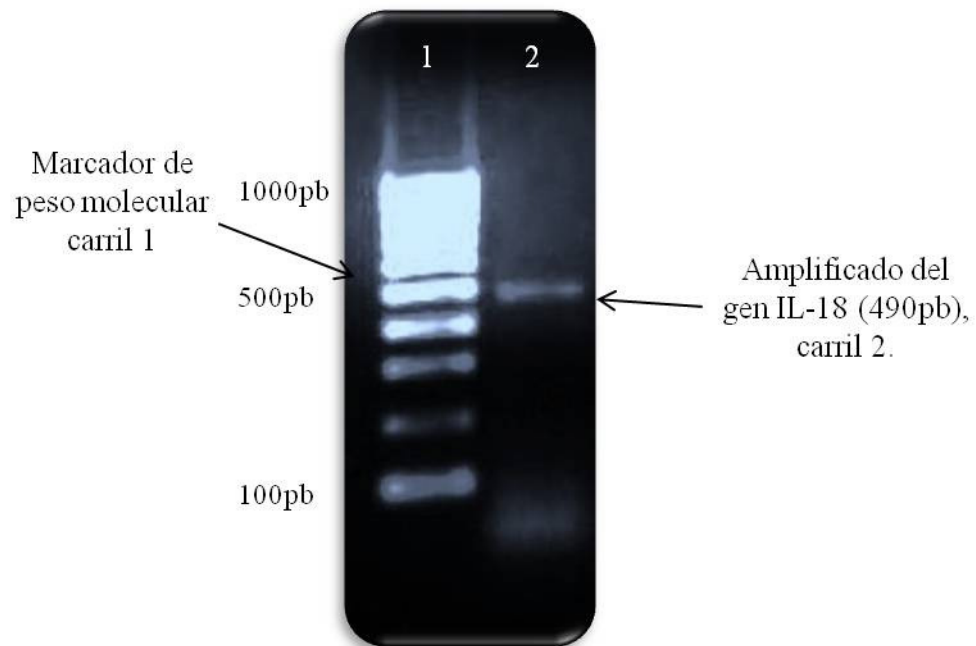


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del gen IL-18 (490 pb) humana.

3.1.4 PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS PARA SU INSERCIÓN AL VECTOR

3.1.4.1 Digestión del producto amplificado del gen E2 con las enzimas de restricción Kpn I y Taq I y 3.4.2 Digestión del producto amplificado del gen IL-18 con las enzimas de restricción Xba I y Taq I.

Los productos amplificados de los genes fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción de acuerdo con los apartados 2.4.1 y 2.4.2 (véase figura 14). En la figura 15 se muestra una representación grafica de la digestión de los genes con sus respectivas enzimas de restricción.

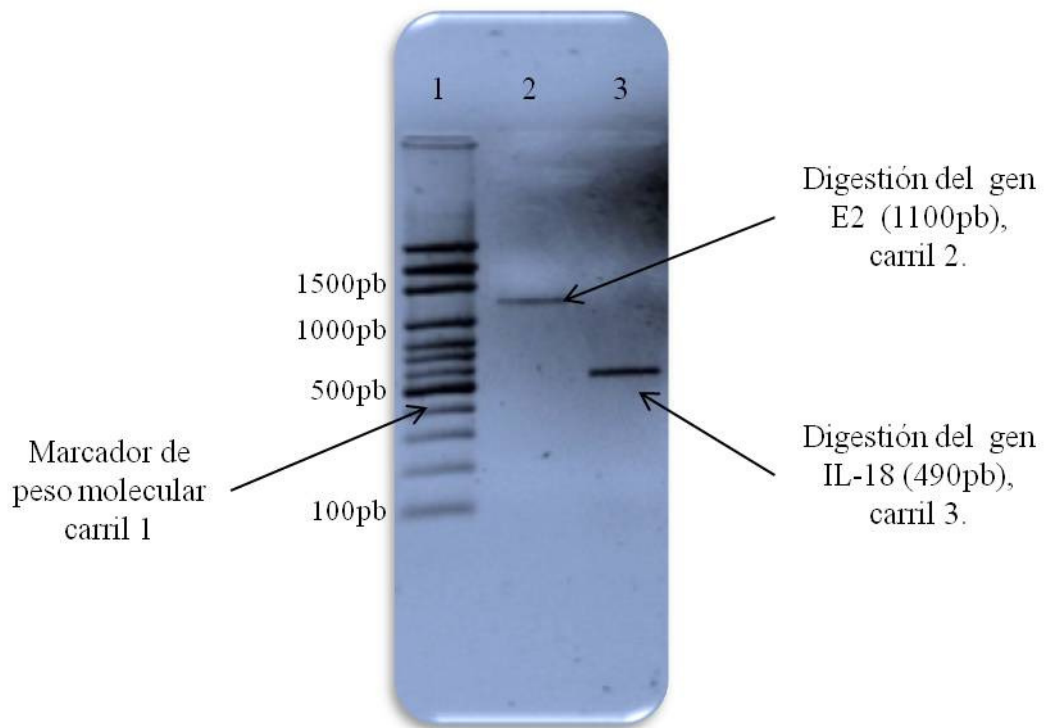


Figura 14. Digestión de los genes E2 (KpnI y TaqI) e IL-18 (TaqI y XbaI) con sus respectivas enzimas de restricción y su posterior purificación.

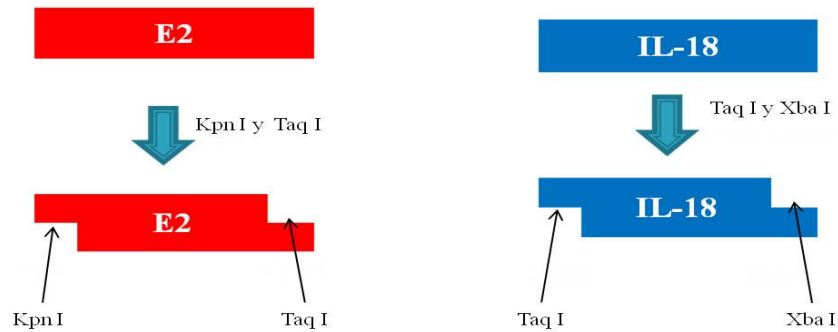


Figura 15. Representación grafica de la digestión de los genes E2 e IL-18.

3.1.5 PREPARACIÓN DEL VECTOR PLASMÍDICO pThioHis B

3.1.5.1 Extracción del vector pThioHis B después de su propagación.

En la figura 16 se muestra la electroforesis en gel de agarosa después de la extracción del ADN plasmídico de las bacterias que fueron transformadas con el objetivo de propagar el vector de expresión.

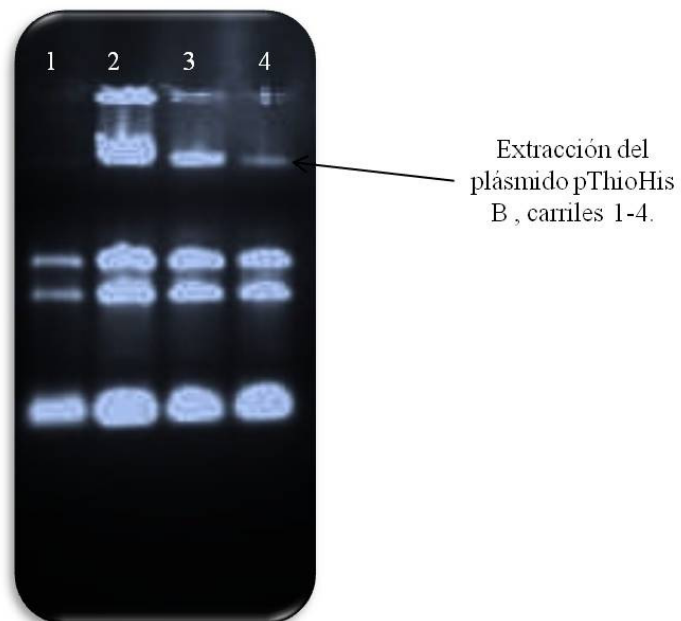


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN plasmídico.

3.1.5.1 Digestión del vector pThioHis B con las enzimas de restricción Kpn I y XbaI.

En la figura 17 se muestra la electroforesis en gel de agarosa del plásmido pThioHis B después de ser digerido con las enzimas de restricción (apartado 2.5.5) y en la figura 18 se muestra una representación gráfica de la digestión.

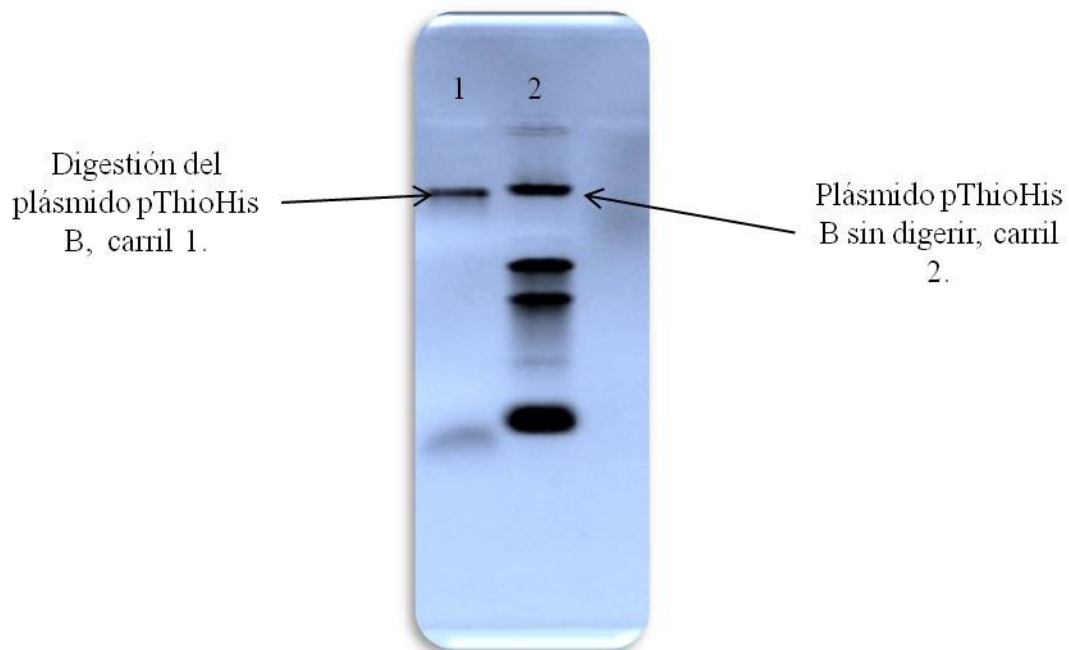
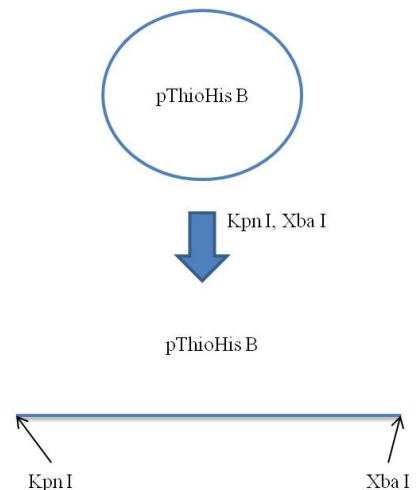


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pThioHis B digerido con las enzimas de restricción Kpn I y Xba I.

Figura 18. Representación gráfica de la digestión del plásmido pThioHis B.



3.1.6 CLONACIÓN MOLECULAR

3.1.6.1 Reacción de ligación de los insertos y el vector.

Se realizó la reacción de ligación de los genes E2, IL-18 y el plásmido pThioHis B catalizada por la enzima T4 ligasa, en la figura 19 se muestra la representación gráfica de la ligación, después de la ligación se realizó la transformación bacteriana.

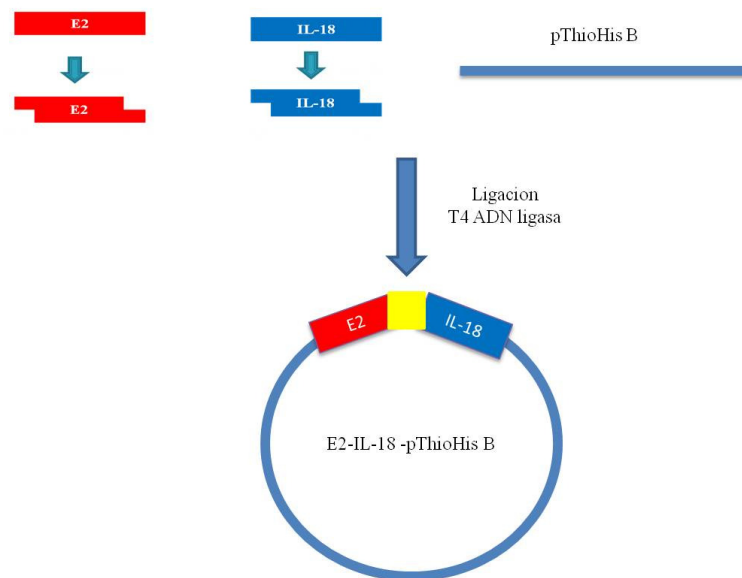


Figura 19. Esquema de clonación.

3.1.6.2 Caracterización de las clonas recombinantes

Después de la transformación bacteriana, se levantaron las colonias en 4 ml de LB/Amp 25 µg/ml y se procedió a caracterizar las clonas para observar si presentaban el inserto con los genes fusionados, para ello se realizó extracción de ADN plasmídico y se corrió una electroforesis en gel de agarosa para observar el tamaño de los plásmidos (véase figura 20) y además se realizó un par de PCR's para observar si el plásmido seleccionado contenía los genes de interés (véase figura 21), en el panel A se pueden observar los genes amplificados por separado tanto E2 e IL-18 y en panel B se observa

la amplificación de la fusión génica E2-IL-18, también se observan bandas inespecíficas debido a las condiciones de la reacción. Finalmente se seleccionó una clona que contiene el plásmido recombinante con la fusión de los genes.

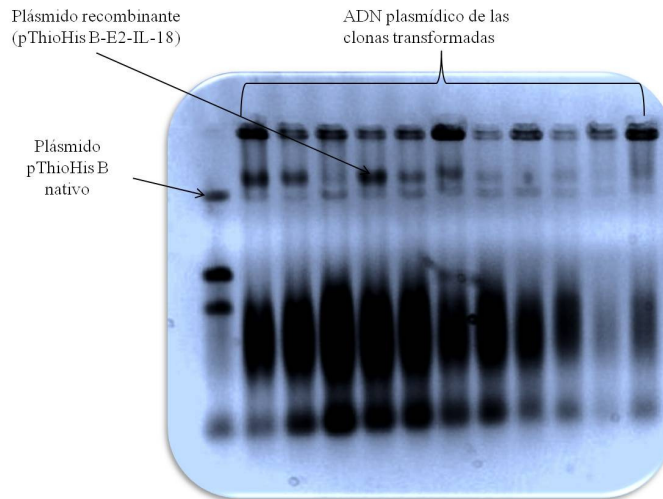


Figura 20. Electroforesis de la extracción del vector pThioHis B-E2-IL-18 presente en las clonas positivas.

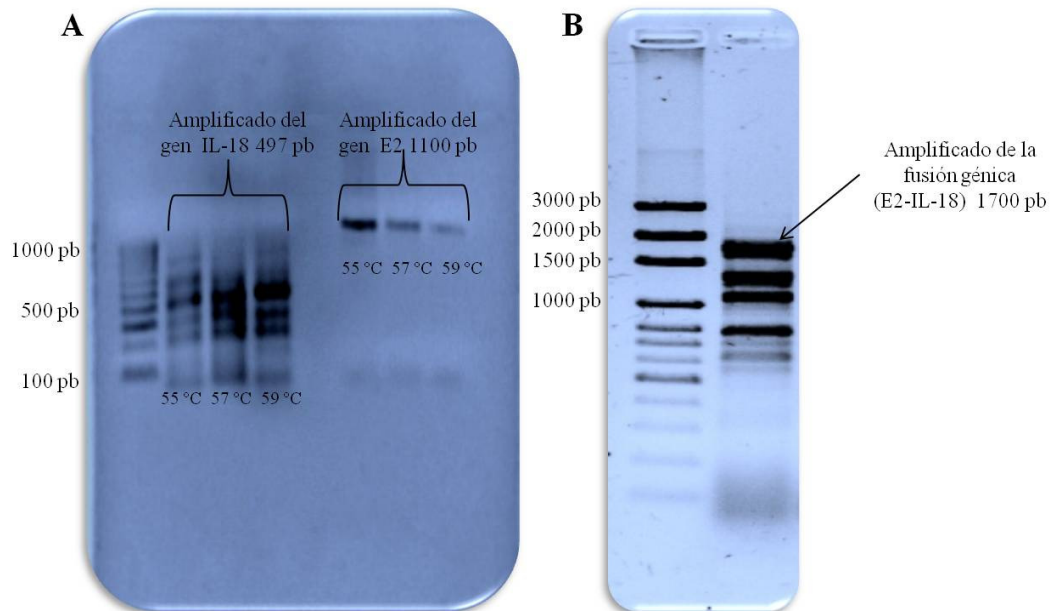


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de confirmación de la integración de los genes E2 y IL-18 en la clona recombinante. A) Amplificación de los genes E2 e IL-18 por separado. B) Amplificación de la integración de los genes E2 e IL-18.

3.1.7 EXPRESIÓN PILOTO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA

Se realizó el estudio de expresión de la proteína quimérica E2-IL-18 de la clona seleccionada, se tomaron muestras a las 0, 2, 4 y 6 horas después de la adición del IPTG, las muestras se lisaron y se cuantificó la cantidad de proteínas presentes por el método de Lowry (véase cuadro XXII), posteriormente se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para observar el estudio de inducción (véase figura 22).

Fracción	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]
Soluble T: 0h	758
Soluble T: 2h	1033
Soluble T: 4h	1263
Soluble T: 6h	1433
Insoluble T: 0h	554
Insoluble T: 2h	1055
Insoluble T: 4h	1633
Insoluble T: 6h	1447

Cuadro XXII. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry de las muestras de la expresión piloto de la proteína.

3.1.8 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

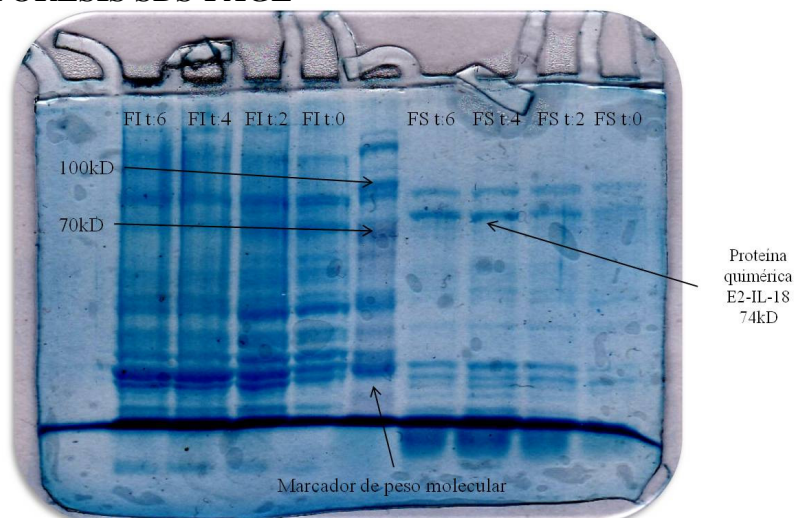


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras tomadas en la expresión piloto de la proteína quimérica.

3.1.9 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE FUSIONADA A LA TIOREDOXINA

La proteína de fusión fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas empacadas con níquel, de las que fue eluída utilizando concentraciones crecientes de imidazol. Se determinó la concentración de cada fracción por el método de Lowry (véase cuadro XXIII) y se utilizó para el ensayo de actividad biológica la fracción que presentó la mayor concentración en este caso la fracción 1.

Fracción	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]
1	52.25
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	16.5
10	8.5
11	4.75

Cuadro XXIII. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry de las muestras de la purificación de la proteína recombinante quimérica.

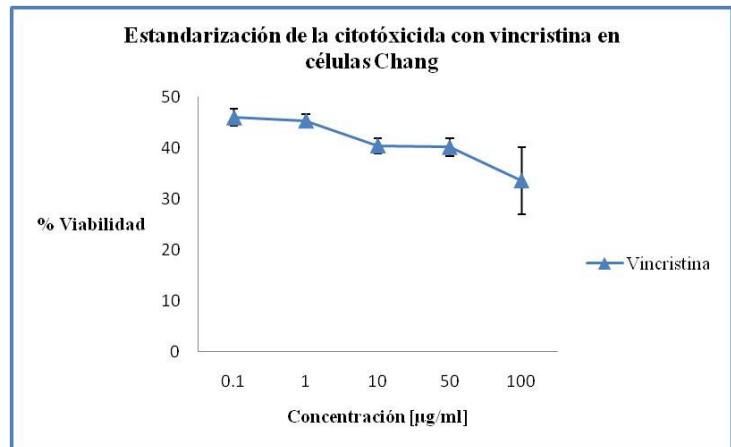
3.2 RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3.2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA CON LA VINCRISTINA

Se estandarizaron los métodos de evaluación de la actividad anticancerígena y la citotoxicidad con ayuda del fármaco antitumoral vincristina, además de utilizarlo también como referencia en los ensayos. La vincristina se seleccionó como control para comparar sus efectos contra los compuestos en estudio, a pesar de que dichas moléculas pudiesen presentar distintos mecanismos de acción, sin embargo al no ser un objetivo del presente trabajo comparar los mecanismos de acción sino solamente la actividad citotóxica, además por el difícil acceso a compuestos con posibles mecanismos similares a los estudiados aquí, se decidió probar la vincristina.

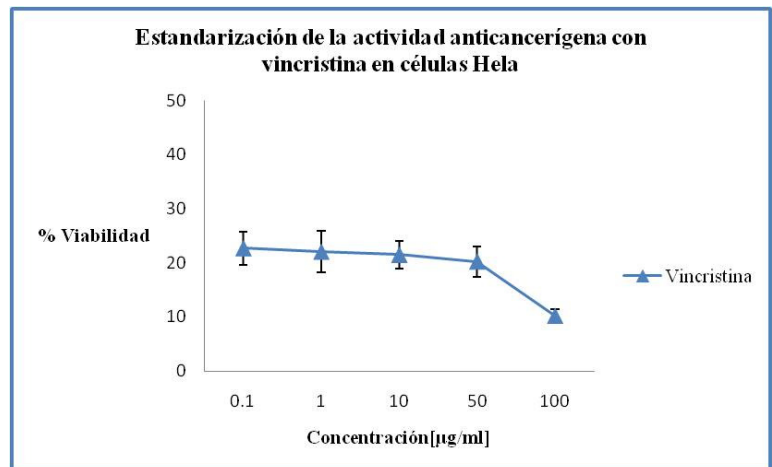
La citotoxicidad fue evaluada en células Chang (ATCC: CCL-13) y los resultados de la misma se presentan en el cuadro XXIV y la figura 23, mientras que los resultados de la actividad anticancerígena medida en células Hela (ATCC: CCL-2) se presentan en el cuadro XXV y la figura 24.

Vincristina	
Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad
100	33.5 \pm 6.5
50	40.1 \pm 1.7
10	40.4 \pm 1.5
1	45.3 \pm 1.2
0.1	45.9 \pm 1.6



Cuadro XXIV y figura 23. Estandarización de la citotoxicidad con la vincristina en células Chang mediante el ensayo de WST-1.

Vincristina	
Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad
100	10.2 \pm 1.3
50	20.3 \pm 2.8
10	21.5 \pm 2.5
1	22.1 \pm 3.9
0.1	22.7 \pm 3.1

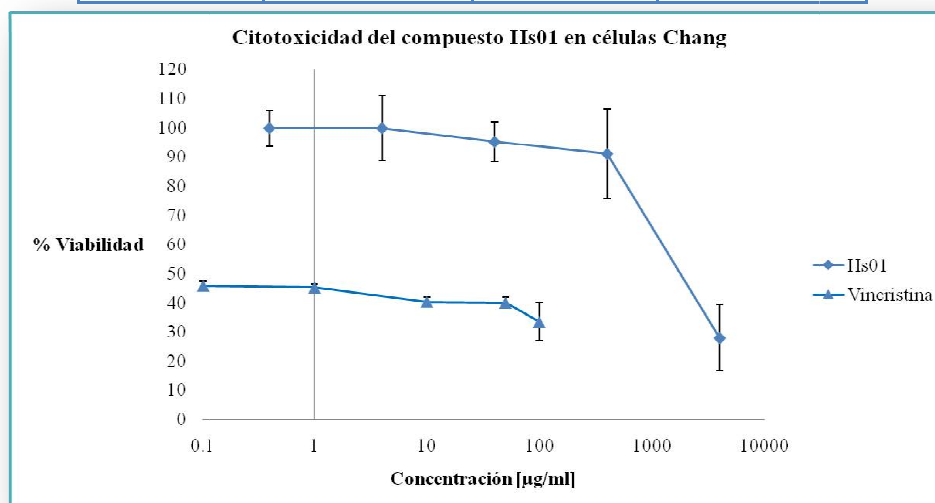


Cuadro XXV y figura 24. Estandarización de la actividad anticancerígena con la vincristina en células Hela mediante el ensayo de WST-1.

3.2.2 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DEL COMPUESTO Hs01 DE LA PLANTA *H. sabdariffa*

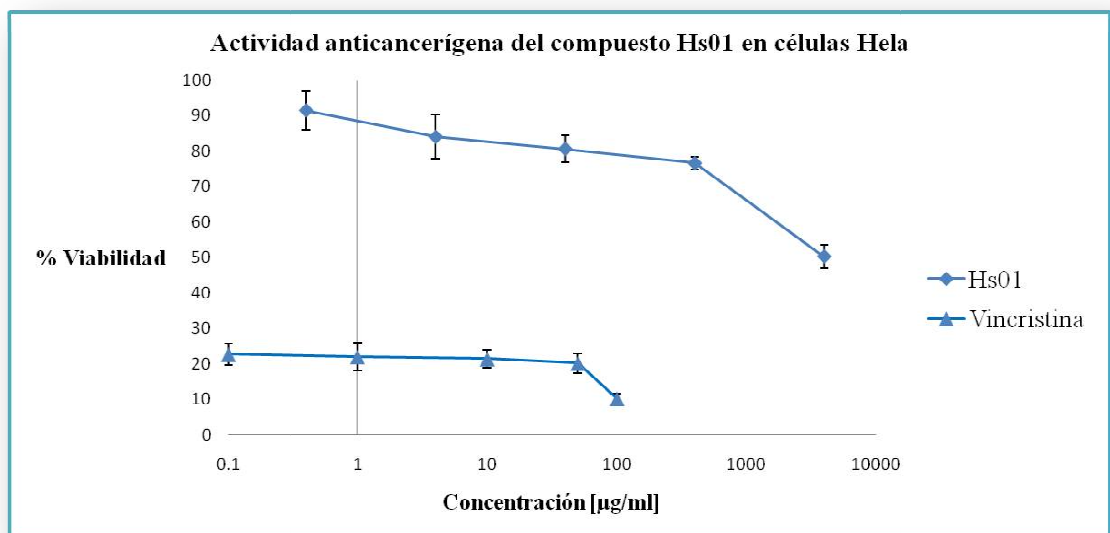
Se determinó la citotoxicidad del compuesto Hs01 en células Chang (ATCC: CCL-13) y la actividad anticancerígena en células Hela (ATCC: CCL-2) mediante el ensayo de WST-1. Los resultados de citotoxicidad se presentan en el cuadro XXVI y la figura 25 y los resultados de la actividad anticancerígena se presentan en el cuadro XXVII y la figura 26.

Compuesto Hs01		Referencia Vincristina	
Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad	Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad
4000	27.9 \pm 6.2	100	33.5 \pm 6.5
400	91.1 \pm 11.1	50	40.1 \pm 1.7
40	95.2 \pm 6.8	10	40.4 \pm 1.5
4	99.8 \pm 15.3	1	45.3 \pm 1.2
0.4	99.9 \pm 11.3	0.1	45.9 \pm 1.6



Cuadro XXVI y Figura 25. Determinación de la citotoxicidad del compuesto Hs01 de la planta *H. sabdariffa* en células Chang mediante el ensayo de WST-1.

Compuesto Hs01		Referencia Vincristina	
Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad	Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad
4000	50.3 \pm 3.4	100	10.2 \pm 1.3
400	76.7 \pm 1.8	50	20.3 \pm 2.8
40	80.1 \pm 3.7	10	21.5 \pm 2.5
4	84.1 \pm 6.2	1	22.1 \pm 3.9
0.4	91.5 \pm 5.5	0.1	22.7 \pm 3.1

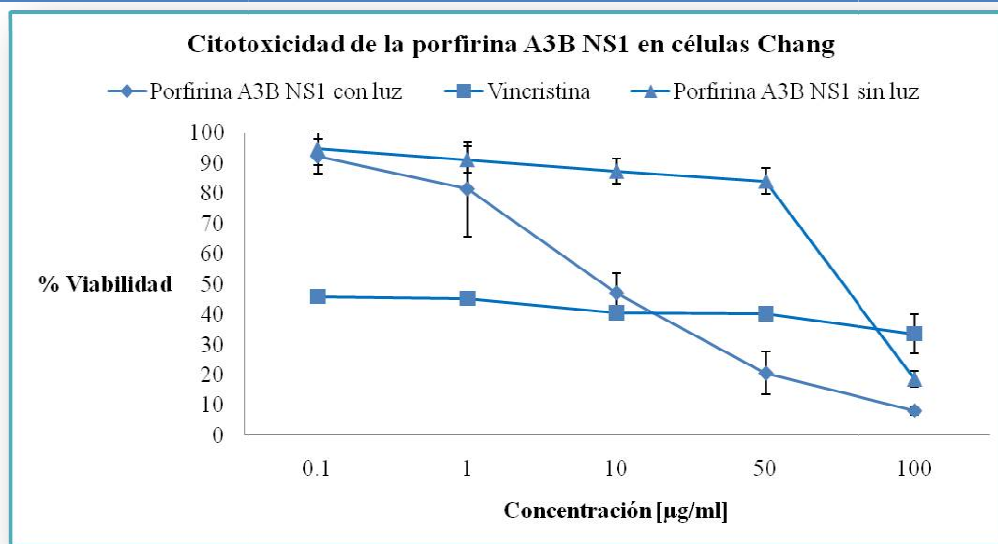


Cuadro XXVII y figura 26. Determinación de la actividad anticancerígena del compuesto Hs01 de la planta *H. sabdariffa* en células Hela mediante el ensayo de WST-1.

3.2.3 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1

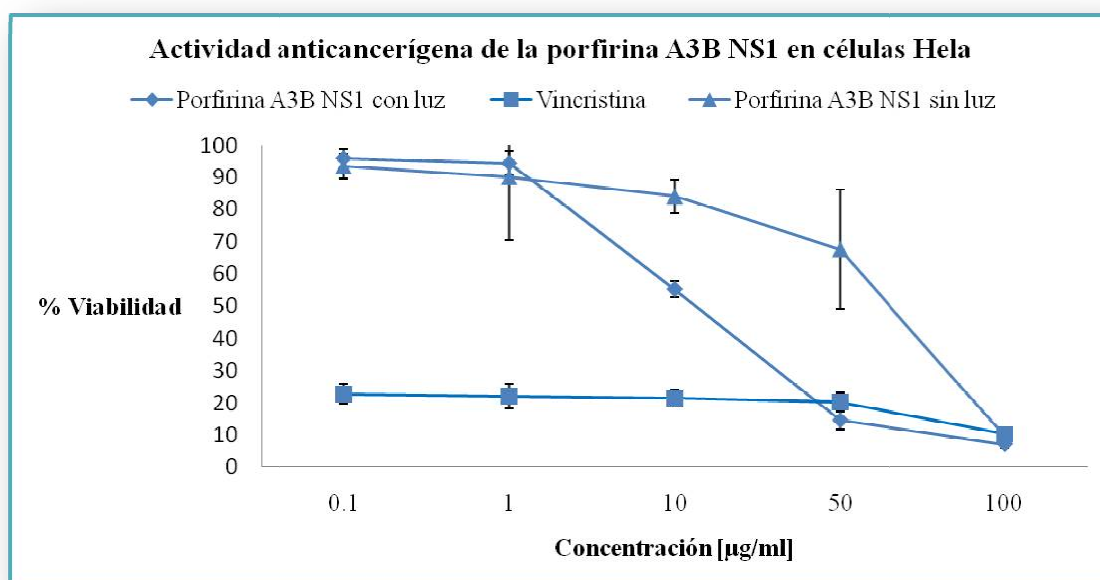
Se determinó la citotoxicidad de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Chang (ATCC: CCL-13) y la actividad anticancerígena en células Hela (ATCC: CCL-2) mediante el ensayo de WST-1, se probó la porfirina no simétrica A3B NS1 sin activación y con activación por medio de irradiación con luz visible por 2 h. Los resultados de citotoxicidad se presentan en el cuadro XXVIII y la figura 27 y los resultados de la actividad anticancerígena se presentan en el cuadro XXIX y la figura 28.

Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	Porfirina A3B NS1 con luz	Porfirina NS1 A3B sin luz	Referencia Vincristina
100	8.1 \pm 1.2	18.6 \pm 2.7	33.5 \pm 6.5
50	20.1 \pm 7.1	84.1 \pm 4.3	40.1 \pm 1.7
10	47.1 \pm 6.5	87.3 \pm 4.2	40.4 \pm 1.5
1	81 \pm 15.6	91.2 \pm 4.5	45.3 \pm 1.2
0.1	92.1 \pm 5.7	94.8 \pm 2.8	45.9 \pm 1.7



Cuadro XXVIII y figura 27. Determinación de la citotoxicidad de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Chang mediante el ensayo de WST-1.

Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	Porfirina A3B NS1 con luz	Porfirina A3BNS1 sin luz	Referencia Vincristina
	% de viabilidad		
100	7.1 \pm 1.1	9.6 \pm 2.3	10.2 \pm 1.3
50	14.5 \pm 5.1	67.7 \pm 18.5	20.3 \pm 2.8
10	55.2 \pm 5.9	84.1 \pm 5.2	21.5 \pm 2.5
1	94.4 \pm 12.6	90.1 \pm 19.7	22.1 \pm 3.9
0.1	95.9 \pm 8.7	93.5 \pm 3.9	22.7 \pm 3.1

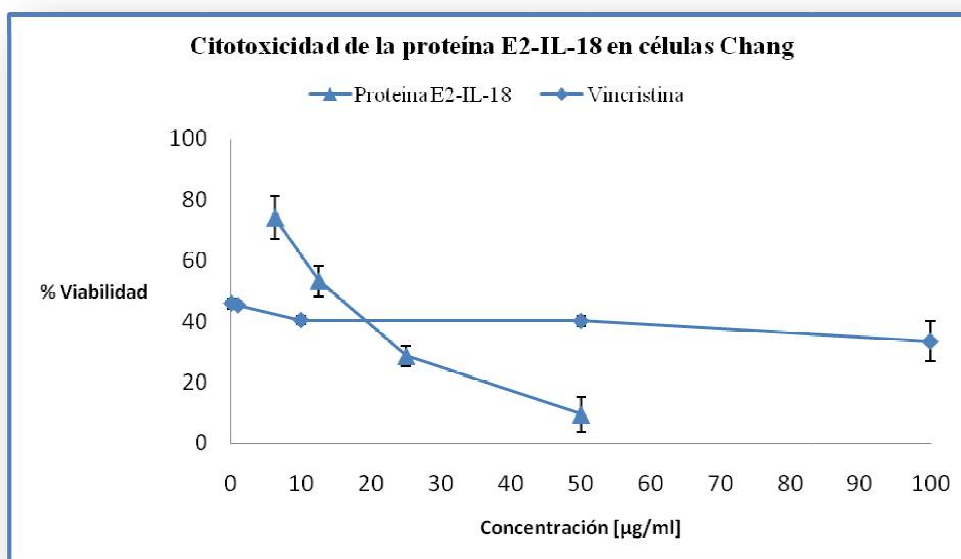


Cuadro XXIX y figura 28. Determinación de la actividad anticancerígena de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Hela mediante el ensayo de WST-1.

3.2.4 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS CHANG Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN CÉLULAS HELA DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2- IL-18

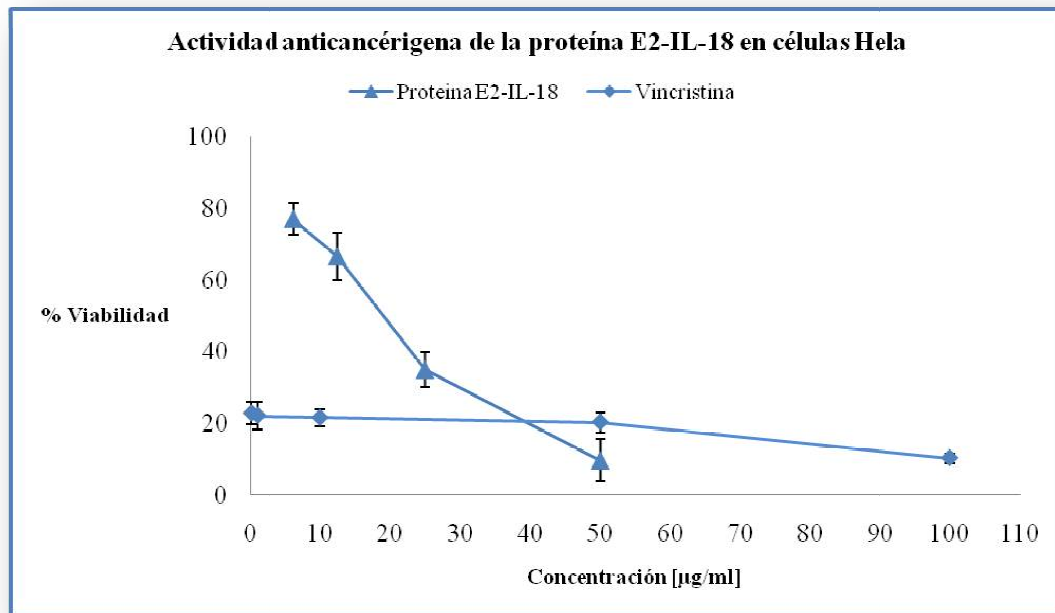
Se determinó la citotoxicidad de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Chang (ATCC: CCL-13) y la actividad anticancerígena en células Hela (ATCC: CCL-2) mediante el ensayo de WST-1. Los resultados de citotoxicidad se presentan en el cuadro XXX y la figura 29 y los resultados de la actividad anticancerígena se presentan en el cuadro XXXI y la figura 30.

Proteína E2-IL-18		Referencia Vincristina	
Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad	Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad
50	9.52 \pm 5.7	100	33.5 \pm 6.5
25	28.7 \pm 3.3	50	40.1 \pm 1.7
12.5	53.4 \pm 5.1	10	40.4 \pm 1.5
6.25	74.1 \pm 7.1	1	45.3 \pm 1.2



Cuadro XXX y figura 29. Determinación de la citotoxicidad de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Chang mediante el ensayo de WST-1.

Proteína E2-IL-18		Referencia Vincristina	
Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad	Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	% de viabilidad
50	9.64 \pm 6.1	100	10.2 \pm 1.3
25	34.8 \pm 4.8	50	20.3 \pm 2.8
12.5	66.5 \pm 6.9	10	21.5 \pm 2.5
6.25	77.1 \pm 4.38	1	22.1 \pm 3.9



Cuadro XXXI y figura 30. Determinación de la actividad anticancerígena de la proteína quimérica E2-IL-18 en células Hela mediante el ensayo de WST-1.

3.2.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO EN CÉLULAS HELA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LA PORFIRINA NO SIMETRICA A3B NS1 POR MEDIO DEL ENSAYO DE T.U.N.E.L

Se determinó el índice apoptótico en células Hela después de ser tratadas con la porfirina no simétrica A3B NS1a a una concentración final de 20 µg/ml. Este se determinó por medio del ensayo de T.U.N.E.L.(véase figura 31). Y en la figuras 32 y 33 se muestra una fotografía del ensayo tomada con un aumento 15X tanto del control como de la muestra respectivamente.

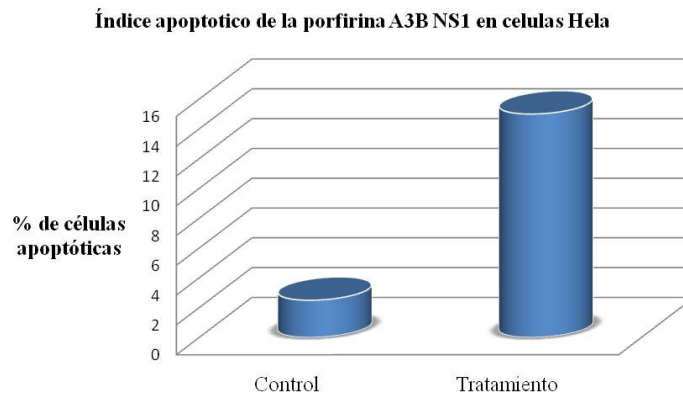


Figura 31. Determinación del índice apoptótico de la porfirina no simétrica A3B NS1 en células Hela por el ensayo de T.U.N.E.L.

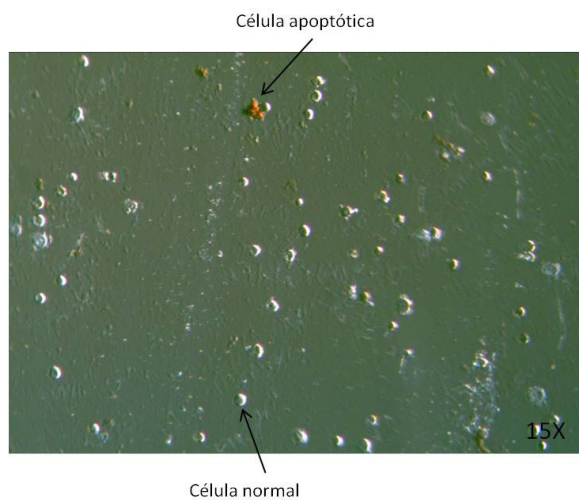


Figura 32. Fotografía del control en el ensayo de apoptosis.

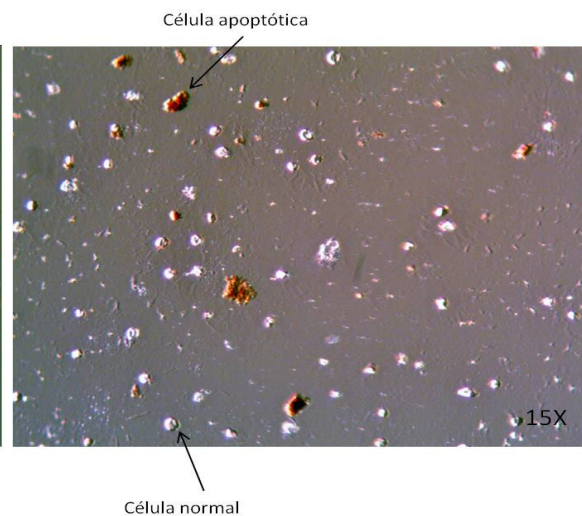


Figura 33. Fotografía del tratamiento con la porfirina NS1 en el ensayo de apoptosis.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 EL COMPUESTO HS01 DE LA PLANTA *H. sabdariffa*

El uso de productos naturales como agentes antineoplásicos tiene su inicio en la medicina tradicional que después de algunos años han sido incorporados a la medicina actual. Se han identificado acciones farmacológicas de la planta *H. sabdariffa* entre los cuales destacan efectos antihipertensivos, antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorio, hipolipemiantes, entre otros.^{83, 85} En diversos extractos de la planta *H. sabdariffa* se ha identificado que poseen la capacidad de reducir la capacidad de mutagenicidad de diversos compuestos como aminas heterocíclicas, 1 -nitropireno, tetraciclina y acetato metilazoximetanol, además de los extractos metanólico han presentando citotoxicidad sobre células Hep3 B (Carcinoma Hepatocelular) y HL-60 (Leucemia Humana).^{84, 85, 88}

Por otro lado se ha demostrado que los antocianinos presentes en la flor de jamaica presentan un efecto protector contra los compuestos carcinogénicos, incluidos el *tert*-butil-hidroperóxido y 2, 4-dinitrofenilhidrazina. También se ha reportado que inhiben la proliferación e inducen apoptosis en células de adenocarcinoma gástrico humano. La

delfinidina-3-sambubiosido antocianino aislado de *H. sabdariffa* induce apoptosis en células de leucemia humana (HL-60).^{99, 99, 101}

Otro compuesto el ácido protocatéquico ha sido estudiado y se ha demostrado en estudios *in vivo* que protege del daño de diversos compuestos carcinogénicos, incluyendo la dietilnitrosamina en el hígado a una concentración de 500 y 1000 µg/ml⁹¹, 4-nitroquinolina-1-óxido en la cavidad oral a una concentración de 500, 1000 µg/ml y 2000 µg/ml⁹², azoximetano en el colon a una concentración de 1000 y 2000 µg/ml⁹³, N-metil-N-nitrosourea en tejido del estómago glandular⁹⁴ y N-butil- N-(4-hidroxibutil) nitrosamina en la vejiga a una concentración de 500, 1000 µg/ml y 2000 µg/ml⁹⁵. El ácido protocatéquico también inhibe la progresión de las células de leucemia humana (HL-60) y presenta una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 4.5 µg/ml y nuestro compuesto requiere una concentración de 4000 µg/ml para reducir la viabilidad celular al 50% en células Hela, aunque los resultados son en líneas celulares cancerígenas diferentes nuestro compuesto presenta una CI₅₀ muy superior al ácido protocatéquico (CI₅₀ 4.5 µg/ml) por lo que podemos inferir que nuestro compuesto no presenta actividad anticancerígena.⁹⁶

4.2 LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1

Comparamos la citotoxicidad de la porfirina activada y no activada y encontramos una diferencia considerable en las CI₅₀ 15 µg/ml para la porfirina activada y 70 µg/ml para la porfirina sin activar, por lo que se puede apreciar que la fotoactivación es el requisito principal para la actividad citotóxica de la porfirina, esto también es importante porque gracias a esto la terapia fotodinámica produce menos efectos secundarios ya que

solo se irradia el tejido tumoral y es ahí donde se producen los efectos citotóxicos, por lo tanto los demás tejidos son poco dañados. Los efectos de la porfirina no simétrica A3B NS1 también fueron comparados en dos tipos celulares, en células Chang (células hepáticas) y células Hela (células de carcinoma cervical) los resultados de citotoxicidad tanto de la porfirina activada (Hela CI_{50} 15 $\mu\text{g/ml}$, Chang CI_{50} 9 $\mu\text{g/ml}$) y sin activar (Hela CI_{50} 70 $\mu\text{g/ml}$, Chang CI_{50} 80 $\mu\text{g/ml}$) en los dos tipos celulares fueron muy similares, dado que los efectos fueron estudiados *in vitro* no se puede comparar la captación celular selectiva por parte de la células tumorales, para ello se requiere realizar estudios *in vivo* para poder observar si se daba una captación selectiva en los tejidos tumorales.^{70, 72, 78}

La vincristina un agente antineoplásico fue utilizado como referencia para comparar los efectos citotóxicos, la porfirina no simétrica A3B NS1 activada presentó una CI_{50} de 15 $\mu\text{g/ml}$ en células Hela y 9 $\mu\text{g/ml}$ en células Chang y la vincristina presentó una CI_{50} de < 0.1 $\mu\text{g/ml}$ en las dos líneas celulares, aunque la vincristina presenta una CI_{50} menor que la porfirina no simétrica A3B NS1 y por lo tanto la vincristina es mas citotóxica, la porfirina se presenta como opción para el tratamiento contra el cáncer ya que la porfirina activada a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ elimina al 70% de las células y estos son porcentajes de inhibición similares a la vincristina, pero dado que el mecanismo de citotoxicidad de la porfirina requiere de la activación y esta es dada solo sobre el tejido tumoral y es allí donde se dan los efectos citotóxicos y en los demás tejidos el efecto es mínimo, es por eso que también se probó la citotoxicidad intrínseca de la porfirina es decir sin activación y a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ inhibe solo el 20% de las células y ya que la vincristina tiene efectos citotóxicos iguales sobre casi todo los tipos

celulares, es decir que no discrimina entre células tumorales y normales por lo que sus efectos secundarios son mayores, es por eso que la porfirina se presenta como una buena opción para el tratamiento fotodinámico.

Los resultados aquí presentados son similares a otros estudios donde probaron porfirinas sintetizadas por ellos y probadas en diferentes líneas celulares. Por ejemplo en un estudio presentado en 2004 por Banfi y col., donde sintetizaron 12 porfirinas y compararon sus efectos contra el Photofrin en células HCT 116 (carcinoma colorectal), en otro estudio en el 2003 presentado por Szurko y cols., se estudiaron dos porfirinas sobre células de melanoma humano presentando resultados similares, en otro reporte en 2008 presentado por Cheng-Liang y cols., se estudiaron 6 porfirinas en células Hela midiendo su citotoxicidad tanto activadas como no activadas presentando resultados similares a los resultados obtenidos en esta investigación.^{70, 72}

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo de identificación de apoptosis, las células Hela tratadas con la porfirina no simétrica A3B NS1 a una concentración final de 20 $\mu\text{l/ml}$ presentaron un porcentaje de células apoptóticas del 15%, mientras que el control presentó solo un 2.5%, lo que nos indica la presencia considerable de apoptosis en las células tratadas comparada con el control. Algunos estudios han documentado la presencia de apoptosis (Banfi y cols. 2004, Szurko y cols. 2003, Wawrzynska y cols. 2010) generada por el tratamiento de diferentes agentes fotosensibilizadores, por lo cual los resultados obtenidos en esta investigación están en concordancia con estos estudios.

4.3 LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-IL-18

La proteína quimérica E2-IL-18 presentó una CI_{50} de 18 $\mu\text{g/ml}$ sobre células Hela y de 12 $\mu\text{g/ml}$ sobre células Chang. Al comparar estos valores con los de la vincristina, que presentó una $CI_{50} < 0.1 \mu\text{g/ml}$, se podría deducir en primera instancia que la proteína quimérica tiene un potencial mucho menor que el control como agente citotóxico. Sin embargo, la finalidad global al diseñar esta quimérica polipeptídica fue la de evaluar tanto su actividad reguladora a nivel genético por acción de E2 sobre E6 y E7 que son los genes potenciadores de la actividad oncogénica en cáncer de cérvix por el VPH, como sería el caso del modelo de células Hela; pero además evaluar el efecto sinérgico de dicha actividad con el poder inmunomodulador de IL-18, al ser un potenciador de la respuesta inmune. En el presente trabajo, no fue posible llevar a efecto dicha experimentación por lo limitado del modelo, ya que se manejaron líneas celulares como sistemas *in vitro* y no modelos de rebanadas de tejidos u órganos o animales completos como sistemas *in vivo* que permitiesen evaluar tanto el efecto inmunomodulador sobre un tipo especial de células como el efecto regulador genético sobre otro tipo celular diferente.

Una perspectiva del presente trabajo sería probar dicho modelo *in vivo* y además evaluar el efecto de E2 directamente sobre la producción de E6 y E7 e IL-18 sobre la producción de una respuesta inmune celular y humoral, pues en el presente trabajo solo se midió la citotoxicidad.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- El compuesto Hs01 de la planta *H. Sabdariffa* mostró una CI_{50} de 4,000 $\mu\text{g/ml}$, que al ser comparado contra la vincristina ($CI_{50} < 0.1 \mu\text{g/ml}$), queda muy por encima.
- La porfirina no simétrica A3B NS1 activada con irradiación de luz visible presenta actividad anticancerígena notable (CI_{50} de 15 $\mu\text{g/ml}$), aunque los efectos anticancerígenos de la vincristina son mayores ($CI_{50} < 0.1 \mu\text{g/ml}$).
- Los resultados de citotoxicidad intrínseca, es decir sin activación de la porfirina no simétrica A3B NS1 (CI_{50} 70 $\mu\text{g/ml}$) muestran que ésta no es reactiva en estas condiciones.
- La porfirina no simétrica A3B NS1 induce un 15% de apoptosis en células Hela.

- Se logró la clonación de la proteína quimérica E2-IL-18 así como su purificación mediante cromatografía de afinidad.
- La proteína quimérica E2-IL-18 presenta una actividad anticancerígena con una CI_{50} de 18 $\mu\text{g/ml}$.
- La proteína quimérica E2-IL-18 no mostró selectividad hacia las células de cáncer de cérvix, ya que presentó los mismos efectos citotóxicos en la línea celular Hela y en la línea celular Chang.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

6.1 EL COMPUESTO HS01 DE LA PLANTA *H. sabdariffa*

A pesar de que el compuesto Hs01 de la planta *H. sabdariffa* no presenta una importante actividad anticancerígena no se puede terminar con su estudio, ya que sería necesario determinar sus efectos en otras líneas celulares cancerígenas. También se puede analizar si este compuesto presenta actividad antioxidante ya que proviene del extracto metanólico de la planta que se ha comprobado que tiene una importante actividad antioxidante, por lo que se pudiera medir esta actividad y si el compuesto tuviera actividad antioxidante importante poder darle una aplicación.

La planta *H. sabdariffa* ofrece importantes perspectivas en el estudio de compuestos que puedan poseer actividad citotóxica o antioxidante, es por eso que se debe continuar con el aislamiento y caracterización de compuestos que se encuentran en la planta que pueden presentar estas actividades para poderlos utilizar en algunos tratamientos,

también es importante continuar con estudios sobre el ácido protocatéquico y la delfidina-3-sambubiosido que son dos compuestos de la planta y que se ha demostrado que tienen actividad inhibitoria del crecimiento en células de leucemia humana, es por eso que sería interesante abundar sobre los posibles mecanismos de esta acción, así como estudiar si estos compuestos presentan esta actividad en otros tipos de líneas celulares neoplásicas.

6.2 LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1

Ya que la porfirina no simétrica A3B NS1 presenta una importante actividad citotóxica sobre células neoplásicas (Hela) es necesario continuar con su estudio. Una de las cosas que seguirían en el estudio de esta porfirina sería analizar sus efectos citotóxicos en otras líneas celulares cancerígenas con el objetivo de poder observar si se presentan los mismos efectos ó que en alguna línea posea una mayor citotoxicidad y así también poder comparar los efectos citotóxicos de esta en las diferentes líneas celulares cancerígenas con el objetivo de poder dirigir los posteriores estudios sobre esta porfirina.

Además de probar la porfirina en diferentes líneas celulares cancerígenas, también es importante estudiar los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo su acción, para esto sería importante hacer estudios sobre identificación de apoptosis y por qué se produce está, también estudiar la localización intracelular de la porfirina ya que esto está relacionado con su actividad citotóxica, la captación celular por las células neoplásicas, así como su afinidad a la lipoproteína de baja densidad y al receptor de benzodiazepinas ya que se ha comprobado que estas moléculas están implicadas en la biodistribución selectiva de los agentes fotosensibilizadores.

6.3 LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-IL-18

Las perspectivas de la proteína quimérica son las siguientes; es necesario realizar estudios *in vivo* para determinar si la proteína quimérica (E2-IL-18) presenta la acción buscada con su diseño de reprimir la expresión de los genes E6 y E7 del VPH así como incrementar la respuesta inmune del huésped contra las células tumorales y por consiguiente conseguir la muerte de las células tumorales. También se podría clonar las proteínas por separado y probarlas al administrarlas conjuntamente en un estudio *in vivo* para poder observar si su efecto es mayor comparado contra la quimera ya que al estar unidas las proteínas puede darse el caso que no logren un correcto plegamiento así como no poder interactuar ya sea con el ADN en el caso de la proteína E2 y con su receptor en el caso de la proteína interleucina 18 humana por ese motivo al estar las dos proteínas libres podrían presentar una actividad distinta respecto de la quimera.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. “Cáncer”. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. (Febrero 2011).
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. “Cáncer”. http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/vitales/demograficas/2008/est_demo. (2009).
3. Cooper, G., Hausman, R. La Célula, 1ª Ed. Pág. 631, 632, 633, 634. Marban Libros, S.L. ISBN: 84-7101-488-2. (2006).
4. Gerald, K. Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos, 5ª Ed. Pág. 662-686. Mc Graw Hill. ISBN 13:978-970-10-6925-7. (2008).
5. Suresh, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. Acta Materialia Inc. 3(4): 413–438. (2007).
6. Hernández, M., y Ríos, M., Oncogenes y Cáncer. Revista Cubana Oncología. 15(2):131-9. (1999).
7. Croce, C., Molecular Origins of cancer, Oncogenes and Cancer. The New England Journal of Medicine. 358:502-11. (2008).
8. Sherr, C., Principles of Tumor Suppression. Cell. Vol. 116, 235–246. (2004).
9. Hernández, M., y Ríos, M., Los Genes Supresores de Tumores y el Cáncer. Revista Cubana de Oncología. 17(1):65-71. (2001).
10. Harris, C., p53 Tumor Suppressor Gene: At the Crossroads of Molecular Carcinogenesis, Molecular Epidemiology, and Cancer Risk Assessment. Environmental Health Perspectives. Vol. 104-3. (1996).
11. Michor, F., Iwasa, Y., y Nowak, M., Dynamics of cáncer. Nature Reviews Cancer. Vol. 4. 197. (2004).
12. Nowell, P., Mechanisms of Tumor Progression. Cancer Research. 46:2203-2207. (1986).
13. Mohandas, K., Genetic Predisposition to Cancer. Current Science. Vol. 81, No. 5, 10. (2001).
14. Menendez, I., Puig, M., y Ruisánchez, N., El Retinoblastoma: Paradigma del Cáncer Hereditario. Revista Cubana Médica. 41(1):35-8. (2002).

15. Turnbull, C., y Hodgson, S., Genetic Predisposition to Cancer. *Clinical Medicine*. Vol. 5 No. 5. (2005).
16. Loeb, L., Loeb, K., y Anderson, J., Multiple Mutations and Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 100. No. 3. (2003).
17. Sheron, P., y Bharati, B., Genetic Instability in Cancer. *Atlas Genetic Cytogenetic Oncology Haematology*. Vol. 2. (2007).
18. Lengauer, C., Kinzler, K., y Vogelstein, B., Genetic Instabilities in Human Cancer. *Nature*. Vol. 396. (1998).
19. Bechman, R., y Loeb, L., Genetic instability in cancer: Theory and experiment. *Seminars in Cancer Biology*. Vol. 15. 423–435. (2005).
20. Yong, Sun, Lee, Anindya, Dutta., MicroRNAs in cáncer. *Annu Rev Pathol*. Vol. 4: 199–227. (2009).
21. Vivien, Wang, Wei, Wu., MicroRNA-Based Therapeutics for Cancer. *Biodrugs*. Vol. 23 (1): 15-23. (2009).
22. Paranjape, T., Slack, F., Weidhaas, J., MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*. 58(11): 1546–1554. (2009).
23. Chunsheng, Li, Yi, Feng, George, Coukos, Lin, Zhang. Therapeutic MicroRNA Strategies in Human Cancer. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. Vol. 11, No. 4. (2009).
24. Esteller, M., Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 358:1148-59. (2008).
25. Sánchez, K., Zazueta, V., Mendoza, C., Rangel, A., Padilla, F., Epigenética mas allá de la Genética. *Acta Universitaria*. Vol. 18 no.1. (2008).
26. Melanie, E., DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. Vol.1(2): 239–259. (2009).
27. Cheung, H., DNA Methylation of Cancer Genome. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 87(4): 335–350. (2009).
28. Sharma, S., Kelly, T., Jones, P., Epigenetics in cáncer. *Carcinogenesis*. Vol. 31 no.1 pp.27–36. (2010).
29. Hitchler, M., Domann, F., Metabolic defects provide a spark for the epigenetic switch in cancer. *Free Radic Biol Med*. Vol. 15; 47(2): 115–127. (2009).
30. Poirier, M., Chemical-Induce DNA Damage and Human Cancer Risk. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 4. (2004).
31. Gooderham, N., y Carmichael, P., Mechanisms of Chemical Carcinogenesis. *The Cancer Handbook 2nd Edition*. John Wiley & Sons, Ltd. (2007).
32. Hecht, S., Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 91. No. 14. (1999).

33. Bolet, M., y Socarras, M., Micotoxinas y Cáncer. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. Vol. 24(1):54-9. (2005).
34. Boffetta, P., y Hashibe, M., Alcohol and Cancer. *Lancet Oncol.* 7: 149–56. (2006).
35. Pöschl, G., y Seitz, H., Alcohol and Cancer. *Alcohol & Alcoholism*. Vol. 39, No. 3. (2004).
36. Bertin, G., y Averbeck, D., Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. *Biochimie*. Vol. 88. 1549–1559. (2006).
37. Asociación Americana Contra el Cáncer. <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/Queesloquecausaelcancer/Otrosagentescancerigenos/la-exposicion-a-la-radiacion-y-el-cancer>. (2010).
38. Clapp, R., Jacobs, M., Loechler, E., Environmental and Occupational Causes of Cancer New Evidence, 2005–2007. *Rev Environ Health*. 23(1): 1–37. (2008).
39. De Grujil, F., UV Radiation, DNA Damage, Mutations and Skin Cancer. *Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Model*. Vol. 57. 249-258. (2006).
40. Asociación Americana Contra el Cáncer. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002782-pdf.pdf>. (2010).
41. McLaughlin-Drubin, M., y Munger, K., Viruses Associated with Human Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1782(3): 127–150. (2008).
42. Liao, J., Viruses and Human Cancer. *Yale Journal of Biology and Medicine*. Vol. 79 pp.115-122. (2006).
43. Mbulaiteye, M., y cols., *Helicobacter Pylori* associated global gastric cancer burden. *Front Biosci*. Vol. 14. 1490–1504. (2009).
44. Selgrad, M., y cols., The Role of Viral and Bacterial Pathogens in Gastrointestinal Cancer. *J Cell Physiol*. 216(2): 378–388. (2008).
45. Martínez, E., y Pérez, C., Influencia de la edad en el desarrollo del cáncer. *RECVET*. Vol. II. N° 01-04. (2007).
46. Komarova, N., y Wodarz, D., Drug resistance in cancer: Principles of emergence and prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 102. No.27. (2005).
47. Sanchez, L., y Diosado, F., Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 41. No. 1. (2003).
48. Igney, F., y Krammer, P., Death and Anti-Death: Tumor Resistance to Apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 2. (2002).
49. Hernández, R., Telómeros y Telomerasas. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. Vol.18. No. 2. (1999).
50. Harley, C., Telomerase and Cancer Therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 8. (2008).

51. Chambers, A., y cols., Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 2. (2002).
52. Liizumi, M., y cols., Drug development against metastasis-related genes and their pathways: A rationale for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1786(2): 87–104. (2008).
53. Nishida, N., y cols. Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*. 2(3) 213–219. (2006).
54. Ma, J., y Waxman, D., Combination of Anti-angiogenesis with Chemotherapy for More Effective Cancer Treatment. *Molecular Cancer Therapy*. 7(12). 3670-3684. (2008).
55. Tonini, T., y cols. Molecular basis of angiogenesis and cáncer. *Oncogene*. 22, 6549–6556. (2003).
56. Instituto Nacional del Cáncer. E.U.A.
<http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/cancer/page8>. (2007).
57. Benedí, J., y Gómez, M., Fármacos Antineoplásicos I. *Farmacia Profesional*. Vol. 20. Núm. 2. (2006).
58. Asociación Americana Contra el Cáncer.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002995-pdf.pdf>. (2010).
59. Vega, E., Velasco, R., y Jiménez, M., Las plantas como fuente de fármacos antineoplásicos. *Bioquímica*. Vol. 31. Núm. 003. (2006).
60. Torpy, J., Radioterapia. *The Journal of the American Medical Association*. Vol. 294, No. 10. (2005).
61. Asociación Americana Contra el Cáncer.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003019-pdf.pdf> . (2010).
62. Asociación Americana Contra el Cáncer.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003022-pdf.pdf>. (2010).
63. Asociación Americana Contra el Cáncer.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003013-pdf.pdf>. (2010).
64. Murphy, J., Trends in Cancer Immunotherapy. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 4 67–80. (2010).
65. Awan, M., y Tarin, S., Review of Photodynamic Therapy. *Surgeon*. 4. 4. 231-236. (2006).
66. Zhu, T., y Finlay, J., The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical physics*. Vol. 35 No. 7. (2008).
67. Asociación Americana Contra el Cáncer.
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002988-pdf.pdf>. (2010).

68. Instituto Nacional del Cáncer. E.U.A.
<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/terapias-dirigidas>. (2006).
69. Zhu, T., y Finlay, J., The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*. Vol. 35. No. 7. (2008).
70. Banfi, S., Carusco, E., Caprioli, S., Mazzagatti, L., Canti, G., Ravizza, R., Garibaldi, M., y Monti, E., Photodynamic Effects of Porphyrin and Chlorin Photosensitizers in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Bio-organic & Medical Chemistry*. 12:4853-486. (2004).
71. López, S., Síntesis y Caracterización de Nuevas Porfirinas no Simétricas A3B con Potencial Aplicación como Fotosensibilizadores en Terapia Fotodinámica. Tesis Facultad de Ciencias Químicas de U.A.N.L. (2008).
72. Cheng-Liang, P., Ping-Shan, L., Ming-Jium, S., Influence of Substitutions in Asymmetric Porphyrins on Intracellular Uptake, Subcellular Localization and Phototoxicity in Hela Cells. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications (BME)*. 20(1):9 – 17. (2008).
73. O'Connor, A., Gallagher, W., y Byrne, A., Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 85. 1053–1074. (2009).
74. Calzavara, P., Venturini, M., y Sala, R., Photodynamic therapy: update 2006, Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*. Vol. 21. 293–302. (2007).
75. Wiedmann, M., y Caca, K., General Principles of Photodynamic Therapy (PDT) and Gastrointestinal. *Applications Current Pharmaceutical Biotechnology*. Vol. 5,397-408. (2004).
76. Castano, A., Mroz, P., y Hamblin, M., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Review Cancer*. Vol. 6. No. 7. 535–545. (2006).
77. Price, M., Reiners, J., Santiago, A., y Kessel, D., Monitoring Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical Formation with Fluorescent Probes During Photodynamic Therapy. *Photochemical Photobiology*. Vol. 85. No.5. 1177–1181. (2009).
78. Dougherty, T., Gomer, C., Henderson, B., Jori, G., Kessel, D., Korbélik, M., Moan, J., y Peng, Q. Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 90. No. 12. (1998).
79. Webber, J., Herman, M., Kessel, D., y Fromm, D., Current Concepts in Gastrointestinal Photodynamic Therapy. *Annals of Surgery*. Vol. 230. No. 1. 12–23. (1999).
80. Marchetti, P., Hirsch, T., Zamzami, N., Castedo, M., Decaudin, D., Susin, S., y cols. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *Journal Immunology*. 157:4830–6. (1996).

81. Tsuchida, T., Zheng, G., Pandey, R., Potter, W., Bellnier, D., Henderson, B., y cols. Correlation between site II-specific human serum albumin (HSA) binding affinity and murine *in vivo* photosensitizing efficacy of some Photofrin components. *Photochemical Photobiology*. 66:224–8. (1997).
82. Cragg, G., y Newman, D., Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 100. 72–79. (2005).
83. Cañiguera, L., *Fitoterapia: Vademécum de prescripción*. Elsevier España, Ed 4. ISBN 8445812203, 9788445812204. (2003).
84. Sayago, S., Arranz, S., Serrano, J. y Goñi, I. Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) Beverage. *Journal Agriculture Food Chemical*. Vol. 55, No. 19. (2007).
85. Ali, B., Wabel, N. y Blunden G. Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A Review. *Phytotherapy Research*. Vol. 19, 369–375. (2005).
86. Mahadevan, N., Kamboj, S., y Kamboj, P., *Hibiscus sabdariffa* Linn.- An overview. *Natural Product Radiance*. Vol. 8. No. 1. (2009).
87. Prenesti, E., Berto, S., Daniele, P., y Toso, S., Antioxidant power quantification and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem*. Vol. 100, 433–438. (2007).
88. Umamaheswari, A., y Govindan, N., Anticancerous effect of *Hibiscus sabdariffa* Leaves on Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep3B. *Research Journal of Medicinal Plant*. Vol. 1. No. 3. (2007).
89. Olvera, V., y cols. *Hibiscus sabdariffa* L. Extracts Inhibit the Mutagenicity in Microsuspension Assay and the Proliferation of HeLa Cells. *Journal of Food Science*. Vol. 73. No. 5. (2008).
90. Luangpirom, A., y Taweebot, N., Protective effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn. Calyx extract on tetracycline induced testicular toxicity in mice. *Animal Biology & Animal Husbandry International Journal of the Bioflux Society*. Vol. 2. No. 1. (2010).
91. Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., y cols. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Research*. 53: 2775–2779. (1993).
92. Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., y cols. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. *Cancer Research*. 54: 2359–2365. (1994).
93. Kawamori, T., Tanaka, T., Kojima, T. y cols. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Japan Journal Cancer Research*. 85: 686–691. (1994).

94. Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., y Mori H. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer Supplementary*. 75: 1433–1439. (1995).
95. Hirose, Y., Tanaka, T., Kawamori, T., y cols. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*. 16: 2337–2342. (1995).
96. Tseng, T., Kao, T., Chu, C., y cols. Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochemical Pharmacology*. 60: 307–315. (2000).
97. Tanaka, T., Tanaka, T., y Tanaka, M., Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 3(1):27-33. (2011).
98. Stagos, D., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Mitaku, S., Anagnostopoulos, K., y Kouretas, D., Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *International Journal Molecular Medicine*. 15:1013-22. (2005).
99. Wang, C., Wang, J., Lin, W. y cols. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 38: 411–416. (2000).
100. Ologundudu, A., Ologundudu, A., Oluba, O., Omotuyi, I., y Obi, F., Effect of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins on 2, 4- dinitrophenylhydrazine-induced tissue damage in rabbits *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. Vol. 2(1), pp. 1-6. (2000).
101. Ping, S., Chi, Y., y Gow, Y., Effects of anthocyanidin on inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 43. No.10. 1557-1566. (2005).
102. Xing, H., y cols. Delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 440. No. 1. (2005).
103. Sampson, J., y cols. Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)- α and a mutated form of the *Pseudomonas* exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. 65: 27–35. (2003).
104. Kawakami, M., Kawakami, K., y Puri, R., Interleukin-4-*Pseudomonas* Exotoxin Chimeric Fusion Protein for Malignant Glioma Therapy. *Journal of Neuro-Oncology*. 65: 15-25. (2003).

105. López–Saavedra, Lizano-Soberón, Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1 31-55. (2006).
106. Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., y Thierry, F., Papillomavirus E2 induce p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*. 18, 4538-4545. (1999).
107. Nishimura, A., y cols. Mechanisms of Human Papillomavirus E2-Mediated Repression of Viral Oncogene Expression and Cervical Cancer Cell Growth Inhibition. *Journal of Virology*. Vol. 74, No. 8. p. 3752–3760. (2000).
108. Wells, S., y cols. Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB and p21^{CIP} dependent pathways. *The European Molecular Biology Organization Journal*. Vol. 21. No. 21. (2000).
109. Dinarello, C., y cols. Overview of interleukin-18: more than an interferon-g inducing factor. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 63. (1998).
110. Cao, R., Farnebo, J., Kurimoto, M., y Cao, Y., Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Vol. 13. (1999).
111. Carroll, R., y cols. Distinct Effects of IL-18 on the Engraftment and Function of Human Effector CD8+ T Cells and Regulatory T Cells. *Plos One*. Vol. 3. No. 9. (2008).
112. Ausbel, F., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3a Edición, John Wiley & Sons Inc, ISBN 0-471-13781-2.
113. Zang, M., Construction, eukaryotic expression and biological activities of a recombinant single chain interleukin-12 fusion gene. *Zhonghua Ye Xue Za Zhi*.21(12):636-640. (2000).
114. Sambrook, J., *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. ISBN 0-87969-306-6. (1989).
115. Chomczynski, P., y Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. Vol. 162. No. 1. (1987).
116. Lowry, O., Rosbrough, N., Farr, A., y Randall, R., Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 183. Pag. 265-275. (1951).

APÉNDICE A

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

g	Gramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
ng	Nanogramos
N	Concentración de normalidad
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
KDa	Kilodaltones
pb	pares de bases
Kb	Kilopares de bases
L	litro
ml	Mililitro
µl	Microlitro
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario al mensajero
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
°C	Grados centígrados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
h	Horas
min	Minutos
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MEM	Medio de cultivo Mínimo Esencial Medio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Retrotranscripción
LPS	Lipopolisacaridos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
NaCl	Cloruro de Sodio
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SFB	Suero fetal bovino
TEMED	N, N, N, N, tetrametil, etilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultra violeta
V	Voltios
X	Numero de veces la concentración de la solución
A	Adenina

C	Citocina
T	Timina
G	Guanina
DNAsa	Enzima que digrada DNA
Kpn I	Enzima de restricci3n obtenida de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Xba I	Enzima de restricci3n obtenida de <i>Xanthomonas badrii</i>
Taq I	Enzima de restricci3n obtenida de <i>Thermus aquaticus</i>
DO	Densidad 3ptica
Fig	Figura
IPTG	Isopropil tio- β -D-galactosido piranosa
IL-18	Interleucina 18 humana
E2	Proteina temprana 2 del Virus del Papiloma Humano
VPH	Virus del Papiloma Humano
Hela	L3nea celular inmortal derivada de c3ncer cervical
Chang	L3nea celular derivada de tejido de h3gado Humano
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
MDM2	Prote3na por sus siglas en ingles (murine doble minute 2)
GTPasa	Guanina trifosfatasa
Ras	Oncog3n Ras
p53	Gen p53 o prote3na p53
RB	Retinoblastoma
G1	Fase G1 del ciclo celular
E2F	Factor de transcripci3n
miRNA's	RNA's peque1os con funciones regulatorias
CpG	Islas ricas en pares de citocina y guanina.

APÉNDICE B

MATERIALES

ORIGEN DE LAS MUESTRAS

El compuesto Hs01 de la planta *Hibiscus Sabdariffa* fue aislado y proporcionado por la Dra. Sohair Ali Ali Hassan, la porfirina no simétrica A3B NS1 fue sintetizada y proporcionada para este trabajo por la Dra. Susana Thelma López Cortina y la proteína quimérica E2- IL-18 fue realizada en el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L.

MATERIAL BIOLÓGICO

Utilizamos la línea celular de cáncer de cérvix (células Hela) y una línea celular hepática (células Chang) obtenidas de The American Type Culture Collection (Rockville, MD, E.U.A.), con un número de catalogo ATCC: CCL-2 y ATCC: CCL-13 respectivamente, para los ensayos de citotoxicidad y actividad anticancerígena. Para la obtención del gen E2 del VPH se utilizaron las células Hela y para la obtención del gen de la IL-18 humana se utilizaron monocitos humanos obtenidos de sangre periférica de un voluntario. Para la clonación de la proteína quimérica E2- IL-18 se utilizó el vector de clonación pThioHis-B y la cepa de E. coli TOP 10 obtenidos de Invitrogen (Carlsbal, CA, E.U.A.).

ORÍGEN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos utilizados se adquirieron de las siguientes compañías:

Invitrogen (Carlsbal, CA, E.U.A.)

- His-Patch ThioFusion™ Expression System Catalog No. K360-01
- Enzima de restricción Kpn I

Promega (Madison, WI, E.U.A.)

- Ensayo T.U.N.E.L.

CHIMERx (Madison, WI, E.U.A.)

- Enzima de restricción Xba I

Roche (Indianapolis, IN, E.U.A.)

- Reactivo WST-1

GIBCO (Grand Island, NY, E.U.A)

- Medio de cultivo MEM
- Suero fetal bovino

CTR Scientific (Monterrey, N.L., México)

- Cloroformo
- Alcohol isopropilico
- Etanol

Qbiogene (Solon, OH, E.U.A)

- Enzima de restricción Taq I

BIOLINE (Tauton, MA, E.U.A.)

- Marcador de peso molecular 100pb
- Taq DNA polimerasa
- Agarosa grado molecular
- IPTG

MP Biomedicals (Solon, HO, E.U.A)

- Sulfato de vincristina

SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, MO, E.U.A)

- DMSO
- Acrilamida

USBiological (Swampscott, MA, E.U.A)

- Medio de cultivo LB

BIO BASIC INC. (Markham, Ontario, Canadá)

- SDS
- Tris
- T4 DNA ligasa

EQUIPO

El equipo utilizado comprende:

- Termociclador CORBETT RESEARCH (San Francisco, E.U.A.), modelo CG 1-96.
- Mini Incubadora, modelo I 5170. Incubadora con agitador, modelo 311 DS. Mini Centrifuga, modelo SPECTRAFUGE 16M. Un juego de pipetas, modelo BIOPETTE. Un pipetor , modelo FASTPETTE, estos de la compañía LABNET (Edison, NJ, E.U.A).
- Centrifuga HERMLE (Gosheim, Alemania), modelo Z320
- Fuente de poder THERMO (Marietta, Ohio, E.U.A), modelo EC-1000-90
- Fotodocumentador BIO-RAD (Hercules, CA, E.U.A), modelo GELDOC-XR
- Una campana de acrílico para extracción de ácidos nucleicos
- Una campana de acrílico para ensayos microbiológicos
- Incubadora con CO2 INCUSAFE SANYO (Entten Leur, Holanda), modelo MCO-17AC
- Campana de flujo laminar BAKER COMPANY (Sanford, Maine, E.U.A), modelo SG-303
- Microscopio invertido LEICA (Solms, Alemania), modelo DMIL
- Lector de placas BIOTEK (Winooski, VT, E.U.A) modelo ELx800
- Balanza analítica AND (San Jose, CA, E.U.A), modelo HR200
- Esterilizador eléctrico ALL AMERICAN (Manitovoc, WI, E.U.A.), modelo 25X
- Congelador TORREY, modelo CH10
- Horno de microondas CHEF STAR, modelo C5636WK
- Biofotómetro EPPENDORF (Hamburgo, Alemania), modelo AG 22331
- Cámara de electroforesis de acrílico

APÉNDICE C

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó agua bidestilada y desionizada en la preparación de todas las soluciones (grado miliQ).

Preparación de soluciones.

IPTG (isopropil B-D-galactopiranosido) 100mM

Se pesan 238.3 mg de IPTG y se disuelven en 10 ml de agua. Se esteriliza por filtración y se almacena en alícuotas de 1 ml a -20°C.

Ampicilina 25mg/ml

Se pesan 25 mg y se disuelven en 1 ml de agua. Se esteriliza por filtración. La solución de almacena a -20°C hasta su uso.

CaCl₂ 100mM

Se disuelven 1.1 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua. Se esteriliza en autoclave y se almacena a -20°C hasta su uso.

Acetato de sodio 3M pH 4.8

Para preparar 100 ml se pesan 24.6 g y se disuelven en agua. Se ajusta el pH con ácido acético.

Buffer TENS

Para preparar 50 ml, se añade 1 ml de Tris 0.5M pH 7.5, 0.1 ml de EDTA 0.5M, 1 ml de NaOH 5N Y 2.5 ml de SDS 10% a un poco de agua y se completa al volumen final.

Agarosa 1%

Se disuelve 1 g de agarosa en 100 ml de solución de TBE 1X.

Amortiguador TBE 10X (Tris 0.8M, Ácido Bórico 0.89M, EDTA 25mM)

Se disuelven 108 g de Tris, 55g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA (Na₂) en 800 ml de agua. Se ajusta el volumen al L.

Etanol 70%

Se mezclan 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de agua.

Bromuro de etidio 0.5mg/ml

Se disuelven 5 mg de bromuro de etidio en 8 ml de agua. Se afora a 10 ml y se almacena a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ambar.

Jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%)

Se mezclan 25 mg de xilencianol, 26 mg de azul de bromofenol y 3 ml de glicerol. Se afora a 10 ml con TE 1X.

Amortiguador TE 100X (EDTA 100mM y Tris-HCl 1M)

Se mezclan 25 ml de Tris-HCl 2M pH 7.5, 10 ml de EDTA 500 mM y 15 ml de agua. Se esteriliza en autoclave.

Solución de formalina al 10% en PBS

Se tomaron 10ml de formalina y se mezclaron con 90ml de de PBS 1X.

Solución de Triton X-100 al 0.2% en PBS

Se tomaron 100µl de Triton X-100 y se mezclaron con 49.9ml de PBS 1X.

Solución de peróxido de hidrogeno al 0.3% en PBS

Se tomaron 0.5ml de una solución de peróxido de hidrogeno al 30% y se mezclaron con 49.5ml de PBS 1X.

Solución DAB

Se mezclaron 50µl de buffer DAB sustrato 20X con 950µl de agua destilada. A esta mezcla se agregaron 50µl de buffer DAB cromógeno 20X y 50µl de peróxido de hidrogeno 20X.

Amortiguador PBS 1X

Se disuelven 8 g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ en 900ml de agua. Se ajusta el pH a 7.4, se afora a 1 L y se esteriliza en autoclave.

Preparación de soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Amortiguador concentrador

Se mezclan 7.88 g de Tris-HCl en 30 ml de agua; se ajusta el pH a 6.8 y se afora a 50 ml.

Amortiguador separador

Se mezclan 11.83 g de Tris-HCl en 30 ml de agua; se ajusta el pH a 8.8 y se afora a 50 ml.

Amortiguador de muestra

Se mezclan 0.158 g de Tris-HCl, 0.4g de SDS, 0.02 g de azul de bromofenol, 0.2 ml de β -mercaptoetanol, 2 ml de glicerol y 7.8 ml de agua.

Amortiguador de corrida 5X

Se disuelven 15 g de Tris Base, 94 g de glicina y 5 g de SDS en 800 ml de agua y se afora a 1 L.

Solución de tinción azul de Coomassie

Se mezclan 1 g de azul de coomassie, 250 ml de metanol, 125 ml de agua y 37.5 ml de ácido acético.

Solución para desteñir y fijar

Se mezclan 200 ml de metanol, 48 ml de ácido acético y 152 ml de agua.

Solución de persulfato de amonio al 10%

Se disuelven 0.1 g de persulfato de amonio en 1ml de agua

Gel separador 13%

Se mezclan 2.5ml de la solución de acrilamida/bis, 1.875 ml de amortiguador separador, 150 μ l de SDS 10%, 2.925 ml de agua, 150 μ l de persulfato de amonio al 10 % y 10 μ l de N, N, N', N', Tetrametiletilendiamina (TEMED).

Gel concentrador 6.8%

Se mezclan 1.3 ml de la solución acrilamida/bis, 1 ml de amortiguador concentrador, 75 μ l de SDS 10%, 5.1 ml de agua, 75 μ l de persulfato de amonio al 10% y 10 μ l de TEMED.

Preparación de soluciones para cromatografía de afinidad en resinas ProBond[®].

Solución A 1X

Se mezclan 10ml del stock de solución A 10X con 90 ml de agua. Almacenar a 4°C.

Solución B 1X

Se mezclan 10 ml del stock se solución B 10X en 90 ml de agua. Almacenar a 4°C.

Amortiguador de unión pH 7.8

Se mezclan 2.9 ml de solución A 1X con 47 ml de solución B 1X, se ajusta el pH a 7.8 con solución B 1X para aumentarlo y solución A 1X para disminuirlo.

Amortiguador de lavado pH 6.0

Se mezclan 37 ml de solución A 1X con 13 ml de solución B 1X, se ajusta el pH a 6.0 con solución B 1X para aumentarlo y solución A 1X para disminuirlo.

Amortiguador de lavado pH 5.5

Se mezclan 43.5 ml de solución A 1X con 6.3 ml de solución B 1X, se ajusta el pH a 7.8 con solución B 1X para aumentarlo y solución A 1X para disminuirlo.

Solución de elución con imidazol: 50mM, 200mM, 350mM, 500mM

Para preparar 5 ml de cada solución se mezclan los siguientes volúmenes de amortiguador de lavado pH 6.0 y solución stock de imidazol 3M proporcionado por el kit.

Concentración final de imidazol	Stock de imidazol 3M	Amortiguador de lavado pH 6.0
50mM	0.08 ml	4.92 ml
200mM	0.33 ml	4.67 ml
350mM	0.58 ml	4.42 ml
500mM	0.83 ml	4.17 ml

Preparación de medios de cultivo

Medio LB caldo

Por litro de cultivo se agregan; 10 g de bacto-peptona, 5 g de extracto de levadura y 10g de NaCl. Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 10 N y se esteriliza en autoclave.

Medio LB agar

Por litro de cultivo se agregan; 10 g de bacto-peptona, 5 g de extracto de levadura, 10g de NaCl y 15 g de agar. Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 10 N y se esteriliza en autoclave.

Medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%

Se disuelven 9.6 g de medio MEM, 2.2 g de bicarbonato de sodio, 100 ml de suero fetal bovino, 1 ml de antibiótico penicilina-estreptomicina 100X en 800 ml de agua y se afora a 1 L. se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C hasta su uso.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO



Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y CITOTÓXICO
IN VITRO DE LA PORFIRINA NO SIMÉTRICA A3B NS1, EL COMPUESTO
HS01 DE LA PLANTA *Hibiscus sabdariffa* Y LA PROTEÍNA QUIMÉRICA E2-
IL-18.**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: nacido en Monterrey, N.L., el 21 de Julio de 1987, hijo de Enrique David Arredondo Moreno y Martha Elena Espinoza Costilla.

Educación: egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 2008.