



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer**

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACION EXPERIMENTAL
ZARAGOZA (UMIEZ) LAB 2, P.B.

“Efecto Antitumoral De los Esteroides Diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo (26-OH-DI) y Diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -colestan-3 β -diilo (26-OH-HE) En La Línea Tumoral De Cérnix CaSki.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

MOISÉS LÓPEZ DÁVILA

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias.

A mi familia, por su confianza y apoyo incondicional.

A mi Madre, por el amor que me brinda, por su compañía y por cuidarme tanto.

A mi Padre, por su comprensión, paciencia, por los consejos y vivencias que me han ayudado a formarme como persona.

A mi Hermano, por creer en mí, por soñar junto conmigo y alentarme a hacer realidad esos sueños.

A paty por apoyarme

A Camila, por traer tanta alegría y cambiar el color de nuestras vidas.

A Giovanna, Denisse, Tania e Iván, que los quiero como hermanos, que me han cuidado tanto con sus consejos y su compañía.

A Eli por su sinceridad y por compartir conmigo su sonrisa que me anima a ser mejor.

A Yessica, Sandra, Paco, Bladimir, Bere, Jorge, Edgar, Sara, Giovanni, Juanito, Mariana, Karla y Elíseo por su amistad y por sus locuras que me animaron a lo largo de la licenciatura y mas.

Agradecimientos

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por permitir integrarme a su proyecto de investigación, por su apoyo y enseñanzas que permitieron mi formación académica.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez por su apoyo técnico y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, responsable del Laboratorio de Síntesis y modificación de Productos Naturales, por brindarnos los compuestos utilizados en este proyecto.

Al Dr. René García Sánchez, Jefe de enseñanza. Hospital ISSSTE Regional Ignacio Zaragoza y al Dr. Dionisio Parra Roldán. Jefe de Gineco y Perinatología por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

A Hugo y Vicente por compartir sus conocimientos, por su paciencia y por su apoyo teórico y experimental.

A los miembros del jurado:

Dr Benny Weiss Steider

M en C. Rosalva Rangel Corona

M. en C. Hugo López Muñoz

Biól. José M. V. Hernández Vázquez

Por enriquecer este trabajo con sus comentarios y aportaciones.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio, por sus aportaciones a este trabajo, por el ambiente alegre que ponen día con día al laboratorio y por su amistad que me han brindado.

Este proyecto fue realizado con el apoyo de CONACyT (Proyecto N° 84380); y con el apoyo de PAPIME (proyecto No PE204609)

ÍNDICE

Tema	Pág.
Resumen	4
Introducción	5
Marco Teórico	7
Ciclo Celular	7
Muerte Celular	10
Apoptosis	10
Necrosis	13
Cáncer	15
Cáncer Cérvico-Uterino	19
Tratamientos	23
Cirugía	23
Radiación	23
Quimioterapia	24
Saponinas esteroides	25
Justificación	29
Planteamiento del problema	30
Hipótesis	31
Objetivos	32
Material y Método	33
Resultados	38
Discusión	49
Conclusiones	53
Bibliografía	54
Anexos	60

Resumen

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una tumoración maligna que se presenta en el cuello de la matriz. En los países en vías de desarrollo el CaCu está todavía asociado a una alta mortalidad y en la actualidad ocupa en México el segundo lugar entre los tumores malignos en la población femenina. Debido a que los tratamientos para el cáncer son poco selectivos e ineficientes en estados avanzados de esta enfermedad, surge la necesidad de buscar compuestos de origen vegetal que ofrezcan una alternativa al tratamiento contra el CaCu y permitan disminuir los efectos secundarios que se presentan por la radioterapia y quimioterapia. Este es el caso de la Diosgenina y Hecogenina, que son saponinas esteroides, que han mostrado tener un efecto antiproliferativo *in vitro* en líneas de cáncer humano como osteosarcoma 1547, laringocarcinoma HEp-2, melanoma M4Beu, en células HeLa, entre otras. También, se ha observado que la modificación en su estructura puede potencializar sus efectos biológicos. Así en el presente estudio se evaluó la actividad antitumoral de los esteroides 26-OH-DI y 26-OH-HE obtenidos a partir de modificaciones químicas de la Diosgenina y Hecogenina respectivamente, sobre la proliferación de las líneas de CaCu, CaSki y de células fibroblásticas de cérvix humano. Los resultados obtenidos establecen que se requiere de una concentración de 24 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto 26-OH-DI para disminuir en un 50% la densidad celular (IC_{50}) en cultivos de la línea celular CaSki, mientras que para el 26-OH-HE se requiere de 100 $\mu\text{g/ml}$. La distribución del DNA en las diferentes fase del ciclo celular evaluada por citometría de flujo indica que el efecto antiproliferativo del 26-OH-DI es independiente del ciclo celular, mientras que la actividad antiproliferativa del 26-OH-HE es dependiente del ciclo, induciendo a las células a salir de las fases G1 y G2/M. La observación de cuerpos apoptóticos, el incremento de la expresión de la procaspasa 3 y la conversión de ésta a caspasa 3 activa en tiempos distintos así como la inducción de la fragmentación del DNA, sugiere que ambos esteroides inducen a las células CaSki a una muerte por apoptosis. Sin embargo, el 26-OH-DI a una concentración de 24 $\mu\text{g/ml}$ no afecta la proliferación de las células fibroblásticas, mientras que el 26-OH-HE a 100 $\mu\text{g/ml}$, afecta el potencial proliferativo tan solo en un 18 %, generando en estos compuestos una acción selectiva que podría ser utilizada para darles un fuerte potencial antitumoral con posibles aplicaciones terapéuticas en el CaCu.

Introducción.

La Organización Mundial de la Salud, establece que el Cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en el mundo. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500 000 casos nuevos se presentan cada año. Tan solo en el año 2002 se presentaron 493 243 casos y de éstos, 273 505 fueron decesos. En México, en el año 2002, se presentaron 12 512 nuevos casos de CaCu, de los cuales 5 777, el 46% de los casos, fueron decesos. Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6% de otros cánceres (López y Lizano, 2006).

En el 2007 la base de datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2009), los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México; 63 888 personas fallecieron por éstos, por lo que este volumen representa 12.9 % del total de las defunciones registradas. En las mujeres, 12.1 % de las defunciones por tumores malignos corresponden al del cuello del útero (cérvico-uterino) y 13.8 % al de mama; el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 7.6 % de las muertes.

En México se han realizado diversos estudios sobre CaCu, algunos de tipo descriptivo y otros de casos y controles. Estos últimos se han enfocado al estudio de los factores de riesgo asociados a CaCu o a las lesiones premalignas. Otros más han evaluado las variantes y subvariantes del virus de papiloma humano (VPH) en población mexicana (Tirado-Gómez *et al.*, 2005). Estos estudios han ampliado el conocimiento en el área, pero hasta el momento no se han presentado suficientes trabajos sobre posibles terapéuticos para combatir el CaCu y mucho menos trabajos donde se tenga un modelo de comparación de células normales contra células de cáncer.

En el presente trabajo se evaluaron a los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre la línea tumoral de CaCu CaSki y a células fibroblásticas provenientes de cérvix humano, estos compuestos son derivados de la Diosgenina y Hecogenina pero análogos a OSW-1, los cuales son saponinas esteroides de origen vegetal,

Algunas de las saponinas esteroides aisladas recientemente han mostrado ser antidiabéticos y antitumorales en asociación con la modificación del sistema inmune entre otros.

La Diosgenina y la Hecogenina tienen actividad antiproliferativa *in vitro* en varias líneas de cáncer humano como; osteosarcoma 1547, laringocarcinoma HEp-2, melanoma M4Beu y en la línea celular HeLa, entre otras (Raju y Bird, 2007; Camoutsis

et al, 2005; Trouillas *et al*, 2005). Mientras que para la molécula OSW-1, se ha encontrado que tiene una potente actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer humano (Deng *et al*, 2004).

Marco teórico

El organismo se caracteriza por tener una marcada estabilidad en el medio interno, el cual depende de una adecuada regulación en la proliferación de las diferentes poblaciones celulares que tienen lugar en sus tejidos y órganos. Por ejemplo, en la sangre el número de células de cada tipo se mantiene por el reemplazo de las que mueren o se deterioran: en otras palabras, la producción celular (salvo en situaciones patológicas) compensa las pérdidas. La sangre posee un ciclo activo de proliferación, donde las células mueren y son sustituidas ininterrumpidamente, gracias a un amplio sistema de regulación que permite un balance apropiado entre la pérdida, renovación y diferenciación celular. La mayoría de los órganos necesita mantener su tamaño, para desempeñar una función específica. Sólo una coordinada maquinaria reguladora, donde interviene un gran número de factores, puede mantener el equilibrio necesario entre los procesos que entraña la proliferación de las poblaciones celulares, definida como el incremento del número de células, resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte celular (Sánchez - Socarrás V., 2001).

Ciclo celular

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases: en la fase G_0 o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G_1 (*gap 1*) de pre síntesis, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G_2 (*gap 2*) o de post-síntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o mitosis. El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “detenidas” en G_0 durante años (Figura 1) (Burgués *et al*, 2005).

Durante los intervalos G_1 y G_2 , la célula monitorea los ambientes intracelulares y extracelulares para asegurar que las condiciones sean las apropiadas. En puntos determinados de G_1 y G_2 la célula debe decidir si pasa a la siguiente fase o efectúa una pausa que permita ganar tiempo y reparar daños o completar la preparación. La proliferación celular depende de nutrientes y de moléculas de señalización específica del medio extracelular, si las condiciones son desfavorables la célula puede retardar el

proceso a través de G₁ e incluso puede ingresar a G₀. El punto de control G₂ garantiza que las células no ingresen en la fase de mitosis hasta que no se haya reparado el ADN y se complete su replicación (Alberts *et al*, 2002).

En la fase M se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. La fase M, para su estudio se divide en: 1) Profase: en esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromátidas hermanas) se condensan en el núcleo, mientras en el citoplasma se comienza a ensamblar el huso mitótico entre los centrosomas; 2) Metafase: Comienza con el rompimiento de la membrana nuclear, de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas éstos se alinean en el ecuador de la célula; 3) Anafase: Se produce la separación de las cromátidas hermanas, las cuales dan lugar a dos cromosomas hijos, que migran hacia polos opuestos de la célula; 4) Telofase: Aquí ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil; 5) Citocinesis: Finalmente se divide la célula mediante el anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas cada una con un juego completo de cromosomas (Alberts *et al*, 2002).

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estricta. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular. Primariamente el ciclo celular está catalizado por complejos que contienen cinasas dependientes de ciclinas (cdks, del inglés; cyclin-dependent kinases) y ciclinas. Las cdks son proteínas de cinasas con treonina/serina que son activadas en puntos específicos del ciclo celular, al menos son siete cdks en células de mamíferos y son críticas para la progresión a través del ciclo celular porque éstas también actúan en su inhibición. Las cdks son reguladas por varios procesos, uno de ellos es la fosforilación en residuos de treonina y tirosina. Las ciclinas realizan múltiples funciones de regulación y son necesarias para la activación de las cdks; algunas cdks se unen a más de una ciclina y éstas están ligadas a las cdks y probablemente les provee especificidad a los sustratos (Schafer K., 1998). Estas proteínas actúan en diferentes espacios de tiempo, permitiendo o inhibiendo el progreso adecuado del ciclo celular. Esta capacidad de orden, se debe principalmente, a que las proteínas (p.e.las ciclinas), que no se

utilizan, son eliminadas por un complejo de degradación llamado ubiquitina-proteosoma.

Así el ciclo avanza por G1 con un incremento en la expresión de las ciclinas D, que se asocian con cdk4 y cdk6, resultando en su fosforilación y activación; éstos ya activados, fosforilan a la proteína RB (Retinoblastoma) que tiene un papel crítico en la regulación de la progresión del punto de restricción de G1. Los miembros de la familia RB son proteínas que retienen a las proteínas de transcripción E2F, evitando que formen complejos con el ADN. En estado hipofosforilado, RB puede capturar a E2F evitando su actividad transcripcional. Cuando RB es fosforilado por cdk4/6 se disocia de E2F y el ciclo continúa. Cuando la célula avanza por G1 tardía, hay también un aumento en la expresión de la ciclina E que es requerida acompañada con cdk2 para la transición de G₁ a S; en esta transición, aumenta la expresión de la ciclina A y persiste durante S. La ciclina A es capturada por cdk2 y procede a la síntesis del ADN (Peralta *et al*, 1997; Israels y Israels, 2000).

En el punto de control G2, se monitorea que no exista daño en el ADN o que no se haya copiado completamente, en cuyo caso el ciclo es detenido hasta que el daño sea reparado o el ciclo sea abortado, en caso de que el daño exceda la capacidad de la célula para repararlo. Al final de G2, los complejos cdk1-ciclina A y ciclina B, se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico, además de asegurarse que los cromosomas se unan a éste. Se encarga además: de iniciar la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas, las cuales participan en el mecanismo que permite desensamblar la envoltura nuclear, la fosforilación de las láminas nucleares, el rearmado del citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Lodish *et al.*, 2000).

En condiciones fisiológicas, la homeostasis celular mantiene el estado de diferenciación de cada célula y regula estrictamente su tasa de proliferación, su tiempo de supervivencia y su territorialidad, de acuerdo con las necesidades del organismo, así, las células mueren y son sustituidas ininterrumpidamente, gracias a un amplio sistema de regulación donde la muerte celular toma un papel fundamental (Schafer K., 1998).

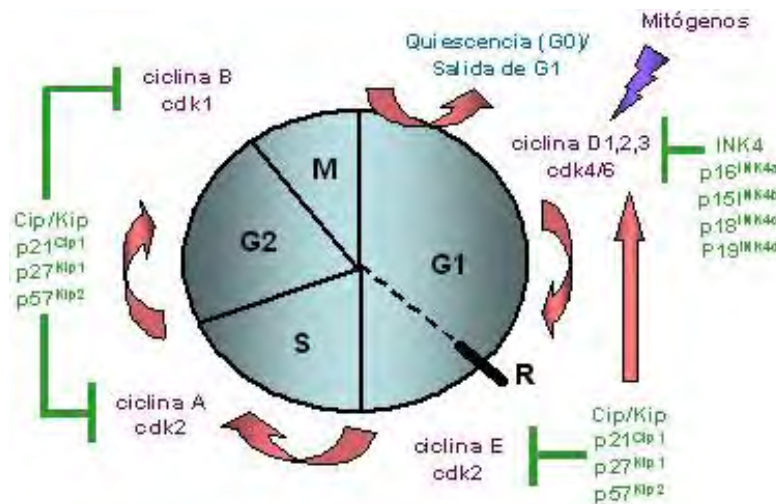


Figura1. Ciclo celular de una célula eucariota, esquema que permite ilustrar el proceso y las moléculas que intervienen en cada una de las fases del ciclo celular. Tomado de www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Muerte celular

Durante el desarrollo y también en el estado adulto, hay numerosas células que degeneran y mueren. La muerte celular es un proceso fisiológico ó patológico que conduce a la eliminación celular y que tiene una función esencial en la homeostasis de los tejidos y en los estados patológicos. Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo las más habituales la necrosis y apoptosis (Raff M., 1998). Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia. Si bien ambos tipos son ordenados, la apoptosis presenta una mayor relevancia por ser un proceso natural a diferencia de la necrosis.

Apoptosis.

Tan importante como la división celular y migración celular, la muerte celular programada permite que el organismo tenga un control estricto en el número de células y por lo tanto en el tamaño de un tejido (Hengartner *et al*, 2000). En los organismos pluricelulares, la muerte celular ocurre como un proceso necesario de su desarrollo. Existen ejemplos clásicos de muerte celular como parte del desarrollo, muerte celular en el embrión como mecanismo de embriogénesis, para formar diferentes estructuras, muerte de neuronas incapaces de establecer una conexión intersticial adecuada (Sánchez – Socarrás V., 2001) y a menudo la necesidad de deshacerse de las células que están en exceso, o potencialmente peligrosas.

Las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación, ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto, considerada como una muerte natural fisiológica, que actúa de manera “silenciosa”, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Cohen *et al*, 1997; Jordan J., 2003).

La apoptosis está caracterizada por una serie de distintas alteraciones morfológicas y bioquímicas, y ocurre en dos fases: la primera es un compromiso de muerte celular seguida de una fase caracterizada por dramáticos cambios morfológicos estereotipados en la estructura de la célula (Figura 3); así ocurre una condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, compactación de los organelos, dilatación del retículo endoplásmico, un decremento en el volumen celular, formación de vesículas y fusión con la membrana plasmática, y alteración en la membrana plasmática donde hay una translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación (Solary *et al*, 1996).

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis parece ser similar para todas las células animales. Esta maquinaria depende de una familia de proteasas que tienen en su sitio activo cisteína y se ancla a su proteína blanco con un ácido aspártico. Éstas son llamadas caspasas. Las caspasas son sintetizadas en la célula como precursores inactivos, o procaspasas, que son usualmente activadas por el anclaje de ácido aspártico por otras caspasas. Una vez activada, la caspasa se ancla y así activa otra procaspasa, resultando en una amplificación de una cascada proteolítica, algunas de las caspasas activas se unen a proteínas claves por ejemplo a la laminina, causando el irreversible desglose de la membrana nuclear; otras se unen a proteínas que normalmente tienen una enzima que degrada el ADN (ADNasa) en forma inactiva, que se libera y corta el ADN dentro del núcleo de la célula, en este camino, la célula se desmantela así misma rápido y limpiamente, y los cuerpos son rápidamente fagocitados y digeridos por otras células (Alberts *et al*, 2002).

Para el estudio de las caspasas, éstas se clasifican en base al tamaño del predominio. Las caspasas con grandes predominios, como las caspasas-2, 8 y 9 funcionan como iniciadores de señales que se encuentran al principio de cascadas proteolíticas, mientras que las que presentan un predominio pequeño, como las

caspasas-3, 6, y 7, se localizan debajo de las caspasas iniciadoras y funcionan como proteasas efectoras que rompen principalmente sustratos proteicos en núcleo y citoesqueleto (Caballero *et al*, 2002).

Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por ruptura proteolítica mediante dos vías alternativas:

1.- Vía del receptor de muerte celular: los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia génica de receptores del TNF (TNFR). Los mejor caracterizados son los receptores Fas, también conocido como CD95 (del inglés; cytotoxicity-dependent proteína 95) o APO-1 (del inglés; apoptosis-1 protein), y el receptor del TNF (TNFR). Tienen en común una secuencia homóloga denominada “dominio de muerte”, capaz de iniciar la cascada de eventos que lleva a la apoptosis.

El receptor Fas activado recluta moléculas adaptadoras como el FADD/ MORT-1 (del inglés; Fas-associated death domain/ mediator of receptor-induced toxicity-1), que contiene también un “dominio de muerte” (DD) que se une al análogo del receptor Fas y un “dominio efector de muerte” que se une a un dominio análogo a la procaspasa 8, que sufre una activación auto-catalítica al unirse al FADD convirtiéndose en la caspasa 8 activa. La caspasa 8 rompe y activa otras caspasas efectoras como la 3, la 6 y la 7.

2.- La vía mitocondrial: Se trata de una vía independiente de los receptores de muerte y es la que inducen los agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas del estrés (especies reactivas del oxígeno o nitrógeno). Las mitocondrias son orgánulos con dos compartimentos: la matriz, rodeada por la membrana interna (MI), y el espacio intermembranal, entre las membranas interna y externa (ME). En la MI está la ATP sintetasa y la cadena respiratoria y en el espacio intermembranal está el citocromo c, que al ser liberado al exterior de la mitocondria induce apoptosis, las proteínas de la familia Bcl-2 regulan esta liberación; los miembros anti-apoptóticos de esta familia (Bcl-2 y Bcl-xL) bloquean la liberación del citocromo c, mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) la inducen. Cuando el citocromo c se libera, provoca el ensamble de apaf-1 (del inglés; apoptotic protease-activating factor) con la procaspasa 9, formándose el complejo denominado apoptosoma. El apaf-1 tiene un dominio reclutador de caspasas denominado CARD (del inglés; caspase recruiting domain), que requiere ATP para la inducción de la ruptura auto catalítica de la procaspasa 9 en caspasa 9 activa. Esta última se libera del apoptosoma para activar a

las caspasas 3, 6 y 7, que provocan la ruptura de diversos sustratos y la apoptosis (Figura 2) (Burgués *et al*, 2005).

En especial la caspasa -3, es crucial en la apoptosis porque se ancla y rompe o modifica la función de cientos de sustratos de proteínas y es un importante punto de convergencia de las rutas de apoptosis extrínseca (iniciado por receptores de muerte) e intrínseca (mitocondrial) (Figura. 2) (Porter G., 2006).

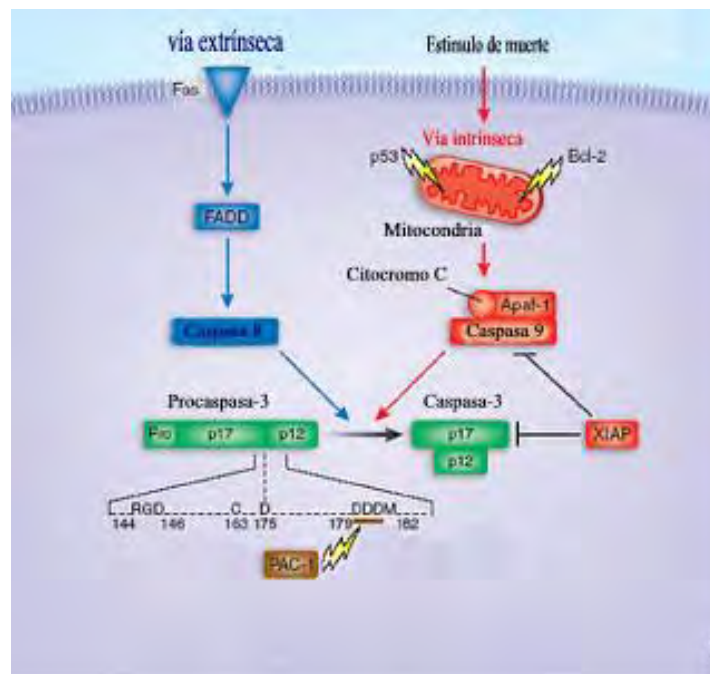


Figura.2 Vías de activación de las caspasas; en azul la vía extrínseca y en rojo la vía mitocondrial las cuales convergen en la caspasa 3. (Porter G., 2006)

Necrosis.

La necrosis es un tipo de muerte celular, se asocia con la pérdida temprana en la integridad de las membranas, lo que resulta en la salida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular. Al igual que ocurre en la apoptosis, en las células necróticas se suman cambios morfológicos que siguen a la muerte celular.

A diferencia de la apoptosis, las células necróticas sufren autólisis, con liberación de enzimas, y desencadenan así una reacción inflamatoria que atrae leucocitos y proteínas plasmáticas. Finalmente tiene lugar la degradación de las células muertas (Figura. 3).

La muerte celular por necrosis se concreta en 2 etapas:

1. Autolisis.

Incluye todos los cambios que dependen de alteraciones en los componentes celulares, proceso que ocurre con un patrón morfológico en cierta medida característico y que consiste en cambios en el núcleo (disolución progresiva de la cromatina o cariolisis); cambios en el citoplasma (pérdida de la basófilia por esparcimiento de las ribonucleoproteínas); aspecto homogéneo del citoplasma (por pérdida de los compartimientos celulares); tumefacción de las mitocondrias.

2. Fagocitosis de los restos celulares por los macrófagos tisulares.

Todos estos cambios condenan a la célula a perder su función específica, y solamente forma parte de restos celulares que serán fagocitados por los macrófagos. La muerte de las células no siempre va seguida de la disolución inmediata de su armazón, puede seguir distintos caminos que originan distintos tipos morfológicos de necrosis, (Sánchez- Socarrás V, 2001).

Es así que el término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (Jordán J, 2003).

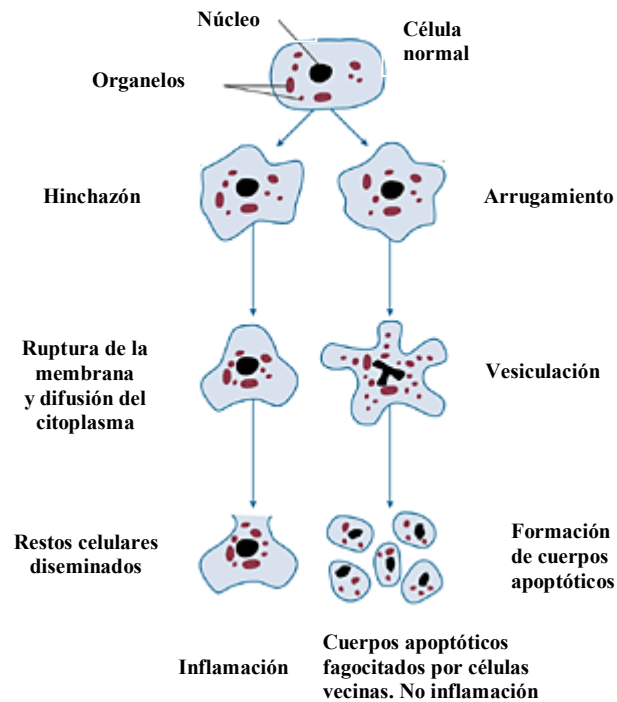


Figura 3. Muerte por necrosis a la izquierda, en la cual se puede observar como la célula vierte su contenido hacia el exterior, provocando respuesta inflamatoria; a la derecha, se presenta la muerte por apoptosis en la cual se observan la vesiculación (cuerpos apoptóticos) que finalmente son fagocitados. Tomado de <http://anatomy.iupui.edu>

Morfológicamente, la diferencia con la necrosis es que en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular. Bioquímicamente, la característica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (De Toro G, 1996; Burgues *et. al*, 2005).

Así el desarrollo de una apoptosis inapropiada está implicada en muchas enfermedades humanas, como el Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varias formas de cáncer (Burgues *et. al*, 2005).

Cáncer

Los controles que regulan la multiplicación celular en raras ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre comienza a dividirse en forma descontrolada, al margen de las necesidades del organismo de más células de este tipo. Cuando esta célula tiene descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida, por último, este clon de células no deseadas

forma una masa, denominado tumor. Así el cáncer es una enfermedad en la cual clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas, destruyendo finalmente toda la sociedad celular y se produce a una escala temporal de meses o años en una población de células del organismo (Figura 4) (Schmitt *et al*, 2002).

Existen factores biológicos, químicos y físicos que contribuyen al desarrollo del cáncer. Dentro de los biológicos se encuentran los virus, en los químicos se puede mencionar sustancias cancerígenas como el benceno y dentro de los físicos se encuentra los rayos UV, todos muestran una propiedad común, provocan cambios en el genoma, sin embargo la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen. Existen dos diferencias claves entre el cáncer y otras enfermedades genéticas. La primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen, sobre todo en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en la línea germinativa; la segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino, mas bien, de la acumulación de entre 3 y 20 mutaciones, en genes que regulan la multiplicación celular normal. Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias: ella y su progeie (1) se reproducen a pesar de las restricciones normales e (2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células. La combinación de estas características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso (Alberst *et al*, 2002).

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas. Estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorogénico (Evan *et al*, 2001).

Las alteraciones más notables después de la transformación ocurren en los cromosomas. En general las células normales conservan su dotación cromosómica diploide normal conforme crecen y se dividen. Mientras que las células cancerosas con frecuencia presentan dotación cromosómica muy aberrante, alteración denominada aneuploidia. Los cambios morfológicos más notables ocurren en el citoplasma, casi siempre afectan al citoesqueleto. La célula normal por lo general tiene una red bien organizada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, el citoesqueleto de la célula cancerosa a menudo está reducido, desorganizado o ambas cosas. Las células cancerosas tienen una capacidad disminuida para responder a los estímulos que desencadenan la apoptosis. La mayoría de las células normales desarrollan una

dependencia de factores ambientales específicos para mantener su viabilidad, por su parte las células tumorales desarrollan cierto grado de independencia de estos factores ambientales, aparentemente son inmortales en el sentido de que continúa dividiéndose de manera indefinida mientras las condiciones de nutrientes y de cultivo sean adecuadas para su sobrevivencia (Karp G., 2006).

Así, si la proliferación celular está fuera de control, producirá un tumor o neoplasma, una masa de células que crece de manera inexorable. Mientras las células neoplásicas permanezcan agrupadas en una masa única y encapsulada, se dice que el tumor es benigno, según el Instituto Nacional de Cancerología, usualmente se pueden remover y en la mayoría de los casos no reincide. En la mayoría de los tumores benignos no se considera como una amenaza de muerte, sin embargo deben de ser observados y tratados adecuadamente. Un tumor se considera canceroso solo si las células tienen capacidad de propagarse a otras regiones del organismo, lo cual se logra a través de dos mecanismos; la invasión y la metástasis. La invasión es la migración y la penetración directa por las células del cáncer en los tejidos vecinos. La metástasis es la capacidad de las células del cáncer de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través de la circulación sanguínea, y después crecer en un nuevo foco (metástasis) en tejidos normales de otra parte del cuerpo.(Alberst *et al*, 2002).

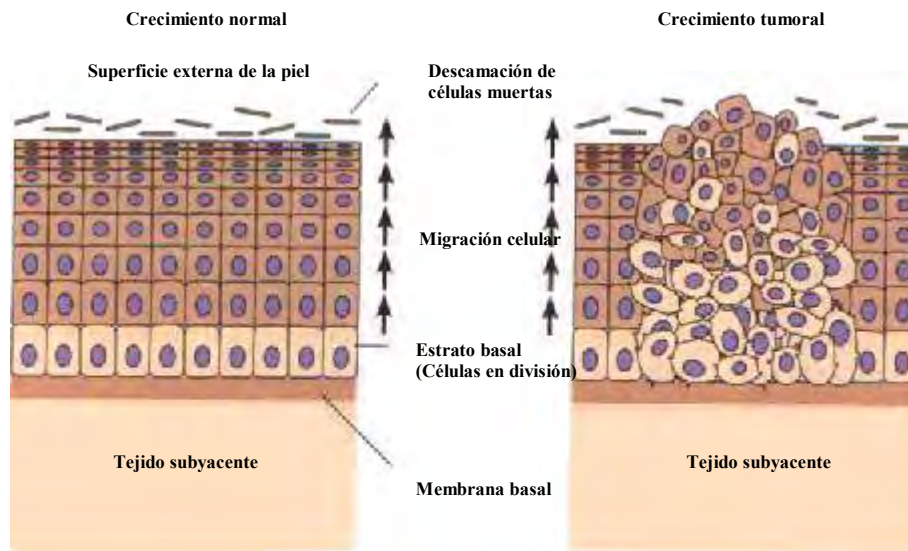


Figura. 4 Esquema de la proliferación descontrolada de una célula cancerosa, con pérdida total de los controles de proliferación (Derecha). Células con una división normal y controlada (Izquierda) (Becker W. *et al*, 2007).

Tipos de cáncer

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo de célula a partir del cual se originan (Alberts *et al*, 2002).

En el primer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

El segundo grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.

El tercer grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas, los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas; los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes (Pardo F, 1998).

Cáncer cérvico-uterino (CaCu).

El útero es el órgano hueco, en forma de pera invertida, donde se desarrolla el feto. El cuello ó cérvix uterino es una abertura que conecta el útero con la vagina ó canal de nacimiento (Figura 5a).

El CaCu es un tipo frecuente de cáncer en mujeres y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas en los tejidos del cuello uterino.

Las lesiones malignas del cuello uterino pueden ser intraepiteliales, pre invasivas, o invasoras. Los carcinomas invasores se pueden originar en el epitelio escamoso del exo-cérvix o en el epitelio glandular del endo-cérvix. Según el lugar de origen se denominan carcinomas escamosos o adenocarcinomas, respectivamente (Pagani *et al*, 1999).

En los países en vías de desarrollo el CaCu está todavía asociado a una alta mortalidad, a diferencia de lo que sucede en los países desarrollados, donde la mortalidad ha disminuido de manera considerable. (Tirado-Gómez *et al*. 2005). En México, en las mujeres, el 13.9% de las defunciones por tumores malignos corresponden al del cuello del útero (cérvico-uterino) y 15% al de mama; el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 9.2% de las muertes (INEGI 2008).

Se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CaCu, cómo el número de parejas sexuales, el inicio temprano de vida sexual activa, la multiparidad, etc. Sin embargo, el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % (Vázquez-Ortiz *et al.*, 2005) de los casos. Entre los VPHs más incidentes se tienen principalmente a los tipos de 16 y 18 con un 50.8 % y 15.5% respectivamente (Berumen-Campos J, 2003). El VPH, es un virus de doble cadenas circular de ADN y de tamaño pequeño (aproximadamente de 8000 pares de bases); los VPHs han convivido con la especie humana durante decenas de miles de años y sufren relativamente pocos cambios en su composición genética. Se ha identificado más de 100 tipos diferentes de VPH (Figura 5b) (Castellsagué X., 2008).

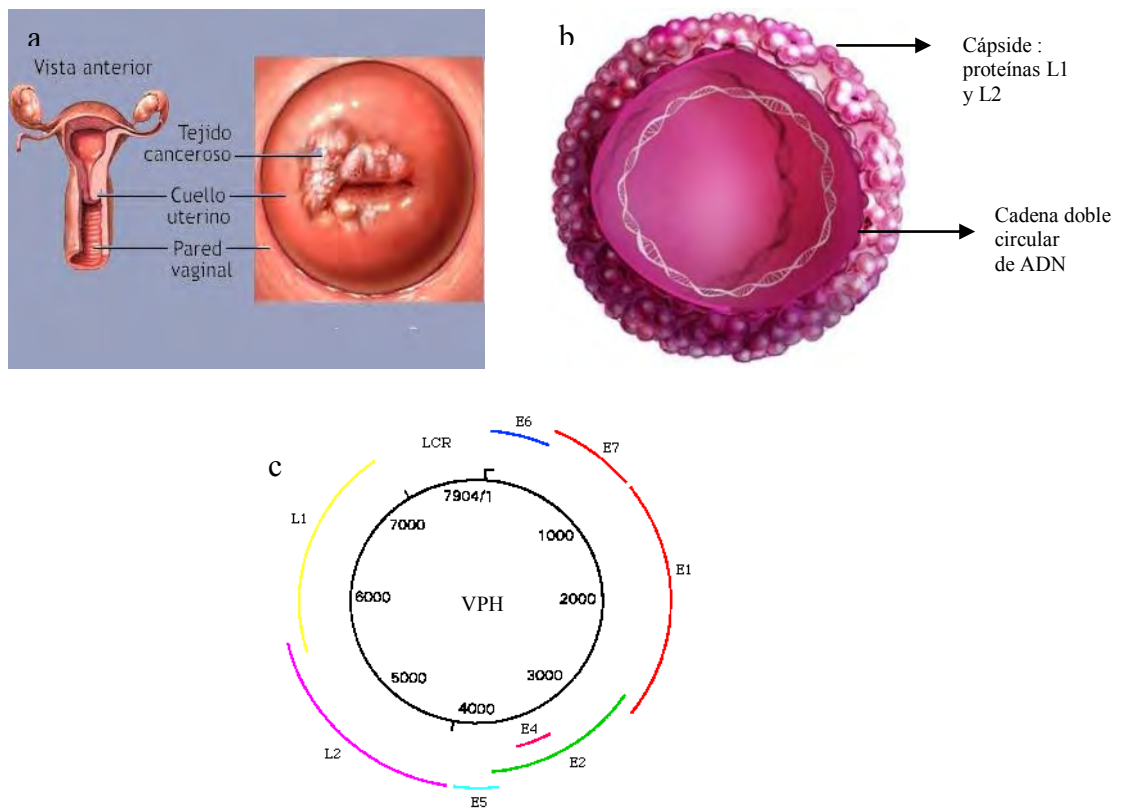


Figura 5. a) Vista de un cuello uterino con principios de cáncer así como su localización anatómica. b) Estructura del virus del papiloma humano (VPH). Tomado de <http://i.esmas.com> y <http://el-nacional.com> respectivamente. c) mapa genético del VPH. Tomado de www.respyn.uanl.mx.

Dependiendo del riesgo de malignidad los VPHs son agrupados como de bajo riesgo o de alto riesgo. Los de alto riesgo como lo son el VPH-8, -16, -18 y 31 causan una progresión maligna de lesiones como el cáncer cervical o anal (Ganguly y Parihar, 2009), mientras que los de bajo riesgo como el VPH -6 y -11 producen verrugas benignas y lesiones que no se desarrollan a malignidad (Zur Hausen H, 2002).

La infección de VPH es básicamente una enfermedad de transmisión sexual, tanto para hombres como para mujeres y es capaz de ser por algún tiempo asintomático. Todo los VPH tienen una organización genómica común y codifican 8 proteínas, de las cuales están las de expresión temprana: E1, E2, E4, E5, E6, E7; y las proteínas de expresión tardía L1 y L2. E1 y E2 son factores de replicación y están también involucrados en el control de transcripción; E4 y E5 se cree que regulan las funciones tardías del virus; E6 y E7 son oncoproteínas; y L1 y L2 son proteínas de estructura. Las proteínas E6 y E7 del grupo de VPH de alto riesgo son los que contribuyen a la transformación maligna. Se cree que la combinación de la persistencia de la infección

del VPH junto con la inhabilidad del sistema inmune para eliminarlo son los factores centrales que contribuyen a la integración del genoma del VPH al ADN de la célula hospedera, que es un paso crítico para la tumorigénesis (Garnett y Duerksen-Hughes, 2006).

El ciclo de proliferación del VPH difiere de otras familias de virus: la infección requiere de la habilidad de las células epidérmicas o mucosas epiteliales que tienen la capacidad de proliferar (capa de células basales). En estas células, la expresión de los genes virales es baja en gran parte, la replicación del ADN viral se mantiene en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extracromosómica, llamados episomas que se estructuran en base a histonas y material genético. Se postula que durante esta etapa se asegura que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune (Rivera *et al*, 2006; Zur Hausen H., 2002).

A pesar de la limitada expresión específica de los genes virales tempranos (E5, E6 y E7), existe el aumento de la proliferación de las células infectadas y de su expansión lateral. Cuando las células basales proliferantes migran a los estratos superiores se amplifica la expresión de genes virales tempranos, los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula. Una vez que el virus entra a la capa suprabasal, inicia la expresión de los genes virales tardíos; el genoma viral comienza a replicarse y a formarse las proteínas estructurales. En las capas superiores de la epidermis o mucosa, la partícula viral son ensambladas y liberadas (Figura 6) (Zur Hausen H., 2002).

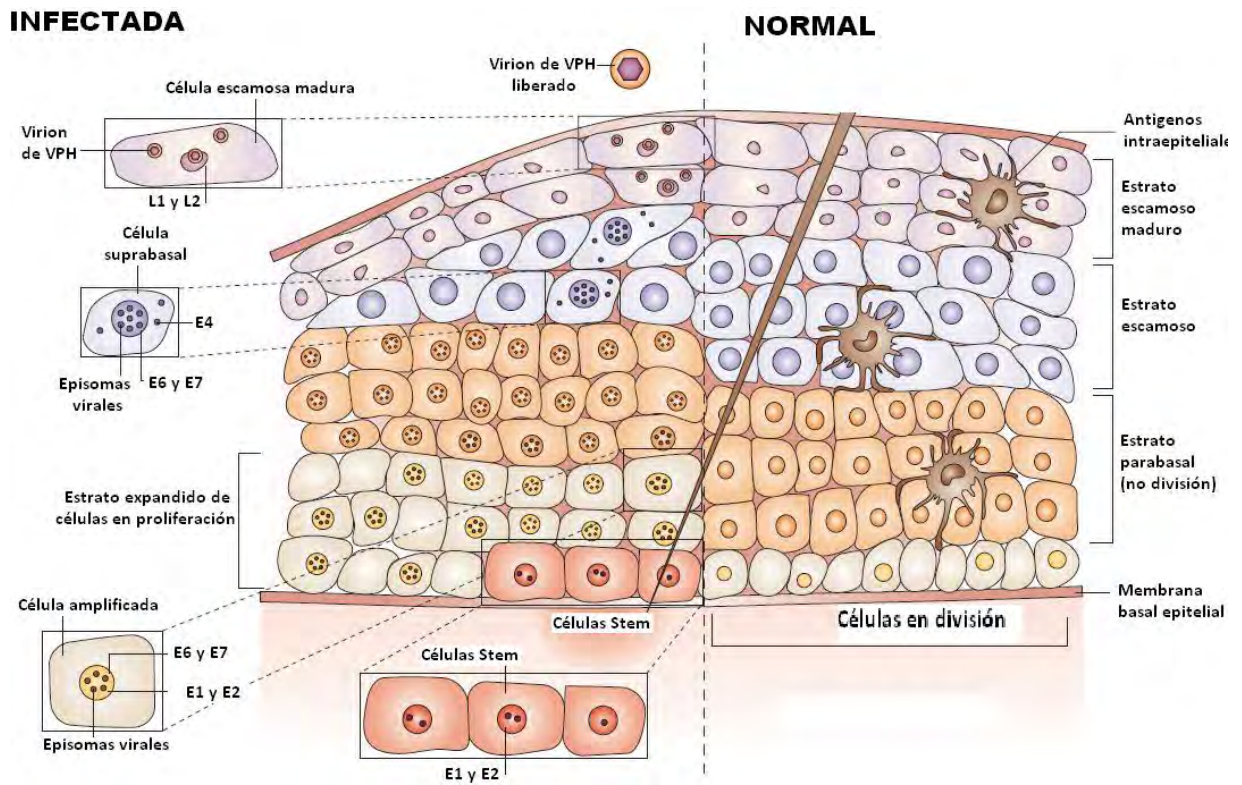


Figura 5. Ciclo de replicación del virus del papiloma humano (modificado de Frazer , 2004)

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Aunque recientemente se ha introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas, los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el Papanicolaou, que busca cambios en las células de la zona de transformación. El sistema actual de reporte para clasificar la citología cervical es el de Bethesda 2001, la cual es una nomenclatura creada para incorporar los conceptos citológicos y unificar la terminología y cuyo fin principal es comunicar la mayor información posible para ser utilizada en el manejo de la paciente, a través de un informe descriptivo en el que se incluyan todos los aspectos citológicos (a nivel hormonal, morfológico y microbiológico) (Lacruz C., 2003).

Tratamientos contra el cáncer.

Los tres tratamientos principales del cáncer son: cirugía, radioterapia y quimioterapia y se aplican de forma separada o conjunta. Estas técnicas se usan para curar ó prevenir que el tumor crezca y/o paliar los síntomas cuando la enfermedad está muy avanzada.

La cirugía:

Este tratamiento implica una operación quirúrgica para quitar el tumor o los tumores. Sin embargo si hay metástasis este tratamiento es ineficaz.

La cirugía es la forma más antigua de tratamiento del cáncer. Además, la biopsia quirúrgica tiene una participación importante en el diagnóstico de la mayor parte de los procesos malignos. El desarrollo de modalidades terapéuticas más modernas, como la quimioterapia y la radioterapia, ha llevado a reducir la indicación de procedimientos quirúrgicos radicales, pero la cirugía continúa siendo el único tratamiento potencialmente curativo para muchos pacientes con cáncer (Cameron R., 1995).

Radiación:

El tratamiento con radiación utiliza rayos X o partículas de alta energía para destruir células cancerosas o aminorar su crecimiento.

La potencia y la precisión de las radiaciones emitida por los aparatos de alta energía obligan a un rigor extremo en la conducta del tratamiento, por ello es necesario:

- Definir muy bien el área específica que representa la zona enferma que debe irradiarse.
- Elegir las condiciones de irradiación que permiten proporcionar una dosis máxima a nivel del tumor y mínima a nivel de los tejidos sanos de la vecindad.
- Controlar las constantes físicas del aparato (cantidad y calidad de las radiaciones emitidas).

Al irradiar las células con enormes cantidades de partículas de energía, provocan modificaciones profundas, fundamentalmente a nivel del núcleo de la célula. De ello resultan perturbaciones que pueden destruirlas o hacerlas incapaces de reproducirse.

Su mecanismo de acción se basa en el daño directo e indirecto del ADN a través de radicales libres (Cameron R., 1995), es por ello que se tiene que las células son más sensibles en la fase S del ciclo celular, así como en la mitosis.

El problema de la radioterapia como tratamiento es que se lesionan todas las células que se encuentren en el haz, sin distinción entre células normales o malignas. Por otra parte, cualesquiera que sean las precauciones tomadas durante la radioterapia, no puede evitarse la irradiación de los tejidos sanos al mismo tiempo que se realiza la irradiación del cáncer (Khoury y Dasmin, 1981; Johns y Cunningham, 1981).

Quimioterapia.

La quimioterapia utiliza medicamentos para reducir los tumores y minimizar el riesgo de que el cáncer se extienda a otras partes del organismo y el riesgo de que el cáncer vuelva a desarrollarse. De esta manera la apoptosis ocurre en muchos tipos de células del cáncer cuando se expone a una variedad de drogas quimioterapéuticas, que incluyen a los antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de deoxynucleótidos, los inhibidores de la topoisomerasa de ADN, agentes que interfieren con los microtúbulos, y agentes alquilantes entre otros. (Miyashita *et al*, 1993).

En cualquier tejido y también en los tumores existe un equilibrio entre las células que se encuentran en fase G1 con las que están en reposo en G₀. Las células en G₀ son relativamente inactivas con respecto a la síntesis de macromoléculas y en consecuencia, insensibles a muchos de los antineoplásicos, particularmente a los que afectan a esta síntesis. Los agentes quimioterapéuticos que actúan sobre las células en división más que sobre las células en G₀ se denominan “específicos del ciclo celular”, mientras que aquellos que actúan también sobre las células en G₀ reciben el nombre de “no específicos del ciclo celular”. A su vez, los específicos del ciclo celular pueden ser “fase específicos” si actúan sólo sobre alguna de las fases, o “no fase específicos” si actúan en cualquier fase del ciclo celular (Burgués *et al*, 2005).

A pesar de los indudables beneficios que cualquiera de estos dos tratamientos aportan en la lucha contra el cáncer, sus efectos secundarios son de consideración, caída del pelo, mucositis, disfagia, vómito o náuseas, por lo cual la calidad de vida del paciente se ve disminuida drásticamente. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial terapéutico. Actualmente existe un fuerte interés en probar compuestos de origen vegetal y en particular en esteroides, a los

cuales se les han atribuido diferentes actividades biológicas, entre las que se destaca la actividad antitumoral.

Saponinas esteroides

Los esteroides junto con los terpenoides son derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado perhidrociclopentanofenantreno, y son conocidos genéricamente como isoprenoides. Los esteroides no son verdaderos triterpenos, en el sentido de que su estructura no se apega al patrón C30; poseen esqueletos C27-C29 (o mas pequeño), pero está correctamente clasificado dentro del grupo de los triterpeno verdaderos, ya que todos derivan del mismo precursor; el escualeno, molécula que puede ciclarse de manera diversa o bien, epoxidarse, dando origen a una gran variedad de estructuras esteroidales (Anaya L. 2003).

Los esteroides difieren entre si, en el número y la posición de sus dobles enlaces, en el tipo, localización y número de sus grupos funcionales sustituyentes, en la configuración (α o β) de los enlaces entre los grupos sustituyentes y la configuración que adoptan los anillos entre si, ya que el hidrocarburo original posee seis centros de asimetría. Los principales puntos de sustitución son el carbono 3 del anillo A, el carbono 11 del anillo C y el carbono 17 del anillo D. El primer producto esteroide importante es el lanosterol que es el precursor del colesterol en los tejidos animales, el colesterol y el lanosterol son miembros de un gran subgrupo de esteroides llamados esteroides; son alcoholes esteroides que contienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo A. El colesterol aparece muy raramente en las plantas superiores las cuales contienen otros tipos de esteroides conocidos colectivamente como fitosteroides. Entre éstos se halla el estigmasterol y el citosterol (Nelson y Cox , 2005).

Los derivados esteroideos se han manejado como agentes citotóxicos que mejoran la especificidad en el tratamiento del cáncer. El descubrimiento de estos nuevos agentes con propiedades anticancerígenas es en base a sustancias con estructura y citotoxicidad conocidas (Camoutsis *et al*, 2005).

Las saponinas son compuestos naturales caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glicósidos y/o éster entre una genina poco polar y restos glucósidos, con una estructura esteroideal (C27) o triterpénica (C30). La remoción del sacárido por hidrólisis ácida produce lo que es una saponina (Omoruyi F., 2008).

Las saponinas reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espuma, por esto se han utilizado ampliamente por sus propiedades detergentes. Esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares; tienen propiedades hemolíticas, son tóxicas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas (Anaya L. 2003).

Las saponinas esteroidales no están tan ampliamente distribuidas en la naturaleza, como las triterpenoides; las saponinas esteroidales abundan especialmente en las monocotiledoneas: *Dioscoraceae*, *Amarylidaceas*, *Agacaceae* y *Liliaceae*. También existen saponinas esteroidales en algunos equinodermos.

Sin duda la más útil de todas las saponinas esteroides es la diosgenina, que se encuentra en diversas especies de *Dioscorea*; este metabolito está disponible en grandes cantidades (5 a 10%) en los rizomas de estas plantas y es utilizado como materia prima en el proceso industrial de fabricación de cortisona y hormonas sexuales como la progesterona. Otra saponina de gran importancia para la generación de hormonas esteroides es la hecogenina que se encuentra en el *Agave sisalana*. (Anaya L. 2003).

Las saponinas esteroides son metabolitos secundarios biosintéticos cuyos precursores son los esteroides, especialmente el colesterol, éstos constituyen estructuralmente una clase diversa de productos naturales y son uno de los mejores componentes en la medicina tradicional china (Ming-Jie *et al*, 2005).

Algunas de las saponinas esteroides aisladas recientemente han mostrado ser antidiabéticos y antitumorales en asociación con la modificación del sistema inmune entre otros.

Se ha reportado que la actividad de las saponinas está relacionada con la estructura para un efecto antihepatitis, usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas, derivadas sintéticamente (Hong-Ji *et al*, 2006). Sin embargo, el encontrar los compuestos adecuados con propiedades antitumorales es difícil ya que dicha actividad debe estar basada en el efecto diferencial que debe tener el compuesto entre las células tumorales y las normales. Este es el caso de los compuestos **Diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo (26-OH-DI)** y **Diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -colestan-3 β -diilo (26-OH-HE)**, compuestos esteroides derivados de la Diosgenina y Hecogenina respectivamente, pero que fueron generados como análogos a la saponina OSW-1 (Figura 7). Se ha reportado que la Diosgenina suprime la absorción del colesterol, incrementa la secreción de éste a través de la

excreción biliar, induce diferenciación de la línea celular eritroleucémica humana por cambios de las actividades de la lipoxigenasa y también induce apoptosis y paro en el ciclo celular en la línea tumoral de osteosarcoma humana 1547 (Son *et al*, 2007). Mientras que la Hecogeina es conocida por su efecto antitumoral; inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana (Liagre *et al*, 2007), y se ha encontrado que ésta inhibe la proliferación celular en cultivos celulares cancerígenos HeLa (Camoutsis C., 2005).

La molécula de OSW-1 fue aislada de *Ornithoagalum saundersiae*; tiene una estructura esteroidal con un azúcar y un residuo p-metoxibenzoil en el carbono 16 (Tamura *et al*, 1997), se ha encontrado que tiene una potente actividad antiproliferativa en líneas celulares humanas, El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos probó a OSW-1 contra 60 líneas celulares de cáncer encontrando en promedio una IC50 de 0.78 nM, siendo así 10 a 100 veces más potente comparado con agentes anticancerígenos con aplicación clínica, como por ejemplo el cisplatino, camptotecina y taxol (Deng *et al*, 2004; Tang *et al*, 2007), sin embargo, el OSW-1 es un compuesto que se extrae en cantidades mínimas (Xu *et al*, 2009), es por ello que surge la necesidad en tratar de hacer la síntesis total del compuesto ó sintetizar análogos a su estructura.

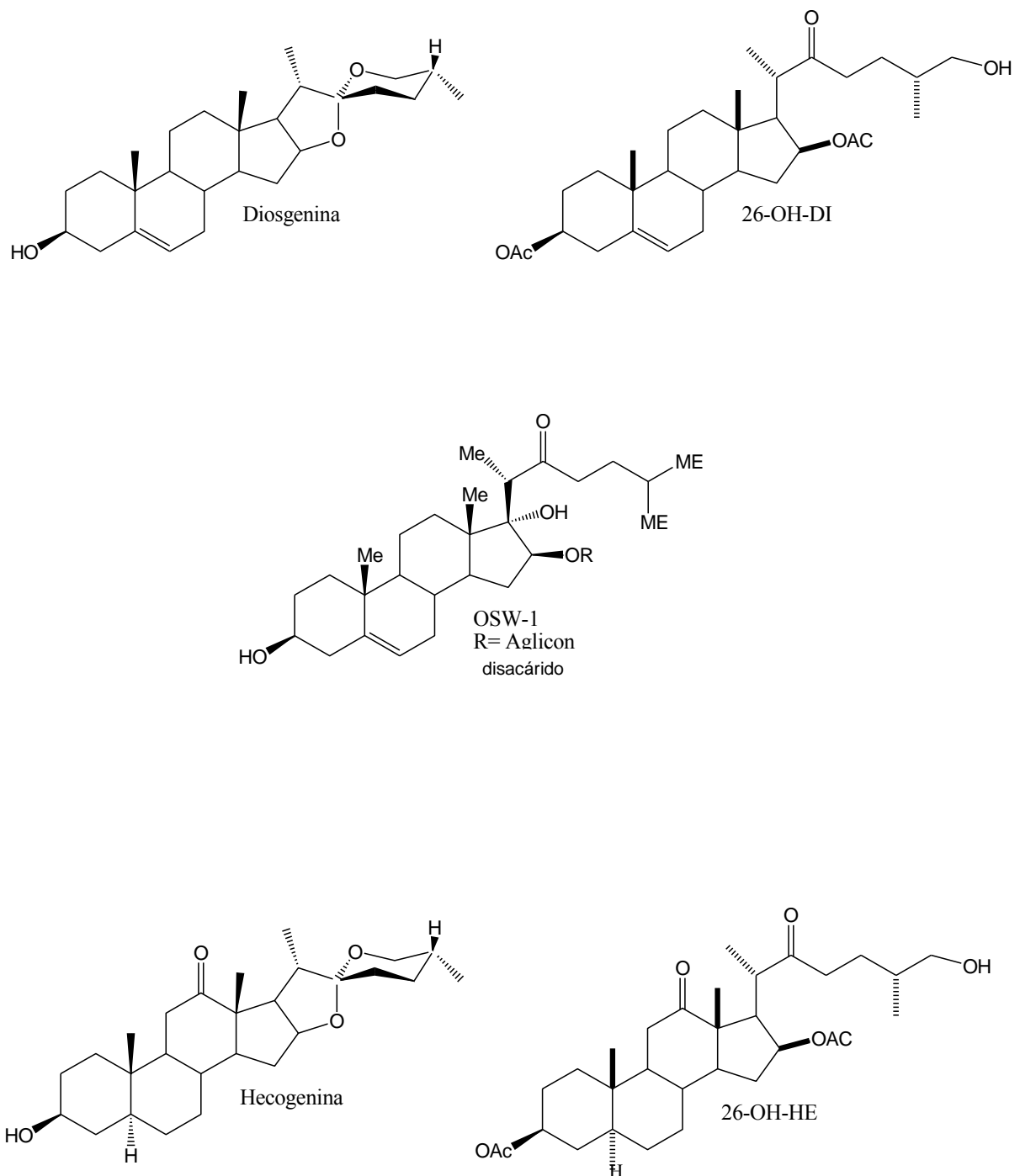


Figura7. Estructura molecular de la Diosgenina, Hecogenina y OSW-1 y sus derivados 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente.

Justificación.

El CaCu es uno de los más incidentes en nuestro país en mujeres de 35 a 65 años de edad y representa la segunda causa de mortalidad con respecto al cáncer (INEGI, 2008). Además, el número creciente de resultados en investigación básica que emplean compuestos de origen vegetal y que han sido propuesto en terapias alternativas, están orientadas hacia la prevención y tratamiento del cáncer, dentro de este grupo de compuestos encontramos a las saponinas esteroides, a las cuales se les han encontrado efecto citotóxicos, entre otros (Chan P., 2007); sin embargo se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el CaCu , por lo que es necesario generar información acerca de la actividad de las saponinas esteroides como agente terapéutico contra el cáncer.

Planteamiento del problema.

El cáncer cérvico-uterino en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, mientras que en México Durante 2007, los tres principales tipos de cáncer que causaron defunciones en las mujeres fueron el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) (INEGI 2008). Para combatir esta enfermedad, existen diversas alternativas de tratamientos, sin embargo, éstos son muy agresivos, poco selectivos y sin efecto en pacientes en fases avanzadas o terminales de la enfermedad, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. En la actualidad existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal, con actividad antitumoral y con acción selectiva. Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos, que presentan un fuerte interés por sus múltiples actividades biológicas, se encuentran las saponinas y sus derivados, las cuales han demostrado una diversa actividad biológica, como antifúngicas, antiinflamatorias e inclusive antitumorales. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado sobre el cáncer cérvico-uterino, por lo que resulta de interés, determinar la actividad antiproliferativa de los derivados de la saponina Diosgenina y Hecogenina 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente, en líneas de cáncer cervical, con el fin de aportar información que permita establecer si este derivado saponínico tiene potencial antitumoral.

Hipótesis:

Actualmente se ha encontrado que las saponinas como la Diosgenina y la Hecogenina, compuestos de origen vegetal, presentan propiedades farmacológicas tales como antifúngicas, hipocolesterolemicas, antidiabéticas, actividad antioxidante, anticancerígenas e inductoras de apoptosis. En especial, se ha reportado que la Diosgenina y la Hecogenina presentan actividad antiproliferativa en la línea de osteosarcoma 1547 y la línea de CaCu HeLa, además, algunos estudios revelaron que la diferencia en sus estructuras de las saponinas, incluyendo el tipo y el número de azúcares, el doble anillo, entre otros, influye en la respuesta biológica, por lo que se espera que sus derivados el 26-OH-DI y 26-OH-HE obtenidas por una modificación química de la Diosgenina y Hecogenina respectivamente, presenten una actividad antiproliferativa así como una inducción de muerte por apoptosis en células de CaCu CaSki.

Objetivos:

➤ General.

Evaluar el efecto antiproliferativo y apoptótico de los derivados de la Diosgenina y Hecogenina, 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente, así como su efecto en el ciclo celular e inductor de apoptosis sobre la línea celular proveniente de CaCu CaSki.

➤ Particulares

- 1.- Establecer las condiciones que permitan generar cultivos de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano.
- 2.- Desarrollar cultivos de la línea tumoral CaSki, proveniente de CaCu.
- 3.- Determinar la concentración de 26-OH-DI y 26-OH-HE en la que se disminuye el 50% del número celular (IC_{50}), en cultivos de células CaSki.
- 4.- Evaluar el efecto del 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre el ciclo celular de la línea tumoral CaSki.
- 5.- Determinar la presencia de cuerpos apoptóticos en las células de CaCu CaSki después del tratamiento con 26-OH-DI y 26-OH-HE
- 6.- Determinar mediante inmunocitoquímica, si los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE inducen el incremento de la expresión de procaspasa-3 así como la expresión de caspasa-3 activa como parámetros de inducción de muerte por apoptosis.
- 7.- Determinar si los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE inducen fragmentación del ADN en las células tumorales como un parámetro de muerte por apoptosis, a través de la técnica de TUNEL.
- 8.- Evaluar el efecto antiproliferativo del 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano.

Material y Método.

Cultivo de la línea tumoral CaSki.

La línea celular de carcinoma epidermoide de cérvix (CaCu) CaSki, positivo al VPH tipo 16 (American Type Culture Collection), es sembrada en cajas petri de cristal de 100 mm (Pirex USA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, USA) con rojo fenol suplementado con bencilpenicilina (Grünenthal, Mex) y al 5 % de suero neonato de ternera (NCS, Gibco, USA) desactivado previamente. Los cultivos son mantenidos a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair USA). Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales a un 70 % de saturación (fase de crecimiento exponencial) (Morgan y Darling, 1993).

Para la realización de los ensayos con cultivos de células CaSki, se utilizó un control (Células en RPMI-1640 con 5% de NCS), un vehículo (Células en RPMI-1640 con 5 % de NCS y 1% de acetato de etilo) y los tratamientos (Células en RPMI-1640 con 5 % de NCS, 1% de acetato de etilo y la concentración de 26-OH-DI y / o 26-OH-HE). Básicamente se dejaron adherir las células CaSki en una caja petri (Pirex USA), placa de 96 pozos (Corning, USA) o cubre objeto por 24 horas con medio de cultivo RPMI-1640 con rojo fenol suplementado con NCS al 5 % (Gibco, USA), posteriormente se les cambio el medio de cultivo por; RPMI-1460 al 5 % de NCS (control); RPMI-1640 al 5 % de NCS y adicionando el 1 % de acetato de etilo (Ac-Et.; vehículo); y RPMI-1640 al 5 % de NCS con las concentraciones de 26-OH-DI ó 26-OH-HE (tratamiento) por 24 horas, finalmente los cultivos fueron utilizados para la determinación de la IC₅₀, la expresión de pro caspasa 3 y caspasa 3 activa, así como para los ensayos de ciclo celular y fragmentación de DNA.

Preparación del compuesto 26-OH-DI y 26-OH-HE

Los derivados de la Diosgenina y Hecogenina 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente, fueron sintetizados en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

Para la evaluación de los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE se preparó un stock con 1 mg de cada uno de los compuestos, los cuales fueron solubilizados en 50 μ l de acetato de etilo con una concentración final de 20 μ g/ μ l.

Determinación del número celular a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.

Se sembraron 7500 células de la línea celular CaSki, en cajas de 96 pozos (Corning. USA), con 100 μ l de medio RPMI-1640 al 5% de NCS, en las cuales se colocaron concentraciones de hasta 100 μ g/ml. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al* (1989), para ello, se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pozos, se dejó secar al aire e inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich. USA) por 15 minutos, al cabo del tiempo, se retiró el fijador y se dejó secar muy bien al aire, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma- Aldrich. USA) por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada. Nuevamente, se dejó secar al aire. Por último, el colorante es solubilizado en ácido acético (J.T.Baker, Mex) al 10 % en agitación por 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector de ELISA (Image Tecan Spectra, USA). Los resultados de los grupos tratados son comparados con el respectivo control y se grafican.

Efecto del 26-OH-DI y 26-OH-HE en el ciclo celular

Se sembraron 1 000,000 de células de la línea celular CaSki en cajas de cultivo de 50 mm de plástico (Corning inc. USA), para los tratamientos se contemplaron las IC₅₀ de los compuestos esteroideos 26-OH-DI y 26-OH-HE. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con Verseno, se centrifugaron y lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS), pH 7.3. El botón celular fue fijado y resuspendido con 1ml de metanol al 50% en PBS, pasando 20 minutos se centrifugó y se lavó con PBS. El botón fue resuspendido con 500 μ l de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó 10 μ l de yoduro de propidio (0.2 μ g/ml), se mezcló y se protegió de la luz. Para finalizar se analizaron las muestras en un citómetro de flujo (Coulter, USA).

Determinación de la expresión de procaspasa 3 y caspasa 3 activa por inmunocitoquímica.

Para determinar si los derivados esteroideos 26-OH-DI y 26-OH-HE inducen un incremento en la concentración de la procaspasa 3 y caspasa 3 activa, como parámetros para inducir apoptosis, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1 x 1 cm en un volumen de 300 μ l de RPMI-1640 al 5 % de NCS en cámara húmeda por 24 horas. El tratamiento consistió en las IC₅₀ de los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente. se procedió a realizar la detección de la procaspasa 3 y caspasa 3, en ensayos separados por inmunocitoquímica, brevemente: las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 15 minutos, al término de el tiempo se procedió a lavar cuidadosamente 3 veces con PBS, posteriormente se permeó con tritón X-100 0.5% (Gibco, USA) durante 5 minutos a 4 °C, y nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, después se adicionó el anticuerpo primario, diferente para cada determinación, para pro-caspasa 3 fue anticaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody 1:100 en PBS (Lab Vision , USA), mientras que para caspasa 3 activa antes de adicionar el anticuerpo primario (Anti-caspase 3, active antibody produced in Rabbit 1:50 en PBS; SIGMA-Aldrich,. USA) se realizó un bloqueo por una hora con PBS-BSA (Albumina Sérica de Bovina)-tween-20 durante un periodo de 2½ horas en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo para ambas pruebas (goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS. Neomarker Fremont, USA) en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ horas, posteriormente se lavó la muestra 3 veces con PBS para después aplicar el flourocromo DAPI (Sigma- Aldrich, USA) de manera muy cuidadosa durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestra con medio de montaje VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA). Las preparaciones, fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

Evaluación de la fragmentación de DNA a través de la técnica de TUNEL.

Gavrieli *et al*, desarrollaron la técnica de marcaje *in situ* denominada TUNEL (Transfer Uridin Nick-End Labelling). TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado

expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Los nucleótidos biotinilados, son incorporados por la enzima TDT al extremo 3'OH del DNA fragmentado. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una fluorescencia roja.

Para determinar si el efecto antiproliferativo de los derivados esteroidales 26-OH-DI y 26-OH-HE inducen fragmentación del ADN, como un parámetro que determine la inducción de muerte apoptótica, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la procaspasa3. Al término del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS preparado al momento. La fragmentación del DNA fue determinada mediante el kit Apoptag Red *in situ* apoptosis detection Kit (Chemicals, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Las preparaciones fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA), se guardaron en oscuridad a -20 ° C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

Procesamiento y obtención de células fibroblásticas de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico-uterino (CaCu). Una vez que se obtuvo la pieza quirúrgica, una porción de tejido fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB) a 4 °C y fue procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos, ambas partes fueron cortadas por separado en trozos pequeños (1-2 mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05 %. Esto consistió en colocar los trozos de tejido en un matraz Erlen Meyer de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37°C en un baño con agitación durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vertió a través de una malla de nylon, dejando el tejido no disgregado en la malla, la solución de tripsina se colectó en un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía 1 ml de SFB y fue centrifugado a 2000 rpm en una centrifuga clínica. El paquete celular obtenido de la disgregación fue resuspendido en RPMI al 10 % de SFB, de tal manera que las células del paquete fueron sembradas en cajas de cultivo de 5 ml (Corning inc. USA). Por otro lado, se añadió nuevamente a la muestra de tejido remanente 10 ml de tripsina y se continuó durante 15 minutos más con agitación suave a 37 °C. La mezcla

se vertió a través de una malla de nylon que permitió solo el paso de la tripsina con el material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. Las células obtenidas del disgregado fueron cultivadas en cajas de cultivo de 5 ml y se mantuvieron en una incubadora (Scientific) al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas máximo, después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio (totalmente), de tal manera que fueron removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 %. En este momento se obtienen poblaciones fibroblásticas o epiteliales, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitieron mantener poblaciones de un solo tipo celular. La resiembra consistió en separar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentra a un 70 % de saturación, con ayuda de la proteasa tripsina al 0.05 % por 1 a 3 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas por centrifugación (2000 rpm) dos veces y posteriormente fueron contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo (Freshney R. 1994; Griffiths B. 1988)..

Cuantificación de la procaspasa-3 y caspasa 3 activa, mediante el programa Adobe Photoshop CS2.

El porcentaje de fluorescencia fue obtenido a través del Programa Adobe Photoshop CS2, para ello, todas las imágenes correspondientes a procaspasa- 3 y caspasa 3 activa, se trasladaron a una hoja de Photoshop donde se cuantifica la luminiscencia de un mínimo de 100 células por condición en la ventana de Histograma, posteriormente, se analizaron los valores.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos experimentales fueron sometidos a un análisis estadístico de análisis de varianzas (ANDEVA) con una significancia del 0.05% seguida de una prueba de Tukey, todos los resultados se compararon contra el vehículo (Acetato de etilo). Esto se realizó en el paquete SPSS 10.0 para Windows.

Resultados.

Con el propósito de evaluar los efectos del 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre número celular de las células provenientes de CaCu CaSki así como el de determinar la IC_{50} , células CaSki fueron tratadas con diferentes concentraciones de los esteroides 26-OH-DI y 26-OH-HE (Figura 8).

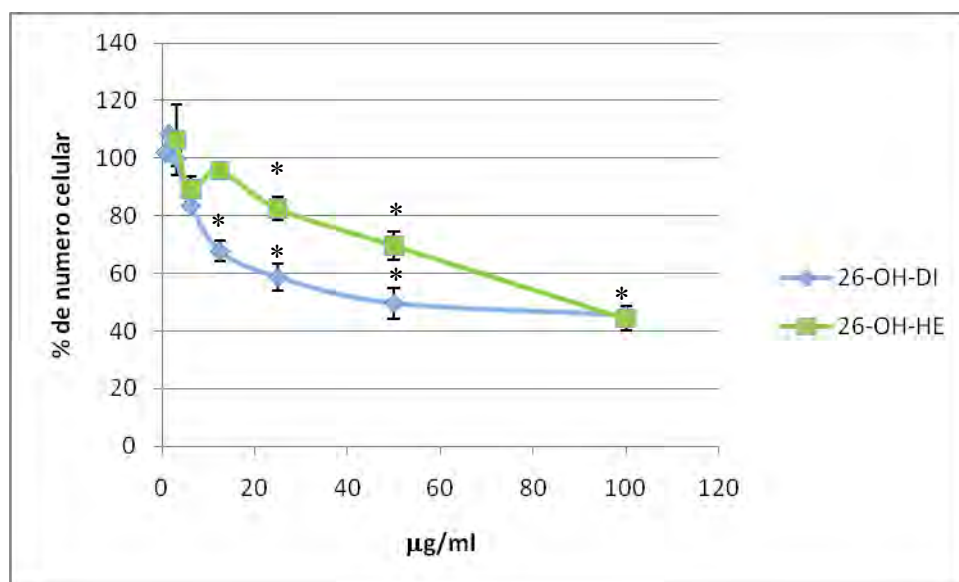


Figura 8. Efecto del esteroide 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre el potencial proliferativo de células CaSki.

* $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). Ac-Et: Acetato de Etilo

Los resultados obtenidos indican que la acción de los derivados diosgenínico y hecogenínico 26-OH-DI y 26-OH-HE, son dependientes de la dosis, es decir, el número celular se disminuye conforme se incrementa la concentración del compuesto (Figura 8), afectando directamente el potencial proliferativo de las células tumorales CaSki e implicando que ambos esteroides presentan una actividad biológica sobre esta línea celular. Sin embargo, el cálculo de la concentración que disminuye en un 50% el número celular (IC_{50}) fue de 24.34 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ para 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente, sugiriendo que las células CaSki son más sensibles a la acción del 26-OH-DI ya que requiere de una concentración cuatro veces menor que la requerida con el 26-OH-HE. Simultáneamente, cultivos de células CaSki fueron tratados con la IC_{50} calculadas para ambos esteroides y los cultivos fueron fotografiados, con la intención de evaluar el efecto de ambos compuestos en la morfología de estas células (Figura 9).

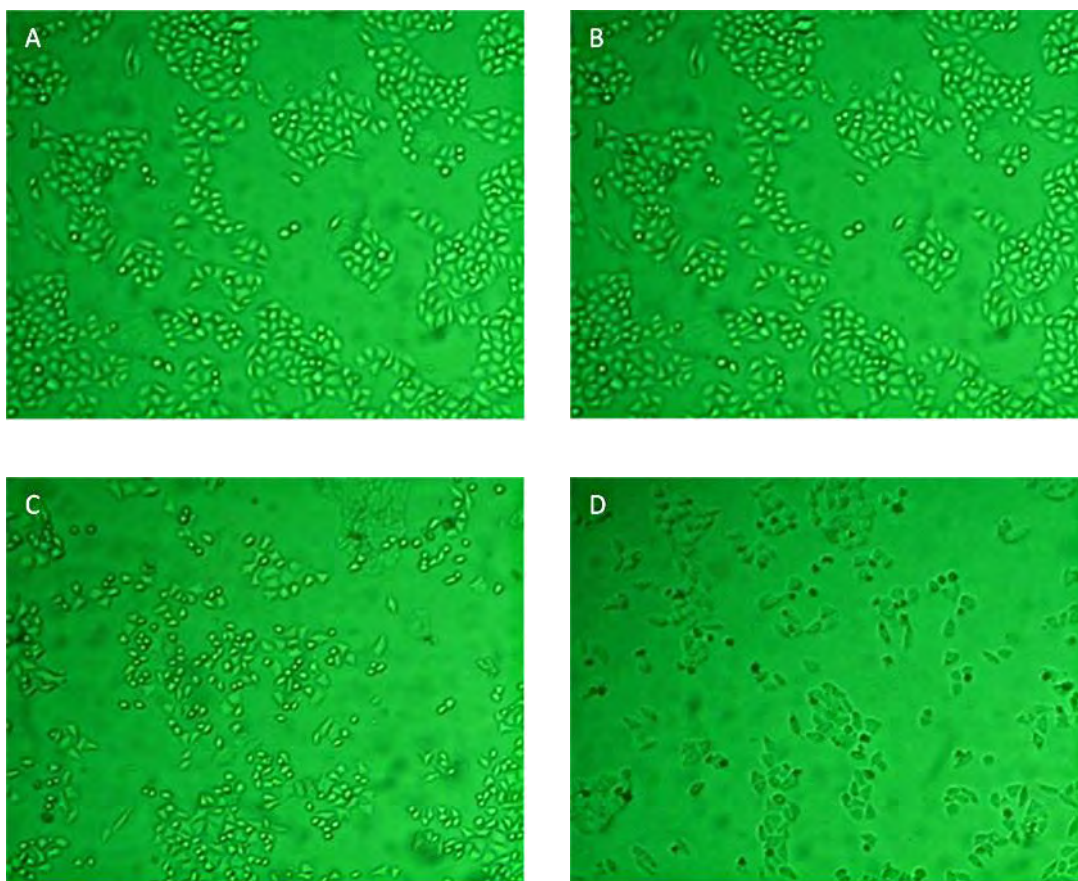


Figura 9. Efecto a las 24 horas de tratamiento de los compuesto 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre la forma de células CaSki. A: células sin tratar; B: células tratadas con acetato de etilo; C: células tratadas con la IC50 (24.34 µg/ml) del compuesto 26-OH-DI; D: células tratadas con la IC50 (100 µg/ml) del compuesto 26-OH-HE.

Las fotografías indican que los esteroides 26-OH-DI y 26-OH-HE afectan la forma de las células CaSki, sin embargo, se observa que las células CaSki tratadas con 26-OH-DI (Figura 9 C) pierden su forma poligonal, presentando una forma redonda que implica una posible disminución en la adherencia celular, mientras que para las células CaSki tratadas con el compuesto 26-OH-HE, las células se aprecian con un volumen mayor que sugieren un hinchamiento así como pequeños cuerpos compactos con poca refringencia, que sugieren la presencia de núcleos celulares provenientes de células rotas, que de manera global indican un proceso necrótico. (Figura 9 D).

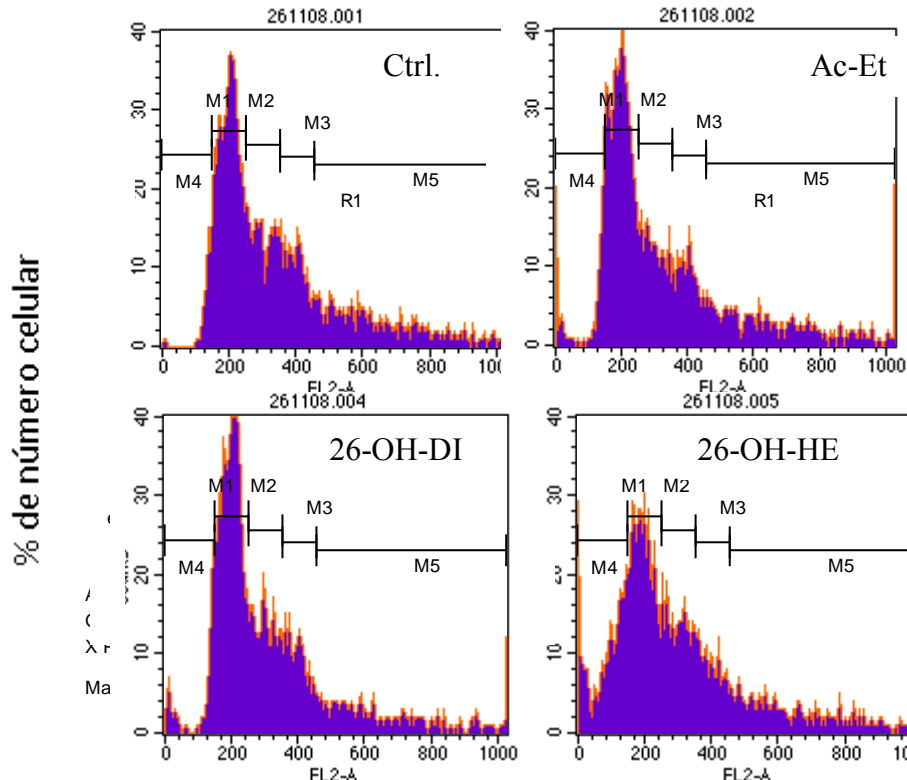
Estos resultados sugieren que el 26-OH-DI y 26-OH-HE inducen un decremento en el número celular en cultivos de células CaSki, sin embargo, este decremento

observado, puede ser causado por diferentes eventos celulares, tales como la muerte celular por citotoxicidad (necrosis), muerte celular por apoptosis, o la detención en alguna fase del ciclo celular, o una combinación de estos procesos. Para aclarar este punto, cultivos de células CaSki fueron inducidos con 24 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente y la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo, con la intención de establecer si estos esteroides detienen a las células CaSki en alguna fase del ciclo celular (tabla 1 y Figura 10).

	Control	Ac-Et	26-OH-DI		Control	Ac-Et	26-OH-HE
	% de ADN	% de ADN	% de ADN		% de ADN	% de ADN	% de ADN
G1	51,43 \pm 3,09	48,68 \pm 1,58	50,55 \pm 4,20	G1	52,17 \pm 5,11	52,41 \pm 3,01	37,68 \pm 7,81
S	19,62 \pm 2,03	19,94 \pm 1,24	17,67 \pm 1,89	S	18,70 \pm 2,73	19,92 \pm 1,45	16,92 \pm 2,02
G2/M	12,72 \pm 1,52	12,12 \pm 1,79	13,41 \pm 1,47	G2/M	14,87 \pm 2,62	16,26 \pm 3,07	10,03 \pm 2,32
SubG1	4,34 \pm 1,145	5,49 \pm 2,55	5,90 \pm 2,26	SubG1	4,96 \pm 2,09	4,06 \pm 2,68	30,52 \pm 9,37

Tabla 1. Efecto de los esteroides 26-OH-DI (24 $\mu\text{g/ml}$) y 26-OH-HE (100 $\mu\text{g/ml}$) sobre las fases del ciclo celular de células CaSki a las 24 horas de tratamiento. Los valores son expresados en porcentaje y representan el promedio de diez ensayos independientes. La distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo.

A



B

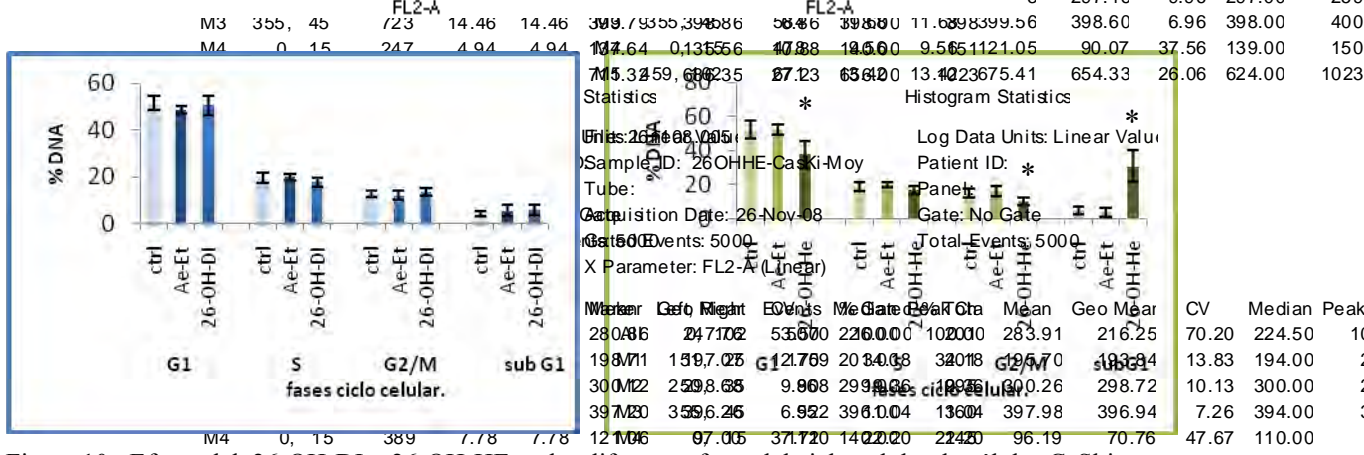


Figura 10. Efecto del 26-OH-DI y 26-OH-HE en las diferentes fases del ciclo celular de las células CaSki a las 24 horas de tratamiento, evaluadas a través de la distribución de ADN determinada por citometría de flujo. A) histogramas representativos de la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular después del tratamiento con 26-OH-DI y 26-OH-HE a concentraciones de 24 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, M1: G1; M2: S; M3: G2/M; M4: sub G1. B) gráficas que permiten la comparación de la distribución del ADN en cada una de las fases de los tratamientos con 26-OH-DI (24 $\mu\text{g/ml}$) y 26-OH-HE (100 $\mu\text{g/ml}$). ctrl.: control; Ac-Et: Acetato de etilo. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). FL2-A: concentración de ADN

Los resultados mostrados en la Figura 10 y Tabla 1, sugieren que el 26-OH-DI no ejerce un efecto significativo sobre el ciclo celular de las células CaSki, indicando que su efecto es independiente del ciclo celular. Sin embargo, para el compuesto 26-OH-HE, se muestra una disminución en la fase G1 y G2/M, que sugiere que el compuesto induce a las células a salir de ciclo. Además, el incremento observado en la fase subG1, la cual se caracteriza por presentar una menor cantidad de ADN que la basal (2 n) de las

células somáticas, sugiere una posible fragmentación de los núcleos, implicando una posible inducción de muerte.

Para determinar si el 26-OH-DI y 26-OH-HE inducen a las células CaSki a una muerte celular y específicamente a una muerte por apoptosis, en la cual una de sus características es la formación de cuerpos apoptóticos que indican una condensación de la cromatina, cultivos de células CaSki fueron tratados con el compuesto 26-OH-DI y 26-OH-HE y la formación de cuerpos apoptóticos fue determinada a través del marcaje de la cromatina con el fluorocromo DAPI, que emite un color azul, apreciando los núcleos completos o fragmentados (Figura 11).

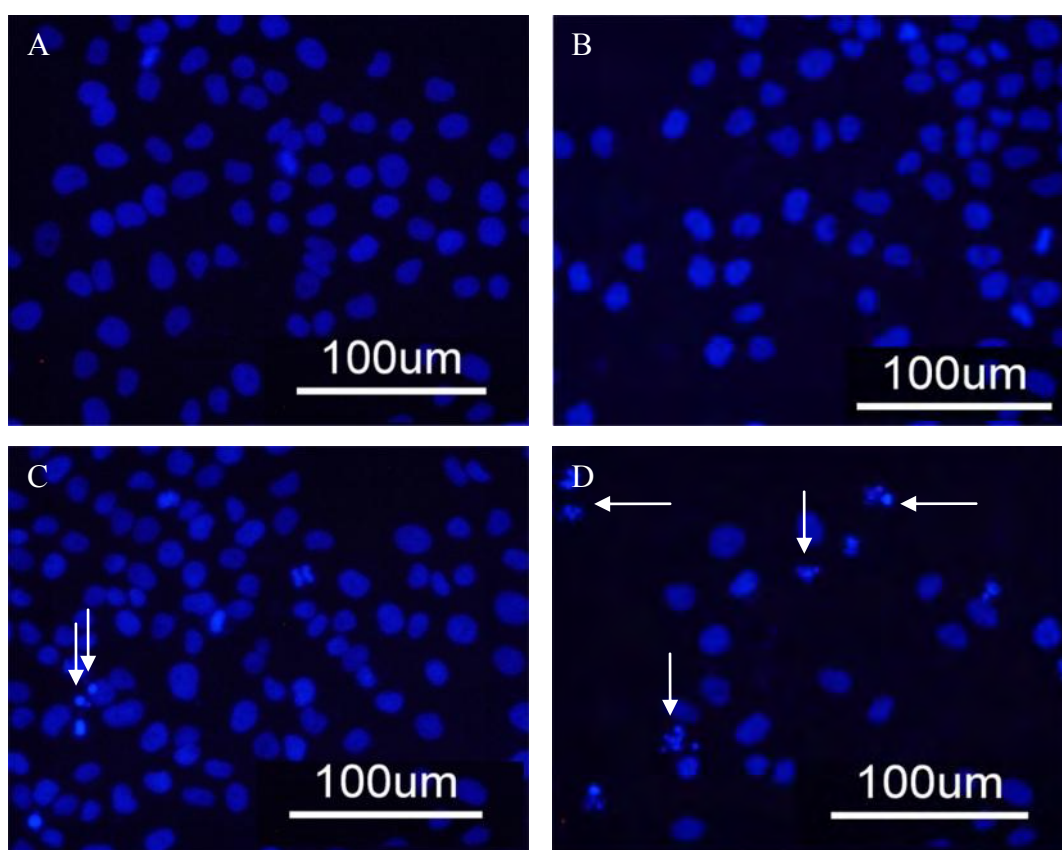


Figura 11. Compactación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos en cultivos de células CaSki. Las células fueron tratadas con los esteroides 26-OH-Di y 26-OH-HE, marcadas con el fluorocromo DAPI y evaluadas a las 24 horas de tratamiento. A: control; B: Acetato de etilo; C: 26-OH-Di (24 µg/ml); D: 26-OH-He (100 µg/ml); Las flechas blancas indican los cuerpos apoptóticos y compactación de cromatina.

Como se observa en las fotografías de la Figura 11 C, para el caso del compuesto 26-OH-DI se puede apreciar núcleos más compactos que indican una condensación de la cromatina, mientras que en el caso del compuesto 26-OH-HE (figura 11 D) también pueden observarse cuerpos apoptóticos, lo que sugiere que los esteroides 26-OH-DI y

26-OH-HE inducen a las células CaSki a una muerte por apoptosis. Sin embargo, la condensación de la cromatina así como la formación de cuerpos apoptóticos no es suficiente para concluir que ambos esteroides inducen a las células CaSki a una muerte por apoptosis, ya que la condensación de la cromatina también se presenta en una muerte por necrosis, mientras que los cuerpos apoptóticos no sugieren que se llegue a concretar el proceso apoptótico debido a que su presencia puede ser consecuencia de cuestiones técnicas, o como parte del proceso de obtención.

Por lo que nuevamente cultivos de células CaSki fueron tratadas con los esteroides 26-OH-HE y 26-OH-DI y la expresión de procaspasa 3 fue determinada por inmunocitoquímica y cuantificada a través de su diferencia en la luminiscencia emitida, mediante el programa ADOBE PHOTOSHOP CS2 (Figura 12 A).

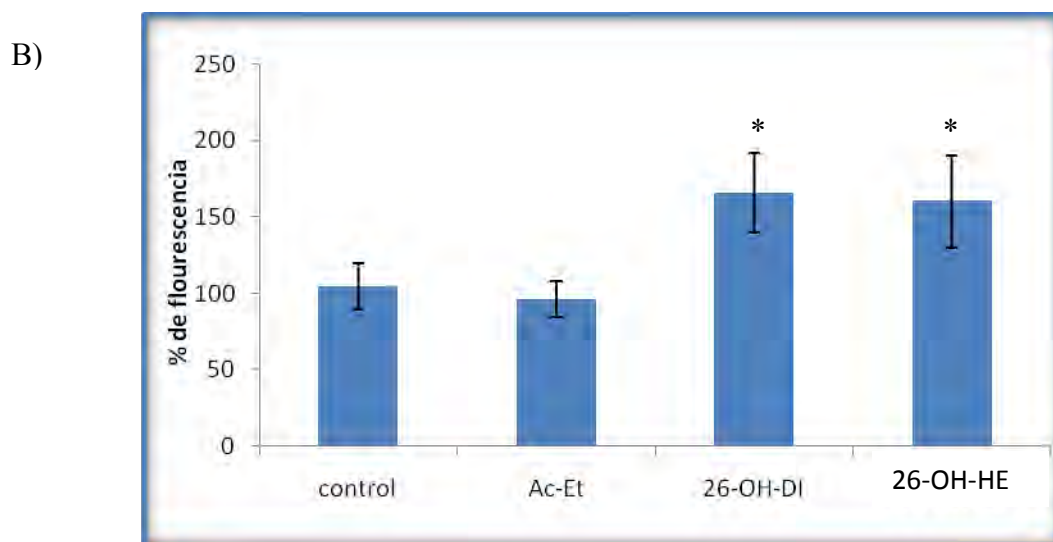
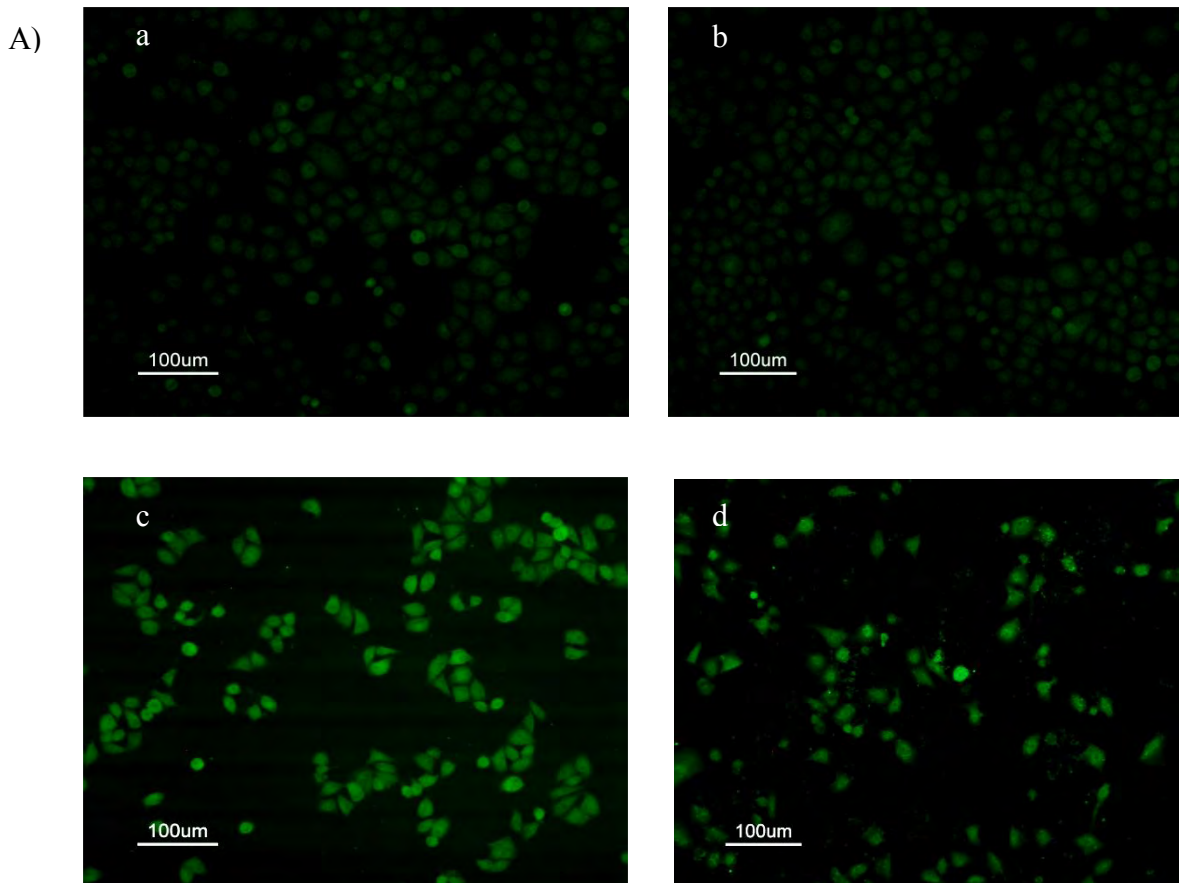


Figura 12. Expresión de procaspasa 3 en cultivos de células CaSki. A) Expresión de la procaspasa 3. Las células fueron tratadas con el esteroide 26-OH-DI y 26-OH-HE por 24 horas, determinadas por inmunocitoquímica y observadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon.; a: Control, b; Acetato de etilo, c; 26-OH-Di (24 µg/ml), d; 26-OH-He (100 µg/ml). B) Cuantificación de la expresión de la procaspasa 3 en cultivos tratados con el esteroide 26-OH-DI (24 µg/ml) y 26-OH-He 100 µg/ml), a través de la cuantificación de la luminiscencia emitida, evaluada con el programa Adobe PhotoShop CS2. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). Ac-Et: Acetato de Etilo.

Las imágenes indican que el 26-OH-DI y el 26-OH-HE inducen un incremento en la expresión de procaspasa 3 en las células CaSki, indicando que la caspasa 3 está

implicada en la inducción de muerte por apoptosis, como lo muestra la formación de cuerpos apoptóticos (Figura 11 C y D), así como el incremento (60%) en la expresión de la procaspasa 3 determinada por inmunocitoquímica (Figura 12 c y d) y cuantificada por la emisión de fluorescencia a través del procesador de imágenes Adobe Photoshop CS2 (Figura 12 B).

No obstante el incremento en la expresión de la procaspasa 3 y la formación de cuerpos apoptóticos que indican que ambos esteroides inducen a las células CaSki a una muerte por apoptosis, es necesario evaluar un paso crítico en la ruta de la apoptosis, que junto con el ensayo de procaspasa 3 así como la formación de cuerpos apoptóticos deja sin lugar a dudas que se induce a una muerte apoptótica. Este paso o evento es la fragmentación de ADN, por lo que cultivos de células CasKi fueron tratadas con ambos esteroides y la fragmentación del ADN fue evaluada por la técnica de TUNEL (Figura 13).

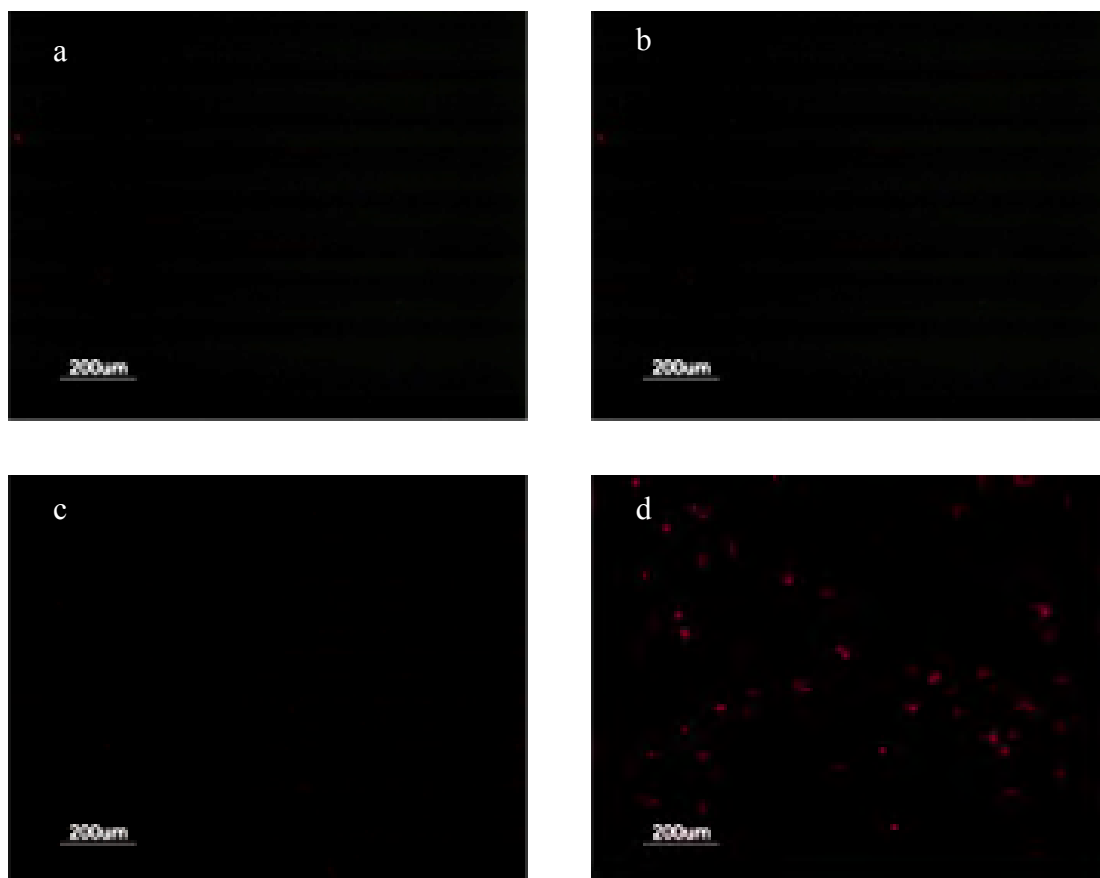
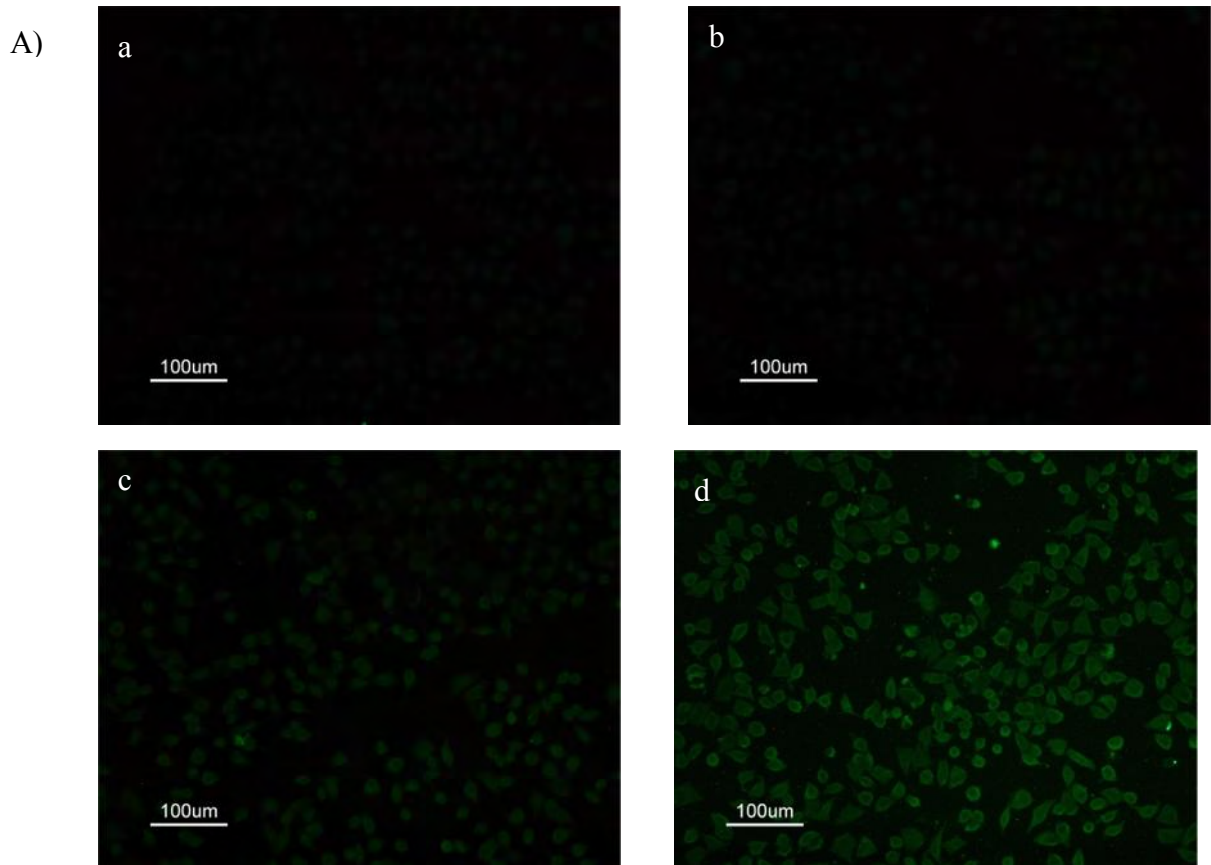


Figura 13. Fragmentación de ADN en cultivos de células CaSki a las 24 horas de tratamiento. a: Control, b; Acetato de etilo, c; 26-OH-DI (24 µg/ml), d; 26-OH-HE (100 µg/ml). El ADN fue evaluado mediante la técnica de TUNEL observada por epifluorescencia.

Cómo se puede observar en la Figura 13, la fragmentación de ADN en las células CaSki solo está inducida por el compuesto 26-OH-HE (Figura 13 d), sin embargo, el compuesto 26-OH-DI no induce fragmentación del ADN, a pesar del incremento observado de la procaspasa 3 y la condensación de la cromatina. Para determinar si el incremento observado, en la expresión de la procaspasa 3 es un indicativo de que ésta sea convertida a caspasa 3 activa y que es cuestión de tiempo para observar la fragmentación del DNA, se evaluó la expresión de la caspasa 3 activa, como una consecuencia del incremento en la procaspasa 3, por lo tanto, cultivos de células CaSki fueron tratadas con 24 µg/ml y 100 µg/ml de los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE respectivamente y se evaluó la presencia de la caspasa 3 activa, la cual nos permite deducir que la cascada apoptótica se está llevando a cabo (Figura 14).



B)

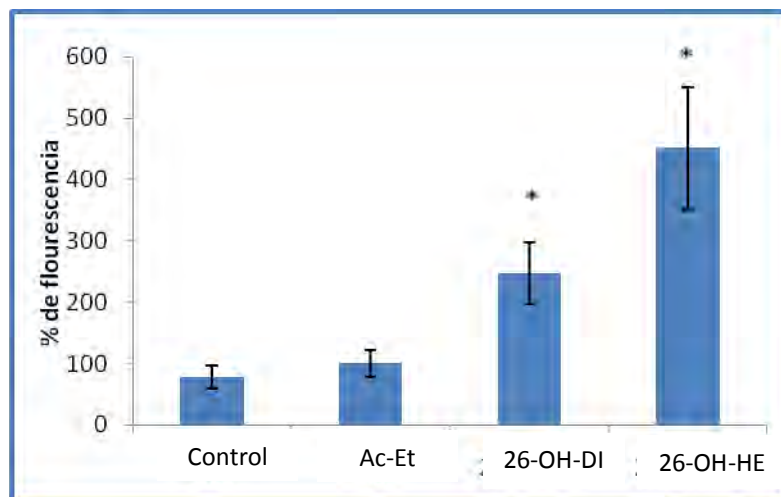


Figura 14. Expresión de la caspasa 3 activa en cultivos de células CaSki a las 30 horas después del tratamiento. A) Observación de la expresión de la caspasa 3 activa . a: control, b; Acetato de etilo, c; 26-OH-DI (24 µg/ml), d; 26-OH-HE (100 µg/ml). Las flechas blancas indican la expresión de caspasa 3. B) Cuantificación de la expresión y activación de la caspasa 3 en cultivos tratados con el esteroide 26-OH-DI (24 µg/ml) y 26-OH-HE (100 µg/ml) a través de la cuantificación de la luminiscencia emitida, evaluada con el programa Adobe PhotoShop CS2. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). Ac-Et: Acetato de Etilo.

Como se observa en la Figura 14, el esteroide 26-OH-HE induce un incremento en la expresión de la caspasa 3 activa en las células CaSki a las 24 horas de inducción, sin embargo, con el 26-OH-DI la inducción de la caspasa 3 activa se observó hasta las

30 horas de inducción y en menor magnitud, sugiriendo que la inducción de muerte apoptótica por el 26-OH-DI lleva más tiempo y a la vez explica el no observar fragmentación del DNA. En concreto, la activación de la procaspasa 3, la inducción en la expresión de la caspasa 3 activa así como la condensación de la cromatina inducida por ambos esteroides, indican que los dos compuestos inducen apoptosis en las células CaSki.

No obstante lo anterior, se desconoce si las concentraciones utilizadas de ambos esteroides afectan el potencial proliferativo de células no tumorales. Para dar respuesta a esta incógnita, cultivos de fibroblastos no tumorales provenientes de cérvix humano fueron inducidos con el 26-OH-DI y 26-OH-HE y el número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta, con el propósito de determinar si los esteroides afectan el potencial proliferativo de las células fibroblásticas, así como el determinar si su acción antiproliferativa es selectiva (Figura 15).

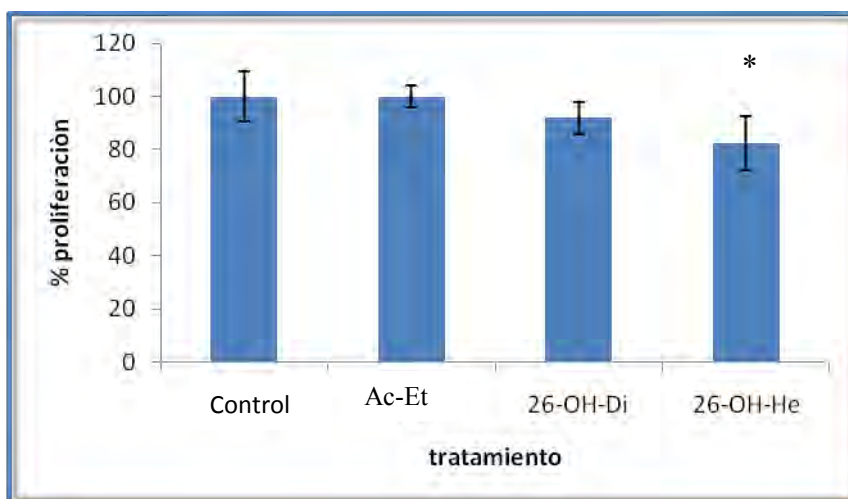


Figura 15. Efecto de los esteroides 26-OH-DI (24 $\mu\text{g/ml}$) y 26-OH-HE (100 $\mu\text{g/ml}$) sobre el potencial proliferativo de fibroblastos no tumorales provenientes del cérvix humano. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). Ac-Et: Acetato de etilo.

Los resultados sugieren que el 26-OH-DI no afecta significativamente la proliferación de las células fibroblásticas, mientras que el 26-OH-HE afecta el potencial proliferativo tan solo en un 18 %, generando en estos compuestos una acción selectiva que podría ser utilizada para darles un fuerte potencial antitumoral con posibles aplicaciones terapéuticas en el CaCu.

Discusión de resultados.

Las saponinas han generado un fuerte interés científico, debido a su diversidad estructural y a su actividad biológica, especialmente como antitumorales. Algunos estudios revelaron que la diferencia en las estructuras de las saponinas, incluyendo el tipo y el número de azúcares, el doble anillo, entre otros, influye en la respuesta biológica (Trouillas, *et al.* 2005). Wang, *et al.* 2001, comparó a la dioscina, un espirostenol contra el metil protodiocina un furostanol con 26-*O*- glicopiranosida, demostrando que únicamente la dioscina induce apoptosis, a pesar de que estos dos compuestos son estructuralmente parecidos, sugiriendo que la estructura o el cambio de estructura de un compuesto juegan un papel importante en la actividad biológica. En los resultados obtenidos en este trabajo con la línea de cáncer cérvico-uterino CaSki, se encontró una IC50 para el 26-OH-DI de 24 µg/ml, mientras que para el 26-OH-HE fue de 100 µg/ml, a pesar de que la estructura entre ambos compuestos sólo se diferencia en un hidrógeno y una doble ligadura en el carbono 5, así como un grupo cetona en el carbono 12. Aparentemente estas pequeñas diferencias le dan al 26-OH-DI una actividad biológica cuatro veces mayor que la observada para el 26-OH-HE, implicando una relación directa entre la estructura de la molécula y su actividad biológica. Sería interesante determinar que parte de la estructura es la que da el incremento en la actividad biológica. Por otro lado, se ha reportado que las saponinas esteroideas como la Diosgenina inducen un decremento en el número celular a través de la detención en la fase G1 del ciclo celular (Raju, *et al* 2007), sin embargo, también se ha descrito que la acción antiproliferativa puede ser independiente de ciclo. En el caso particular del 26-OH-DI, su acción antiproliferativa fue independiente de ciclo, mientras que para el 26-OH-HE fue dependiente de ciclo, lo cual nuevamente resulta interesante, ya que las diferencias entre estas moléculas son muy específicas, generando la posibilidad de establecer que parte de la estructura de la molécula es la responsable de afectar el ciclo celular de estas células CaSki. También es importante resaltar que la acción antiproliferativa dependiente de ciclo podría darle a este compuesto una acción selectiva, como se ha reportado para otros compuestos, donde el compuesto detiene a las células en la fase de G2/M, que en algunos estudios se ha establecido que la detención en esta fase, confiere una mayor sensibilidad a las radiaciones (Rudoltz *et al*, 1996).

No obstante que el 26-OH-DI y el 26-OH-HE actúan de manera diferente, en nuestros resultados ambos indujeron muerte por apoptosis. Esto es, ambos indujeron un incremento de la caspasa 3 activa y sólo en el 26-OH-HE se observó fragmentación de ADN y formación de cuerpos apoptóticos. Sin embargo, cabe resaltar que el incremento en la expresión de la caspasa 3 activa en las células CaSki tratadas con el 26 OH-DI se observó a las 30 horas, mientras que en el 26-OH-HE se observó desde las 24 horas y es posible que se observe en un tiempo menor. Esta diferencia en el tiempo, refleja nuevamente su acción diferente entre ambos compuestos e implica que en la ruta apoptótica el 26-OH-DI actúa de una manera más lenta que el 26-OH-HE. Es conveniente que en un futuro, se estudie la relación del efecto inductor de apoptosis en ambos esteroides, con respecto al tiempo, con la intención de encontrar diferencias específicas en los componentes que intervienen en esta ruta de muerte, con el propósito de explicar como un compuesto puede inducir muerte por apoptosis más rápido que otro. La inducción de muerte por apoptosis en ambos esteroides concuerda con lo descrito en la literatura, donde se ha establecido que la Diosgenina y la Hecogenina inducen muerte por apoptosis en diferentes líneas celulares. La Diosgenina y Hecogenina, ambas saponinas esteroides, han demostrado tener actividad biológica en diferentes líneas celulares de cáncer humano, tales como en la línea de osteosarcoma humano 1547, en la línea leucémica K562, en la línea de cáncer de mama AU516, en la línea de cáncer cérvico-uterino HeLa, entre otras, ya que estos compuestos presentan un efecto antiproliferativo, puesto que producen una detención en alguna de las fases del ciclo celular y/o producen una muerte celular por apoptosis (Raju, *et al* 2007; Corbiere, *et al.* 2003; Trouillas, *et al.* 2005; Huo, *et al.* 2004). No obstante estos datos, la Diosgenina y Hecogenina son poco útiles para ser aplicadas, ya que su estructura les confiere una baja solubilidad en sistemas acuosos y presentan una actividad hemolítica de manera natural, generando la necesidad de generar análogos o derivados de estas moléculas.

Es por ello que los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE, surgieron de una modificación de la Diosgenina y Hecogenina respectivamente, donde se les hizo una acetólisis a ambos, catalizadas con un ácido de Lewis, con lo cual se abrió el espirocetal, que es la cadena lateral y se formaron estructuras colestánicas, que contienen un grupo cetona en el carbono 22 y un acetato en el carbono 16 lo cual estabiliza las moléculas e impiden que no se cierre de nuevo. Estas modificaciones se hicieron pensando en la molécula OSW-1, una saponina esteroide, que se extrae en

cantidades mínimas (Morzycki, *et al.* 2002) la cual ha demostrado tener una actividad anti cancerígena en diferentes líneas celulares de cáncer humano, capaz de inducir apoptosis, siendo ésta, más potente que otras moléculas que ya son utilizadas clínicamente como la mitomicina C, adriamicina, cis-platino, camptotecina, y taxol, además de ser poco citotóxico en células normales de pulmón (Qi-hai, *et al.* 2003; Tang, *et al.* 2007), es por ello que hay un fuerte interés en encontrar un método para obtener una síntesis total o crear análogos.

En la mayoría de los trabajos enfocados en compuestos descritos con propiedades antitumorales, carecen de controles normales, o algunos comparan el efecto en líneas celulares normales, las cuales presentan una característica común con las células tumorales, ambas proliferan sin control, por lo que los resultados no son muy claros. Otro control utilizado es el uso de células provenientes de ratón, sin embargo, éstas pueden responder de manera diferente a como lo haría una célula humana, por lo que también el efecto observado no es concluyente. Por ello, se recomienda el uso de células humanas, de preferencia del mismo origen o del mismo órgano.

En el caso del 26-OH-DI y 26-OH-HE, el efecto antitumoral fue evaluado en células fibroblásticas no tumorales proveniente del cérvix humano, ya que estas células forman parte del microambiente del cérvix normal así como del microambiente tumoral, además de presentar un fuerte potencial proliferativo que aunque lo idóneo sea utilizar células epiteliales de cérvix, la célula fibroblástica permite mantenerla proliferando mientras que las células epiteliales del cérvix hasta el momento no se ha podido lograr mantenerlas en división. Sorprendentemente el 26-OH-DI a una concentración de 24 $\mu\text{g/ml}$ no afecta el potencial proliferativo de las células fibroblásticas, mientras que el 26-OH-HE (100 $\mu\text{g/ml}$) sólo afectó en un 18 % el potencial proliferativo, confiriendo en ambos esteroides una acción selectiva, que permite proponer a estos compuestos como agentes con un fuerte potencial anticancerígeno.

A pesar de demostrar que los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE presentan una actividad antiproliferativa y anticancerígena en la línea celular CaSki proveniente de cáncer cérvico-uterino, sería conveniente repetir este trabajo con otras líneas de CaCu infectadas con el VPH tipo 16, así mismo como con otros tipos de VPH y líneas celulares no infectadas con este virus, con el propósito de confirmar y de ser el caso de generalizar la acción antiproliferativa de estos compuestos.

Por otro lado también sería conveniente realizar el análisis del efecto de los compuestos 26-OH-DI y 26-OH-HE sobre otras líneas celulares de cáncer diferente a la

de CaCu (pulmón, mama, próstata... etc.) con la intención de determinar si su efecto antitumoral es independiente del tipo del tumor, o es específico de tumores de CaCu.

También es importante determinar la molécula o moléculas que están implicadas en la acción antiproliferativa o anticancerígena, de tal forma que se pueda aportar más información sobre el mecanismo de acción de ambos compuestos, con el propósito de valorar su potencial quimioterapéutico.

Conclusiones

- Los esteroides 26-OH-DI y 26-OH-HE disminuyen el número celular en cultivos de la línea de CaCu CaSki.
- La concentración a la cual se disminuye la densidad celular en un 50 % para las células provenientes de CaCu CaSki es de 24 $\mu\text{g/ml}$ para el 26-OH-DI y de 100 $\mu\text{g/ml}$ para el compuesto 26-OH-HE.
- El efecto del esteroide 26-OH-DI sobre la línea celular CaSki es independiente del ciclo celular, mientras que para el 26-OH-HE su acción es dependiente de ciclo.
- El 26-OH-HE disminuye el porcentaje de células CaSki en las fases G1 y G2-M del ciclo celular.
- El 26-OH-He y 26-OH-Di inducen muerte por apoptosis en la línea celular CaSki,
- El potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano no es afectada por el 26-OH-Di a la concentración de 24 $\mu\text{g/ml}$.
- El 26-OH-HE induce un decremento en el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano en un 18%, a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Bibliografía.

- ❖ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Raberts K y Watson J., 2004. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª ed. Garland Publishising inc. New York. Pág. 1294.
- ❖ Anaya L., 2003. *Ecología Química*, UNAM,Plaza y Valdes editores. Mexico. Pág. 53-59.
- ❖ Becker W., Kleinsmit L. y Hardin J., 2006. *El mundo de la célula*. 6ª ed., Pearson Educación, S.A., Madrid. Pág. 834.
- ❖ Berumen-Campos J., 2003. Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix. *Gac Méd Méx*. 139: S3-S10.
- ❖ Burgués J., Pontones J., Vera C., Jiménez J., y Ozonas M., 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol. Esp*. 29 : 846-859.
- ❖ Caballero A. y Moran J., 2002. Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *REB*. 21:235-244.
- ❖ Cameron R., 1995. *Oncologia Practica*, Ed Medica Panoamericana. Pág. 5-24.
- ❖ Camoutsis C., Trafalis D., Pairas G. y Papageorgiou T., 2005. On the formation of 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity. *Il Farmaco*. 60: 826–829.
- ❖ Castellsagué X., 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cáncer. *Gynecol Oncol*. 110: S4-S7.
- ❖ Chan P., 2007. Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 73:341-350.

- ❖ Cohen G., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16.
- ❖ Corbière C., Battu S., Liagre B., Cardot P. y Beneytout J., 2004. SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. *J. Chromatogr.* 808: 255–262.
- ❖ De Toro G., 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas del 8º CVHAP.* 1:1-13.
- ❖ Deng L., Wu H., Yu B., Jiang M. y Wu J., 2004. Synthesis of OSW-1 analogs with modified side chains and their antitumor activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 2781–2785
- ❖ Evan G y Vousden K., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 411: 342-348.
- ❖ Frazer I., 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews.* 4: 46-54
- ❖ Freshney R., 1994. Culture of animal cell. A manual of basics technique. Wiley-Liss Inc. New York. USA. Pág. 397.
- ❖ Ganguly N. y Parihar S., 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.* 34: 113-123.
- ❖ Garnett T. y Duerksen-Hughes P., 2006. Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. *Arch Virol.* 151: 2321-2335.
- ❖ Gavrieli Y., Sherman Y. y Ben-Sasson S., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501.
- ❖ Griffiths B., 1988. Scaling-up of animal cell cultures Ed. Freshney R.I. Animal cell culture:A practical approach IRL. Press England. Pág. 345.

- ❖ Hengartner, 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 685-6877.
- ❖ Hong-Ji Q., Jyunichi K., Ken H., Xing-Ri C., Yasunori I., Seiichi K., Fusao K., y Setsuo S., 2006. Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with Various Nucleophiles and Pharmacological Activities of the Products., *Chem. Pharm. Bull.* 54: 72-79.
- ❖ Huo R., Zhou Q., Wang B., Tashiro S., Onodera S y Ikejima T., 2004. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 25 : 1077-1082.
- ❖ INEGI. Consulta Interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 24 de enero del 2010 www.inegi.com
- ❖ Israels E. e Israels L., 2000. The cell cicle. *The Oncol. Fund. Can. Med.* 5: 510-513.
- ❖ Johns H. y Cunningham J., 1981. *The Physics of Radiology*, 3er ed. Charles c Thomas Publicher. USA. Pág. 695-701.
- ❖ Jordán J., 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM.* 22: 100-106.
- ❖ Karp Gerald., 2006. *Biología Celular y Molecular*. 4ª Ed. Mc Grawl-Hill Interamericana. México. Pág. 899.
- ❖ Khoury S y Dasmin C., 1981. cáncer: los grandes especialistas responden, librería Hachette. España. Pág. 221-227.
- ❖ Kueng W., Silver E. y Eppenberg V., 1989. Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Anal. Biochem.* 186:16-19.
- ❖ Lacruz C., 2003. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol* 36 : 5-10.

- ❖ Liagre B., Vergne-Salle P., Leger D y Beneytout J., 2007. Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. *Int J Mol Med.* 20: 451-460.
- ❖ Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D. y Darnell J., 2000. *Biología celular y molecular*, Editorial Medica Panamericana. Madrid. Pág. 177-181
- ❖ López- Saavedra A. y Lizano- Soberón M., 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerol.* 1: 31-55.
- ❖ Ming-Jie L., Zhao W., Yong J., Ngok-Shun W y Qing-Yu W., 2005. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis., *Can Chem Pharm.* 55: 79-90.
- ❖ Miyashita T. y Reed J., 1993. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood.* 81: 151-157.
- ❖ Morzycki J. y Gryszkiewicz A., 2001. Synthesis of the potent antitumor saponin OSW-1 aglycone. *Polish J. Chem.* 75: 983-989.
- ❖ Nelson D y Cox M., 2005. *Lehninger. Principios de Bioquímica.* 4a Edición. Ediciones Omega, Barcelona. Pág. 669.
- ❖ Omoruyi F., 2008. Jamaican Bitter Yam Sapogenin: Potential Mechanisms of Action in Diabetes., *Plant Foods Hum Nutr.* 63: 135-140.
- ❖ Pagani A., Custogno E., Rosasco M., Cancela M., Salveraglio C., 1999. Cáncer de cuello uterino con diferenciación neuroendócrina. *Rev Med Uruguay* 15: I46-150.
- ❖ Pardo F., 1998. *Anatomía patología general y especial de las neoplasias.* Editorial Científico- Médico, España. Pág. 335.

- ❖ Peralta Z., Bahena R., Diaz B., Madrid M., 1997. Relationship between cell cycle and cancer development: Therapeutically approaches. *Salud pública. Méx.* 39:451-452.
- ❖ Porter G., 2006. Flipping the safety catch of procaspase-3. *Nat. Chem. Biol.* 2: 509-510.
- ❖ Raff, M., 1998. Cell suicide for beginners. *Nat.* 396: 119-122.
- ❖ Raju J. y Bird R., 2007. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 255: 194-204.
- ❖ Rivera R., Delgado J., Painel V., Barrero R., Larraín A., 2006. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 71: 135-140.
- ❖ Rudoltz M., Kao G., Blank K., Muschel R. y Mckenna W., 1996. Molecular biology of the cell cycle: potencial for therapeutic applications in radiation oncology. *Semin Radia at oncol.* 6: 284-294.
- ❖ Sánchez-Socarrás V., 2001. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev Cubana Invest Biomed.* 20: 266-74.
- ❖ Schafer K., 1998. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.* 35:461-478.
- ❖ Schmitt C., Fridman, J., Yang M., Baranow E., Hoffman R., y Lowe S., 2002. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell.* 1: 289-91.
- ❖ Solary E., Dubrez L y Eymin B., 1996. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J.* 9: 1293-1305.
- ❖ Son I., Kim J., Sohn H., Son K., Kim J y Kwon C., 2007. Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Diosgenin, a Steroidal Saponin of Yam (*Dioscorea* spp.), on High-Cholesterol Fed Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 3063-3071.

- ❖ Tamura K., Honda H., Mimaki Y., Sashida Y. y Kogo H., 1997. Inhibitory effect of a new steroidal saponin, OSW-1, on ovarian functions in rats. *Br J Pharmacol.* 121: 1796 -1802.
- ❖ Tang P., Mamdani F., Hu X., Liu J y Yu B., 2007. Synthesis of OSW saponin analogs with modified sugar residues and their antiproliferative activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 1003-1007.
- ❖ Tirado-Gómez L. L., Mohar-Betancourt A., López-Cervantes M., García-Carrancá A., Franco-Marina F. y Borges G., 2005. Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Publica Mex.* 47: 342-350.
- ❖ Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J. y Beneytout J., 2005. Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 1141-1149
- ❖ Vázquez-Ortíz G, Piña-Sanchez P, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, Alvarado I, Cruz F, Hernández D, Pérez-Plascencia C y Salcedo M., 2005. Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados. *Rev Invest Clin.* 57: 434-441.
- ❖ Wang Z., Zhou J., Ju Y., Zhang H., Liu M., y Li X., 2001. Effects of Two Saponins Extracted from the *Polygonatum Zanolanscianense* Pamp on the Human Leukemia (HL-60) Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 159-162.
- ❖ Xu Q., Peng X. y Tian W., 2003. A new strategy for synthesizing the steroids with side chains from steroidal sapogenins: synthesis of the aglycone of OSW-1 by using the intact skeleton of diosgenin. *Tetrahedron Lett.* 44: 9375-9377.
- ❖ zur Hausen H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 342-350.

APÉNDICE

❖ Composición del RPMI-1640 (Sigma Chemical Co .U.S.A).

Sales inorgánicas	g/l
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Bicarbonato de Sodio	—
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0.8
Aminoácidos	g/l
L-alanil-L-glutamina	—
L-Arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina • 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-iso-leucina	0.05
L-leucina	0.05
L-Lisina • HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-serina	0.03
L-treonina	0.02
L-triptófano	0.005
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.02883
L-valina	0.02
Vitaminas	g/l
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
myo-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
ácido p-aminobenzoico	0.001
D-ácido pantoténico (hemicalcium)	0.00025
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002

tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005

Otros **g/l**

D-glucosa	—
Glutación (reducido)	0.001
Rojo de fenol • Na	0.0053

Adicionar **g/l**

Bicarbonato de Sodio	2
----------------------	---

❖ Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares.

Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

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

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

❖ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

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

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

❖ Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g. de NaOH y 4.28 ml de ácido fórmico aforados a 500ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución se filtra y posteriormente se usa.

❖ Desactivación del suero

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone,U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57°C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml para su mejor uso y manipulación.