



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIÓLOGIA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA**

**“Efecto antiproliferativo y apoptótico del esteroide SeCN-D
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 :

Chávez Morales Martha Concepción.

Director de tesis:
M. en C. Luís 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.

Agradecimientos

A una persona muy especial que ya no está entre nosotros, pero que gracias a ella soy lo que soy, Consullo gracias por todo y por qué se que aún sigues conmigo.

A mis hijas Alondra y Alexia por que han aguantado mi ausencia y porque son mi inspiración y lo que me da fuerza para seguir cada día, cuando todo se nubla ustedes me iluminan mi vida, las amo.

A mi mamá, por su apoyo para cursar la carrera y por sus consejos, a mis hermanas Alejandra y Karina que a pesar de nuestras diferencias siempre han estado conmigo y me han dado su apoyo.

A mi esposo Ernesto, por que ha estado conmigo en cada momento de mi vida, apoyándome y soportándome, gracias por todo.

A mis amigos Sandra, Blanca, Miriam, Lorena, Dafne, Gina, José Luis, Leonardo, Edgar, Carmelo y Manuel, por escucharme y por estar allí cuando más los necesitaba y por supuesto por todos esos buenos y malos momentos que vivimos a lo largo de la carrera, gracias.

Al Doc. José Toscano López, por su amistad, consejos y apoyo, gracias por estar allí todo este tiempo.

Agradecimientos

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por darme la oportunidad de ingresar al laboratorio, por su apoyo, paciencia y enseñanzas ilimitadas que permitieron mi formación profesional.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por su gran paciencia y tolerancia para resolver mis dudas porque su enseñanza fue fundamental en mi aprendizaje.

Al M. en C. Hugo López Muñoz, por su gran conocimiento que me ayudo tanto en lo teórico como experimental

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

Al Biol. Moisés López Dávila, por su tolerancia para resolver dudas tanto técnicas como teóricas y por supuesto por si amistad.

A mis sinodales Dr. Benny Weiss Steyder, Dr. Raul Zavala Chavero y M. en C. Carlos Bautista por enriquecer este trabajo con sus comentarios y aportaciones.

Dr. Jesús Sandoval Ramírez y a la Dra. Ma. Antonieta Fernández Herrera, por proporcionar 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.	ABREVIATURAS	1
II.	Resumen	2
III.	Introducción	4
IV.	Marco Teórico	5
	A. Ciclo celular	5
	B. Muerte celular	7
	C. Apoptosis	7
	D. Fase de iniciación	8
	E. Fase de ejecución	8
	F. Caspasas	8
	G. Interrelación entre las vías	11
	H. Fase de eliminación	12
	I. Necrosis	13
	J. Cáncer	14
	K. Tipos de cáncer	16
	L. Metástasis	16
	M. Cáncer cervicouterino	17
	N. Factores de riesgo	20
	O. Virus del papiloma humano	21
	P. Infección del virus	21
	Q. Tratamientos	23
	R. Esteroides	24
	S. Saponinas	24
	T. Selenio (Se)	25
	U. (SeCN-D)	26
V.	Planteamiento del problema	28
VI.	Justificación	28
VII.	Hipótesis	28
VIII.	Objetivo general	29
IX.	Objetivos particulares	29
X.	Metodología	30
XI.	RESULTADOS	36
XII.	DISCUSION	48
XIII.	CONCLUSIONES	51
XIV.	REFERENCIAS	52
XV.	APÉNDICE	58

ABREVIATURAS USADAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
Apaf-1	(del inglés) Apoptosis protease-activating factor-1
Bax	(del inglés) Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	(del inglés) B cell leukemia 2
CaCu	cáncer cérvico-uterino
Cdk	(del inglés) Cyclin-dependent kinases
CIP	(del inglés) Cdk-interacting protein
DAPI	(del inglés) 4',6-diamidino-2-phenylindole
FACS	(del inglés) Fluorescence Activated Cell Sorting.
FADD	(del inglés) Fass-associated protein whit death domain
FasL	(del inglés) Fas Ligand
Fit-C	(del inglés) Fluorescein isothiocyanate
IAPs	(del inglés) inhibotors of apoptosis
IC ₅₀	(del inglés) inhibitor concentration (50%)
PBS	(del inglés) Phopate buphered saline
RPMI	(del inglés) Roswell park memorial institute
SFB	suero fetal bobino
Tdt	deoxinucleotidil transferasa
TNF	(del inglés) Tumor necrosis factor
TRAIL	(del inglés) TNF-related apoptosis-inducing ligand
VPH	virus del papiloma humano

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es la segunda neoplasia maligna más frecuente en la población femenina a nivel mundial. Se estima que causa alrededor de 500,000 muertes al año. En países en desarrollo, su incidencia es de 11 por cada 100,000 mujeres. En nuestro país es una de las principales causas de muerte, siendo el responsable de 4,500 decesos al año de mujeres en etapa reproductiva.

Pese a los beneficios de las terapias actualmente utilizadas para esta patología, éstas resultan ser ineficientes en pacientes con la enfermedad avanzada y en pacientes que presentan metástasis, además de dañar tanto a células tumorales como a células normales. Estas limitantes han generado la necesidad de buscar nuevas alternativas que ofrezcan mejores resultados al tratamiento de esta enfermedad. Actualmente existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal con actividad antitumoral y específicamente en las saponinas esteroidales y sus derivados, ya que presentan diversas actividades biológicas, destacando su actividad antiviral, antimicótica, antiinflamatoria y antitumoral. Sin duda, un ejemplo de estas saponinas es la diosgenina y sus derivados, que presentan estas características de forma muy precisa. No obstante el interés mostrado hacia estos fitoesteroides, también se ha puesto interés en algunos elementos químicos que igualmente han sido descritos con actividad antitumoral. Entre estos elementos químicos figura el selenio (Se), al cual se le ha reportado una fuerte actividad anticancerígena o quimiopreventiva. Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo del derivado de la diosgenina así como la actividad del selenio juntos, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis del compuesto SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo) en las líneas provenientes de cáncer cervicouterino (CaCu) CaSki, HeLa y ViBo. Al respecto, se obtuvo que el SeCN-D presenta una actividad antiproliferativa que afecta a las células tumorales de CaCu de manera dependiente de la concentración, induciendo un decremento del 50 % en el número celular (IC_{50}) a una concentración de 10.3 μ M para las células HeLa, 14.9 μ M para las células CaSki y 8.3 μ M para las células ViBo. Sin embargo, la detección de la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo, sugieren que las células tumorales son inducidas a morir por necrosis aunque también por apoptosis, esto se demostró por las pruebas de inmunolocalización de caspasa-3 y TUNEL. Sorprendentemente, en los sobrenadantes provenientes de cultivos de linfocitos humanos no tumorales, al ser tratados con 14.9 μ M de SeCN-D, no se detectó actividad de LDH, sugiriendo que la actividad antiproliferativa e inductora de muerte por necrosis es de acción selectiva. No obstante la actividad inductora de necrosis presente en el SeCN-D, el análisis de la distribución del ácido desoxirribonucleico (ADN) en cada una de las fases del ciclo celular, evaluado por citometría de flujo para cada una de las líneas tumorales, indica que el SeCN-D induce un decremento en el porcentaje de células CaSki que se encuentran en la fase G1 y G2/M y un incremento en la subG1, de igual forma que en la línea HeLa que disminuye en la G1 y aumenta en la región sub G, sugiriendo que el efecto se da en estas fases. Sin embargo, para el caso de la línea celular ViBo, no se observa diferencia alguna en los

valores de distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular, implicando que su efecto es independiente de éste.

Por otro lado, el incremento en la expresión de la caspasa 3 activa, así como la fragmentación del ADN inducida por el esteroide SeCN-D en las células CaSki, HeLa y ViBo, sugieren que el compuesto también 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 14.9 μ M del esteroide con la intención de determinar si el SeCN-D afecta el potencial proliferativo de células no tumorales. Al respecto se obtuvo que el SeCN-D afectó el potencial proliferativo de células linfocíticas en un 22.8 a 37.09 %, mientras que en células fibroblásticas del cérvix fue de 20 al 40 %, implicando que el SeCN-D inhibe la proliferación de células no tumorales en menor grado que en las células tumorales ya que éstas registraron un 50 % de decremento en el número celular a las mismas concentraciones de SeCN-D.

Los resultados obtenidos concluyen que el SeCN-D presenta una actividad antiproliferativa tanto en células tumorales como en no tumorales, cuya acción puede ser dependiente o independiente del ciclo celular. De igual manera, este derivado esteroidal induce a las células tumorales de cáncer cervicouterino a una muerte por necrosis y por apoptosis, afectando a las células no tumorales en menor grado. Las propiedades biológicas del SeCN-D hace de este compuesto un digno candidato, para ser evaluado como un agente con potencial anticancerígeno y terapéutico.

Introducción.

Los animales y plantas están conformados por un conjunto de unidades llamadas células. La célula es considerada como la unidad fundamental tanto estructural como de funcionamiento en los seres vivos. Es decir, la célula es la entidad más pequeña que reúne el conjunto de propiedades que se pueden asociar con la materia viviente. Dicho de otra manera, la célula tiene la capacidad de nutrirse, de aprovechar sustancias extrañas y de transformarlas realizando la síntesis de su propio citoplasma, además es capaz de reproducirse para asegurar la supervivencia de la especie (Alberts *et al*, 2004). Cada célula a su vez fue producida por una célula progenitora de características muy similares (Mercer, 1966).

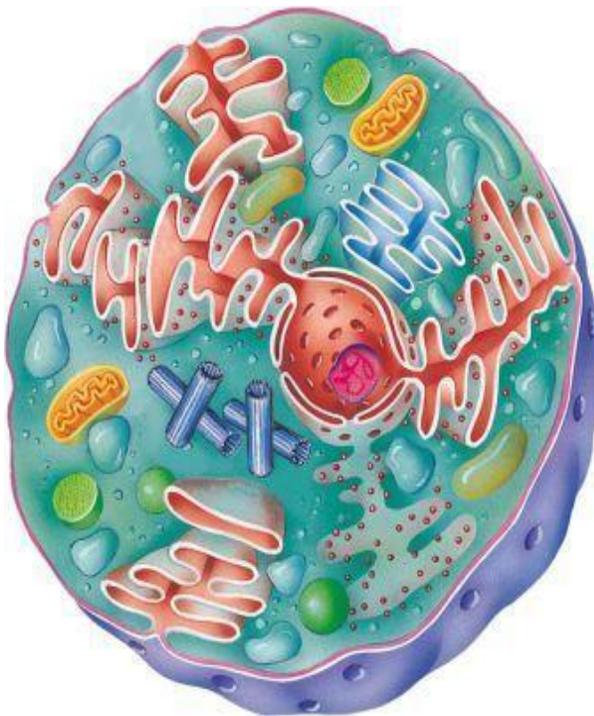


Fig.1 Célula animal. Imagen tomada de:
www.dialogica.com

El organismo humano presenta la capacidad de lograr una marcada estabilidad para mantener el medio interno. Este control depende de una óptima regulación en la proliferación de las diferentes poblaciones celulares que tienen lugar en sus tejidos y órganos. La mayoría de los órganos necesitan mantener su tamaño para desempeñar una función específica. Sólo una coordinada maquinaria reguladora, donde interviene un gran número de factores, puede mantener el equilibrio necesario entre los procesos que entrañan la proliferación de las poblaciones celulares, definido como el incremento del número de células resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte celular. (Sánchez, 2001).

Marco Teorico.

Ciclo Celular.

El ciclo celular es el conjunto de eventos necesarios para la división de una célula; es decir, la proliferación celular propiamente dicha. La importancia de este proceso la vemos, por ejemplo, en el cuerpo humano, donde se regeneran constantemente los epitelios (como los de cavidades intestinales), así como células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos); e incluso algunas células pueden accionar su ciclo celular como mecanismo de defensa (los hepatocitos en la regeneración del hígado); todo ello para mantener no sólo la integridad sino también las funciones biológicas adecuadas del organismo frente a las condiciones que le impone el ambiente (Quezada,2007).

El ciclo celular está dividido en cuatro fases consecutivas: la fase M corresponde a la mitosis y las fases G1, S y G2 constituyen el tiempo biosintéticamente activo de la interfase (Avers, 1991). El tránsito por estas cuatro fases del ciclo celular está mediado por una red de interacción de proteínas altamente compleja y finamente regulada. De entre estas proteínas se destacan las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas 1, 2, 4 y 6 y sus subunidades activadoras las ciclinas A, B, D y E (Quezada, 2007).

Para que el ciclo celular de una célula se ponga en marcha es necesaria la presencia de un estímulo que la célula sea capaz de interpretar a través de sus receptores para así poder encender la maquinaria molecular del ciclo celular. A este proceso se le conoce como transducción de señales y es mediado por complejos proteicos de funciones específicas denominados transducisomas. Aquellas proteínas que constituyen el estímulo o señal extracelular que le indica a una célula que entre en proliferación, son conocidas como factores de crecimiento. Estos factores son producidos naturalmente por el organismo y en ocasiones su actividad no sólo se limita a inducir la proliferación, sino también la diferenciación celular. Para ejercer sus efectos requieren que la célula blanco exprese los receptores de membrana específicos para cada uno de ellos. Una vez que el ligando (factor de crecimiento) se une a su receptor de membrana le produce a éste un cambio conformacional que se traduce comúnmente en una actividad enzimática sobre otras proteínas que forman parte de la vía de señalización en la célula. En las vías de señalización para factores de crecimiento se ha encontrado que las reacciones predominantes son las fosforilaciones (Quezada, 2007).

En la fase G1 (G: gap o intervalo) la producción de ciclina D promueve el inicio del recorrido por las fases del ciclo celular. Al formar un complejo con la CDK adecuada (4 o 6) se activa la acción cinasa de esta última cuyo sustrato principal es la proteína Rb, la cual es una proteína supresora de tumor que en su forma hipofosforilada bloquea a los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3, que son esenciales para la expresión de genes que le darán continuidad al ciclo celular (Quezada, 2007).

La fosforilación parcial de Rb por el complejo ciclina D/CDK deja en libertad a los E2Fs, los cuales tienen la capacidad de reemplazar al complejo represor p107/E2F4 de sus promotores blanco en etapa G1 temprana. Esta acción desemboca en la activación transcripcional de la ciclina E y la fosfatasa cdc25A. Los E2Fs activantes promueven también la expresión de ciclina A, ciclina B y proteínas de la maquinaria de replicación (como cdc6 y orc1) en la misma transición G1/S. La formación del complejo ciclina A/CDK2 permite activar parte de la maquinaria para iniciar la replicación y el bloqueo de los E2Fs activantes, de este modo se inhibe la producción de proteínas que intervienen en la progresión de la etapa S, asegurando que se sinteticen solo las necesarias. Por su parte la fase S (síntesis) consiste en la replicación del DNA para heredar a cada célula hija la misma carga genética (Quezada, 2007).

G2 implica una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. La fase G2 del ciclo celular es el lapso entre el fin de la replicación (fase S) y el inicio de la fase M. Al igual que en G1 la célula aumenta en tamaño y duplica sus organelos citosólicos. Por su parte la fase M o de división celular comprende la división nuclear (mitosis) y la división citoplásmica (citocinesis) siendo esta última la etapa final del ciclo celular (Alberts, 2004). El actor principal de esta transición es el complejo ciclina B/CDK1, llamado factor promotor de la fase M o MPF por sus siglas en inglés (M-promotingfactor). El MPF es activado por la cinasa Polo y translocado al núcleo en pro-metafase coincidiendo con la desintegración de la membrana nuclear, por lo cual se ha sugerido que uno de sus trabajos es fosforilar a las proteínas de la lámina nuclear, un paso fundamental para que el núcleo se disocie en vesículas y deje libres a los cromosomas (Quezada, 2007).

La ciclina A, que puede formar un complejo con CDK1, también fosforila a proteínas de la membrana nuclear además de estabilizar a la ciclina B. La citocinesis ocurre sólo después de que se hubo terminado la mitosis, pues ambos procesos están vinculados espacial y molecularmente de una manera altamente precisa y no menos compleja. Un punto de control entre ambos procesos está a nivel de la ciclina B. Se ha observado que la introducción de la ciclina B que no puede ser degradada por carecer de la secuencia de reconocimiento por el complejo APC (anaphase-promoting complex), arresta a las células en anafase y no se procede a la citocinesis (la formación de dos células hijas). Así, el final de la citocinesis marca el final de un ciclo celular (Quezada, 2007).

La duración completa de este ciclo varía con el tipo de célula de que se trate y de las condiciones del medio en el que se encuentre. Cuando la célula no está en actividad proliferante se dice que ha salido del ciclo celular y se encuentra en estado de quiescencia o G0, un ejemplo clásico de estas células son las neuronas (Quezada, 2007).

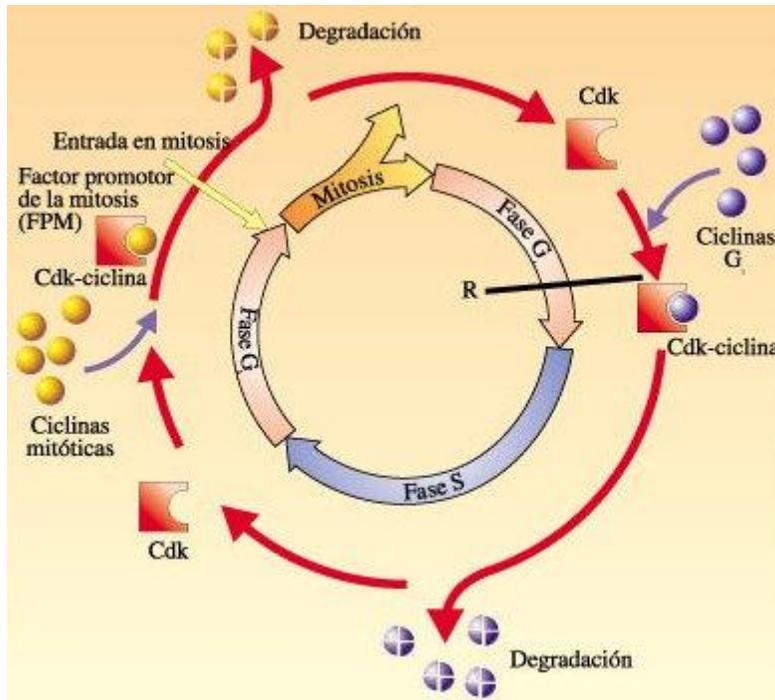


Fig. 2 Ciclo celular. Imagen tomada de <http://www.fisicanet.com>

Durante las fases del ciclo celular ocurren errores en el ADN, los cuales pueden ser reparables o irreparables. Cuando son irreparables se enciende un mecanismo de muerte celular programada, llamada apoptosis (Arango *et al*, 1997).

Muerte Celular.

Durante el desarrollo y también en estado adulto, hay numerosas células que degeneran y mueren. La muerte celular es un proceso fisiológico y patológico que conduce a la eliminación celular y que tiene una función esencial en la homeostasis de los tejidos y en los estados patológicos. La muerte celular puede ocurrir por apoptosis.

Apoptosis.

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica. El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Sánchez-Torres, 2003).

1.-Fase de iniciación.

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. La primera es la vía intrínseca que es cuando ocurre un daño en la mitocondria, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación del citocromo C de ésta, mientras que algunas de las señales extracelulares o vía extrínseca desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco. La naturaleza de los inductores pueden ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (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 encuentran en diferente etapa de desarrollo (Sánchez-Torres, 2003).

2.-Fase de ejecución.

La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). En etapas posteriores la cromatina se condensa y se adhiere a la membrana interna de la célula y se fragmenta. Finalmente la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos (Sánchez-Torres, 2003).

A nivel bioquímico, cuando una señal de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula durante la apoptosis. Esta maquinaria básica la constituyen principalmente las caspasas. Tanto la apoptosis inducida por vía intrínseca como extrínseca provoca la activación de estas enzimas. La, o las caspasas que se activan durante la muerte apoptótica, dependen del estímulo pudiendo convergir en las caspasas que intervienen al final de la cascada de señalización (Sánchez-Torres, 2003).

CASPASAS

Las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisteína que muestran entre sí similitud en la secuencia de aminoácidos, en estructura y especificidad, sus sustratos deben contener una molécula de ácido aspártico y requiere del reconocimiento de al menos otros cuatro aminoácidos en el sitio de ruptura. Su actividad enzimática lleva a cabo una ruptura coordinada y dirigida que previene la digestión indiscriminada de proteínas. Algunas caspasas pueden ser sustrato de otras, así como de sí mismas vía auto procesamiento. Las caspasas son

sintetizadas como zimógenos, por lo que requieren de un procesamiento proteolítico para volverse activas. Los precursores de las caspasas están constitutivamente expresados en las células vivas y su actividad está regulada por una combinación de proteasas reguladoras, cofactores, umbrales y mecanismos de retroalimentación (Sánchez-Torres, 2003).

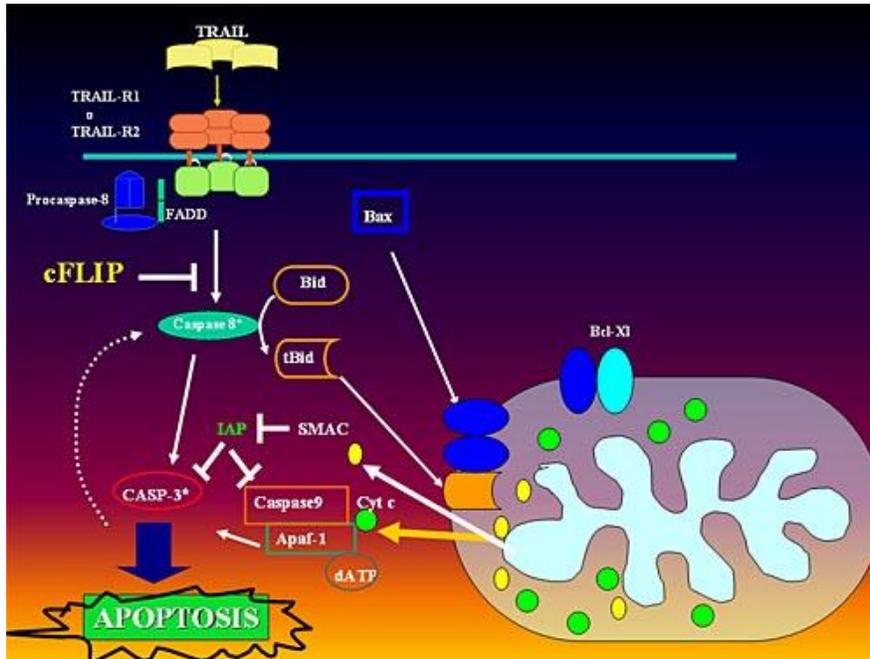


Fig. 3 Activación de las caspasas para efectuar la apoptosis. Imagen tomada de: http://www.cabimer.es/es/docs/imgs/31_02s.jpg

En su forma inactiva las caspasas constan de tres dominios, un predominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que da lugar a una subunidad enzimática pequeña (p10). La enzima madura es un heterodímero que contiene dos heterodímeros p20/p10, por lo que la forma activa cuenta con dos sitios activos independientes. 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 de ADN y de las encargadas de la organización del citoesqueleto, en la activación de CAD (caspase activated Dnase) e induce a la célula a expresar señales que las marcan para ser fagocitadas. Uno de los eventos moleculares que ha sido tomado como sello característico de la apoptosis es la fragmentación del ADN. El material genético es fragmentado inicialmente en pedazos de 50 a 300 kDa (kilo Dalton) y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pb (pares de bases) y múltiplos de ellos (Sánchez-Torres, 2003).

Se han descrito de manera general dos cascadas o vías de inducción de apoptosis, las cuales pueden unirse en un componente común, la caspasa 3 (Sánchez-Torres, 2003).

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal pro-apoptótica que se desencadena por la unión de Fas o CD95 con su ligando FasL (CD95L) y es necesaria una trimerización para la trasducción de la señal apoptótica. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC (death inducing signaling complex) al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la procaspasa-8 favoreciendo su auto activación, la caspasa-8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3,6 y 7. Además de lo antes citado, la caspasa-8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C y apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Sánchez-Torres, 2003).

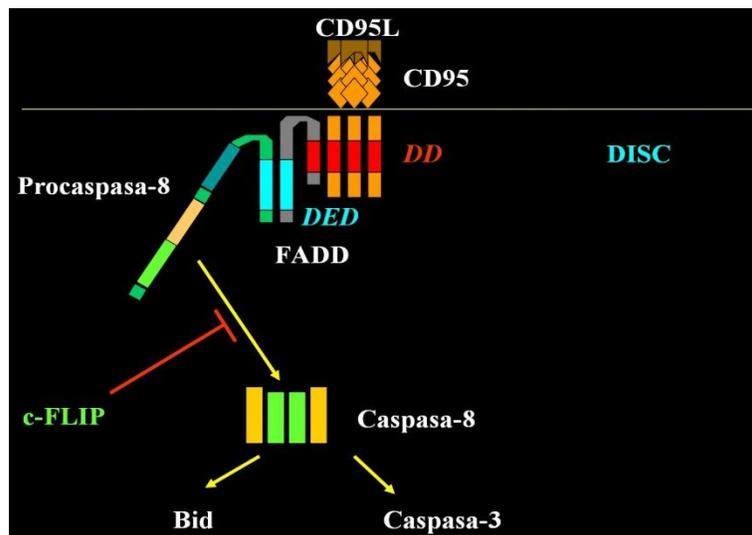


Fig. 4 Vía extrínseca de la apoptosis. Imagen tomada de Arango, 1997.

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros pro-apoptóticos 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 membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. 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, el cual recluta y activa a la pro-caspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3,6 y 7 (Sánchez-Torres, 2003).

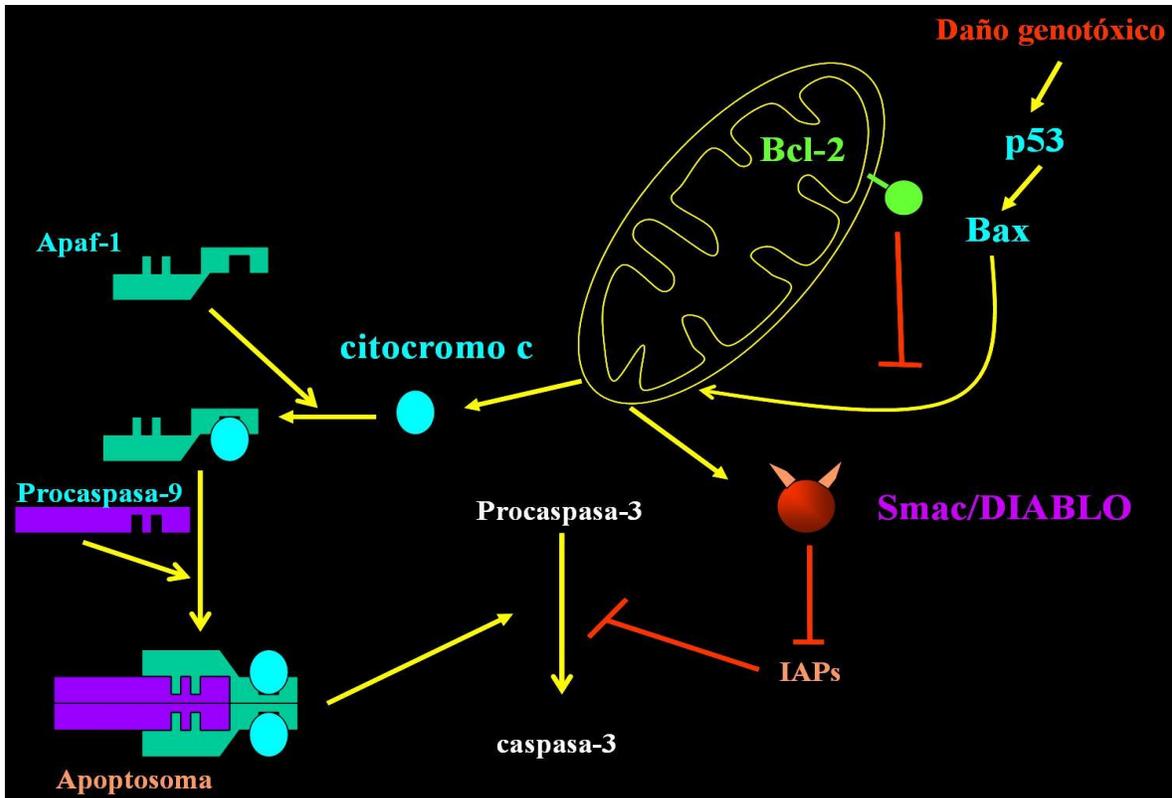


Fig. 5 Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2 Imagen tomada de: Arango, 1997.

INTERRELACIÓN ENTRE LAS VÍAS

La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El acoplamiento y la integración de las dos vías se deben a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid incrementando enormemente su actividad proapoptótica que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c (Arango y LLanes, 1997).

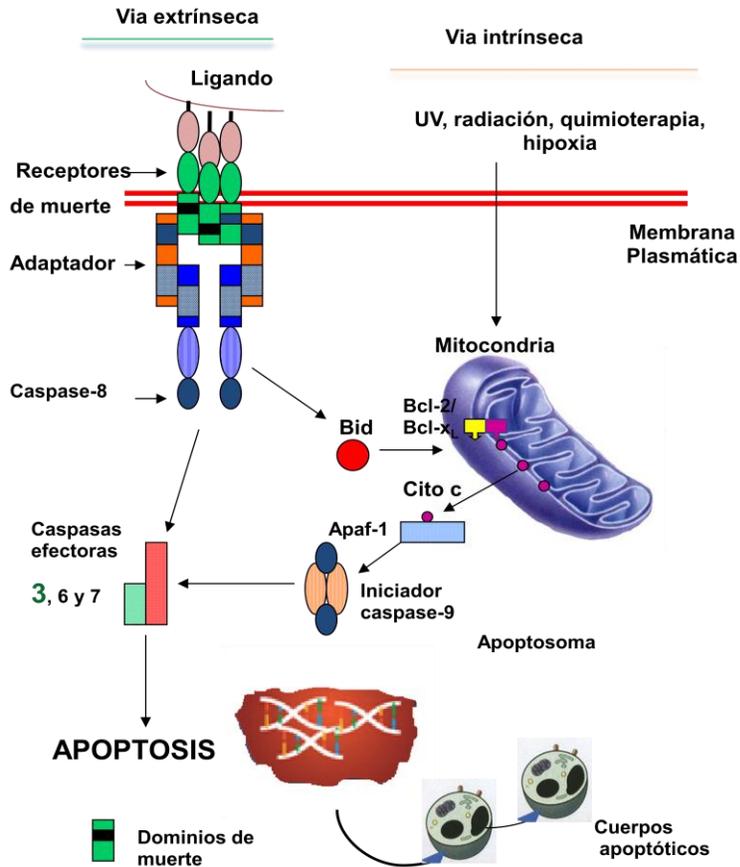


Fig. 6 Vías, extrínseca e intrínseca de la muerte por apoptosis (Imagen tomada y modificada de Gupta *et al.*, 2006)

3.-FASE DE ELIMINACION

Aunque la muerte celular ocurre de manera constante en un organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara vez vistas *in situ* debido a que son rápida y eficientemente removidas por células fagocíticas. Este hecho diferencia a la apoptosis de la necrosis, ya que en ésta última, hay liberación de contenido citoplasmático, lo que desencadena un proceso inflamatorio. Los responsables de retirar la mayoría de las células apoptóticas son los fagocitos profesionales, pero también células dendríticas, epiteliales y fibroblastos participan en la remoción de células apoptóticas. (Sánchez-Torres, 2003).

Dentro del contexto de muerte celular encontramos otro tipo de muerte llamada necrosis.

Necrosis.

Podríamos definir necrosis celular como el conjunto de alteraciones morfológicas que suceden después de la muerte celular, en la cual no hay un gasto de energía por ATP. La necrosis celular suele ser provocada por una agresión que afecta externamente a la célula (frío, calor o isquemia). Está directamente asociada a la pérdida temprana de la integridad de las membranas, lo que provoca la salida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular (Sánchez, 2001).

La necrosis provoca la aparición de los siguientes cambios intracelulares: picnosis (condensación del núcleo), cariolisis (disolución de la cromatina), cromatolisis (disolución de los cromosomas), cariorexis (fragmentación de la cromatina). Estos cambios van apareciendo a lo largo del tiempo, y nos permiten diferenciar las células que van a morir (o ya están muertas) de las que todavía están sanas, al final sufren autólisis, con la liberación de enzimas, y desencadenan así una reacción inflamatoria que atrae leucocitos y proteínas plasmáticas. Finalmente tiene lugar la degradación de las células muertas (Sánchez, 2001).

La muerte por necrosis se lleva a cabo en dos etapas:

1. Lisis

Incluye todos los cambios que dependen de alteraciones en los componentes celulares, proceso que ocurre con un patrón morfológico en cierta medida característico y que consiste en cambios en el núcleo (disolución progresiva de la cromatina o cariólisis); cambios en el citoplasma (pérdida de la basofilia por esparcimiento de las ribonucleoproteínas); aspecto homogéneo del citoplasma (por pérdida de los compartimientos celulares); tumefacción de las mitocondrias y la alteración de las células vecinas (Sánchez, 2001).

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

Todos estos cambios condenan a la célula a perder su función específica, y solamente forman parte de restos celulares que serán fagocitados por los macrófagos reclutados por el sistema inmune para resolver un problema inflamatorio (Sánchez, 2001).

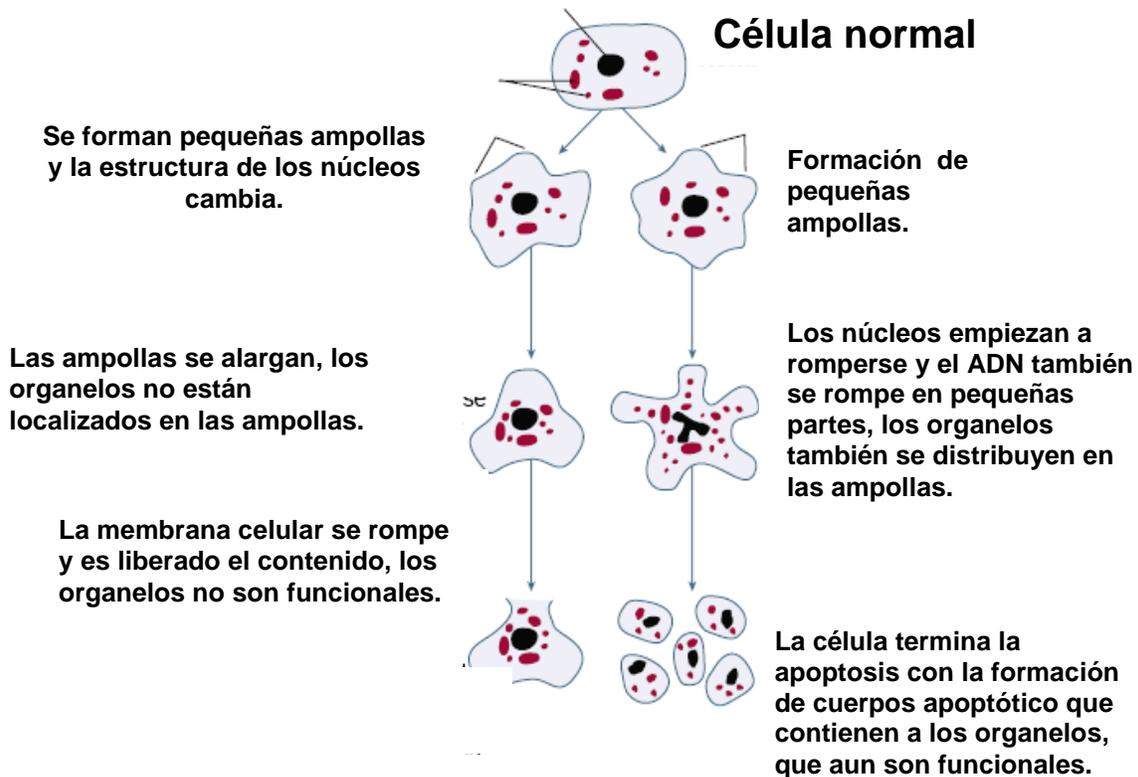


Figura 8. Diferencias entre necrosis y apoptosis. Imagen tomada de: Namji and Hiller, 1997.

Cuando una célula pierde el control en su reproducción y no sigue las señalizaciones de muerte, se multiplica de forma incontrolada, a este proceso se le llama cáncer.

Cáncer.

El cáncer se origina cuando las células normales se transforman en malignas, pierden su capacidad de diferenciación y adquieren la capacidad de multiplicarse descontroladamente e invadir tejidos y otros órganos. Este proceso se denomina carcinogénesis. Este proceso se da por fases (Hanahan, 2002).

La primera fase comienza cuando agentes mutagénicos actúan sobre la célula alterando su material genético (mutación). Una primera mutación no es suficiente para que se genere un cáncer, pero es el inicio del proceso. La condición indispensable es que la célula alterada sea capaz de dividirse. Como resultado, las células dañadas comienzan a multiplicarse a una velocidad ligeramente superior a la normal, transmitiendo a sus descendientes la mutación. A esto se le llama fase de iniciación tumoral y las células involucradas en esta fase se llaman

células iniciadas. La alteración producida es irreversible, pero insuficiente para desarrollar el cáncer (Hanahan, 2002).

Si sobre las células iniciadas actúan de nuevo y de forma repetida, los agentes carcinógenos, la multiplicación celular comienza a ser más rápida y la probabilidad de que se produzcan nuevas mutaciones aumenta. A esto se le llama fase de promoción y las células involucradas en esta fase se denominan células promocionadas (Hanahan, 2002).

Por último, las células iniciadas y promocionadas sufren nuevas mutaciones. Cada vez se hacen más anómalas en su crecimiento y comportamiento. Adquieren la capacidad de invasión, tanto a nivel local infiltrando los tejidos de alrededor, como a distancia, originando las metástasis. Es la fase de progresión (Hanahan, 2002).

Para que se produzca un cáncer es necesario que de forma acumulativa y continuada se produzcan alteraciones celulares durante un largo periodo de tiempo, generalmente años (Hanahan, 2002).

Como resultado aumenta el número celular, presentan alteraciones de forma, tamaño y función y poseen la capacidad de invadir otras partes del organismo (Hanahan, 2002).

En la actualidad se ha observado que el cáncer es una enfermedad, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los protooncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células (Arango, 1997).

Además del papel que juega la apoptosis en el origen del cáncer, su modulación también pudiera influir en el tratamiento de esta enfermedad (Arango, 1997).

Como resultado de todas estas alteraciones genéticas una célula neoplásica o cancerosa presenta características muy específicas y diferentes a una célula sana, como son:

Hipercromasía. Afinidad exagerada de la cromatina nuclear a los colorantes que la hacen resaltar extraordinariamente.

Cariorexis. Ruptura de la cromatina nuclear en prominentes acúmulos o en pequeños grumos y en barras.

Condensación en los bordes del núcleo de la cromatina hípercoloreada, que hacen más evidentes las irregularidades nucleares. Este signo es sumamente decisivo para que una célula reúna cualidades morfológicas de clase V de malignidad.

Discariosis marcadas, que dan al núcleo aberraciones en su aspecto y tamaño (Anisocitosis).

Mitosis. Una de las características cancerosas son las numerosas mitosis, muchas de las cuales son anormales (mitosis atípicas).

Variación de la relación núcleo-citoplasma. Disminuyendo el citoplasma con aumento de tamaño del núcleo. Característica muy notable en el carcinoma in-situ.

Cambios morfológicos del citoplasma (Cardona, 1968).

Tipos de Cáncer.

El cáncer se clasifica de acuerdo con el tejido y el tipo de célula a partir de la cual se originan (Alberts *et al*, 2002).

Leucemias y linfomas.

Son los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas, producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras (Pardo, 2008).

Sarcomas.

Se encuentran en el tejido conectivo tales como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculo y tejido adiposo (Pardo, 2008).

Carcinoma.

Se producen en tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de mama y próstata (Pardo, 2008).

Metástasis.

La metástasis es la propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. Ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática. En la vía sanguínea sucede cuando las células del tumor primario atraviesan la lámina basal y migran a través del tejido conjuntivo y alcanzan la circulación sanguínea (Alberts *et al* 2004).

Mientras que por la vía linfática las células neoplásicas lo hacen a través de la permeación vascular, que corresponde al paso de las células a la porción luminal de los vasos, la circulación normal de la linfa llega a los ganglios linfáticos regionales, posteriormente a los locales y finalmente pasa a la circulación general. (Pichardo-Bahena, 2001).

El proceso de metástasis en cáncer

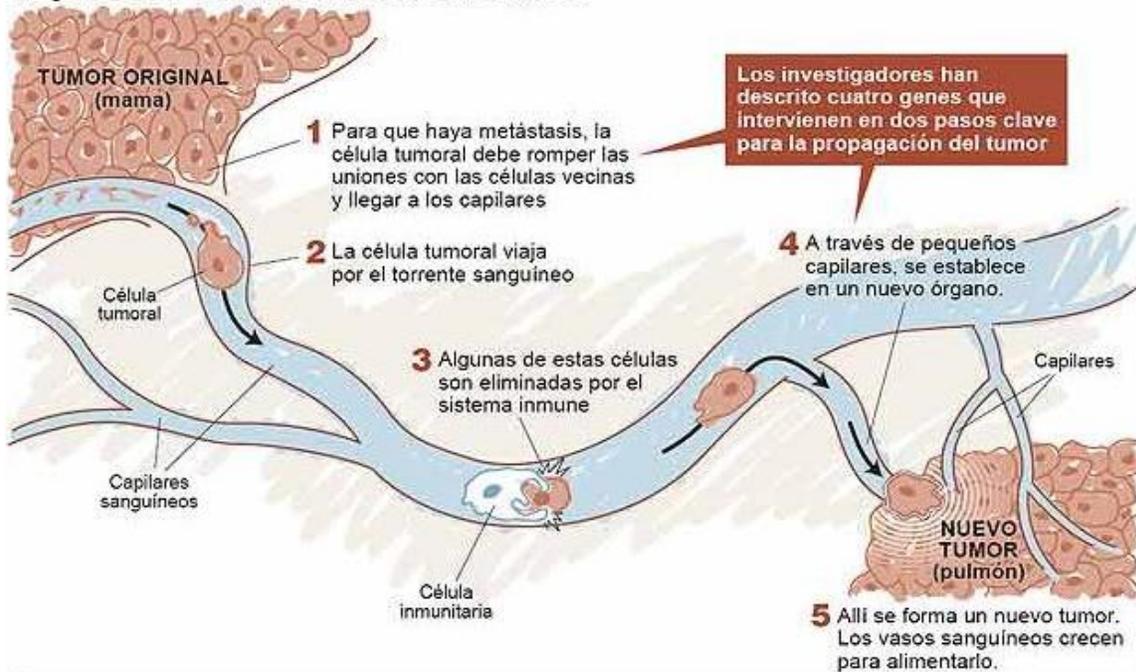


Fig. 5 Etapas en el proceso de apoptosis. Este ejemplo ilustra la expansión de un tumor desde un órgano como el de mama hasta el pulmón. Imagen tomada de: www.loshinojosos.wordpress.com.

La entrada de las células a la sangre o a los vasos linfáticos se llama intravasación, lo que las lleva a los sitios más remotos del organismo, después escapan de la microvasculatura, a lo cual se le llama extravasación, para llegar a un tejido diana y empieza a invadirlo para formar un tumor secundario, en un lugar muy lejano al primario. Se cree que en el proceso de extravasación es donde se da la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales (Fitzgerald, 2006).

Cáncer Cervicouterino.

El cáncer cervicouterino es una tumoración maligna que se presenta en el cuello del útero

El útero es un órgano de gran importancia en la mujer, por ofrecer al óvulo fecundado el sitio ideal para su anidación, desarrollo embrionario y fetal, cuando llega el momento del parto, ejerce un papel eminentemente dinámico para desalojar al producto, y es cuando el útero puede sufrir traumatismos de mayor o menor intensidad, cuando esto sucede estos desgarros provocados en el cuello uterino, generalmente asientan lesiones, que posteriormente evolucionan a un carcinoma. También es un órgano que está sujeto a la acción cíclica hormonal de la mujer, sobre todo en lo que se refiere a sus epitelios, en donde se reflejan diversas condiciones del medio interno y factores exógenos, que van desde las infecciones bacterianas, de virus y parasitarias del medio vaginal, hasta irritaciones producidas por cuerpos extraños que ejercen sus influencias en sus

epitelios y con predilección en la zona transicional. Es quizá por todos estos factores que es el cuello uterino el sitio de mayor incidencia de cáncer en la mujer (Cardona, 1968).

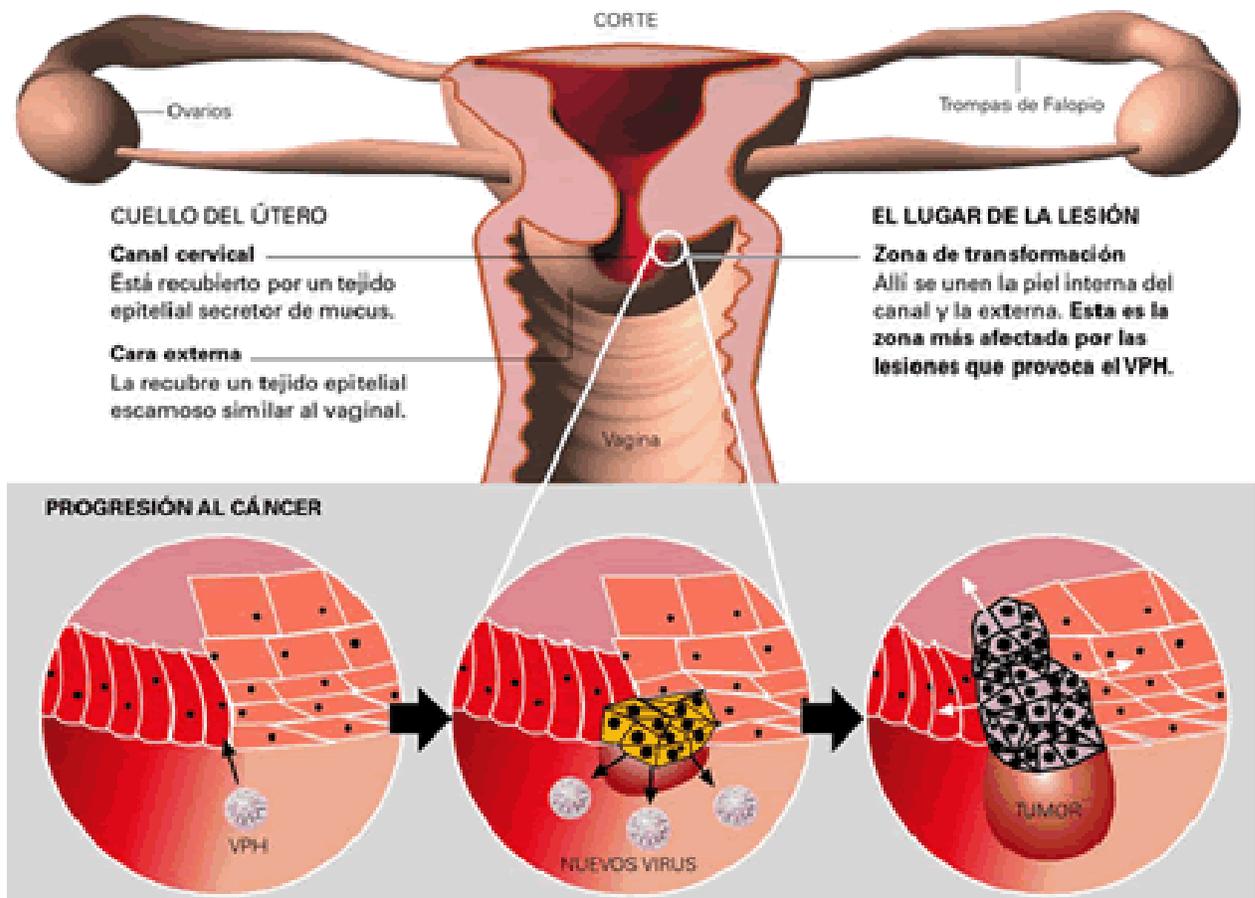


Fig. 9 Infección del VPH y progresión a cáncer. Imagen tomada de: http://www.msd.com.ar/images/content/press/hpv_not01_im01.gif

El cáncer cervicouterino se divide en cuatro estadios (Alemán, 2007):

Estadio I: El cáncer se encuentra solamente en el cuello uterino.

Estadio II: El cáncer se ha extendido del cuello uterino hacia la parte superior de la vagina o al tejido alrededor del útero. No se ha extendido a las paredes de la pelvis. (Las paredes de la pelvis están constituidas por el tejido muscular y el tejido conjuntivo que revisten el interior del hueso ilíaco.)

Estadio III: El cáncer se ha extendido a la parte inferior de la vagina o a las paredes de la pelvis. Podría bloquear el flujo de orina a la vejiga. Las células cancerosas también podrían encontrarse en los ganglios linfáticos en la pelvis.

Estadio IV: El cáncer se ha extendido a otros órganos dentro o fuera de la pelvis. Podría haber células cancerosas en la vejiga, el recto, el abdomen, el hígado, los intestinos o los pulmones.

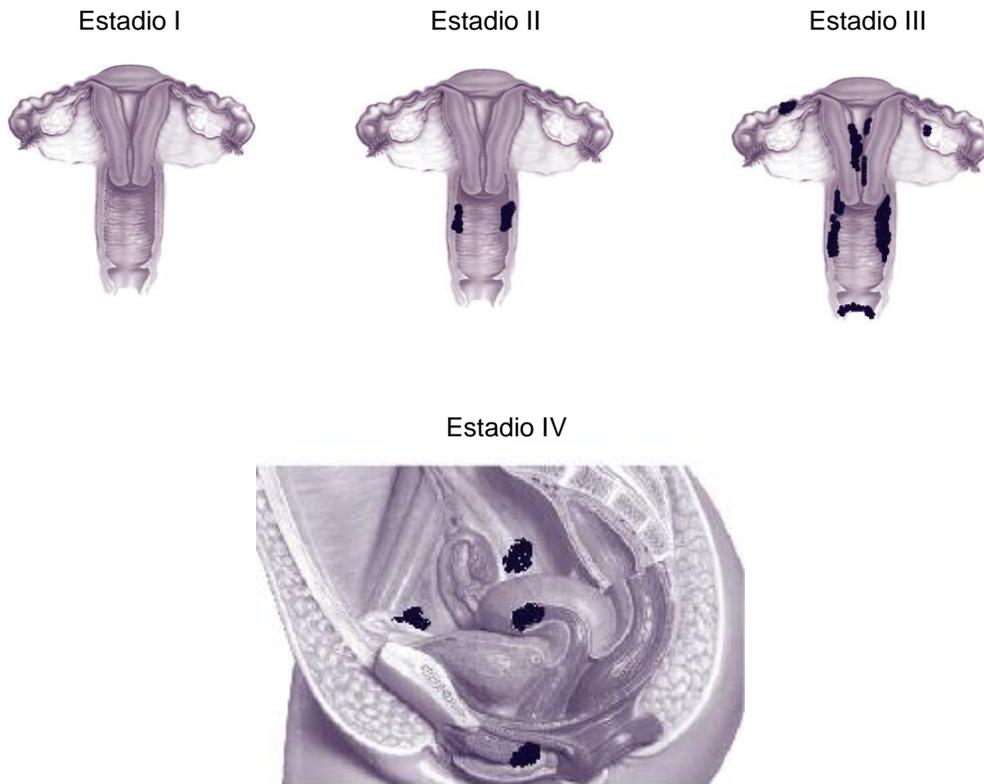


Fig.10 Estadios del cáncer. Imagen tomada de: Alemán, 2007.

En el caso particular del cáncer cervicouterino, éste representa el segundo lugar en incidencia en mujeres por cáncer a nivel mundial y el segundo a nivel nacional (Fuente: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, INEGI 2008 y Secretaria de Salud 2002).

A nivel mundial se presentan cerca de medio millón de nuevos casos estimados anualmente y 274,000 muertes en el año 2002. La gran mayoría (83 %) de estos casos ocurren en los países en desarrollo, con la más alta incidencia en África sub sahariana, América Latina, el Caribe y parte de Asia (con tasas que pueden superar los 50 por cada 100,000). Las tasas de incidencia más bajas se observan en Europa, Norteamérica y Japón. Del mismo modo varían las tasas de sobrevivencia, siendo entre 63 -73 % a 5 años en USA y Europa y sólo de 30.5 % a 5 años en Zimbawe (Lewis, 2004).

Dado que esta enfermedad afecta mujeres relativamente jóvenes, es una causa muy importante de años de vida perdidos en países en desarrollo. Se ha estimado que en el año 2000 el cáncer cervicouterino fue responsable de 2.7 millones de años de vida perdidos en todo el mundo y que fue la principal causa de pérdida de años por cáncer en el mundo en desarrollo (Lewis, 2004).

Hoy en día, el cáncer cervicouterino sigue siendo una causa preponderante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial, aunque es la neoplasia con el mayor potencial de prevención secundaria. Esta enfermedad es totalmente prevenible y

curable, a bajo costo y con un bajo riesgo, cuando se cuenta con métodos para tamizaje en mujeres sintomáticas, junto con un diagnóstico, tratamiento y seguimiento apropiados. No obstante, los programas de prevención en América Latina y el Caribe han tenido poco o ningún éxito (Lewis, 2004).

Particularmente en México, el CaCu es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas causando anualmente la muerte prematura de 4,500 mujeres aproximadamente, muchas de ellas en edad reproductiva. (Fuente: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática INEGI 2008, Secretaria de Salud 2002).

Para el año 2002 se presentaron 12,512 nuevos casos de los cuales 5,777 el 46 % fueron decesos. Casi todos (99.8 %) los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de un virus ADN tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH) (Saavedra, 2006).

En México, donde ha estado en marcha un programa de tamizaje durante más de 20 años, se han evitado menos de 13 por ciento de los casos potencialmente prevenibles (Lewis, 2004).

Factores de Riesgo.

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCu sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente (Abarca, 2007).

Promiscuidad, hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH, actividad sexual a temprana edad, tabaquismo, tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente, pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene, el uso prolongado de anticonceptivos orales, esto es porque la región larga de control (LCR) en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al ADN viral. Multiparidad, A mayor número de partos mayor es la posibilidad de contraer la enfermedad debido a que en cada parto la zona del cuello puede sufrir desgarres por los cuales puede entrar el virus del VPH (Saavedra, 2006).

Virus del Papiloma Humano.

Los virus del papiloma son un género de virus agrupados juntos por su tumorigenicidad y homogeneidad de ADN, que afectan a vertebrados. Actualmente se conocen más de 100 tipos de VPH (Doorbar, 2006), siendo comunes las infecciones de piel y de mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital (Serman, 2002).

El rol del virus papiloma humano como agente causal del CaCu ha sido firmemente establecido, encontrándose ADN de este virus en 99,7% de muestras tumorales de mujeres de distintas zonas del mundo. Asimismo, se ha comprobado la participación de los genes de VPH denominados E6 y E7 en el proceso de la oncogénesis. Ocho tipos de VPH son responsables del 90% de los cánceres cervicales: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35. Los tipos de HPV 16 y 18 son los más comunes, dando cuenta del 70% de los cánceres de células escamosas y 89% de los adenocarcinomas/carcinomas adenoescamosos. Resultados combinados de distintas zonas geográficas del mundo muestran que el tipo HPV 16 produce entre 53,5 y 54,6% y el VPH 18 entre 15,8 y 17,2% de los cánceres cervicales (Abarca, 2007; Lewis, 2004).

Además de su participación claramente establecida en el CaCu, los tipos VPH de alto riesgo tienen participación en proporciones variables de otros cánceres, como los de vulva, vagina, ano, pene y orofaringe (30-70%). Los tipos de VPH 6 y 11 son los causantes en 90% de las verrugas genitales o condilomas acuminados.

Desde el punto de vista genómico, el ADN del VPH se divide funcionalmente en 2 tipos de genes: los tempranos (E), y los tardíos (L). Los tempranos son responsables de la replicación del ADN, regulación transcripcional, y transformación del ADN de la célula infectada. Los genes tardíos codifican las proteínas de la cápside viral (Serman, 2004).

Infección del Virus.

Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma. Para los VPH de alto riesgo como VPH 16, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del ADN viral al núcleo de ésta. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase del ciclo celular de G1 a S (Saavedra, 2006).

La expresión de E6 y E7 de un ARNm bajo el control del promotor temprano en la LCR evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que ésta migra al estrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular (Saavedra, 2006).

Para que se produzcan viriones infecciosos, los VPH deben amplificar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del

promotor tardío dependiente de la diferenciación. Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral (Fig. 12) (Saavedra, 2006).

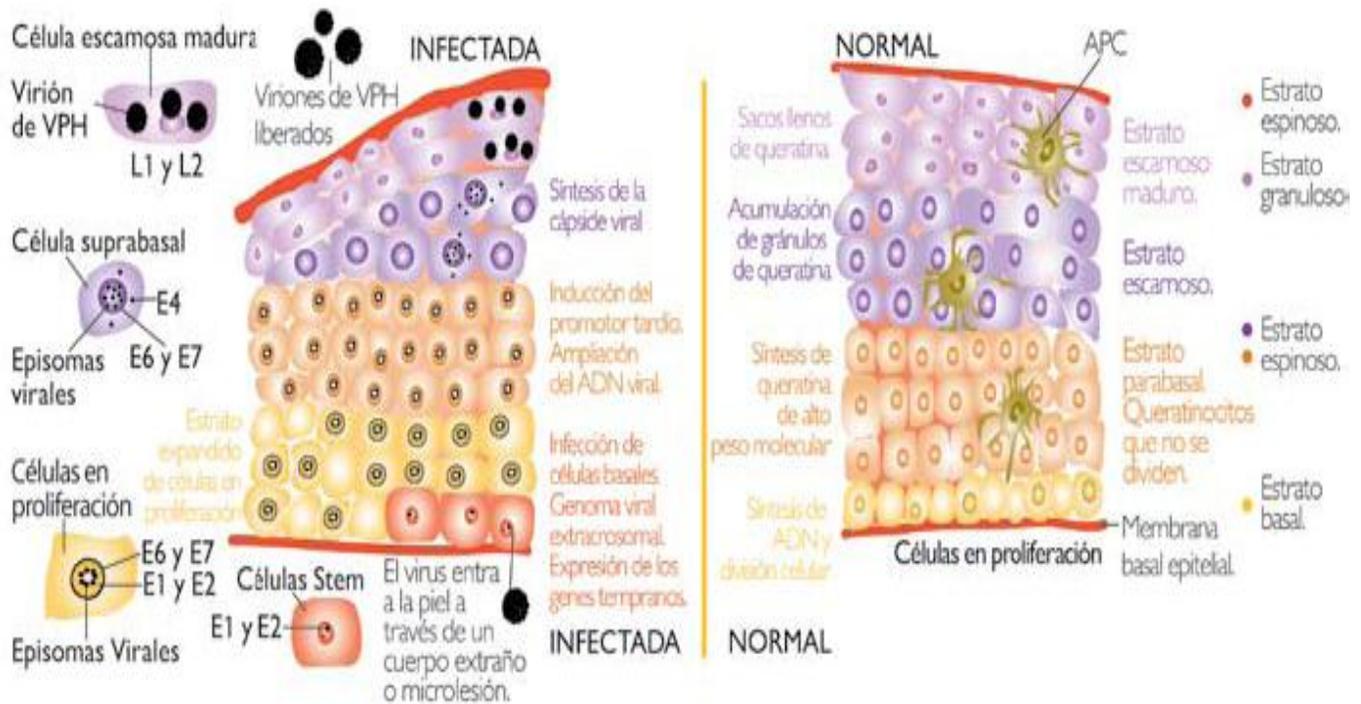


Fig. 12 Infección por VPH. Imagen tomada de Saavedra, 2006.

Cuando ocurre infección del epitelio metaplásico de la zona de transformación cervical por un VPH carcinogénico, la infección puede ser eliminada rápidamente por el sistema inmune innato u otros mecanismos de defensa; de hecho, la mayoría de las infecciones son eliminadas. Sin embargo, un pequeño porcentaje de ellas persisten en el tiempo, pudiendo en el lapso de 1 a 10 años producir neoplasias intraepiteliales, algunas de las cuales también pueden regresar y otras progresar hasta grado 3 y finalmente invadir, dando como resultado un CaCu (Saavedra, 2006).

Tratamientos.

Existen tres tratamientos frecuentes para esta enfermedad:

Cirugía.- Se utiliza por lo general cuando el tumor es pequeño y está bien delimitado, se extirpa el tejido dañado con un poco del que lo rodea, para asegurar la eliminación total de las células malignas. Aunque en ocasiones se puede extraer el órgano completo y algunos accesorios del aparato reproductor, cuando hubo metástasis (Mora, 1992).

Conización del Cuello Uterino: es la operación que se practica para extirpar una porción del exocervix y endocervix, su amplitud dependerá de la anatomía

cervical, extensión de la lesión, penetración en el canal cervical, sospecha de invasión y grado de la lesión (Mora, 1992).

Criocirugía: su principal objetivo es la destrucción celular en un área determinada mediante técnicas de congelación local. Los factores que contribuyen a la criodestrucción de los tejidos son físicos (congelación), vasculares (criotrombosis) e inmunológicos. En la criocirugía, los tejidos se congelan rápidamente y se descongelan lentamente, lo que lleva a una destrucción celular (Sandoval, 2005).

Histerectomía: es una operación para extraer el útero (matriz) de la mujer, en algunas ocasiones se extraen otras partes donde se sospeche se haya diseminado el cáncer (Centro Nacional de Información sobre la Salud de la Mujer, 2003).

Radioterapia.- La radioterapia (también llamada terapia con rayos X o irradiación) es el uso de un tipo de energía (llamada radiación ionizante) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. El tumor es irradiado con rayos X o gamma, que originan iones en las células neoplásicas y bajo la influencia de dicha radiación los iones pueden romper las hebras del ADN, dando lugar así a muchas mutaciones, lo que causa suficiente daño en el ADN para eliminar directamente a las células, o bien, para inducir las a muerte (Hellman, 1996; Lavelly, 1995; Blagosklonny, 2003). Aunque la radiación daña las células cancerosas así como las normales, muchas células normales se recuperan de los efectos de la radiación y funcionan adecuadamente. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano del alrededor. La velocidad de respuesta es característica de la población celular, pero no del resultado eventual. Las biopsias obtenidas después de la radioterapia pueden demostrar que hay células tumorales, pero es preciso practicar exámenes seriados (clínicos, químicos o radiológicos) para determinar si tienen capacidad de reproducción (Cameron, 1995).

Quimioterapia.- Consiste en la administración de fármacos citotóxicos capaces de destruir e inhibir el crecimiento y la reproducción de las células malignas en pacientes con enfermedad oncológica. A su vez destruyen células de desarrollo normal que se multiplican rápidamente. Los compuestos empleados en la quimioterapia pueden inicialmente detener la división celular (citostáticos) y posteriormente inducir la muerte celular (citotóxicos o apoptóticos) (Avendaño y Menéndez, 2008).

Pese a los beneficios de las terapias aplicadas para el tratamiento o cura de esta enfermedad, hasta el momento, éstas son ineficientes en pacientes con la enfermedad en estado avanzado o con metástasis, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. Actualmente existe fuerte interés por la exploración de compuestos con actividad biológica y específicamente con actividad anticancerígena. Entre el diverso grupo de compuestos explorados,

existe una especial atracción por los compuestos esteroidales, debido a sus diversas actividades biológicas reportadas, entre las que destacan su actividad antiviral, antiinflamatoria y antitumoral.

Dentro de este grupo de compuestos esteroidales existen las saponinas y sus derivados, a las cuales se les ha adjudicado una potente actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis.

Esteroides.

Los esteroides, tanto naturales como sintéticos, tienen una estructura cuyo esqueleto básico es el ciclopentanoperhidrofenantreno. Cientos de esteroides distintos se encuentran en plantas, animales y hongos. En las plantas se sintetizan una gran variedad de esteroides, algunos de ellos poseen función hormonal y otros participan en los mecanismos de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos (Castillaa *et al.*, 2009).

Saponinas.

Las saponinas esteroidales son compuestos que poseen una estructura compleja formadas por una parte hidrofílica (un sacárido) y otra hidrofóbica (una aglicona triterpénica o esteroideal) (Fernández, 2010). Estos metabolitos son los principales constituyentes de una gran variedad de tratamientos herbales utilizados en la medicina tradicional. Estas 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.

Las saponinas tienen un amplio rango de actividades biológicas tales como su [acción](#) antimicótica, antiviral, anticancerígena e antiinflamatoria (Deng, 1999).

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 exposición de algunas células cancerosas del colon humano a las saponinas redujo el crecimiento de las células en un 27 a 68 % (Berhow, 2007).

Dentro del grupo de las saponinas encontramos a la Diosgenina que se puede obtener de forma natural de plantas como el barbasco (*Dioscorea mexicana*). Se han realizado varias pruebas con este compuesto registrándose una gran actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de cáncer de laringe HEp-2 y melanoma M4Beu (Corbiere, 2004).

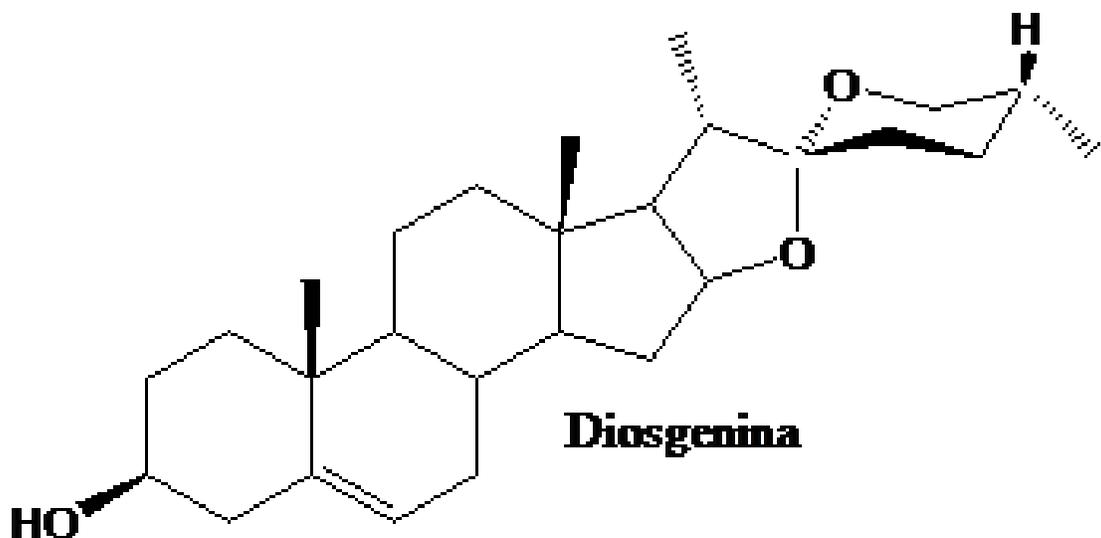


Fig.14 Estructura química de la Diosgenina.

La Diosgenina puede ser estructuralmente modificada mediante reacciones químicas que podrían incrementar o disminuir sus actividades biológicas.

Selenio (Se).

Desde la década de los 70, los esfuerzos en ensayos clínicos con selenio en diferentes centros aplicados a la salud y nutrición humana, han llegado a la conclusión de que el selenio es un elemento esencial en la dieta humana, principalmente en la prevención de muchas enfermedades que no tienen cura definitiva, entre las que se destacan; cáncer, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y complicaciones cardiovasculares (Hernández, 2009).

El selenio ha sido reconocido como elemento esencial en el mantenimiento de las funciones fisiológicas en el organismo, que a su vez, debe ser ingerido en la dieta humana en concentraciones del orden de 70 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Hernández, 2009). Su importancia radica en la formación de selenio enzimas, en las cuales radica la protección antioxidante celular previniendo cáncer de hígado, pecho, esófago, pulmón, cabeza y cuello, ovario, páncreas, tiroides, estomago, melanomas, próstata y colón (Tapiero, 2003).

El selenio es un mineral al cual se le ha ligado mucho con la prevención del cáncer pues se ha demostrado mediante estudios que una dieta rica en selenio reduce el 52 % de posibilidades de desarrollar cáncer (Solórzano, 2002). En estudios anteriores a ratones se le agregó selenio a su alimento, y otro fue el grupo intacto después se expusieron a una sustancia cancerígena y los resultados demostraron que los expuestos al selenio no desarrollaron cáncer, lo contrario de los no expuestos (Solórzano, 2002).

En un diseño experimental se determinó el efecto anticancerígeno del selenio frente al Sarcoma 180, inoculado a ratones hembras de la cepa Balb C53, (la dosis de selenio fue 7.36 µg/Kg. peso/día) durante 120 días por vía oral. Los resultados revelaron que el selenio incrementó en 5 días el periodo de supervivencia (13 %), por lo que el selenio demostró tener un efecto protector contra la tumorigénesis inducida por sarcoma 180 (Hernández, 2005).

También se ha observado que en pacientes con cáncer de tiroides, este elemento se presenta en menores concentraciones que en un paciente que no tiene cáncer. En un experimento donde se le administró selenio a ratas durante un tiempo y a otro grupo no, después ambos grupos fueron sometidos a radiaciones, el grupo que se trató con selenio presentó una supervivencia de hasta tres veces más que las no tratadas. El mecanismo protector del selenio puede ser a través de la enzima glutatión-peroxidasa, que es un poderoso antioxidante, cuya acción depende del selenio (Fleites, 1999).

También en otros estudios se ha demostrado que el selenio, como antioxidante, se ha relacionado con la reducción del cáncer gastrointestinal (Lugo, 2007).

SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3β,16β-diilo)

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 diosgenina conteniendo selenio, cuya fórmula de la IUPAC es: Diacetato de (25R)-22oxo-26selenocianocolest-5-en-3β, 16β-diilo (SeCN-D). La modificación consistió en que la molécula de diosgenina fue modificada en su anillo f, al agregársele un selenio (Se) en el carbono 26, dándole así una modificación novedosa, obteniendo el compuesto SeCN-D.

Para la formación del SeCN-D se abre la cadena lateral de la diosgenona 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 (Quan, 2006).

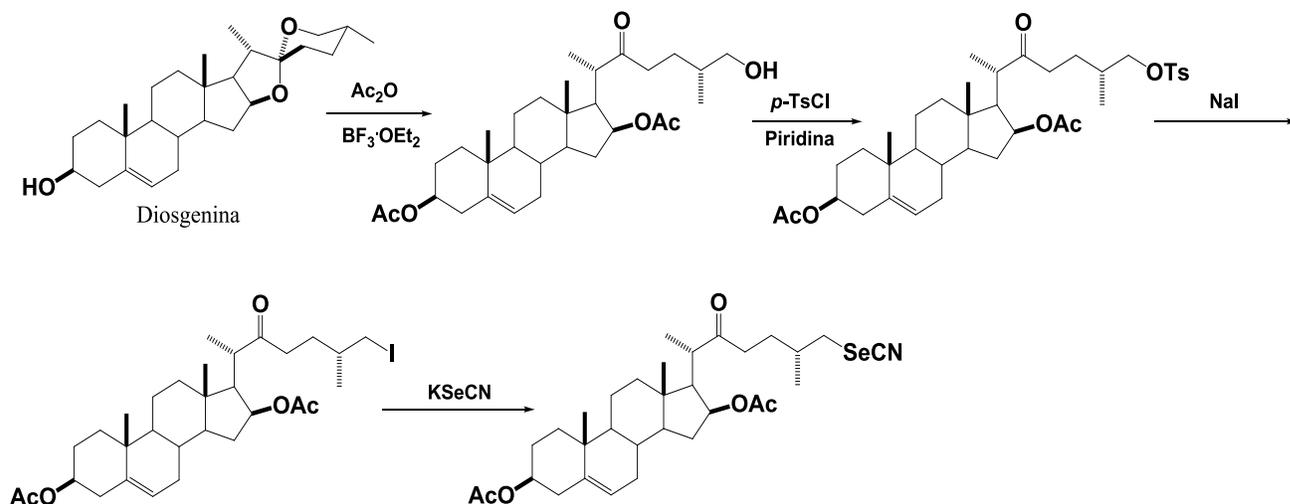


Figura 15. Obtención del compuesto SeCN-D

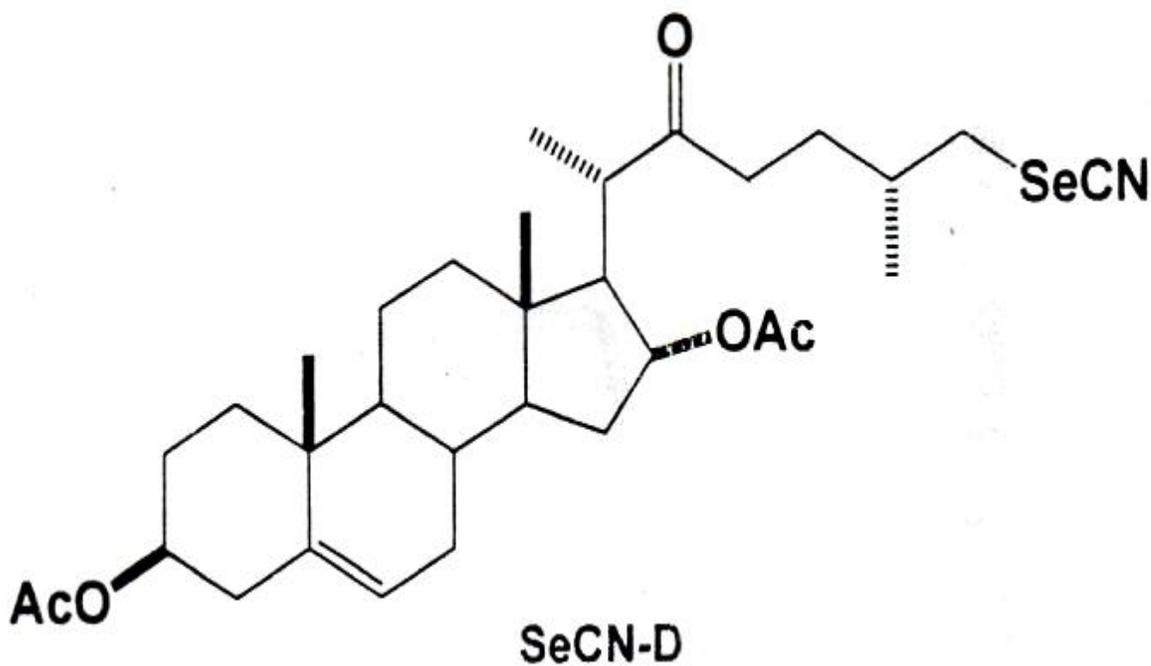


Fig. 16 Estructura química del SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo).

Planteamiento del problema.

Actualmente el cáncer es tratado en muchas ocasiones mediante la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, las cuales son costosas y en pacientes con cáncer

terminal son ineficientes. Tanto la radioterapia así como la quimioterapia dañan 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 como aquellas que se han descrito 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 y a elementos químicos como el selenio (Se), a los cuales recientemente se les han atribuido un efecto citotóxico y antiproliferativo; sin embargo se tienen pocos estudios sobre el efecto de éstos sobre cáncer de cerviz que es muy frecuente en nuestro país, por lo cual es necesario generar información sobre la actividad de las saponinas esteroidales junto con elementos químicos como el Se, sobre células de cáncer cervical.

Justificación.

El cáncer cérvicouterino (CaCu) en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, mientras que en nuestro país es una enfermedad muy común en la población de mujeres mexicanas de entre los 35 a 65 años de edad y es en la actualidad la segunda causa de muerte. Este hecho y la ineficiencia de las terapias aplicadas a el tratamiento o cura del cáncer en pacientes con un estado avanzado de la enfermedad, genera la necesidad de crear 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 elementos químicos, entre los cuales podemos mencionar a las saponinas esteroidales y sus derivados y al selenio los cuales han sido descritos con actividad citotóxica y anticancerígena; sin embargo se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el CaCu, por lo que sería conveniente generar información acerca de la actividad de las saponinas esteroides y el selenio o de las saponinas selenadas sobre esta enfermedad.

Hipótesis.

Se ha descrito que tanto la diosgenina como el selenio presentan actividad antiproliferativa, apoptótica y citotóxica en células de cáncer. En consecuencias esperaríamos que generando un compuesto en donde éstos se encuentren juntos en la misma molécula como en el compuesto **SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo)**, se pueda presentar un efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico importante en líneas celulares de cáncer cérvicouterino.

Objetivo General.

Evaluar el efecto antiproliferativo y citotóxico del derivado de la Diosgenina **SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo)**, así

como su efecto en el ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer cérvicouterino.

Objetivos Particulares.

- ❖ Realizar cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo, así como de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano y de linfocitos humanos de sangre periférica.
- ❖ Determinar la concentración de SeCN-D, requerida para disminuir en un 50% (IC_{50}) la densidad celular de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo.
- ❖ Valorar si las IC_{50} obtenidas afectan el potencial proliferativo de células no tumorales (fibroblastos de cérvix y linfocitos humanos).
- ❖ Comprobar si el SeCN-D induce actividad citotóxica en CaSki, HeLa y ViBo así como de linfocitos humanos no tumorales, mediante la detección de la actividad de la LDH.
- ❖ Establecer si la actividad antiproliferativa del SeCN-D es dependiente o independiente del ciclo celular, mediante su efecto en la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular de cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo, determinadas por citometría de flujo.
- ❖ Evaluar si el SeCN-D induce muerte por apoptosis en CaSki, HeLa y ViBo mediante la detección de caspasa 3 activa, así como la detección de fragmentación de ADN, determinadas por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente.

Metodología.

Obtención del esteroide SeCN-D.

250 mg del esteroide SeCN-D ($C_{32}H_{47}NO_5Se$) con peso molecular de 604.679 gr/mol fueron proporcionados por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez, responsable del laboratorio de Química de Síntesis de productos naturales de la Universidad Benemérita de Puebla, se proporcionó de forma sólida, es decir en un polvo blanco el cual es soluble en acetato de etilo. Su nombre determinado por la IUPAC es: **Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo.**

Cultivo de células de CaCu.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares provenientes de CaCu fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA) suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), rojo fenol y NCS (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5 %, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO_2 y a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuair, USA). Para realizar las pruebas biológicas las células fueron tomadas de cultivos a una densidad del 70 % (Morgan y Darling, 1993).

Obtención y procesamiento de células fibroblásticas de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes al CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, USA) y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió en escindir el tejido en trozos pequeños (5 mm) y someterlos a una disgregación enzimática con tripsina (SIGMA, USA) a 0.1 %. La cual se llevó a cabo colocando los trozos de tejido en un matríz Erlenmeyer (Pirex, USA) 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 vertió a través de una malla de nylon que permitió sólo el paso del material disgregado. El filtrado se centrifugó (centrífuga; DINAC, USA) por 5 minutos a 1,500 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón celular fue cultivado en cajas Petri de 5 ml donde se mantuvo en incubadora (Nuair, USA) al 5 % de CO_2 y una atmósfera húmeda a punto de rocío durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado totalmente con el propósito de remover las células no adheridas y se añadió medio fresco suplementado con SFB al 10 % y mantenidas en condiciones de incubadora durante 48 a 72 horas. Los cultivos fueron supervisados durante una a dos semanas, cambiando el 50 % del medio de cultivo cada 3 días hasta obtener una densidad del 80 % de células fibroblásticas. Los cultivos con un 80 % de densidad celular fueron resembrados en cajas petri de 100 mm de diámetro y fueron consideradas como la R1. Las células fibroblásticas utilizadas para los ensayos experimentales fueron obtenidas de cultivos en segunda resiembra (R2) en fase de crecimiento exponencial.

Obtención y procesamiento para la medición de 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 (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA) con 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se cubrió con aluminio y se centrifugó (centrifuga; Dinac, USA) inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1,500 rpm, después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1,000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB (el total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se cosecharon todas las células que permanecían 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 se 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 tubo cónico de plástico de 1.5 ml, la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 de células/ml de medio total. Para marcar con carboxifluoresceína (Zigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ l por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1,500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos a una densidad de 1×10^6 de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con SeCN-D se trataron las células con IC_{50} de cada línea. Las células contenidas en cada tubo cónico 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 cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 minutos, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1,500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500 μ l de PBS (dos veces), y 500 μ l de paraformaldehído al 2 % para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesan los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Preparación del stock del esteroide SeCN-D.

1 mg del compuesto fue solubilizado en 1ml de acetato de etilo, obteniendo así una concentración de 1000 µg / 1000 µl. A partir de esta concentración se tomarán los microlitros necesarios para las evaluaciones.

Determinación de la IC₅₀.

Para establecer la IC₅₀ (índice de concentración en la cual se disminuye en un 50% el número celular) se tomaron la cantidad de volumen del stock necesaria para las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56 µg/ml.

Cada tipo celular fue sembrado (7,500 por pozo) en cajas de plástico de 96 pozos, con un volumen por pozo de 100 µl de RPMI al 5 % de SFB, durante 24 horas. Se dejaron transcurrir 24 horas y se trataron con las diferentes concentraciones de nuestro compuesto, de la siguiente manera: se retiraron los 100 µl del medio de cultivo, al primero se le denominó control, el cual solo contenía medio de RPMI al 5 % de SFB, el segundo fue llamado vehículo, y contenía la concentración máxima de acetato de etilo que se utilizará en el ensayo. En los demás pozos se trataron a las células con las diferentes concentraciones del compuesto, este procedimiento se llevó a cabo en una serie de tres repeticiones, se aplicaron los mismos volúmenes por pozo que fueron de 100 µl, y así se mantuvieron las condiciones por 24 horas.

Evaluación de proliferación por la técnica de la incorporación de cristal violeta.

El colorante cristal violeta posee características alcalinas que le permiten incorporarse a los núcleos celulares. El número de núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida (Kueng, 1989).

Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % durante 10 minutos, para posteriormente ser lavadas con agua bidestilada y secadas al aire. A las placas se les agregó una solución de cristal violeta al 0.1 % (hasta cubrir completamente las células), manteniéndose en agitación durante 10 minutos. Una vez concluido este tiempo las placas de cultivo se lavaron exhaustivamente con agua desionizada (de manera que el colorante no incorporado sea retirado), para posteriormente secarse al aire a temperatura ambiente. A las cajas de cultivo se les añadió ácido acético al 10 % (que solubiliza el colorante de los núcleos celulares) dejando en agitación durante 20 minutos. Posteriormente a eso, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (E1 800; Bio-Tek) a 590 nm y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje (%) de proliferación celular con respecto al control.

Determinación de la IC₅₀ matemática.

Para la determinación de la IC_{50} matemática los datos obtenidos de concentración en mg/ml fueron correlacionados con los respectivos valores de % celular. Los datos son linealizados y se realizó una intrapolación para calcular la disminución del 50% de la población celular (IC_{50}). Todo esto se realiza con la ayuda de un software específico (Excel 2003).

Determinación de citotoxicidad por medio de la LDH

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima catalizadora 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 oxidoreductasas, 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 medio al romperse la membrana celular por lo que al ser detectada extra celularmente se comprueba que la célula murió por necrosis (Serrano, 2009).

Se sembraron 7,500 células por pozo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo en placas de 96 pozos (Corning, USA), con 100 μ l de medio RPMI al 5 % de SNC, por 24 horas. 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 solo se le cambia el medio de cultivo por medio fresco y un control que contempla la cantidad de acetato de etilo máxima utilizada para solubilizar el compuesto SeCN-D en cada una de las IC_{50} se agregaron. Se efectuó un tratamiento con la IC_{50} para cada una de las líneas celulares. Una hora antes de cumplir las 24 horas de estímulo, se agregó Tritón X-100 al 1 % al control positivo. Cumplidas las 24 horas 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 2,000 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 minutos a temperatura ambiente en la obscuridad. El ensayo se evaluó a 490 nm.

Método de evaluación del ciclo celular por el método de citometría de flujo.

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células pasen dentro de un aparato (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems; 1995). Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. Si la célula va marcada con un fluoróforo, como el yoduro de propidio, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro. Estas ideas son la base de la

técnica conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). las aplicaciones más comunes utilizando fluoróforos son la viabilidad y el estado fisiológico, la apoptosis, el análisis del ciclo celular y el contenido de ácidos nucleicos, el crecimiento celular, los índices de mortalidad y la concentración de calcio intracelular. Una de las formas de evaluar la viabilidad es determinar la integridad de la membrana y para ello existen colorantes de exclusión que tiñen los ácidos nucleicos de las células con membranas defectuosas (Rieseberg *et.al*, 2001; Salgado, 2002).

Se sembraron 1,000,000 de células de cada una de las líneas en cajas de cultivo de 50 mm de plástico (Corning inc. USA), para los tratamientos se contemplaron las IC₅₀ del compuesto para cada línea celular. Para la evaluación por citometría de flujo las células fueron despegadas de las cajas de cultivo con Verseno, se centrifugaron y se lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS) a un pH 7.3. El botón celular fue fijado y resuspendido con 1 ml de metanol al 50 % en PBS, pasando 20 minutos se centrifugó y se lavó con PBS. El botón fue resuspendido con ARNasa (2.5 U/ml) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó 10 µl de ioduro de propidio (0.2 µg/ml), se mezcló y se protegió de la luz. Para finalizar se analizaron las muestras en un citometro de flujo (Coulter, USA).

Evaluación de la caspasa-3 activa.

Se sembraron 50,000 células en portaobjetos de aproximadamente 1 x 1 cm. con un volumen de 2 ml de RPMI al 5 % de SNC en cámara húmeda por 24 horas. Al término del tiempo se procedió a estimular con cada una de las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular. A continuación, se realizó la detección de la caspasa-3 activa por inmunolocalización, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 15 minutos, al término del tiempo se lavó cuidadosamente 3 veces con PBS, a continuación se perneó con Tritón X-100 0.2 % durante 5 minutos a 4 °C, nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, se bloqueó con PBS-BSA Tween 20 durante una hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Después se adicionó el anticuerpo primario (anti-caspasa-3 activa 1/100 en PBS) y se incubó durante 24 horas a 4 °C en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS 3 veces y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (Goat anti-Rabbit con FITC 1/100 en PBS) durante 2 horas en cámara húmeda en oscuridad, posteriormente se lavan las muestras 3 veces con PBS, después se aplica el DAPI de manera muy cuidadosa durante 1 minuto, nuevamente se lavan las muestras con PBS. Finalmente se montan las muestras con medio de montaje antifolding. Una vez realizadas las preparaciones se procede a analizar las muestras en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON, JAP).

Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL.

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

han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Los nucleótidos biotinilados, son incorporados por la enzima TDT al extremo 3'OH del DNA fragmentado. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una fluorescencia roja (Colin-Valenzuela *et al*, 2010).

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 dejaron secar.

Se Incubó inmediatamente por 1 hora con enzima Tdt (33µl de enzima más 77 µl de buffer de reacción) en cámara húmeda. Se detuvo la reacción con buffer de paro (1ml de buffer de paro en 34 ml de agua MiliQ), 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Se lavaron con PBS, se incubaron con antidigoxigenina-rodamina (Chemicon international, USA) (68 µl de solución de bloqueo más 62 µl 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, se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos se les realizaron un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows 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-D

Con la finalidad de evaluar el efecto antiproliferativo del SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo), así como el determinar la concentración requerida del compuesto que induzca un decremento del 50 % en el número celular (IC₅₀), cultivos de células de CaCu CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con diferentes concentraciones del esteroide (Fig. 17, Tabla 1).

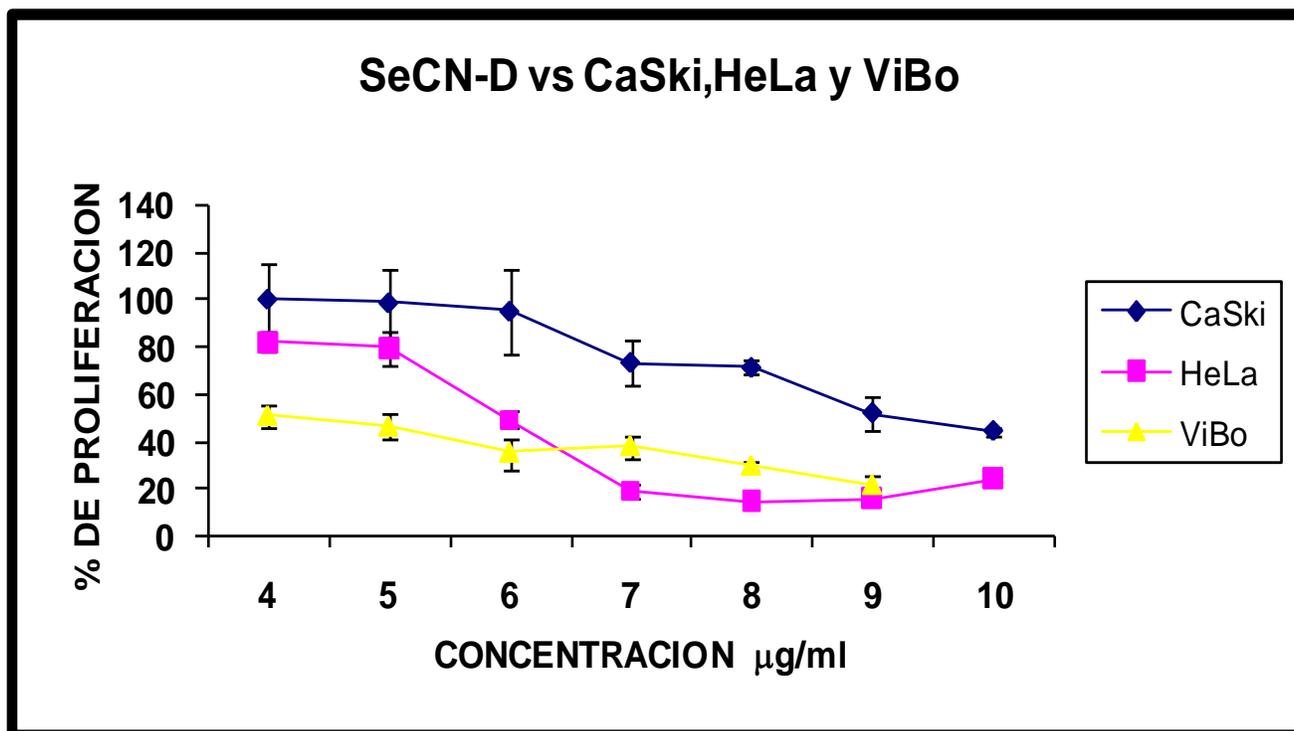


Fig. 17 Efecto antiproliferativo de la saponina esteroide SeCN-D sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. 7500 células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos por 24 horas y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto por 24 horas.

Compuesto	Línea celular	IC50	
		(µg/ml)	(µM)
SeCN-D	HeLa	6.15	10.3
	CaSki	9	14.9

	ViBo	5	8.3
--	------	---	-----

Tabla 1. Concentración requerida de SeCN-D para inducir un 50 % de decremento en el número celular de cultivos de CaSki, HeLa y ViBo.

Los resultados obtenidos en la figura 17 indican que el efecto del SeCN-D sobre el potencial proliferativo de las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo es dosis dependiente, es decir, conforme se incrementa la concentración la densidad celular disminuye. La concentración calculada de SeCN-D requerida para disminuir en un 50 % el número celular (IC_{50}), en las células CaSki, HeLa y ViBo fue de 14.9, 10.3 y 8.3 μM respectivamente.

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

Con la intención de observar el efecto del esteroide en la morfología de células tumorales cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimuladas con 14.9, 10.3 y 8.3 μM respectivamente por 24 horas y los cultivos fueron observados al microscopio invertido 100 aumentadas y fotografiados con una cámara digital SONY (Fig.18).

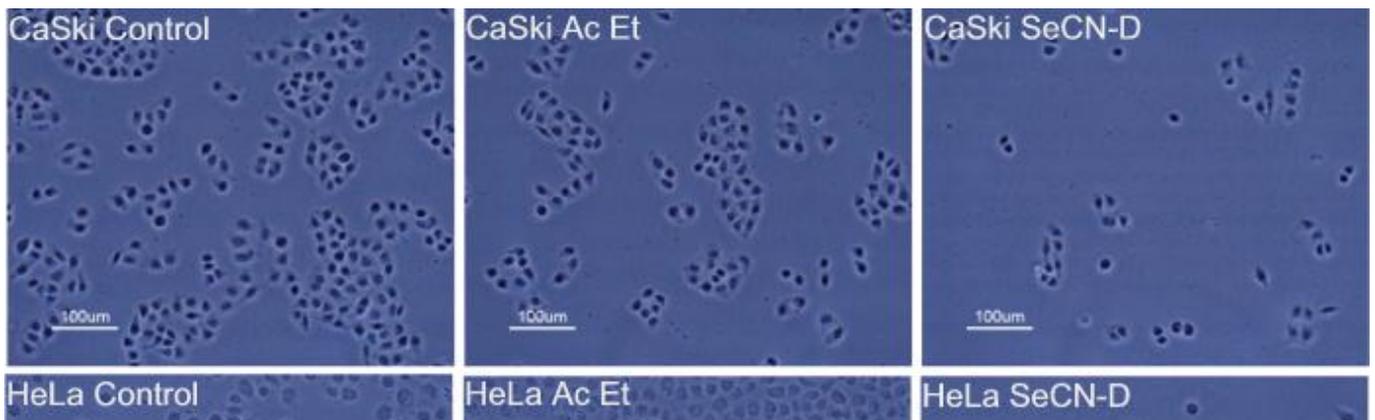


Fig. 18 Efecto de la saponina esteroideal SeCN-D en la morfología de células CaSki, HeLa, y ViBo. Estimuladas con 14.9, 10.3 y 8.3 μM del esteroide respectivamente. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON). Todas las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. AC-ET: acetato de etilo.

Como se observa en la Fig. 18 la morfología de las líneas celulares tratadas con el compuesto SeCN-D se ve afectada, destacando que mientras en los cultivos estimulados con acetato de etilo las células se muestran adheridas al plato de cultivo con un contorno regular, el citoplasma extendido y guardando contacto con células vecinas, las células CaSki, HeLa y ViBo tratadas con el esteroide presentan un menor tamaño, con células suspendidas y células adheridas de tamaño pequeño de forma esférica, sugiriendo probablemente que el SeCN-D afecta la adhesión celular, así como a las moléculas del citoesqueleto.

Efecto de las IC_{50} de SeCN-D en el potencial proliferativo de células no tumorales.

Con el interés de determinar si la actividad antiproliferativa del SeCN-D afecta a las células no tumorales, células fibroblásticas obtenidas de biopsias de cérvix no tumoral humano, así como cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre

periférica humana, fueron estimuladas con 8.3 y 14.9 μM 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 (Fig.19 y 20).

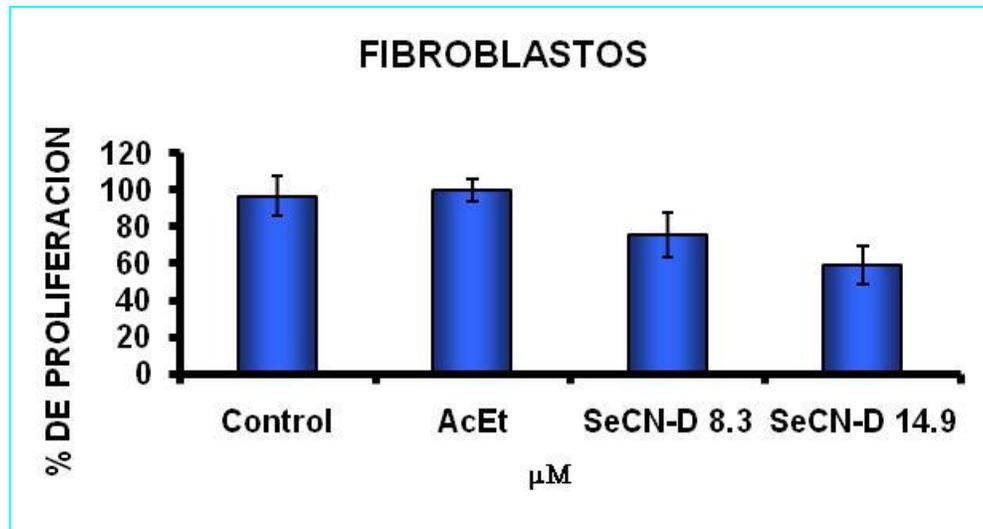


Fig.19. Efecto de la saponina esteroideal SeCN-D sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano no tumorales. 7500 células de cérvix humano fueron sembradas en placas de 96 pozos en RPMI al 10 % de SFB y estimuladas con el compuesto SeCN-D (8.3 y 14.9 μM) por 24 horas. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta.

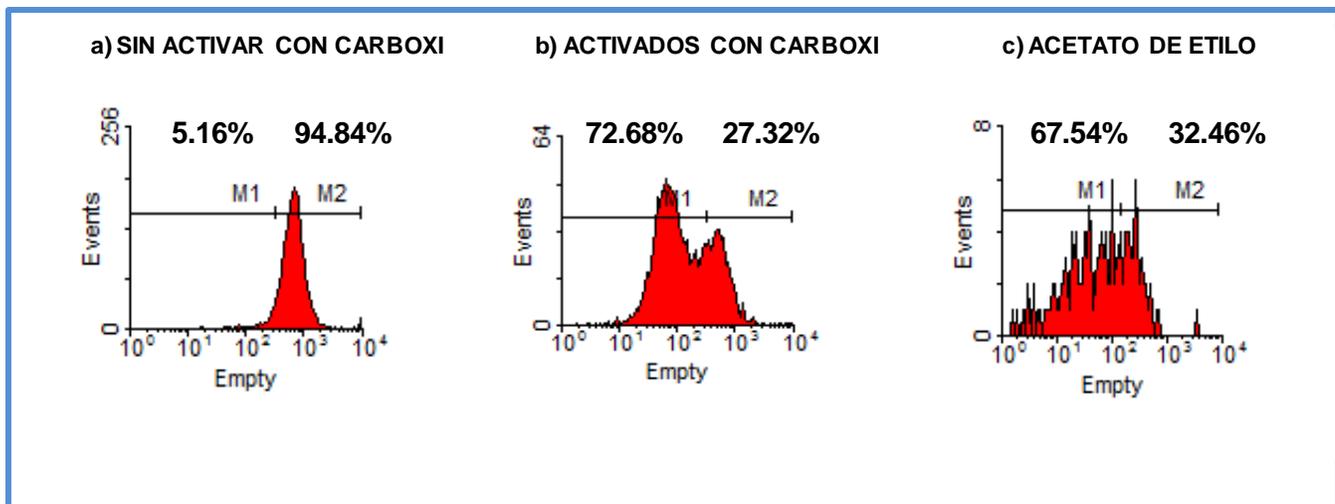


Fig.20. Efecto del SeCN-D en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína, el potencial proliferativo fue evaluado con linfocitos tratados con la IC50 de SeCN-D y células sin tratamiento. La proliferación fue medida por marcaje con carboxifluoresceína 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, d) 8.3 $\mu\text{g/ml}$ de SeCN-D y e) 14.9 $\mu\text{g/ml}$ del esteroide.

Los resultados mostrados en las figuras 19 y 20 indican que el SeCN-D afecta el potencial proliferativo de las células no tumorales, sin embargo el hecho de que en las células fibroblásticas se observó un decremento en el número celular del 20 al 40 % y solo un 22.8 a un 37.09 % en células linfocíticas implica que la actividad antiproliferativa nunca alcanzó el 50 % como se determinó para las células tumorales.

SeCN-D y citotoxicidad en células tumorales 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 continuidad de la membrana plasmática se encuentre alterada, dejando salir el contenido citoplasmático, causando que las enzimas citoplásmicas actúen fuera de la célula.

Con el interés de determinar si el compuesto SeCN-D ejerce un efecto citotóxico (necrótico) en líneas celulares de CaCu, cultivos de células CaSki HeLa y ViBo fueron tratados con 14.9, 10.3 y 8.3 μM respectivamente de la saponina esteroidal SeCN-D y la actividad de la LDH fue determinada en los sobrenadantes provenientes de cultivos de líneas tumorales de CaCu mediante el LDH-Cytotoxicity Assay kit (Viobision; N° Cat. K311-400) (Fig.21).

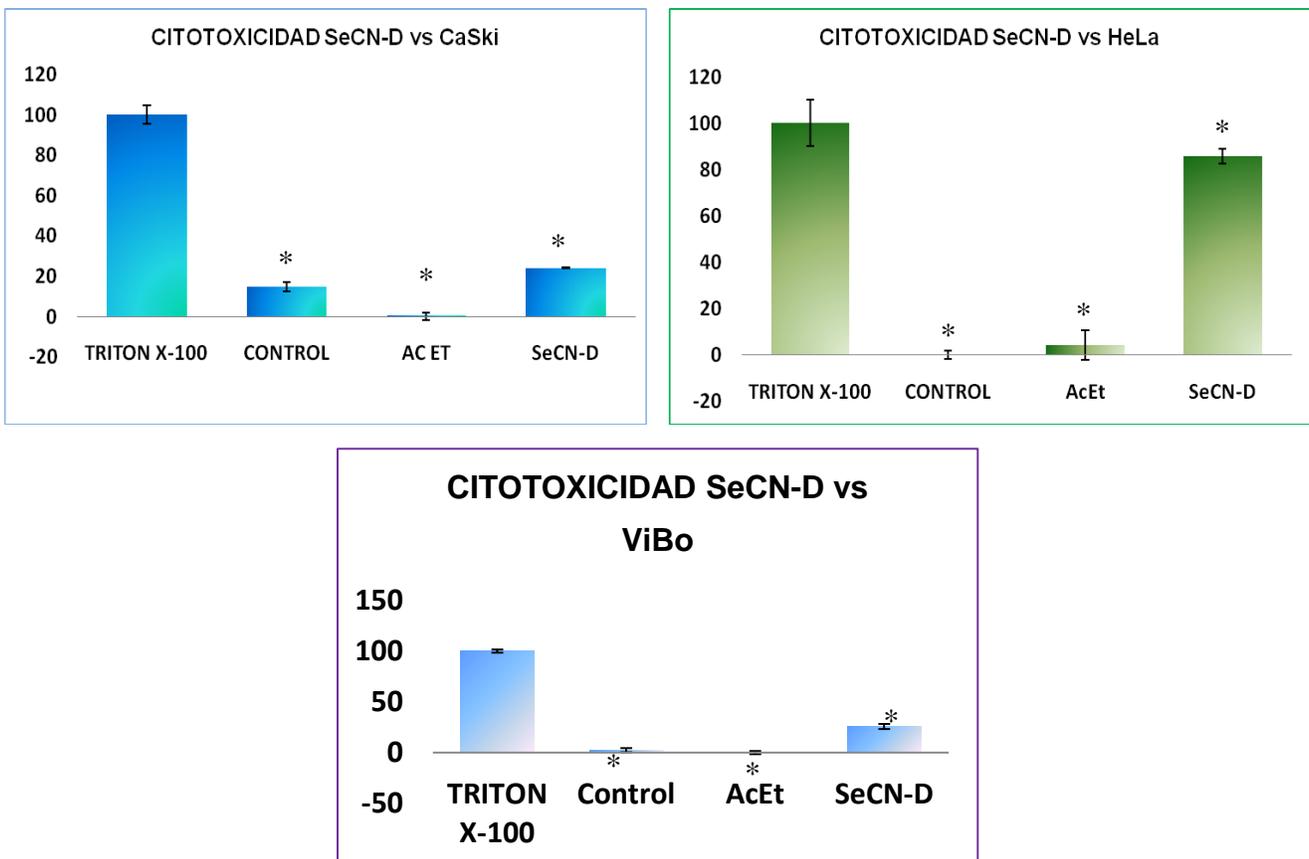


Fig. 21 Actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de CaSki, HeLa y ViBo estimuladas con 14.9, 10.3 y 8.3 μM respectivamente del esteroide SeCN-D. (*.p<0.05 vs A. E., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos muestran que la saponina SeCN-D ejerce una acción citotóxica en las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo, sugiriendo que las induce a morir por necrosis. No obstante el efecto citotóxico observado en las células tumorales CaSki y ViBo, éste fue menor al 50 % (25 % en ViBo y 24 % CaSki), sugiriendo que el decremento observado en el número celular en los cultivos de células CaSki y ViBo tratadas con el SeCN-D es causado además de la necrosis,

por una vía diferente a la necrótica. Sin embargo, en el caso de las células HeLa, éstas presentaron un efecto del 82%, implicando que es la línea tumoral con mayor sensibilidad al efecto citotóxico del SeCN-D, además implica que el decremento en el número celular es causado por una muerte necrótica.

SeCN-D y citotoxicidad en células no tumorales

Con el fin de establecer si el SeCN-D ejerce una actividad citotóxica sobre células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos fueron tratados con el compuesto a una concentración de 14.9 μM y la actividad de la LDH fue evaluada (Fig.22).

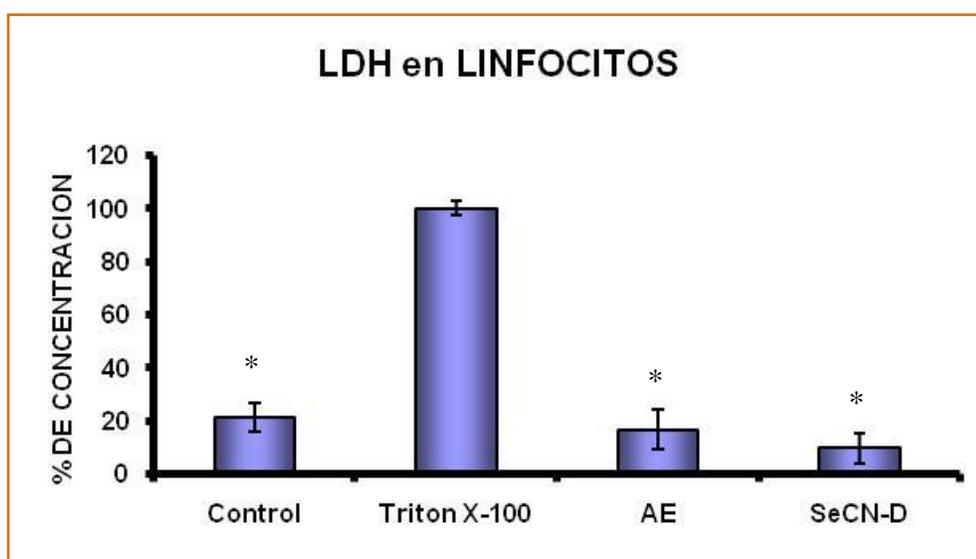


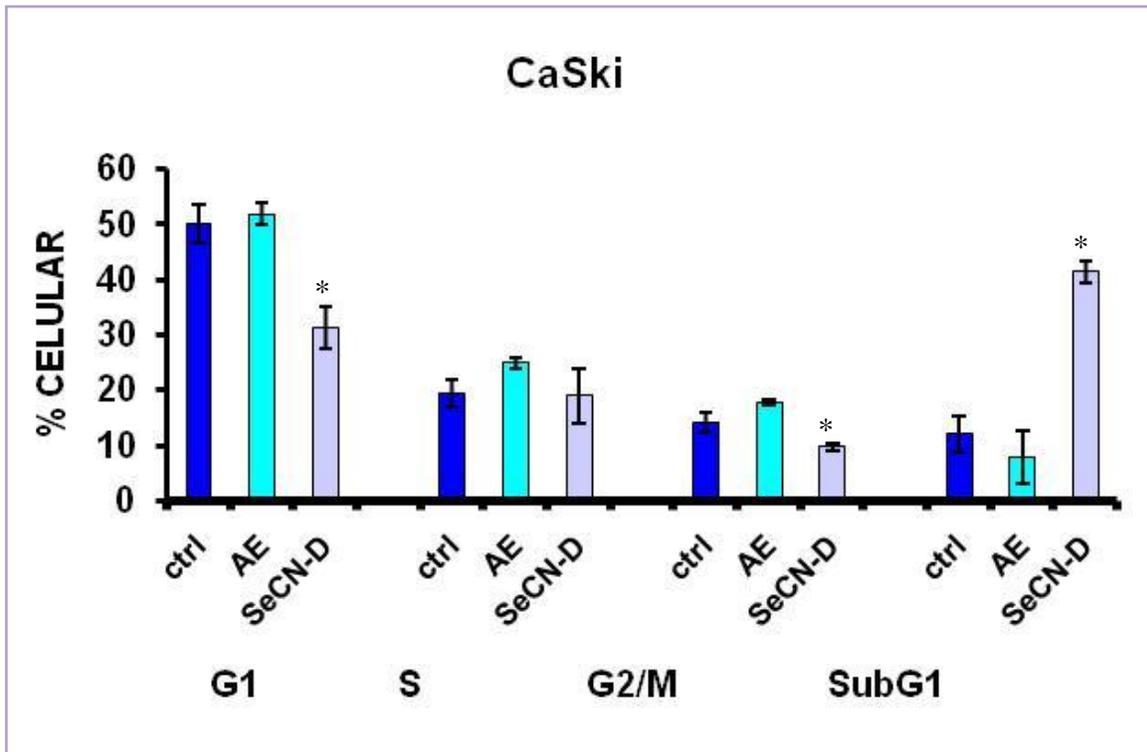
Fig. 22. Efecto citotóxico del compuesto SeCN-D a la concentración de 14.9 μM en cultivos de linfocitos humanos. (*.p<0.05 vs A. E., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos muestran que el SeCN-D 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-D en el ciclo celular de células de CaCu.

Es conocido que los compuestos 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-D actúa de manera dependiente o independiente del ciclo, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con 14.9, 10.3 y 8.3 μM de SeCN-D respectivamente y la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada mediante citometría de flujo (Fig.23).



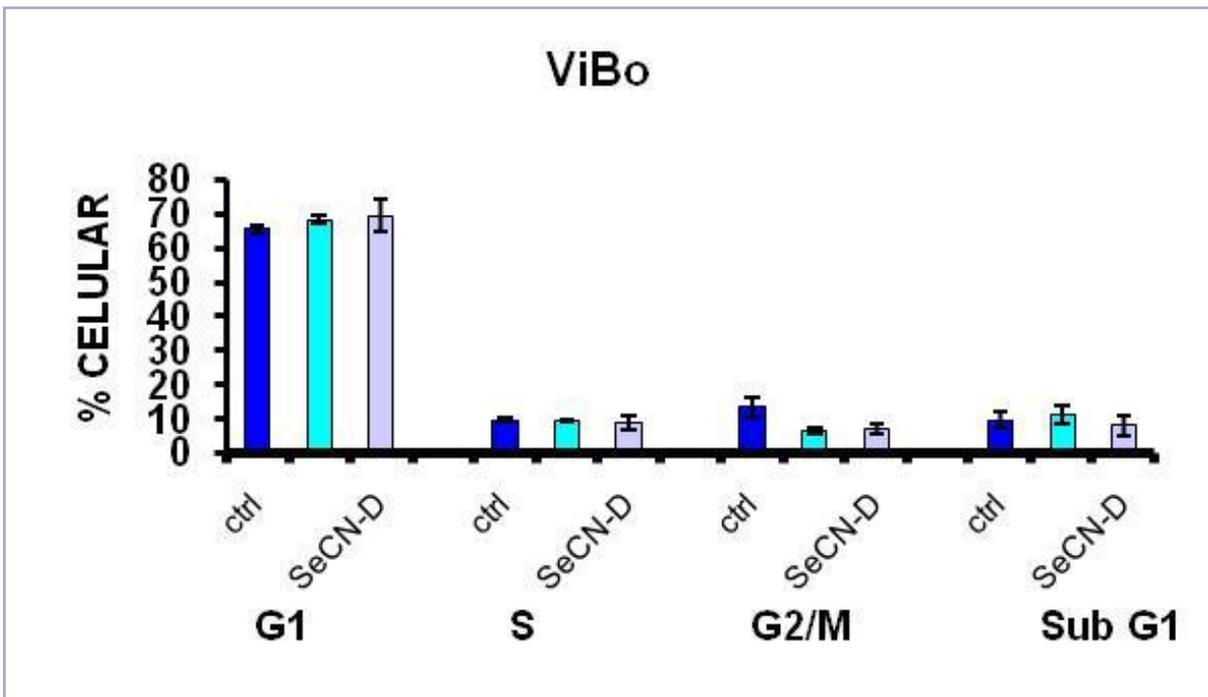
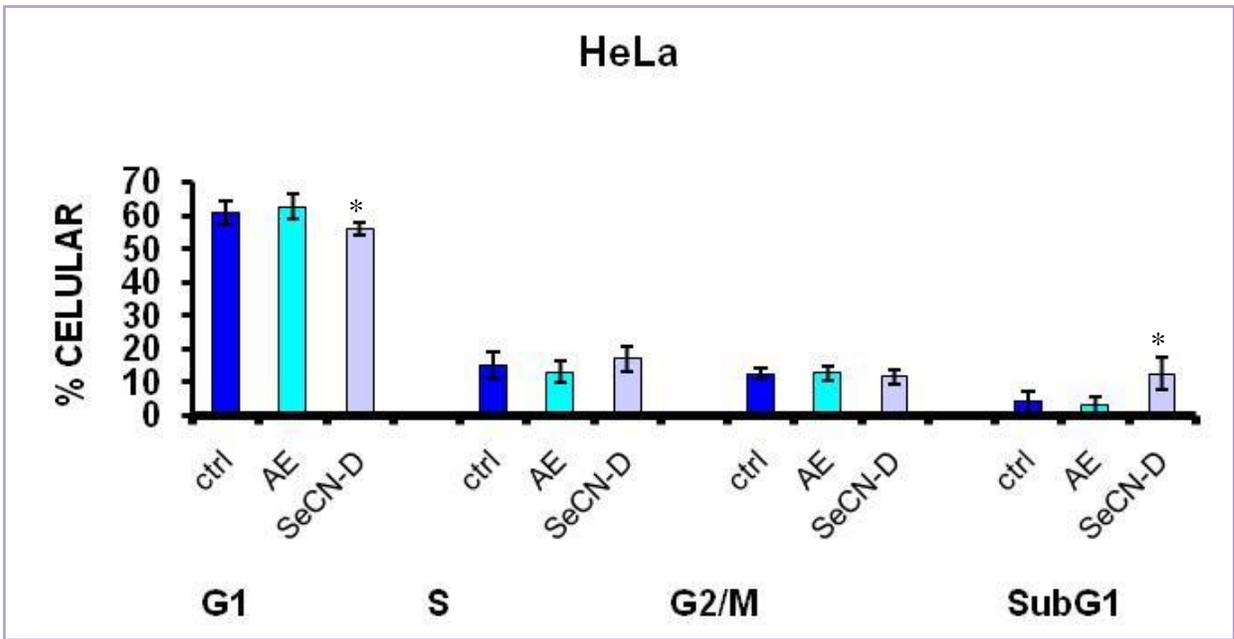


Fig.23. Distribución del ADN en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular de células CaSki, HeLa y ViBo estimuladas con 14.9, 10.3 y 8.3 μM respectivamente de SeCN-D. Los ensayos se realizaron con cultivos de 5×10^5 células tumorales con y sin SeCN-D, en cajas petri de 60 X 15 mm, en 5 ml de RPMI al 5% de NCS. 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 eventos independientes. (*.p<0.05 vs A. E., ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados en la Fig.23 indican que en células CaSki el SeCN-D induce un decremento en el porcentaje de células que están en la fase G1 y G2/M, en las células HeLa se registra un decremento en la fase G1 mientras que para ViBo no afecta ninguna de las fases del ciclo celular, sugiriendo que la acción antiproliferativa del SeCN-D podría ser dependiente o independiente de ciclo así como dependiendo de la línea celular. Sin embargo, en las células CaSki y HeLa tratadas con la saponina, se observa un 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-D y detección de caspasa-3 activa en cultivos de células tumorales:

Con la intención de establecer que el SeCN-D induce a una muerte por apoptosis en células tumorales, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con 14.9, 10.3 y 8.3 μM de SeCN-D respectivamente. y la detección de la caspasa-3 activa fue evaluada por inmunocitoquímica (Fig.25).

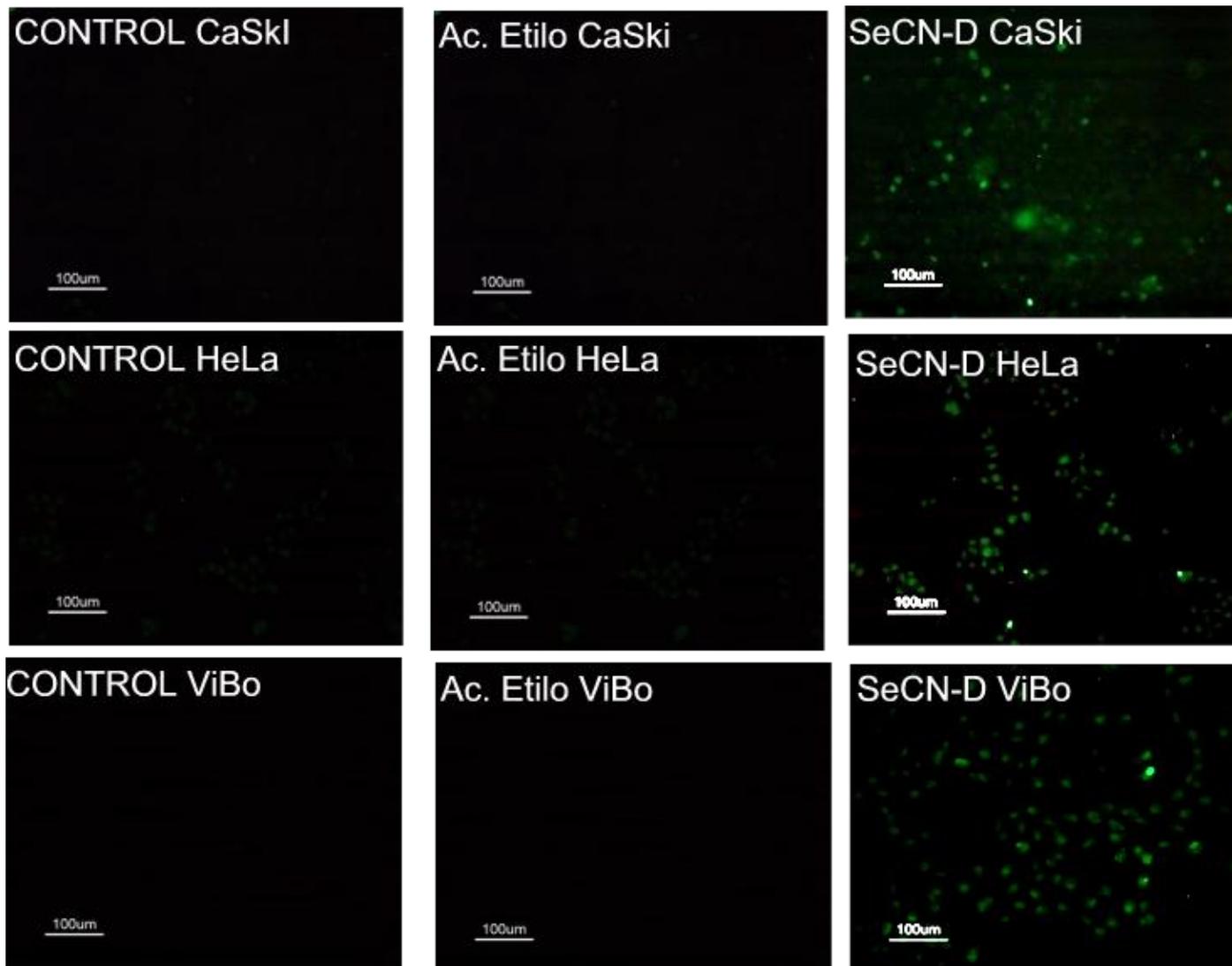


Fig. 25 Detección de la caspasa-3 activa en cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo estimuladas con 14.9, 10.3 y 8.3 μM de SeCN-D respectivamente. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON). Todas las fotografías son representativas de por lo menos tres ensayos independientes. AC-ET: acetato de etilo.

Como se muestra en la Fig. 25 el esteroide SeCN-D induce a las células de CaCu CaSki, HeLa y ViBo a expresar la caspasa-3 activa, la cual indica que las células están siendo inducidas a una muerte por apoptosis.

No obstante la detección de la caspasa-3 activa en los cultivos de células tumorales inducidas con el SeCN-D, es necesario concluir sí el evento apoptótico llega a su término, esto es, en el proceso de una muerte apoptótica, las células sufren cambios morfológicos característicos de esta muerte, estos cambios pueden observarse dependiendo del grado de apoptosis que presenta la célula y como evento final de este tipo de muerte es la fragmentación del ADN. Por ello, cultivos de células tumorales CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con 14.9, 10.3 y 8.3 μM respectivamente del esteroide SeCN-D y la fragmentación del ADN fue detectada mediante la técnica de TUNEL (Fig.26).

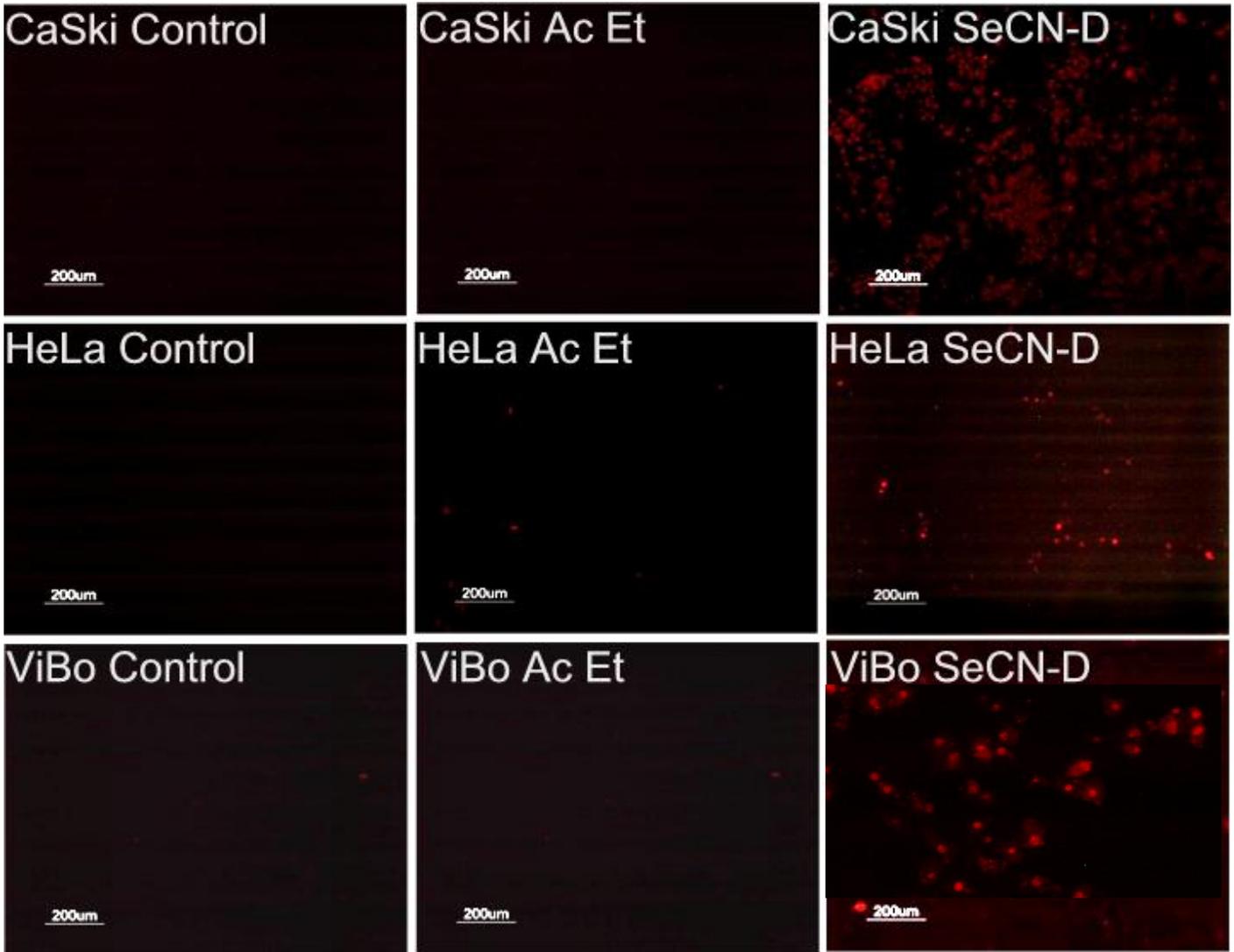


Fig. 26 Detección de fragmentos de ADN en cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo estimulados con 14.9, 10.3 y 8.3 μM de SeCN-D respectivamente. La detección de ADN fragmentado en los cultivos celulares fue evaluado mediante la técnica de TUNEL y observados por epifluorescencia a través del fluorocromo rodamina.

Los resultados mostrados en figura 26 establecen que el SeCN-D induce la fragmentación de ADN en las tres líneas tumorales, concluyendo que el esteroide induce una muerte por apoptosis.

Discusión de Resultados

Es conocido que las saponinas presentan actividades biológicas tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, inductoras de apoptosis y antiproliferativas. Con respecto a la actividad antiproliferativa de saponinas esteroidales expresada como la IC_{50} se han reportado diferentes concentraciones, donde la concentración mínima reportada se obtuvo en células de melanoma maligno B16 con una IC_{50} de 10 μM (Lee *et al*, 2007), mientras que la concentración mayor de IC_{50} se obtuvo en las células de osteosarcoma 1547 con una IC_{50} de 40 μM (Trouillas *et al*, 2005). De igual manera, con respecto al selenio, se ha descrito que en el compuesto 1,4-fenilenebis (metileno) selenocianato la IC_{50} reportada para las células C4-2 LNCap de cáncer de próstata es de 7.6 μM , mientras que este mismo compuesto aplicado en ratas evitó el desarrollo de cáncer mamario a una concentración de 30 a 90 μM (Soon, 1999). Con respecto al compuesto SeCN-D (Diacetato de (25R)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-en-3 β , 16 β -diilo) en nuestros resultados presentó una IC_{50} en células de CaCu de 8.3 a 14.9 μM , mientras que en células de cáncer colorectal HCT116 fue de 2.6 μM (Quan, 2006). No obstante la actividad antiproliferativa reportada para las saponinas y el selenio, estudios de citotoxicidad han revelado que las saponinas presentan una baja citotoxicidad (Chun-Te, 2007), mientras que los compuestos selenados son fuertemente citotóxicos (Wael, 2007), sugiriendo que la actividad antiproliferativa está fuertemente relacionada con su actividad citotóxica. Por ejemplo Raju 2007 reporta que células de cáncer colorectal HCT-116 y osteosarcoma 1547 tratadas con diosgenina a una concentración de 35 μM , la citotoxicidad registrada fue del 50 %, evaluada por la técnica de MTT, mientras que para el selenio se encontró registrado que en su forma como Selenometilselenocisteína al aplicarla en una dosis de 85 μM causa una alta necrosis por citotoxicidad (Kim, 2001), mientras que en células K562 de leucemia al ser tratadas con una IC_{50} de 15 μM de diosgenina se registró una fuerte citotoxicidad (Liu *et al*, 2005). Con respecto al SeCN-D, en nuestros resultados éste presentó una actividad citotóxica de moderada a fuerte (24 – 80%) dependiendo de la línea celular, sugiriendo que la respuesta al compuesto depende de la sensibilidad de las células y el hecho de que las células HeLa están infectadas con el papiloma virus tipo 18 y presentan la mayor necrosis (80 %) que las otras líneas de CaCu con otro tipo de VPH o sin éste, lo cual podría indicar que existe una relación entre la respuesta al esteroide y el subtipo de VPH, de tal manera que las células tumorales de CaCu VPH 18 positivas podrían ser más sensibles al esteroide y ser eliminadas más rápido que aquellas que no son VPH 18 positivas. Sin embargo, es necesario realizar este mismo ensayo en un número mayor de líneas provenientes de CaCu VPH 18 así como VPH 16 y negativas al VPH, para confirmar esta hipótesis.

Desafortunadamente existe escasa información del efecto de las saponinas y de los compuestos selenados en células no tumorales que permitan establecer si estos compuestos presentan acción selectiva. Al respecto, nuestros resultados establecen que en células no tumorales, como en el caso de los linfocitos provenientes de sangre periférica humana, el potencial proliferativo fue afectado en un 22 % a 40 % con una concentración de 8.3 o 10.3 μM respectivamente, mientras que en las células fibroblásticas el efecto antiproliferativo fue de un 40 %, sugiriendo que las células no tumorales son menos sensibles que las células tumorales de CaCu a la actividad antiproliferativa del SeCN-D. Por otro lado y en relación a la actividad citotóxica del esteroide, las células linfocíticas no tumorales no fueron afectadas, sugiriendo que el efecto antiproliferativo observado en estas células al ser tratadas con el SeCN-D no es causado por una muerte necrótica o por su actividad citotóxica, además de establecer que las células tumorales son más sensibles a la actividad citotóxica del SeCN-D que las células no tumorales.

En cuanto al efecto en el ciclo celular, se ha reportado que la diosgenina detiene a las células de osteosarcoma humano 1547 en la fase S al ser tratadas con 40 μM (Trouillas *et al*, 2005), mientras que para las células de leucemia K562 al administrarles 12.5 μM las células se detienen en la fase G2/M. Específicamente en las células HeLa se ha descrito que la diosgenina no afecta su ciclo celular (Huo *et al*, 2004), lo cual no coincide con nuestros resultados pues el compuesto SeCN-D registra un decremento en la fase G1 para células HeLa, esto se puede deber al cambio en la estructura al adicionar el Se, en las células CaSki indujo un decremento en el porcentaje de células que se encuentran en G1 y G2/M, estableciendo un efecto dependiente del ciclo celular. Sin embargo para las células ViBo la acción del esteroide es independiente del ciclo. Estos resultados sugieren que el efecto antiproliferativo del SeCN-D en las células de CaCu podría ser dependiente o independiente del ciclo celular dependiendo de la línea celular o podría existir una relación entre el subtipo del VPH y el efecto en el ciclo celular, que explicaría que las células CaSki (VPH 16) y HeLa (VPH 18) son afectadas en su ciclo celular debido a la presencia de este subtipo de VPH, lo cual también tendría que confirmarse probando en un mayor número de líneas provenientes de CaCu positivas al VPH 16, 18 y sin VPH.

Con respecto a un efecto inductor de apoptosis se ha reportado que la diosgenina induce muerte por apoptosis en células de leucemia humana k562 con una IC_{50} de 12.5 μM (Min-Jie Lu *et al*, 2005), mientras que en células HeLa se indujo apoptosis con una IC_{50} de 30 μM (Huo *et al*, 2004). De igual manera en los compuestos selenados se ha reportado una actividad inductora de apoptosis, tal es el caso del compuesto 1,4fenilenebis (metileno) selenocianato, el cual indujo apoptosis en células de próstata C4-2 LNCap a una concentración de 7.6 μM (Facompre, 2010), mientras que el Se-metilselenocisteina indujo apoptosis en células de leucemia HL-60 a una concentración de 85 μM . En nuestro caso con SeCN-D, también observamos actividad inductora de apoptosis. En la mayoría de los compuestos publicados no se realiza una cuantificación de las células que están apoptóticas, quedando poco claro si la muerte por apoptosis realmente es

relevante en el efecto antiproliferativo del compuesto o si la apoptosis es generada en un pequeño porcentaje de la población celular, dejando a la actividad citotóxica o necrótica del compuesto como la vía principal que causa el efecto antiproliferativo. Sin embargo a diferencia de la mayoría de los compuestos que son aplicados en el tratamiento contra el cáncer, los cuales son citotóxicos y no selectivos, el SeCN-D ejerce una acción citotóxica selectiva mayor para las células de cáncer y menor para las normales (al menos para las células linfocíticas), abriendo la posibilidad de ser un digno candidato para ser evaluado *in vivo* como agente antitumoral.

Conclusiones.

- ❖ El esteroide SeCN-D (Diacetato de (25R)-22oxo-26selenocianocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo) presenta un efecto antiproliferativo en las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo, dependiente de la dosis.
- ❖
- ❖ Las IC₅₀ para las líneas tumorales son:
 - CaSki 9 μ g/ml
 - HeLa 6.15 μ g/ml
 - ViBo 5 μ g/ml
- ❖ El esteroide SeCN-D afecta de forma moderada el potencial proliferativo de los fibroblastos y linfocitos de sangre periférica humana.
- ❖ El esteroide SeCN-D presenta un efecto citotóxico para las tres líneas celulares de CaCu.
- ❖ Para células normales como son los linfocitos se determinó una citotoxicidad muy baja.
- ❖ El esteroide SeCN-D actúa sobre el ciclo celular para la línea CaSki registrando un decremento en la fase G1 y G2/M e incrementando la región Sub-G1. Mientras que para la línea HeLa se registra un decremento para la fase G1 y un incremento en la región Sub-G1.
- ❖ El esteroide SeCN-D no altera el ciclo celular en la línea ViBo.
- ❖ El esteroide SeCN-D induce una muerte por apoptosis a las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo a través de la expresión de la caspasa-3 activa y la fragmentación del ADN.

REFERENCIAS.

1. Abarca K. 2007. "Infección por virus papiloma humano y cáncer cervicouterino: ¿en las puertas de la prevención?". Boletín Escuela de Medicina U. C. Pontificia Universidad Católica de Chile. Volumen 32 número 1 Chile.
2. Aguilar E. 2008. "Tumores óseos y quimioterapia (Entrevista académica)". Medigraphic Artemisa en línea. Volumen 4 número 2.
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. 2004. "Biología molecular de la célula". 3ª edición. Ediciones Omega. España, 505 pp.
4. Alemán L. 2007. "Intervenciones de enfermería para la prevención del cáncer cervicouterino (CaCu)". Boletín informativo editado por el Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaría de Salud. Morelos, México.
5. Anaya A. 2003. "Ecología Química". Primera edición, Editorial Plaza y Valdés, España, 349 pp.
6. Arango M., Llanes L., Díaz T. y Faxas M. 1997. "La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula". Instituto de Oncología y Radiobiología. México.
7. Avendaño C. & Menéndez J. 2008. "Medicinal chemistry of anticancer drugs". Elsevier, Oxford, Reino Unido.
8. Avers C. 1991. "Biología celular". Editorial Iberoamérica, segunda edición, Estados Unidos de Norte América, 748 pp.
9. Berhow A. 2007. "Centro nacional de investigación de utilización agrícola". Revista Carcinogenesis. Volumen 26.
10. Blagosklonny M. 2003. "A new science-business paradigm in anticancer drug development". Trends in Biotechnology 21.
11. Burgués J. y Portones J. 2005. "Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en la resistencia a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga". Actas Urol. Volumen 29 número 9.
12. Caballero B. y Moran J. 2002. "Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica". Revista de educación bioquímica 21.
13. Cabane P. 2007. "Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad". Revista chilena de cirugía, Volumen 59 número 2.
14. Cameron R. 1995. "Oncología práctica". Primera edición. Editorial Panamericana, Argentina, 769 pp.
15. Cardona H. 1968. "Pesquisa del cáncer del cuello uterino". Revista Médica, Volumen 36.
16. Castilla V., Ramírez P. y Coto C. 2009. "Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales". Revista Química Viva 1.
17. Centro Nacional de Información Sobre la Salud de la Mujer, 2003. "Histerectomía: preguntas frecuentes" Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Oficina para la Salud de las Mujeres.
18. Colin-Valenzuela A., Ardhy N., Ávila R. y Barroso G. 2010. "Impacto del envejecimiento masculino en la capacidad funcional del espermatozoide a

- través de la expresión de fosfatidil serina y oligonucleomas". Ginecología Obstétrica, volumen 78 número 12.
19. Corbiere C. 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 número 22.
 20. Corbiere C. 2004. "Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (aif) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells". Cell research volumen 14 número 3.
 21. Coto C. 2007. "Inhibición de la Apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves". Revista Química Viva 6.
 22. Covarrubias G. 2000. "Osteosarcoma. Quimioterapia pre y posoperatoria: informe de 10 casos". Revista del Instituto Nacional de Cancerología, Volumen 46 número 4.
 23. Chun-Te C., Tzong-Der W., Shang-Jie T. & Jen-Kun L. 2007. "Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in her-overexpressing breast cancer cells through modulating akt, m tor and jnk phosphorylation". FEBS Letters número 581.
 24. Deng S. 1999. "First total synthesis of an exceptionally potent antitumor saponin osw-1". American Chemical Society.
 25. Doorbar J. 2006. "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer". Clinical Science número 110.
 26. Duffield A., Shureiqi I., Lippman S., Shureiqi I. & Lippman S. 2004. "Can selenium prevent colorectal cancer? A signpost from epidemiology". Journal of the national cancer institute. Volumen 96 número 22.
 27. Facompre N., El-Bayoumy K., Sun Y., Pinto J. & Sinha R. 2010. "1,4-phenylenebis (methylene) selenocyanate not selenomethionine, inhibits androgen receptor and Akt signaling in human prostate cancer cell". Cancer prevention & research volumen 3 número 8.
 28. Fernández M. 2010. "Síntesis de derivados esteroides con actividad biológica: compuestos anticancerígenos y promotores del crecimiento vegetal. Tesis de maestría Benemérita Universidad de Puebla.
 29. Feng L., Fernández P., Rajendran P., Hui K. & Sethi G. 2010. "Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells". Cancer Letters número 292.
 30. Fernández M., López H., Hernández J., López M., Escobar M., Sánchez L., Pinto M. & Sandoval 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 número 18.
 31. Fiala E., Staretz M., Pandya G., El-Bayoumy K. & Hamilton S. 1998. "Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methylation". Carcinogenesis Volumen 19 Número 4

32. Fichtner I., Claffey J., Deally A., Gleeson B., Hogan M., Markelova M., Müller H., Weber H. & Tacke M. 2010. "Antitumor activity of vanadocene Y and selenocyanate derivative in xenografted caki-1 tumors in mice". Journal of organometallic chemistry número 695.
33. Fitzgerald K. 2006. "Mechanisms of metastasis". Looking at Metastatic Movements whit the Oko-Light Time-Lapse Station and the Cellix's Vena Flux Platform.
34. Fleites G. 1999. "Dieta y cáncer del tiroides". Revista Cubana Oncol volumen 15 número 2.
35. Gupta S., Agrawal A., Agrawal S., Su H. & Gollapudi S. 2006. "A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis". Immunity & Ageing volumen 3.
36. Hanahan D. & Weinberg R. 2002. "Hallmarks of cancer". Asociación Española contra el Cáncer.
37. Hellman S. 1996. "Advancing current treatments for cancer". Scientific American número 275.
38. Hernández J. 2003. "Efectos adversos de la radioterapia en el tratamiento del cáncer de la mama". Revista del Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía Volumen 46 número 4.
39. Hernández M. 2005. "Efecto del selenio en ratones con cáncer experimental inducido con sarcoma 180". Ciencia e investigación volumen 8 número 2.
40. Hernández M. y Ríos M. 2009. "Rol biológico del Selenio en el humano". Revista Química Viva, No. 2 año 8.
41. Huo R., Zhou Q., Wang B., Tashiro S., Onodera S. & Ikejima T. 2004, "Diosgenin induces apoptosis in Hela cells via activation of caspase pathway". Acta Pharmacological Sinica, China-Japan.
42. INEGI. Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 10 enero del 2011. www.inegi.gob.mx
43. Jayadev R. 2007. "Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3methylglutaryl coa reductase espression and induces apoptosis in hct-116 human colon carcinoma cell". Cancer Letters número 3.
44. Johns H. & Cunningham J. 1981. "The physics of radiology". Tercera edición. Charles C. Thomas Publisher, USA. 1131 pp.
45. Karp G. 2005. "Biología celular y molecular conceptos y experimentos". Primera Edición, editorial Mc Grawn Hill Interamericana, México 746 pp.
46. Kim T., Jung U., Cho D. & Chung A. 2001. " Se-methylselenocysteine induce apoptosis through caspasa activation in HL-60 cells". Carcinogenesis Volumen 22 número 4.
47. Khoury S., Claude J. y García J. 1981. "Cáncer los grandes especialistas responden". Primera edición, Librería Hachelte, España, 452 pp.
48. Kueng W. 1989. "Quantification of cell culture on 96 well plates". Analycal biochemistry número 182.
49. Lautaro V. 1993. "Carcinoma adrenocortical virilizante: tratamiento quirúrgico y quimioterapia". Revista Chilena Pedriátrica volumen 64 número 6.

50. Lavelly R. 1995. "Principios en oncología radiante". En Oncología práctica, Editorial médica panamericana, Argentina.
51. Lee J., Jung K., Shik Y. & Park D. 2007. "Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling". Life Sciences número 81.
52. Lewis M. 2004. "Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América latina y el caribe". Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C.
53. Liu M., Wang Z., Ju Y., Ngok-Shun R. & Wu Q. 2005. "Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis". Cáncer Chemoterapy and Pharmacology, volumen 55 número 1.
54. Lozano J., Tarazona R. y Peña J. 2003. "Citotoxicidad" inmunología on line, <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/>.
55. Massagé J. 2009. "Evolución y metástasis del cáncer" dossier científico sebbm número 160.
56. Melo A., Montenegro S., Hooperlitalo T., Capurro V., Roa J. y Roa I. 2003. "Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile" Revista Médica Chilena número 131.
57. Mercer E. 1966. "Células y estructura celular" editorial Interamericana, segunda edición, México, 160 pp.
58. Ming- Jie L. 2004, "Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia k562 cell whit the disruption of ca homeostasis". Cancer Chemother Pharmacol.
59. Miyashita T. & Reed J. 1993. "BCL-2 oncoprotein blocks of chemotherapy induced apoptosis in human leukemia cell line". Blood 81, Journal of the American society hematology.
60. Moffitt K., Martin S. & Walker B. 2007. "The emerging role of serine proteases in apoptosis". Biochemical Society Transactions, volumen 35, parte 3.
61. Mora M. y Crespín M. 1992. "Conización del cuello uterino en patología cervical". Revista Médica Hondureña Volumen 60.
62. Murillo T. 2004. "Síntomas asociados al tratamiento con radioterapia". Psicosociología Volumen 1 números 2-3.
63. Nelson S. y Cox L. 2005. "Principios de bioquímica". Cuarta edición, Ediciones Omega, Barcelona, España. 160 pp.
64. Nanji A. & Hiller S. 1997. "Apoptosis and necrosis two types of cell death in alcoholic liver disease". Reseach Update Volumen 21 número 4.
65. Pazos A. 2007. "Pueden las vitaminas y minerales prevenir el cáncer" MIR 3 de Medicina Interna.CH. Xeral.
66. Paniagua R., Nistal M., Sesma M., Álvarez M., Anadón R., Fraile B, y Sáez F. 2007. "Biología molecular". Mc Grawn Hill, Interamericana. 381 pp.
67. Pardo F. 1998."Anatomía patología general y especia de las neoplasias". Editorial Científico-Medico, España.

68. Parkin M., Pisani P. & Ferlay J. 1999. "Estimates of the world wide incidence of 25 major cancers in 1990". *Int J Cáncer* número 80.
69. Pichardo R. 2001. "Aclaramiento ganglionar. Técnicas e indicaciones". Departamento de Anatomía Patológica e Investigación Biomédica. Fundación Clínica Médica Sur. México, D. F.
70. Quan H. & Koyanagi J. 2006. "Reactions of 26-iodopseudodiosgenin and 26-iodopseudodiosgenone with various nucleophiles and pharmacological activities of the products". *Chem. Pharm Bull* volumen 54 número 1.
71. Quezada M. 2007. "El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias". *Contactos* número 65, Licenciatura en Biología Experimental, UAM-I.
72. Raju J. & Bird R. 2007. "Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells" *Cancer Letters* número 255.
73. Reid M., Duffield A., Garland L., Turnbull B., Clark L. & Marshall J. 2002. "Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial". *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* Volumen 11.
74. Rieseberg M., Kasper C., Reardon K. & Scheper T. 2001. "Flow Cytometry in biotechnology". *Appl Microbiol Biotechnol* volumen 56.
75. Rivera R. 2006. "Mecanismos de infección y transformación neoplásica producida por virus papiloma humano en el epitelio cervical". *Revista Chilena Ohster Ginecol* número 71.
76. Rodilla F. 2010. "Mecanismos de acción antitumoral". *Boletín oncológico del área sanitaria de Teruel* número 15.
77. Saavedra A. y Lisano M. 2006. "Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina". *Cancerología* 1.
78. Salgado M. 2002. "Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)". Universidad Nacional Autónoma de México, curso de métodos en biotecnología.
79. Sánchez-Torres L. y Diosdado F. 2003. "Apoptosis: el fenómeno y su determinación". *Téc Pecú Méx*, volumen 41 número 1.
80. Sánchez V. 2001. "Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica", *Revista Cubana Investigación Biomédica*.
81. Sandoval B. y Santillán T. 2005. "Criocirugía en el tratamiento de lesiones cosméticas de la piel". *Folia Dermatol Perú* volumen 16 número 1.
82. Serrano J. 2009. Trabajo en grado- "Estudio multivariable sobre actividad física estrés oxidativo, inflamación y daño muscular". Universidad de Granada, Instituto de Biotecnología, Facultad de medicina.
83. Serman F. 2002. "Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus" *Rev Chil Obstet Ginecol* volumen 67 número 4.
84. Shaojiang D., Yu B., Lou Y. & Hui Y. 1999. "First total synthesis of an exceptionally potent antitumor saponin, osw-1". *American Chemical Society. J. Org Chem* número 64.

85. Shishodia S. & Aggarwal B. 2006. "Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of akt, ikk kinase activation and nf-kb-regulated gene expression" Nature Publishing Group, Oncogene 10. Tx, USA.
86. Soon O., Fiala E., Upadhyaya P., Chae Y. & El-Bayoumy K. 1999. "Comparative effects of phenylenebis (methylene) selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats". Carcinogenesis Volumen 20 número 4.
87. Solórzano E. 2002. "Un mineral que reduce el 52% de probabilidad de contraer cáncer" Terapia Bioquímica Nutricional.
88. Tapiero H. & Townsend D. 2003. "The antioxidant role of selenium and seleno-compounds". Biomedicine & pharmacotherapy número 57.
89. Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J. & Beneytout J. 2005. "Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin". Science direct, Bioorganic & Medical Chemistry, Francia.
90. Vargas L., Vivanco X., Cuello X., Abodovsky N., Ossanden F., Sirebrenik S. y Franco C. 1993. "Carcinoma adrenocortical virilizante: tratamiento quirúrgico y quimioterapia" Revista Chilena de Pediatría. Volumen 64 número 6.
91. Wael M., Hussin W. & Franklin M. 2007. "The antimutagenicity of 2-substituted selenazolidine-4-(r)-carboxylic acids". Mutat Res volumen 627 número 2.
92. Wu J., Lyons G., Graham R. & Fenech M. 2009. "The effect of selenium as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis block micronucleus cytome assay". Mutagenesis volumen 24 número 3.

APÉNDICE

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

Sales inorgánicas	Cantidad (g/l)
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0.8
Aminoácidos	
L-Arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina • 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-leucina	0.05
L-Lisina • HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-serina	0.03
L-treonina	0.02
L-triptófano	0.005
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.02883
L-valina	0.02
Vitaminas	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
myo-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
ácido p-aminobenzoico	0.001
D-ácido pantoténico (hemicalcium)	0.00025
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Otros	
Glutación (reducido)	0.001

Rojo de fenol • Na	0.0053
Adicionar Bicarbonato de Sodio	2

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.04 g (SIGMA, U.S.A)
Etilen – diamen- tetra- acético (EDTA)	0.40 g (SIGMA, 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, U.S.A)
Cloruro de calcio	0.10 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de sodio	8.00 g (SIGMA, U.S.A)
Cloruro de potasio	0.20 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato mono ácido de sodio	2.16 g (SIGMA, U.S.A)
Fosfato di ácido de potasio	0.20 g (SIGMA, USA)

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, sí 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 minutos 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 μ l 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 carboxifluoreceína,

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

Tabla 2. Condiciones del ensayo de linfocitos con Carboxifluoresceína (CSFE) y fitohemaglutinina (PHA).