



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA
(UMIEZ)

“EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y APOPTÓTICO DEL ESTEROIDE
SeCN-H SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO”

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 :
MORALES DELGADO SANDRA LINDA

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

México, D.F.

2011





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.

A mis padres Rosa y José

Por ser ustedes el pilar en el cual me apoyo cuando estoy a punto de fracasar. Porque gracias a su apoyo he llegado a realizar una de mis mejores metas.

A mi hermano Alberto

Por creer en mí, por su apoyo y por compartir las experiencias más importantes de mi vida.

A mi familia

Por su confianza y apoyo incondicional.

A Martha

Gracias por tu amistad y sobre todo tu apoyo que fue crucial para realizar este trabajo.

A Gina, Dafne y Lorena

Por dejarme compartir esta etapa de mi vida con ellas, por su amistad y por todos esos momentos que vivimos juntas.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por permitir mi ingreso al laboratorio, por su apoyo y enseñanzas que permitieron mi formación profesional.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por explicarme siempre con paciencia, porque su enseñanza fue fundamental en mi aprendizaje.

Al M. en C. Hugo López Muñoz, por compartir sus conocimientos y su tiempo que ayudaron a enriquecer mi trabajo teórico y experimental.

A la Dra. María Luisa Escobar, por su ayuda, orientación y contribución en la realización de las técnicas aplicadas en este trabajo.

Al Biol. Moisés López Dávila, por sus aportaciones a este trabajo, por su apoyo, tiempo y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. Benny Weiss Steyder, y a la Dra. Lourdes Mora García, por enriquecer este trabajo con sus comentarios y aportaciones.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado, porque sus observaciones contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez y a la Dra. Ma. Antonieta Fernández Herrera, por elaborar el compuesto que se utilizó en ésta tesis y por siempre responder a mis dudas.

Al Dr. René García Sánchez, jefe de enseñanza del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSTE y al Dr. Dionisio Parra Roldan jefe del departamento de ginecología y perinatología del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSTE, por habernos facilitado las muestras de cérvix humano con las que se realizó éste trabajo.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio, gracias por su apoyo y por sus aportaciones a este trabajo.

La tesis fue realizada con apoyo del PAPIME: proyecto PE204609 y del proyecto CONACYT 84380.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. MARCO TEÓRICO	3
A. Proliferación celular	4
B. Ciclo celular	4
C. Muerte celular	7
D. Necrosis	8
E. Apoptosis	9
F. Cáncer	14
G. Cáncer cérvicouterino (CaCu)	16
H. Tratamiento	20
I. Saponinas esteroidales	22
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
V. JUSTIFICACIÓN	26
VI. HIPÓTESIS	26
VII. OBJETIVO GENERAL	27
VIII. OBJETIVOS PARTICULARES	27
IX. METODOLOGÍA	28
X. RESULTADOS	35
XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
XII. CONCLUSIONES	47
XIII. BIBLIOGRAFÍA	48
XIV. APÉNDICE	54

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer a nivel mundial. En México, en las mujeres, el 13.9 % de las defunciones por tumores malignos corresponden al del cuello del útero (CaCu). Hoy en día, se cuenta con diferentes terapias aplicadas a esta patología, sin embargo, éstas son eficientes en tumores únicos, en fase temprana y de fácil localización, por lo que los pacientes con tumores en una fase avanzada y con más de un tumor (metástasis), resultan inadecuadas. Este hecho genera la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad, sobre todo aquellas que están basadas en compuestos de origen vegetal con actividad antiproliferativa. Actualmente existe un interés especial en saponinas esteroidales debido a sus diferentes actividades biológicas reportadas y en algunos elementos como el selenio, que también se le ha adjudicado una actividad anticancerígena. Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de un derivado de la hecogenina así como la actividad del selenio juntos, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis del compuesto diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo (SeCN-H) en las líneas HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cervicouterino. Al respecto se obtuvo que el SeCN-H indujo un decremento del 50 % en el número celular a una concentración de 59 μ g/ml para las células HeLa, mientras que para las células CaSki y ViBo fue de 60 μ g/ml. La disminución del número celular observada en las células HeLa y ViBo fue debida en parte al efecto citotóxico del esteroide, como lo indica la prueba de citotoxicidad determinada por la liberación de la enzima LDH. Sin embargo, en las células CaSki no se observó efecto citotóxico. Estos resultados indican que el SeCN-H induce muerte por necrosis en las células HeLa y ViBo (40 y 38 % respectivamente), mientras que las células CaSki son resistentes a este efecto. Sorprendentemente en cultivos de células linfocíticas tratadas con 60 μ g/ml no se observó efecto citotóxico, sugiriendo que el efecto citotóxico presente en el SeCN-H es de acción selectiva.

El análisis de la distribución del ADN en cada una de las fases del ciclo celular, evaluado por citometría de flujo para cada una de las líneas tumorales, indica que la actividad antiproliferativa del SeCN-H no altera la distribución del ADN, sugiriendo que tal actividad es independiente de ciclo. Sin embargo, el incremento en la expresión de la caspasa 3 activa, así como la fragmentación del ADN inducida por el esteroide SeCN-H en las células HeLa, CaSki y ViBo, sugieren que el compuesto induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis. De manera paralela, cultivos de células no tumorales (fibroblastos humanos provenientes del cérvix y linfocitos de sangre periférica) fueron tratados con 60 µg/ml del esteroide con la intención de determinar si el SeCN-H afecta el potencial proliferativo de células no tumorales. Al respecto se obtuvo que el SeCN-H no afecta el potencial proliferativo de células no tumorales.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud establece que el cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo. En México, en las mujeres, el 13.9 % de las defunciones por tumores malignos corresponden al del cuello del útero, 15 % al de mama, mientras que el de hígado y vías biliares intrahepáticas presentan el 9.2 % de las muertes (INEGI 2011).

El CaCu es una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas en los tejidos del cuello uterino. Antes de que se localicen dichas células en el cuello uterino, sus tejidos experimentan cambios y empiezan a generar células anormales. Existen varios factores de riesgo que incrementan el desarrollo del cáncer cervical como lo es tener múltiples parejas sexuales, actividad sexual a temprana edad, tener historial en enfermedades de transmisión sexual, tabaquismo, uso prolongado de anticonceptivos hormonales y bajo nivel socioeconómico. Se ha detectado el virus del papiloma humano (VPH) hasta en un 99 % de las pacientes que presentaron cáncer cervical, particularmente los virus de alto poder oncogénico (VPH-16 y VPH-18), mismos que se relacionan con las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y que pueden progresar en un carcinoma.

Entre las estrategias para combatir el CaCu, dependiendo del grado de la lesión, se realizan terapias como la cirugía, radioterapia y quimioterapia, las cuales son costosas, ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad y con acción poco selectiva. Este hecho ha provocado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta patología. Entre las alternativas para combatir el cáncer, hoy en día, hay un número creciente de resultados en investigación que emplean compuestos de origen vegetal, que han sido propuestos en terapias alternativas y que están orientados hacia la quimioprevención del cáncer.

Dentro de este grupo de compuestos se encuentran las saponinas esteroidales, compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Éstas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y aunque en mayor o menor medida se encuentran en una gran cantidad de plantas, son especialmente abundantes en algunas familias, como la *Agavaceae*.

A dichas saponinas se le han atribuido efectos inhibidores de la proliferación de células tumorales, por lo cual este trabajo tiene el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de la saponina esteroide SeCN-H (diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo), en células provenientes de CaCu. Por otro lado, dicho compuesto tiene en su estructura al selenio, elemento al que recientemente se le ha atribuido una actividad antioxidante en células provenientes de diferentes tipos de cáncer como son, el de hígado, pecho, estómago, pulmón, tiroides, próstata y colon (Tapiero *et al.*, 2003). Además en estudios con animales, se ha demostrado que la nutrición mejorada con selenio puede reducir el riesgo de cáncer (Hernández, 2005).

MARCO TEÓRICO

La célula es una unidad mínima de un organismo capaz de actuar de manera autónoma. Todos los organismos vivos están formados por células, y en general se acepta que ningún organismo es un ser vivo si no consta al menos de una célula (Alberts *et al.*, 2004).

La vida de una célula se inicia con su formación a través de la división de una célula madre y termina con la formación de sus células hijas o con su muerte. Las etapas a través de las cuales pasa la célula desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo de la célula.

PROLIFERACION CELULAR

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular, es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos.

Es característica en cada tipo celular por lo que está controlado de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por lo tanto la proliferación de las células. La proliferación celular está sometida en primer término a la presencia de factores externos como son los factores de crecimiento, interacciones con otras células y nutrientes.

El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característicos. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo.

Hay células como las epiteliales o las hematopoyéticas con una alta capacidad proliferativa que están en constante renovación y otras, como las neuronas, que tienen una capacidad proliferativa muy baja.

El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer, donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas. Por el contrario, una pérdida en la capacidad de división celular es uno de los factores que originan el envejecimiento.

CICLO CELULAR

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los cuales duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división, conocido como ciclo celular, es el mecanismo esencial mediante el cual todos los seres vivos se reproducen. La función más importante del ciclo celular es duplicar con exactitud la gran cantidad de ADN de los cromosomas y luego segregar las copias con precisión en dos células hijas idénticas (Alberts *et al.*, 2004).

La mayoría de las células tardan mucho más en crecer que en duplicar su masa de proteínas y orgánulos que el que necesitan para replicar su ADN y dividirse.

El ciclo de la célula se divide en dos fases principales según las actividades celulares fácilmente visibles; éstas son la fase M (M= mitótica); que incluye: 1) cariocinesis, durante la cual los cromosomas duplicados se reparten entre dos núcleos, y 2) citocinesis, en donde toda la célula se divide físicamente en dos células hijas; y la interfase, en donde no se manifiestan fenómenos de división, por lo tanto, el ADN no está compactado (Burgués *et al.*, 2005).

En la mayoría de los ciclos celulares, se intercalan fases de descanso que les permiten disponer de más tiempo para crecer; la fase G1 entre la fase M y la fase S y la fase G2 entre la fase S y la mitosis. Así, el ciclo celular eucariota se divide tradicionalmente en cuatro fases secuenciales G1, S, G2 y M (Figura 1).

Las fases G1 y G2 son mucho más que meros periodos de espera que permiten crecer a la célula. Proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo para así asegurarse de que las condiciones son adecuadas y que se han completado los preparativos antes de la fase S y de la mitosis (Baynes y Dominiczak, 2008).

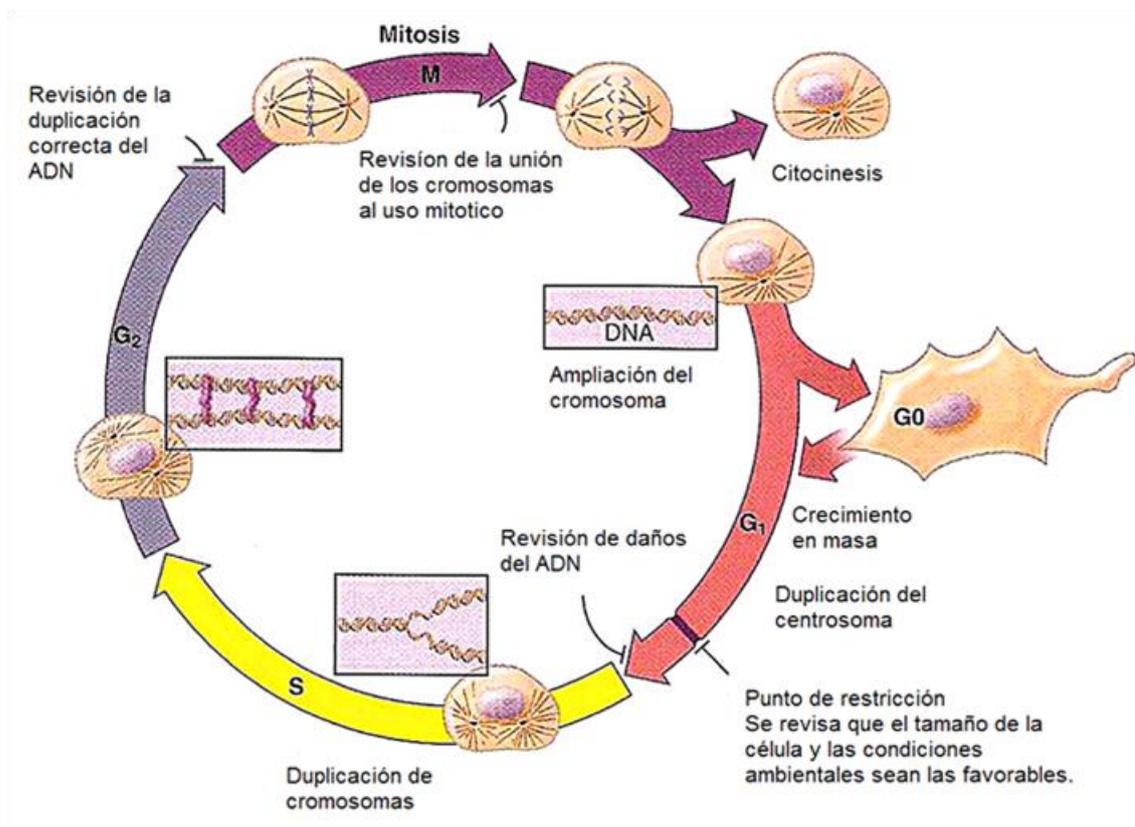


Figura 1. Fases del ciclo celular. La célula crece continuamente durante la interfase, la cual consta de tres fases: en la fase G1 la célula activa los genes necesarios para la progresión del ciclo celular, durante la fase S se duplica la totalidad de ADN nuclear y durante la fase G2 se verifica la correcta duplicación de ADN así como su integridad. Tomada de www.fisicanet.com.ar.

La progresión del ciclo de división celular está controlada por un grupo de genes que pueden dividirse en dos grandes grupos (Paniagua y Nistal, 2007).

1.- Los genes que codifican proteínas necesarias para la progresión del ciclo, como las enzimas y precursores de la síntesis de ADN.

2.- Los genes que codifican proteínas que regulan positiva o negativamente el ciclo celular, que a su vez se dividen en

- *Genes que regulan positivamente el ciclo:* son los denominados protooncogenes, y sus productos activan la proliferación celular, consiguiendo que células en G₀ salgan de este estado, pasen a la fase S y entren en división.
- *Genes que regulan negativamente el ciclo:* se les denomina genes supresores tumorales.

La secuencia de acontecimientos en el ciclo celular está regulada por un sistema de control que vigila cada uno de los pasos que realiza la célula para completar el ciclo, de modo que si no se cumplen las condiciones para pasar a la siguiente etapa, el ciclo se detiene.

En el núcleo del sistema de control del ciclo celular se halla una familia de proteínas cinasas denominadas cinasas dependientes de ciclina (Cdk, de cyclin-dependent kinases) (Peralta *et al*, 1997). Su actividad aumenta y disminuye a medida que la célula progresa a través del ciclo. Las Cdk actúan fosforilando serinas y treoninas de proteínas diana para desencadenar procesos celulares. Los reguladores más importantes de las Cdk son las proteínas denominadas ciclinas, éstas son proteínas de vida muy corta y se destruyen tras su unión a las Cdk (Wayne *et al.*, 2007), (Figura 2).

Existen diferentes tipos de ciclinas, cada una de ellas definida por la etapa del ciclo celular en la que se une a las Cdk y actúa. En todos los ciclos celulares se necesitan tres de estas clases:

- Las ciclinas G₁/S se unen a las Cdk al final de G₁ y determinan que la célula replique el ADN.
- Las ciclinas S se unen a las Cdk durante la fase S y son necesarias para iniciar la replicación del ADN.
- Las ciclinas M estimulan los acontecimientos de la mitosis.

En la mayoría de las células, una cuarta clase de ciclinas, las ciclinas G₁, ayudan a realizar el paso a través del inicio o del punto de restricción en las postrimerías de G₁.

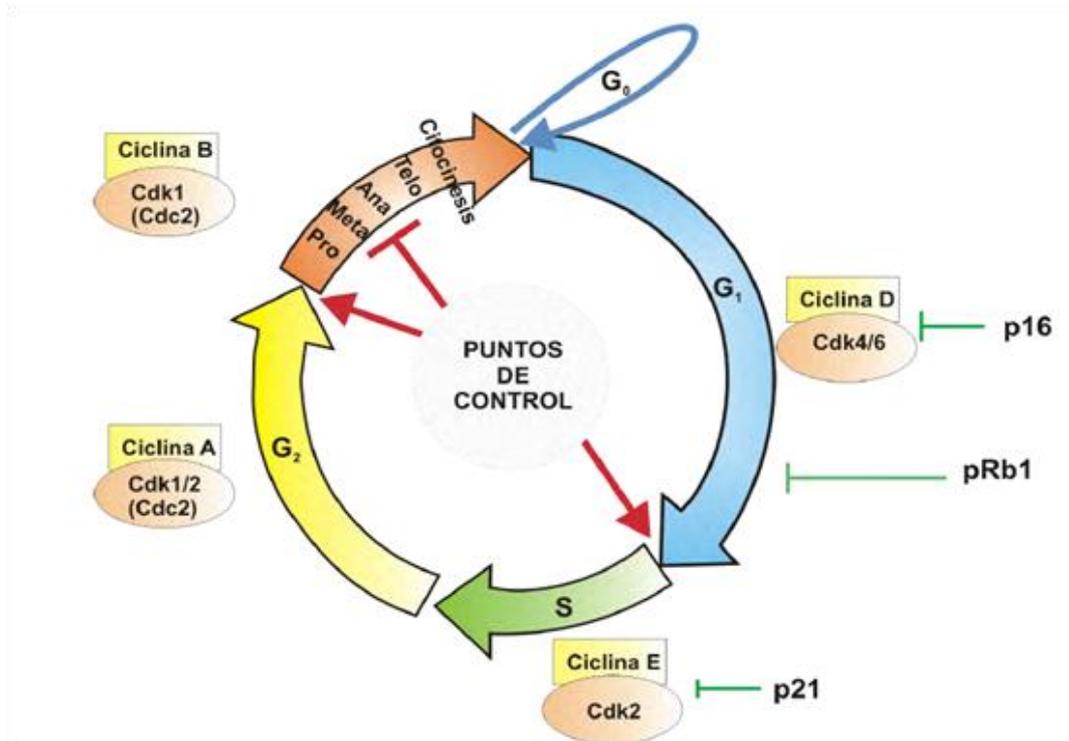


Figura 2. Ciclo celular que muestra la intervención de las proteínas Cdk (cinasas dependientes de ciclinas). Tomada de Alberts *et al.*, 2002.

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 ubicación específica anatómica, de acuerdo con las necesidades del organismo, así las células mueren y son sustituidas ininterrumpidamente, debido a un sistema de regulación donde la muerte celular toma un papel fundamental (Schafer, 1998).

MUERTE CELULAR

En los organismos multicelulares, la homeostasis es mantenida a través de un balance entre la proliferación y la muerte celular (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Los mecanismos que regulan la muerte celular son esenciales para el normal desarrollo y mantenimiento de la homeostasia. Las células crecen controladamente gracias a la expresión de nuevos genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados (Arango *et al.*, 1997).

Los dos tipos, más estudiados, de muerte celular que se reconocen en organismos son la necrosis y la apoptosis (Figura 3). La primera tiene un carácter patológico y se desencadena tras un daño celular extremo (por ejemplo por falta de oxígeno o envenenamiento), que daña irreversiblemente el funcionamiento de la célula. Por el contrario, la apoptosis es un proceso fisiológico que ocurre de forma habitual en los organismos eucariotas pluricelulares, tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta (Paniagua, 2007).

Este mecanismo lo induce el propio organismo para la eliminación de células no deseadas, bien por necesidad del desarrollo embrionario, para el mantenimiento fisiológico en la etapa adulta, o bien porque, debido a mutaciones o lesiones, esas células son dañinas para el propio organismo.

NECROSIS

Desde el punto de vista morfológico, la necrosis se caracteriza por una dilatación del retículo endoplasmático, una entrada de agua que acaba por provocar la ruptura osmótica de la célula y la salida al exterior del contenido celular. La permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones hacia el interior, principalmente de calcio, que va acompañado de la entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta (tumefacción) y algunas rutas metabólicas se alteran por las nuevas concentraciones iónicas que se establecen. Así la mayor concentración intracelular de calcio inhibe la producción de ATP, a la vez que estimula la síntesis de algunas enzimas proteolíticas. Algunos orgánulos membranosos, como el retículo endoplasmático o la mitocondria, se dilatan por la entrada de agua, los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Como etapa final, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior promoviendo una respuesta inflamatoria (Kroemer *et al*, 2008).

Las células fagocíticas que acuden al tejido ingieren y degradan estos restos. Esta salida del contenido celular será la responsable de la extensión del fenómeno necrótico, ya que las células adyacentes serán afectadas, bien directamente, o bien de modo indirecto por la reacción inflamatoria (Paniagua y Nistal, 2007).

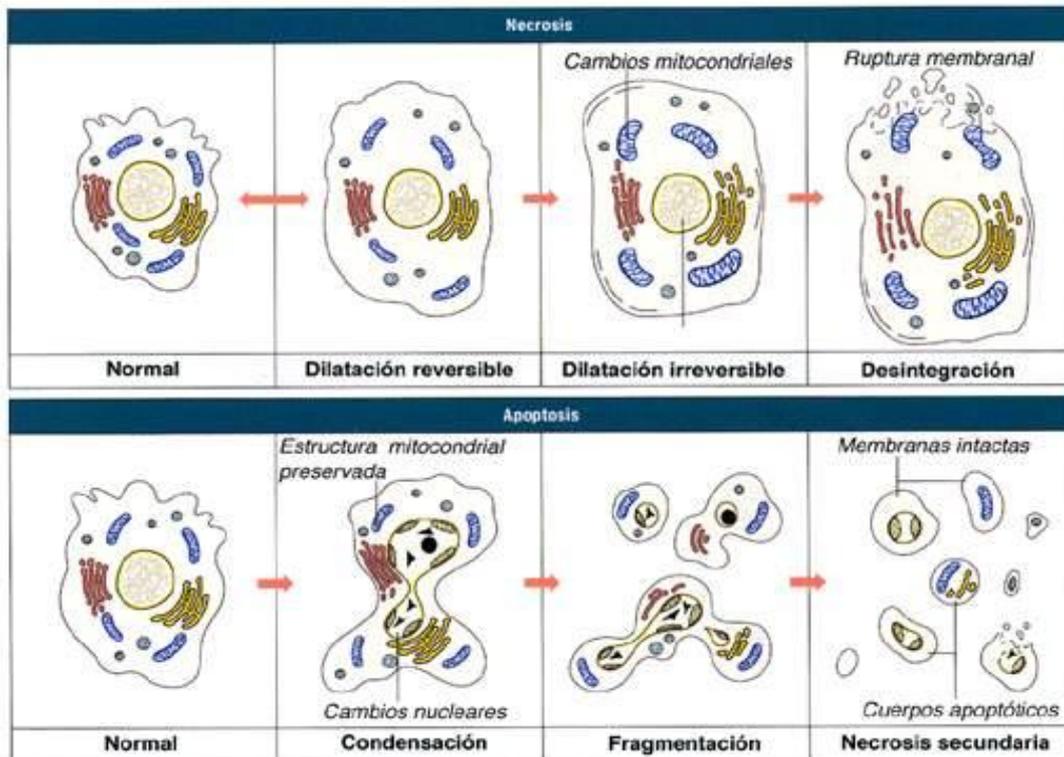


Figura 3. Comparación entre necrosis y apoptosis y los diferentes cambios morfológicos que conllevan. Tomada de www.retina.umh.es.

APOPTOSIS

La apoptosis es un evento natural que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y es parte de un proceso de eliminación de células en organismos maduros. La necesidad de que ocurra la apoptosis se debe a dos circunstancias a las que se enfrenta habitualmente el organismo (Robbins *et al.*, 1993).

- 1) A lo largo del desarrollo, cualquier organismo necesita deshacerse de ciertas estructuras y crear otras, por ejemplo, durante un proceso de metamorfosis. Durante la vida del individuo es también necesario reconstruir estructuras en los tejidos u órganos, por ejemplo el endometrio.
- 2) Cuando es necesario eliminar células porque son una amenaza para el organismo, por ejemplo cuando están infectadas por virus, o que su ADN ha sufrido daños importantes.

La célula inicia una serie de acontecimientos ordenados por lo que también se denomina muerte celular programada. La característica principal de la apoptosis es que es silenciosa debido a que las células apoptóticas son reconocidas por macrófagos, de esta forma no se produce el derrame del contenido celular por tanto no existe inflamación ni lesión del tejido.

Uno de los eventos más tempranos de la apoptosis es la deshidratación celular. La pérdida del agua intracelular conlleva la condensación del citoplasma y cambios en la forma y el tamaño celular. Las células que eran redondas originalmente aparecen elongadas y generalmente más pequeñas.

Otro cambio, quizá el más característico de la apoptosis, es la condensación de la cromatina nuclear. La condensación comienza en la periferia nuclear, y la cromatina condensada a menudo adquiere una forma cóncava que se asemeja a una media luna. La envoltura nuclear se desintegra o fragmenta en vesículas, la lámina sufre degradación proteolítica y, por último, se produce la fragmentación nuclear. Algunos fragmentos nucleares, que parecen gotitas de ADN de diferentes tamaños, están dispersos en el citoplasma. Estos fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma incluyendo orgánulos intactos, son empaquetados y envueltos por fragmentos de membrana plasmática (Paniagua y Nistal, 2007).

Estas estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, son emitidas por células apoptóticas. Estos cuerpos apoptóticos se reconocen por la presencia de fosfatidilserina en su superficie. La fosfatidilserina es un fosfolípido que sólo suele encontrarse en la hoja interna de la membrana plasmática. Cuando la apoptosis sucede *in vivo*, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas como fibroblastos o células epiteliales y no necesariamente por macrófagos profesionales sin desencadenar ninguna reacción inflamatoria en el tejido (Arango *et al.*, 1997).

La muerte apoptótica es un proceso complejo que requiere la activación de varias señales y mecanismos de regulación, los cuales involucran la participación de una serie de moléculas con acción proapoptótica como en el caso de la familia de las caspasas, así como antiapoptóticas como los miembros de la familia del Bcl-2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis.

Las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisteína, que fragmentan proteínas en lugares específicos en los que hay ácido aspártico. En su forma nativa las caspasas constan de tres dominios; un prodominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que da lugar a una subunidad enzimática pequeña (p10) (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Dentro de las funciones de las caspasas destacan la inactivación de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte apoptótica, de aquellas involucradas en la reparación del ADN y de las encargadas de la organización del citoesqueleto y participan en la destrucción de la lámina nuclear (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

La apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación del citocromo C de la mitocondria, vía intrínseca, mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco, vía extrínseca. La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica como hormonas y citocinas; biológica como bacterias y virus; química los fármacos o físicas como radiaciones, pudiendo un mismo estímulo generar efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares, e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentren en diferente etapa de desarrollo (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Vía extrínseca de la apoptosis

Uno de los estímulos para la apoptosis lo porta una proteína mensajera extracelular llamada factor de necrosis tumoral (TNF). Este se produce en ciertas células del sistema inmunitario como respuesta a factores adversos, como la exposición a radiación ionizante, temperatura elevada, infección viral o sustancias tóxicas (Paniagua, 2007).

Una de las señales mejor conocidas es la molécula denominada ligando del Fas, también llamado CD95 (del inglés, Cytotoxicity-dependent protein 95) o APO-1 (apoptosis-1 protein) que es un miembro de la familia receptores del factor de necrosis tumoral. Al ser estimulado, el Fas se une a unas proteínas adaptadoras denominadas FADD (Fas-associated protein with death domain), que a su vez se une a la procaspasa 8 favoreciendo su autoactivación; la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7.

Sin embargo, hay factores como el FLIP y IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis) que tienen la capacidad de evitar la apoptosis. La caspasa 8 puede también cortar a la proteína Bid, miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, para dar lugar a la forma inhibida (tBid) que actúa sobre la mitocondria, de este modo se da la conexión entre ambas vías (Figura 4) (Paniagua, 2007).

Vía intrínseca o vía mitocondrial de la apoptosis

Los estímulos internos, como el daño genético irreparable, las concentraciones demasiado elevadas de Ca^{2+} en el citosol o el estrés oxidante grave esto es, la producción de grandes cantidades de radicales libres destructivos y la falta de señales de supervivencia como ausencia de factores de crecimiento desencadena la apoptosis por la vía intrínseca.

Los miembros de la familia Bcl-2 son proteínas que regulan la activación de la apoptosis por esta vía. Los integrantes de la familia Bcl-2 pueden subdividirse en dos grupos, los miembros proapoptóticos que promueven la apoptosis (Bad y Bax) y los miembros antiapoptóticos que protegen a las células de la apoptosis (Bcl-xl, Bcl-w y Bcl-2) (Caballero y Morán, 2002).

Los estímulos estresantes, como los descritos antes, provocan la translocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo C al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria (Karp, 2005).

En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, que recluta y activa a la procaspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3, 6 y 7.

Las caspasas 3, 6 y 7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del ADN (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

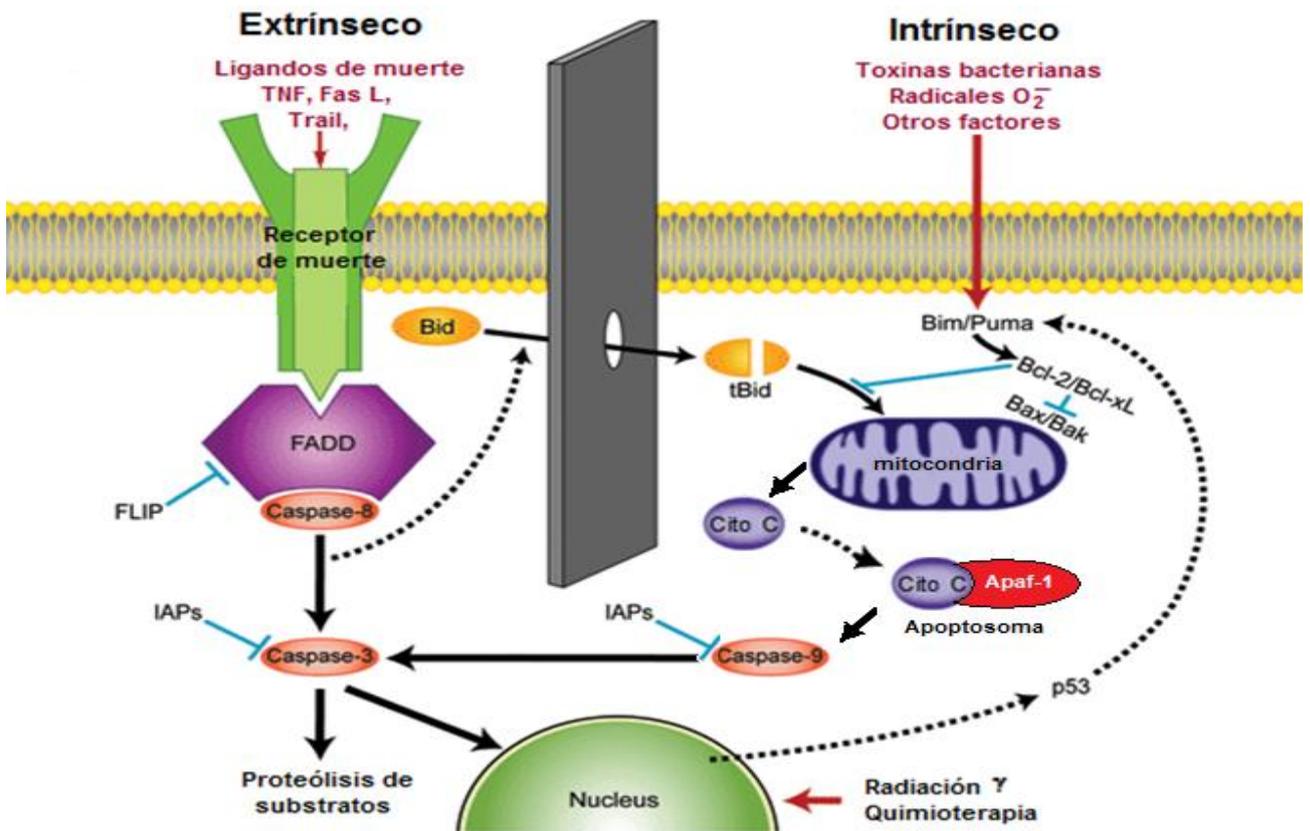


Figura 4. Esquema ilustrativo de las diferentes rutas de muerte celular apoptótica. La vía extrínseca es llevada por la unión de ligandos como FasL o TRAIL. La vía intrínseca llevada por fenómenos de stress celular. Tomada de Coto, 2007.

La apoptosis a diferencia de la necrosis es un proceso ordenado, la célula muere “limpiamente” sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, la célula se condensa y reduce su tamaño, se colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el ADN se fragmenta y finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada. Otra diferencia entre la apoptosis y la necrosis, es que la necrosis no requiere síntesis de nuevos ARNm o proteínas (Nistal, 2007).

Los trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías, están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y en todos los tipos de cáncer (Arango *et al.*, 1997).

CÁNCER

El hombre está formado por miles de millones de células. Estas pueden variar tanto en su forma, en su volumen o en sus funciones, de un órgano a otro, pero guardan una misma estructura básica. Las células crecen y se dividen para producir nuevas células conforme el cuerpo las necesita.

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 (Schmitt *et al.*, 2002).

Los controles que regulan la multiplicación celular en raras ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre comienza a crecer y a dividirse en forma descontrolada, al margen de las necesidades del organismo y de las demás células de este tipo, cuando esta célula tiene descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es una expansión clonal capaz de proliferar en forma indefinida. Por último, este clon de células no deseadas forma una masa, denominado tumor (Schmitt *et al.*, 2002).

Los tumores aparecen con gran frecuencia, en especial en seres humanos de edad avanzada, pero la mayoría conlleva escaso riesgo para el hospedero, porque son localizados y de tamaño pequeño. Estos tumores se denominan benignos; un ejemplo son las verrugas. El carácter benigno suele ser aparente a simple vista, porque contiene células muy similares a las normales y se comportan como tales. Las moléculas de interacción superficial que unen a las células mantienen a los tumores benignos, al igual que a las células normales, localizadas en tejidos adecuados. Las células que componen un tumor maligno, o cáncer, expresan algunas proteínas características del tipo celular que le dio origen y una fracción importante de las células crece y se divide con mayor frecuencia que las normales (Lodish *et al.*, 2003).

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los que derivan de las células epiteliales se denominan carcinomas, los que derivan del tejido conjuntivo o de fibras musculares sarcomas y leucemia, derivadas de células hematopoyéticas, así como los derivados del sistema nervioso (Alberts *et al.*, 2004).

El desencadenamiento del proceso canceroso depende de numerosos factores, que pueden ser ordenados en dos grupos principales (Hernández y Ríos, 1999).

1. Factores externos.- son factores cancerígenos que provienen del exterior del organismo y que se encuentran en nuestro medio ambiente. Están constituidos principalmente por:

- *Las sustancias químicas*, se estima que hay aproximadamente un millar de sustancias químicas peligrosas, utilizadas en la vida cotidiana.
- *Las radiaciones*, que provienen de cuerpos radiactivos o de los rayos ultravioleta del sol
- *Los virus*, que son responsables de ciertos cánceres y leucemias en diversas especies animales.

2. Factores internos los cuales actúan desde el mismo interior del organismo, como:

- *Los factores genéticos*, es decir, la constitución hereditaria del organismo. Ciertas anomalías genéticas pueden representar un papel esencial en determinados cánceres.
- *Las hormonas*, que tienen un papel decisivo en la aparición de ciertos tipos de cáncer, en particular el de próstata y el de cáncer de mama en la mujer.
- *La inmunidad*, una insuficiencia inmunitaria parece facilitar la aparición de ciertos tumores.

Los cánceres son capaces de propagarse por el cuerpo gracias a dos mecanismos: invasión y 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 del torrente sanguíneo y después crecer en un nuevo sitio en tejidos normales de otra parte del cuerpo para formar un tumor secundario . Se inicia con la ruptura de los límites naturales del tejido, la lámina basal, en caso de carcinomas, mediante un proceso de destrucción de la matriz extracelular.

A la invasión sigue la intravasación, fenómeno por el que la célula tumoral se introduce en un vaso sanguíneo o linfático y procede a su circulación por el organismo. Procesos inflamatorios y de restricción de elasticidad determinan la detención de la célula tumoral en un capilar. Tras su detención la célula tumoral procede a su extravasación a la matriz conectiva perivascular, para proliferar en su nuevo asentamiento y formar un tumor secundario (Figura 5).

Uno de los acontecimientos críticos requeridos para el crecimiento de los tumores y la producción de metástasis, es la generación de una nueva red de los vasos sanguíneos.

Este proceso de formar nuevos vasos sanguíneos se llama angiogénesis; es la proliferación de una red de vasos sanguíneos que penetra en el tumor, le proporciona nutrientes, oxígeno y le retira los residuos; puede estar favorecida por las propias células cancerosas, capaces de producir moléculas que envían señales al tejido normal circundante.

Estas señales activan ciertos genes en el tejido hospederero que responde con la síntesis de proteínas que estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

El proceso de metástasis en cáncer

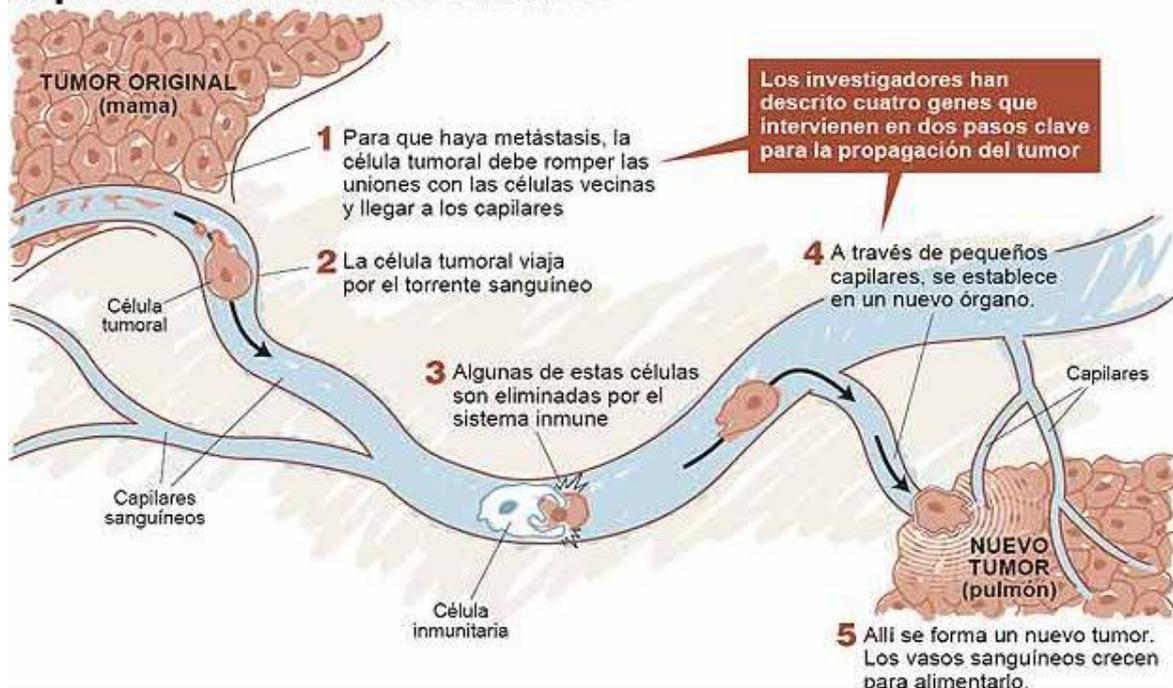


Figura 5. Etapas en el proceso de metástasis. Este ejemplo ilustra la expansión de un tumor desde un órgano como el de mama hasta el pulmón. Tomada www.loshinojosos.wordpress.com.

CÁNCER CÉRVICOUTERINO (CaCu)

De todos los tipos de cáncer el cervicouterino (carcinoma) presenta una gran relevancia por ser la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial.

El CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer a nivel mundial. Hacia el año 2002, se presentaron 12,512 nuevos casos de CaCu de los cuales 5,777, el 46 % de los casos, fueron decesos; y para el 2007 se presentaron alrededor de 16,000 casos nuevos (López y Lizano, 2007).

En México, en las mujeres, el 13.9% de las defunciones por tumores malignos corresponden al CaCu y 15 % al de mama, mientras que el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó un 9.2 % de las muertes (INEGI 2011).

El CaCu fue la primera causa de muerte en el año 2007, entre las mujeres mexicanas de 40 y 50 años de edad, representando 16.6% con respecto a otro tipo de cáncer. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas, que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica cáncer cervical.

El CaCu es una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas en los tejidos del cuello uterino. Antes de que se localicen dichas células en el cuello uterino, sus tejidos experimentan cambios y empiezan a generar células anormales proceso conocido como displasia (Figura 6).

Existen varios factores de riesgo para el CaCu entre los cuales se encuentran presencia del virus del papiloma humano (VPH), múltiples parejas sexuales, actividad sexual a temprana edad, tener historial de otras enfermedades de transmisión sexual, tabaquismo, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, y bajo nivel socioeconómico (Tirado *et al*, 2005).

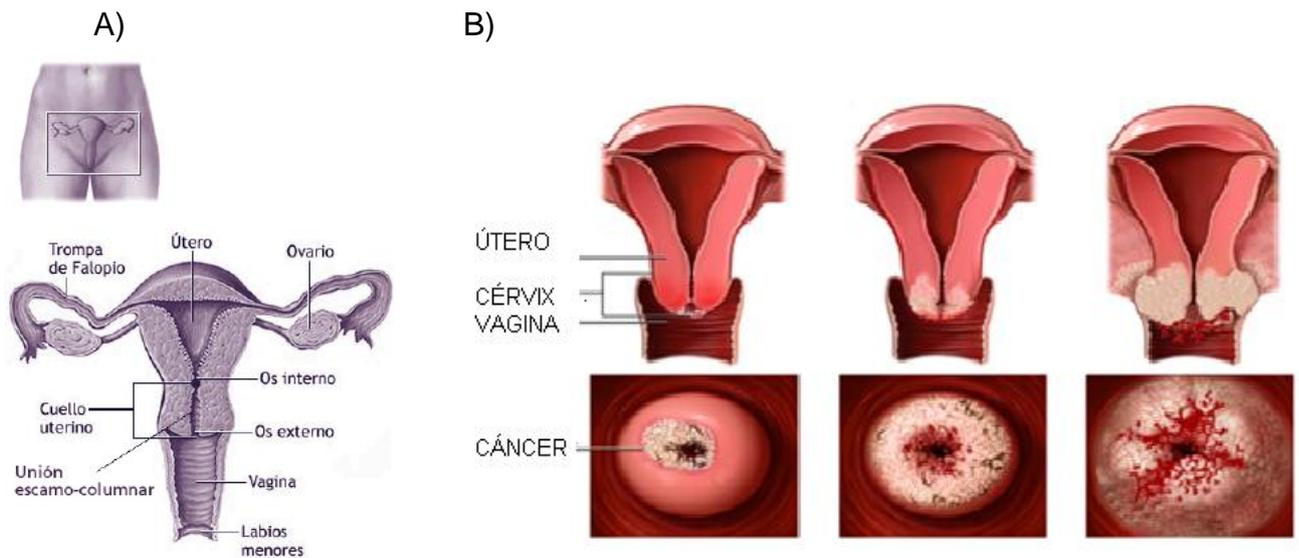


Figura 6. En A) Esquema del aparato reproductor femenino y en B) desarrollo de cáncer cervical. El cáncer cervical inicialmente progresa en capas de tejido que se encuentran en la superficie del cérvix, posteriormente invaden capas más profundas del cérvix, del útero, y finalmente se extiende en el área pélvica y otras áreas del cuerpo iniciando el proceso de metástasis. Tomada de www.health.com.

Se ha detectado el VPH hasta en 99 % de las pacientes que presentaron CaCu, particularmente virus de alto poder oncogénico, mismos que se relacionan con las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y que pueden progresar en un carcinoma (García, 2007).

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, 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, 2002).

Los tipos de VPHs de alto riesgo necesitan penetrar más profundamente en el recubrimiento del cérvix para establecer una infección crónica. Una úlcera vaginal o las relaciones sexuales, las cuales pueden erosionar el recubrimiento, pueden proporcionar un punto de entrada para el virus del papiloma.

Una vez dentro del recubrimiento cervical, el virus se adhiere a las células epiteliales. A medida que estas células ingieren nutrientes y otras moléculas que están normalmente presentes en su ambiente, ellas también ingieren al virus (Figura 7). Más de un 99 % de los casos de cáncer cervical están ligados a infecciones de larga duración con los virus del papiloma humano de alto riesgo (Doorbar, 2006).

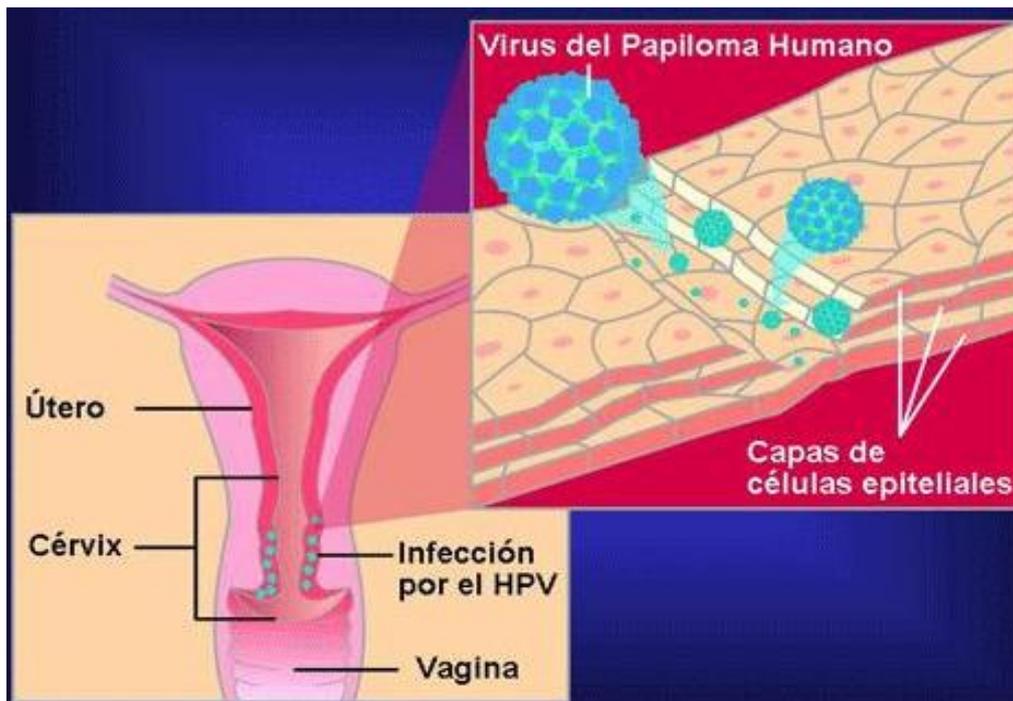


Figura 7. El VPH necesita penetrar más profundamente en el recubrimiento del cérvix para establecer una infección crónica. Una úlcera vaginal o las relaciones sexuales, las cuales pueden erosionar el recubrimiento, pueden proporcionar un punto de entrada para el virus del papiloma. Una vez dentro del recubrimiento cervical, el virus se adhiere a las células epiteliales. Tomada de www.cancer.gov/espanol.

El VPH se establece dentro de las células epiteliales alojado en la cápside constituida por una proteína viral conocida como L1 y L2. Después de que el virus entra a la célula, el recubrimiento viral se degrada, conduciendo a la liberación del material genético del virus dentro de la célula y su núcleo. Desde el núcleo, los genes del virus se expresan, incluyendo dos genes conocidos como E6 y E7, los cuales instruyen a la célula a que elabore proteínas virales conocidas como E6 y E7 (Saavedra, 2006).

Las proteínas virales E6 y E7 entonces incapacitan las actividades normales de los genes supresores de tumores propios de la mujer, los cuales elaboran proteínas supresoras que realizan "vigilancia de daño" en células normales.

Estas proteínas por lo general detienen el crecimiento celular cuando existe un nivel grave de daño genético no reparado. Aún después de que los supresores son inactivados en las células cervicales de una mujer, por lo general toma más de 10 años antes de que el tejido afectado se vuelva canceroso.

Los tipos virales relacionados con el cáncer anogenital, y específicamente con el de cérvix, son el 16 (en más de 50 % de los casos), el 18 (15 %) y, en menor proporción, el 31 y el 45.

Se ha encontrado con mayor frecuencia el tipo 16 en los carcinomas escamosos, y el 18 en los adenocarcinomas. Inicialmente, durante la infección crónica no se presentan síntomas; éstos suelen aparecer en etapas avanzadas manifestándose principalmente como sangrado ínter menstrual o sangrado por coito, y en algunos casos dolor pélvico (García, 2007).

Las células alteradas, requieren entre 10 y 20 años para generar un tumor, por lo que es importante detectarlas en los estadios tempranos de esta enfermedad. Una forma clínica de detectar a las células cancerosas, es a través de la prueba de Papanicolaou.

Cuando se encuentran problemas cervicales durante un examen pélvico, o cuando se encuentran células anormales a través de un Papanicolaou, se podría realizar una biopsia cervical.

Hay varios tipos de biopsias cervicales que pueden usarse para diagnosticar el CaCu, las cuales incluyen:

- Procedimiento de excisión electroquirúrgica.- Es un procedimiento en el cual se usa un aro de alambre eléctrico delgado para obtener un pedazo de tejido.
- Colposcopia.- En este procedimiento se utiliza un instrumento con lentes de aumento, llamado colposcopio, para examinar si el cuello uterino tiene anormalidades.

- Curetaje endocervical.- Procedimiento que consiste en raspar el revestimiento del canal endocervical con un instrumento estrecho llamado cureta. Este tipo de biopsia suele completarse con la biopsia colposcópica.
- Biopsia en cono, también llamada conización.- Consiste en extraer una porción de tejido en forma de cono del cérvix usando el procedimiento de excisión electroquirúrgica o el procedimiento de biopsia en cono.

TRATAMIENTO

El tratamiento del CaCu depende de la etapa o fase, es decir si se encuentra en un estado temprano o avanzado de la enfermedad, del tamaño y forma del tumor, la edad y la salud general de la mujer.

Cirugía.

Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido extirpadas. Se puede emplear uno de varios tipos de cirugía disponibles con el fin de destruir el tejido canceroso.

Criocirugía.- Consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.

Cirugía con rayo laser.- Consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.

Histerectomía.- Es una operación en la cual se extrae el útero y el cuello uterino además del cáncer. Si el útero se extrae a través de la vagina, la operación se llama histerectomía vaginal. Si se extrae mediante un corte (incisión) en el abdomen, la operación se llama histerectomía abdominal total. A veces los ovarios y las trompas de Falopio también se extraen; a este procedimiento se le llama salpingooforectomía bilateral (Mora, 1992).

Histerectomía radical.- Es una operación en la cual se extrae el cuello uterino, el útero y parte de la vagina. También se extraen los ganglios linfáticos de la región, a este procedimiento se le denomina disección de los ganglios linfáticos.

Si el cáncer se ha diseminado afuera del cuello uterino o los órganos femeninos, el médico puede extraer el colon inferior, el recto o la vejiga (dependiendo el lugar al que se haya diseminado el cáncer) junto con el cuello uterino, el útero y la vagina. Este procedimiento se llama exenteración y raramente se necesita.

Radioterapia.

Consiste en el uso de rayos X de alta energía para eliminar células cancerosas y reducir tumores. La radiación puede provenir de una máquina fuera del cuerpo (radioterapia externa) o se puede derivar de materiales que producen radiación (radiosótopos) a través de tubos de plásticos delgados que se aplican al área donde se encuentran las células cancerosas (radiación interna).

La radioterapia puede utilizarse como tratamiento único en aquellos casos en que los tumores sean especialmente sensibles a la radiación y no haya señales de que se haya extendido hacia ningún otro lugar. Puede emplearse como tratamiento supletorio a la cirugía, para aplicarlo previamente a ésta, y disminuir así el tamaño del tumor y que sea más fácil su extirpación.

El principal problema que produce este tratamiento viene derivado de que las células cancerosas no son agentes o cuerpos extraños al organismo sino que son parecidas a las células que las rodean. Esto hace que actúan sobre todo contra las células del cáncer, tengan también efectos sobre las células normales.

Quimioterapia.

Consiste en el uso de medicamentos para eliminar células cancerosas. Puede tomarse en forma de píldoras o se por vía intravenosa. La quimioterapia se considera un tratamiento sistémico ya que el medicamento es introducido al torrente sanguíneo, viaja a través del cuerpo y puede eliminar células cancerosas fuera del cuello uterino.

Algunos de los medicamentos para destruir el cáncer y de los que se usan como quimioterapia para el CaCu son 5-FU, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel y ciclofosfamida. En algunas ocasiones, se utiliza radiación y quimioterapia antes o después de la cirugía.

La gran desventaja es que tanto los rayos de alta energía así como los medicamentos no son específicos, ya que atacan por igual a células normales y células cancerosas, principalmente en las que se encuentran en constante proliferación, dañando así la función reproductora de ambas, así como inhibiendo su proliferación. Esto trae graves consecuencias pues los tejidos que necesitan renovarse constantemente como lo son: las paredes del esófago y del estómago, el cabello, la piel; son dañados y al inhibir su proliferación se desencadenan graves consecuencias para el paciente (Goldwein & Vachani, 2006).

El efecto secundario ha llevado al interés de generar nuevas terapias para contrarrestar este padecimiento. Dentro de esta búsqueda, se ha dado un muy fuerte interés en aquellas que están basadas en compuestos de origen natural.

Hoy en día, hay un número creciente de resultados en investigación que emplean compuestos de origen vegetal, que han sido propuestos en terapias alternativas y que están orientados hacia la quimioprevención del cáncer.

Dentro de este grupo de compuestos se encuentran las saponinas esteroidales a las se les han atribuido efectos inhibidores de la proliferación de células tumorales, por lo cual este trabajo tiene el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de la saponina esteroidal **diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo (SeCN-H)**, en células provenientes de CaCu.

SAPONINAS ESTEROIDALES

Los esteroides son derivados oxigenados de los esteroides; poseen el núcleo del esteroide pero carecen de la cadena alquilo unida al anillo D del colesterol y, por ello, son más polares que el colesterol. (Nelson y Michael, 2005).

Se derivan del núcleo del ciclo-pentano-perhidro-fenantreno que se compone de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, también de 4 anillos fusionados de carbono que poseen diversos grupos funcionales y tienen partes hidrofílicas e hidrofóbicas (figura8).

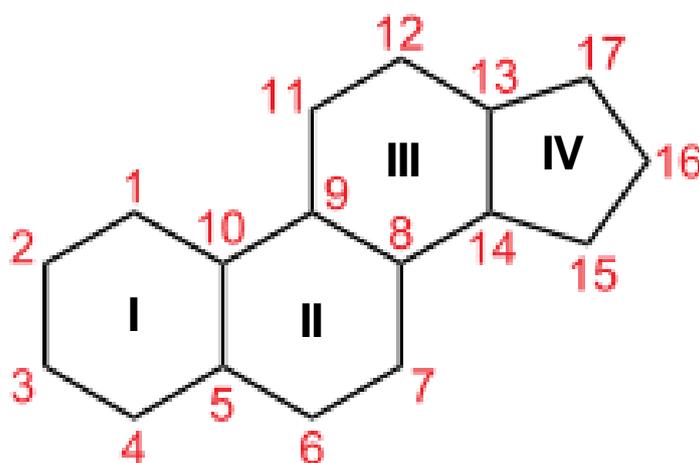


Figura 8. Molécula de ciclo-pentano-perhidro-fenantreno.

Las saponinas pueden ser esteroides o triterpenoides vegetales que reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espumas estables. Esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares; tiene propiedades hemolíticas, son venenosas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas, las saponinas tienen elevado peso molecular (Anaya, 2003).

Las saponinas esteroidales son derivados del espirostano cadena formada por un anillo de furano y otro de pirano, con muchas posibilidades de isomería, llevan un grupo OH con configuración beta por donde se une el azúcar. Podemos tener variaciones estructurales que derivan de la presencia de OH en otras posiciones.

Son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroideal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Éstas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y aunque en mayor o menor medida se encuentran en una gran cantidad de plantas, son especialmente abundantes en algunas familias, entre ellas la *Agavaceae*.

Tienen un amplio rango de actividades biológicas tales como su acción antimicótica, anticancerígenas, hipocolesterolémicas, hipoglucémica, antitrombótica, diurética, y antiinflamatoria (Rao *et al.*, 2000; Sparg *et al.*, 2004).

La capacidad de las saponinas de combatir el cáncer ha sido descrita en estudios realizados por la Universidad de Illinois en 2005. La investigación reveló que la exposición de algunas células cancerosas de colon humano a las saponinas redujo el crecimiento de las células en un 27 a 68 % (Berhow, 2007).

Dentro del grupo de saponinas encontramos a la hecogenina, la cual es conocida por presentar efecto antitumoral en células de osteosarcoma 1547 (Corbiere *et al.*, 2003), produce inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana (Liagre, 2007), así como también se ha encontrado que inhibe la proliferación celular en células tumorales HeLa (Mimaki *et al.*, 1996) y en cultivos de linfocitos normales no presenta actividad citostática (Camoutsis, 2005).

El selenio (Se) es un mineral que nuestro cuerpo ocupa para producir glutatión peroxidasa. El glutatión peroxidasa es un tripéptido formado por los aminoácidos cisteína, glicina y ácido glutámico, además, es parte del sistema de defensa antioxidante del cuerpo; éste funciona con la vitamina E para proteger las membranas de las células del daño causado por sustancias peligrosas que se presentan de forma natural conocidas como radicales libres. Y en pacientes cuya sangre tiene un nivel bajo de glutatión peroxidasa, la incidencia de cáncer es mucho más alta (Darlow *et al.*, 2000).

Las principales fuentes del Se de los mexicanos, son la cebolla, el pescado y los mariscos; aunque las tortillas y los frijoles contienen niveles relativamente bajos de selenio, son también una importante fuente dietética de selenio porque se comen en grandes cantidades.

Estudios en animales han demostrado que la nutrición mejorada con Se puede reducir el riesgo de cáncer. En los ensayos, se agregaron cantidades moderadas de este metal a las dietas normales de los animales que habían sido tratados con sustancias cancerígenas. En casi todos los casos, la complementación con Se redujo substancialmente la incidencia de cáncer (Hernández, 2005).

Por otro lado, también se observó que en pacientes con cáncer de tiroides, el Se se presenta en menores concentraciones que en pacientes que no presentan cáncer, para comprobar esto, se realizó un estudio donde se administró selenio a un grupo de ratas y a otro grupo no se le administró dicho elemento, después los dos grupos fueron sometidos a radiaciones, el grupo tratado presentó una supervivencia mayor a las no tratadas (Fleites, 1999). Por otro lado, también se ha reportado que el Se tiene una actividad antioxidante en células provenientes de cáncer de hígado, pecho, estómago, esófago, pulmón, ovario, páncreas, tiroides, melanoma, próstata y colón (Tapiero *et al*, 2003).

La información antes mencionada, genera la posibilidad de crear una molécula esteroidal conteniendo selenio, permitiendo evaluar la actividad antitumoral descrita anteriormente para ambas moléculas en una sola. Al respecto, en el laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se sintetizó un derivado de la hecogenina conteniendo selenio, cuya fórmula de la IUPAC es **diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo (SeCN-H).**

Para la formación del SeCN-H se abre la cadena lateral de la hecogenina con anhídrido acético y trifluoruro de boro, luego el OH que se formó en la cadena lateral se protege con un grupo tosilo el cual se forma con cloruro de paratoluensulfonilo y piridina, posteriormente se hace una sustitución nucleofílica con yoduro de sodio y se forma el compuesto yodado y al final se hace otra sustitución nucleofílica para desplazar al yodo y se forma el producto final selenado utilizando selenocianato de potasio (Fernández, 2010) (Figura 9).

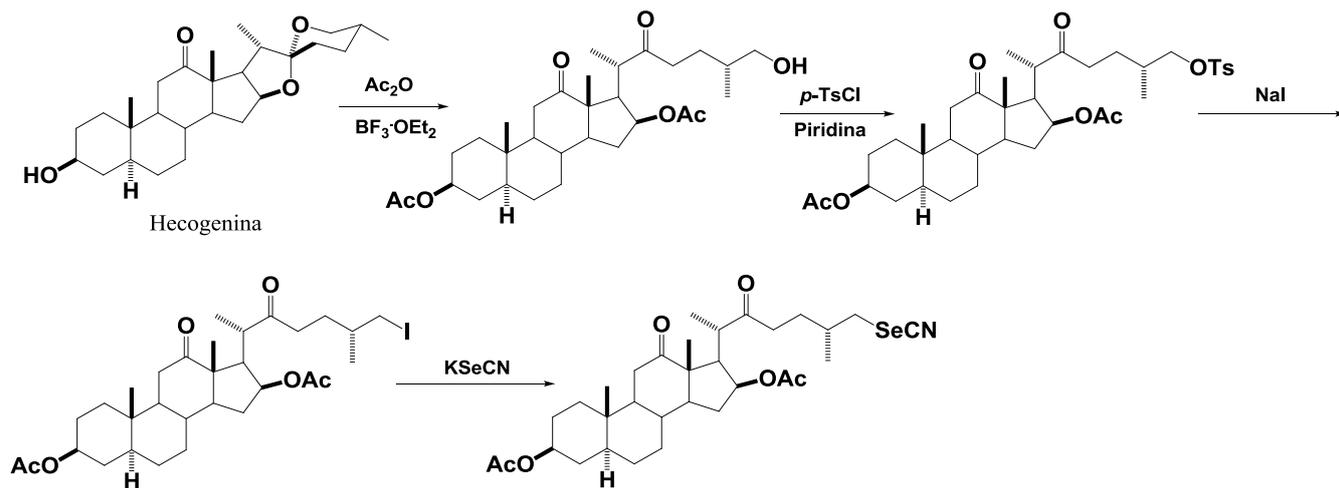


Figura 9. Síntesis del SeCN-H (diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5α-colestan-3β-16β-diilo) a partir de la hecogenina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el cáncer es tratado mediante cirugía, radioterapia y quimioterapia, las cuales son costosas y en pacientes con cáncer terminal son ineficientes. La radioterapia así como la quimioterapia dañan tanto a células tumorales como a células normales, es decir, solamente atacan a células en división, caracterizándolas con un efecto poco selectivo, e ineficiente en estados avanzados de la enfermedad. Este hecho, genera la necesidad de buscar nuevas terapias que estén basadas en compuestos de origen biológico y en particular los de origen vegetal. En la actualidad hay un número creciente de resultados en investigación que emplean compuestos de origen vegetal. Dentro de dichos compuestos encontramos a las saponinas esteroidales, a elementos químicos como el selenio, entre otros, a las cuales recientemente se les ha atribuido un efecto citotóxico y antiproliferativo; sin embargo se tienen pocos estudios sobre el efecto de éstas sobre cáncer de cérvix, por lo cual es necesario generar información sobre la actividad de las saponinas esteroidales sobre células de cáncer cervical.

JUSTIFICACIÓN

El CaCu es la principal causa de muerte en las mujeres mexicanas siendo responsable de 46% de las muertes por cáncer en el 2007. En tanto el virus del papiloma humano tipo 16 y 18 están asociados a un 70 % de los casos. Pese a los tratamientos que existen actualmente para combatir y erradicar este tipo de cáncer, la tasa de incidencia y mortalidad aun es considerable. Este hecho, genera la necesidad de buscar alternativas terapéuticas adecuadas y de mayor eficiencia para esta patología. Dentro de las nuevas alternativas terapéuticas con fines orientados hacia la quimioprevención y cura del cáncer, está el uso de compuestos vegetales y / o elementos químicos, entre los cuales podemos mencionar a las saponinas esteroidales, sus derivados y al selenio respectivamente, los cuales presentan efectos citotóxicos, anticancerígenos, entre otros; 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 sobre este tipo de enfermedad.

HIPÓTESIS

Es conocido que las saponinas esteroidales, compuestos de origen vegetal, presentan actividad antimicótica, anticancerígena, hipoglucémica, diurética y antiinflamatoria. En especial, se ha reportado que la hecogenina y el selenio presentan un efecto antitumoral, antiproliferativo e inductor de apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana y en la línea celular HeLa, por lo que se espera que su derivado el SeCN-H, presente una actividad antiproliferativa inducida por una muerte por apoptosis en líneas celulares de CaCu.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo del derivado de la hecogenina **diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo (SeCN-H)**, así como su efecto en el ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares de CaCu.

PARTICULARES

Realizar cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, así como, células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano y linfocitos humanos de sangre periférica.

Determinar la concentración de SeCN-H, requerida para disminuir en un 50 % (CI₅₀) la densidad celular de cultivos de las líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo.

Comprobar si el SeCN-H induce actividad citotóxica en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo así como de linfocitos humanos no tumorales, mediante la detección de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Establecer si el SeCN-H afecta la distribución de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo, determinadas por citometría de flujo.

Evaluar si el SeCN-H, induce muerte por apoptosis en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo mediante la detección de caspasa 3 activa así como la detección de fragmentación de DNA, determinadas por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente.

Determinar si el compuesto SeCN-H afecta la proliferación celular de fibroblastos no tumorales provenientes de cérvix humano así como la proliferación de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.

METODOLOGÍA

Cultivo de células tumorales.

Células provenientes de CaCu son sembradas en cajas petri de cristal de 100 mm (Pirex EUA), con 10 ml de medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) con rojo fenol, al 10% de suero de neonato de ternera (SNC) desactivado a 56 °C por 30 minutos (Gibco BRL) ver apéndice. Los cultivos son mantenidos a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (NUAIRE, EUA). Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales a un 70 % de saturación de acuerdo con Morgan y Darling (1995).

Obtención de la saponina esteroidal SeCN-H.

Fueron proporcionados 250 mg del esteroide SeCN-H (C₃₂H₄₇NO₆Se) por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez, responsable del laboratorio de Química de Síntesis de productos naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se proporciono de forma solida el cual es soluble en acetato de etilo. Su nombre determinado por la IUPAC es: **diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo.**

Preparación del SeCN-H.

Para evaluar el efecto de la saponina esteroidal SeCN-H se preparó una solución patrón que contiene 1mg del compuesto solubilizado en 50 μ l de acetato de etilo, del cual se tomó la cantidad correspondiente para estimular los cultivos celulares, tanto de células tumorales así como los cultivos de células no tumorales.

Determinación de CI₅₀.

Para establecer la CI₅₀, índice de concentración en la cual se disminuye en un 50 % el número celular, de las líneas tumorales provenientes de CaCu, fueron sembradas 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de NCS, durante 24 h. Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI-1640 al 5 % de NCS con el compuesto SeCN-H, a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μ l/ml.

En el ensayo se utilizó como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 5 μ l de etanol. A las 24 h se evaluó el número celular por la técnica de cristal violeta Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de regresión para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50 % la población celular de las líneas tumorales de CaCu.

Obtención de la CI_{50} matemática.

Para calcular las CI_{50} , los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dependientes de la dosis, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular. A estas curvas se les aplicó regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, de éste modo, en base a la ecuación obtenida de la recta, el valor de "Y" se sustituye por 50 y el valor de X = CI_{50} . Obteniendo así finalmente el valor de la CI_{50} respectiva.

Evaluación de la proliferación por incorporación del colorante cristal violeta.

El colorante cristal violeta posee características alcalinas que le permiten teñir la cromatina del núcleo celular. El número de núcleos con tinción aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida.

Células HeLa, CaSki y ViBo fueron sembradas (7500 por pozo) en cajas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc.), con un volumen por pozo de 100 μ l de RPMI-1640 al 5 % de suero fetal bovino (SFB), durante 24 h.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó compuesto (SeCN-H) diluido en RPMI-1640 al 5 % de NCS a concentraciones desde 25 μ g/ml hasta 200 μ g/ml, y se permitió actuar al compuesto por 24 h.

Además se incluyó un ensayo control-vehículo que contempló 5 μ l de acetato de etilo diluido en RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al término del estímulo con las diferentes concentraciones del compuesto se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al*, 1989.

Para ello, a los cultivos tratados se les retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, EUA) por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con PBS (agua desionizada), con un pH de 7.3 durante tres minutos por lavado, posteriormente se dejaron secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante fue 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 espectrofotómetro (Imagine tecan spectra). En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal y se obtuvo la concentración inhibitoria del 50 % de la población celular (CI_{50}).

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.

La cantidad de ADN presente en las células se determinó marcando el DNA con yoduro de propidio y la fluorescencia fue evaluada en un citómetro de flujo. 500,000 células de las líneas celulares de CaCu fueron sembradas en cajas de petri de 5 ml (Kimex, EUA) con 5 ml de RPMI al 5 % de NCS. Se incubaron por 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente fueron estimuladas con las CI_{50} obtenidas del SeCN-H para cada línea celular, y se permitió actuar al compuesto por 24 horas.

Consecutivamente al estímulo, las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con verseno, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y lavaron con PBS. El botón celular fue fijado y resuspendido con 1 ml de una solución 1:1 metanol/PBS, pasados 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 adicionaron 10 μ l de yoduro de propidio (200 mg/l), se mezcló y se protegió de la luz, para ulteriormente analizar las muestras en un citómetro de flujo (Coulter, EUA).

Determinación de la expresión de Caspasa 3 por inmunocitoquímica.

Para determinar si la saponina esteroide SeCN-H induce un incremento en la expresión de la Caspasa 3, como un parámetro para inducir apoptosis, 50,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1 x 1 cm, en un volumen de 300 μ l de RPMI al 5 % de SFB en cámara húmeda por 24 h. Al término se procedió a estimular a las células con concentración de IC_{50} de la saponina esteroide SeCN-H en medio de cultivo RPMI al 5 % de SFB por 24 h.

A continuación se realizó la detección de la caspasa 3 por inmunocitoquímica, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 20 minutos, al término del tiempo las células fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS y a continuación se permearon con tritón X-100 al 0.5 % por 5 minutos a 4°C. Nuevamente las células fueron lavadas 3 veces con PBS y sucesivamente se adicionó el anticuerpo primario (anticaspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision) 1:50 en PBS durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:100 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después aplicar DAPI de manera muy cuidadosa durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestras con medio de montaje antifolding y selladas con resina acrílica y nitrocelulosa. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a analizarlas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (Nikon, Japón).

Evaluación de la fragmentación de ADN 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 ADN fragmentado. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con fluorescencia roja.

Para llevar a cabo la técnica 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la Caspasa 3. Al término del cultivo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % en PBS el cual debe ser preparado al momento. Se lavó 3 veces con PBS y se permeó con tritón X-100 0.5 % en PBS, durante 5 minutos a 4°C.

Se lavó con PBS 3 veces. Se adicionó inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30 µl) en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar. Se incubó inmediatamente por 1 h con enzima Tdt (33µl de enzima más 77 µl de buffer de reacción), en cámara húmeda. Se detuvo la reacción con buffer de paro (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua desionizada), 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda.

Se lavaron con PBS, se incubaron con anti-digoxigenina-rodamina (Chemicon international, EUA) (68 μ l de solución de bloqueo más 62 μ l de anti-digoxigenina) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron los respectivos lavados con PBS en cámara húmeda. Se incubó con Dapi por 1 minuto. A continuación, se lavaron las muestras con PBS en cámara húmeda. Las preparaciones fueron montadas con medio de montaje y selladas con resina acrílica y nitrocelulosa se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

Procesamiento y obtención de células fibroblásticas de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica es transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % SFB (Gibco, EUA) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en escindir el tejido en trozos pequeños (5 mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.1 %.

Se lleva a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pirex EUA) de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37 °C en un baño maría durante 15 minutos en agitación constante.

Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vierte a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. El filtrado se centrifuga por 5 minutos a 1500 rpm, se decanta el sobrenadante y el botón celular es cultivado en cajas petri de 5 ml que se mantienen en una incubadora (Nuair, EUA) al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío durante dos días máximo. Después de este tiempo de incubación, se realiza el cambio de medio, de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continúa así hasta obtener un buen número de células proliferando. En este momento se obtienen poblaciones fibroblásticas o epiteliales, las cuales son utilizadas para llevar a cabo resiembras que permitan mantener poblaciones de un solo tipo celular. Prospera a largo plazo el monocultivo de células fibroblásticas.

Proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CSFE).

En tubos vacutainer con EDTA fueron obtenidos 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y colocados (5ml) en tubos cónico de vidrio (Pirex, EUA), con 5 ml de histopaque (un total de 4 tubos), se cubrieron con aluminio y centrifugaron (centrifuga; Dinac, EUA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y fue aumento gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos más.

Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo leucocitos en un tubo cónico de vidrio de 15 ml, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendió con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se re suspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB. El total de células queda contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml.

Se sembraron las células en una caja de petri de 100 mm (Pirex, EUA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, e incubaron durante 1h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para el ensayo de carboxifluoresceína; se agregó en cada eppendorf la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1 000 000 de células/ml de medio total.

Para marcar con carboxifluoresceína (Zigma-Aldrich, EUA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ M por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron 15 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS y 5% SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.5 ml a una densidad de 1 000 000 de células por ml de RPMI suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con SeCN-H se trataron las células con CI_{50} (60 μ l/ml). Las células contenidas en cada tubo fueron sembradas en la placa de cultivo de 96 pozos, a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l e incubadas hasta su evaluación.

Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y retiró el verseno, posteriormente se resuspendió con 500 μ l de PBS (dos veces) y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo.

Determinación de citotoxicidad (necrosis) por medio de la evaluación de la liberación de LDH en medios de cultivo.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones. Corresponde a la categoría de las oxidorreductasas, dado que cataliza una reacción redox en la que el piruvato es reducido a lactato. La LDH se encuentra en el citoplasma, y se libera al romperse la membrana celular, al ser detectada se comprueba que la célula murió por necrosis.

Se sembraron 7500 células por pozo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo en placas de 96 pozos (Corning, EUA), con 100 μ l de medio RPMI al 5 % de SNC, por 24 h. Pasado este tiempo se retiró el medio y se agregaron los estímulos indicados. Un control positivo, al cual solo se le cambia el medio de cultivo por medio fresco. Un control basal o negativo al cual sólo se le cambia el medio de cultivo por medio fresco. Un control que contempla la cantidad de acetato de etilo máxima utilizada para solubilizar el compuesto SeCN-H en cada una de las CI_{50} . Un tratamiento con la CI_{50} para cada una de las líneas celulares. Una hora antes de cumplir las 24 h de estímulo, se agrega Tritón X-100 al 1% al control positivo. Cumplidas las 24 h se recoge el medio de cultivo de cada uno de los pozos en tubos cónicos de plástico de 600 μ l y se centrifuga a 2000 rpm. El medio es colocado en una placa de 96 pozos, 100 μ l por pozo, agregándole 100 μ l de mezcla de reacción del Kit de evaluación de citotoxicidad por LDH (Colorante 11.25 ml más catalizador 250 μ l. BioVision). Se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad. El ensayo se evaluó a 490 nm.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se muestran como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 6 repeticiones. A los que se les realizaron análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows 7 seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

Efecto antiproliferativo del esteroide SeCN-H en células de CaCu.

Con la finalidad de evaluar el efecto antiproliferativo del **diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β -16 β -diilo (SeCN-H)**, así como el determinar la concentración requerida del compuesto que induzca un decremento del 50 % el crecimiento celular (CI_{50}), cultivos de células tumorales provenientes de CaCu HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con diferentes concentraciones del esteroide (Figura 10).

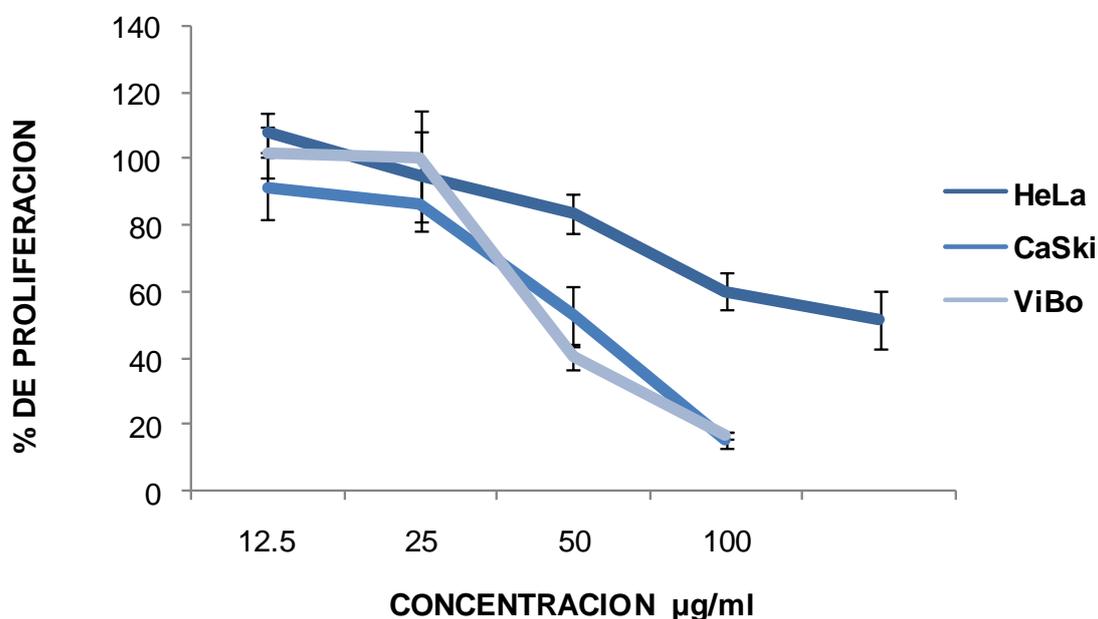


Figura 10. Efecto antiproliferativo de la saponina esteroide SeCN-H sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. Fueron cultivadas 7500 células en cajas de 96 pozos por 24 h y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto por 24 h.

Los resultados obtenidos en la figura 10 indican que el efecto del SeCN-H sobre el potencial proliferativo de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo es dependiente de la concentración, es decir, conforme se incrementa la concentración la densidad celular disminuye. La concentración calculada de SeCN-H requerida para disminuir en un 50% el número celular (CI_{50}), obtenida a través de la regresión lineal con la cual se realiza la interpolación del 50 % llegando a la determinación de la CI_{50} calculada en las células HeLa es de 59 $\mu\text{l/ml}$, mientras para las células CaSki y ViBo es de 60 $\mu\text{l/ml}$.

Efecto del SeCN-H en la morfología de células de CaCu.

Con intención de observar el efecto del compuesto en la morfología de células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con las CI_{50} del compuesto SeCN-H por 24 h y los cultivos fueron observados al microscopio invertido y fotografiados con una cámara digital SONY (Figura11).

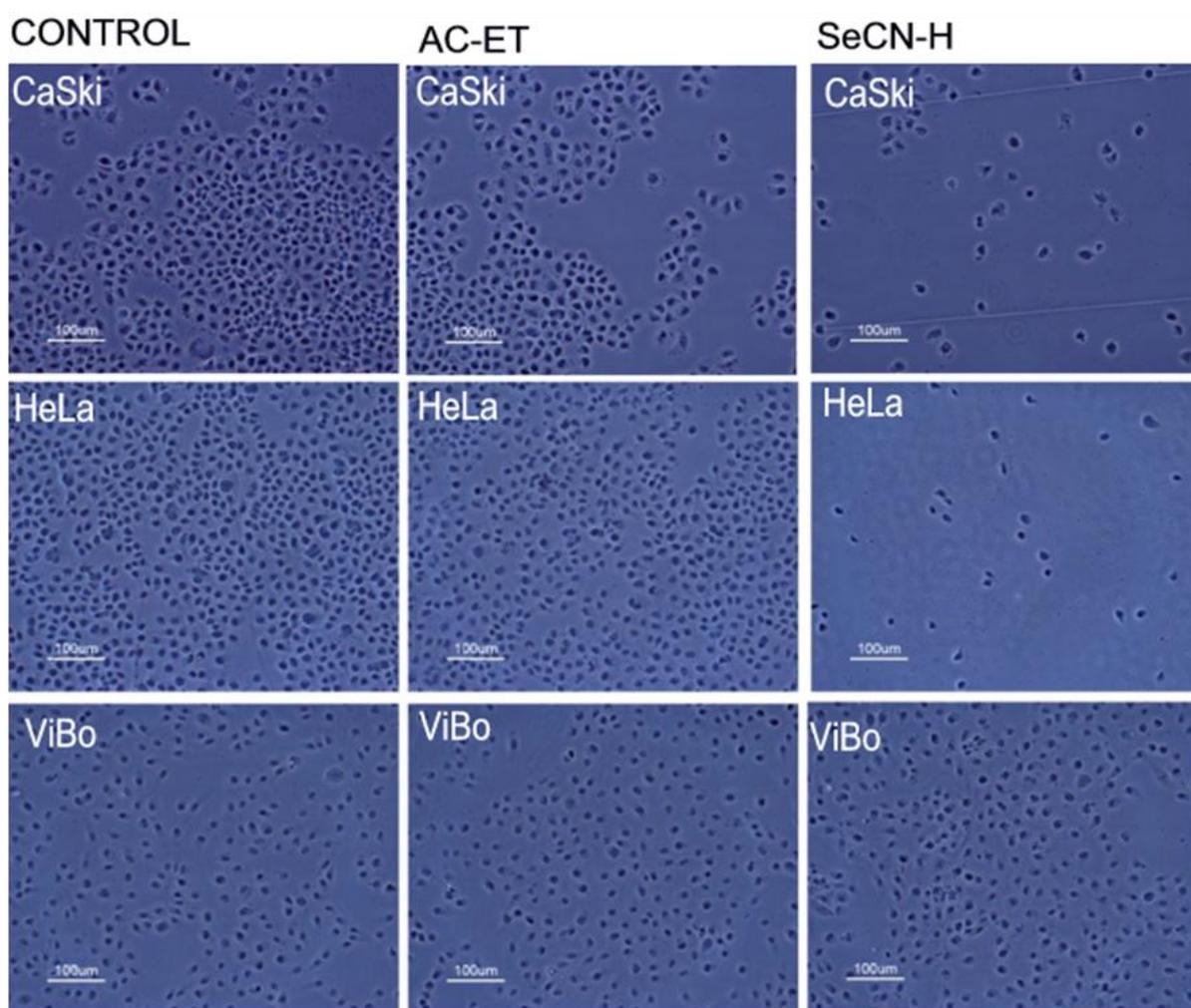


Figura 11. Efecto de la saponina esteroide SeCN-H en la morfología de células CaSki, HeLa, y ViBo; cultivo de células tumorales en medio de RPMI al 5 % de SNC; células estimuladas con 1% de acetato de etilo con RPMI al 5 % de SNC; células CaSki, HeLa y ViBo estimuladas con la CI_{50} para cada línea celular.

Como se observa en la Figura 10 la morfología de las líneas celulares tratadas con el compuesto SeCN-H se ve afectada. En los cultivos control así como en las estimuladas con acetato de etilo se muestran adheridas al plato de cultivo, con un contorno regular, el citoplasma extendido, y guardando contacto con células vecinas. A los cultivos tratados con el SeCN-H, las células HeLa y CaSki presentan una reducción del citoplasma, tamaño reducido, con un núcleo pequeño, que indica la compactación de la cromatina.

Efecto de la C150 de SeCN-H en el potencial proliferativo de células no tumorales.

Con el interés de determinar si la actividad antiproliferativa de este esteroide es selectiva, se determinó el efecto antiproliferativo del SeCN-H en células no tumorales, por lo que células fibroblásticas obtenidas de biopsias de cérvix no tumoral humano, así como cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, fueron estimuladas con 60 $\mu\text{l/ml}$ del esteroide y la densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta para las células fibroblásticas y mediante la incorporación de carboxifluoresceína para las células linfocíticas (Figura 12 y 13).

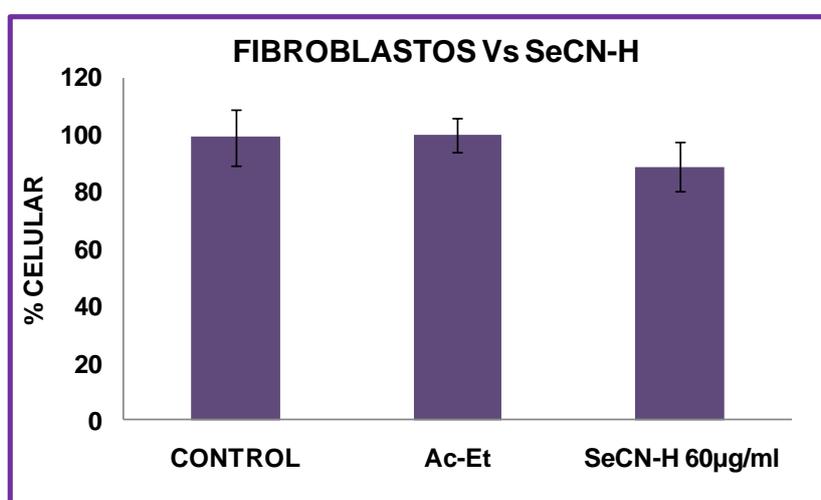


Figura 12. Efecto de la saponina esteroide SeCN-H sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano no tumorales. Fueron sembradas 7500 células de cérvix humano en placas de 96 pozos en RPMI al 10 % de SFB y estimuladas con el compuesto SeCN-H (60 $\mu\text{l/ml}$) por 24 h. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta.

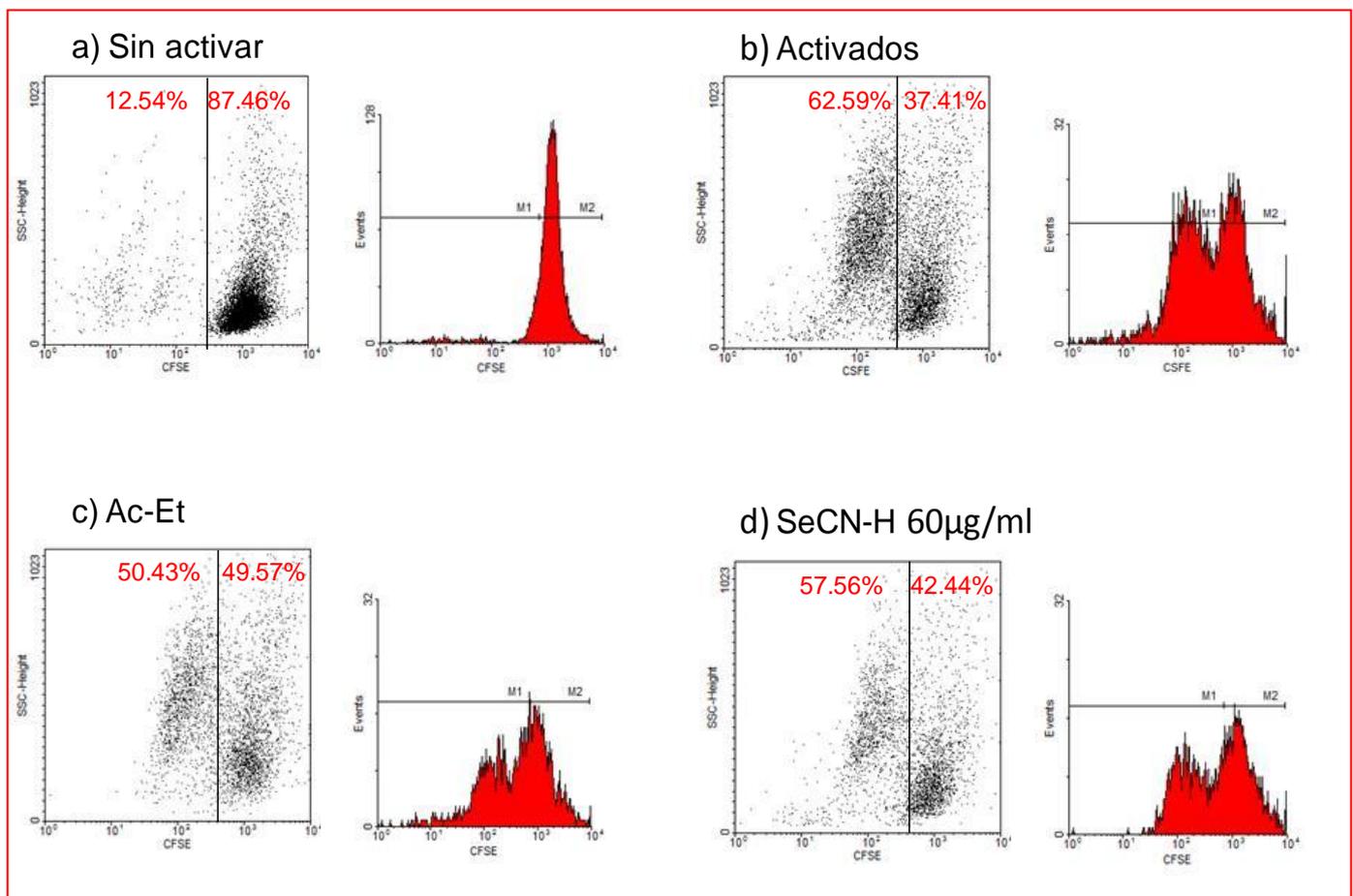


Figura 13. Efecto de la saponina esteroide SeCN-H en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína, el potencial proliferativo fue evaluado con linfocitos tratados con la CI_{50} del SeCN-H y células sin tratamiento. La proliferación fue medida por marcaje con carboxifluoresceína y evaluada por citometría de flujo. M1: región de células en proliferación y M2: región de células que no proliferan. a) Linfocitos sin activar, b) linfocitos activados con fitohemaglutinina, c) tratados con acetato de etilo y d) 60 μ g/ml de SeCN-H.

Los resultados mostrados en las figuras 12 y 13, indican que el SeCN-H no afecta el potencial proliferativo de las células fibroblásticas ni de las células linfocíticas, sugiriendo una acción selectiva de la saponina SeCN-H.

Actividad citotóxica del SeCN-H en células de CaCu.

Se sabe que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto puede ser causado por un efecto citotóxico que lleva a la célula a una muerte por necrosis. Una característica principal de la necrosis es el rompimiento de la membrana citoplasmática, liberando así el contenido intracelular. Como es ya conocido en el citoplasma existen enzimas como la LDH que no pueden salir de la célula a menos que la membrana plasmática se encuentre averiada, de tal manera que su continuidad se vea pérdida, dejando salir el contenido citoplasmático, causando que las enzimas citoplásmicas fuera de la célula.

Con el interés de determinar si el compuesto SeCN-H ejerce un efecto necrótico en líneas celulares, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con 59 y 60 μ l/ml de la saponina esteroidal SeCN-H y la actividad de la LDH fue determinada en los sobrenadantes, mediante un el kit LDH-Cytotoxicity Assay kit (Viobision; N° Cat. K311-400) (Figura 14).

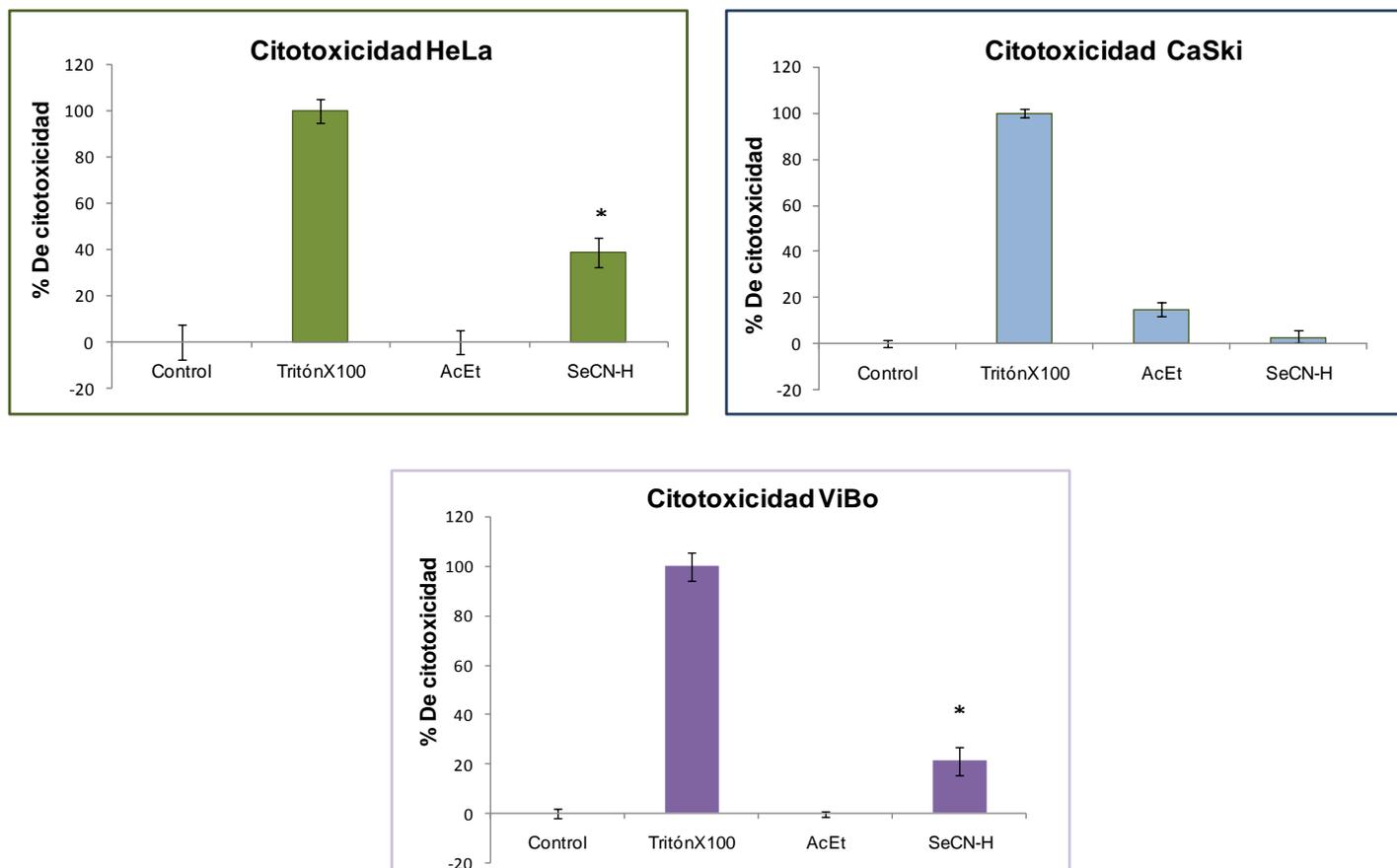


Figura 14. Efecto necrótico del compuesto SeCN-H sobre líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. (* $P < 0.05$ vs AcEt., con prueba ANDEVA seguida de Tukey).

Los resultados obtenidos muestran que la saponina SeCN-H ejerce una acción citotóxica en las líneas tumorales HeLa y ViBo, sugiriendo que las induce a morir por necrosis. Sin embargo en células CaSki, no se observó efecto citotóxico, indicando que el efecto citotóxico del SeCN-H podría ser dependiente de la línea celular. No obstante el efecto citotóxico observado en las células tumorales HeLa y ViBo fue menor al 50 % (40 % en HeLa y 20 % en ViBo) con respecto al tritón X100 el cual es un control positivo, sugiriendo que el decremento observado en el número celular en los cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo tratadas con el SeCN-H es causado además de la necrosis por una vía diferente a la necrótica.

Efecto citotóxico del SeCN-H en células no tumorales.

Con el fin de determinar si el SeCN-H ejerce una actividad citotóxica sobre células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos fueron tratados con el compuesto a una concentración de 60 $\mu\text{l/ml}$ y la actividad de la LDH fue evaluada (Figura 15).

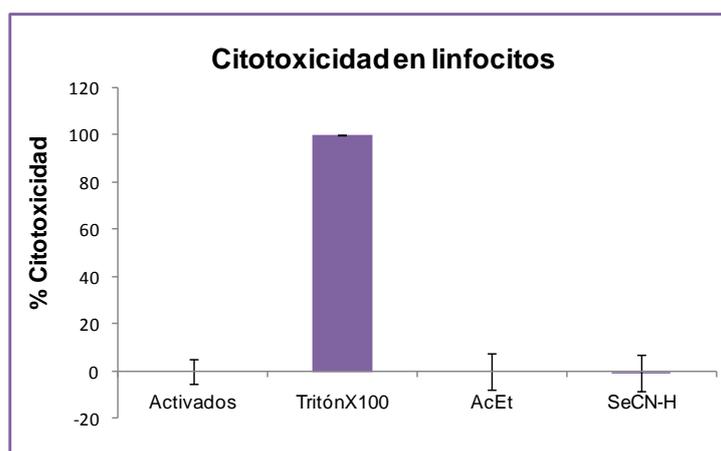


Figura 15. Efecto citotóxico del compuesto SeCN-H, a la concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$, sobre cultivos de linfocitos humanos.

Los resultados obtenidos muestran que el SeCN-H no presenta actividad citotóxica en los cultivos de células linfocíticas humanas, indicando que no induce muerte por necrosis en células no tumorales.

Efecto del SeCN-H en el ciclo celular de células de CaCu.

Es conocido que los compuestos que actualmente se usan para las quimioterapias pueden actuar a través del ciclo celular, de tal manera que éstos detienen a las células en alguna fase del ciclo. Sin embargo, también se ha reportado que hay compuestos cuya acción antiproliferativa es independiente del ciclo, esto es, actúan independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células. Con el interés de determinar si el SeCN-H actúa de manera dependiente o independiente del ciclo, cultivos de células CaSki, ViBo y HeLa fueron estimulados con 60 y 59 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente y la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 16).

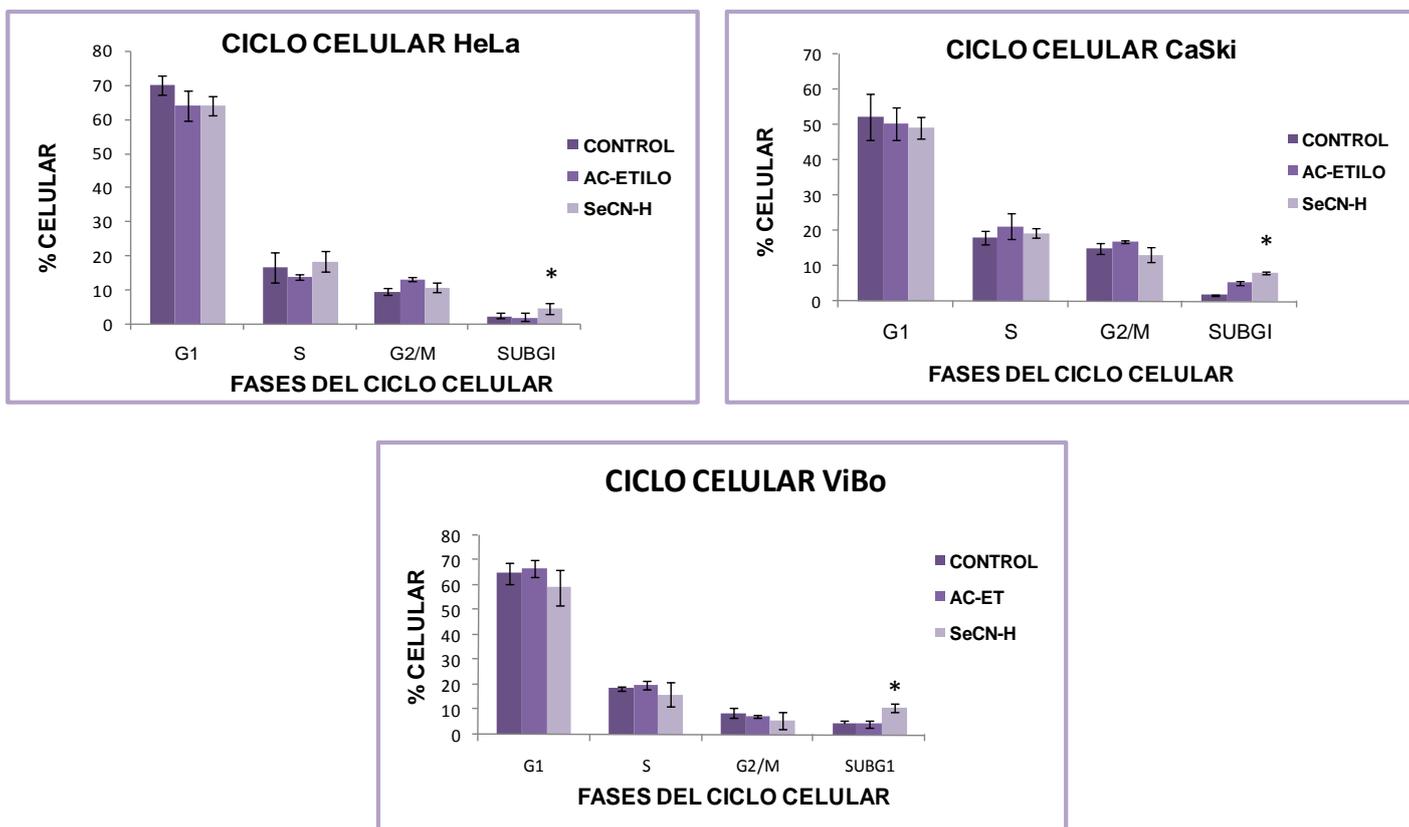


Figura 16. Efecto de la saponina esteroide SeCN-H en las diferentes fases del ciclo celular de células HeLa, CaSki y ViBo. Los ensayos se realizaron con cultivos de 5×10^5 células en cajas de petri con 5 ml de RPMI al 5 % de NCS y tratados a las 24 horas con las CI_{50} obtenida del SeCN-H. La distribución del ADN en las fases del ciclo celular fue evaluada a través de citometría de flujo. La gráfica representa el promedio de seis experimentos independientes. (* $P < 0.05$ vs AcEt., con prueba ANDEVA seguida de Tukey).

Como se muestra en la figura 16, no se observan diferencias significativas en los valores de distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular en las tres líneas celulares, sugiriendo que el efecto antiproliferativo del esteroide SeCN-H es independiente del ciclo. Sin embargo, en dichas líneas celulares tratadas con la saponina esteroide se observa un pequeño incremento en la región sub-G1, que sugiere que el esteroide induce a las células tumorales a algún tipo de muerte, ya que la región sub-G1 se caracteriza por presentar una cantidad de ADN menor a las células que se encuentran en la fase G1, implicando la presencia de núcleos fragmentados.

SeCN-H e inducción de apoptosis en células tumorales.

Detección de núcleos con cromatina condensada.

Con el afán de precisar si el decremento en el número celular inducido por la saponina esteroide SeCN-H en las células tumorales se debe a una muerte por apoptosis, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el compuesto SeCN-H y la observación de núcleos con la cromatina condensada fue determinada mediante la detección de núcleos pequeños y compactos como una característica de la muerte por apoptosis (Figura 17).

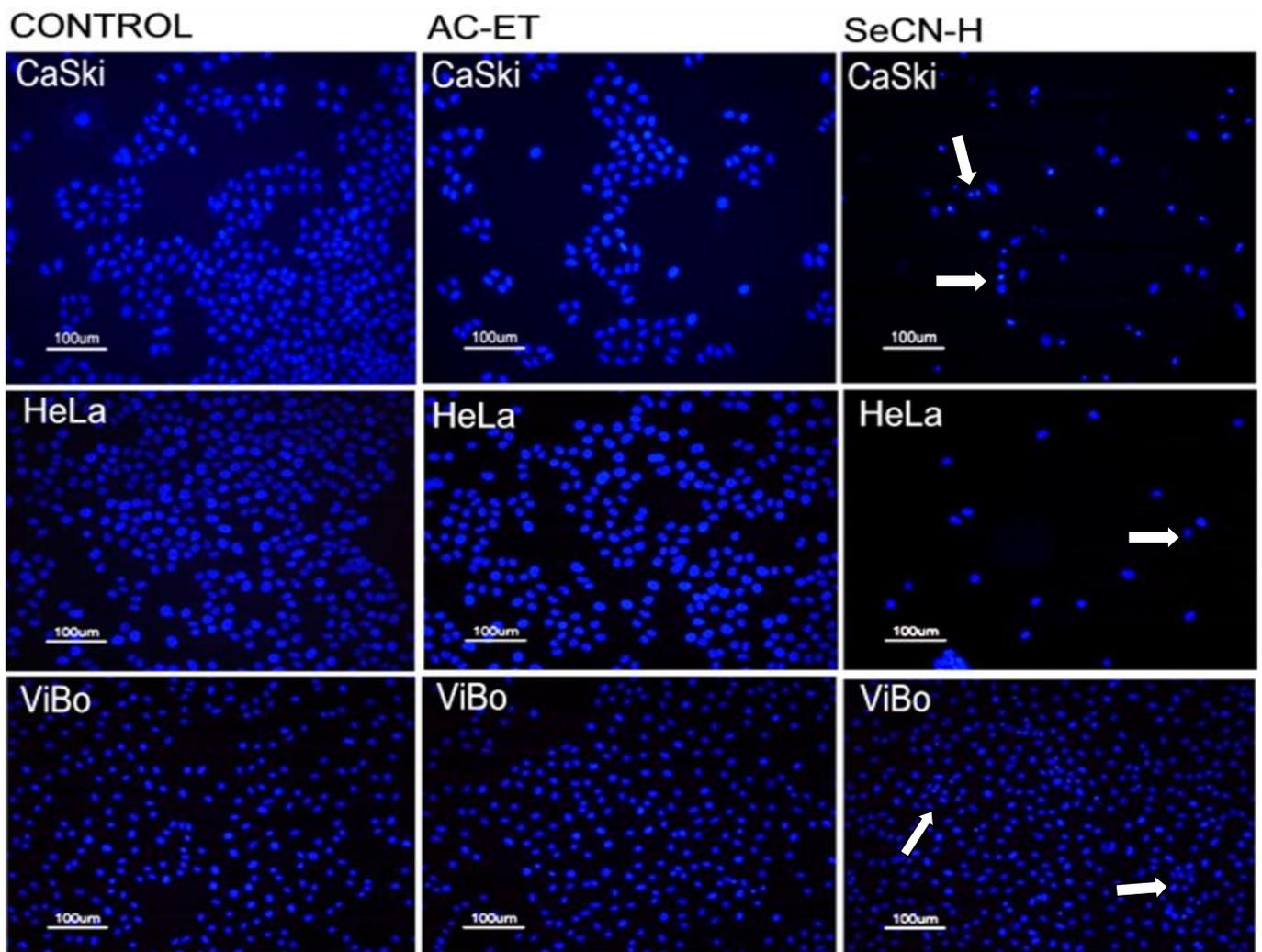


Figura 17. Observación de núcleos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, estimuladas con la saponina esteroide SeCN-H. Los núcleos fueron marcados con el fluorocromo DAPI y observados en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON).

Como se observa en las imágenes de la figura 17 los cultivos tratados con el SeCN-H, hay núcleos más pequeños y compactos que en los cultivos no tratados, indicando que el SeCN-H induce en las células tumorales, una compactación o condensación de la cromatina como resultado de una muerte celular.

SeCN-H y detección de caspasa 3 activa y fragmentación de ADN en cultivos de células tumorales.

No obstante la detección de la condensación de la cromatina en los cultivos de células tumorales tratados con el esteroide, esto no es suficiente para concluir que la saponina esterooidal SeCN-H induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis, ya que en la necrosis se generan fragmentos de núcleos que podrían confundirse con núcleos pequeños.

Por consiguiente y con la intención de concluir que el SeCN-H induce a una muerte por apoptosis a las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el compuesto y la detección de la caspasa 3 activa así como la fragmentación del ADN fue evaluada por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente (Figura 18 y 19).

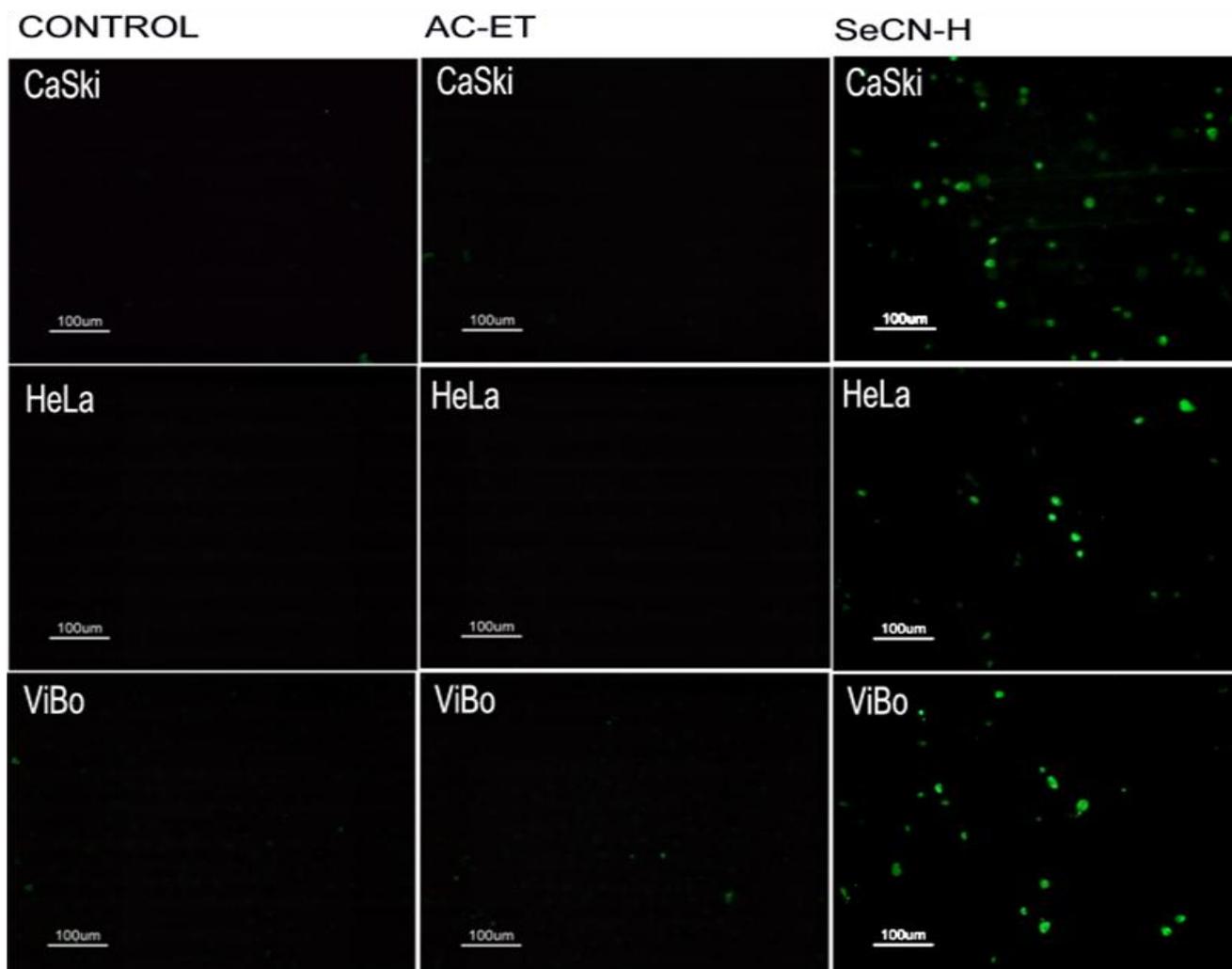


Figura 18 Expresión de la Caspasa 3 activa en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con 59 y 60 $\mu\text{g/ml}$ de SeCN-H, respectivamente. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON). Todas las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. AC-ET, acetato de etilo.

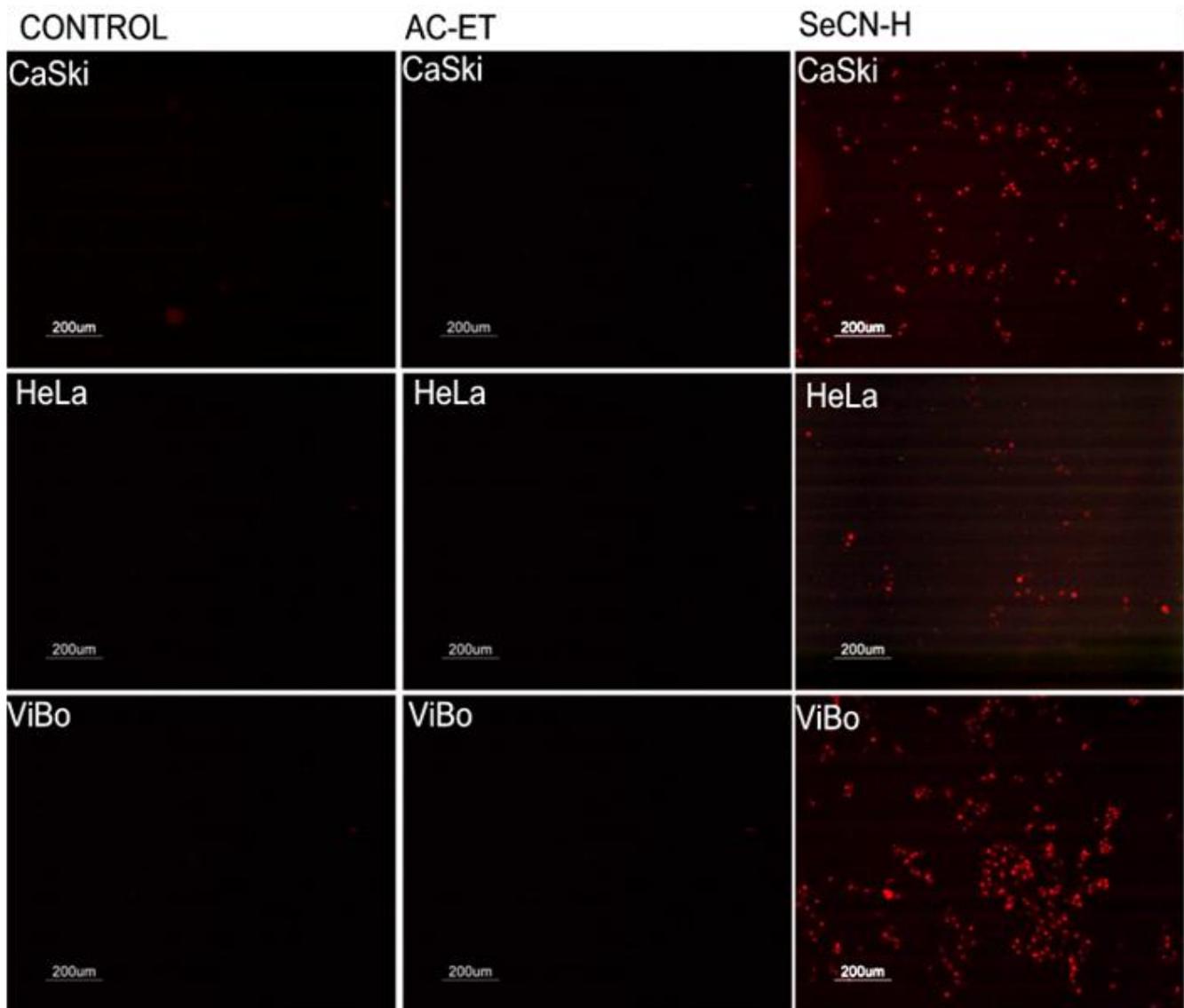


Figura 19. Detección de fragmentos de ADN en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con 59 y 60 $\mu\text{g/ml}$ de SeCN-H, respectivamente. La detección de ADN fragmentado en cultivos de células tumorales fue evaluado mediante la técnica de TUNEL. La coloración roja indica células con fragmentación de ADN.

Las imágenes de la figura 18 y 19 muestran que el SeCN-H induce la expresión de la caspasa 3 activa así como la fragmentación de DNA en las tres líneas tumorales, concluyendo que el esteroide induce una muerte por apoptosis.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente, la búsqueda de compuestos antitumorales ha despertado un gran interés, sobre todo, en aquellos que son de origen biológico y específicamente los de origen vegetal como es el caso de las saponinas, las cuales se sabe que presentan una actividad antibacteriana, antifúngica y antitumoral, entre otras. El efecto antiproliferativo de la hecogenina ha sido demostrado *in vitro* en células sinoviales de artritis reumatoide humana (Liagre, 2007), presentando una inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis; así como también se ha encontrado que inhibe la proliferación celular en cultivos de células tumorales HeLa (Mimaki *et al*, 1996). No obstante su actividad antitumoral, la hecogenina presenta una acción citotóxica y la falta de estudios en células no tumorales no ha permitido concluir si este esteroide presenta acción selectiva. Por ello, se ha generado un fuerte interés en la búsqueda de derivados de la hecogenina que presenten actividad antiproliferativa, inductora de apoptosis, sin generar citotoxicidad y con acción selectiva.

Por otro lado también existe un fuerte interés en el Se, debido a su actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis presente en algunos compuestos que contienen este elemento. Por ejemplo, recientemente se estudio que la nutrición complementada con Se puede reducir el riesgo de cáncer de tiroides, mientras que en individuos que no presentan cáncer él Se se encuentra en menores concentraciones (Fleites, 1999). También se sabe que él Se, actúa como antioxidante, y se ha relacionado con la reducción del cáncer gastrointestinal (Lugo, 2007). Sin embargo, los compuestos selenados han presentado una fuerte actividad citotóxica.

Con respecto al compuesto **diacetato de (25R)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano, 3 β , 16 β -diilo (SeCN-H)**, derivado de la hecogenina, el cual contiene selenio en su estructura; se encontró que el compuesto afecta el potencial proliferativo de las líneas celulares provenientes de cáncer cervical CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración el número celular decrece. De igual manera, se obtuvo que las CI_{50} obtenidas para las tres líneas celulares fue de aproximadamente de 60 $\mu\text{g/ml}$, resultados que coinciden con las CI_{50} reportadas para otros compuestos selenados (Fiala *et al*, 1998; Wael *et al*, 2008; Duffield-Lillico *et al*, 2004). Al igual que los compuestos selenados descritos en otros trabajos (Facompre *et al*, 2010; Wael *et al*, 2008), el SeCN-H también presentó una fuerte actividad citotóxica en células tumorales, implicando que éstas son inducidas a morir por necrosis. Sin embargo, a la misma concentración, en células linfocíticas normales no indujo muerte celular, sugiriendo que este compuesto tiene una acción citotóxica selectiva.

Por otro lado, al igual que la hecogenina, el efecto antiproliferativo del SeCN-H es independiente del ciclo celular (Corbiere *et al*, 2003; Liagre *et al*, 2007), sugiriendo que su acción podría actuar en células proliferantes como en no proliferantes y que la respuesta al compuesto dependerá de la sensibilidad de las células. Esto concuerda con el nulo efecto antiproliferativo observado en los linfocitos provenientes de sangre periférica humana así como en las células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano, implicando que la acción antiproliferativa independiente de ciclo inducida en las células tumorales es selectiva ya que en estas mismas condiciones no afecta a las células normales. Este resultado obtenido para el SeCN-H, el cual es un derivado de la hecogenina, sugiere que ésta podría presentar una actividad antiproliferativa de acción selectiva.

Con respecto a la actividad inductora de apoptosis el SeCN-H al igual que lo descrito para la hecogenina y los compuestos selenados (Facompre *et al*, 2010; Tapiero *et al*, 2003), indujo apoptosis en las tres líneas tumorales, incrementando la expresión de la caspasa 3 activa así como induciendo la fragmentación del DNA.

En hecho de que el SeCN-H induce muerte por necrosis así como apoptosis en las tres líneas tumorales, genera la necesidad de establecer cuál de estos dos tipos de muerte es la principal o si una es consecuencia de la otra, o si son dos eventos independientes así como el establecer por qué es necesario que una célula muera por estos tipos de muerte.

Por otro lado, el haber utilizado tres líneas de CaCu, de las cuales una es positiva al HPV16 (CaSki), otra al HPV 18 (HeLa) y una negativa al HPV (ViBo), genera la necesidad de establecer si el efecto del SeCN-H presenta alguna relación con este virus, de tal manera que el efecto antiproliferativo y apoptótico presente en el SeCN-H esté influenciado por la presencia o ausencia del HPV o por el subtipo de virus. De igual manera es necesario establecer si el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis es específico para estas líneas celulares o es independiente del tipo celular, lo que podría establecer si es posible aplicarlo para cualquier tipo de cáncer.

Los resultados obtenidos establecen que la actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis presente en el SeCN-H es selectiva ya que dichas actividades sólo se ejercieron en las tres líneas tumorales de CaCu sin afectar a las células no tumorales, sugiriendo que el SeCN-H podría ser un excelente candidato para evaluar su potencial terapéutico contra enfermedades como el cáncer.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del compuesto en más líneas celulares, tanto de CaCu como otros tipos de cáncer.
- Evaluar el efecto del compuesto SeCN-H en modelos *in vivo*.
- Evaluar la posible ruta a través de la cual ejerce su efecto.
- Evaluar en qué porcentaje se presenta la necrosis así como la apoptosis.

CONCLUSIONES

- ❖ El compuesto SeCN-H reduce la densidad celular en 50% a la concentración de 59 µg/ml para las células HeLa, mientras que para las células ViBo y CaSki es de 60 µg/ml.
- ❖ El SeCN-H presenta un efecto citotóxico para las líneas de CaCu HeLa y ViBo, pero no para CaSki y linfocitos.
- ❖ La progresión del ciclo celular no es afectada por la saponina esteroide SeCN-H.
- ❖ El incremento en la expresión de la caspasa 3 activa, en líneas celulares de cáncer cervical HeLa, CaSki y ViBo, así como la fragmentación de ADN, indica la activación de muerte por apoptosis.
- ❖ El SeCN-H a una concentración de 60 µg/ml no afecta la proliferación de células fibroblásticas no tumorales, provenientes de cérvix humano.
- ❖ El SeCN-H a una concentración de 60 µg/ml no afecta la proliferación de linfocitos humanos.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas K. Abul; 2002; Inmunología celular y molecular; NcGraw-Hill; Interamericana.
2. Adams D. P.; 2001; Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1471, M123-M133.
3. Alberts B., Bray D., Lewis J.; 2004; *Biología molecular de la célula*; Ediciones Omega.
4. Anaya L., 2003; *Ecología Química*, UNAM, Editorial Plaza y Valdés, México.
5. Arango P. M., Llanes F., Díaz R. y Elena F.; 1997; La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula; *Revista Cubana Oncología*; 13, 126-134.
6. Baynes J. M. y Dominiczak M. H.; 2008; *Bioquímica médica*; Editorial Elsevier. España.
7. Berhow A; 2007; Centro nacional de investigación de utilización agrícola; Peoria Illinois; *Carcinogénesis*; 26, 156-167.
8. 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 Urología*, 29, 846-859.
9. Caballero B., Morán A.; 2002; Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica; *Revista de educación bioquímica*; 21, 235-244.
10. Callen. J. C; 1999; *Biología celular de las moléculas de los organismos*; Ediciones Continental. México.
11. 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.
12. Corbiere C., Liagre B., Arnaud B.; 2003; Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells; *International journal of oncology*; 22; 899-905.
13. Corbiere C.; 2004; Induction of antiproliferative effect by disjoin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (aif) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells; *International journal of oncology* 14, 188-196.
14. Coto C.; 2007; Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. *Revista Química Viva*; 6, 9-17.

15. Cuello M., Kato S., Sadarangani A.; 2006; Muerte celular mediada por receptores: rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducida por el ligando "TRAIL" en cánceres ginecológicos; Boletín escuela de medicina U.C. de Chile; 31, 1-11.
16. Darlow B. A, Winterbourn C, Inder T.; 2000; The effect of selenium supplementation on outcome in very low birth weight infants: a randomized controlled trial. The New Zealand Neonatal Study Group. J Pediatric; 136, 473-480.
17. De Toro G.; 2006; Muerte celular programada revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular; *VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica*. Chile; 1,1-13.
18. Dolto G. Paolo; 2000; P21 WAF1/Ctp1, more than a break to the cell cycle?; *Biochimica et Biophysica Acta*; 141, M43-M56.
19. Doorbar J.; 2006; Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer; *Clinical Science*; 110, 525-541.
20. Duffield-Lillico A, Imad S., Scott M; 2004; Can Selenium prevent colorectal cancer? Assignpost from epidemiology; *Journal of the National Cancer Institute*; 96, 22.
21. Facompre N. D, Karam E.B., Yuan-Wan S., Jhon T. P.; 2010; 1,4-phenylenebis(methylene) selenocyanate, but not selenomethionine, inhibits androgen receptor and akt signaling in human prostate cancer cells; *Cancer Prevention Research*; 3,OF1-OF9.
22. Fernández H., M., A.; 2010; Síntesis de derivados esteroidales con actividad biológica: compuestos anticancerígenos y promotores del crecimiento vegetal; Tesis de maestría; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
23. Fernández-Herrera M., A, López-Muñoz H., José M. V. Hernández-Vázquez, López-Dávila M., Escobar-Sánchez M. L., Sánchez-Sánchez L., Pinto B., M., Sandoval-Ramirez J.; 2010; Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18, 2474–2484.
24. Fiala E. S., Marianne E., Gagan A., Karam B., 1998; Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation; *Carcinogenesis*; 19, 597-604.
25. Fichtner I., James C., Brendan G.; 2010; Antitumor activity of vanadocene y and its selenocyanate derivative in xenografted caki-1 tumors in mice; *Journal of organometallic chemistry*, 695, 1175-1181.
26. Fleites G. 1999; Dieta y cáncer del tiroides; *Revista. Cubana Oncología*; 15,119-130.

27. Franco E, L; Summary and discussion: epidemiology of HPV and anogenital neoplasms. En: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A. The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Oxford, UK: Oxford University Press 1992, 283-4.
28. García. A. S; Miguel. A. C; 2007; Compendio y atlas de lesiones del cuello uterino del VPH al cáncer cervicouterino; Ediciones. Intersistemas; México.
29. Goldwein W. J. & Vachani C.; 2006; Quimioterapia: Los Fundamentos; The Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania.
30. Guízar. V. J.; 2001; Genética clínica: diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias; Ediciones. El manual moderno. México.
31. Hernández M. 2005; Efecto del selenio en ratones con cáncer experimental inducido con sarcoma 180; Ciencia e investigación Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM; 8-2.
32. Hernández M., M. Ríos H.; 2009; Rol biológico del selenio en el humano; Revista Química viva, Buenos Aires Argentina; 8,64-79.
33. Hernández M. M. y Ríos M. A.; 1999; Oncogenes y Cáncer; Revista. Cubana Oncología; 15, 131-139.
34. Higuchi Y.; 2003; Chromosoma DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress; Biochemical Pharmacology; 66, 1527-1535.
35. INEGI. Consulta Interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 18 de enero del 2011 www.inegi.com
36. Jianbei Z., Lei X., Bioa Y., Jiarui W.; Apoptosis induced by a new member of saponin family is mediated through Caspase-8-dependent cleavage of Bcl-2; Molecular pharmacology; 68,1831-1838.
37. Jiménez G. L., Merchant L. H.; 2003; Biología celular y molecular; Pearson Educación México.
38. Karp. G; 2005; Biología celular y molecular conceptos y experimentos; McGraw-Hill Interamericana. México.
39. Kim T., U. Jung, D. Cho & A. Chung; 2001; Se-methylselenocysteine induce apoptosis through caspasa activation in HL-60 cells; Carcinogenesis; 22, 559-565.
40. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abram J., Alnemri ES., Baehrecke EH., Blagosklonny MV., El-Deiry WS., Golstein P., Green DR., Hengartner M., Knight RA., Kumar S., Lipton SA., Malorni W., Nuñez G., Piacentini M., Zhivotovsky B. & Melino G.; 2008; Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009; Cell Death and Differentiation; 1–9.
41. Lehninger A.; 1995; Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular; 2ª edición; Ediciones Omega.
42. Lewis, M. J.; 2004; Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe; Organización Panamericana de la Salud; Biblioteca Sede OPS, 1-40.

43. Liagre B., Pascale V., David Y.; 2007; Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigigenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2; *International journal of molecular medicine*; 20, 451-460.
44. Lodish H., Berk A., Zipursky S.; 2003; *Biología celular y molecular*; Ediciones Panamericana.
45. López D., M.; 2010; 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; Tesis de licenciatura; Universidad Nacional Autónoma de México.
46. López S. A., M. Lizano; 2006; Cáncer cérvico uterino y el virus del papiloma humano. La historia que no termina; *Cancerología*; 1, 31-55.
47. Lugo; 2007; Pueden las vitaminas y minerales prevenir el cáncer; *MIR 3 de Medicina Interna*. CH. Xeral.
48. Mano H., Tatsushi Y., Takumi; 2005; The combination of TRAIL and luteolin enhances apoptosis in cervical cancer Healy cells; *Biochemical and Biophysical Research Communicatons*; 333, 833-838.
49. Massagué J.; 2009; Evolución y metástasis del cáncer; *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*; 160, 22-25.
50. McLaughlin F., Paul F. & Nicolas B. La Thangue; 2003; The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age; *Drug discovery today*; 8, 793-802.
51. McMahan M., D. Woods; 2001; Regulation of the p53 pathway by Ras, the plot thickens; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1471, M63-M71.
52. Mimaki Y., Kanmoto T., Sashida Y., Nishino A.; 1996; Steroidal saponins from the underground parts of *Chlorophytum comosum* and their inhibitory activity on tumor-promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells; *Phytochemistry*; 41, 1405-1410.
53. Ming-Jie L., Zhao W., Youn J., Jiang-bing Z.; 2004; The mitotic-arresting and apoptosis-inducing effects of Diosgenyl saponins on human leukemia cell lines; *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 27, 1059-1065.
54. Mora del M. y M. Crespín, 1992. Conización del cuello uterino en patología cervical; *Revista Medica Hondureña*, 60.
55. Morgan, S. J. y D. C. Darling. 1993. *Cultivo de células animales*. Editorial. Acriba, España.
56. Munna I. A., Archana A., William R.; 1995; p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 92, 8493-8497.
57. Nelson. D. L; Michael. M; 2005; *Lehninger Principios de bioquímica*; Ed. Omega.

58. Paniagua. G. R, Nistal M.; 2007; Biología celular; McGraw-Hill Interamericana México.
59. Peralta O., Bahena M., Díaz C. & V. Madrid; 1997; Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas; Salud Pública México; 39, 451-452.
60. Pérez C. E.; 2010; Efecto antiproliferativo y apoptótico de la saponina (20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -colestano-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu) en células provenientes de cáncer cervicouterino; Tesis de licenciatura; Universidad Nacional Autónoma de México.
61. Quan H. J., Jyunichi K., Ken H.; 2006; Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with Various Nucleophiles and Pharmacological Activities of the Products; Chemical. Pharmaceutical Bulletin; 54, 72-79.
62. Quezada R. M.; 2007; El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias; Biología experimental, UAM-I; Contactos; 65,5-12.
63. Raff, M.; 1998; Cell suicide for beginners; Nature; 396, 119-122
64. Raju J., Ranjana P.; 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 letters, 255, 194-204.
65. Rao A. V. & Gurfinkel D. M.; 2000; The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides; Drug Metabolism and Drug Interactions, 17:211-35.
66. Reid M. E., Duffield-Lillico, Garland L.; 2002; Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial; Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention; 11, 1285-1291.
67. Robbins S., Kumar V. y Cotran R.; 1993; Patología Humana; Editorial McGraw Hill, México.
68. Rodilla F.; 2010.; Mecanismos de acción antitumoral; Boletín oncológico del área sanitaria de Teruel, 15.
69. Sánchez S.; 2001; Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica; Revista Cubana Investigación Biomédica.
70. Sánchez-Torres L. y Vargas F. D; 2003; Apoptosis: el fenómeno y su determinación; Téc Pecú; México; 41, 49-62.
71. Schafer K.; 1998; The Cell Cycle: A Review; Vet Pathol; 35,461-478.
72. Schmitt C. A., Fridman J. S., Yang M., Baranow E., Hoffman R. M. & Lowe S. W; 2002; Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. Cancer Cell; 1,289-91.
73. Sparg S.G., M.E. Light, J Van Staden; 2004; Biological activities and distribution of plant saponins; Journal of Ethnopharmacology; 94, 219-243.
74. Starr C., R. Taggart; 2007; Biología la unidad y la diversidad de la vida; Ediciones Thompson; México.

75. Soon O., E. Fiala, P. Upadhyaya, Y. Chae & Bayoumy; 1999; Comparative effects of phenylenebis (methylene) selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats; Carcinogenesis; 20, 615-621.
76. Takahashi M.; 1985; Citología del cáncer; Ediciones Panamericana.
77. Tapiero H., D. M. Townsend; 2003; The antioxidant role of selenium and seleno-compounds; Biomedicine & Pharmacotherapy 57, 134-144.
78. Tirado L., Mohar A., López M., García A., Franco F. & G. Borges. ;2005;. Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. Salud Pública México, 47, 342-350.
79. Trouillas P., C. Corbiere, B. Liagre; 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 related to diosgenin; Bioorganic & Medicinal Chemistry; 13, 1141-1149.
80. W. Kueng, E. Sliver, U. Eppenberger; 1989; Quantification of cells cultured on 96-well plates; Analytical biochemistry; 182, 16-19.
81. Wael M., Aboul-FAadl, J. Roberst; 2008; Murine hepatoma (Hepa1c1c7) cells: a responsive *in vitro* system for chemoprotective enzyme induction by organoselenium compounds; Toxicol *In Vitro*; 21-157-164.
82. Wayne M. B., Lewis J. K.; 2007; El mundo de la célula; Pearson; Educación. Madrid.
83. Wu J., Graham H., Robin D.; 2009; The effect of selenium, as selenomethionin, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay; Mutagenesis; 24, 225-232.
84. Zur Hausen H.; 2002; Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Reviews Cancer; 2, 342-350.

APÉNDICE

Composición del RPMI-1640 (Sigma Chemical Co.EUA).

Nitrato de calcio tetrahidratado	0.100000
Sulfato de magnesio anhídrido	0.048840
Cloruro de sodio	6000000
Fosfato dibásico de sodio anhidro	0.800000

Aminoácidos

L- arginina	0.200000
L-aspargina	0.050000
L-ácido aspárgico	0.200000
L-cisteina 2HCL	0.065200
L-ácido glutâmico	0.020000
L-glutamina	0.300000
Glicina	0.100000
L-histidina	0.015000
L-hidroxiprolina	0.020000
L-isoileucina	0.050000
L-leucina	0.050000
L-lisina HCL	0.040000
L-metionina	0.015000
L-fenilalanina	0.015000
L-prolina	0.020000
L-serina	0.030000
L-treonina	0.020000
L-triptofano	0.005000
L-tirosina	0.028830

L-valina	0.020000
<i>Vitaminas</i>	
D-biotina	0.000200
Cloruro de colina	0.003000
Ácido fólico	0.001000
Myo-inostil	0.035000
Niacinamida	0.001000
Ácido-p-Amino Benzoico	0.001000
Ácido – D- pantoténico	0.000250
Piridoxina HCL	0.001000
Riboflavina	0.000200
Tianoma HCL	0.001000
Vitamina B-12	0.000005

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

Los reactivos se disuelven en 800 ml. de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 M 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 U.S.A)
Cloruro de calcio	0.10 g (sigma chemical U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (sigma chemical U.S.A)
Cloruro de potasio	0.20 g (sigma chemical U.S.A)
Fosfato monoácido de sodio	2.16 g (sigma chemical U.S.A)
Fosfato diácido de potasio	0.20 g (sigma chemical 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 8 N 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 500 ml 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.

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, Se almacena a 4 °C.

Solución de ácido acético (10 %)

A 10 ml de ácido acético glacial (J. T. Baker) se le agrega 90 ml de agua bidestilada.

Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% de PBS, preparado al momento, para disolverlo se calentó la solución a temperatura no mayor a 60°C, si rebasa esta temperatura el paraformaldehído polimeriza y la solución no sirve para fijar.

Catalizador liofilizado

1 vial y solución colorante 45 ml.

Reconstituir el catalizador en 1 ml de H₂O mili Q estéril por 10 min y mezclar completamente. Esta solución es estable varias semanas a 4 °C.

Descongelar la solución colorante, ésta es estable a 4 °C varias semanas. Evitar ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Preparación de la mezcla de reacción (Bio Vision, California): Para 100 ensayos mezclar 250 µl de la solución del catalizador con 11.25 ml de la solución colorante. Esta mezcla deberá prepararse inmediatamente antes de ser utilizada.

Controles que se utilizan en la técnica de linfocitos con carboxifluoresceina.

Columna	CSFE	PHA	
1	-	-	Control negativo
2	-	+	Activados sin carboxifluoresceina
3	+	-	Sin activar con carboxifluoresceina
4	+	+	Activados con carboxifluoresceina
5	+		Tratamiento
6	+		Vehículo

Tabla 1. Condiciones del ensayo de linfocitos con carboxifluoresceina (CSFE) y fitohemaglutinina (PHA).