



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ)

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER.

LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**Efecto antiproliferativo y apoptótico de la saponina
(20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -colestan-
26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu) en células
provenientes 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:

ESMERALDA PÉREZ CERVANTES

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

Asesor interno M. en C. Luis Sánchez Sánchez



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*La ciencia es producto del amor... Si del amor al mundo,
a nuestros seres queridos y a nosotros mismo. Ésta tesis es
dedicada a mis abuelitas:*

*Luci† el cáncer invadió su cuerpo, pero nunca doblego
su espíritu y Felicitas† que luchó hasta el final contra ésta
enfermedad.*

*A mis padres, por apoyarme incondicionalmente
en mis decisiones y enseñarme a luchar por mis sueños.*

*A mis hermanos, por ser mis mejores amigos y
animarme todos los días de mi vida.*

A Julio por su amor, comprensión y paciencia.

*A mis amigas, por dejarme compartir
mi vida con ellas y por confiarme la suyas.*

*A mis amigos, por acompañarme en
éste camino y hacerlo divertido.*

Agradecimientos

Al M. en C. Hugo López Muñoz, por darme su tiempo y ser siempre muy amable con sus correcciones.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por abrirme las puertas a éste laboratorio, y por tenerme toda la paciencia del mundo para enseñarme y corregirme.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández, por hacerme ver mis errores y compartir sus conocimientos conmigo.

A la Dra. María Luisa Escobar, por explicarme siempre con su paciencia y por su singular forma de reprenderme.

Al Dr. Benny Weiss Steyder, y a *la Dra. Ma. de Lourdes Mora García*, gracias a sus observaciones pude concluir ésta tesis.

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

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

A mis compañeros de laboratorio, gracias por su apoyo, sin él no hubiera terminado ésta tesis.

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

ÍNDICE

RESUMEN.....	-1-
INTRODUCCIÓN.....	-2-
MARCO TEÓRICO.....	-3-
La célula.....	-3-
Ciclo celular.....	-4-
Control del ciclo celular.....	-6-
Puntos de regulación de ciclo celular.....	-7-
Muerte celular.....	-7-
Necrosis.....	-8-
Apoptosis.....	-8-
El cáncer.....	-11-
El cáncer cervicouterino (CaCu).....	-12-
Terapia del cáncer.....	-15-
Cirugía.....	-15-
Radiación.....	-15-
Quimioterapia.....	-15-
Esteroides.....	-16-
Saponinas.....	-16-
Hecogenina.....	-17-
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	-19-
JUSTIFICACIÓN.....	-20-
HIPÓTESIS.....	-21-
OBJETIVO GENERAL.....	-22-
OBJETIVOS PARTICULARES.....	-22-
MÉTODO.....	-23-
RESULTADOS.....	-29-
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	-40-
CONCLUSIONES.....	-43-
LITERATURA CITADA.....	-44-
APÉNDICE.....	-50-

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad con alta mortalidad en nuestro país, ocupando el segundo lugar, después del cáncer de mama. Dependiendo del estadio de la enfermedad existen distintos tratamientos. Los tratamientos actuales afectan tanto a células tumorales como a normales, además de ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y con efectos secundarios graves. Éste hecho genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial antitumoral. Actualmente se tiene un gran interés en alternativas basadas en compuestos de origen vegetal y especialmente en saponinas esteroides como la Hecogenina y sus derivados, ya que se les han adjudicado actividades biológicas diversas, entre las que se destaca su actividad antitumoral. La Hecogenina, aislada del *Agave sisalana*, es una saponina esteroideal no glicosilada, se le atribuye actividad antitumoral en células de osteosarcoma 1547, inhibe la proliferación en células de CaCu HeLa, además de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana y no producir efecto toxico en linfocitos humanos. En éste trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis del derivado hecogenínico (20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -coleston-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu) en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Al respecto, la IC₅₀ en las células HeLa y CaSki fue de 45 μ g/ml y de 29 μ g/ml para las células ViBo. El ciclo celular de las tres líneas se ve afectado por el tratamiento con las IC₅₀ de 26-OH-He-Glu. En las células HeLa el compuesto detiene el ciclo celular en G1 y disminuye la distribución de ADN en la fase S, en CaSki disminuye la fase G2/M y en las células ViBo en la fase G1, mostrando un incremento en la región sub-G1 para ambas líneas. Lo anterior indica que el compuesto ejerce un efecto dependiente de ciclo celular. El compuesto produce una liberación de LDH en las líneas HeLa, CaSki y ViBo en un 17.15%, 24.44% y 0.79% respectivamente, indicando que en un porcentaje las células están muriendo por necrosis y en linfocitos no produce dicho efecto. El incremento en la expresión de caspasa 3 activa así como la observación de la fragmentación del ADN determinadas por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente, sugiere que el 26-OH-He-Glu induce muerte por apoptosis. La evaluación del efecto del compuesto en células no tumorales (fibroblastos y linfocitos), establece que el 26-OH-He-Glu disminuye solo un 15% el porcentaje celular en fibroblastos, mientras que en las células linfocíticas no afecta su proliferación, lo que indica acción selectiva del compuesto, que permite proponerlo como agente con un fuerte potencial anticancerígeno. Por los resultados anteriores las perspectivas de éste compuesto son: evaluar el efecto del compuesto en más líneas celulares de CaCu y otros tipos de cáncer con intención de determinar si el efecto apoptótico y antiproliferativo es independiente del tipo de cáncer, en células epiteliales no tumorales de cérvix, en modelos *in vivo* y la posible ruta a través de la cual ejerce su efecto.

INTRODUCCIÓN

En México el CaCu es la segunda causa de defunción por neoplasias malignas particularmente en mujeres de 25 a 64 años con el 13.9% del total defunciones y 4114 muertes (INEGI, 2006; Diario Oficial de la Federación, 2007). Los factores de riesgo relacionados con el cáncer cervicouterino que informa el Instituto Nacional de Cancerología en México son: infección cérvico-vaginal por virus del papiloma humano (VPH) de “alto riesgo”, tabaquismo, infección con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infecciones de transmisión sexual, múltiples embarazos, el uso de píldoras anticonceptivas y antecedentes familiares de CaCu. La prueba citológica de Papanicolaou sigue dando la pauta para el diagnóstico de lesiones cervicales precancerosas y/o la detección del carcinoma invasor, al igual que técnicas complementarias como colposcopia, biopsia, tipificación viral e inmuno-histoquímica (Serman, 2002). Los tratamiento, como la cirugía, la radiación y la quimioterapia para el cáncer cervicouterino ha mejorado en las últimas tres décadas, pero la alta toxicidad de los fármacos usados en la quimioterapia causan una reducción en la calidad de vida de las pacientes ya que se llega a afectar también a células normales, por lo que se siguen buscando nuevas alternativas que sean más selectivas. Por tal motivo en el presente trabajo se determina el efecto antiproliferativo y apoptótico del compuesto (20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -coleston-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu), derivado de la hecogenina, saponina extraída del *Agave sisalana* a la que se le atribuye actividad antitumoral en cultivos de células de CaCu HeLa (Mimaki *et al.*, 1996) y osteosarcoma 1547 (Trouillas, *et al.*, 2005), además de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana (Liagre *et al.*, 2007) y no ser toxica para linfocitos humanos (Camoutsis *et al.*, 2005). Previo en la síntesis del 26-OH-He-Glu encontramos a el compuesto diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -coleston-3 β -diilo (26-OH-He), el cual presenta actividad en la línea celular CaSki y difícil solubilidad en acetato de etilo (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010), por lo que se agregó una glucosa para aumentar la solubilidad y la biodisposición en las células. El 26-OH-He-Glu fue probado en las líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, analizando cómo afecta la proliferación celular y el tipo de muerte celular que provoca en las células, apoptosis o necrosis, además se determina si el compuesto afecta la proliferación de cultivos de fibroblastos y a linfocitos humanos como parámetro de comparación en células normales. Con el antecedente del compuesto 25-OH-He se espera encontrar actividad antiproliferativa y apoptótica en al compuesto 26-OH-He-Glu.

MARCO TEÓRICO

La célula

La célula es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos (Curtis y Barnes, 2005), la célula cuenta con diferentes organelos que le permiten realizar todas sus funciones (figura 1). En 1838, Theodor Schwann y Matthias Schleiden propusieron, mediante la teoría celular, que todos los organismos vivos se componen de una o más células que proceden de la división de células preexistentes (Murray y Hunt, 1993).

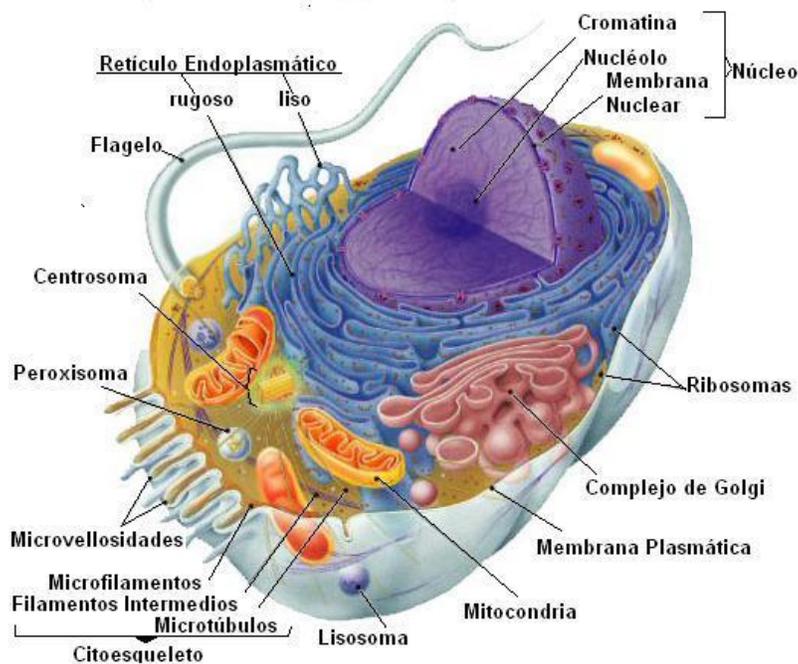


Figura 1. Célula animal, donde se muestran los organelos (tomada y modificada Quintana, 2000).

Las células regulan su medio interno, lo que les permite crecer, proliferar, dividirse y morir; los mecanismos de muerte pueden ser: necrosis o apoptosis y el mecanismo que les permite replicarse y dividirse es el ciclo celular; en el cual la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide (Alberts *et al.*, 2002). En la proliferación celular se incrementa el número de células por división celular (Sánchez, 2001), el control de la proliferación, la división y la muerte celular son esenciales para el correcto funcionamiento del organismo.

Ciclo celular

El ciclo celular comprende un proceso en secuencia ordenada que permite que la célula se divida, el tiempo que transcurre desde que ocurrió una mitosis hasta que vuelve a presentarse, varía mucho de un tipo de célula a otro. La mayoría de las células de un mamífero tienen ciclos celulares que duran 24 horas (Alberts, *et al.*, 2002). La regulación precisa del ciclo celular es esencial para que una célula genere progenie con un genoma intacto y funcional. El crecimiento celular y la replicación del ADN deben estar cuidadosamente coordinados para que el ciclo progrese de manera armoniosa (Álvarez, 2007).

El ciclo celular se divide en varias fases. La mitosis (fase M) consiste en la división celular, que en la mayoría de las células dura aproximadamente 1 hora. El resto del ciclo celular se conoce como interfase, y durante la misma se producirá la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el crecimiento celular. La replicación de ADN nuclear sucede durante la fase de síntesis (fase S) de la interfase. El intervalo entre la fase M y S se conoce como G1 (gap 1), y el intervalo entre la fase S y M como G2 (gap 2). Las fases G1 y G2 permiten el tiempo suficiente no sólo para el crecimiento celular sino también para asegurar un control correcto del desarrollo del ciclo celular, así como verificar la integridad del ADN que se incorpora antes de la división final de la célula (Baynes y Dominiczak, 2008).

De manera general los eventos que se llevan a cabo durante el ciclo celular son los siguientes, (figura 2):

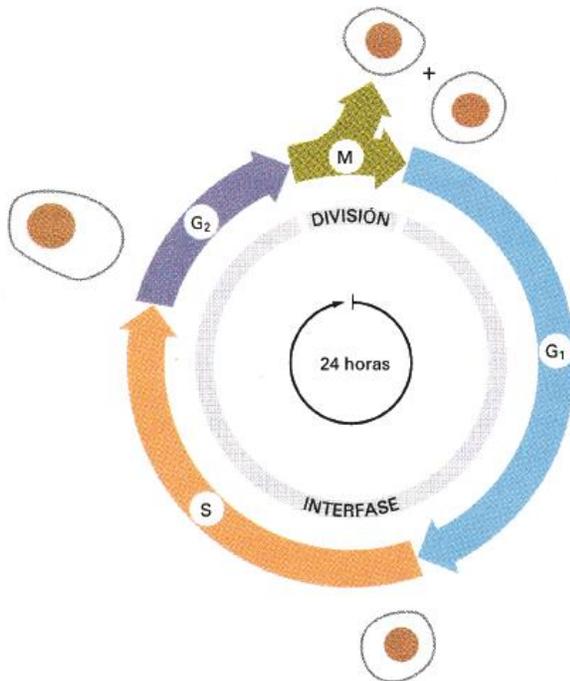


Figura 2. Las cuatro fases sucesivas del ciclo celular de una célula eucariota típica. (Alberts, *et al.*, 2002).

1. Interfase

- a) G1: Durante éste periodo la célula es metabólicamente activa, crece, pero no replica su material genético. La célula recolecta nutrientes y factores de crecimiento a partir del torrente sanguíneo. La duración de esta fase en cultivos de células es altamente variable, va desde 6 horas hasta más de 24 horas, a diferencia de la uniformidad en el tiempo de las otras fases (Alvarado y Mayani, 2007).
 - b) S: Durante esta fase el ADN se replica. Al inicio de esta fase se ha superado el punto de restricción (R), ya que la célula detecta que se encuentra en las condiciones apropiadas de temperatura, nutrientes, factores de crecimiento y tamaño necesarios para iniciar la síntesis de ADN. También, aumentan las enzimas que participan en la replicación del ADN y se desplazan del citoplasma al núcleo para iniciar la replicación del genoma. A cada célula le toma entre 6-8 horas replicar cerca de 40 000 genes agrupados en 23 pares de cromosomas. En esta fase, si hay daño al ADN, la célula detiene la replicación hasta que dicho daño se ha reparado, y si no es posible reparar dicho daño la célula activa mecanismos de muerte celular programada. (González, 2009).
 - c) G2: Puede durar varias horas, probablemente para producir más ARN, enzimas y proteínas necesarias al final de la división en cada célula. En promedio en las células de mamíferos dura aproximadamente 2 horas. Una célula que era diploide ($2n$) en éste momento se observa tetraploide ($4n$). La célula debe comprobar que ha replicado su ADN completamente y que lo ha hecho una sola vez. La célula sigue creciendo y se sintetizan proteínas que se necesitan para la división (González, 2009).
2. Mitosis: La mitosis, denominada fase M, tiene una duración menor a una hora y está subdividida en varios estadios. En esta fase, los cromosomas duplicados se condensan, la membrana nuclear se desintegra y los cromosomas se segregan en cantidades equivalentes mediante estructuras de tubulina (huso mitótico). Posteriormente, el huso mitótico se desensambla y se forman dos núcleos con sus respectivos cromosomas. Finalmente, inicia la citocinesis o división celular para formar dos células hijas con la misma información genética (Alison, 2002; Alberts *et al.*, 2002).

Si al término de la fase M la célula no recibe los estímulos adecuados para iniciar el proceso de replicación y seguir a la fase G1, ésta puede pasar a G0, el cual es un lapso en la que la célula es metabólicamente activa. Algunos tipos de células se quedan en G0, como es el caso de las neuronas.

Control del ciclo celular

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en los complejos proteicos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina) (figura 3) (Baynes y Dominiczak, 2008). Las cinasas dependientes de ciclinas dirigen la transición de las células, de una fase a la siguiente. Estas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas de serina/treonina y por medio de fosforilaciones activan secuencialmente la maquinaria del ciclo celular. Existen diferentes tipos de CDKs (CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 principalmente) aunque las concentraciones cambian a lo largo del ciclo, la actividad cinasa de cada una, se inicia en eventos particulares de cada fase (Ortega *et al.*, 2002).

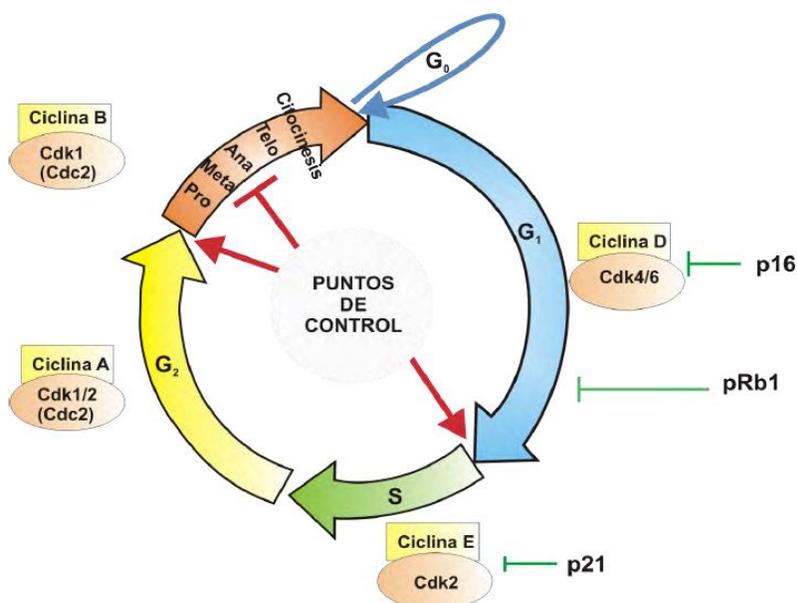


Figura 3. Regulación del ciclo celular. La activación estimuladora de los factores de crecimiento conlleva la activación dependiente de ciclinas de las fases del ciclo, mediante las CDK y sus inhibidores. CDK= cinasa dependiente de ciclina; Rb= proteína del retinoblastoma, y puntos de control del ciclo celular (tomada y modificada de Alberts *et al.*, 2002; Baynes y Dominiczak, 2008).

En su estado monomérico las CDKs son inactivas. Su principal forma de activación es la unión a subunidades reguladoras, llamadas ciclinas (ciclinas D, ciclina E, ciclina A y ciclina B). Las ciclinas D son sintetizadas en la fase G₁. La ciclina E se sintetiza al final de la fase G₁ alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase G₁ a fase S y se degrada durante la fase S. La ciclina A se sintetiza al inicio de la fase S, alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase S a G₂ y se degrada en la fase M (Alberts, *et al.*, 2002).

Puntos de regulación de ciclo celular.

La progresión del ciclo celular está estrictamente regulado para asegurar que el paso (la transición de una fase a otra) sólo se realice si los eventos de la etapa previa han concluido. El sistema de control está regulado por puntos de control que pueden detener el ciclo en puntos específicos. Los puntos de control que detectan el daño del ADN los podemos encontrar en G1/S, en G2/M y en M (figura 3). Estos puntos de control facilitan la reparación del ADN y promueven la muerte celular en células sin reparar (Bucher y Britten, 2008).

Muerte celular

El tamaño y la forma de un organismo pluricelular están determinados por procesos de proliferación y muerte celular. Además la exposición a sustancias tóxicas y ambientes nocivos también pueden producir muerte celular (Von-Bernhardi, 2004). Los dos tipos, más estudiados, de muerte celular que se reconocen en los organismos son la necrosis y la apoptosis. La primera tiene un carácter patológico y se desencadena tras un daño celular extremo (por falta de oxígeno o envenenamiento, por ejemplo), que daña irreversiblemente el funcionamiento de la célula (Paniagua, 2007). En la segunda muerte las células moribundas disminuyen de tamaño, se condensan y luego se fragmentan, liberando pequeños cuerpos apoptóticos limitados por membranas, que generalmente son absorbidos por otras células (figura 4). El núcleo se condensa y el DNA se fragmenta (Lodish *et al.*, 2005).

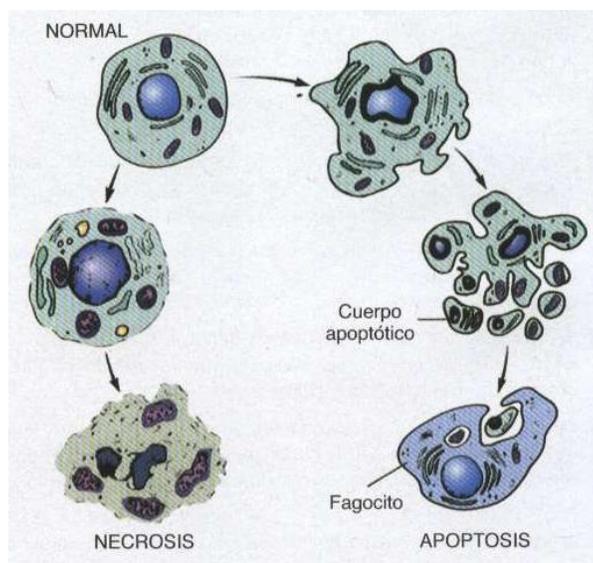


Figura 4. Cambios ultraestructurales secuenciales que se observa en la necrosis (izquierda) y la apoptosis (derecha) (Robbins *et al.*, 1993).

Necrosis

La necrosis, también llamada muerte celular patológica o accidental, ocurre cuando las células son expuestas a una variación extrema de las condiciones fisiológicas (ejemplo hipoxia) lo cual puede resultar en un daño a la membrana plasmática (Majno, 1995). La necrosis comienza con una incapacidad de las células para mantener la homeostasis, dirigiéndolas a una pérdida de la permeabilidad de la membrana y la consiguiente entrada de iones extracelulares y agua. La célula se hincha y se rompe (lisis). Debido a esta lisis los contenidos citoplasmáticos, incluyendo enzimas liposomales, son liberados a la matriz extracelular, por lo que la necrosis está asociada a un daño extensivo a tejidos, lo que origina una respuesta inflamatoria extensa (Williams, 1991).

Apoptosis

La muerte celular durante el desarrollo normal de los animales fue descrita por Gluscksmann en 1951. Más tarde, en 1971, Kerr y colaboradores estudiaron la ultraestructura del proceso y lo denominaron apoptosis. En la actualidad, éste término se usa como sinónimo de muerte celular programada (Paniagua, 2007).

La apoptosis es importante en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos entre ellos: destrucción programada de la célula durante la embriogénesis como ocurre en la implantación, organogénesis e involución del desarrollo de un individuo; involución fisiológica dependiente de hormonas, como el endometrio durante el ciclo menstrual y pérdida de células en poblaciones proliferantes como epitelio de las criptas intestinales (Robbins *et al.*, 1993). La membrana plasmática de la célula permanece intacta, pero su estructura resulta alterada ya que ocurre un encogimiento, condensación de la cromatina, aberturas, desensamblaje de la membrana mediante vesículas llamadas cuerpos apoptóticos que inducen una rápida fagocitosis por las células vecinas. La acumulación de esteroides en la membrana plasmática y la traslocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana sirven como marcadores de célula apoptótica para su posterior eliminación vía fagocitosis por las células vecinas y macrófagos (Baynes y Dominiczak, 2008). La apoptosis es un mecanismo importante por el cual compuestos antitumorales ejercen su efecto en células tumorales (Kim *et al.*, 2002).

La apoptosis puede ocurrir en la célula por diferentes vías, las principales que han sido descritas hasta el momento son: la vía extrínseca, también llamada vía del receptor de muerte y la vía intrínseca o mediada por la mitocondria (figura 5), causando la activación de enzimas inductoras y efectoras llamadas caspasas. La apoptosis se puede dividir en fase de iniciación (las caspasas se activan) y en una fase de ejecución, cuando las enzimas causan la muerte celular (Stevens y Lowe, 2001).

Vía extrínseca

Los receptores de muerte son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), receptores TNF tipo 1 y Fas; tienen un dominio de muerte citoplasmático implicado en las interacciones proteína-proteína. La formación de entrecruzamiento de ligandos externos es causa de que estos receptores se polimericen para formar sitios de unión para las proteínas adaptadoras que, a su vez, aproximan múltiples moléculas de caspasa 8 inactivas. Que posteriormente activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Mitchell *et al.*, 2007). También la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C, generando con Apaf-1 el apoptosoma y activación de la vía intrínseca.

Vía intrínseca

En esta vía se aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial y se liberan moléculas proapoptóticas al citoplasma; no se encuentran implicados los receptores de muerte. Más de 20 proteínas de la familia de proteínas Bcl-2 funcionan normalmente para regular la apoptosis; las dos proteínas antiapoptóticas son Bcl-2 y Bcl-x. Cuando las células se ven privadas de las señales de supervivencia o sometidas a estrés, Bcl-2 y Bcl-x se pierden en la membrana mitocondrial y son sustituidos por los miembros proapoptóticos de la familia (Bak, Bax y Bim). Al disminuir los niveles de Bcl-2/Bcl-x, aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con lo que se produce una fuga de varias proteínas que pueden activar caspasas, entre las que se encuentra el citocromo c, que es liberado se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de apoptosis) y el complejo desencadena la activación de la caspasa-9, formando el llamado apoptosoma. La esencia de la vía intrínseca es un equilibrio entre las moléculas proapoptóticas: Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, NOXA y PUMA. Las moléculas protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w (Mitchell *et al.*, 2007).

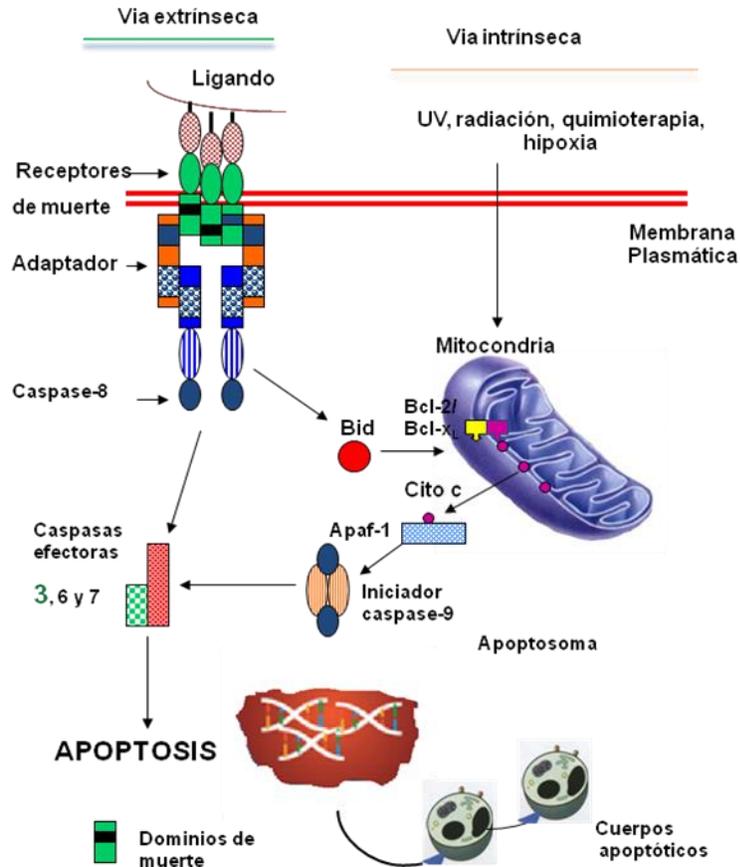


Figura 5. Vías, extrínseca e intrínseca de la muerte por apoptosis (Imagen tomada y modificada de Gupta *et al.*, 2006)

En ambas vías apoptóticas una vez que la caspasa 9 o la caspasa 8 adquieren actividad proteolítica, convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, principalmente la caspasa 3, las cuales inician el proceso de muerte celular; escindiendo los diferentes sustratos de muerte. En éste punto la apoptosis es irreversible (Gupta *et al.*, 2006; Elmore, 2007).

Numerosos trabajos reportados en la literatura han señalado que los fármacos tales como el taxol, vinblastina, etopósido (McCloskey *et al.*, 1996), topotecán (Tolis *et al.*, 1999) y compuestos antitumorales de origen natural (Kathleen, 2001) inducen la muerte en células neoplásicas a través de apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kaufmann y Earnshaw, 2000).

Se ha descrito que las células incapaces de experimentar apoptosis pueden ser más susceptibles a la acumulación de alteraciones genéticas que las células normales (Bargou *et al.*, 1995). Éste es uno de los mecanismos involucrados en la progresión del cáncer y en la resistencia de los tumores a la quimioterapia o radioterapia (Sierra *et al.*, 2000).

El cáncer

El término cáncer (del latín cangrejo) se usa para definir a una enfermedad que es caracterizada por un desequilibrio entre la división y la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2000), con una proliferación celular incontrolada. Las células neoplásicas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, proceso llamado metástasis (National Cancer Institute, 2009). Ya en la antigüedad, el cáncer intrigaba a los médicos. Fue Hipócrates —el padre de la medicina— quien en el año 400 a.C. le dio su nombre, *cancrum*. Lo eligió por analogía con un cangrejo por la imagen que adquirirían los vasos sanguíneos de los tumores, similar a pinzas o garras que se adhieren con tenacidad a los tejidos normales (Dosne, 2007).

El desarrollo del cáncer representa interacciones complejas entre factores ambientales, la respuesta inmunológica y características genéticas de cada individuo. Debido a su etiología multifactorial, la carcinogénesis representa un gran reto para la investigación (Hidalgo y Salcedo, 2001). Las mutaciones pueden ser heredadas o adquiridas debido a varios factores, como son: las radiaciones ionizantes, la acción hormonal, carcinógenos y virus. Por lo tanto, las características malignas se manifiestan en grados variables a medida que se desarrolla el padecimiento. Las mutaciones pueden producir proteínas alteradas que ganan o pierden funciones, como: La activación de protooncogenes a oncogenes, inactivación o pérdida de genes supresores de tumores, defectos en la apoptosis y defectos en la maquinaria de reparación celular.

Como consecuencia de todas las alteraciones que le ocurren a la célula normal, la célula cancerosa adquiere progresivamente las siguientes características: Desregulación de las vías de señalización celular. Proliferación desregulada, debido a anomalías del ciclo celular y la apoptosis.

En algunos casos, las células del tumor primario migran hacia nuevos sitios (metástasis) donde producen tumores secundarios que con frecuencia tienen el más alto impacto sobre la salud. La metástasis es un proceso complejo con muchos pasos. La invasión de nuevos tejidos no es aleatoria y depende de la naturaleza del tejido invadido. La metástasis se facilita si las células tumorales producen factores de crecimiento y de angiogénesis (inductores del crecimiento de vasos sanguíneos). Las células forma flexible, móviles, invasivas y que se agregan son las más peligrosas. Los tejidos atacados son más vulnerables si producen factores de crecimiento y hacen crecer las nuevas venas. Son más resistentes si producen factores antiproliferativos, inhibidores de enzimas proteolíticas y factores antiangiogénesis (Lodish *et al.*, 2005).

Se han descrito más de 100 tipos distintos de cáncer. Las leucemias y linfomas se producen a partir de las células formadoras de la sangre que residen en la medula ósea y en los tejidos linfáticos (Boticario, 2005). Los sarcomas que afectan a tejido conjuntivo. Los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90% de los cánceres y que se generan en los epitelios. Por lo general, estos tumores ocurren en edad avanzada y pueden incrementarse hasta 1000 veces entre los veinte y los sesenta años. Entre ellos los más comunes son los que afectan a pulmón, intestino grueso, mamas y cuello uterino (National Cancer Institute, 2009).

El cáncer cervicouterino (CaCu)

El CaCu es, en el ámbito mundial, el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres, siendo precedido por el cáncer de mama (Waggoner, 2003). Se estima que el cáncer cervicouterino causa alrededor de 500,000 muertes al año en el mundo. En países en desarrollo, su incidencia llega hasta 40 por cada 100,000 mujeres (Serman, 2002).

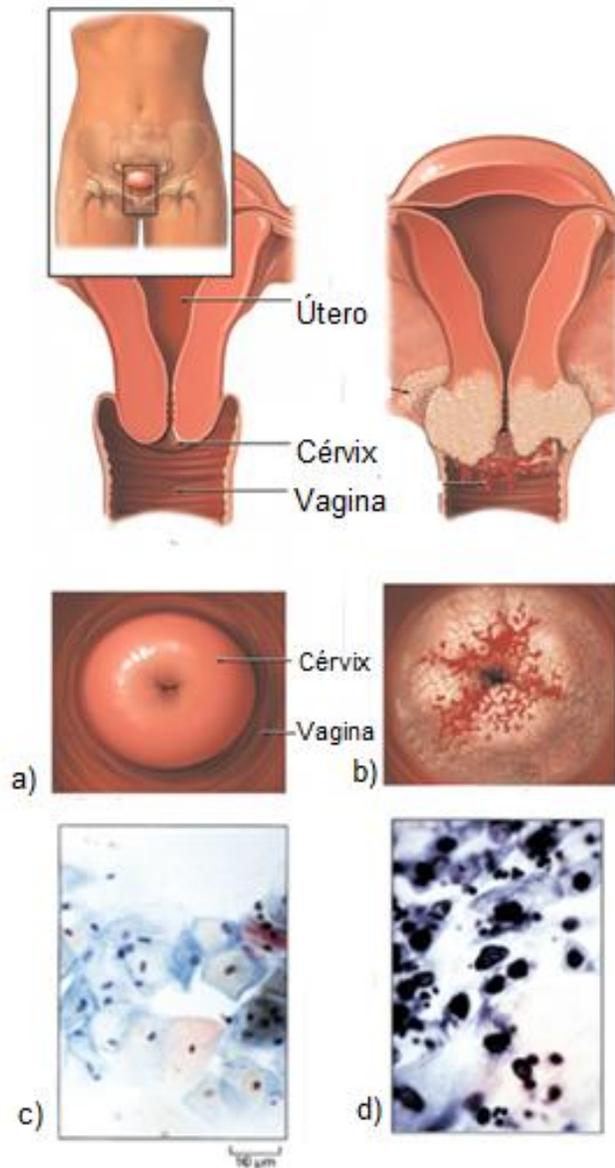


Figura 6. a) Anatomía de cérvix normal, b) cáncer de cérvix estadio IIB, c) células normales y d) células de carcinoma invasivo. (Imagen tomada y modificada de Tribal Connections, 2006; Alberts et al., 2002).

En los últimos años se ha ido atenuando la marcada declinación en la mortalidad lograda hasta mediados de la década del 80, lograda principalmente en los países desarrollados gracias al aumento de disponibilidad de programas de detección como la prueba de Papanicolaou (figura 6) (Suárez y Rojas, 2001). En la mayoría de los países, la incidencia del cáncer invasor del cuello uterino, es muy baja en las mujeres menores de 25 años. La incidencia aumenta alrededor de los 35 a 40 años y alcanza un máximo en las mujeres de entre 50 y 70 años de edad (Herdman y Sherris, 2002).

El cuello uterino o cérvix, es la parte inferior o abertura del útero (figura 6). El cuello uterino está compuesto por ectocérvix y endocérvix. El ectocérvix es la porción vaginal del cérvix que se extiende hacia el orificio cervical. En el cuello uterino se encuentran dos tipos de epitelio: el epitelio escamoso no queratinizado que recubre la superficie vaginal del ectocérvix y el epitelio columnar mucosecretor, que constituye el recubrimiento epitelial del endocérvix. Existe una zona en el cuello uterino, en donde los dos epitelios se unen en un punto llamado unión escamo-columnar en la cual se encuentra la zona de transformación (ZT), en donde el epitelio escamoso se encuentra en constante transformación hacia el epitelio columnar (Amador, 2009).

El cáncer cervical es un tumor epitelial, que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La dispersión de la parte superior de la vagina, los parametrios, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación. Los casos de cáncer de cuello uterino primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano o del epitelio glandular. Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en grado de diferenciación y características morfológicas (Toro, 2006).

El cáncer de cuello uterino de origen escamoso o tipo epidermoide surge de lesiones precancerosas bien definidas como lo son las lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) o neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que constituyen un espectro de alteraciones no invasoras asociadas a la infección por virus papiloma humano. Abarcan desde las alteraciones displásicas leves y las propias de dicha infección viral, a nivel del tercio inferior del epitelio escamoso (LIE de bajo grado) hasta aquellas alteraciones que ocupan la totalidad espesor epitelial (LIE de alto grado, carcinoma *in situ*), siempre confinadas al epitelio, con la membrana basal intacta. El adenocarcinoma de cuello uterino surge de las células de reserva subcolumnares pluripotenciales del epitelio columnar endocervical y es el adenocarcinoma *in situ* el precursor inmediato del adenocarcinoma invasor del cérvix. El carcinoma epidermoide es el tipo histológico más frecuentemente diagnosticado (Toro, 2006).

La causa principal del cáncer de cérvix es el virus del papiloma humano (VPH), una infección de transmisión sexual común. No obstante, es importante reconocer que menos de 5% de las mujeres infectadas por el VPH contraen el cáncer cervicouterino si no tienen acceso al tratamiento. Ciertos subtipos genéticos del VPH están asociados más estrechamente con el cáncer cervicouterino y la infección persistente por el VPH tiende a progresar con mayor frecuencia a la displasia de grado alto y al cáncer. El consumo de tabaco puede influir si una mujer con displasia tiene tendencia a desarrollar cáncer cervicouterino. La inmunosupresión, en especial la relacionada con la infección por VIH, también es un factor predisponente. Algunos factores hormonales (como los que ocurren en el parto), un parto a edad temprana, numerosos partos y el uso de anticonceptivos hormonales también influyen. La mayoría de los demás factores que se consideran asociados al CaCu, como la edad en que se tiene la primera relación sexual y el número de parejas sexuales, muy probablemente sean indicadores de exposición al VPH más que factores de riesgo propiamente dichos (Herdman y Sherris, 2002).

Los VPH, se han clasificado en virus de alto o bajo riesgo, de acuerdo a su potencial oncogénico que presentan para el desarrollo de lesiones cancerosas. Dentro de esta clasificación podemos encontrar ejemplos representativos de cada grupo en la siguiente tabla (Tjalma, *et al*, 2004).

Riesgo	Tipo de VPH
Ato	16,18 , 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82.
Bajo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Tabla 1. Principales VPH de alto y bajo riesgo oncogénico (Tjalma, *et al*, 2004)

Las líneas celulares de CaCu que se utilizaron en éste trabajo son: Hela, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2009). CaSki, células provenientes carcinoma cervicouterino, que fueron establecidas a partir de células de metástasis en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2009) y ViBo células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al.*, 1992).

Terapia del cáncer

El tratamiento del cáncer cervicouterino varía según el estadio. Hoy en día, existen diferentes tratamientos. Los tratamientos más frecuentemente son: cirugía, radioterapia y quimioterapia (González *et al.*, 2000).

Cirugía

La cirugía fue el primer tipo de tratamiento utilizado para combatir el cáncer y hasta la fecha sigue siendo la opción más utilizada para remover tumores sólidos. Generalmente se utiliza para tratar el cáncer que no ha formado metástasis, pero también se puede aplicar para eliminar el cáncer que ha pasado a otros tejidos, como nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, para asegurar que todo el tejido afectado ha sido extraído. Las cirugías que se utilizan en el CaCu son: criocirugía, cirugía con laser, biopsia de cono, histerectomía básica y radical.

Radiación

La radiación utiliza ciertas longitudes de onda de alta energía para eliminar las células malignas, como los rayos gamma. Esta técnica se puede utilizar a varios niveles para destruir a las células transformadas o para prevenir que las células normales o malignas proliferen y formen tumores. En éste tratamiento se llega a eliminar a todas las células que se encuentran ciclando, efecto que también afecta a células no tumorales.

Quimioterapia

Los primeros registros de la quimioterapia datan desde principios del siglo XVI cuando se administraban por vía sistémica metales pesados en el tratamiento del cáncer, aunque la toxicidad era severa y sólo podían curar algunos tipos de cáncer. Desde entonces, se han buscado nuevos agentes antitumorales que logren curar, controlar u ofrecer tratamientos paliativos para el cáncer (Baquiran y Gallagher, 2001).

La quimioterapia es uno de los tratamientos de primera elección para algunos tipos de cáncer y en algunos otros se emplea en combinación con radioterapia, cirugía o inmunoterapia. El objetivo principal de los compuestos usados en la clínica contra el cáncer es inducir muerte a las células neoplásicas, inhibiendo en algunos casos procesos relacionados al ciclo celular. 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).

La mayoría de las veces se requiere de la combinación de los tratamientos para poder eliminar las células cancerosas. Estos tratamientos son poco selectivos, dañando así a células no tumorales que se encuentran normalmente ciclando, generando efectos secundarios en el paciente, como pérdida de cabello, irritabilidad, vómito, mareo, entre otros. Ante esta situación se buscan nuevos tratamientos que permitan una mejor calidad de vida a los pacientes. Actualmente existe un fuerte interés en moléculas de origen vegetal y en particular de esteroides producidos en distintos tipos de plantas, a los cuales se les atribuye actividad antiproliferativa y antitumoral.

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). El primer esteroide con actividad hormonal fue aislado de una fuente natural, brassinólido, en 1979 a partir del nabo silvestre *Brassica napus*. Posteriormente se aislaron numerosos compuestos esteroidales de plantas, estructuralmente relacionados, que promueven el crecimiento vegetal. Se conocen alrededor de 60 compuestos (Bajguz y Tretyn, 2003), dentro de los cuales podemos encontrar las saponinas; éstas a su vez, pueden tener una estructura triterpenoides (30 carbonos) o esteroides (27 carbonos). Las saponinas esteroideas son menos abundantes que las triterpénicas y se les atribuye actividad biológica, cardíaca y hemolítica.

Saponinas

Las saponinas pueden ser esteroides o triterpenoides vegetales que reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espumas estables. Esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares; tiene propiedades hemolíticas, son venenosas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas. Las saponinas tienen elevado peso molecular (Anaya, 2003). Se extraen por hidrólisis con propanol, por el método de Marker. Hay reportes de que tienen actividad biológica: anticancerígenos, hipocolesterolémicos, inmunomoduladores, antioxidantes, hipoglucemiantes, hemolíticos, antivirales (Rao *et al.*, 2000; Sparg *et al.*, 2004), antifúngicos y antibacteriales (Jun-Dong *et al.*, 2005). Las saponinas que se han extraído de distintas plantas presentan una actividad citostática y además inhiben el crecimiento de células cancerosas *in vitro* (Konoshima *et al.*, 1998; Podolak *et al.*, 1998; Rao, 2000; Mimaki *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2001).

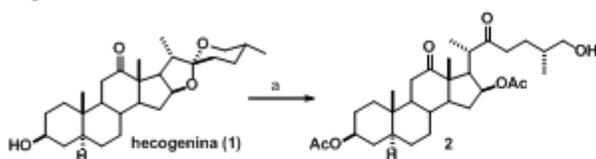
La actividad de las saponinas dependerá de su estructura química, un ejemplo es la presencia o ausencia de azúcares en la molécula, diferencia entre el tipo y el número de azúcares influye en la respuesta biológica (Trouillas, *et al.*, 2005). Si la saponina tiene azúcares tendrá una mejor disponibilidad en la célula, ya que aumentara la permeabilidad de la membrana celular (Yamasaki *et al.*, 1987), la solubilidad y el tiempo de vida de la molécula (Tschamber *et al.*, 2007). Se tienen reportes, en el que al eliminar los azúcares de la molécula se disminuye su actividad antitumoral (Pui-Kwong, 2007).

Hecogenina

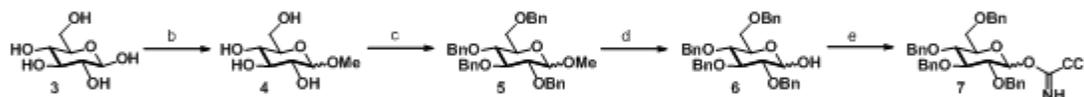
Un ejemplo de saponina esteroide es la hecogenina que se extrae del “sisal o henequén”, *Agave sisalana* Perr. La hecogenina (3 β -hidroxi-5 α , 25R-espirostan-12-ona) es una molécula con un peso molecular de 430.62 g/mol y formula química de C₂₇H₄₂O₄. Su empleo creció fuertemente en los cincuentas debido a que a partir de ella se sintetizaron corticoesteroides (Djerassi *et al.*, 1951). La hecogenina, al ser extraída a partir de las hojas del agave pierde sus azúcares naturales, por lo que también su actividad hemolítica, característica de las saponinas, disminuyendo su actividad antitumoral, ya que al eliminar los azúcares la molécula pierde solubilidad, por lo que es necesario crear a partir de sus derivados un compuesto glicosilado que mantenga sus propiedades antiproliferativas y apoptóticas. Se ha reportado que la hecogenina tiene actividad antitumoral en células de osteosarcoma 1547 (Corbiere *et al.*, 2003), produce inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana (Liagre *et al.*, 2007), además de inhibir la proliferación celular en cultivos de la línea de CaCu HeLa (Mimaki *et al.*, 1996) y en cultivos de linfocitos normales no presenta actividad citostática (Camoutsis *et al.*, 2005).

El compuesto diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -coleston-3 β -diilo (26-OH-He), es un derivado de la hecogenina que presenta actividad antitumoral en la línea de CaCu CaSki, el cual surge de una modificación a la hecogenina, a la que se le realizó una acetólisis, catalizada con un ácido de Lewis, con lo cual se abrió el espiroacetal, cadena lateral de las saponinas, formando estructuras colestánicas, que contienen un grupo cetona en el carbono 22 y un acetato en el carbono 16 lo cual estabiliza la molécula e impiden que no se cierre de nuevo (López. 2010; Fernández *et al.*, 2010).

Aglicona



Protección de la glucosa



Acoplamiento

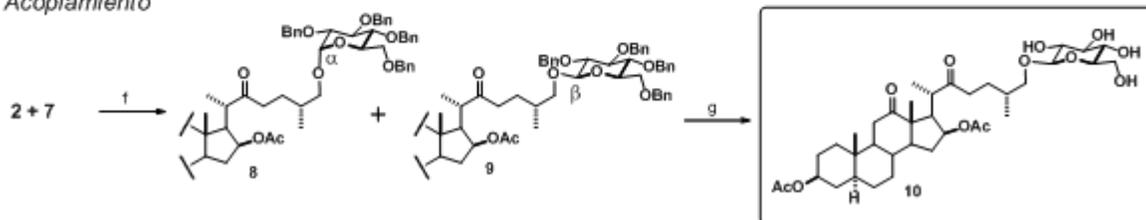


Fig. 7. Síntesis de 26-OH-He-Glu (10) a partir de 26-OH-He (2) y hecogenina (1).

El compuesto (20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -colestán-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (también conocido como 26-OH-He-Glu) es un derivado glicosilado de la hecogenina, sintetizado en el laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cuenta con un peso molecular de 694.84 g/mol y una fórmula química de C₃₇H₅₈O₁₂ (figura 7). El compuesto 26-OH-He-Glu se sintetizó a partir del 26-OH-He, la síntesis consistió en hacer una protección selectiva de grupos funcionales del azúcar, posteriormente se colocó un tricloroacetimidado en el extremo -OH del carbono 26 que finalmente permitió el acoplamiento con la glucosa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tratamientos de quimioterapia y radioterapia que actualmente se aplican a los pacientes que sufren de cáncer, resultan ser poco selectivos e ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas basadas en compuestos con actividad antitumoral. Al respecto, existe un fuerte interés por compuestos de origen vegetal y en particular por saponinas esteroidales, como la hecogenina y sus derivados, los cuales han sido reportados con actividad antiproliferativa, citotóxica y posible actividad antitumoral. Se sabe que al adicionar azúcar a las saponinas se aumenta la actividad antitumoral. Es por ello que el presente trabajo tiene como propósito evaluar si el derivado de la hecogenina 26-OH-He-Glu presenta actividad antiproliferativa y apoptótica sobre líneas celulares de CaCu.

JUSTIFICACIÓN

En México y el mundo, el cáncer cervicouterino, es una de las principales causa de muerte en las mujeres con cáncer, siendo precedido únicamente por el cáncer de mama. En nuestro país, datos del INEGI reportan un total de 4,500 defunciones anuales (una muerte cada dos horas) constituyéndose en un problema de salud grave. A pesar de las campañas de prevención y los tratamientos existentes, no se ha logrado erradicar esta enfermedad, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de ésta enfermedad.

HIPÓTESIS

Se ha reportado que algunas saponinas como la hecogenina pueden presentar actividad antiproliferativa y posible actividad antitumoral en células de cáncer cervical, se sabe también que al modificar la estructura química de algunos compuestos, se puede mejorar su actividad biológica. Por tanto se espera que el 26-OH-He-Glu, derivado glicosilado de la hecogenina, presente actividad antiproliferativa y apoptótica en células de cáncer cervical.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo y apoptótico del derivado de la hecogenina (20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -colestano-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu), en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cervicouterino así como de fibroblastos no tumorales y linfocitos de sangre periférica humana.
2. Determinar la concentración del compuesto 26-OH-He-Glu, requerida para disminuir en un 50% (IC₅₀) la densidad de cultivos celular en las líneas de CaCu HeLa, CaSki y ViBo.
3. Evaluar la actividad citotóxica del 26-OH-He-Glu en cultivos de células HeLa, CaSki, ViBo, y linfocitos humanos, por la técnica de liberación de LDH.
4. Determinar si el 26-OH-He-Glu afecta el ciclo celular de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, a través de la distribución de ADN en las fases del ciclo celular, evaluado por citometría de flujo.
5. Evaluar si el 26-OH-He-Glu, induce un incremento en la expresión de la caspasa 3 activa en las líneas de CaCu; HeLa, CaSki y ViBo, mediante inmunocitoquímica.
6. Determinar sí el compuesto 26-OH-He-Glu induce fragmentación del ADN en las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo a través de la técnica de TUNEL.
7. Determinar si el compuesto 26-OH-He-Glu afecta la proliferación celular de fibroblastos no tumorales provenientes de cérvix humano así como la proliferación de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.

MÉTODO

Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino.

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% CO₂ 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).

Procesamiento y obtención de células 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 sometidos 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 1500 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 CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante dos días máximo. Después de ese tiempo de incubación, se realizó el cambio del medio (total), de tal manera que se removieron las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10% y se continuó así hasta obtener un buen número de células proliferando. En ese momento se obtuvieron poblaciones fibroblásticas.

Compuesto 26-OH-He-Glu.

El compuesto 26-OH-He-Glu, fue sintetizado por Dr. Jesús Sandoval Ramírez, con la colaboración de la M en C. Ma. Antonieta Fernández Herrera, en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, Facultad de Ciencia Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El compuesto (20S,25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -colestano-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu) fue solubilizado en etanol para llevar a cabo las pruebas biológicas, se preparó un stock con 1 mg en 50 μ l de etanol a una concentración final de 20 μ g/ μ l.

Determinación de IC₅₀.

Para establecer la IC₅₀ (índice de concentración en la cual se disminuye en un 50% el número celular) de las líneas tumorales provenientes de CaCu, fueron sembradas 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de NCS, durante 24 horas.

Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI-1640 al 5% de NCS con el compuesto 26-OH-He-Glu, a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μ g/ml. En el ensayo se utilizó como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 5 μ l de etanol. A las 24 horas se evaluó el número celular por la técnica de cristal violeta la cual consistió en: retirar el RPMI-1640 de los pozos de la placa y agregar el fijador glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1% el cual se mantuvo durante 15 min. Posteriormente se retiró el fijador y se dejó secar al aire, luego se les agregó el colorante cristal violeta al 0.1% durante 10 min. Al término de éste tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada para retirar el exceso de colorante. Se dejó secar al aire. Por último, se solubilizó el colorante con una solución de ácido acético al 10% en agitación durante 20 min. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de regresión para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50% la población celular de las líneas tumorales de CaCu.

Obtención de la IC₅₀ matemática.

Para calcular las IC₅₀, los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dependientes de la dosis, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular. A estas curvas se les aplicó regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta, de éste modo, en base a la ecuación obtenida de la recta, el valor de “Y” se sustituye por 50 y el valor de X = IC₅₀. Obteniendo así finalmente el valor de la IC₅₀ respectiva.

Evaluación de 26-OH-He-Glu sobre el ciclo celular.

La cantidad de ADN presente en las células fue determinado por la técnica de citometría de flujo, la cual se describe a continuación. 1×10^6 células de las diferentes líneas celulares de CaCu fueron sembradas en cajas petri de 60 mm con 5 ml de RPMI-1640 al 5% de NCS. Después de 24 horas se retiró todo el medio y se trataron con RPMI-1640 al 5% NCS y con la IC₅₀ obtenida para cada línea celular por 24 horas.

Para evaluar la distribución de ADN en el ciclo celular, se retiró el RPMI-1640 de las cajas petri y se le adicionó 3 ml de verseno por 5 minutos, para que las células HeLa y CaSki fueran despegadas. Las células ViBo fueron despegadas con tripsina al 0.05%. Posteriormente fueron centrifugadas, lavadas con un buffer salino de fosfatos (PBS), pH 7.3. Fueron centrifugadas nuevamente por 5 minutos a 1500 rpm. El botón celular fue resuspendido y fijado en 1 ml de PBS al 50% de metanol. Se dejó reposar 20 minutos, posteriormente se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se lavó con PBS.

El botón celular fue resuspendido en 0.5 ml de ARNasa (100 mg/l) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó 10 µl de la solución de yoduro de propidio (200 mg/l). Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo (FACSAria II, USA) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH.

El ensayo de citotoxicidad se realizó con el kit de LDH (BioVision, USA). En la placa de 96 pozos (CORNING, USA) fueron sembradas 7,500 células y se incubaron en condiciones de incubadora, por 24 horas, posteriormente se colocó la IC₅₀ del 26-OH-He-Glu y se prepararon los controles, después de 24 horas se retiró el medio de cultivo y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Después se transfirió 100 µl de sobrenadante a un pozo de una placa de 96, se añadió 100 µl de mezcla de reacción (250µl de solución catalítica y 11.25 ml de solución de marcado) a cada pozo y se incubó durante 30 minutos, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = [(muestra – control negativo)/(control alto – control negativo)]*100.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Fueron sembradas 2X10⁵ célula de las líneas de CaCu en cubreobjetos de 1X1 cm, en un volumen de 2 ml de RPMI-1640 al 5% de NCS en cajas petri de 2.5 ml. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con IC₅₀ de 26-OH-He-Glu con medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de NCS, y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por inmunocitoquímica, brevemente: las células fueron fijadas a las 24 horas de cultivo, con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Después se permearon las células con tritón X-100 0.2% durante 5 minutos a 4 °C, posteriormente las preparaciones fueron lavadas 3 veces con PBS, se adicionó el bloqueador PBS-BSA-Tween 20, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y se retiró el bloqueador.

Inmediatamente después fue adicionado el anticuerpo primario, anti-caspasa 3 activa anticuerpo producido en conejo SIGMA 1:50 en PBS (CPP32 Ab4; Lab Vision, USA), durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo de cabra anti-caspasa 3 con FITC 1:100 en PBS (Invitrogen, USA), en cámara húmeda en oscuridad durante 2 horas, se lavaron la muestra 3 veces con PBS para después aplicar el DAPI (Sigma-Aldrich, USA) de manera muy cuidadosa durante 30 segundos e inmediatamente fueron lavadas 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestra con medio de montaje antifolding (Vectashield, USA), las cuales fueron selladas con barniz de uñas. Una vez realizadas las preparaciones, fueron etiquetadas y guardadas en oscuridad a -20 °C, posteriormente se tomaron fotografías en un microscopio de epifluorescencia (Nakon, JAP) para su posterior análisis.

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

Para la técnica de TUNEL se utilizó el kit ApopTag (Chemicon International, USA). Para la cual fueron sembradas 2×10^5 células en cubreobjetos de 1X1 cm en un volumen de 2 ml de RPMI-1640 al 5% de NCS en cajas petri de 2.50 ml. Al paso de las 24 horas se procedió a estimular a las células con IC_{50} del 26-OH-He-Glu en medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de NCS. Al término de 24 horas del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS el cual fue preparado al momento. Se lavaron 3 veces con PBS y se permearon con tritón X-100 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4 °C. Se lavaron con PBS 3 veces. Posteriormente se adicionó inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30 μ l) en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar.

Se incubó inmediatamente por 1 hora con enzima Tdt (33 μ l de enzima Tdt más 77 μ l de buffer de reacción), en cámara húmeda. La reacción fue detenida con buffer de paro (Chemicon international, USA) (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua bidestilada), agitando suavemente por 10 minutos, en cámara húmeda. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS, 1 minuto cada lavado. Se incubó con antidigoxigenina acoplada a rodamina, 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (Chemicon international, USA) (68 μ l de solución bloqueó más 62 μ l de antidigoxigenina-rodamina). Se realizaron los respectivos lavados 3 veces con PBS en cámara húmeda, dos minutos cada lavado. Se procedió a incubar con DAPI (Sigma-Aldrich, USA) 30 segundos (se añaden rápidamente). Se lavó 3 veces la muestra con PBS en cámara húmeda 1 minuto, cada lavado.

Finalmente las preparaciones fueron montadas en medio de montaje antifolding (Vectashield, USA), etiquetadas y guardadas en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

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 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 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 1500 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 tipo eppendorf 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 M 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 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos eppendorf 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 26-OH-He-Glu se trataron las células con IC_{50} de cada línea. Las células contenidas en cada tubo eppendorf 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 min, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1500 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.

Análisis estadístico.

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

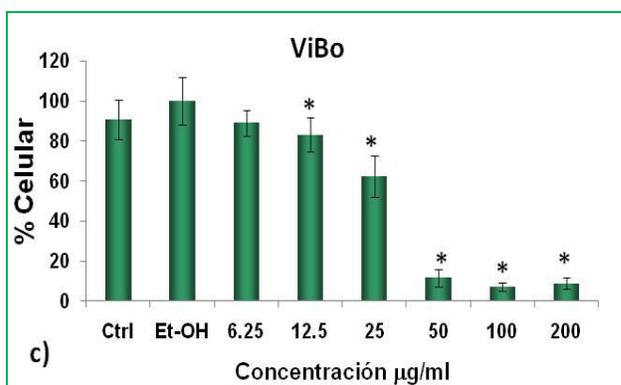
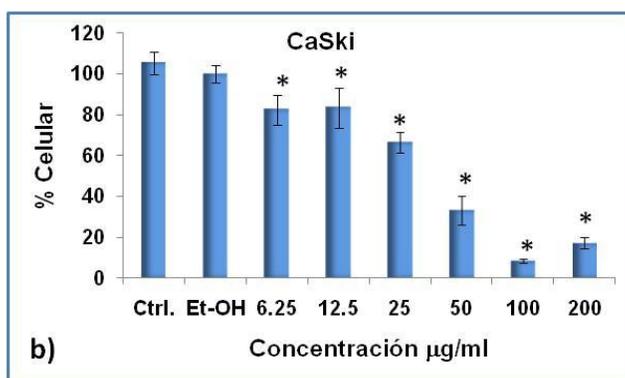
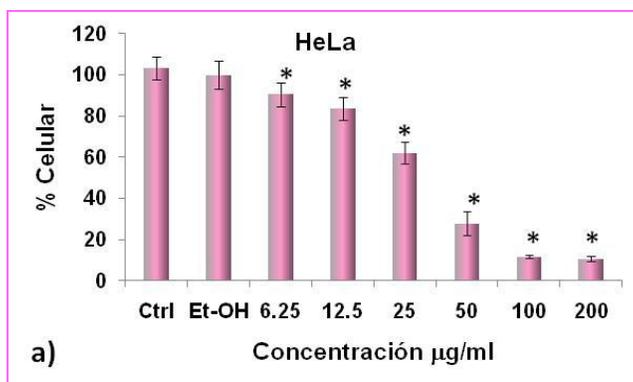
RESULTADOS

El cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar en neoplasias femeninas en México y en el mundo. Hay distintos tratamientos para esta enfermedad, pero llegan a ser poco selectivos, ya que se llega a eliminar a células no tumorales, provocando en la paciente efectos secundarios. En la actualidad el fuerte interés por compuestos de origen vegetal nos llevó a probar el efecto antiproliferativo y apoptótico de un compuesto nuevo 26-OH-He-Glu derivado glicosilado de la hecogenina, saponina a la que se le atribuye un efecto antitumoral en diferentes líneas celulares.

La molécula fue sintetizada a partir del compuesto 26-OH-He, compuesto de baja solubilidad que presenta actividad antitumoral en la línea celular de CaCu CaSki (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010), esperando que la modificación permita una mejor solubilidad y por tanto aumentar su actividad biológica.

Para tal efecto se procedió a evaluar la actividad antiproliferativa del compuesto 26-OH-He-Glu sobre las líneas celulares de CaCu, HeLa, CaSki y ViBo y determinar la cantidad del compuesto requerida para disminuir su densidad celular en un 50% (IC₅₀). Para ello se trataron con diferentes concentraciones de 26-OH-He-Glu a cada una de las líneas celulares de CaCu.

Las gráficas muestran un efecto del 26-OH-He-Glu dependiente de la dosis en las líneas HeLa, CaSki y ViBo (figura 8), en donde a mayor concentración hay un menor número celular. Posteriormente para cada línea a partir de la ecuación de la recta se obtuvo una IC₅₀ matemática. Generando para HeLa una IC₅₀ de 45±0.71 µg/ml, para CaSki 45±0.94 µg/ml y para ViBo 29±1.84 µg/ml.



Línea celular	IC ₅₀ (µg/ml)
a) HeLa	45 ± 0.71
b) CaSki	45 ± 0.94
c) ViBo	29 ± 1.84

d)

Figura 8. Efecto de 26-OH-He-Glu sobre la proliferación de cultivos de las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 hrs para su adherencia y tratadas con las diferentes concentraciones de 26-OH-He-Glu durante 24 hrs. a) HeLa, b) CaSki y c) ViBo. d) IC₅₀ calculada de cada línea celular. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan por lo menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. *p<0.05 vs Et-OH (ANDEVA).

Algunos trabajos indican que el efecto de compuestos antitumorales cambian la morfología de la células (Camacho, 2010; Galicia, 2010; López, 2010; Fernández *et al.*, 2010). Para observar el efecto del 26-OH-He-Glu sobre la morfología celular de las líneas de CaCu: HeLa, CaSki y ViBo, se tomaron fotografías de las células control, las células estimuladas con etanol y las tratadas con las IC_{50} del compuesto a 24 horas de tratamiento.

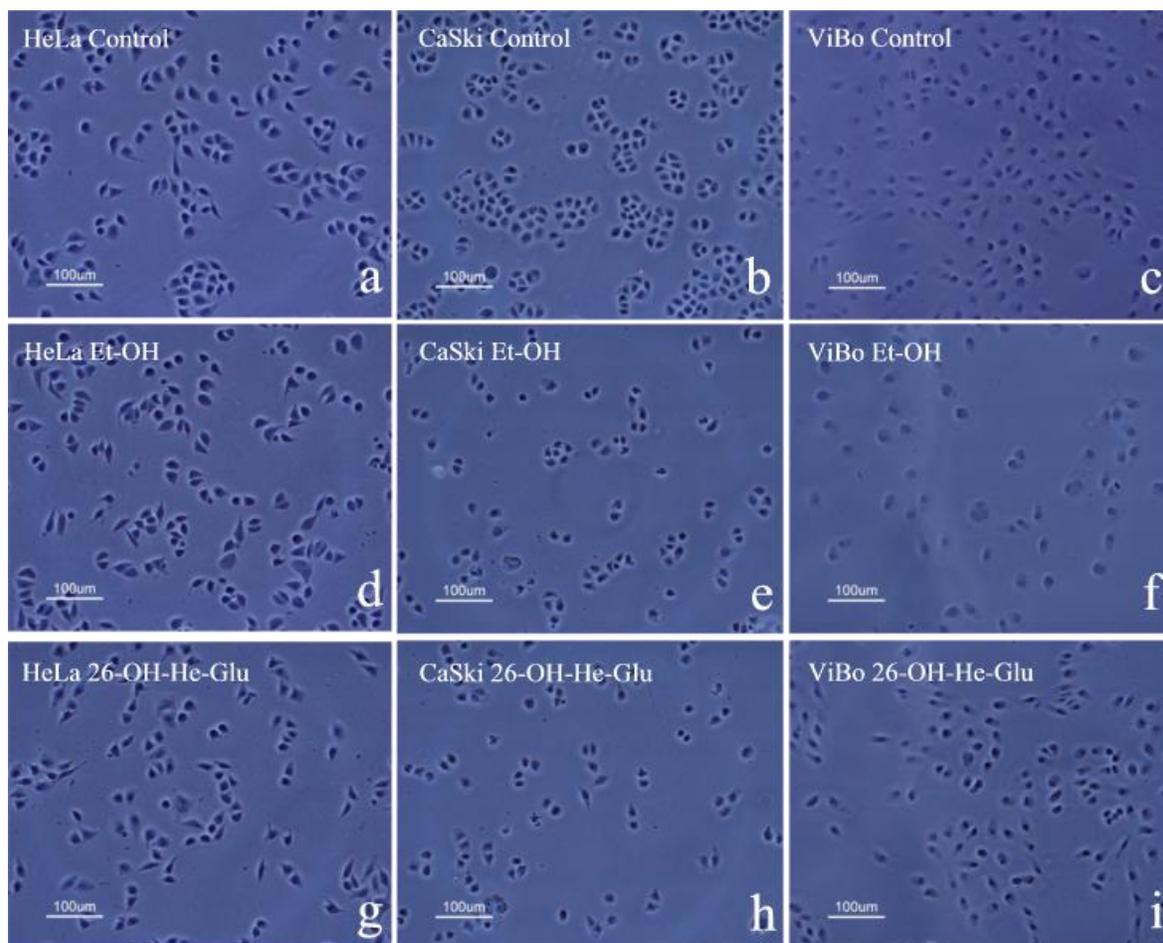
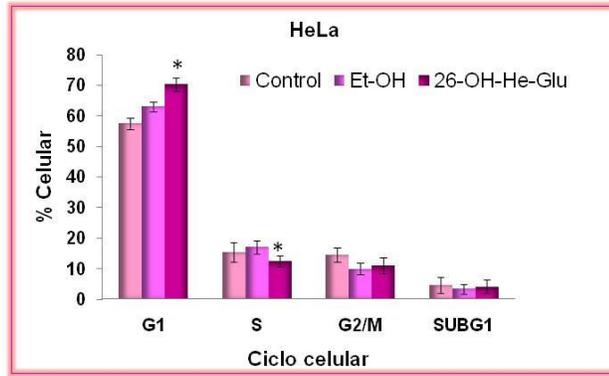


Figura 9. Efecto del 26-OH-He-Glu en la morfología celular de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas y tratadas con las IC_{50} de cada línea celular de 26-OH-He-Glu por 24 horas. Las imágenes a, b y c muestran los controles de HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. Las células que se muestran en las imágenes d, e y f son estimuladas con el vehículo, 5 µl de etanol. En las células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con 26-OH-He-Glu no se observan cambio en la morfología, g, h e i.

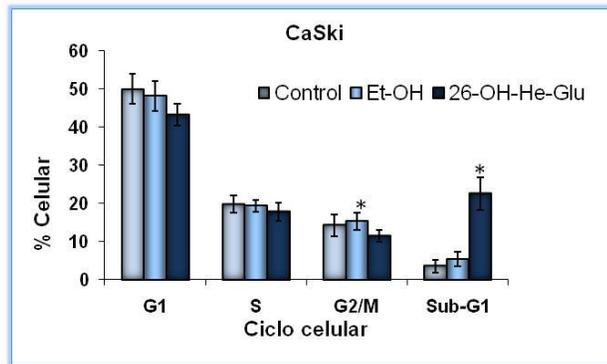
En las imágenes se observa que el compuesto no provoca cambios en la morfología de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo (figura 9). Las células HeLa conservan su forma poliédrica que las caracteriza, las células CaSki se observan de forma poliédrica pequeña y las células ViBo con una forma ovalada.

Una vez determinado que el compuesto 26-OH-He-Glu disminuye el número celular en los cultivos de células de CaCu, y sabiendo que algunos compuestos que son utilizados en tratamientos contra el cáncer llegan a tener un efecto citostático, deteniendo a las células en alguna fase del ciclo celular (generalmente la fase G1), (Mandal *et al.*, 2007), se procedió a determinar si el decremento observado en el número celular está relacionado con el ciclo celular. Para ello cultivos celulares de cáncer cervicouterino fueron estimuladas con la IC₅₀ de 26-OH-He-Glu obtenida para cada línea, y se determinó la distribución de ADN en las distintas fases del ciclo celular, por citometría de flujo.

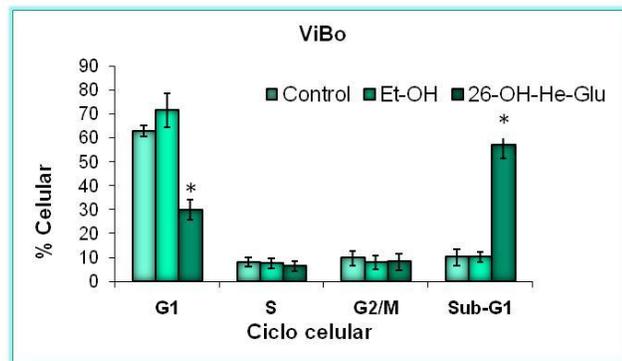
La gráfica (figura 10 a) muestra que la distribución de ADN a través del ciclo celular en las células HeLa tratadas con 45 µg/ml de 26-OH-He-Glu se encuentra afectado en la fase S, ya que se observa un decremento significativo en dicha fase respecto a las células tratadas con etanol además el compuesto detiene el ciclo celular en la fase G1, ya que se observa mayor porcentaje celular. Por su parte en las células CaSki tratadas con la IC₅₀ del 26-OH-He-Glu, 45 µg/ml, se observa un decremento en la fase G2/M, del ciclo celular respecto a las tratadas con etanol, y un incremento en la región sub-G1, en donde hay una cantidad de ADN menor a 2n, lo que sugiere una posible fragmentación de los núcleos, implicando una inducción de muerte por parte del compuesto (figura 10 b). Para las células ViBo tratadas con 29 µg/ml de 26-OH-He-Glu, se encuentra una disminución en la fase G1 del ciclo celular, además podemos observar un aumento en la región sub-G1, respecto a las células tratadas con etanol (figura 10 c). El aumento del porcentaje celular en la región sub-G1 en células CaSki y ViBo tratadas con 26-OH-He-Glu nos indican que el ADN de las células en cultivo se está fragmentando, mostrando con ello que el compuesto induce una muerte celular. Sin embargo no nos brinda información sobre el tipo de muerte que se está produciendo, necrosis o apoptosis.



a)



b)



c)

Figura 10. Efecto del 26-OH-He-Glu sobre la distribución del ADN en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular de las líneas de CaCu a) HeLa, b) CaSki y c) ViBo. Las células fueron tratadas con las IC₅₀ por 24 horas, la distribución de ADN fue evaluada por citometría de flujo. Las gráficas representan el promedio de siete eventos independientes para cada línea celular. (*. $p < 0.05$ vs Et-OH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Para determinar si la disminución de la densidad celular en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con las IC₅₀ de 26-OH-He-Glu a las 24 horas es por muerte necrótica, se cuantificó la cantidad de LDH liberada en el medio de cultivo ya que las células que mueren por necrosis rompen su membrana citoplasmática liberando LDH y otras enzimas al medio. Para las células HeLa hubo una liberación de LDH de 17.15%, en CaSki de 24.44% y en ViBo del 0.79%. En las células HeLa y CaSki hay una diferencia significativa respecto al control, por lo que indica que ese porcentaje de células están muriendo por efecto de la IC₅₀ del 26-OH-He-Glu. Para la línea celular ViBo no hubo diferencia (figura 11 a).

Como parámetro comparativo, se determinó si el compuesto 26-OH-He-Glu afecta a las células no tumorales. Se realizó para ello una prueba de liberación de LDH en linfocitos humanos, encontrando que en estos cultivos el compuesto no induce una necrosis a la concentración de 45 µg/ml para éste grupo celular (figura 11 b).

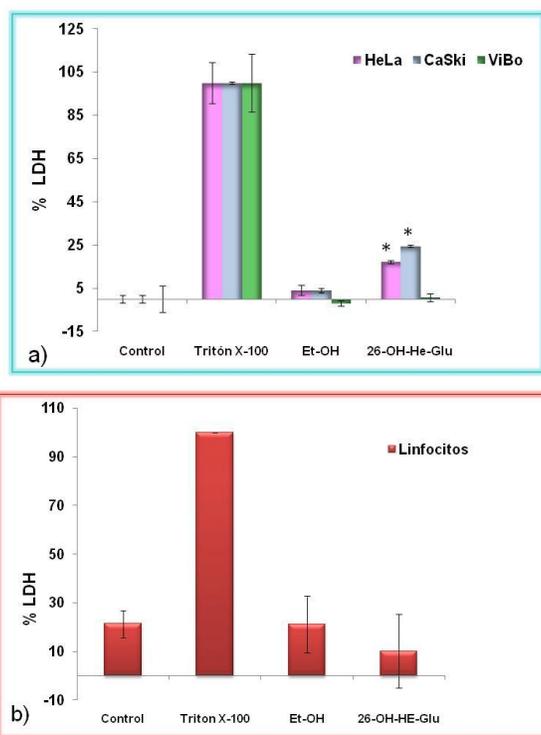


Figura 11. Liberación de LDH en cultivos de a) HeLa, CaSki y ViBo y b) linfocitos humanos, tratadas con la IC₅₀ de 26-OH-He-Glu. 7,500 células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos, el porcentaje de LDH fue medido respecto a un control positivo (células tratadas con tritón x-100) y un control negativo. Para HeLa, CaSki y ViBo hay un 17.15%, 24.44% y 0.79% respectivamente y para linfocitos no hay liberación de LDH. (*. p<0.05 vs Et-OH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos muestran que el compuesto 26-OH-He-Glu ejerce un porcentaje muerte por necrosis sobre los cultivos de HeLa y CaSki sin embargo no explica el decremento celular del 50%. Por lo que se procedió a evaluar si el compuesto induce una muerte por apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.

Los núcleos de las células HeLa, CaSki y ViBo fueron teñidas con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), para observar la condensación de la cromatina, característica típica de la muerte por apoptosis. En las células CaSki y ViBo tratadas con las IC_{50} de 26-OH-He-Glu a las 24 horas se observó condensación de cromatina a diferencia de las células control y las células estimuladas con 5 μ l de etanol. En las células HeLa no se observó condensaciones de cromatina. La figura muestra con flechas blancas las condensaciones de cromatina de las células tratadas con el compuesto (figura 12).

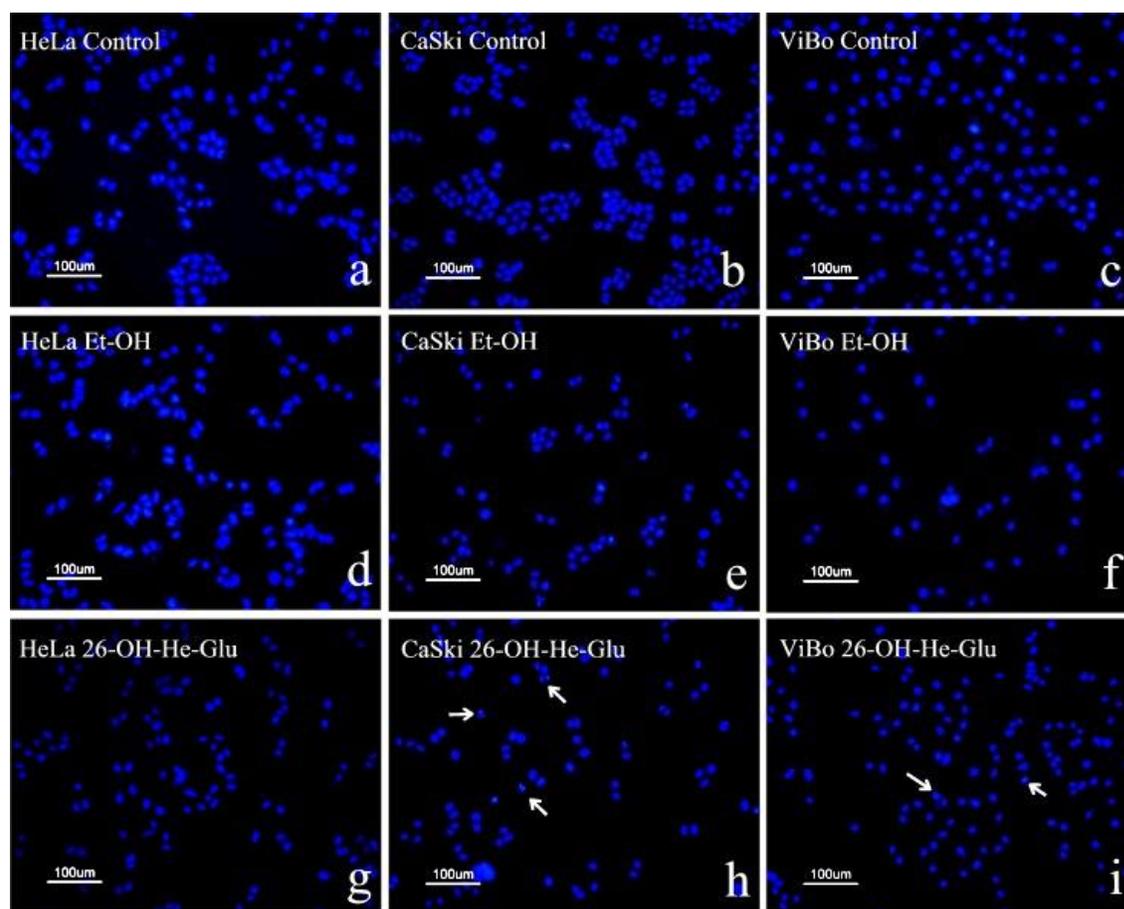


Figura 12. Compactación de la cromatina en células CaSki y ViBo tratadas con la IC_{50} de 26-OH-He-Glu. 200,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm, con 2 ml de RPMI-164 al 5% de CNS y se trataron con las IC_{50} por 24 horas. Las fotografías muestran los núcleos marcados con DAPI en color azul, los controles de HeLa, CaSki y ViBo (a, b y c), las células tratadas con 5 μ l de etanol (Et-OH) HeLa, CaSki y ViBo (d, e, y f) y las células tratadas con 26-OH-He-Glu (g, h e i), en la que las flechas blancas muestran condensaciones de cromatina de las líneas CaSki y ViBo.

Para determinar si el compuesto 26-OH-He-Glu induce una muerte apoptótica en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, se realizaron inmunocitoquímicas para observar la expresión de caspasa 3 activa, (una caspasa ejecutora que se activa al final de la apoptosis). Las imágenes (figura 13) muestran que en las tres líneas celulares el compuesto 26-OH-He-Glu induce un incremento en la expresión de la caspasa 3 activa, lo que indica que el compuesto activa la muerte celular por apoptosis.

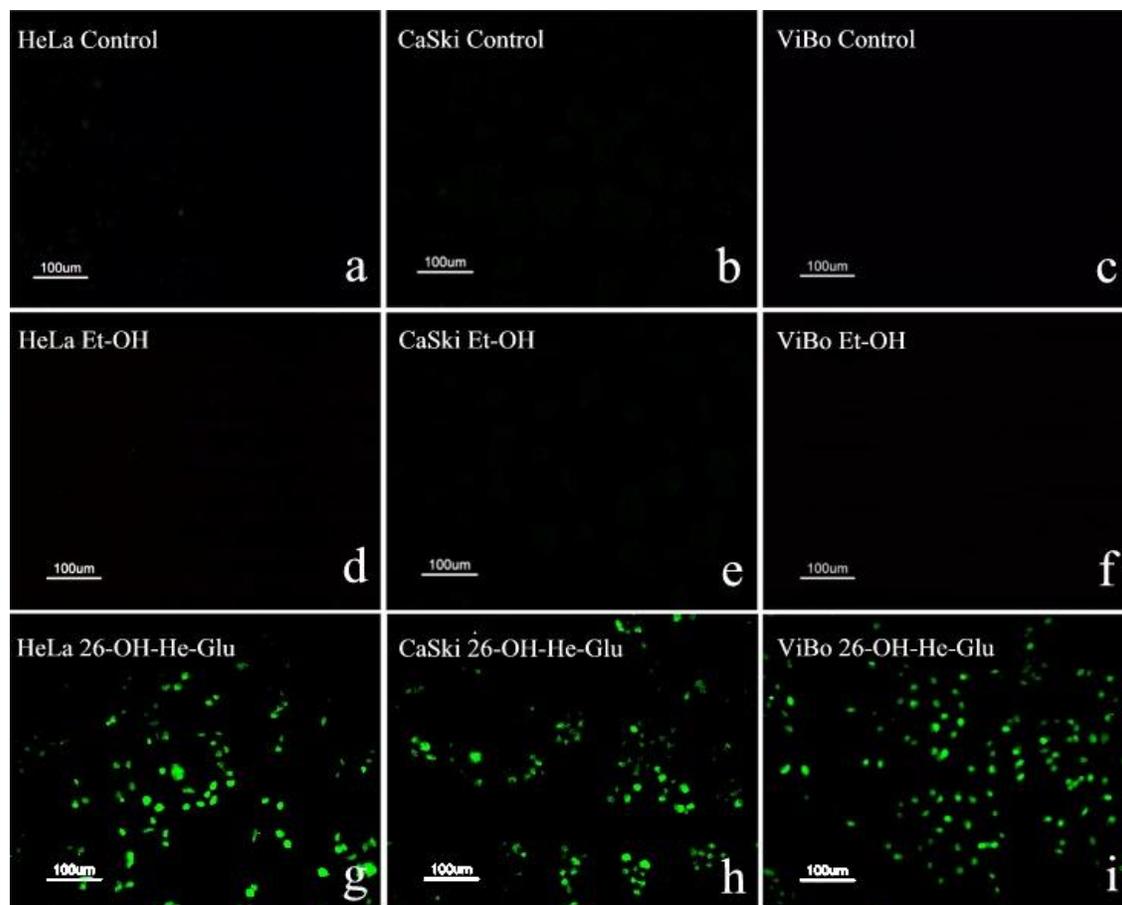


Figura 13. Evaluación de la expresión de la caspasa 3, en células HeLa, CaSki y ViBo. 200,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1X1 cm y tratadas con la IC_{50} de 26-OH-He-Glu por 24 horas. Posteriormente las células fueron fijadas y evaluadas por inmunocitoquímicas. Los controles de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo (a, b y c) y las células tratadas con etanol (d, e y f) no presentan expresión de caspasa 3, a diferencia de las células tratadas con 26-OH-He-Glu donde la expresión de la caspasa 3 se puede apreciar en las células teñidas de color verde (g, h e i).

Uno de los eventos finales de la muerte por apoptosis es la fragmentación del ADN en las células afectadas, por ello para determinar si el compuesto 26-OH-He-Glu produce fragmentación de ADN en los cultivos celulares como un parámetro más para medir la inducción de muerte por apoptosis, se aplicó la técnica de TUNEL [Marcado del extremo libre 3'OH del ADN por dUTP (desoxi-uridina trifosfato) mediado por la Tdt (desoxi transferasa terminal)] en las células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con la IC₅₀ de 26-OH-He-Glu por 24 horas. Los resultados indican que el tratamiento de los cultivos con el compuesto produce la fragmentación de ADN. En las células control y en las células tratadas con etanol no se observe dicha fragmentación (figura 14).

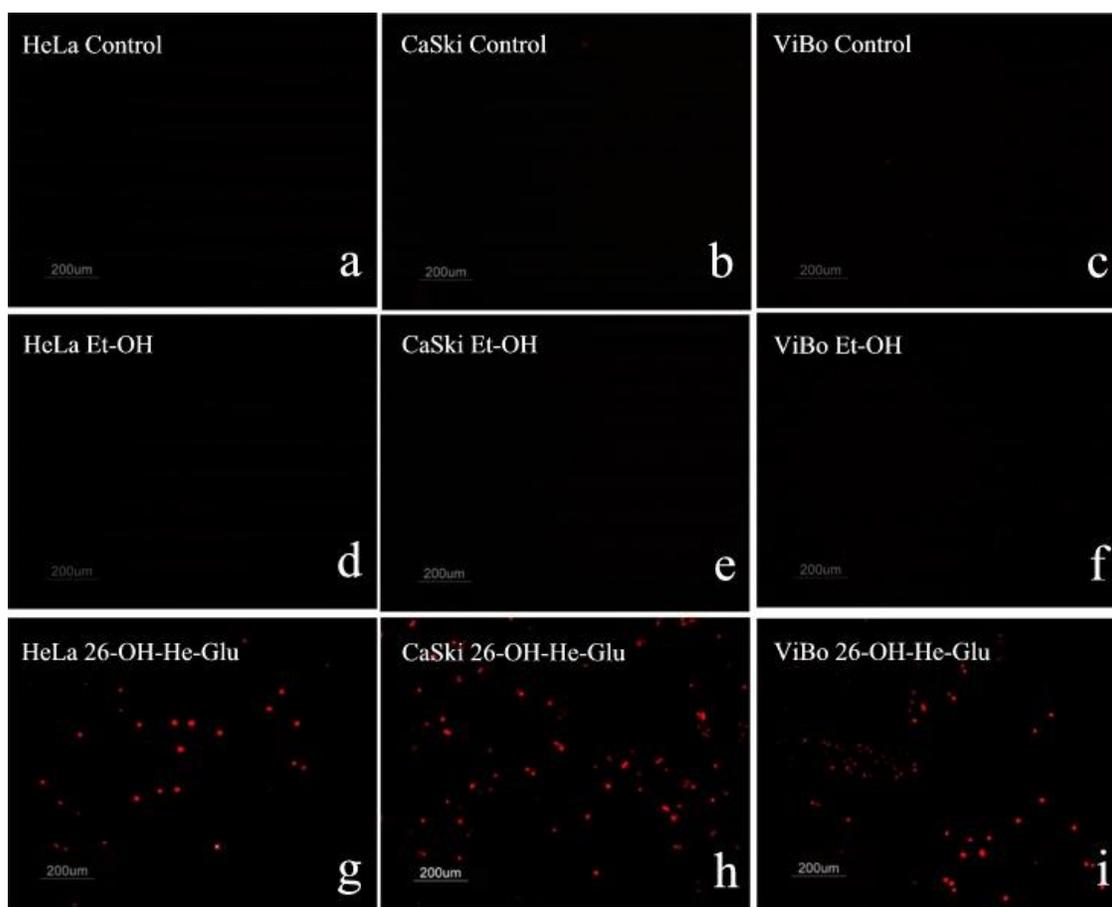


Figura 14. Fragmentación de ADN por efecto de las IC₅₀ de 26-OH-He-Glu sobre células HeLa, CaSki y ViBo. 200,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1X1 cm, con un volumen de 2 ml de RPMI-1640 al 5% de NCS a las 24 h tratadas con 25-OH-He-Glu. Posteriormente las células fueron evaluadas mediante la técnica de TUNEL. Los controles de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo (a, b y c) y las células tratadas con etanol (d, e y f) no presentan fragmentación de ADN, a diferencia de las células tratadas con 26-OH-He-Glu donde la fragmentación de ADN se puede apreciar en las células teñidas de color rojo (g, h e i).

Se sabe que las células normales, en la mayoría de los tratamientos contra el cáncer, se ven afectadas en su número celular y su proliferación y dado que el 26-OH-He-Glu no ejerce un efecto citotóxico en cultivos de linfocitos humanos, se procedió a evaluar la actividad del compuesto en cultivos de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano para determinar si presenta cierta selectividad sobre las células tumorales. Para ello las células fibroblásticas fueron tratadas con 45 $\mu\text{g/ml}$ de 26-OH-He-Glu (la mayor concentración de IC_{50} obtenida).

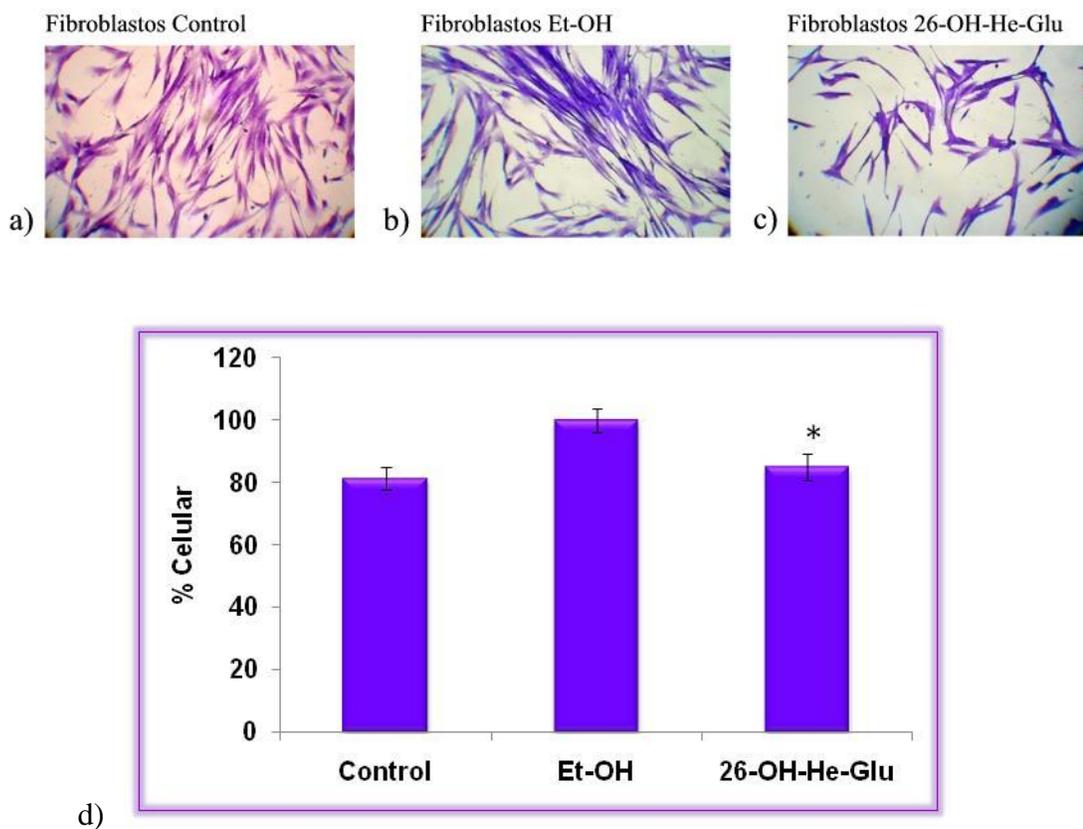


Figura 15. Efecto del 26-OH-He-Glu sobre el porcentaje celular de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano. 7,500 células fibroblásticas fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos en RPMI-164 al 10% de CNS y fueron tratadas con la IC_{50} , 45 mg/ml de 26-OH-He-Glu, por 24 hrs. La densidad celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta, a) control, b) 5 ml de Et-OH y c) células tratadas con la IC_{50} . Los resultados de tres eventos independientes (*. $p < 0.05$ vs Et-OH, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados demuestran que el compuesto sólo induce una disminución del 15% en el número celular de los cultivos tratados, respecto a las células tratadas con etanol. Sin embargo se observó que el compuesto afecta la morfología de las células fibroblásticas (figura 15).

Por otro lado, para determinar si el compuesto disminuye la proliferación de células no tumorales, se midió el efecto del compuesto sobre la proliferación celular con marcaje de carboxifluoresceína en cultivos de linfocitos humanos. Los resultados muestran que las IC_{50} del 26-OH-He-Glu, 45 $\mu\text{g/ml}$ y 29 $\mu\text{g/ml}$, no afectan la proliferación de linfocitos (figura 16). Observando que los linfocitos tratados con etanol proliferaron 75.96%, las células tratadas con las IC_{50} de 26-OH-He-Glu de 45 $\mu\text{g/ml}$ y 29 $\mu\text{g/ml}$ se encuentran en un 71.06% y 73.88% de proliferación respectivamente.

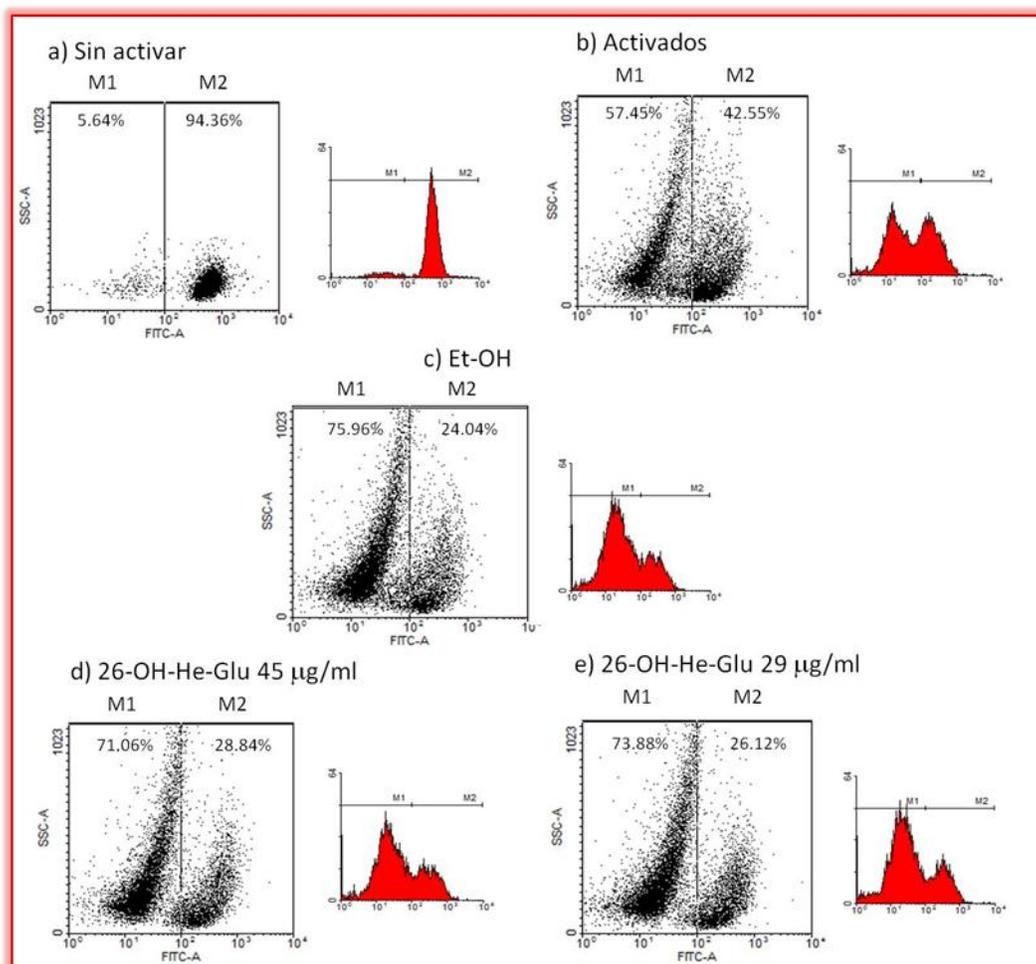


Figura 16. Efecto del 26-OH-He-Glu en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína, el potencial proliferativo fue evaluado con linfocitos tratados con la IC_{50} de 26-OH-He-Glu y células sin tratamiento. La proliferación fue medida por 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 etanol, d) 45 $\mu\text{g/ml}$ de 26-OH-He-Glu y e) 29 $\mu\text{g/ml}$ de 26-OH-He-Glu.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente el cáncer cervicouterino (CaCu), es una de las principales causas de muerte por enfermedades ginecológicas en el mundo, precedido únicamente por el cáncer de mama (INEGI, 2006). Los tratamientos que se utilizan para ésta enfermedad resultan agresivos y poco selectivos, por lo que demeritan considerablemente la calidad de vida de la paciente. La búsqueda de nuevos compuestos para combatir al cáncer de manera selectiva, ha llevado a investigar compuestos de origen vegetal, que podrían ayudar a prevenir y curar ésta enfermedad, que puedan ser menos agresivos y más selectivos. En ese sentido, se han realizado investigaciones en compuestos como las saponinas a quienes se les ha atribuido una importante actividad antitumoral y apoptótica (Konoshima *et al.*, 1998; Podolak *et al.*, 1998; Rao, 2000; Mimaki *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2001).

De entre la diversa gama de saponinas que se han estudiado, la hecogenina ha despertado un fuerte interés debido a que se le ha reportado con actividad antitumoral. En nuestro grupo de trabajo se evaluó al derivado hecogenínico (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -coleston-3 β -diilo (26-OH-He), que tiene una IC₅₀ de 100 μ g/ml en cultivos de células CaSki de CaCu, además de inducir las a una muerte apoptótica (López, 2010, Fernández *et al.*, 2010); sin embargo, la solubilidad de éste compuesto es limitada, por lo que se dificulta la evaluación del efecto a concentraciones mayores de 100 μ g/ml. Por tal motivo se procedió a agregar un azúcar a dicho compuesto, sintetizando el 26-OH-He-Glu, con la intención de mejorar su solubilidad y con ello aumentar la biodisponibilidad para las células. Los resultados obtenidos muestran que el compuesto 26-OH-He-Glu presenta mejor solubilidad que el compuesto 26-OH-He, logrando concentraciones de hasta 200 μ g/ml, lo que permitió evaluarlo en otras líneas tumorales de CaCu, HeLa, CaSki y ViBo.

Se ha reportado que la hecogenina (3 β -hidroxi-5 α , 25R-espirostan-12-ona) a una concentración de 17.22 μ g/ml (40 μ M) inhibe la proliferación de células de osteosarcoma 1547 en un 38% (Trouillas, *et al.*, 2005), además en células de CaCu HeLa a una concentración de 5 μ g/ml logra inhibir la proliferación en un 17.2% y a una concentración de 50 μ g/ml el compuesto es tóxico para las células (Mimaki *et al.*, 1996). En el caso del 26-OH-He-Glu, para lograr inhibir la proliferación en un 50% (IC₅₀) las concentraciones de son mayores para HeLa, CaSki y ViBo (45 μ g/ml y 29 μ g/ml) en comparación a las que utilizan con la hecogenina, sin embargo en las células HeLa a una concentración de 45 μ g/ml el compuesto no llega ser tóxico a diferencia de la hecogenina. Por lo que el compuesto glicosilado puede llegar a ser menos tóxico que la hecogenina. Además se muestra que el 26-OH-He-Glu presenta una mejor actividad biológica sobre la línea celular CaSki encontrando una IC₅₀ de 45 μ g/ml, concentración 50% menor en la IC₅₀ determinada para el compuesto 26-OH-He (100 μ g/ml).

Los resultados muestran que el compuesto 26-OH-He-Glu, presenta una actividad dependiente de la dosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, indicando que la respuesta a la concentración del compuesto es dependiente o específica de la línea celular. La mayoría de los compuestos que presentan actividad antiproliferativa, afectan el ciclo celular, por ejemplo, los medicamentos utilizados en la quimioterapia ejercen un efecto citostático, deteniendo a la célula en alguna fase del ciclo celular, la mayoría de ellos en la fase G1 (Mandal *et al.*, 2007), además, compuestos como el taxol, detienen el ciclo celular en G2 (Gokul *et al.*, 2001) otros, como el cisplatino, lo hacen en la fase S del ciclo celular (Mastbergen *et al.*, 2000) y compuestos como el topotecán inducen una detención en todas las fases del ciclo celular (Ohneseit *et al.*, 2005), mostrando que son ciclo dependientes. Con respecto a la hecogenina, en células de osteosarcoma 1547 no afecta el ciclo celular (Trouillas, *et al.*, 2005), sin embargo en el caso del compuesto 26-OH-HE, derivado de la hecogenina, induce una disminución en el porcentaje de células CaSki en la fase G1 y G2/M (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010). Con respecto al 26-OH-He-Glu, se induce un decremento en el porcentaje de células en la fase S y un incremento en la fase G1 de células HeLa, mientras que en células CaSki y ViBo se induce a un decremento en la fase G2/M y G1 respectivamente, sugiriendo que su acción del 26-OH-He-Glu es ciclo dependiente. Es conocido que cuando las células detienen su ciclo, es para reparar algún daño sufrido en su material genético o en su estructura celular. Sin embargo, cuando el daño supera al mecanismo de reparación, la célula activa un sistema de muerte que lleva a la célula a morir.

Se ha descrito que la hecogenina y sus derivados inducen muerte por necrosis y por apoptosis. Al respecto, el 26-OH-He-Glu induce a las células tumorales de cáncer cervicouterino a morir por apoptosis y necrosis, sin embargo en células no tumorales como los linfocitos de sangre periférica humana, no indujo necrosis, sugiriendo que la acción inductora de necrosis y posiblemente la acción inductora de apoptosis de este esteroide es selectiva. Es de llamar la atención que la actividad citotóxica del 26-OH-He en células CaSki fue del 28% (Fernández *et al.*, 2010), mientras que en las mismas células estimuladas con el 26-OH-He-Glu fue del 24%, sugiriendo que el azúcar podría reducir la actividad citotóxica del esteroide.

Con respecto a la actividad inductora de apoptosis, se ha reportado que compuestos de origen vegetal como el aceite de ricino del *Ricinus communis*, el p-Hydroxymetosibenzobijuglone aislado de *Juglans mandshurica* y el ácido 3,4,5-trihydroxil-benzoico presentes en diversas plantas, inducen muerte por apoptosis en células de cáncer cervicouterino HeLa (Lakshmana *et al.*, 2005; Zhi-Bo *et al.*, 2007; You *et al.*, 2010). El emodín (1,3,8-trihidroxí-6-metilanttraquinona) aislado de *Polygonum cuspidatum* induce muerte por apoptosis en células HeLa y CaSki (Srinivas *et al.*, 2003). En el caso específico de la hecogenina, en células de osteosarcoma 1547 no induce muerte por apoptosis a las 24 hrs a una concentración de 40 μ M (Trouillas, *et al.*, 2005), mientras que en células sinoviales de artritis reumatoide produce activación de la caspasa 3 activa y fragmentación de ADN (Liagre *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos para el 26-OH-He-Glu indican que induce muerte por apoptosis en las líneas HeLa, CaSki y ViBo, ya que se encontró condensación de la cromatina, expresión de la caspasa 3 activa y fragmentación de ADN, coincidiendo con lo reportado para el 26-OH-He para células CaSki (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010), implicando que la glicosilación realizada en el compuesto 26-OH-He-Glu mantiene la actividad inductora de apoptosis. Éste dato resulta relevante ya que compuestos que inducen apoptosis en células tumorales son considerados como potenciales agentes anticancerígenos (Rankfurt y Krishan, 2003), puesto que la apoptosis tiene una ventaja respecto a la muerte por necrosis al no activar una respuesta inmune y por lo tanto evitar la inflamación característica de la necrosis.

En la mayoría de los compuestos descritos con actividad antitumoral no se han evaluado en células no tumorales, careciendo de una prueba de acción selectiva. La actividad antiproliferativa presente en el 26-OH-He-Glu sobre células tumorales y el hecho de afectar en un 15 % el potencial proliferativo de células fibroblásticas de cérvix humano no tumorales, así como el nulo efecto antiproliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana, sugiere que el compuesto 26-OH-He-Glu presenta características que lo hacen un digno candidato para ser evaluado como un agente con potencial terapéutico, ya que presenta actividad antiproliferativa, induce muerte por necrosis y apoptosis en células tumorales y presenta selectividad respecto a células normales.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del compuesto en más líneas celulares, tanto de CaCu como otros tipos de cáncer.
- Evaluar el efecto del compuesto sobre células epiteliales no tumorales de cérvix.
- Evaluar el efecto del compuesto 26-OH-He-Glu en modelos *in vivo*.
- Evaluar la posible ruta a través de la cual ejerce su efecto.

CONCLUSIONES

- El compuesto 26-OH-He-Glu reduce la densidad celular en un 50% en cultivos de células HeLa y CaSki a una concentración de 45 $\mu\text{g/ml}$ y 29 $\mu\text{g/ml}$ para células ViBo.
- El compuesto 26-OH-He-Glu en HeLa disminuye el porcentaje celular en la fase S y lo aumenta en G1, en las células CaSki lo disminuye en G2/M y en ViBo en G1, incrementando la región sub-G1 para CaSki y ViBo.
- El compuesto 26-OH-He-Glu induce una muerte por necrosis en células HeLa, CaSki y ViBo 17.15%, 24.44% y 0.79% respectivamente
- El 26-OH-He-Glu induce muerte por apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.
- El compuesto 26-OH-He-Glu disminuye en un 15% el porcentaje celular de células no tumorales de cérvix (fibroblastos).
- El 26-OH-He-Glu no afecta el potencial proliferativo ni induce muerte por necrosis en cultivos de linfocitos humanos.

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 Ibs 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 almacene a 4 °C.

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2%)

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

Catalizador liofilizado

1 vial y solución colorante 45 ml.

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

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

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

Controles que se utilizan en la técnica de linfocitos con carboxifluoreceína,

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

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

LITERATURA CITADA

- ⌘ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2002). *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. España, 505 pp.
- ⌘ Alison M. R. (2002). *The cancer handbook vol. 2*, 2ª edición. Editorial Nature, Estados Unidos de América, 1723 pp.
- ⌘ Alvarado M. J. A. y Mayani V. H. (2007). El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. *Gaceta Médica Mexicana*, 143(2):149-161.
- ⌘ Álvarez D. C. (2007). Mecanismo de acción antitumoral de la cumarina A/AA en una línea celular de cáncer cérvico-uterino (HeLa). Tesis, UNAM. DF. México, 75 pp.
- ⌘ Amador M. A. (2009). Efecto de las variaciones intratipo de los genes E1, E2 y región larga de control de virus papiloma humano tipo 18 sobre la replicación viral. Tesis, UNAM. DF. México, 64 pp.
- ⌘ Anaya L. A. (2003). *Ecología Química*, Editorial Plaza y Valdés, España, 55 pp.
- ⌘ ATCC (2009). Product details. Cell biology: CaSki. Consultada: 7 de enero 2010. Disponible en: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1550&Template=cellBiology>
- ⌘ ATCC (2009). Product details. Cell biology: HeLa. Consultada: 7 de enero 2010. Disponible en: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2&Template=cellBiology>
- ⌘ Avendaño C. y Menéndez J. C. (2008). *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. Elsevier, Oxford, Reino Unido, 53 pp.
- ⌘ Bajguz A. y Tretyn A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62:1027-46.
- ⌘ Baquiran D. y Gallagher J. (2001). *Lippincott's cancer chemotherapy handbook*. 2ª edición. Editorial Lippincott Williams y Wilkins Philadelphia, Estados Unidos de América, 129 pp.
- ⌘ Bargou R. C., Daniel P. T., Mapara M. Y., Bommert K., Wagener C., Kallinich B., Royer H. D. y Dörken B. (1995). Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *International journal of cancer*, 60(6):854-9.
- ⌘ Baynes J. M. y Dominiczak M. H. (2008). *Bioquímica médica*. 2ª edición. Editorial Elsevier. España, 703 pp.
- ⌘ Boticario B. C. (2005). ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 71: 609-633.
- ⌘ Bucher N. y Britten C. D. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *British Journal of Cancer*, 98:523-528.
- ⌘ Camacho Z. E. (2010). Efecto antitumoral del S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino. Tesis, UNAM. DF México, 54 pp.

- ⌘ Camoutsis C., Trafalis D., Pairas G. y Papageorgiou T. (2005). On the formation of 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity. *Il Farmaco*, 60: 826–829.
- ⌘ Castillaa V. J., Ramírez P. y Coto C. E. (2009). Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Revista Química Viva*, 1: 56-67.
- ⌘ Corbiere C., Liagre B., Bianchi A., Bordji K., Dauca M., Netter P y Beneytout J. L. (2003). Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Intrernationa Journal of Oncology*, 22:899.
- ⌘ Curtis H. y Barnes N. (2005). Biología. 6ª edición, Editorial Médica Panamericana. México, 1491 pp.
- ⌘ Diario Oficial de la Federación (2007). Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA-1994. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico-uterino. Consultada el 8 de abril del 2010. Disponible en: www.salud.gob.mx.
- ⌘ Djerassi, C., Ringold, H. y Rosenkranz G. (1951). Steroidal Sapogenins. XV. Experiments in the hecogenin series (part 3). Conversion to cortisone. *Journal of the American Chemical Society*, 73: 5513 - 5514.
- ⌘ Dosne P. C. (2007). Investigación en cáncer y citogenética. Editorial Eudeba, Argentina, 59 pp.
- ⌘ Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495–516.
- ⌘ Fernández H. M. A., López M. H., Hernández V. J. M. V., López D. M., Escobar S. M. L., Sánchez S. L., Pinto B. M. y Sandoval R. J. (2010). Synthesis of 26-hydroxy-22 oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:2474–2484.
- ⌘ Galicia O. K. (2010). Efecto del compuesto S-metil-N, N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), sobre el potencial proliferativo, muerte y ciclo celular de las líneas tumorales HeLa y CaSki provenientes de cáncer cervicouterino. Tesis, UNAM. DF México. 51 pp.
- ⌘ Gokul C. D., David H., Rafael G. y Charles H. (2001). Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose–response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letters*, 165:147-153.
- ⌘ González M. J., González B. E., Biete S. A., Casanova D. L. y Mestres E. J. (2000). Ginecología oncológica. 2ª edición, Editorial Elsevier, España. 634 pp.
- ⌘ González S. I. (2009). Mecanismo de muerte celular por un nuevo derivado tiazolo [5,4b] quinolina D3CLP en la línea celular humana K-562. Tesis UNAM. México. 88 pp.
- ⌘ Gupta S., Agrawal A., Agrawal S., Su H. y Gollapudi S. (2006). A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immunity & Ageing*, 3:1-8. Consultada 4 de marzo de 2010. Disponible en: <http://www.immunityageing.com/content/3/1/5/figure/F1>

- ⌘ Hanahan D. y Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70.
- ⌘ Herdman C. y Sherris J. (2002). Planificación de programas apropiados para la prevención del cáncer cervicouterino. 3ª edición. Editorial Organización Panamericana de la Salud. México, 234 pp.
- ⌘ Hidalgo A. y Salcedo M. (2001). Estrategias de análisis global, hacia el manejo genético de las neoplasias. *Investigación Clínica*, 53 (5): 430-44.
- ⌘ INEGI (2006). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 24 de enero del 2010. Disponible en: www.inegi.com
- ⌘ Jun-Dong Z., Yong-Bing C., Zheng X., Hui-Hua S., Mao-Mao A., Lan Y., Hai-Sheng C., Ping-Hui G., Yan W., Xin-Ming J y Yuan-Ying J. (2005). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(12): 78-85.
- ⌘ Kathleen H. (2001). Natural compounds in cancer therapy, review alternative medicine review. Consultada: 14 abril de 2010. Disponible en: http://findarticles.com/p/articles/mi_m0FDN/is_4_6/ai_78539422/
- ⌘ Kaufmann H. y Earnshaw W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 256:42-49.
- ⌘ Kim R., Tanabe K., Uchida Y., Emi M., Inoue H. y Toge T. (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 50:343-352.
- ⌘ Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H., Nishino H., Duc N. M., Kasai R. y Yamasaki K. (1998). Anti-tumor-promoting activity of majonoside-R2 from vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Haet Grushv. (I). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21:834-838.
- ⌘ Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. y Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16: 3-11.
- ⌘ Kuroda M., Mimaki Y., Hasegawa F., Yokosuka A., Sashida Y. y Sakagami H. (2001). Steroidal glycosides from the bulbs of *Camassia leichtlinii* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49:726-731.
- ⌘ Lakshmana R., Jayaraj R., Bhaskar A. S. B., Kumar O., Bhattacharya R., Saxena P., Dash P. K. y Vijayaraghavan R. (2005). Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 69:855-865.
- ⌘ Liagre B., Vergne-Salle P., Leger D. y Beneytout J. (2007). Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. *International Journal of Molecular Medicine*, 20: 451-460.
- ⌘ Lodish H., Berk A., Matsudaria P., Kaiser C., Scott M. P., Zipursky S. L. y Darnell J. (2005) *Biología celular y molecular*. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 973 pp.

- ⌘ López D. M. (2010). Efecto antitumoral de los esteroides diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo (26-OH-Di) y diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -colestan-3 β -diilo (26-OH-He) en la línea tumoral de cérvix CaSki. Tesis. UNAM. México. 63 pp.
- ⌘ Majno G. y Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, necrosis an overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 146:3-16.
- ⌘ Mandal S., Berube G., Asselin E., Richardson V. J., Church J. G., Bridson J., Pham N. Q., Pramanik S. K. y Mandal S. K. (2007). A new platinum complex of triazine demonstrates G1 arrest with novel biological profile in human breast cancer cell line, MDA-MB-468. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 17(8):2139-2145.
- ⌘ Mastbergen S. C., Duivenvoorden I., Versteegh R. T. y Geldof A. A. (2000). Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs. *Anticancer Research*, 20(3A):1833-8.
- ⌘ McCloskey D. E., Kaufmann S. H., Prestigiaco L. J. y Davidson N. E. (1996). Paclitaxel índices programmed cell death in MDA-MB-468 human breast cancer cell. *Clinical. Cancer Research*, 2:847-854.
- ⌘ Mimaki Y., Kanmoto T., Sashida Y., Nishino A., Satoni Y. y Nishino H. (1996). Steroidal saponins from the underground parts of *Chlorophytum comosum* and their inhibitory activity on tumor-promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry*, 41:1405–1410.
- ⌘ Mimaki Y., Yokosuka A., Kuroda M. y Sashida Y. (2001). Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24:1286–1289.
- ⌘ Mitchell R. N., Kuman V., Abbas A. K. y Fausto N. (2007). Compendio Robbins y Cotran patología estructural y funcional, 7^a edición, Editorial Elsevier. España, 877 pp.
- ⌘ Monroy G. A., Rangel C. R., Rocha Z. L., Trejo B. C., Ramírez G. J., Martínez R. D., y Weiss-Steider B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Revista Mexicana de Oncología*, 7: 69–76.
- ⌘ Morgan S. J. y Darling D. C. (1993). Cultivo de las células animales. Editorial Acriba. España. 159 pp.
- ⌘ Murray A. y Hunt T. (1993). The cell cycle an introduction. Editorial Oxford University Press. Estados Unidos de America, 251 pp.
- ⌘ National Cancer Institute, (2009). National Institutes of Health. U.S.A. Consultada el 1 de junio de 2009. Disponible en: <http://www.cancer.gov/>.
- ⌘ Ohneseit P. A., Prager D., Kehlbach R. y Rodemann H. P. (2005). Cell cycle effects of topotecán alone and in combination with irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 75(2):237-245.
- ⌘ Ortega S., Malumbres M. y Barbacid M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cáncer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602: 73-87.
- ⌘ Paniagua R. y Nistal M. M. (2007). Biología celular. 3^a edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, 404 pp.
- ⌘ Podolak I., Elas M. y Cieszka K. (1998). *In vitro* antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research*, 12: 570–573.

- ⌘ Pui-Kwong C. (2007). Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochemical pharmacology*, 73:341-350.
- ⌘ Quintana F. J. (2000). La célula eucarionte. Consultada 14 de febrero de 2010. Disponible en: <http://www.bioapuntes.cl/apuntes/fotoscelula.htm>
- ⌘ Rankfurt O. S. y Krishan F. A. (2003). Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anticancer Drug*, 14:555–561.
- ⌘ Rao A. V. y Gurfinkel D. M. (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17:211–35.
- ⌘ Rigaud O., Guedeney G., Duranton I., Leroy A., Doloy M. T. y Magdelenat H. (1990). Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. I. Chromosome aberrations induced *in vivo*. *Mutation Research*, 242:17-23.
- ⌘ Robbins S., Kumar V. y Cotran R. (1993). Patología Humana. Editorial Mc Graw Hill. México. 673 p.p.
- ⌘ Sánchez S. P., Ostrosky W. P., Gallegos H. F., Peñarroja R. F., Toledo G. J. Bravo J. L., Rojas D. C. E. y Benítez B. L. (2008). DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutation Research*, 640: 8–15
- ⌘ Sánchez S. V. (2001). Mecanismos Reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 20(4):266-74.
- ⌘ Serman F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. perspectivas en prevención y tratamiento, *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*; 67(4): 318-323.
- ⌘ Sierra A., Castellsagué X., Coll T., Mañas S., Escobedo A., Moreno A. y Fabra A. (2000). Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *International journal of cancer*, 89(2):142-7.
- ⌘ Sparg S. G., Light M. E., y Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacolog*, 94:219–43.
- ⌘ Srinivas G., Antov R. J., Srinivas P., Vidhyalakshmi S., Senan V. P., Karunagaran D. (2003). Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *European Journal of Pharmacolog*, 473:117–125.
- ⌘ Stevens A. y Lowe J. (2001). Anatomía patológica. 2ª edición. Editorial Elsevier. España. 652 pp.
- ⌘ Suárez E. P. y Rojas M. (2001). Programa nacional de cáncer cervicouterino. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*; 66(6): 480-91.
- ⌘ Tjalma W., Arbyn M., Paavonen J., Van W. y Bogers J. J. (2004). Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 14:751-761.
- ⌘ Tolis C., Peters G. J., Ferreira C. G., Pinedo H. M. y Giaccone G. (1999). Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *European Journal of Cancer*, 35: 796-807.

- ⌘ Toro M. (2006). Caracterización inmunofenotípica del cáncer de cuello uterino asociado a la infección por virus papiloma humano (HPV). Tesis, Universidad de Valencia, España. 332 pp.
- ⌘ Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J. y Beneytout J., (2005). Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 1141-1149.
- ⌘ Tschamber T., Adam S., Matsuya Y., Masuda S., Ohsawa N., Maruyama S., Kamoshita K., Nemoto H. y Eustache J. (2007). OSW-1 analogues: modification of the carbohydrate moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17:5101-5106.
- ⌘ Von-Bernhardi M. R. (2004). Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Revista. Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 42:281-292.
- ⌘ Waggoner S. E. (2003). Cervical cancer. *The Lancet*, 361: 2217-2225.
- ⌘ Williams G. T. (1991). Programed cell death apoptosis and oncogénesis. *Cell*, 65:1097-1098.
- ⌘ Yamasaki Y., Ito K., Enomoto Y. y Sutko J. L. (1987). Alterations by saponins of passive calcium permeability and sodium-calcium exchange activity of canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 897:481–487.