



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE ALGA PARDA, SOBRE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA Y REGULACIÓN DE ARNm DE PROTEÍNAS POR-APOPTÓTICAS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX.**

Guzmán Pérez Nancy Nallely<sup>a</sup>, Santiago Cruz Rubí<sup>a</sup>, Ávila Ortiz Alejandrina<sup>b</sup>, Weiss Steider Benny<sup>b</sup>, Rangel Corona Rosalva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Oncología Celular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, [dreykonave@hotmail.com](mailto:dreykonave@hotmail.com), [rstgo89@hotmail.com](mailto:rstgo89@hotmail.com), [rancor@unam.mx](mailto:rancor@unam.mx)

<sup>b</sup> Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM [aviale53@hotmail.com](mailto:aviale53@hotmail.com)

**RESUMEN**

El Cáncer de Cérnix (CaCu) es la segunda enfermedad neoplásica más frecuente y mortal en la población femenina, para la cual existen diversos tratamientos, que no son selectivos y causan severos efectos colaterales. En este sentido actualmente se estudia el efecto de compuestos aislados de una gran variedad de algas con resultados prometedores, tal es el caso de los miembros del género *Sargassum* que han demostrado tener propiedades antifúngicas, inmunoregulatoras y antitumoral entre otras. Al respecto en el Laboratorio de Oncología Celular se trabaja, con la especie *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (*SabuChW*), cuyo extracto ha mostrado tener un efecto citostático e inductor de muerte por apoptosis sobre células de CaCu. sin embargo, se desconoce su potencial para activar células del sistema inmunológico y cual es vía por la que induce la muerte de dichas células. Por lo antes mencionado el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto de *SabuChW* sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana (LSPH) y la expresión de ARNm de proteínas pro-apoptóticas Citocromo C y Smac/DIABLO. Para ello se extrajeron LSPH y se cultivaron por 96h en presencia de *SabuChW* e IL-2. También se determinó por RT-PCR la expresión de mensajeros para Citocromo C y Smac/DIABLO en células de las líneas de CaCu CALO e INBL cultivadas en presencia y ausencia de *SabuChW*. Los resultados muestran que el extracto de *SabuChW* posee un efecto positivo sobre la proliferación de los LSP, además de inducir su activación. Además de aumentar la expresión e los ARNm para las diferentes proteínas pro-apoptóticas. Estos resultados ayudan a dilucidar la ruta molecular que regula *SabuChW* para inducir la muerte de células de CaCu, se discute una acción dual de extracto sobre las células de este tipo de tumor.



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

## 1. INTRODUCCIÓN

La muerte celular es un proceso fisiológico-patológico el cual es un punto en el cual una célula llega a un punto de no retorno (Lizarbe, 2007).

Las anomalías en la regulación de muerte celular puede ser un componente importante de enfermedades como: el síndrome linfoproliferativo autoinmune, el SIDA, Isquemia y **Cáncer**; así mismo enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington (Norbury y Zhivotovsky, 2004).

El cáncer es un crecimiento tisular, producido por la suma de mutaciones en la célula, provocando la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción a otros tejidos. El cáncer no es solo una enfermedad sino muchas enfermedades. Hay más de 100 diferentes tipos de cáncer. siendo estas causa de las principales causas de muerte en el mundo (Massagué, 2009).

El cáncer de cérvix es un problema importante de salud pública en el mundo, siendo una de las principales causas de muerte por neoplasias malignas en la mujer; siendo los países en vías de desarrollo como México los que presentan una mayor incidencia. Los tratamientos que actualmente se utilizan suelen ser en la mayoría de los casos quimioterapia, radioterapia o cirugía, esto dependiendo del estadio en el cual sea detectado el tumor; estos tratamientos suelen ser efectivos si el cáncer es detectado a tiempo o en estadios que aun puedan ser tratados; sin embargo cualquiera de dichos procedimientos disminuyen la calidad de vida de las pacientes, ya que producen diversos efectos secundarios que afectan tanto la salud física como emocional de las mujeres que se vieron afectadas por este padecimiento; es por ello que la búsqueda de tratamientos alternativos naturales que disminuyan estos efectos y que además posean un efecto inmunoregulador, se ha intensificado en los últimos años, dando lugar a numerosos estudios donde los metabolitos de diversas plantas y algas han demostrado que poseen un sinnúmero de actividades, tal es el caso del género *Sargassum* perteneciente a las algas pardas, el cual ha manifestado que posee actividades que van desde antibacteriana, antifúngica, hasta antiangiogénica y antitumoral. Esto debido a que presenta numerosas moléculas bioactivas como fucanos; así como diversos derivados de fucanos, sarganinas, taninos, polisacáridos, etc.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### Material Biológico.

Para el extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne, el alga fue colectada en playa Los Muñecos, Estado de Veracruz, Posteriormente se procedió a una revisión taxonómica. La determinación taxonómica de los ejemplares se llevó a cabo en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, posteriormente se procedió a realizar el extracto etanólico bajo la dirección de la Dra. Alejandrina Ávila Ortíz; el cual fue proporcionado para este trabajo.

### Condiciones del Cultivo

Las líneas Celulares CALO e INBL se cultivarán en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), en botellas de cultivo de 75 cm<sup>3</sup>. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmósfera húmeda saturante al 5 % de CO<sup>2</sup>. Las células tumorales CALO e INBL en fase de confluencia serán separadas del sustrato con verseno



## TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

Posteriormente se realizó una sincronización celular para que los cultivos partieran del mismo punto del ciclo celular (G1), esto se realizará cultivando a las células 24 h en ausencia de Suero Fetal Bovino.

### RT- PCR Punto final

Se partió de  $1 \times 10^6$  de células de las líneas celulares CALO e INBL, las cuales serán cultivadas en presencia y ausencia del extracto de SabuChW a una dilución de 1:8910. Los cultivos serán mantenidos en incubadora (FORM SCIENTIFIC, USA) a 37 °C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO<sup>2</sup>. Durante diferentes tiempos, 36, 48 y 72 horas, para posteriormente realizar la extracción de ARN total.

### Extracción de RNA Total.

Transcurridos los tiempos de cultivo con el extracto de SabuChW, se realizó la extracción del ARN mediante la utilización de la solución TRIzolTM (INVITROGEN) de isotiocianato de guanina.

### Cuantificación de ARN.

La concentración de RNA se determinará en un biofotómetro (BIOPhotometer, Eppendorf), para normalizar las muestras e igualar concentraciones (Sierra 2011)

### Obtención de ADNc por RT

La concentración de ARN utilizado para la técnica fue de 2µg/µl para cada una de las muestras, para lo cual, se utilizó un kit de RT-PCR en el que se establecieron las siguientes condiciones para cada reacción (1Rx), el cual será multiplicado por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia del extracto de SabuChW).

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

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

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevara a cabo la PCR semicuantitativa utilizando 2 µg/µl, las condiciones establecidas para 1Rx utilizando un kit de PCR Go taq Polimerasa, las cuales se multiplicaran por el número de muestras (controles y tratamientos con extracto de SabuChW).

PRIMER	SECUENCIA	PARES DE BASES
<b>β-Actina</b>	Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG Antisentido: GGTCTCAAACATGATCTGGG	234
<b>Citocromo C</b>	Sentido: TTGGCAATCCGTCATCAGTA Antisentido: CCCGACAGTGCCTAGAAGAG	187
<b>Smac/Diablo</b>	Sentido: GGAAAGCAGAAACCAAGCTG Antisentido: CTCGGTGACAGACAGTCAT	211

**Tabla 1. Secuencia, sentido y antisentido, de los primers utilizados para la detección del ARNm para Citocromo C y Smac/DIABLO así como β-Actina como un control interno de la técnica.**

**Obtenidos con el programa Primer3 input versión 0.4.0 y comprobado en e-PCR.**



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD  
5, 6 y 7 de junio de 2014  
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

**ELECTROFORESIS.**

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

Los ensayos mencionados se realizaron en tres ocasiones de manera independiente para confirmar que los resultados sean confiables y reproducibles.

**Integridad del ARN**

Con la propósitos de confirmar la integridad del RNA extraído por la técnica de TRizol, las células de las líneas CALO e INBL fueron cultivadas a diferentes tiempos: 24, 36, 48 y 72 horas en ausencia y presencia de la fracción del extracto de *SbCh*, diluida a . Una vez extraído el RNA fue teñido con bromuro de etidio y las muestras se corrieron en el gel de Agarosa al 1.5%, por 60 minutos a 80 V. Al excitar el gel con luz UV observamos nítidamente las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal (RNAr), lo que confirma la integridad del RNA extraído de todas las muestras (Figura 1).

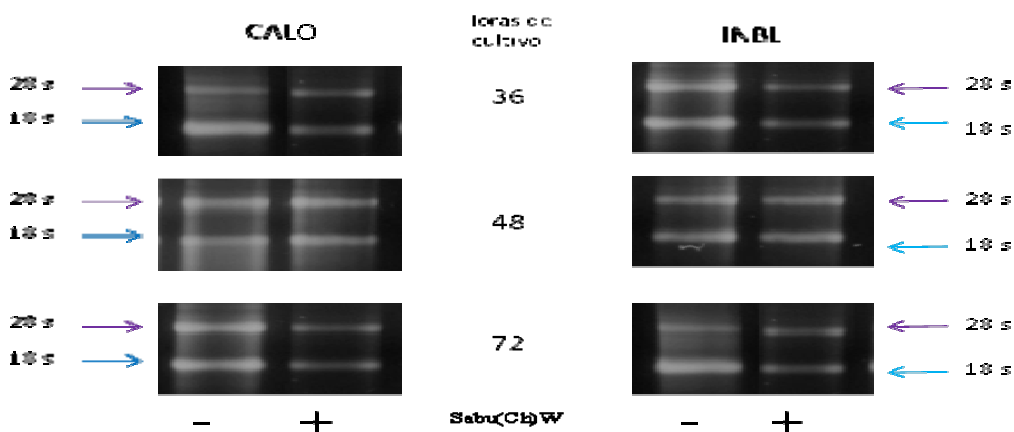


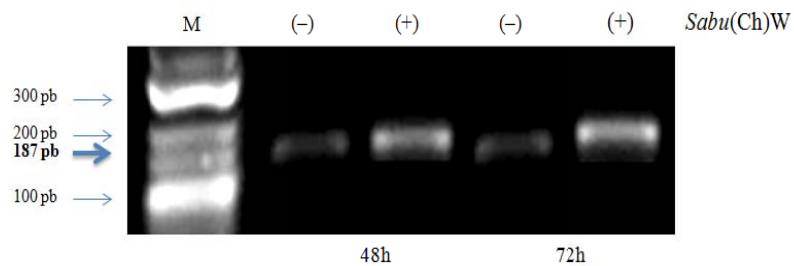
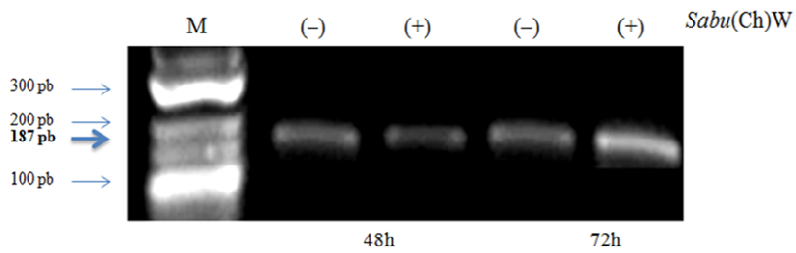
Figura 1. Integridad del RNA en líneas celulares de CaCu CALO, INBL. Se realizó la extracción del RNAm por la técnica de TRizolTM. Cultivadas en presencia del extracto de *SabuChW* (+). Células cultivadas en ausencia del extracto de *SabuChW* (-). Tiempo de cultivo 36, 48h y 72h. Las bandas muestran la integridad de las subunidades 28S y 18S del RNAr.

**RT-PCR para Citocromo C en las líneas celulares CALO e INBL**

Después de confirmar por medio de la expresión de  $\beta$ -actina que las condiciones de la PCR son las correctas, se procedió a amplificar el producto para el ARNm de la proteína pro-apoptica Smac/DIABLO. Los resultados obtenidos muestran para ambas líneas celulares, una banda de amplificación de 187pb para Citocromo C, que corresponde al tamaño del producto esperado (figura 2)

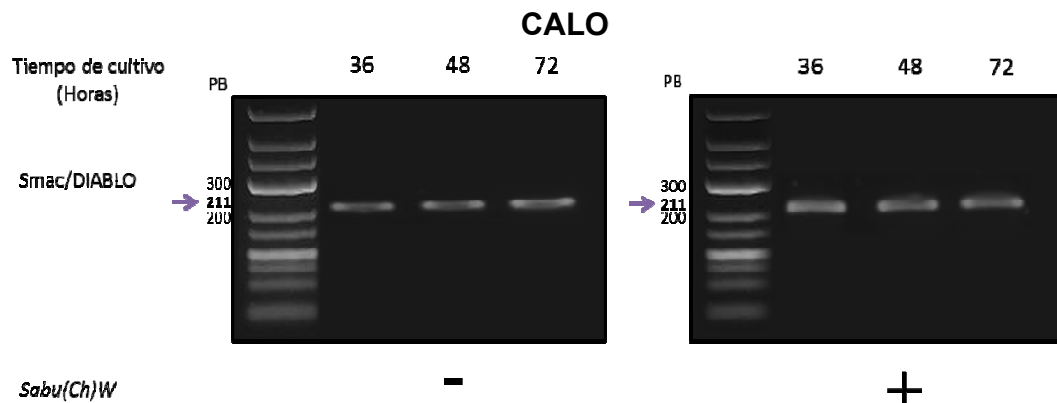


V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD  
 5, 6 y 7 de junio de 2014  
 TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

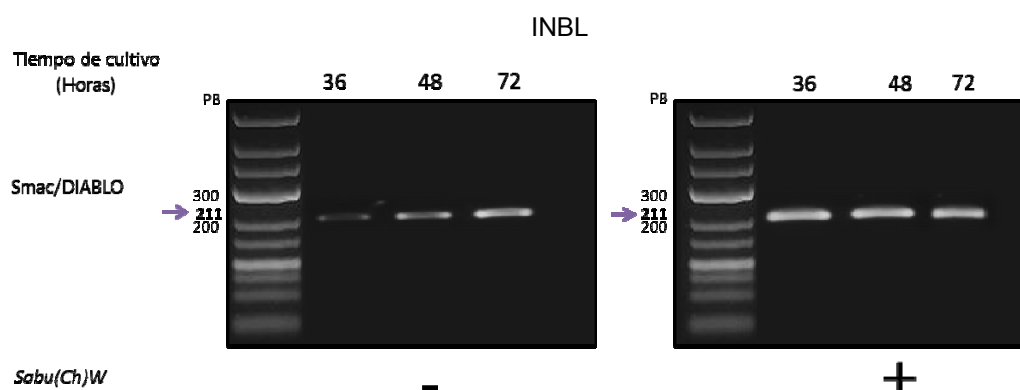


**RT-PCR para Smac/DIABLO en las líneas celulares CALO e INBL**

Después de confirmar por medio de la expresión de  $\beta$ -actina que las condiciones de la PCR son las correctas, se procedió a amplificar el producto para el ARNm de la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO. Los resultados obtenidos muestran para ambas líneas celulares, una banda de amplificación de 187pb para Citocromo C, que corresponde al tamaño del producto esperado (figura 3)



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD  
5, 6 y 7 de junio de 2014  
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO



**Figura 3. Expresión del ARNm para la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO para las líneas celulares CALO e INBL.** Banda de los productos de amplificación para el ARNm de la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO de células de la línea celular INBL cultivadas a 36,48 y 72 horas en ausencia (-) y presencia (+) del extracto de la fracción 2 del extracto de *Sabu(Ch)W*. Mostrando un aumento en la intensidad lumínica y grosor en las bandas de los productos de amplificación obtenidos de las células cultivadas en presencia del extracto a las 36 y 48 horas de cultivo, con respecto a las bandas de los productos de amplificación obtenidos de las células cultivadas en ausencia del extracto.

#### 4. CONCLUSIONES

2 líneas en blanco

#### BIBLIOGRAFÍA (ARIAL, bold, 10 pt. justificado a la izquierda)

1. Lizarbe A. 2007. El suicidio y la muerte celular. Real Academia De Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Vol.101, Nº 2.
2. Massagué J. 2009. Evolución y metástasis de Cáncer. Dossier Científico. SEBBM 160. Junio. Pp. 22
3. Norbury CJ, Zhivotovsky B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*; Pp 2797-808.
4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*. (2011). Atlanta: American Cancer Society. p 60.
5. Cain, K., Bratton, S.B., y Cohen, G.M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214.
6. De Lara, Issasi (1991). Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas, UAM-1. *Hidrobiología*. 1(2): 21-28.
7. Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 13, 1979-1987.



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO