



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE ALGUNOS IRIDOIDES DE
ORIGEN NATURAL SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER
CERVICOUTERINO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M. F. Miriam Ramírez Carrillo

CO-DIRECTORES:

Dra. Verónica Rodríguez López

Dra. Judith González Christen

Cuernavaca, Morelos marzo 2019

VOTOS APROBATORIOS

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por las instalaciones y equipos utilizados en este proyecto de investigación.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo obtenido mediante la beca de doctorado 443725 y al Fondo Mixto CONACYT por el apoyo económico para la realización de la estancia de investigación en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

CONTENIDO

ABSTRACT	9
RESUMEN	10
1. ANTECEDENTES.....	11
1.1. Cáncer cervicouterino	11
1.2. Descripción del Virus del Papiloma Humano	12
1.2.1. Carcinogénesis inducida por el Virus del Papiloma Humano.....	14
1.3. Tratamiento empleado en el cáncer cervicouterino.....	19
1.4. Las plantas medicinales contra el cáncer	19
1.5. Iridoides	20
1.5.1. Descripción general	20
1.5.2. Biosíntesis de los iridoides	21
1.5.3. Iridoides con actividad citotóxica.....	23
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General	27
4.2. Objetivo Específicos	27
5. METODOLOGÍA	27
5.1. Obtención de los iridoides a evaluar	27
5.2. Líneas celulares	29
5.3. Evaluación de la actividad citotóxica por el método de Sulforodamina B.	29
5.3.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀).....	29
5.4. Determinación del Índice de Selectividad (IS)	30
5.5. Evaluación de la actividad sobre la expresión de los genes E6 y E7 del VPH por RT-PCR. ...	30
5.5.1. Extracción de RNA por el método de TRIZOL.....	30
5.5.2. Cuantificación de RNA	31
5.5.3. Preparación del gel de agarosa al 1.5%	31
5.5.4. Conversión de RNA genómico a cDNA.....	32
5.5.5. PCR para β-actina, E6 y E7	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34

6.1. Evaluación de la actividad citotóxica por el método de Sulforodamina B	34
7. CONCLUSIONES.....	40
8. Perspectivas.....	¡Error! Marcador no definido.
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de papilomavirus	14
Tabla 2. Citotoxicidad de los extractos metanólicos de plantas pertenecientes a la orden de <i>Lamiales</i> (Moreno <i>et al.</i> , 2011).	23
Tabla 3. Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) en µg/mL de los iridoides evaluados sobre las cinco líneas tumorales y la línea celular normal.....	34
Tabla 4. Líneas celulares utilizadas en el presente estudio.	35
Tabla 5. Actividad citotóxica de los iridoides sobre las líneas celulares de cérvix a las 72 horas.	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de defunciones en 2018 por los diferentes tipos de cáncer en mujeres, estadísticas internacionales. Imagen modificada de GLOBOCAN 2018.....	11
Figura 2. Cubo del sistema Epidemiológico y Estadístico de las defunciones. Cáncer de cuello de útero es la segunda causa de defunciones lo que representa el 9.9%. INEGI 2015.	12
Figura 3. Genoma del virus del papiloma humano (VPH) linealizado.	13
Figura 4. Localización en el epitelio escamoso de las principales etapas del ciclo de vida del virus del papiloma.	15
Figura 5. Desregulación del ciclo celular por acción de la proteína viral oncogénica E6.....	16
Figura 6. Oncogenes de VPH bloquean la apoptosis.	18
Figura 7. Tipos de iridoides y su numeración.	20
Figura 8. Clasificación los iridoides de acuerdo Hegnauer.....	20
Figura 9. Clasificación de los secoiridoides de acuerdo a Hegnauer	21
Figura 10. Clasificación de los iridoides C8 y C9 según El-Naggar & Beal, 1989.	21
Figura 11. Secuencia propuesta para la biosíntesis de los iridoides (Sampaio & Kaplan, 2001).	22
Figura 12. Iridoides aislados de <i>Penstemon barbatus</i>	24
Figura 13. Iridoides aislados de <i>Castilleja tenuiflora</i>	24
Figura 14. Células HeLa tratadas con el genipósido a una CI_{50} y CI_{70} a las 48 y 72h.....	37

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	microgramos
µL	microlitros
5-FU	5 - Fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
CaSki	Carcinoma de cérvix
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CO ₂	Bióxido de Carbono
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	gramo
HeLa	Carcinoma de cérvix
HF-6	Carcinoma de colon
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
INC	Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IS	Índice de Selectividad
KB	Carcinoma de nasofaringe
Kg	Kilogramos
m	mili
MCF-7	Carcinoma de mama
mg	miligramos
mL	mlilitros
mm	micrómetros
MMP	Metaloproteinasas de matriz
NF-kB	Factor nuclear-kB
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PC-3	Carcinoma de próstata
RNA	Ácido ribonucleico
SiHa	Carcinoma de cérvix
UV	Ultravioleta

ABSTRACT

RESUMEN

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la causa principal de cáncer de cuello uterino en mujeres (25 a 65 años). Los virus del papiloma humano asociados con lesiones genitales se dividen en virus de alto y bajo riesgo. Se han identificado 15 tipos virales de alto riesgo (oncogénicos) asociados con el cáncer cervicouterino y con la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado; los más comunes son los VPH-16 y 18. El potencial de las plantas medicinales tiene importantes aplicaciones en la medicina moderna en tanto que son fuente directa de agentes terapéuticos y/o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos.

En el presente estudio se evaluó la actividad citotóxica de algunos iridoides de origen natural sobre un panel de líneas de cáncer humano (HF-6, PC-3, MCF-7, CaSki y KB), esto dio como resultado que los compuestos; ácido geniposídico, genipósido, aucubina, ácido logánico y loganina mostraron citotoxicidad selectividad sobre la línea celular CaSki, la cual se caracteriza por tener integrado el genoma del VHP tipo 16 y 18.

La actividad citotóxica mostrada por estos cinco iridoides (ácido geniposídico, genipósido, aucubina, ácido logánico y loganina) sobre la línea celular CaSki (VPH 16 y 18) nos llevó a preguntarnos sobre el espectro de selectividad, por lo que se decidió realizar la evaluación de estos mismos iridoides sobre otras líneas de cáncer cervicouterino como HeLa (VPH 18), SiHa (VPH 16) y C33A (VPH -) además de una línea celular normal MRC-5 (fibroblastos de pulmón).

Finalmente, se exploró el efecto del genipósido sobre las proteínas virales E6 y E7 del VPH, se selecciono esta molécula por presentar selectividad y la mayor actividad citotóxica sobre las líneas celulares HeLa (VPH 18) y CaSki (VPH 16 y 18).

1. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un padecimiento originado por el crecimiento acelerado y descontrolado de las células que se encuentran en el cuello de la matriz formando una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales. A nivel mundial el cáncer cervicouterino es la cuarta causa de mortalidad en mujeres mayores de 35 años, de acuerdo a la International Agency for Research on Cancer (IARC) en el 2018 se reportaron 311 365 defunciones (figura 1)

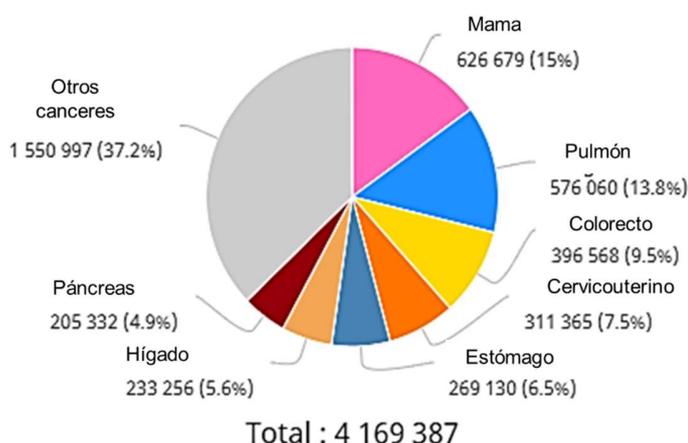


Figura 1. Número estimado de defunciones en 2018 por los diferentes tipos de cáncer en mujeres, estadísticas internacionales. Imagen modificada de GLOBOCAN 2018.

En 2018, más de 72,000 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer cervicouterino y casi 34,000 fallecieron por esta enfermedad en la Región de las Américas (OMS, 2018).

En México, desde el año 2006, el CaCu es la segunda causa de muerte en mujeres, durante el año 2015, se registraron 3,071 casos nuevos de tumores malignos del cuello uterino, con una tasa de incidencia de 6.01 casos por cada 100,000 habitantes femeninas mayores de 10 años. La distribución de los casos en México muestra un incremento a partir de los 35 años de edad, siendo el grupo de 50 a 59 años quien registra el mayor porcentaje con alrededor del 30% de todos los casos.



Figura 2. Cubo del sistema Epidemiológico y Estadístico de las defunciones. Cáncer de cuello de útero es la segunda causa de defunciones lo que representa el 9.9%. INEGI 2015.

Múltiples estudios han asociado la infección causada por el VPH con el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCu) y lo han considerado como el principal factor etiológico de este tipo de cáncer. El 90% de los casos de CaCu están relacionados con la presencia del VPH. La infección con el genotipo VPH-16 es responsable de más del 50% de cáncer cervicales en el mundo (Vallejo *et al.*, 2015). El virus del papiloma humano (VPH) se considera el agente de transmisión sexual más común en todo el mundo.

1.2. Descripción del Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma humano representan un grupo heterogéneo de agentes que infectan los tejidos epiteliales y se han asociado con diversas enfermedades neoplásicas. Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, que incluye virus relativamente pequeños, sin envoltura, con diámetro de 55 nm.

Hasta el momento se han descubierto cerca de 200 tipos virales, 100 de éstos bien caracterizados. Los tipos se consideran distintos cuando la secuencia de nucleótidos de su genoma es diferente en más de 10%. Sin embargo, todos los virus del papiloma humano tienen estructura y organización genética similar: se componen de una molécula de ADN circular de doble hebra, con un tamaño de entre 7200 a 8000 pares de bases y una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros producidos de dos proteínas estructurales, y no tienen envoltura nuclear (Hebner & Laimins, 2006). El ADN viral tiene ocho genes (figura 3), de los cuales seis codifican para proteínas tempranas (E) y dos para proteínas tardías (L). Las proteínas E5, E6 y E7 están implicadas en la transformación neoplásica, y E1 y E2

en la replicación del genoma viral; también, E2 regula la expresión de los genes tempranos y, particularmente, reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Álvarez *et al.*, 2012).

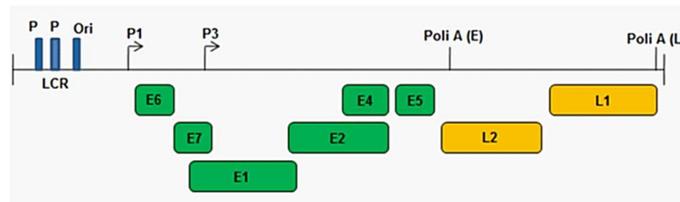


Figura 3. Genoma del virus del papiloma humano (VPH) linealizado. P (potenciadores); P1 y P3 (promotores); Poli A (sitios de poliadenilación); LCR (Región de control).

Los genes L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside. Además de estos genes, el genoma viral tiene una región de 800 pares de bases, conocida como región larga de control o región reguladora, que contiene diversos elementos de regulación de la transcripción y el origen de replicación del virus (Frazer, 2004). Las variantes genéticas del virus del papiloma humano difieren entre sí hasta en 2% de su genoma, y algunos de estos se han relacionado con lesiones más avanzadas o tipos histológicos de comportamiento más agresivos (Hebner & Laimins, 2006). Casi la mitad de los diferentes tipos de virus infecta el conducto genital y el resto produce verrugas benignas, entre otras lesiones en la piel y las mucosas no genitales.

Los papilomavirus humanos han sido agrupados de acuerdo a su asociación con lesiones benignas o con tumores malignos, en virus de bajo y alto riesgo, respectivamente como se representa en la tabla 1 (Chavaro *et al.*, 2009). Se han identificado 15 tipos virales de alto riesgo (oncogénicos) asociados con el cáncer cervicouterino y con la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado; los más comunes son los VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59.13,14 (Jayshree *et al.*, 2009). Los virus de bajo riesgo, como los VPH-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, y 81 se asocian con el condiloma acuminado, la neoplasia intraepitelial de bajo grado y las infecciones asintomáticas (Vallejo *et al.*, 2015). La incidencia de cáncer cervicouterino entre los diferentes países aún no se asocia con la distribución de los tipos virales, pero puede relacionarse con la distribución específica de variantes virales, porque su distribución es diferente por regiones geográficas (Lizano *et al.*, 2009).

Tabla 1. Clasificación de papilomavirus

Grupo	Prototipo	Sitio de infección	Consecuencia		Otras características
			Aguda	Crónica	
Cutáneo	VPH1, VPH2 y BPV1	Piel	Verrugas	Ninguna	Regresión sincrónica. Inmunidad duradera.
Mucosa	VPH6, VPH11, COPV, ROPV	Mucosa genital	Verrugas	Ninguna	Resolución lenta en individuos inmunodeprimidos.
Mucosa de alto riesgo	VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH45, BPV4	Mucosa Anogenital	Lesiones planas (CIN-1)	~2% persiste ~1% progresa en cáncer invasivo	Resolución lenta en individuos inmunodeprimidos, potencial maligno variable.
Cutáneo de alto riesgo	VPH5, VPH8, CRPV	Piel	Lesiones planas o ninguna verruga	Promueve SCC	El cáncer de piel escamoso es más común en personas inmunodeprimidas.

BPV, papilomavirus bovino; CIN, neoplasia cervical intraepitelial; COPV, Papilomavirus oral canino; CRPV, papilomavirus de conejo; VPH, papilomavirus humano; ROPV, Papilomavirus oral de conejo; SCC, Cáncer de piel escamoso. Modificado de Frazer 2004.

1.2.1. Carcinogénesis inducida por el Virus del Papiloma Humano

El ciclo de vida del VPH se acopla con el programa de diferenciación de los queratinocitos en el epitelio, ver figura 4. Los pseudoviriones inicialmente se unen a la capa basal cérvico-vaginal en los sitios de trauma donde la cápside sufre un cambio conformacional por la acción de una furina que cliva la proteína L2. De este modo el virus se une a los receptores de membrana tipo integrinas de las células de la lámina basal. Después de la infección, el virus establece y mantiene su genoma como un elemento extra cromosomal (episoma) en el núcleo de las células infectadas. El episoma es mantenido en bajo número de copias, pero este se incrementa en las capas superiores del epitelio por la acción de los oncogenes virales E6 y E7. Las células de la capa basal son células madre que están constantemente dividiéndose para dar origen a las células de la región supra basal (Frazer, 2004).

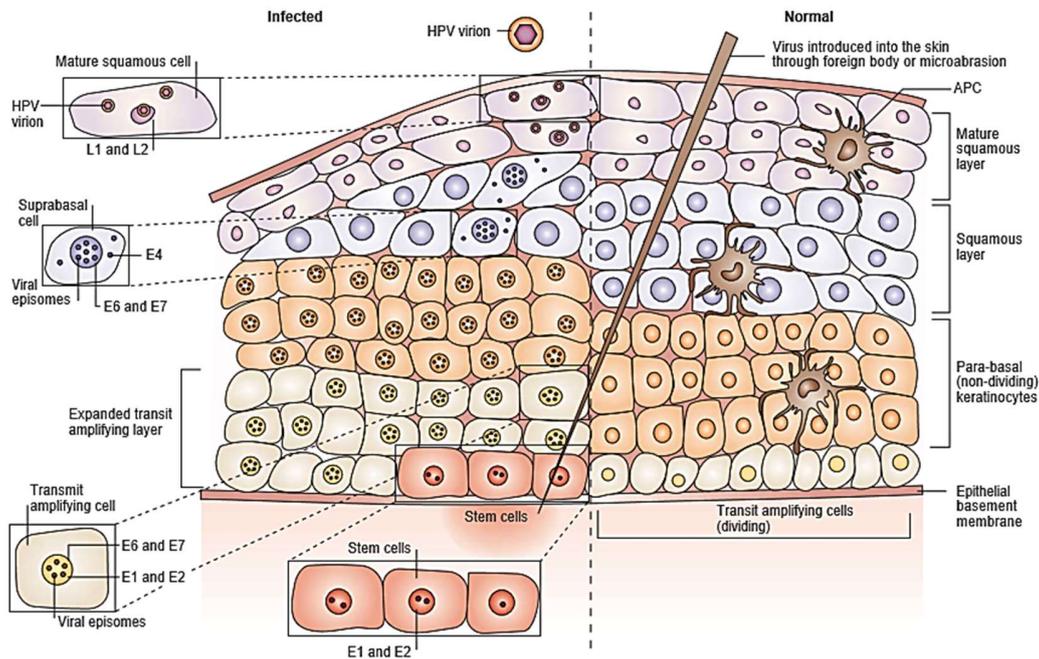


Figura 4. Localización en el epitelio escamoso de las principales etapas del ciclo de vida del virus del papiloma.

Las células hijas de las células madre se dividen a lo largo de la membrana basal y luego maduran verticalmente a través del epitelio sin más división (lado derecho). Después de la introducción de HPV en células madre en la capa basal del epitelio, la expresión de proteínas no estructurales virales se produce. Bajo la regulación de estas proteínas, la división celular se expande verticalmente y la diferenciación de las células epiteliales se retrasa y es menos completa. Las proteínas virales se expresan de forma secuencial con la diferenciación como se muestra, y los viriones maduros se producen sólo en las capas más superficiales del epitelio (Frazer, 2004).

La infección por el VPH de estas células lleva a la activación de la expresión de una cascada de genes virales que resulta en la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extra cromosómicas del virus por célula infectada. Entre las primeras proteínas virales expresadas se encuentran los factores de replicación E1 y E2, los cuales forman un complejo, uniéndose al origen de replicación viral y actuando reclutando polimerasas y proteínas accesorias que median replicación en la célula. La proteína E1 también exhibe actividad helicasa permitiendo la separación de las cadenas del ADN viral en el complejo de replicación. La proteína E2 es una proteína de unión al ADN que ayuda a reclutar a E1 al origen de replicación, pero también juega un papel en la regulación de la transcripción viral (Vande & Klingelutz, 2013). Dado que la capacidad de codificación de la proteína viral es pequeña, el virus secuestra factores celulares con el fin de replicar. E6 y E7 interfieren activamente en el ciclo celular, apoptosis y mantenimiento de la estabilidad cromosomal al interactuar con las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB, respectivamente. A medida que las células hijas empiezan a diferenciarse y se vuelven no permisivas para la síntesis de ADN, el virus induce la transición de fase G1 a S para iniciar la síntesis del ADN viral y expresa los genes

víricos tempranos para prevenir las respuestas de estrés celular tales como la activación de p53 (Baleja *et al.*, 2006).

Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas virales, por lo que tienen un papel fundamental en la carcinogénesis mediada por el VPH. La primera indicación del papel en carcinogénesis de estas proteínas surgió de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical SiHa y CaSki, en las cuales, el ADN viral está integrado aleatoriamente en el genoma de la célula. Además, la integración del ADN viral resulta en la pérdida o alteración de algunos genes virales, excepto los genes E6 y E7, los cuales se transcriben activamente (Álvarez, 2012). E6 y E7 interfieren activamente en el ciclo celular, apoptosis y mantenimiento de la estabilidad cromosomal al interactuar con las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB, respectivamente.

La proteína E6 del VPH codifica para una proteína de 151 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. E6 es una de las proteínas que se expresan tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, por ejemplo: el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP y el incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa. Como se observa en la figura 5, la acción clave de E6 en los VPH de alto riesgo es inhibir la función de p53, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina con la participación de la proteína celular asociada a E6 formando el complejo E6-AP (Álvarez, 2012).

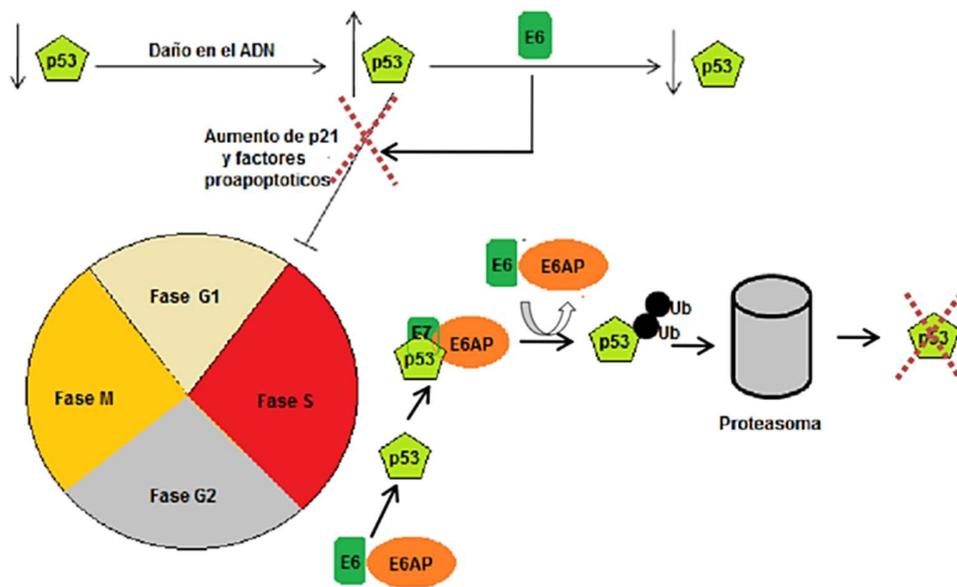


Figura 5. Desregulación del ciclo celular por acción de la proteína viral oncogénica E6. E6 inhibe la función de p53, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina en asociación con la proteína celular asociada E6 (E6-AP).

La proteína p53 se activa cuando el ADN celular sufre algún daño, uniéndose a él e induciendo así la expresión del gen que codifica la proteína p21. Dicha proteína es un

inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas (CDK), que se une a los complejos de ciclina G1 con proteína CDK2, la cual conduce a la célula más allá del punto de control G1 del ciclo celular. La proteína p21 bloquea la actividad cinasa de estos complejos, evitando así la progresión de la célula en fase S y la replicación de su ADN. Las células no podrán progresar en la fase S del ciclo celular y se retrasarán en la fase G1 o morirán por apoptosis. Por tanto, la degradación de p53 tiene como consecuencia la evasión del punto de control del ciclo celular G1/S, dando lugar a la desregulación del ciclo celular (Vande & Klingelutz, 2013).

La proteína E7 del VPH codifica para una proteína de aproximadamente 98 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F, ver figura 6. La familia pRB controla la replicación celular. La unión de E7 con pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular. E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Como resultado de la liberación de E2F se expresa ciclina E, importante para el progreso de la fase S. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la disminución de p53 que normalmente contrarrestaría esta replicación celular, anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo, la proteína E6 degrada a p53 y por tanto bloquea esta respuesta celular (Jayshree *et al.*, 2009).

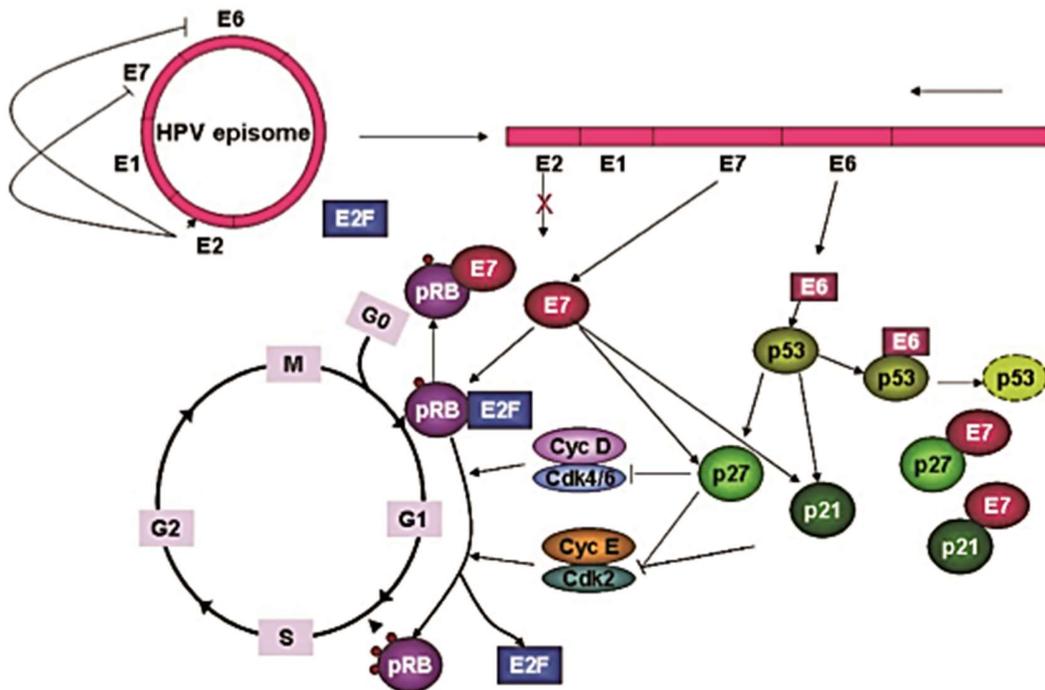


Figura 6. Oncogenes de VPH bloquean la apoptosis.

Con la división de las células basales infectadas por el VPH, los genomas virales son distribuidos en las células hijas, estas células se separan de la capa basal, migran hacia el estrato granuloso y sufren diferenciación. Cuando las células epiteliales normales no infectadas migran hacia las capas suprabasales, salen del ciclo de división celular. Sin embargo, cuando las células infectadas migran hacia las capas suprabasales, se mantienen activas en el ciclo celular debido a la acción de la proteína E7, corroborando su papel transformante en las células infectadas. Estas células entran en fase S y activan la expresión de factores de replicación celular requeridos para la replicación viral. Las oncoproteínas virales E6 y E7 no solo son necesarias para la immortalización y retención de las células en el ciclo celular, sino también son necesarias para el mantenimiento extracromosomal del VPH en células basales no diferenciadas (Frazer, 2004).

En lesiones de bajo grado, los genomas de VPH de alto riesgo están presentes en episomas mientras progresan las lesiones hacia alto grado o carcinomas, donde el genoma viral es integrado en el genoma del hospedero. Esta integración usualmente ocurre dentro del gen E2 dando como resultado la pérdida del control de la transcripción que ejerce la proteína E2, incrementando los niveles de expresión de E6 y E7 (Kyoung & Jong-Sup, 2005).

1.3. Tratamiento empleado en el cáncer cervicouterino

Muchas neoplasias malignas se extirpan por cirugía, sin embargo, se prefiere aplicar quimioterapias y radioterapias cuando el cáncer está muy diseminado por el organismo o se encuentra en órganos comprometidos en donde la intervención quirúrgica puede afectar mucho su funcionamiento (Tortora & Grabowski, 2006). El tratamiento del cáncer de cuello uterino depende de varios factores, entre ellos, el tipo y estadio del cáncer, los efectos secundarios posibles, así como las preferencias y el estado de salud general de la mujer. También es posible que su plan de atención incluya el tratamiento de los síntomas y los efectos secundarios, una parte importante de la atención del cáncer. El cáncer de cuello uterino con frecuencia se trata con radioterapia. El objetivo de la quimioterapia, cuando se administra con radioterapia, es aumentar la efectividad de la radioterapia. También puede administrarse para destruir el cáncer remanente después de la cirugía, también denominada terapia adyuvante.

El conjunto de tratamientos que se emplean contra el cáncer se denomina, de forma genérica, tratamiento antineoplásico. Dentro de este conjunto, la quimioterapia antineoplásica agrupa diversos fármacos: derivados naturales, antibióticos, etc., que actúan sobre las células tumorales de forma característica, inhibiendo el crecimiento celular y se diferencia por su mecanismo de acción (Lorenzo *et al.*, 2013). Las células cancerosas se dividen con una tasa de velocidad mayor comparada a las normales, de modo que resultan ser más vulnerables; no obstante, estos tratamientos también pueden matar o anular las funciones de algunas células sanas (Tortora & Grabowski, 2006).

Los medicamentos que se utilizan con más frecuencia para tratar el cáncer de cuello uterino avanzado incluyen: Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel (Taxol®), Topotecán, Gemcitabina (Gemzar®), o sus combinaciones (Tortora & Grabowski, 2006).

1.4. Las plantas medicinales contra el cáncer

El papel de los productos naturales como fuente de remedios ha sido bien reconocido desde la antigüedad. Las plantas medicinales también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna en tanto que son fuente directa de agentes terapéuticos y/o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos.

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha desempeñado un papel importante en el tratamiento del cáncer y de hecho la mayoría de las nuevas aplicaciones

clínicas de los metabolitos secundarios de plantas y sus derivados durante el último medio siglo se han aplicado para combatir el cáncer.

1.5. Iridoides

1.5.1. Descripción general

Los iridoides son un grupo de metabolitos secundarios que han sido aislados a partir de productos naturales, el término proviene del vocablo iridomirmecina, iridolactona e iridodial, aislados por primera vez de hormigas del género *Iridomyrmex*, quienes lo secretan como mecanismo de defensa (Roth & Eisner, 1961), el nombre dado a estos compuestos fue adaptado posteriormente para referirse a la clase de estructura, la mayoría de los miembros de los cuales han sido aislados de las plantas.

La estructura de tipo iridoide está compuesta por 10 átomos de carbono, por lo que pertenecen al grupo de los monoterpenos. Presentan un esqueleto base de ciclopenta [c] pirano, también conocido como 2-oxabicyclo-[4, 3, 0]-nonano (figura 7). Cuando presentan ruptura en el anillo de ciclopentano se conocen como seco-iridoides, mientras que si la ruptura se presenta en el anillo de pirano se denominan derivados de iridoides, por esta razón el anillo de ciclopentano se considera su esqueleto base (Gómez, 2016).

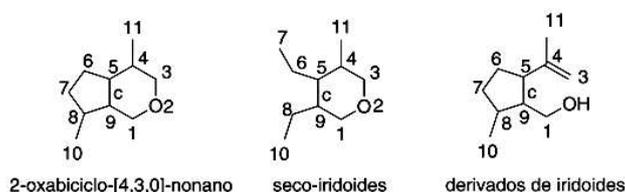
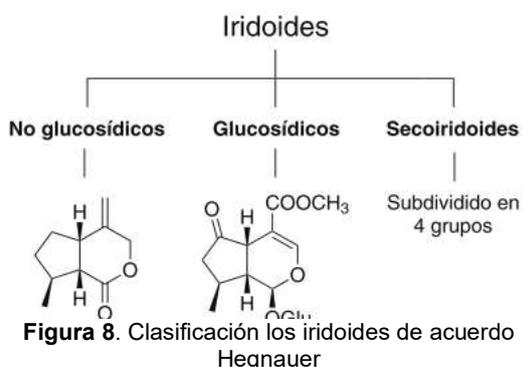


Figura 7. Tipos de iridoides y su numeración.

Existen diversas clasificaciones para los iridoides, de acuerdo con Hegnauer, estos se dividen en tres grandes grupos: no glicosídicos, glicosídicos y secoiridoides (figura 8). Los



dos primeros se diferencian por la ausencia o presencia, respectivamente, de residuos azúcar en su estructura. Los secoiridoides derivan de la ruptura en el enlace C7-C8 y a su vez se subdividen en; 1) estructuras caracterizadas por la formación de un anillo lactona entre C7 y C11 o la presencia un anillo

de pirano formado por la introducción de un átomo de oxígeno entre estos mismos carbonos; 2) estructuras con una apertura en el anillo de ciclopentano a lo largo del enlace C7-C8; 3) alcaloides; 4) el subgrupo de los hidrangenósidos,

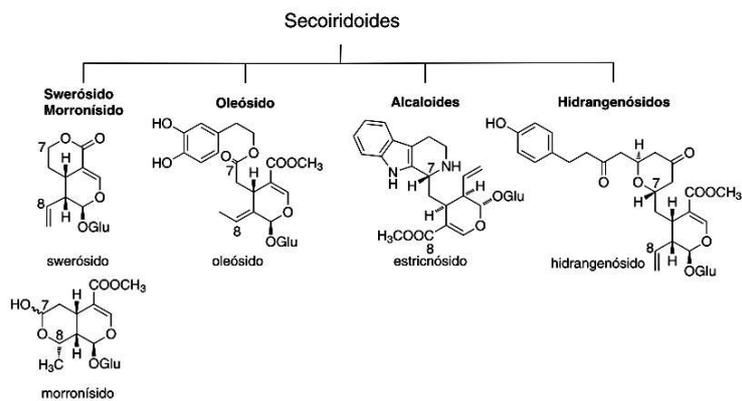


Figura 9. Clasificación de los secoiridoides de acuerdo a Hegnauer

caracterizados porque C7 se encuentra formando un anillo de pirano (comúnmente como γ -pirona) con un residuo carbonado de diferente origen biosintético (figura 9). El creciente número de iridoides naturales aislados ha llevado a proponer una clasificación distinta a la de Hegnauer; en 1980 El-Naggar y Beal agrupa estos compuestos de acuerdo con el número de carbonos incluidos en su estructura; así, los dos primeros grupos corresponden a *nor*-iridoides. El grupo 1 es poco numeroso y corresponde a los iridoides C8 (*di-nor*-iridoides), que provienen de la pérdida de los carbonos C10 y C11 (Figura 10). El grupo 2 integra a los iridoides C9 (*nor*-iridoides) y se subdivide en dos grupos. El subgrupo 2a incorpora a los iridoides derivados de la pérdida del C10, mientras que el subgrupo 2b incluye a aquéllos provenientes de la pérdida del C11. De los iridoides C9 este último subgrupo constituye el más numeroso.

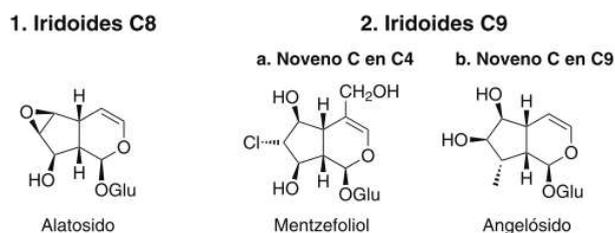


Figura 10. Clasificación de los iridoides C8 y C9 según El-Naggar & Beal, 1989.

1.5.2. Biosíntesis de los iridoides

La biosíntesis de los iridoides en las plantas ha sido bastante bien estudiada, siendo el compuesto de partida el ácido mevalónico y aunque las etapas iniciales parecen ser comunes a todas las estructuras, hay diferencias en las etapas de ciclación que conducen al esqueleto de iridano. En plantas se conocen dos rutas principales, la primera de ellas

conduce desde el iridodial, vía iridotrial, hasta el ácido desoxilogánico que es el precursor de muchos iridooides y secoiridooides.

En la biosíntesis de iridooides se presentan dos hechos, el geraniol nunca adquiere su forma fosforilada, y, en segundo lugar, a lo largo de su obtención no intervienen reacciones a través de carbocationes, ambas características comunes en la biosíntesis de la mayoría de los terpenos naturales. El geraniol se transforma en un di-aldehído mediante una secuencia de dos reacciones: una oxidación catalizada por mono-oxigenasa dependiente de algún donador de hidrógeno como NADH, NADPH o ácido ascórbico, para generar el correspondiente diol, el cual, mediante una reacción equivalente a una des hidrogenación biológica genera el correspondiente di-aldehído. La ciclación fundamental ocurre a través del ataque de un equivalente biológico de hidruro al doble enlace C8-C9, lo que provoca una adición tipo Michael de C9 al carbonilo α , β -insaturado, para generar iridodial en su forma ceto, cuyo equilibrio a su forma enol conduce a la formación del anillo pirano, produciendo iridodial en su forma hemiacetálica (Inouye *et al.*, 1977).

Por otra parte, la posterior oxidación de la forma ceto de iridodial conduce al iridotrial en su forma enólica, el cual, mediante la misma secuencia de equilibrios produce iridotrial en forma hemiacetálica. En el iridotrial, ambos aldehídos tienen igual probabilidad de ciclarse o permanecer como el aldehído remanente. Iridodial e iridotrial son intermediarios clave en la biosíntesis de numerosos iridooides (Mann *et al.*, 1994).

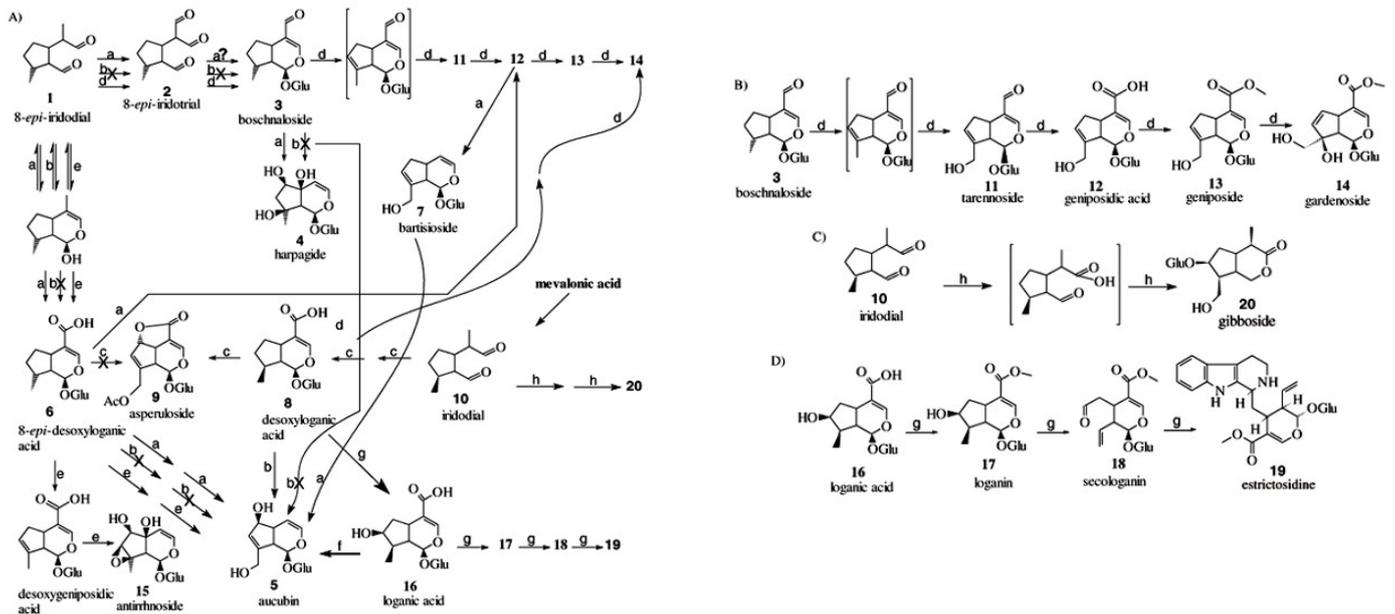


Figura 11. Secuencia propuesta para la biosíntesis de los iridooides (Sampaio & Kaplan, 2001).

1.5.3. Iridoides con actividad citotóxica

Estos compuestos han demostrado tener diversas propiedades beneficiosas para la salud y en la literatura se describe una amplia variedad de actividades biológicas y farmacológicas entre las que destaca antiviral, citotóxica, antiinflamatoria, antimicrobiana, hepatoprotectora, antioxidante, cardioprotector, antiespasmódica, entre otras (Gómez, 2016 y Tundis *et al.*, 2008). Moreno y colaboradores (Moreno *et al.*, 2011) realizaron un estudio sobre varias especies vegetales recolectadas en el estado de Morelos que pertenecen al orden de las *Lamiales*, a partir de estas plantas se obtuvieron los extractos metanólicos para evaluar su citotoxicidad por el método de Sulforodamina B. Los resultados de este screening (tabla 2) muestra que algunos de los extractos de las especies seleccionadas poseen efecto citotóxico con mayor sensibilidad en la línea celular CaSki.

Tabla 2. Citotoxicidad de los extractos metanólicos de plantas pertenecientes a la orden de *Lamiales* (Moreno *et al.*, 2011).

Extract	Growth inhibition (IC ₅₀ µg/mL)*					
	KB	HEp-2	HF-6	MCF7	PC-3	Ca Ski
<i>Bacopa monnieri</i>	6.8±0.599	>20	>20	>20	5.3±0.494	11.35±0.622
<i>Castilleja tenuiflora</i>	>20	>20	>20	9.53±0.718	>20	8.72±0.633
<i>Limosella aquatica</i>	15.19±0.649	>20	>20	>20	>20	11.3±0.280
<i>Mimulus glabratus</i>	>20	>20	12.64±0.298	>20	7.27±0.525	>20
<i>Pedicularis mexicana</i>	3.49±0.911	>20	>20	>20	10.1±0.725	17.17±0.513
<i>Penstemon barbatus</i>	>20	>20	15.19±0.219	>20	>20	14.5±0.231
<i>Penstemon campanulatus</i>	>20	>20	6.74±1.39	>20	>20	2.64±0.632
<i>Veronica americana</i>	>20	>20	0.169±0.073	>20	1.46±0.531	>20
Camptothecin [§]	0.015±0.0014	3.2 [§] ±0.17 [¶]	0.1013±0.063	1.269±0.148	0.02±0.004	0.2796±0.070
Etoposide [§]	1.25 [§] ±2 [§]	2.7 [§] ±0.59 [¶]	1.38 [§] ±1.09 [¶]	6.52 [¶] ±0.13 [§]	0.134±0.04	3.94 [§] ±0.031 [§]

*IC₅₀ is defined as the concentration that resulted in a 50% decrease in cell number and the results are means ± standard deviation of three independent replicates. Values greater than 20 are not considered to be cytotoxic.

[§]Positive control substance. The cytotoxic effect was investigated on the human cancer cell lines: nasopharyngeal (KB), larynx (HEp-2), colon (HF-6), breast (MCF7), prostate (PC-3), and cervix (Ca Ski).

A partir de algunas especies utilizadas en este estudio se aislaron y caracterizaron compuestos tipo iridoides por la M. F. Rola Aburto Amar en el 2006; de la especie *Penstemon barbatus* se obtuvieron el ácido geniposídico [1], boschnalósido [2] y penstemonósido [3]; de *Castilleja tenuiflora* 8-*epi*-loganina [4], mussaenósido [5] y aucubina [6].

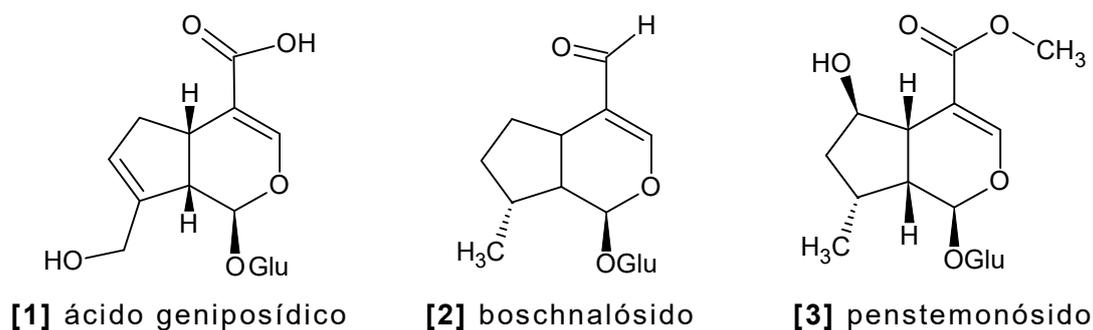


Figura 12. Iridoides aislados de *Penstemon barbatus*.

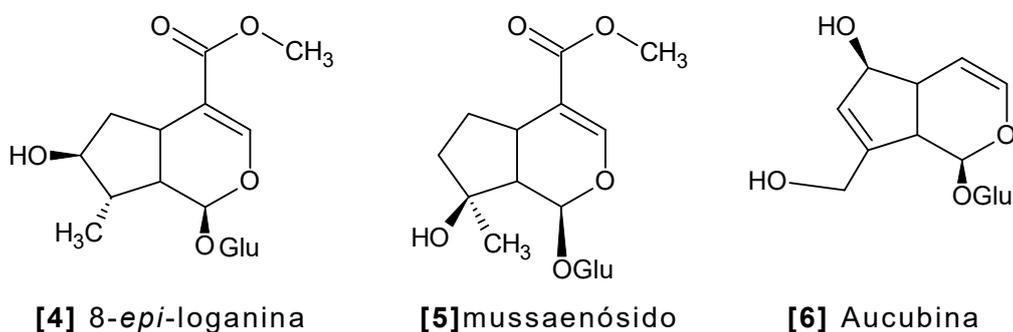
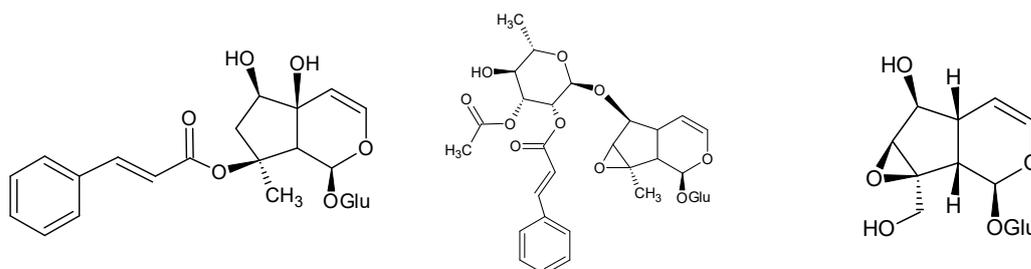


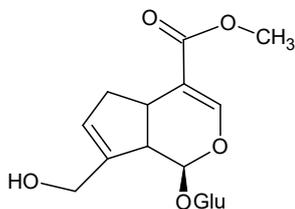
Figura 13. Iridoides aislados de *Castilleja tenuiflora*.

En la literatura se describe la actividad antiviral de los iridoides harpagósido [7] y Scorodiósido [8] sobre el virus de estomatitis vesicular (VSV), este virus RNA se caracteriza por provocar vesículas en el hocico de caballos, cerdos y bovinos (Bermejo *et al.*, 2002) .

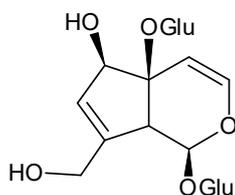
Existe una patente relacionada con la actividad antiviral que han mostrado los iridoides glucosilados (Chang Il-Moo, 1999, #5929038); un preparado farmacéutico que inhibe la replicación del virus hepatitis B, contiene Aucubina [6], Catalpol [9], Genipósido [10], Rehmanniosido [11], Harpagósido [7], Harpagido [12] y Genipina [13]. Este último iridoide no glucosilado en otra patente (Choongwae Pharmaceutical Corporation, 2000, #6162826) ha sido formulado con propósitos clínicos y utilizado como hepatoprotector y contra el virus de hepatitis B.



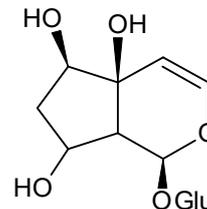
[7] harpagósido



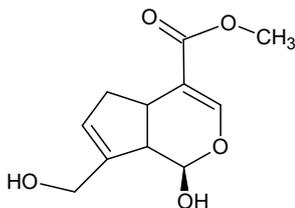
[8] scorodiósido



[9] catalpol



[10] genipósido



[11] rehmanniósido

[12] harpagido

[13] genipina

Se tienen reportes en la literatura de iridoides con potencial actividad citotóxica, antitumoral o anticancerígena probada. El genipósido **[10]** es hidrolizado a genipina **[13]** por la enzima β-D-glicosidasa que se encuentra en el intestino y saliva. La genipina **[13]** ha mostrado tener actividad antiinflamatoria, antidiabética, antitrombótica, antioxidante, antiangiogénico, neuroprotector e induce apoptosis en la línea celular Hep3B (hepatocarcinoma) (Cao *et al.*, 2010) y sobre la línea celular FaO (células hepáticas de ratón) (Kim *et al.*, 2005).

Cao y *cols.* demostraron que genipina **[13]** provoca en HeLa (carcinoma de cérvix) fragmentación de ADN lo que indica que la citotoxicidad mostrada de este compuesto sobre esta línea celular se debe a apoptosis después de un tratamiento por 24 horas a 90 µg/mL, también incrementa la cantidad de p53.

La aucubina **[6]** y genipósido **[10]** tienen la capacidad de inhibir la formación de tumores inducidos mediante la estabilización de uniones covalentes selectivas entre topoisomerasa I (Gálvez, Cordero, & Ayuso, 2005) y DNA. El genipósido **[10]** incrementa la actividad de la glutatión s-transferasa, lo que disminuye el daño al DNA (Kang *et al.*, 1997).

El genipósido **[10]** aislado del extracto etanólico de *Gardenia jasminoides* y posee actividad anti-angiogénica dependiente de la concentración y efecto inhibitorio en el rango de 25 a 100 µM sobre la línea NIH 3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón), esta actividad fue probada mediante el ensayo de membrana corioalantoica de pollo (Koo *et al.*, 2004).

El catalpol **[9]** inhibe significativamente la taqDNA polimerasa, además disminuye tumores sólidos de las líneas celulares A2780 (carcinoma de ovario), T-47D (carcinoma de mama)

y HBL-100 (células derivadas de leche materna), la CI_{50} mostrada por el iridoide oscila entre 1.8 a 4.8 μ M (Gálvez *et al.*, 2005).

Camero y colaboradores (2018) realizaron un estudio fitoquímico sobre el extracto metanólico de las hojas de la especie *Galium tunetanum* y por medio de una extracción cloroformo – metanol aislaron seis iridoideas glucosilados, entre ellos el ácido geniposídico [1]. Este grupo de investigación demostró mediante un modelo en embrión de pollo que el ácido geniposídico y el iridoide V1 poseen efecto antiangiogénico del 59% y 54 % respectivamente comparado con el estándar de referencia el ácido retinoico en un rango de concentraciones de 0.5 a 2 μ g por embrión.

2. JUSTIFICACIÓN

El Cáncer cérvico uterino es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas de entre 25 a 65 años de edad, este tipo de cáncer está asociado con la infección persistente por algunos tipos del virus del papiloma humano, estudios epidemiológicos han demostrado la presencia de VPH tipo 16 y 18 en mujeres con CaCu (<60% de los casos), por lo que se consideran de alto riesgo junto con otros 13 tipos más de VPH. Actualmente no existe un tratamiento farmacológico específico para eliminar la infección por VPH en mujeres.

El potencial de las plantas medicinales tiene importantes aplicaciones en la medicina moderna en tanto que son una fuente directa de agentes terapéuticos y/o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos. Los iridoideas son un grupo de compuestos químicos que se han reportado poseen efecto citotóxico. En un estudio previo a este, se llevó a cabo la evaluación citotóxica de los extractos metanólicos de diferentes especies vegetales (Moreno *et al.*, 2011). Como parte de este estudio, las especies *Castilleja tenuiflora* y *Penstemon barbatus* mostraron actividad citotóxica sobre las líneas celulares MCF-7, HF-6 y CaSki. A partir de dichas especies se aislaron y caracterizaron (Aburto *et al.*, 2006) un grupo de iridoideas.

Para este proyecto se seleccionaron doce iridoideas con la finalidad de evaluar su efecto citotóxico sobre un panel de líneas celulares de cáncer humano. Además, estudiamos la posibilidad de que algunos de estos iridoideas puedan tener efecto sobre la proliferación de células de cérvix humano positivas a VPH, a través de la regulación de procesos asociados a la expresión de VPH-E6 y VPH-E7, dado que la expresión de dichas proteínas interfieren

con los mecanismos de regulación en la célula, ya sea degradando a la proteína supresora de tumores p53, lo que altera el punto de control en la fase del ciclo celular G1/S; o por la inactivación de pRb, quien también participa en el control de las fases G1/S y G2/M; lo que en su conjunto conduce a la progresión del ciclo celular. Se ha propuesto que, si se puede inhibir el efecto de estas proteínas, se podría mejorar la respuesta de los tratamientos anti cancerígenos frente a la infección por el VPH en CaCu.

3. HIPÓTESIS

Los iridoides seleccionados poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el potencial citotóxico de algunos iridoides de origen natural sobre líneas celulares tumorales humanas.

4.2. Objetivo Específicos

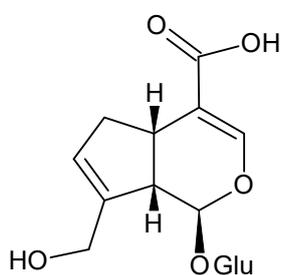
1. Determinar la citotoxicidad de doce iridoides de origen natural por el método de Sulforodamina B sobre todas las líneas celulares HF-6, PC-3, CaSki, MCF-7, KB.
2. Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sobre una línea celular de fibroblastos humanos para determinar su índice de selectividad.
3. Evaluar los compuestos activos sobre 3 líneas celulares VPH positivas y una VPH negativa con la finalidad de evaluar su espectro de acción de los compuestos sobre líneas celulares de cáncer cervicouterino y su relación con la presencia de VPHs.
4. El (los) compuesto(s) con mejor actividad se evaluará su efecto sobre la expresión y función de las proteínas VPH-E6 y VPH-E7 por RT-PCR y qPCR.

5. METODOLOGÍA

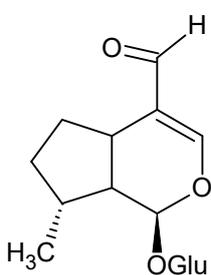
5.1. Obtención de los iridoides a evaluar

En un estudio previo realizado por (Moreno *et al.*, 2011) se llevó a cabo la evaluación citotóxica de los extractos metanólicos provenientes de varias especies vegetales, las

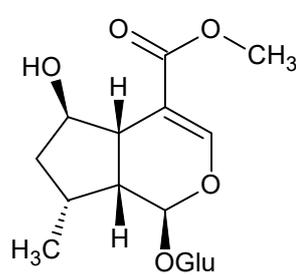
especies *Castilleja tenuiflora* y *Penstemon barbatus* mostraron actividad citotóxica sobre la línea celular CaSki ($CI_{50} = 8.72 \pm 0.633$ y 14.5 ± 0.231 , respectivamente). A partir de estas especies y de *Vitex mollis* se realizó el aislamiento y caracterización por la M. F. Rola Aburto Amar en el 2006 de siete iridoides (ácido geniposídico [1], boschnalósido [2], penstemonósido [3], 8-epi-loganina [4], mussaenósido [5], aucubina [6] y agnúsido [14]). En el presente estudio se realizó la evaluación citotóxica de doce iridoides, de los cuales siete fueron previamente aislados por Aburto en el 2006 y 5 de ellos (loganina [15], ácido logánico [16], catalpol [9], 8-o-acetilharpagido [17], genipósido [10]) fueron donados por el Dr. S. R. Jensen de la Universidad Técnica de Dinamarca (UTC).



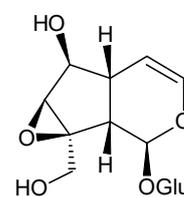
[1] ácido geniposídico



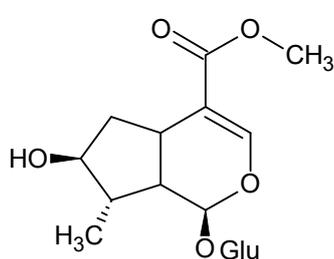
[2] boschnalósido



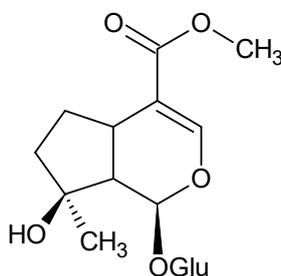
[3]
penstemonósido



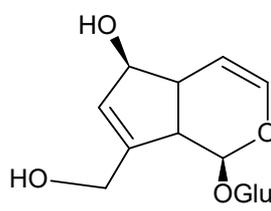
[9] catalpol



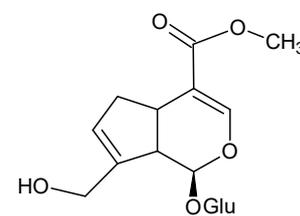
[4] 8-*epi*-loganina



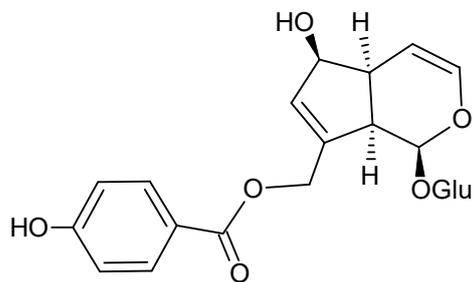
[5]mussaenósido



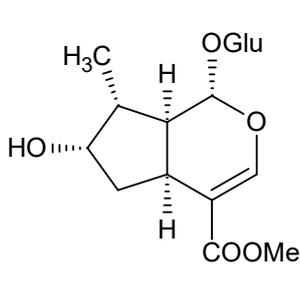
[6] aucubina



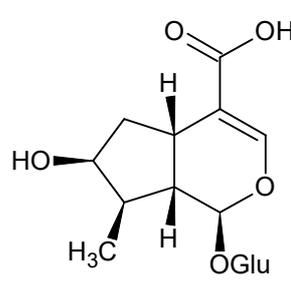
[10] genipósido



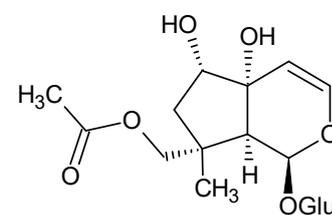
[14] agnúsido



[15] loganina



[16] ácido logánico



[17] 8-o-acetilharpagido

5.2. Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer humano que se utilizarán fueron las siguientes; KB (carcinoma de nasofaringe), HF-6 (Carcinoma de colón), MCF-7 (Carcinoma de mama), PC-3 (Carcinoma de próstata), CaSki (Carcinoma de cérvix VPH 16 y 18 positiva), HeLa (Carcinoma de cérvix VPH 18), SiHa (Carcinoma de cérvix VPH 16), C33A (Cáncer cervical VPH negativo) y MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano).

Las células fueron cultivadas en medio Advance MEM suplementado con 3% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 95%. El medio será cambiado una vez alcanzada la confluencia celular entre el 60-70%.

5.3. Evaluación de la actividad citotóxica por el método de Sulforodamina B.

Las células se crecen en cajas de 96 pozos, a una densidad de 6 X 10³ células por pozo. Los iridoideos se prepararon a 4 mg/mL en DMSO al 0.1% y se hicieron diluciones para tener las siguientes concentraciones: 10 µg/mL, 2 µg/mL, 0.4 µg/mL, 0.08 µg/mL, 0.016 µg/mL y 0.0032 µg/mL.

Como control de vehículo se utilizó DMSO al 0.1% y como control negativo etopósido. Una caja se incubó a 37°C durante 4h, y posteriormente se fijó con ácido tricloroacético al 20% en frío (ATC), para fijar las células en el tiempo cero. Otras dos cajas recibieron los diferentes tratamientos, y se incubaron por 48 o 72 horas, antes de fijarse con ácido tricloroacético.

Después de la fijación de las células se adiciona 100 µL de sulforodamina B a cada pozo de la placa y se deja reposar por 30 minutos. Se desecha el colorante y se lava 4 veces con ácido acético al 1% para eliminar el exceso de colorante. Se dejó secar al aire libre.

Se adicionó 200 µL de TRIS-BASE 10 mM, se mezcló por 30 minutos en un agitador de placas. Se midió la densidad óptica o absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 490 nm.

5.3.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Con base a la densidad óptica obtenida de cada muestra (Iridoide), el blanco y del día cero se calculó el porcentaje de sobrevivencia por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Sobrevivencia} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO día cero}}{\text{DO blanco} - \text{DO día cero}} \times 100$$

Se graficó el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de sobrevivencia, de la ecuación de la recta ($y=mx+b$) se sustituyó y por 50 y se despejó x . Obteniéndose la siguiente fórmula:

$$CI_{50} = \frac{50-b}{m}$$

De acuerdo a los parámetros establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos un compuesto puro se considera citotóxico si su concentración inhibitoria media es menor a 4 $\mu\text{g/mL}$.

5.4. Determinación del Índice de Selectividad (IS)

Para determinar la especificidad de los iridoideos evaluados sobre las líneas tumorales, se calculó el índice de selectividad, según la fórmula (Mena *et al.*, 2009):

$$\text{Índice de Selectividad} = \frac{CI_{50} \text{ del compuesto contra la línea normal}}{CI_{50} \text{ del compuesto contra la línea tumoral}}$$

Si el valor de índice de selectividad es >10 , indica que tiene mayor eficacia biológica para las células tumorales que para las células normales, si es <10 , lo contrario (Vontron *et al.*, 2003 y Caamal *et al.*, 2011).

5.5. Evaluación de la actividad sobre la expresión de los genes E6 y E7 del VPH por RT-PCR.

5.5.1. Extracción de RNA por el método de TRIZOL

En una caja de 12 pozos se cultivaron las células (60, 000 células por pozo) y fueron tratadas por los iridoideos a la CI_{50} y CI_{70} . Como control negativo se utilizó DMSO al 0.1%. Las cajas se dejaron incubar por un periodo de 48h y 72h a una temperatura de 37°C y una atmosfera de CO_2 del 5%.

La metodología empleada para la extracción de RNA se siguió de acuerdo al protocolo del kit TRIZOL® Reagent (número de catálogo 15596-018) para ello se retira el medio de cultivo de las células adherentes que previamente fueron tratadas por los compuestos iridoide, sobre la monocapa celular se realiza dos lavados con PBS (1X pH 7.4) y posteriormente se adiciona 1 mL de trizol por cada 10cm^2 de cultivo celular. El lisado celular se pasa a un tubo eppendorf estéril. Adicionar 0.2 mL de cloroformo, mezclar y centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C .

Se recupera la fase orgánica en un tubo estéril y se agregan 400 μL de isopropanol frío, mezclar y centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después se retiró el sobrenadante, se adicionaron 500 μL de etanol al 75 % y se centrifugó a 7500 rpm a 4°C. Finalmente se decanta el etanol, se deja secar la muestra y se re suspende el RNA en agua libre de DNAsas.

5.5.2. Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA obtenido se realizó en el equipo NanoDrop, a partir de 1 μL de muestra, los valores obtenidos para el índice de pureza se interpretan de la siguiente forma:

Relación A260/280

Una absorbancia de 260 nm y 280 nm es usada para evaluar la pureza del RNA, un valor de 2.0 a 2.2 es generalmente aceptado como “puro” para RNA. Valores A260/280 > 1.7 indica una muestra de ARN con pureza aceptable. Por debajo de este valor indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente o cercanamente a 280 nm.

Relación A260/230

Esta es una medida secundaria de pureza para ácidos nucleicos. Los valores 260/230 para ácidos nucleicos son a menudo más altos que la de relación 260/280, los valores esperados son entre 2.0 a 2.2. Si la proporción es sensiblemente inferior indica la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm como, por ejemplo; sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos.

5.5.3. Preparación del gel de agarosa al 1.5%

La electroforesis en gel de agarosa se prepara al 1.5% (p/v) y se corre en la cámara a 110 Volts durante 15 minutos. El gel se revela por medio de la luz ultravioleta en el equipo analizador de imágenes, ChemiDoc XRS (Quantity One-4.5). De acuerdo a la integridad de la muestra se realizará un tratamiento con DNAsas, cuyo procedimiento es el siguiente:

Utilizando el kit On-Spin Column DNasa I (catalogo 15100-50), para un volumen final de 100 μL , se consideró el volumen inicial de RNA (en este caso 20 μL), 10 μL de solución D1, 2 μL de DNasa y 80 μL de agua libre de DNasa. Se dejó a temperatura ambiente por 10

minutos, después se adicionó 1 μL de EDTA 5mM y posteriormente se dejó calentar en el termoblock durante 5 minutos a 75° C.

La efectividad del procedimiento se valoró realizando un gel de agarosa al 1.5% (p/v).

5.5.4. Conversión de RNA genómico a cDNA

La síntesis de cDNA se basó en el protocolo descrito en el kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis (catalogo K1622). La proporción de los reactivos se describe a continuación considerando una concentración de RNA de 250 ng (0.25 μg).

Componentes	Cantidad
Templado RNA	0.1- 5 μg
Oligo dT ₁₈ primer	1 μL
H ₂ O libre de nucleasas	a 12 μL
Volumen total	12 μL
Buffer de reacción	4 μL
RiboLockRNasa	1 μL
dNTP 10 mM	2 μL
Enzima TR	1 μL
Volumen total	20 μL

Las condiciones de temperatura para la reacción fueron las siguientes:

Paso	Tiempo minutos	Temperatura ° C	Ciclos
1	60	42°C	1
Inactivación	5	70°C	1

5.5.5. PCR para β -actina, E6 y E7

A partir del cDNA sintetizado se llevó a cabo una dilución 1:1000. La amplificación de cDNA se realizó de acuerdo las condiciones descritas en el kit:

Componente	Muestra	Control +	Control -
Taq Master 5X	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Oligo F	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
Oligo R	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
cDNA molde	4 μ L	4 μ L	-

Los oligos utilizados fueron beta actina, E6 y E7. El volumen final de la reacción fue de 10 μ L. Las condiciones de temperatura y tiempo se describen a continuación en la tabla.

Procedimiento	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	
Alineamiento	65 E6	30 seg	35
	65 E7		
	57 β actina		
Elongación	72	30 min	
Elongación final	72	10 min	1
Mantenimiento	4	mantener	

Las muestras fueron utilizadas para realizar un gel de agarosa al 1.5%, se corrió el gel a 110 Volts durante 15 minuto. Se realizó un análisis de bandas utilizando el equipo analizador de imágenes, ChemiDoc XRS (Quantity One-4.5).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación de la actividad citotóxica por el método de Sulforodamina B

La evaluación citotóxica se realizó utilizando el método de Sulforodamina B en las líneas celulares HF-6 (colón), PC-3 (próstata), CaSki (cérvix), KB (nasofaríngeo) y MCF-7 (mama). En la tabla 3 se describe los resultados obtenidos.

Tabla 3. Concentración inhibitoria media (CI_{50}) en $\mu\text{g/mL}$ de los iridoideos evaluados sobre las cinco líneas tumorales y la línea celular normal

Iridoide	KB	PC-3	MCF-7	HF-6	CaSki
Ácido genipósido (No.)	SE	SE	SE	41.54±0.04	0.58±0.018
Ácido logánico (No.)	SE	24.5±0.01	SE	SE	1.67±0.025
Agnúsido (No.)	SE	SE	>50	SE	SE
Aucubina (No.)	SE	SE	SE	>50	10.29±0.03
Boschnalósido (No.)	SE	SE	SE	>50	SE
Catalpol (No.)	>50	SE	28±0.014	SE	12.03±0.01
Genipósido (No.)	>50	SE	23±0.011	SE	0.134±0.009
Logánina (No.)	7.4±0.02	SE	38±0.010	SE	0.7±0.002
Mussaenósido (No.)	SE	SE	>50	>50	SE
Penstemonósido (No.)	SE	SE	SE	SE	SE
8-o-acetilharpagido (No.)	SE	SE	SE	SE	SE
8- <i>epi</i> lóganina (No.)	SE	SE	SE	SE	SE
*Etopósido	0.4±0.03	0.08±0.01	0.28±0.03	0.13±0.02	0.3±0.003
*Camptotecina	0.11±0.04	0.21±0.01	0.055±0.02	0.031±0.02	0.03±0.01

*Controles de referencia

SE -Sin efecto a las concentraciones probadas

>50 Concentración Inhibitoria Media mayor a 50 $\mu\text{g/mL}$

Este experimento dio como resultado que el ácido geniposídico (No.), genipósido (No.), aucubina (No.), loganina (No.) y ácido logánico (No.) mostraron un efecto citotóxico sobre la línea celular CaSki de cérvix. Estos mismos compuestos fueron evaluados sobre una línea de fibroblastos humanos para determinar su índice de selectividad, lo cual indicó que sólo el ácido geniposídico y genipósido mostraron una mayor eficacia biológica sobre líneas tumorales que normales. Este hallazgo hizo que nos planteáramos cuáles eran las diferencias que presenta la línea celular CaSki donde se vio reflejado el efecto citotóxico con respecto a las demás líneas celulares y entre las diversas razones una de ellas y la más importante es que CaSki es una línea VPH positiva, es decir que contiene dentro de su genoma secuencias de VPH tipo 16 y 18. Estudios epidemiológicos han demostrado la presencia del VPH tipo 16 y 18 en mujeres con CaCu (<60% de los casos), por lo que son considerados de alto riesgo junto con otros 13 tipos más de VPH. Es por ello que se decidió evaluar el efecto de estos iridoides (No. y No.) sobre otras líneas de cérvix que contuvieran estos tipos de VPH considerados de alto riesgo y que son los más comunes en mujeres con CaCu.

A partir de este antecedente se realizó la evaluación citotóxica del ácido geniposídico (No.), genipósido (No.), aucubina (No.), loganina (No.) y ácido logánico (No.) sobre dos líneas celulares VPH positivo como HeLa y SiHa; además de una VPH negativo como C33A. Como se describe en la siguiente tabla cada línea celular tiene características específicas.

Tabla 4. Líneas celulares utilizadas en el presente estudio.

Línea celular	Característica
CaSki	Este tipo de células tiene integrado VPH tipo 16 (alrededor de 600 copia de VPH-16 por célula), así como secuencias relacionadas con el VPH-18
HeLa	Las células HeLa contienen secuencias del virus del papiloma humano tipo 18
SiHa	Esta línea celular contiene VPH tipo 16 (de 1 a 2 copias de VPH-16 por célula)
C33A	Células negativas a VPH

El método de Sulforodamina B es una técnica colorimétrica que se basa en la tinción de la proteína total, estima directamente el número de células con la cantidad de proteína teñida por el colorante. Los resultados de la evaluación biológica se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Actividad citotóxica de los iridoides sobre las líneas celulares de cérvix a las 72 horas.

IRIDOIDES	CI ₅₀ en µg/ml para las líneas celulares de cáncer cervical humano			
	CaSki VPH 16 y 18	HeLa VPH18	SiHa VPH 16	C33A VPH (-)
Ácido geniposídico (No.)	0.58± 0.018	0.01±0.00203	<50	<50
Ácido logánico (No.)	1.67±0.025	3.003±0.0039	<50	48.5±0.012
Genipósido (No.)	0.134±0.009	0.524±0.002	<50	<50
Aucubina (No.)	10.29±0.031	0.89±0.0026	0.83±0.0099	<50
Loganina (No.)	0.7±0.02	12.68±0.006	<50	<50
Podofilotoxina*	0.029±0.012	0.100±0.0085	0.6963±0.01	0.038±0.018

Como se indica en la tabla 5 el ácido geniposídico (No.), el genipósido (No.), el ácido logánico (No.) y la loganina (No.) mostraron un efecto citotóxico sobre las líneas celulares CaSki y HeLa. Ambas líneas se caracterizan por tener secuencias de VPH 18. De las tres líneas VPH positivas la línea celular SiHa es la que menos copias de VPH tipo 16 contiene (de acuerdo a ATCC) y puede ser esta la razón por la que los iridoides no presentaron un efecto citotóxico a concentraciones menores de 50 µg/mL sobre ella.

La aucubina es el único compuesto que mostró efecto sobre las tres líneas celulares VPH positivas, pero no sobre la línea celular VPH negativa, aunque la CI₅₀ para CaSki fue la más alta de los iridoides evaluados. Los resultados indican que es posible que exista una asociación entre la actividad citotóxica mostrada por los iridoides y las líneas celulares VPH positivas.

El ácido geniposídico (No.) y el genipósido (No.) son los que tuvieron el valor de CI₅₀ más baja contra estas líneas celulares además de que no mostraron citotoxicidad frente a la línea celular de fibroblastos (MRC-5). Por esta razón se decidió iniciar el estudio sobre la expresión de VPH-E6 y VPH-E7 con estos compuestos. Para este ensayo se adquirió el ácido geniposídico (No.) y genipósido (No.) de sigma aldrich.

Una vez determinada la CI₅₀ y CI₇₀ del ácido geniposídico y genipósido las células HeLa fueron tratadas a estas concentraciones por un periodo de incubación de 48 y 72h. Se realizó la extracción de RNA utilizando el método de TRIZOL. Se considera que una

muestra de RNA es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa corresponde a la visualización de dos a tres bandas que indican a las subunidades de RNA. Lo cual se puede observar en la muestra y tuvo un valor en la relación A260/280 mayor a 1.7 y en la relación A260/230 <2.0.

En la figura 14 se muestra bandas que indica la expresión de los genes E6 (300 pb) y E7 (200 pb), como control del sistema se utilizó el gen de β actina (500pb). A las 72 horas se aprecia una disminución en la expresión del gen E6 y en menor proporción para E7 debido al tratamiento a la CI_{50} y CI_{70} del genipósido. Con la finalidad de semi-cuantificar esta disminución, la intensidad de cada banda se normalizó respecto a la intensidad del gen de β actina, el cuál no debería de cambiar por el tratamiento. Este análisis nos permite estimar que las células HeLa tratadas con el genipósido a la CI_{70} desde las 48 horas hay un efecto de disminución del 10% para E6, pero no para E7. A las 72 horas la CI_{70} disminuyó la expresión de E6 hasta un 20%.

Para el gen E7 a las 72 horas hubo una disminución en la expresión, pero el máximo fue del 15% con la CI_{70} .

Estos datos nos corroboran que el efecto citotóxico del genipósido no es inmediato, sino que se requiere más de 48 horas puesto que tanto por Sulforodamina B como por la expresión de los VPH-E6 y VPH-E7 se requiere de ese tiempo.

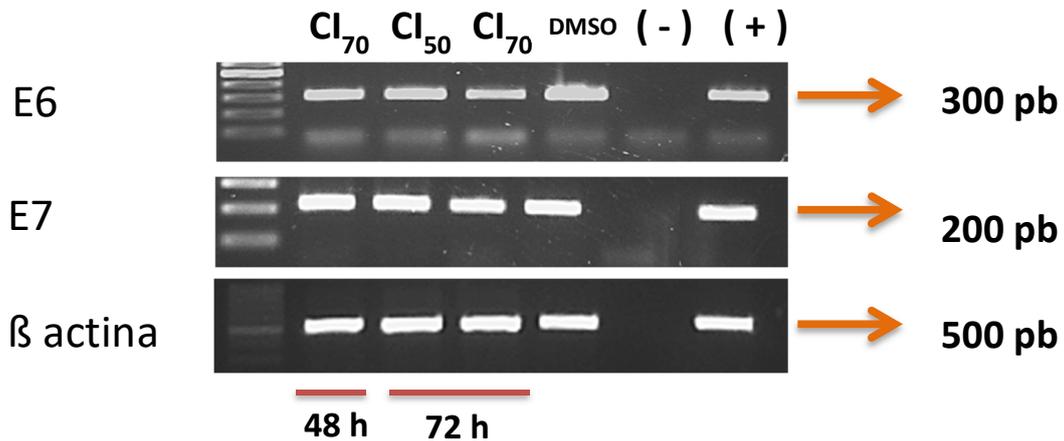
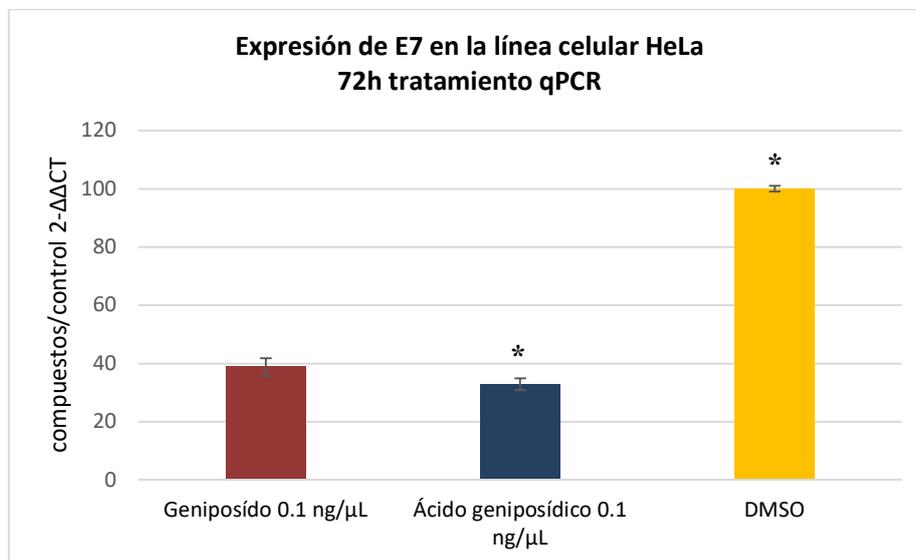
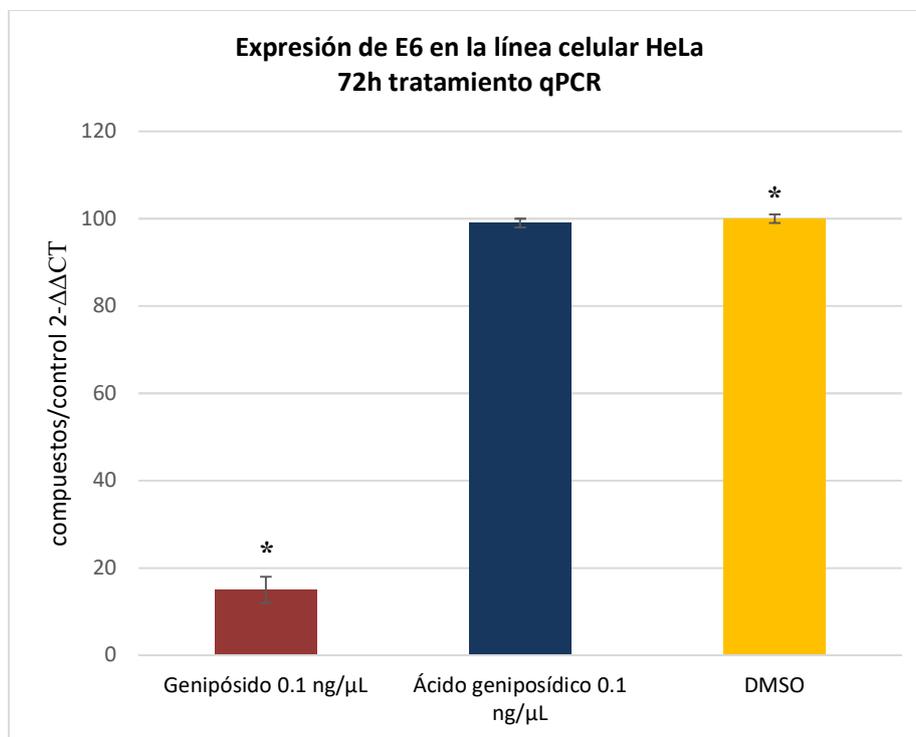


Figura 14. Células HeLa tratadas con el genipósido a una CI_{50} y CI_{70} a las 48 y 72h

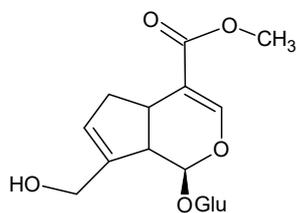
Se realizó una estancia en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomedica de Oriente (CIBIOR-IMSS) en Metepec, Puebla a cargo de la Dra. Verónica Vallejo Ruiz. Durante la estancia se evaluó de manera cuantitativa por PCR tiempo real el

aumento o disminución en la expresión de los genes E6 y E7 del VPH en células HeLa por el tratamiento con el ácido geniposídico (No.) y el genipósido (No.).

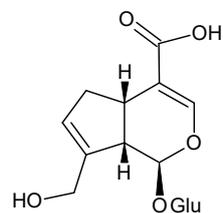


De acuerdo a los resultados obtenidos por qPCR existe una significativa disminución en la expresión del gen E6 y E7 en las células HeLa tratadas por 72 horas con el genipósido (No.). Por otro lado, el ácido geniposídico (No.) solo disminuye la expresión de E7 en la misma línea celular. Estructuralmente la única diferencia entre ambos iridoideos es una sustitución éster en el C-4 para el genipósido (No.) y un ácido carboxílico en la misma

posición para el ácido geniposídico (No.). Esta diferencia estructural podría ser la responsable de la diferencia en la expresión de los genes E6 y E7.



[10] genipósido



[1] ácido geniposídico

La inhibición en la expresión de dichos genes podría indicar que el tratamiento por estos compuestos sobre la línea celular HeLa puede revertir el efecto o modificación que sufre la célula por el virus del papiloma humano.

7. CONCLUSIONES

- Primera conclusión respecto a la hipótesis
- Resultados respecto a la actividad citotóxica de los iridoïdes sobre la baterias de líneas celulares humanas
- Aparente selectividad de los iridoïdes aobre las lineas de CaCu
- Aparente selectividad de los iridoïdes sobre cáncer infectado por VPH
- Selectividad Los iridoïdes muestran un efecto citotóxico selectivo sobre líneas celulares VPH positivo, el genipósido y el ácido geniposídico tienen mayor eficacia biológica sobre células tumorales que células normales.
- En células HeLa se observó una disminución en la expresión de los genes E6 y E7 que fueron tratadas con el genipósido a la CI₅₀ y CI₇₀ en un periodo de 72 h.
- En un experimento cuantitativo PCR tiempo real se corrobora el efecto mostrado por el genipósido en la disminución del gen E6 y E7 sobre la línea celular HeLa.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Baleja, J. D., Cherry, J. J., Liu, Z., Gao, H., Nicklaus, M. C., Voigt, J. H., ... & Androphy, E. J. (2006). Identification of inhibitors to papillomavirus type 16 E6 protein based on three-dimensional structures of interacting proteins. *Antiviral research*, 72(1), 49-59.
- Bermejo, P., Abad, M. J., Díaz, A. M., Fernández, L., De Santos, J., Sánchez, S., ... Irurzun, A. (2002). Antiviral Activity of Seven Iridoids , Three Saikosa- ponins and One Phenylpropanoid Glycoside Extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. *Planta. Med.*, 68, 106–110.
- Cao, H., Feng, Q., Wei, X., Xiaorong, L., Kang, Z., Ren, Y., & Linfang, D. (2010). Genipin Induced Apoptosis Associated with Activation of the c-Jun NH 2 - Terminal Kinase and p53 Protein in HeLa Cells. *Biol. Pharma. Bull.*, 33(8), 1343–1348.
- Chavaro Vicuña, N., Arroyo Hernández, G., Felipe Alcázar, L., Walter Muruchi, G., & Pérez Zúñiga, I. (2009). Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología México*, 1, 61–79.
- Frazer, I. H. (2004). PREVENTION OF CERVICAL CANCER THROUGH PAPILOMAVIRUS VACCINATION, 4(January), 46–54. <http://doi.org/10.1038/nri1260>
- Gálvez, M., Cordero, C., & Ayuso, M. (2005). Iridoids as DNA topoisomerase I poisons. *Journal of Enzyme and Medicinal Chemistry*, 20, 389–392. <http://doi.org/10.1080/14756360500141879>
- Gomez, Y. R. (2016). Química y Farmacología de Iridoides. In *Temas Selectos de Química de Productos Naturales* (pp. 95–127).
- Hebner, C. M., & Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses : basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.*, 16, 83–97. <http://doi.org/10.1002/rmv.488>
- Jayshree, R. S., Sreenivas, A., Tessa, M., & Krishna, S. (2009). Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis, (September), 286–295.
- Kang, J., Wang, H., Liu, T., Chen, Y., & Ueng, T. (1997). Modulation of Cytochrome P-450-dependent Monooxygenases, Glutathione and Glutathione S-transferase in Rat Liver by Geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 957–965.
- Kim, B., Kim, H., Lee, S., Lim, S., Park, E., Kim, S., & Lim, C. (2005). Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species / c-Jun NH 2 - terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. *Biochemical Pharmacology*, 70, 1398–1407. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.025>
- Koo, H., Lee, S., Shin, K., Kim, B., Lim, C., & Park, E. (2004). Geniposide, an Anti-Angiogenic compund from the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Planta. Med.*, 1, 3–5. <http://doi.org/10.1055/s-2004-818978>
- Kyoung, E. Y., & Jong-Sup, P. (2005). The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Trat*, 37(6), 319–324.
- Moreno Escobar, J. A., Bazaldúa, S., Villareal, M. L., Bonilla, J., Mendoza, S., & Rodriguez, V. (2011). Cytotoxic and antioxidant activities of selected Lamiales species from Mexico. *Pharmaceutical Biology*, (August 2010), 1–6. <http://doi.org/10.3109/13880209.2011.589454>
- Roth, L. M., & Eisner, T. (1961). CHEMICAL DEFENSES OF ARTHROPODSI. *Annu. Rev. Entomol.*, 7, 107–136.
- Sampaio-santos, M. I., & Kaplan, M. A. C. (2001). Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *J. Braz. Chem. Soc*, 12(2), 144–153.
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. (I. A. for R. on Cancer, Ed.)*World Cancer Report* (WHO Press). France.

- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Statti, G. A., & Menichini, F. (2008). Biological and Developments Pharmacological Activities of Iridoids: Recent. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(4), 399–420.
- Vallejo, V., Velázquez, N., Sánchez, P., Santos, G., & Reyes, J. (2015). La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Rev Med Inst Seguro Soc*, 53, 172–177.
- Vande, S. B., & Klingelhutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445(1–2), 115–137. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
- Mann, J.; Davidson, R. S.; Hobbs, J. B; Banthorpe, D. V.; Harborne, J. B. in *Natural Products - Their Chemistry and Biological Significance*, Longman Scientific & Technical, London, 1994.
- Abdel Kader M. S., Wisse J., Evans R., Werff H. D., Bioactive Iridoids And A New Lignan From *Allamanda cathartica* And *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest, *Journal Natural Product*, 1997; 60:1294-1297.
- Aquino R., Capasso A., De Simone F., Garofalo L., Pizza C., Sorrentino L. Inhibiting Activity of Some Glucoindolalkaloids And Iridoids From *Sickingia williamsii* On Electrically Induced Contractions of Isolated Guinea-Pig Ileum, *Phytotherapy Research*, 1996; 10:161-166.
- Bos R., Hendriks H., Scheffer J. C., Woerdenbag H. J. Cytotoxic Potential of Valerian Constituents and Valerian Tinctures, *Phytomedicine*, 1998; 5:219-225.
- Cheng-Shan Y., Qi Z., Wei-Dong X., Xiu-Ping Y., Zhong-Jian J., *Pharmazie*, 2003, 58, 428-230.
- Cooper M. Geoffrey & Hausman E. Robert. (2007). *La célula*. Madrid, España: Marbán.
- Drewes, Horn, Connolly, Bredenkamp B., Enolic Iridolactone And Other Iridoids From *Alberta magna*, *Phytochemistry*, 1998; 47:991-996.
- Ghisalberti E. L., The Ethnopharmacology And Phytochemistry Of *Eremophila* Species (Myoporaceae). *J. Ethnopharmacol.* 44: 1-9, 1994.
- Ghisalberti E.L., Biological and Pharmacological Activity of Naturally Occurring Iridoids And Secoiridoids, Review Article, *Phytomedicine*, Volume 5, Issue 2, April 1998, Pages 147-163.
- Harput U. S., Saracoglu I., Inoue M., Ogihara Y., *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25, 483-486.
- Hsu H. Y., Yang J. J., Lin S. Y., Lin, Comparisons of Geniposidic Acid and Geniposide On Antitumor and Radioprotection After Sublethal Irradiation, *Cancer Lett*, 1997; 113 (1-2): 31-37.
- Lorenzo Fernández Pedro, Moreno González Alfonso, Leza Cerro Juan Carlos, Lizasoain Hernández Ignacio, Moro Sánchez Ma. Ángeles, Portolés Pérez Antonio (2013). Velázquez Manual de Farmacología Básica y Clínica. 18ª Edición. Madrid. Medica Panamericana.
- Mena-Rejon G., Caamal-Fuentes E., Cantillo-Ciau Z., Cedillo-Rivera R., Flores-Guido J., Moo-Puc R., (2009) In Vitro Cytotoxic Activity Of Nine Plants Used In Mayan Traditional Medicine, *Journal Of Ethnopharmacology* 30, 462–465.
- Ono M., Matsuoka C., Ito Y., Noharat, Antioxidative Constituents from *Viticis Triflorae Fructus*, *Food Sci, Technolog*, 1998; 4(1):9-13.
- Picerno P., Autore G., Marzocco S., Meloni M., Sanogo R., Aquino R. P., *Journal Natural Product*, 2005, 68, 1610-1614.
- Schapoal, Winter De Vargas, Chaves C., Bridi R., Zuanazzi, Henriquez, Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of Extracts and Isolated Compounds from *Stachytarpheta cayennensis*, *J. Ethnopharmacol*, 1998; 60 (1):53-59.
- TNM Classification of malignant tumours. L. Sobin and Ch Wittekind (eds.), UICC International Union against Cancer, Geneva, Switzerland. pp155-157; 6th ed. 2002.

- Tortora J Gerard & Grabowski Reynolds Sandra. (2006). Principios de Anatomía y Fisiología. México: Oxford.
- Trovato A., Forestieri A. M., Lauk L., Barbera R., Montforte M. T., Galati M. E., Hypoglycemic Activity of Different Extracts of *Olea europea* L. In Rats. Plant. Med. Phytother. 26: 300-308, 1993.
- Vlietinick A. J., De Bruyne T., Aspers S., Pieters L.A., Plant Derived Leading Compounds for Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection, Planta Medica, 1998; 64:97-109.
- Vonthron-Sénécheau C., Bernard-Weniger B., Ouattara M., Tra-Bi F., Kamenan A., Lobstein A., Brun R., Anton R., (2003), In Vitro Ant plasmodial Activity And Cytotoxicity Of Ethnobotanically Selected Ivorian Plants, Journal Of Ethnopharmacology 87, 221–222.
- OPS. (2018). Cáncer Cervicouterino. 04 de Abril del 2019, de Organización Panamericana de Salud & Organización mundial de la Salud Sitio web: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5420:2018-cervical-cancer&Itemid=3637&lang=es

VOTOS APROBATORIOS



VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Miriam Ramirez Carrillo

Título de la tesis: "Evaluación citotóxica de algunos iridoides de origen natural sobre líneas celulares de cáncer cervicouterino"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Jorge A. Reyes Esparza
Firma del miembro del jurado

03/Julio/2019
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Ramirez Carrillo

Título de la tesis: "Evaluación citotóxica de algunos
iridooides de origen natural sobre líneas celulares
de cáncer cervicouterino"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

3 de junio 2019

Fecha



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Ramírez Carrillo

Título de la tesis "Evaluación citotóxica de algunos iridoides de origen natural sobre líneas celulares de cáncer cervicouterino"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Meneses Acosta

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (sólo en caso de rechazo):

**Firma del miembro del jurado
Angélica Meneses Acosta**

**03/06/2019
Fecha**

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Ramirez Carrillo

Título de la tesis: "Evaluación citotóxica de algunos
iridoides de origen natural sobre líneas celulares
de cáncer cervicouterino"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa
Firma del miembro del jurado

03 Junio 2019
Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Ramírez Carrillo

Título de la tesis: "Evaluación citotóxica de algunos
iridoides de origen natural sobre líneas celulares
de cáncer cervicouterino"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

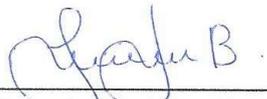
Miembro del jurado: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

3-06-2019
Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Miriam Ramirez Carrillo

Título de la tesis: "Evaluación citotóxica de algunos
iridoïdes de origen natural sobre líneas celulares
de cáncer cervicouterino."

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

Junio 3 de 2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Ramírez Carrillo

Título de la tesis: "Evaluación citotóxica de algunos
iridoides de origen natural sobre líneas celulares
de cáncer cervicouterino"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Oscar Pedraza Zaragoza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

Junio 3, 2019

Fecha