



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
ZARAGOZA (UMIEZ)

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**Efecto antiproliferativo de la saponina esteroideal ξ -D-
glucopiranosido de (25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-22-
oxocolest-5-eno-26-ilo (26-OH-Di-glu) en células de
cáncer cervicouterino.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

DANIELA BERENICE TORRES PINEDA

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas, a menudo estarás solo, y a veces asustado. Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo”.

Friedrich Nietzsche.

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi

A mis padres

Por su amor, apoyo y confianza incondicional, porque el esfuerzo y el sacrificio hecho no solo fue mío, por lo tanto este logro también es de ustedes. Gracias a su ayuda he llegado hasta donde estoy, sin embargo, esta meta es solo un pequeño paso de un largo camino.

A mi hermano

Da siempre lo mejor de ti, lucha por cada uno de tus sueños y no pretendas obtener algo con palabras sino con acciones. Como hermana y como amiga siempre estaré cuando me necesites.

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber".

A Yair

Por su amor, apoyo y comprensión, por convertir estos 5 años en lo mejor que he vivido. Te agradezco por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por darme la oportunidad de aprender cosas nuevas y por enseñarme a ser mejor cada día.

"El amor implica un fenómeno tan raro que puedo vivir toda la vida tranquila por haber encontrado el ser a quien la naturaleza ha concedido el poder de hacerme de feliz".

A mi familia

Por darme ánimo y no dejar de creer en mí.

A mis amigas Lucero, Paty y Natalie

Por confiar en mí, por los buenos y malos momentos que hemos vivido juntas y por compartir una parte de sus vidas conmigo.

"Un hermano puede no ser un amigo, pero un amigo será siempre un hermano".

AGRADECIMIENTOS

Al *M. en C. Luis Sánchez Sánchez*, por abrirme las puertas del laboratorio permitiéndome formar parte de su equipo de trabajo y por dedicarme su apoyo, orientación, enseñanzas y tiempo.

Al *Biol. José Misael Vicente Hernández*, por compartir sus conocimientos, por sus observaciones y apoyo en la parte experimental de esta tesis.

Al *M. en C. Hugo López Muñoz*, por su colaboración en la realización de este trabajo y por siempre resolver mis dudas.

A la *Dra. María Luisa Escobar Sánchez*, por sus contribuciones en la parte experimental que permitieron concluir este trabajo.

Al *Biol. Moisés López Dávila*, por otorgarme su tiempo y paciencia mientras me estaba capacitando, por compartir sus conocimientos y ayuda para buscar una respuesta a mis preguntas.

Al *Dr. Benny Weiss Steider*, al *Dr. Juan José Rodríguez Mercado* y a la *Dra. María de Lourdes Mora García*, gracias a sus aportaciones y comentarios contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo, permitiéndome concluirlo satisfactoriamente.

Al *Dr. Jesús Sandoval Ramírez* y a la *Dra. María Antonieta Fernández Herrera*, por elaborar y donar el compuesto que se utilizó para realizar este trabajo.

A *Betzabe, Casandra, Daniel, Esmeralda, Javier y Pavel*, por su amistad, apoyo, compañía y por los agradables momentos que hemos pasado dentro del laboratorio.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	
La célula.....	5
Ciclo celular.....	6
Muerte celular.....	8
Necrosis.....	9
Apoptosis.....	10
<i>Caspasas apoptóticas.....</i>	<i>12</i>
<i>Vía extrínseca.....</i>	<i>13</i>
<i>Vía intrínseca.....</i>	<i>13</i>
Cáncer.....	15
<i>Tipos de cáncer.....</i>	<i>15</i>
Cáncer cervicouterino.....	16
Tratamientos.....	21
<i>Cirugía.....</i>	<i>21</i>
<i>Radioterapia.....</i>	<i>21</i>
<i>Quimioterapia.....</i>	<i>22</i>
Esteroides.....	23
Saponinas y sapogeninas.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	30

OBJETIVOS.....	31
METODOLOGÍA.....	32
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS.....	54
LITERATURA CITADA.....	55
APÉNDICE.....	61

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es en el ámbito mundial, el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres, siendo precedido por el cáncer de mama y se ubica como una de las principales causas de defunción en nuestro país, siendo el responsable de más de 450,000 muertes al año. Desafortunadamente, los tratamientos actuales contra esta enfermedad afectan tanto a células tumorales como a células normales, además son ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y producen efectos secundarios graves. Dentro de las nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de este tipo de enfermedad se ha contemplado el uso de compuestos vegetales orientados hacia el tratamiento del mismo. Entre este grupo de compuestos destacan las saponinas esteroides como la diosgenina y sus derivados, ya que se les han adjudicado actividades biológicas diversas, entre las que se destaca su actividad antitumoral. Por ello, la obtención de nuevas saponinas a partir de su fuente natural o por transformación bioquímica, abre un panorama interesante en lo que se refiere a estudios de estructura y actividad para poder ser consideradas como posibles agentes terapéuticos.

La diosgenina, aislada de *Dioscorea tokoro*, es una saponina esteroideal no glicosilada. Se le atribuye actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares, como HeLa (cáncer cervicouterino), HeL 92.1.7 y K562 (eritroleucemia), osteosarcoma 1547, HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (cáncer de mama) y otras. Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo.

En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa del derivado diosgenínico ξ -D-glucopiranosido de (25*R*)-3 β ,16 β -diacetoxi-22-oxocolest-5-eno-26-ilo (26-OH-Di-glu) en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Al respecto, la IC₅₀ en las células HeLa y ViBo fue de 20 μ g/ml y de 23 μ g/ml para las células CaSki. El compuesto produce una liberación de LDH en las líneas HeLa y ViBo en un 6.35% y 11.01% respectivamente, mientras que en las células CaSki no hubo liberación de LDH, indicando que en un pequeño porcentaje de células están muriendo por necrosis, sin embargo, en linfocitos humanos de sangre periférica, tratados con 23 μ g/ml del esteroide no se produce dicho efecto. El análisis de la distribución del ADN en cada una de las fases del ciclo celular, evaluado por citometría de flujo para cada una de las líneas

tumorales, indica que la actividad antiproliferativa del 26-OH-Di-glu no altera la distribución del ADN en alguna fase del ciclo celular, sugiriendo que tal actividad es independiente de ciclo. Por otro lado, el incremento en la expresión de la caspasa 3 activa, la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN inducida por el esteroide 26-OH-Di-glu en las células HeLa, CaSki y ViBo, indican que el compuesto induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis. La evaluación del efecto del compuesto en células normales (linfocitos), establece que el 26-OH-Di-glu en las células linfocíticas no afecta su proliferación, lo que indica acción selectiva del compuesto, que permite proponerlo como un agente con fuerte potencial antiproliferativo.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad en mujeres. El cáncer de cérvix es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, ocupando un 16.6% de otros cánceres (INEGI, 2008).

Dentro de los factores de riesgo asociados a este padecimiento se encuentran: el inicio de relaciones sexuales a edad temprana, el número de parejas sexuales, el presentar un historial clínico con antecedentes de alguna infección por transmisión sexual, el consumo de tabaco, alcohol o uso de anticonceptivos, son las principales causas de la adquisición, manifestación y progresión de éste tipo de carcinoma. Por otro lado, se ha informado que el 99% de todos los casos de carcinomas de cérvix es originado por la infección del virus del papiloma humano (VPH) y particularmente los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de estos casos, el resto presentan el VPH 31 y 45 (Muñoz y Bosch, 1997) y solo un mínimo porcentaje (1%) del carcinoma de cérvix es negativo al VPH. Hasta el momento se han presentado trabajos sobre posibles terapéuticos para combatir el cáncer cervicouterino, desafortunadamente, son pocos donde se tenga un modelo de comparación de células normales contra células de cáncer. El estudio de la biología del cáncer cervicouterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla y manifiesta, no obstante, pese a los esfuerzos encaminados a tratar esta enfermedad, aún no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana.

Dentro de las estrategias para tratar a las neoplasias malignas en general, en los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de dicha enfermedad, entre tales elementos se tiene a las saponinas (Fernández *et al.*, 2010).

Las saponinas son pequeños compuestos químicamente constituidos por una aglicona policíclica que puede ser un esteroide (C27) o un triterpenoide (C30) unido en el C3 a una cadena lateral de azúcar (Pui-Kwong, 2007). La diosgenina es una saponina esterooidal a la cual se le han atribuido propiedades antitumorales. Existen compuestos

derivados de la diosgenina como el diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (26-OH-Di), el cual tiene efectos antitumorales sobre la línea de cáncer cervicouterino CaSki (Fernández *et al.*, 2010), aunque, como en la mayoría de las saponinas, el 26-OH-Di es insoluble en soluciones acuosas, impidiendo una adecuada valoración de su actividad biológica al ser evaluada en cultivos celulares. Ante esta prerrogativa y con la intención de incrementar la solubilidad y la biodisposición del esteroide 26-OH-Di en las células, a la molécula se le ha agregado un azúcar dando origen al 26-OH-Di-glu. En este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo y apoptótico de la saponina 26-OH-Di-glu en cultivos de células provenientes de cáncer cervicouterino.

MARCO TEÓRICO

La célula

La célula es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos (figura 1), es el elemento básico con la cual todos los organismos están compuestos y en donde se reconocen todas las funciones de los organismos vivos (Curtis y Barnes, 2005; Nelson y Cox, 2005).

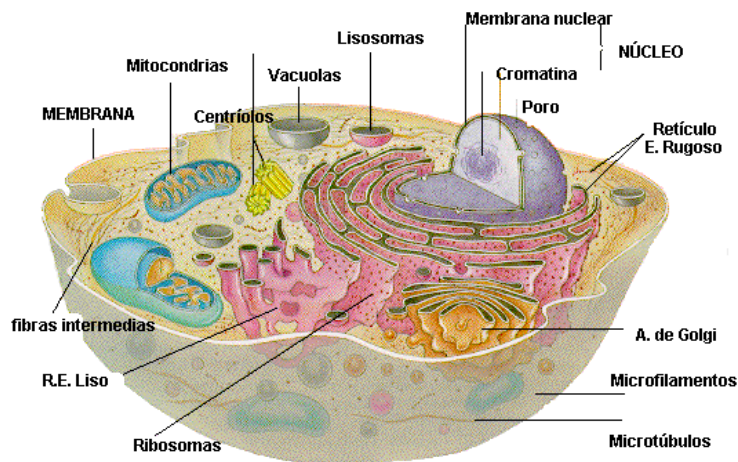


Figura1. Esquema general de una célula animal (tomado y modificado de Nelson y Cox, 2005).

Las células de un organismo pluricelular están comprometidas a colaborar, de modo que para que el organismo crezca y se desarrolle adecuadamente requiere de una meticulosa regulación de actividades cotidianas como la protección, ingestión, digestión, absorción de metabolitos, eliminación de desechos, movimiento, reproducción e incluso la muerte cuando sea necesario para el bien del organismo (Ross *et al.*, 2005; Wayne *et al.*, 2007). Para coordinar su comportamiento, emiten, reciben, interpretan y elaboran conjuntos de señales que actúan como controles sociales, transmitiéndose las unas a las otras como deben de actuar.

Ciclo celular

Los organismos están constituidos por células que se encuentran finamente organizadas formando parte de tejidos, órganos y sistemas. Tal organización es mantenida por el equilibrio existente entre las células que pierde el organismo y las que genera para restablecer la pérdida de éstas. Este equilibrio está dado por la tasa de divisiones celulares que se presentan dentro de una célula en particular. La división celular es el mecanismo fundamental por el cual todos los organismos vivos duplican sus células. En especies multicelulares, un gran número de divisiones son requeridas para crear un nuevo individuo, de tal manera que en un organismo adulto, la división celular es necesaria para poder reemplazar las células que se pierden por accidentes, destrucción o muerte celular programada, generándose millones de nuevas células cada segundo, solamente para mantener el equilibrio. Este fenómeno, implica que para que un organismo pueda replicarse requiere de una serie de eventos celulares que le permitan generar nuevas células, en estos eventos se incluye la duplicación del material genético y de todos los organelos celulares (Alberts *et al.*, 2004).

El ciclo celular se lleva a cabo en diferentes fases, puede variar de un tipo celular a otro, pero ciertos requerimientos son universales (figura 2). Primero la célula debe prepararse para generar dos células hijas con características genéticas idénticas y segundo, el proceso de división celular debe de ir acompañado de la duplicación de todos los organelos citoplasmáticos (Alberts *et al.*, 2004; Pollard y Earnshaw, 2004).

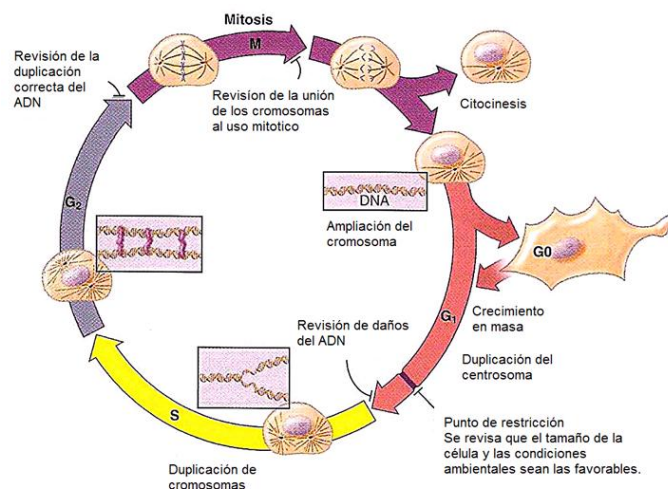


Figura 2. Ciclo celular (tomado y modificado de Pollard y Earnshaw, 2004).

El ciclo celular es un complejo juego de eventos que permiten que una célula de origen a dos células (Lingappa y Farey, 2000), dicho ciclo es dividido en cuatro fases, G1, S, G2, y M. La fase **S** o de síntesis es la fase en la que los cromosomas se duplican. En la fase **M**, también conocida como mitosis ocurre la segregación de una de las dos cromátidas hermanas a cada célula hija; esta fase puede subdividirse en profase, anafase, metafase y telofase. En la fase de mitosis todos los constituyentes celulares como: aparato de Golgi y retículo endoplásmico también se dividen. Las fases **S** y **M** están separadas por las fases de “separación” **G1** y **G2**. La fase **G1** (primera separación) es por una parte una fase postmitótica y por otra un periodo presintético durante el cual la célula se prepara para la progresión del ciclo celular, también puede ocurrir que la célula entre en el estado **G0**. La fase **G2** (segunda separación) es una fase en la cual las células pueden reparar errores que hayan ocurrido en la replicación del ADN antes de la división celular. En el estado G0 las células abandonan el ciclo normal y entran en un periodo de quiescencia (no división). A excepción de algunos tipos celulares, en las células humanas todo el proceso del ciclo celular toma aproximadamente 24 horas; en términos generales la fase M dura 30 minutos, G1 9 horas, S 10 horas, y G2 4.5 horas (Baumforth y Crocker, 2003).

En el ciclo celular se deben completar los eventos de cada fase antes de pasar a la siguiente, por lo que existen puntos de control que monitorean la integridad del ADN y se encuentran en puntos estratégicos del ciclo celular, como son en la fase tardía de G1 y en la interfase G2/M, para prevenir la propagación de células dañadas o mutadas (Mathews y Van, 1998). El control del ciclo celular está regulado por tres principales familias de proteínas: las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, por sus siglas en inglés), las ciclinas y los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) (Baumforth y Crocker, 2003). Las ciclinas son activadores de las CDKs y los CKIs pueden bloquear la actividad de las CDKs, reteniendo a la célula en una fase en particular hasta que las condiciones sean favorables para la proliferación o para que la célula sea dirigida hacia la apoptosis (Baumforth y Crocker, 2003).

Muerte celular

Las células de los organismos pluricelulares son miembros de una comunidad sumamente organizada. El número de células de esta comunidad está regulado con precisión, de tal manera que, aquellas células que ya no son necesarias, se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte (Alberts *et al.*, 2004).

No obstante, que existen diferentes tipos de muerte celular; tales como necroptosis (Degterev *et al.*, 2005; Kroemer *et al.*, 2009), paraptosis (Sperandio *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004), pyroptosis (Kepp *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2007), pyronecrosis (Willingham *et al.*, 2007; Morishige *et al.*, 2010) y autofagia (De Toro, 2006; Fink y Cookson, 2005; Mizushima, 2004); los dos tipos, más estudiados de muerte celular que se reconocen en los organismos son la necrosis y la apoptosis, presentando diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia (figura 3) (Robbins *et al.*, 1993).

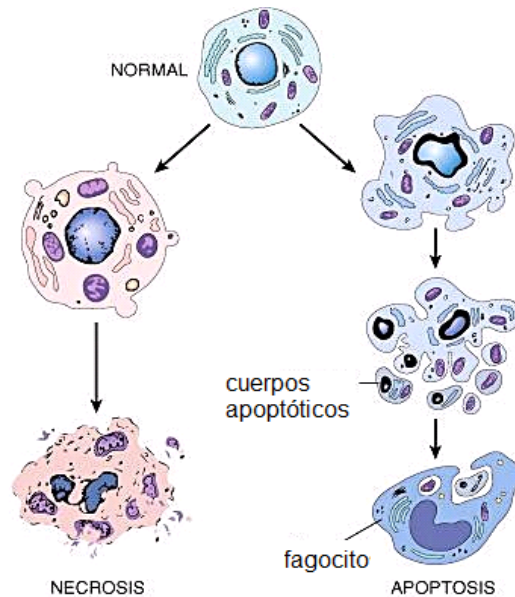


Figura 3. Esquema de necrosis y apoptosis (tomado y modificado de Robbins *et al.*, 1993).

Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular, esta puede ser patológica o accidental y se asocia con la pérdida temprana en la integridad de las membranas, lo que resulta en la salida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular (figura 4). Al igual que ocurre en la apoptosis, en las células necróticas se suman cambios morfológicos que siguen a la muerte celular (Sánchez y Diosdado, 2003; Alberts *et al.*, 2004).

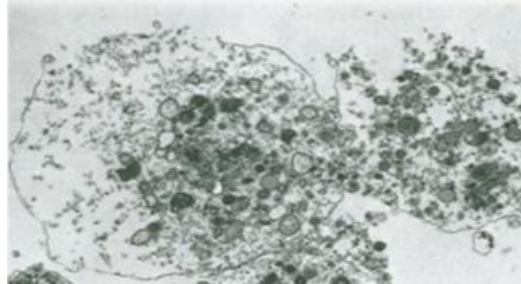


Figura 4. Necrosis (tomado de Alberts *et al.*, 2004).

Durante la necrosis los orgánulos se hinchan y el volumen celular aumenta considerablemente. Estos cambios han sido asociados con alteraciones en el control osmótico, que resulta de una depleción de ATP y la consecuente disfunción de los transportadores iónicos de membrana, conduciendo a una pérdida en el balance de los iones Ca^{++} y Na^+ , que presentan un influjo al tiempo que se presenta una pérdida de K^+ . Durante la necrosis se puede observar condensación de la cromatina y en ocasiones también puede observarse fragmentación nuclear, el ADN se degrada por acción de endonucleasas y exonucleasas que cortan el ADN en fragmentos de una gran variedad de tamaños (Alcalá, 2008).

El cambio inicial resulta en la dilatación del retículo endoplasmático y un incremento del volumen celular. Esta fase reversible de hinchamiento hídrico es seguida por un cambio irreversible que involucra un hinchamiento de alta amplitud de la mitocondria. Tanto el compartimiento interno como externo de la mitocondria llegan a estar muy distendidos y aparecen deposiciones de lipoproteínas de la matriz. La activación de las fosfolipasas unidas a membrana por el calcio es probablemente la principal causa de perturbación celular durante la fase final de la muerte celular necrótica debido a una pérdida precipitada de fosforilación oxidativa y un descenso en la producción de ATP (Elmore, 2007).

Una sobrecarga de calcio conduce a la disfunción de la membrana mitocondrial guiando finalmente a un estado de daño irreversible, donde las membranas de los organelos celulares se fisuran y se pierde la integridad de la membrana celular, permitiendo que el contenido citoplasmático se vacíe al espacio intersticial (Gómez y Zentella, 1998). Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, por lo que la necrosis está asociada a un daño extensivo a tejidos, lo que origina una respuesta inflamatoria extensa y perjudicial (Williams, 1991).

Apoptosis

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). Aunque, se puede considerar que el proceso de apoptosis cumple con cinco funciones, varias de las cuales están involucradas con la eliminación de células no deseadas: esculpiendo estructuras, eliminando estructuras innecesarias, controlando el número de células, eliminando células anormales, no funcionales o dañinas; y produciendo células diferenciadas sin organelos (Jacobson *et al.*, 1997).

También conocida como muerte celular programada, es una forma de muerte celular, en la cual se activa un programa “suicida” en la célula, que conduce posteriormente a la fragmentación del ADN, el encogimiento del citoplasma, cambios en la membrana y muerte celular sin lisis ni alteración de las células vecinas (figura 5) (Alberts *et al.*, 2004).

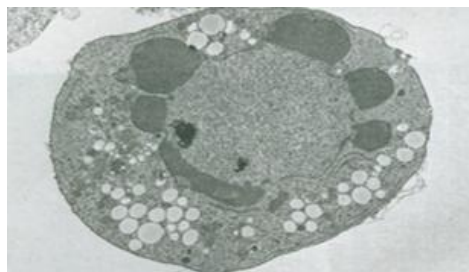


Figura 5. Apoptosis (tomado de Alberts *et al.*, 2004).

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician el proceso apoptótico consiste en una condensación del citoplasma y reducción del volumen celular, acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana nuclear; esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera paralela, la membrana celular genera proyecciones (proyecciones) que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con lisosomas (cuerpos apoptóticos). Hay que resaltar que la formación de los cuerpos apoptóticos previene que el contenido citoplasmático pueda ser liberado al medio extracelular. Antes de que los cuerpos apoptóticos se desintegren, estos son fagocitados por células vecinas en un proceso en el que participan antígenos de superficie y fosfatidilserina, proteína que sólo en estas circunstancias se presenta en la lámina externa de la membrana celular. (Alcalá, 2008; De Toro, 2006; Gómez y Zentella, 1998; Jordán y Harrison, 2003). Esta característica de la muerte celular por apoptosis es responsable de que no se produzca una respuesta inflamatoria (Alcalá, 2008; Gómez y Zentella, 1998).

El núcleo de las células apoptóticas se fragmenta, a este fenómeno se le denomina cariorrexis, además la cromatina celular se condensa con el propósito de impedir la transcripción, a los cuerpos de cromatina compacta se les denomina cuerpos picnóticos. Una característica que hasta ahora se considera exclusiva de la muerte apoptótica, es la degradación internucleosomal de ADN, durante la muerte por apoptosis los fragmentos producidos son múltiplos de 180 pares de bases, correspondientes a la longitud del ADN que se enrolla alrededor de cada nucleosoma (Gómez y Zentella, 1998).

La muerte apoptótica es un proceso complejo que requiere de la activación de varias señales y mecanismos de regulación, los cuales involucran la participación de una serie de moléculas con acción proapoptóticas como en el caso de los miembros de la familia de las caspasas, así como antiapoptóticas como alguno de los miembros de la familia de las Bcl2 y las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Caballero y Morán, 2002). Hoy en día se sabe que la activación de las caspasas ocurre de manera secuencial y específica.

Caspasas apoptóticas

El programa de muerte celular por apoptosis es dependiente de la activación de un grupo de proteasas denominado caspasas. Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva o zimógeno, en éste estado se les denomina también procaspasas, para poder diferenciar su estado inactivo (procaspasas) de su estado activo (caspasa), las células poseen una cantidad basal de procaspasa, cuando se da un proceso de activación la caspasa efectuara su acción de corte de proteínas específicas (regulatorias de la actina, los factores de transcripción y las proteínas involucradas en la síntesis y reparación del ADN), con ello también activa proteínas por debajo en la ruta de señalización de la apoptosis e induce la transcripción de mas procaspasa, los niveles que esta alcanza pueden llegar a ser superiores a la cantidad de basal. Existen dos niveles de acción de estas proteínas, por ello, las caspasas apoptóticas se han subdividido en dos grupos, las caspasas activadoras 8, 10, 9 y 2, y las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. La apoptosis posee dos rutas de activación, una de ellas es conocida como intrínseca o mitocondrial ya que este organelo celular juega un papel central en dicha ruta, la segunda ruta ha sido denominada extrínseca ya que es iniciada por el acoplamiento de los llamados receptores de muerte con sus respectivos ligandos. Las dos vías de activación (extrínseca e intrínseca), convergen en las caspasas ejecutoras, que a su vez, activan a otras proteasas y nucleasas que se encuentran por debajo en la cascada de señalización, así las caspasas ejecutoras (principalmente caspasa 3), junto con otras moléculas activadas durante el programa de muerte por apoptosis, dan lugar a las alteraciones morfológicas y moleculares características de este proceso (pérdida de la adhesión celular, compactación de la cromatina, fragmentación nuclear, fragmentación de ADN, formación de cuerpos apoptóticos), y representan el punto en el que el proceso es irreversible (punto de no retorno) (Alcalá. 2008; Wayne *et al.* 2007; Saikumar, 1999).

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 pro-apoptótico 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 (figura 6) (Gupta *et al.*, 2006).

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, y las moléculas protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w (figura 6) (Gupta *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007).

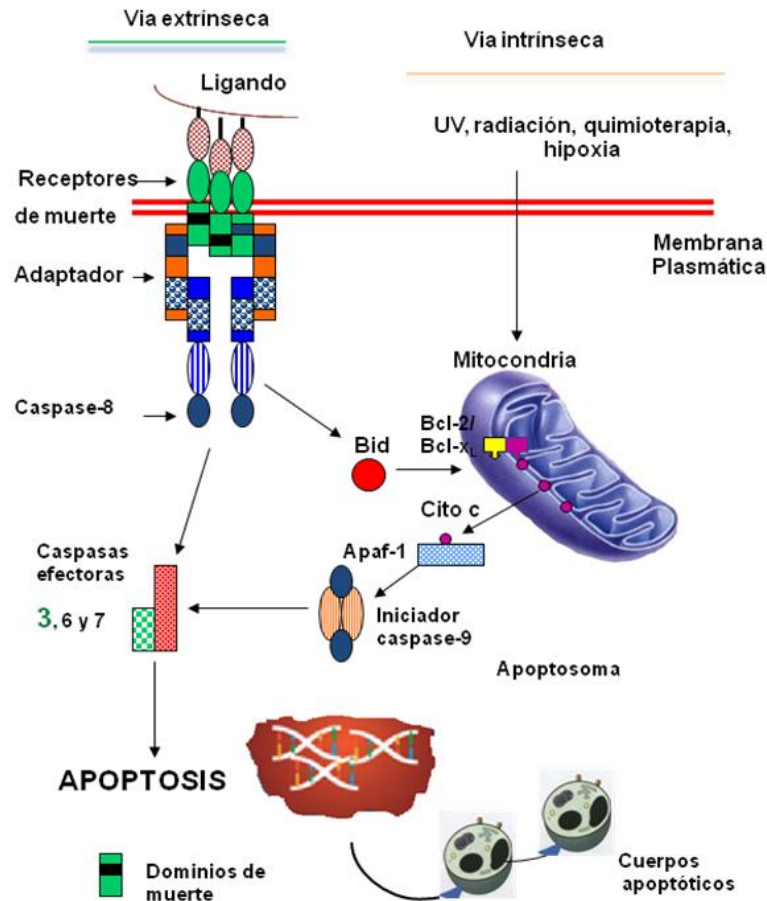


Figura 6. Vías, extrínseca e intrínseca de la muerte por apoptosis (tomado y modificado de Gupta *et al.*, 2006).

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).

En un organismo joven o en desarrollo, la multiplicación celular excede la muerte celular; pero en organismos adultos, los procesos de multiplicación y muerte celular se producen de una manera balanceada para mantener un equilibrio. Cuando alguno de estos mecanismos sufre alteraciones, las células pueden manifestar un crecimiento desmedido, dando lugar a enfermedades como tumores o cáncer (Alcalá, 2008; Ross *et al.*, 2005).

Cáncer

El cáncer es una proliferación acelerada, desordenada e incontrolada de una o algunas células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen tanto al mismo órgano donde se inició el tumor, así como a otros tejidos sanos del organismo. Las causas que provocan tales cambios en la célula se deben a la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Karp, 2006).

En una célula cancerosa, una o más señales estimuladoras e inhibitoras están alteradas, lo que determina que las células proliferen con una velocidad anormalmente alta. El cáncer es una enfermedad originada por mutaciones que producen fallas en el mecanismo que controla el crecimiento y proliferación celular, además de la pérdida de la funcionalidad (Alberts *et al.*, 2004).

Las células cancerosas presentan diversas propiedades que las hacen peligrosas para el huésped: ignoran las señales internas y externas que regulan la proliferación celular, evitan el suicidio por apoptosis, son genéticamente inestables, escapan de sus tejidos de origen (capacidad invasiva), sobreviven y proliferan en entornos ajenos (metástasis). La combinación de estas características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso (Alberts *et al.*, 2004; Hernández y Ríos, 1999).

Tipos de cáncer

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo de célula a partir del cual se originan (Alberts *et al.*, 2004).

El primer grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. En segundo grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. El tercer grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata.

Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas (Darnell *et al.*, 1993; Pardo, 1998).

De todos los tipos de cáncer, el cervicouterino (un carcinoma) presenta una relevancia al ubicarse como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y la segunda a nivel nacional (INEGI, 2008). Por lo tanto su estudio y comprensión es importante para su prevención y tratamiento.

Cáncer Cervicouterino

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300,000 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500,000 casos nuevos se presentan cada año (López *et al.*, 2006).

El cáncer cervical es un carcinoma que se desarrolla en el cérvix, en la región inferior y estrecha del útero (Tirado-Gómez *et al.*, 2005). El cáncer de cérvix invasor se define como una invasión de células anormales en el tejido conjuntivo fibroso y denso situado por debajo de la membrana basal.

El útero es el órgano hueco, en forma de pera invertida, donde se desarrolla el feto. El cuello o cérvix uterino es una abertura que conecta el útero con la vagina (figura 8) (ICCE, 2007).

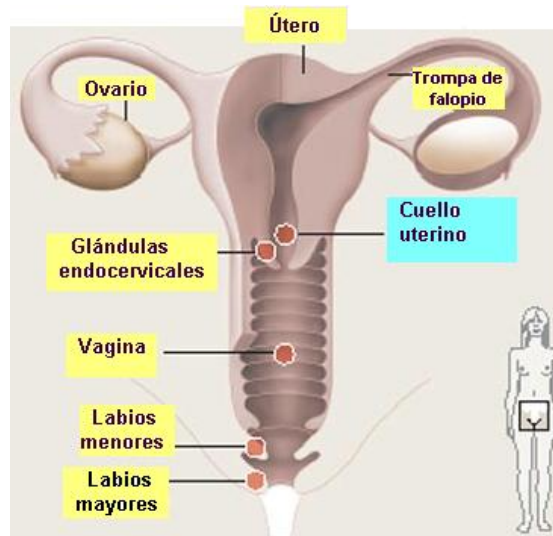


Figura 8. Esquema del aparato reproductor femenino (tomado y modificado de ICCE, 2007).

Las lesiones malignas del cuello uterino pueden ser intraepiteliales preinvasivas o invasoras. Los carcinomas invasores se pueden originar en el epitelio escamoso del exocérnix o en el epitelio glandular del endocérnix. Según el lugar de origen se denominan carcinomas escamosos o adenocarcinomas, respectivamente (Pagani *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2000).

Los eventos tisulares en la progresión del cáncer cervical se clasifican en los diferentes estadios de esta enfermedad. Se inicia con el cáncer *in situ* denominado Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), donde se presentan varios estados de desarrollo. La NIC-I es una lesión Intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado. Presentándose de esta manera un cáncer *in situ*. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico (Hernández, 2004).

Entre los principales factores de riesgo que se conocen para el cáncer de cérvix, se encuentran:

- Infección del cérvix con el virus del papiloma humano (HPV).
- Historial de displasia cervical (una condición pre-cancerosa).
- Múltiples parejas sexuales.

- Actividad sexual antes de los 18 años de edad.
- Primer embarazo antes de los 20 años de edad.
- Historial de no haberse realizado exámenes de Papanicolaou.
- El uso de anticonceptivos orales.
- Tener más de 25 años.
- Fumar.

Se considera que la causa principal del cáncer epidermoide cervicouterino es la infección persistente o crónica por uno o más de los denominados tipos oncógenos del virus del papiloma humano (HPV). Los tipos más frecuentes que causan cáncer son el 16 y el 18, que se encuentran en el 70% de todos los cánceres de cérvix (Herdman y Sherris, 2002).

El virus papiloma humano (VPH) corresponde a un virus ADN, que infecta piel y mucosas, altamente especie específico. Se han aislado, secuenciado y clonado al menos 100 tipos del virus y de ellos, 50 están asociados al tracto genital femenino. Este ha sido clasificado en cepas de “alto riesgo” y de “bajo riesgo” (tabla 1), según el grado de transformación maligna que ocasiona en la célula infectada (León, 2004; Tjalma, *et al.*, 2004).

Riesgo	Tipo de VPH
Alto	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).

Tomando como modelo el VPH 16, para esquematizar el mapa genómico, presenta una estructura de aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región de control largo (LCR) y 8 regiones de lectura abierta (ORF). La infección por VPH, comienza con un microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permitiendo la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de HPV, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1. Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped (endocitosis). Posteriormente la cápside viral

experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfuro que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (figura 9) (Quisehuatl, 2009; Rohl, 2008).

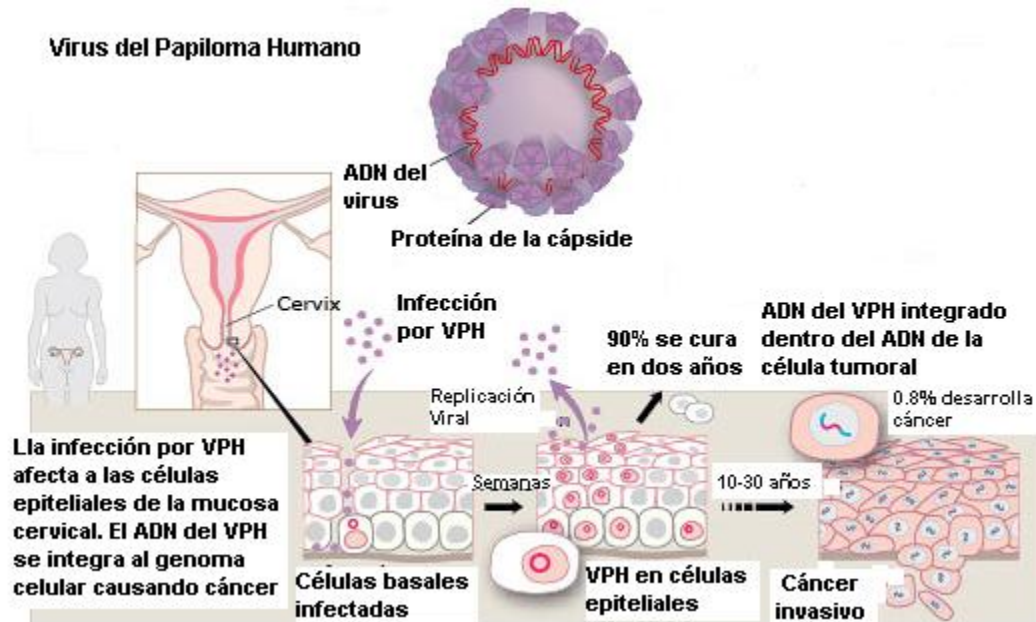


Figura 9. Infección y replicación del virus del papiloma humano (tomado y modificado de Rohl, 2008).

En la primera etapa conocida como no productiva, la población viral localizada en el estrato basal, mantiene la replicación del ADN viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extra cromosómica, llamados episomas que se estructuran en base a histonas y material genético. Las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante (URR), los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula; esta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase vegetante, proliferante o productiva.

En este proceso de replicación del ADN viral participan factores de replicación como las proteínas E1 y E2 que forman complejos que se unen a secuencias en el origen de replicación viral y que utilizan las polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. Las proteínas E4 y E5 se piensa están involucradas en la regulación

de funciones virales posteriores. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas que han de provocar que la célula hospedera entre continuamente a ciclo celular y se divida. (Rivera *et al*, 2006).

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el papanicolaou, que busca cambios en las células de la zona de transformación (figura 10) (Alonso *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2004). Recientemente se han introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas. El sistema actual de reporte para clasificar la citología cervical es el de Bethesda. Las pacientes con resultados de papanicolaou anormales que no tienen una lesión cervical grave son evaluadas por colposcopia y por toma de biopsia o cono.

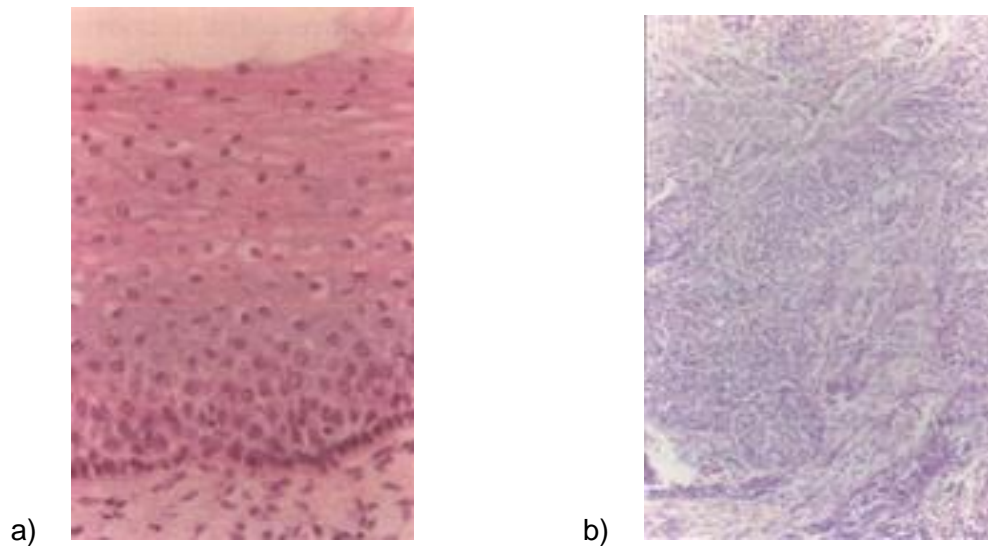


Figura 10. (a) Citología de células de cuello uterino sanas y (b) células de cuello uterino transformadas provenientes de un carcinoma invasivo (Tomada de Alberts *et al.*, 2004).

Tratamientos

El pronóstico (posibilidades de recuperación) y la selección del tratamiento dependen de la etapa en que se encuentra el cáncer y el estado de salud en general del paciente. Se emplean principalmente tres clases de tratamiento, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (Herrera, 2005).

Cirugía

La cirugía es el tratamiento más común para el cáncer cervicouterino, si bien pueden realizarse diferentes tipos de cirugía la decisión final dependerá de ciertas características especialmente del estadio y el tamaño del cáncer.

Este tratamiento implica una operación quirúrgica para quitar el tumor o los tumores. Sin embargo si hay metástasis, es decir, si el cáncer se encuentra demasiado extendido localmente o a distancia este tratamiento es ineficaz (Herrera, 2005).

Radioterapia

La radioterapia es la utilización de radiaciones ionizantes tales como rayos X, rayos gamma y electrones en el tratamiento del cáncer.

Hay tres formas de irradiar un cáncer, la primera y la más utilizada es tratando el tumor desde el exterior a través de la piel por rayos que son emitidos por algún aparato; la segunda se lleva a cabo introduciendo en el organismo, por la boca o mediante inyecciones intravenosas, cuerpos radioactivos que, debido a sus características químicas, se van a fijar en determinados puntos del organismo, los cuales se requieren alcanzar para provocar una irradiación localizada interiormente; y la última se emplea colocando la fuente radioactiva cerca del tumor (Lavelly y Poen, 1995).

Teóricamente, todos los cánceres deberían ser controlados localmente si una dosis lo suficientemente alta se aplicara a la masa tumoral. Sin embargo, en la práctica clínica, no es posible administrar dosis altas sin llegar a generar toxicidad local o sistémica (Rosen *et al.*, 1999).

Quimioterapia

En la actualidad la quimioterapia coadyuvante es el método que complementa el tratamiento de diversos tipos de cáncer. La quimioterapia es el tratamiento de los cánceres por medio de productos químicos.

La quimioterapia consiste en la utilización de medicamentos para matar a las células cancerosas. Para el tratamiento de cáncer cervicouterino se administra por lo general de manera intravenosa. El fármaco o los fármacos circulan a través del torrente sanguíneo para llegar a todas las partes del cuerpo. Por lo que este tratamiento es eficaz para cáncer en estadios avanzados. Sin embargo, los mismos fármacos que matan a las células cancerosas dañan a las células sanas provocando efectos secundarios. Para limitar el daño a las células sanas, la quimioterapia se administra por lo general en ciclos. Los periodos de tratamiento se alternan con periodos de descanso (Cetina *et al.*, 2006; McLaughlin, 1995).

Es conocido que la eficiencia de estas terapias sólo se logra en pacientes cuyos tumores son de fácil acceso, únicos y diagnosticados tempranamente. Desafortunadamente, estas terapias afectan a células normales que están en proliferación (células del cabello, epitelio gástrico, epitelio epidérmico, algunas células sanguíneas, como los leucocitos, entre otras), que resultan severamente dañadas provocando efectos colaterales que demeritan fuertemente la calidad de vida del paciente.

Con respecto a los fármacos utilizados contra el cáncer, la mayoría carece de selectividad y pueden llegar a producir muerte celular por necrosis, mecanismo donde se rompe la membrana celular y todo el contenido plasmático de las células tumorales queda expuesto y se transporta por el torrente sanguíneo distribuyéndose en todo el cuerpo, generando las ya mencionadas reacciones secundarias adversas. Como consecuencia de la respuesta inmunológica inducida por la falta de selectividad, el paciente puede sufrir la pérdida parcial o total de células inmunológicas y esto genera un estado de inmunosupresión que permite el desarrollo de fuertes infecciones. Es por esto que se ha generado un fuerte interés en probar moléculas de origen vegetal y en particular esteroides producidos en distintas especies de plantas, a los cuales se les han atribuido diferentes actividades biológicas, entre las que se destaca la actividad antiproliferativa y antineoplásica.

Esteroides

Los esteroides son un conjunto de productos naturales con excepcional importancia química, biológica y médica, tienen una estructura cuyo esqueleto básico es el ciclopentanoperhidrofenantreno constituido por tres anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros, denominados A, B, C y D; dicho núcleo normalmente se encuentra sustituido por grupos metilo en C-10 y C-13. En C-17 es frecuente encontrar una cadena lateral hidrocarbonada ocasionalmente sustituida (Nelson y Cox, 2005). 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 mecanismos de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos (Castillaa *et al.*, 2009). Debido a su diversa acción biológica, varios esteroides de origen natural y sintético son rutinariamente utilizados en medicina (Mann *et al.*, 1994).

Saponinas y Sapogeninas

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides, se encuentran las saponinas, que son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, poseen una compleja estructura anfifílica formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. La especie humana ha aprendido a emplear en su provecho la amplia actividad biológica de las saponinas; además, muchas de ellas son muy utilizadas en síntesis para la obtención de compuestos de origen natural (Hostettmann y Marston, 1995). De la hidrólisis enzimática o química de las saponinas, se obtienen sapogeninas esteroidales, las cuales poseen 27 átomos de carbono y además del núcleo esteroidal presentan dos anillos más (figura 11), los anillos E (tetrahidrofuránico) y F (tetrahidropiránico).

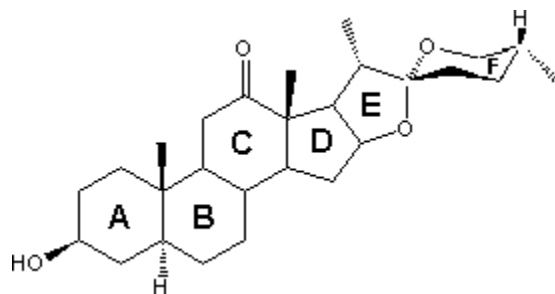


Figura 11. Estructura de una sapogenina natural.

Las saponinas esteroidales son metabolitos secundarios biosintéticos con un alto peso molecular, además, son los principales constituyentes de una gran variedad de tratamientos herbales utilizados en la medicina tradicional (Liu *et al.*, 2005; Waller y Yamasaki, 1996). Las saponinas esteroidales poseen actividad biológica diversa como por ejemplo, antimicrobiana (Jun-Dong *et al.*, 2005), piscicida, molusquicida, insecticida, anticonceptiva, inhibidora del crecimiento vegetal, antiinflamatoria, hipocolesterolémica, inmunomoduladora, antioxidante, hipoglucemiante, hemolítica, antiviral (Rao y Gurfinkel, 2000), citotóxica y antitumoral (Podolak *et al.*, 1998; Rao, 2000; Mimaki *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2001).

Aunque la aglicona juega el papel más importante en la actividad biológica, es bien conocido que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de los glicósidos esteroidales; por ejemplo, incrementando la solubilidad de éstos en medio fisiológico, ayudando a la permeabilidad celular y al tiempo de acción; y dirigiendo a la molécula al sitio activo (Tschamber *et al.*, 2007). Por consiguiente, es de gran interés continuar con la búsqueda de nuevas variantes de glicósidos esteroidales que posean actividad. En general se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado (Trouillas *et al.*, 2005; Yamasaki *et al.*, 1987; Pui-Kwong, 2007).

Las sapogeninas por sí solas, son compuestos naturales de gran trascendencia debido a su utilidad en la preparación de diversos productos esteroidales biológicamente activos. En la década de los cuarentas, las sapogeninas adquirieron gran relevancia por su uso en la síntesis de derivados pregnánicos como la diosgenina y la sarsasapogenina que fueron transformadas en progesterona (Marker y Rohrmann, 1939). Por otro lado, la hecogenina se utilizó para la síntesis de corticoesteroides como la cortisona y la betametasona (Djerassi *et al.*, 1951).

Un ejemplo de sapogenina esteroide es la diosgenina (figura 12) que fue aislada por primera vez en 1936 por Takeo Tsukamoto, a partir de *Dioscorea tokoro*. Esta molécula se ha utilizado como material de partida para la obtención de diversos compuestos esteroidales. Se ha reportado, que la diosgenina posee actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares, como HeLa (cáncer cervicouterino) (Mimaki *et al.*, 1996), HeL 92.1.7 y K562 (eritroleucemia), osteosarcoma 1547 (Son *et al.*,

2007), HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (cáncer de mama) y otras. Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo.

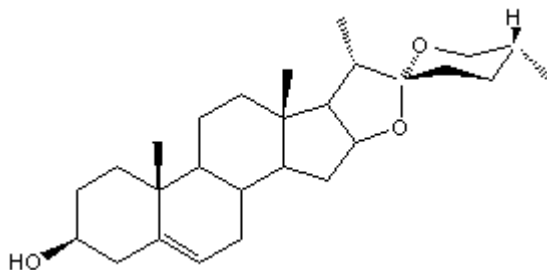


Figura 12. Estructura de la diosgenina.

En el caso de las saponinas, un ejemplo muy característico es el OSW-1 (figura 13) y sus análogos naturales (Xu *et al.*, 2003). Este compuesto que se extrajo por primera vez del *Ornithogalum saundersiae* (Kubo *et al.*, 1992) ha llamado especial atención debido a que su actividad citotóxica es 100 veces mayor comparada con agentes anticancerígenos con aplicación clínica, como por ejemplo el cisplatino, camptotecina y taxol (Deng *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2007).

El OSW-1 (3 β ,17 α -dihidroxi-22-oxocolest-5-en-16 β -il-2-O-4-metoxibenzoil- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-acetil- α -L-arabinopiranosido) es hasta ahora la más representativa e importante de las saponinas colestánicas. Demostró ser extremadamente activo (en ensayos *in vitro*) contra un amplio espectro de células tumorales malignas como la leucemia y varias líneas celulares de cáncer de pulmón. A pesar de la existencia de un sin número de saponinas esteroidales con actividad anticancerígena, el OSW-1 se comportó de una manera diferente y excepcional; debido a ello, grupos de investigación se avocaron a la búsqueda de vías sintéticas para lograr la síntesis total del OSW-1, su aglicona y análogos.

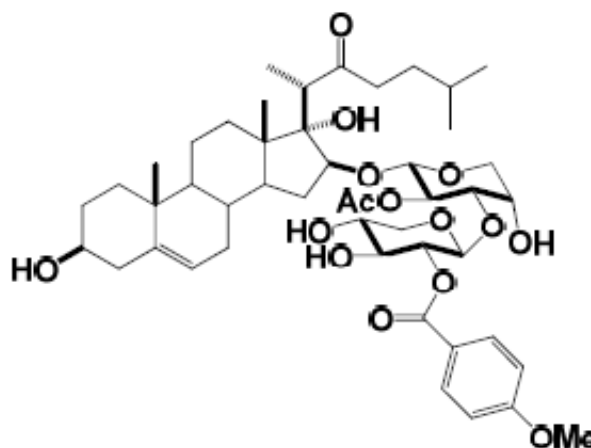


Figura 13. Estructura del OSW-1

De lo anteriormente descrito, se puede apreciar la importancia que poseen las saponinas y las sapogeninas esteroidales como material de partida en la síntesis de nuevos compuestos esteroidales con funciones farmacológicas de gran importancia. El OSW-1 posee una potente actividad antiproliferativa en líneas tumorales humanas y es un compuesto que se extrae en cantidades mínimas (Xue et al, 2008), es por ello que surge la necesidad en tratar de hacer la síntesis total del compuesto o sintetizar análogos a su estructura. Por otro lado, el esqueleto de la sapogenina diosgenina, posee una estructura que puede ser transformada para la obtención de diversos compuestos con alto potencial biológico.

El compuesto diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (26-OH-Di), es un derivado de la diosgenina que presenta actividad antitumoral en la línea de cáncer cervicouterino CaSki, el cual surge de una modificación a la diosgenina, 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).

En este trabajo el compuesto ξ -D-glucopiranosido de (25R)-3 β ,16 β -diacetoxi-22-oxocolest-5-eno-26-ilo (26-OH-Di-glu) es un derivado glicosilado de la diosgenina, pero que fue generado como análogo de la saponina OSW-1, de manera que posea las características funcionales de la aglicona del OSW-1. El 26-OH-Di-glu fue sintetizado en el laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cuenta con un peso molecular de 678,85 g/mol y una fórmula química de C₃₇H₅₈O₁₁ (figura 14). El compuesto 26-OH-Di-glu se sintetizó a partir del 26-OH-Di, 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.

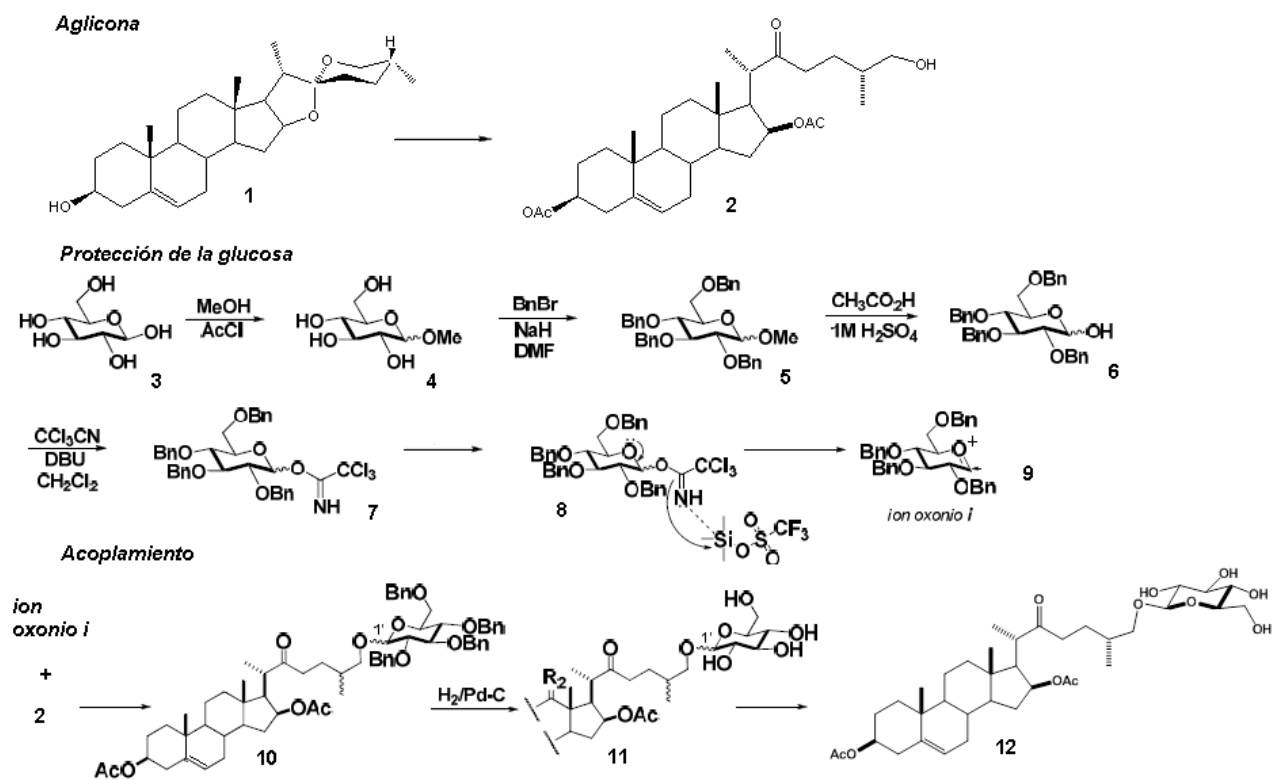


Fig. 14. Síntesis de 26-OH-Di-glu (12) a partir de 26-OH-Di (2) y diosgenina (1).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tratamientos de quimioterapia y radioterapia que se aplican actualmente a las pacientes que sufren de cáncer cervicouterino, resultan ser poco selectivos e ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, además, producen efectos secundarios que afectan la calidad de vida de los pacientes, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas basadas en compuestos con actividad antitumoral y con acción selectiva. Al respecto, existe un fuerte interés por compuestos de origen vegetal y en particular por las saponinas y las sapogeninas esteroidales, como la diosgenina, OSW-1 y sus respectivos derivados, los cuales han sido reportados con actividad antiproliferativa, necrótica, inductora de apoptosis y posible actividad antitumoral. Sin embargo, se sabe que al adicionar azúcar a las sapogeninas se incrementa la actividad antitumoral. Es por ello que el presente trabajo tiene como propósito evaluar si el derivado de la diosgenina 26-OH-Di-glu presenta actividad antiproliferativa y apoptótica sobre líneas celulares de cáncer cervicouterino.

JUSTIFICACIÓN

En México y el mundo, el cáncer cervicouterino, es uno de los tipos de cáncer más incidentes en mujeres de 35 a 65 años de edad y representa la segunda causa de mortalidad con respecto a esta enfermedad. En nuestro país, datos del INEGI reportan un total de 4,500 defunciones anuales constituyéndose un problema de salud grave (INEGI, 2008). A pesar de los tratamientos existentes para combatir el cáncer, 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 de esta enfermedad, entre las cuales podemos mencionar a las saponinas y las sapogeninas esteroidales y sus análogos o derivados, los cuales han sido descritos con propiedades antiproliferativas. Sin embargo, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de estos compuestos sobre el cáncer cervicouterino, por lo que sería conveniente generar información acerca de la actividad de las saponinas esteroides sobre esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Se ha reportado que algunos fitoesteroides como la diosgenina y el OSW-1 presentan actividad antiproliferativa, apoptótica y necrótica en diferentes líneas tumorales, además, se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado. Por tanto, se espera que el 26-OH-Di-glu, derivado glicosilado de la diosgenina y análogo del OSW-1, mejore su respuesta biológica presentando actividad antiproliferativa y apoptótica en células de cáncer cervical, además de selectividad con respecto a células normales.

OBJETIVOS

General

Determinar si el 26-OH-Di-glu afecta el potencial proliferativo y el ciclo celular de las líneas tumorales de cérvix CaSki, HeLa y ViBo, así como determinar su actividad necrótica e inductora de apoptosis.

Particulares

1. Realizar cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cervicouterino así como de linfocitos de sangre periférica humana.
2. Determinar la concentración inhibitoria (IC_{50} , por sus siglas en inglés) del compuesto 26-OH-Di-glu, necesaria para disminuir en un 50% el número celular de cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo.
3. Determinar si el 26-OH-Di-glu afecta la morfología de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
4. Evaluar la actividad necrótica del 26-OH-Di-glu en cultivos de células HeLa, CaSki, ViBo y linfocitos humanos.
5. Evaluar si el 26-OH-Di-glu afecta la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.
6. Determinar si el 26-OH-Di-glu induce condensación de la cromatina o la formación de cuerpos apoptóticos, en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
7. Evaluar si el 26-OH-Di-glu induce la expresión de caspasa 3 activa.
8. Determinar si el 26-OH-Di-glu induce fragmentación de ADN en las líneas tumorales.
9. Determinar si el compuesto 26-OH-Di-glu afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.

METODOLOGÍA

Cultivo de células tumorales.

Células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, se sembraron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pyrex, EUA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, EUA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), al 10 % de suero neonato de ternera (NCS; Gibco, EUA) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (Nuair, EUA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera a saturación húmeda. Se permitió la proliferación de los cultivos hasta alrededor de un 70 % de confluencia para realizar los ensayos posteriores (Morgan y Darling, 1993).

Preparación del 26-OH-Di-glu.

Se partió de un stock de 1000 µg de 26-OH-Di-glu disueltos en 100 µl de etanol. Para los ensayos de curva dosis-respuesta, se realizaron diluciones seriadas que van de 100 a 0.37 µg/ml para la obtención de una IC₅₀. Del stock se tomaron 5 µl y se llevaron a 1 ml con medio RPMI al 5 % de NCS en tubos cónicos de plástico de 1.5 ml para tener una concentración 200 µl/ml del cual se tomaron 500 µl y llevaron a 1 ml con medio RPMI 5 % de NCS para obtener una concentración de 100 µl/ml y se continuó de la misma manera hasta llegar a una concentración de 0.37 µg/ml. Para el resto de los ensayos, la concentración utilizada fue tomada de manera directa del stock.

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

Se sembraron 7500 células provenientes de cáncer cervicouterino en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, EUA), con 100 µl de medio RPMI al 5 % de NCS, por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó el compuesto a probar en RPMI fresco (5 % de NCS) a partir de una dilución seriada (concentraciones que van desde 100 hasta 0.37 µg/ml). El ensayo control contempló la cantidad de vehículo (disolvente) utilizada en la concentración máxima a probar. El cultivo con el compuesto se

mantuvo por 24 horas más, dando un tiempo total de 48 horas. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta (Kueng *et al.*, 1989), para ello, se retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, EUA), por 15 minutos, al cabo del tiempo, se retiró el fijador y se dejó secar, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma-Aldrich, EUA) por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar. Por último, el colorante se solubilizó en ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 %, por 20 minutos en agitación, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Imagen Tecan Spectra).

Para calcular las IC_{50} , los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dosis respuesta, que mostraron el efecto del compuesto sobre la población celular. Posteriormente se realizaron ensayos a partir de los datos obtenidos, hasta obtener el intervalo que reveló la IC_{50} observada.

Determinación de la actividad necrótica basado en la liberación de LDH.

Fueron sembradas 7500 células provenientes de cáncer cervicouterino en una placa de 96 pozos, con 100 μ l de medio RPMI al 5 % de NCS, por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó la IC_{50} obtenida en RPMI fresco 5 % de NCS, por 24 horas más, dando un tiempo total de 48 horas, contemplando los siguientes controles: control basal (únicamente medio de cultivo), control negativo (células con medio y suero al 5 %), control positivo (Tritón X-100 al 1 %,) y vehículo (etanol) cada uno por triplicado. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm (conservando el sobrenadante), se transfirieron 100 μ l/pozo, del sobrenadante de cada uno de los controles y del tratamiento a otra placa de 96 pozos, para adicionarle 100 μ l de la mezcla de reacción (Cyto Tox 96 Non Radioactive Cytotoxicity Assay, PROMEGA, EUA) a cada pozo e incubar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para finalmente medir la absorbancia a 490 nm se utilizó un lector de placas (Imagen Tecan Spectra) (Roche Applied Science Apoptosis).

Para calcular el porcentaje de LDH liberada, los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007. Se obtuvieron gráficos, que mostraron el efecto necrótico del compuesto sobre la población celular.

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.

Se sembraron 750,000 células de cáncer cervicouterino en cajas de plástico de 60 mm (Pyrex, EUA), con medio RPMI al 5 % de NCS. Se dejaron 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente, fueron tratadas con la IC₅₀ del 26-OH-Di-glu cada una de las líneas celulares, durante 24 horas. Para la evaluación por citometría de flujo, las células fueron despegadas con verseno, se centrifugaron y lavaron con buffer salino de fosfatos, pH = 7.3 (PBS). El botón celular fue fijado y resuspendido con 1 ml de una solución 1:1 metanol/PBS, pasados 20 minutos se centrifugaron y se lavaron con PBS. El botón se resuspendió con 500 µl de ARNasa (2.5 U/ml) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 µl de una solución de yoduro de propidio (200 mg/l) (Sigma-Aldrich, EUA), se mezcló y se protegió de la luz. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro de flujo (FACS ARIA II) y analizadas con el software FACSDIVA.

Evaluación de la caspasa 3 activa.

Se sembraron 300 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5 % de NCS y se incubaron por 24 horas. Al término del tiempo, se procedió a tratar con las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular por 24 horas. Posteriormente, se realizó la detección de la caspasa 3 por inmunocitoquímica, esto es, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 20 minutos, al término de este tiempo las células fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS y posteriormente se permearon con Tritón (X-100 0.5 %) durante 5 minutos a 4 °C. Nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y sucesivamente se adicionó el anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3, 1:100 en PBS (CPP32 Ab4; LabVision, EUA) durante un periodo de 24 horas en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se les aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo de cabra anticonejo con FIT-C (Invitrogen, EUA), 1:200 en PBS en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ horas. Posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS,

después se aplicó un fluorocromo afin al ADN DAPI (Sigma-Aldrich, EUA), durante 1 minuto. Nuevamente se lavaron las muestras con PBS. Finalmente se montaron las muestras con medio de montaje (Vector Laboratories, EUA) y se sellaron con resina acrílica con nitrocelulosa. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP), para su posterior análisis.

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

Se sembraron 300 000 células en cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 2.5 ml de RPMI al 5 % de NCS y se incubaron por 24 horas, bajo las mismas condiciones que se realizó para la determinación de la caspasa 3 activa. Al término, las células fueron fijadas con paraformaldehído (al 2 % en PBS). Posteriormente las células se lavaron con PBS y permearon con Tritón X-100 al 0.5 % en PBS, durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente fueron lavadas con PBS, y se adicionó el amortiguador de equilibrio en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron las preparaciones en un papel absorbente sin dejarlas secar. Enseguida fueron incubadas por 1 hora con enzima Tdt (1:3 enzima/amortiguador de reacción), en cámara húmeda. Al término del tiempo se detuvo la reacción con amortiguador de paro (Chemicon International, EUA), (1ml de amortiguador de paro en 34 ml de agua Milli Q), por 10 minutos en agitación suave y en cámara húmeda. Nuevamente se lavaron con PBS e incubaron con anti-digoxigenina-rodamina (Chemicon International, EUA) (68 µl de solución de bloqueo más 62 µl de anti-digoxigenina) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavaron otra vez con PBS en cámara húmeda y se adicionó el fluorocromo DAPI por 1 min. A continuación, se lavaron las muestras con PBS en cámara húmeda y se montaron con medio de montaje, se sellaron con resina acrílica con nitrocelulosa, etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías en un microscopio de alta definición (Nikon, JAP), para su posterior análisis.

Cultivo de linfocitos humanos y determinación de la proliferación celular con carboxifluoresceína (CSFE).

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónico de vidrio (Pyrex, EUA), con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, EUA) (un total de 4 tubos) y se centrifugaron (centrífuga; Dinac, EUA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB, el total de células linfocíticas quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml. Se sembraron las células en una caja Petri de 100 mm, en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, e incubaron durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para el ensayo de carboxifluoresceína, se agregó en cada tubo cónico de plástico la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1 000 000 células/ml de medio total (tubos por condición; activados y marcados con carboxifluoresceína, vehículo y tratamiento). Se realizaron dos lavados con PBS libre de suero. Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, EUA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y se re-suspendieron en 4 ml de RPMI al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 1 000 000 células/ml de RPMI suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., MEX). Para el tratamiento con 26-OH-Di-glu se trataron las células linfocíticas con la IC₅₀ más

alta. Las células contenidas en cada tubo cónico de plástico 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 durante 72 horas. Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 minutos, se centrifugó y retiró el verseno, posteriormente se re-suspendió con 500 μ l de PBS (dos veces), y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo.

Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows. Seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia de ≤ 0.05 .

RESULTADOS

Actividad antiproliferativa.

Con el propósito de evaluar si el 26-OH-Di-glu afecta el potencial proliferativo de células tumorales provenientes del cérvix, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 y 0.78 $\mu\text{g/ml}$ del esteroide. La concentración inhibitoria del compuesto (IC_{50}) fue calculada para cada línea celular a partir de la ecuación de la recta (figura 15, tabla 2).

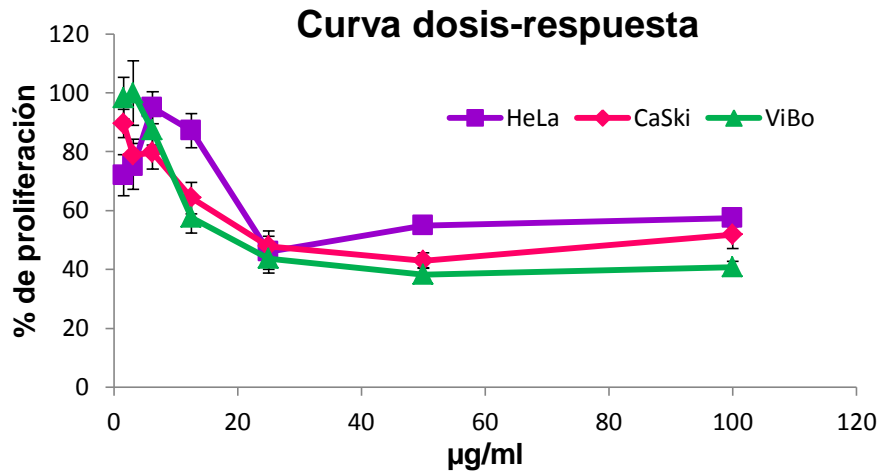


Figura 15. Efecto del esteroide 26-OH-Di-glu sobre el potencial proliferativo de las líneas tumorales provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. 7500 células/pozo fueron cultivadas en cajas de 96 pozos e inducidas con el 26-OH-Di-glu a diferentes concentraciones por 24 horas. El número celular fue evaluado por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.

Línea celular	IC_{50}	
	($\mu\text{g/ml}$)	(μM)
CaSki	23	33.9
HeLa	20	29.5
ViBo	20	29.5

Tabla 2. Concentración inhibitoria del esteroide 26-OH-Di-glu (IC_{50}) para inducir un decremento del 50% en el número celular de cultivos de las líneas tumorales provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Los resultados establecen que el 26-OH-Di-glu ejerce en las células tumorales un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración del esteroide, el número celular disminuye. Los valores de IC_{50} obtenidos fue de 20 ± 0.71 , 23 ± 0.95 y 20 ± 0.91 $\mu\text{g/ml}$ para HeLa, CaSki y ViBo, respectivamente.

Efecto en la morfología.

Algunos trabajos indican que el efecto de compuestos antitumorales cambian la morfología de las células (Camacho, 2010; Galicia, 2010; López, 2010; Fernández *et al.*, 2010). Para determinar el efecto del 26-OH-Di-glu sobre la morfología celular de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, cultivos de estas líneas tumorales fueron tratadas con las respectivas concentraciones del esteroide (IC_{50}) por 24 horas y fueron observadas en un microscopio invertido con un objetivo de 10X y un ocular de 10X y fotografiados con una cámara digital (SONY) con un zoom de 1.5 (figura 16).

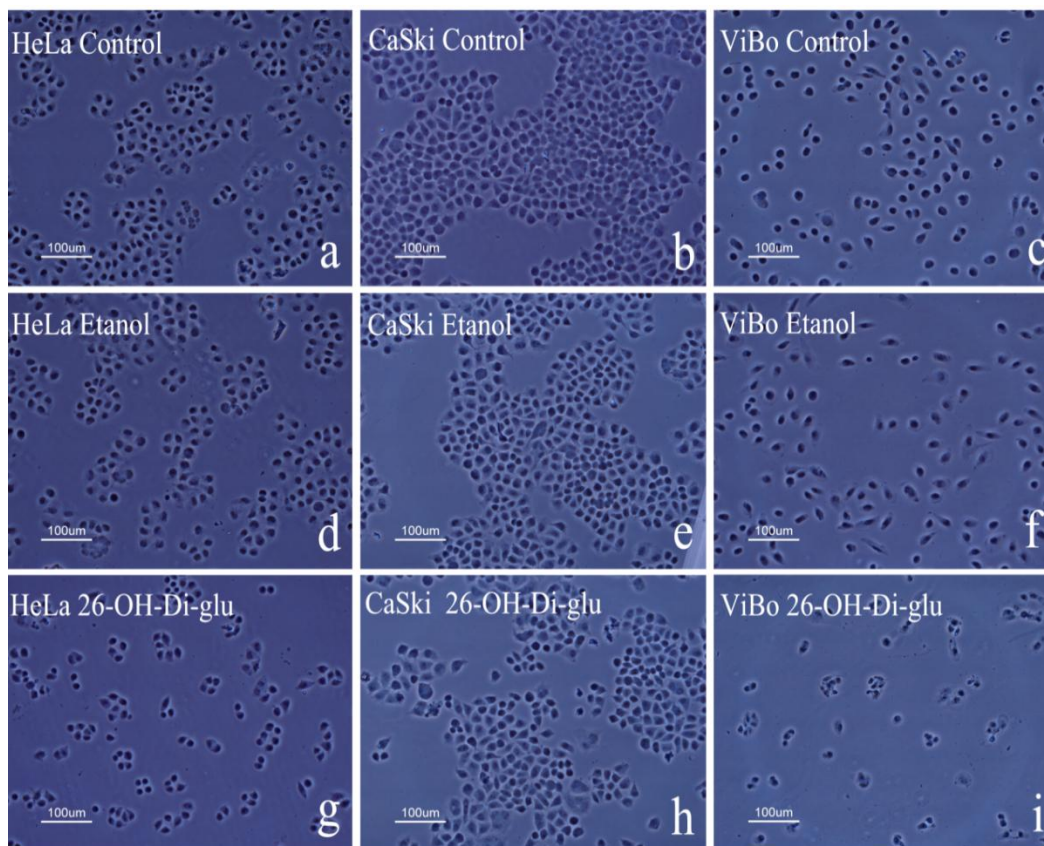


Figura 16. Efecto del 26-OH-Di-glu en la morfología celular de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas y tratadas con las IC_{50} de cada línea celular de 26-OH-Di-glu por 24 horas. Las imágenes a, b, c muestran los controles de HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. Las células que se muestran en las imágenes d, e, f fueron estimuladas con 2.3 μ l de etanol/ml. Las fotografías g, h, i son células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el 26-OH-Di-glu a la concentración de IC_{50} obtenidas para cada una de las líneas tumorales.

Como se observa en la figura 16, la morfología de las células tumorales HeLa y ViBo tratadas con el fitoesteroide 26-OH-Di-glu presentan un menor tamaño y forma esférica. Sin embargo, el efecto sobre la morfología de las células CaSki no es tan evidente como en las otras líneas celulares.

Actividad necrótica.

Con la finalidad de evaluar si el 26-OH-Di-glu es necrótico a las concentraciones de las IC_{50} obtenidas para cada una de las líneas tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con 20 $\mu\text{g/ml}$ para las células HeLa y ViBo y con 23 $\mu\text{g/ml}$ para las células CaSki, y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue determinada en cada uno de los sobrenadantes provenientes de los cultivos tumorales, como un parámetro indicativo de daño a la membrana plasmática que indica una muerte celular por necrosis (figura 17).

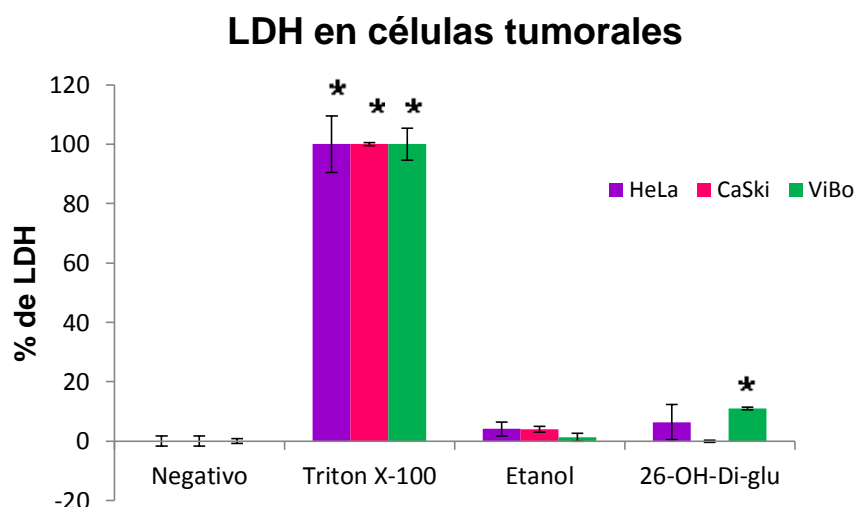


Figura 17. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con la IC_{50} respectiva del esteroide 26-OH-Di-glu. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs Etanol, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados en la figura 17, establecen que el 26-OH-Di-glu genera una pequeña actividad de la LDH en los cultivos de células tumorales HeLa, mientras que para las células CaSki el efecto necrótico es nulo, indicando que no induce una muerte por necrosis a la concentración de 20 y 23 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, en las células ViBo se observa un ligero incremento en la actividad de la LDH (11 %), que es estadísticamente significativo, sugiriendo que el 26-OH-Di-glu ejerce una ligera acción necrótica en las células ViBo.

Actividad necrótica en células no tumorales.

No obstante que el 26-OH-Di-glu ejerce una acción antiproliferativa en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino, con un nulo o bajo efecto necrótico, es importante establecer si el 26-OH-Di-glu ejerce una acción necrótica en células no tumorales, por lo que cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana de donadores sanos, fueron tratados con 23 $\mu\text{g/ml}$ del esteroide y la actividad de la LDH fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de estos cultivos (figura 18).

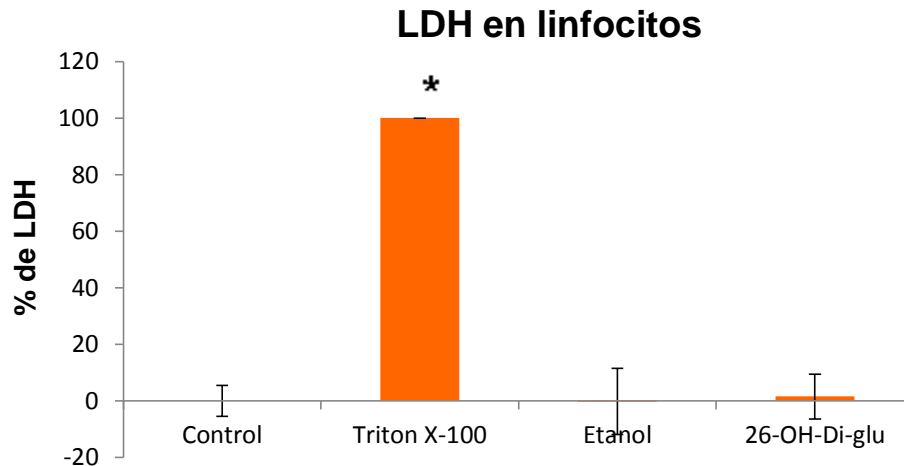
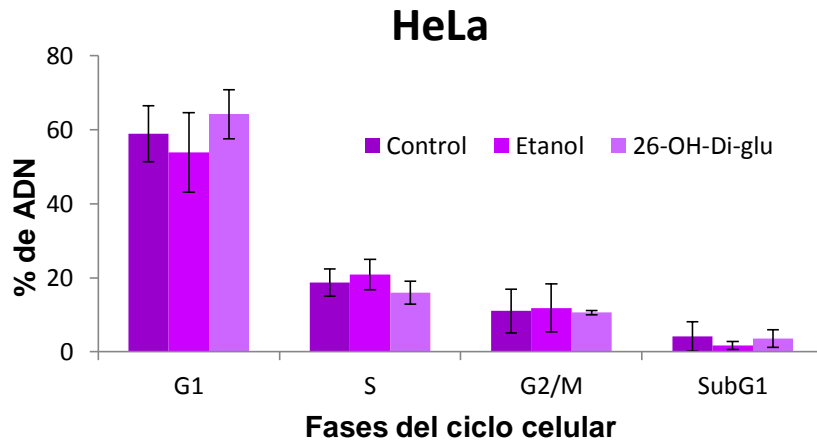


Figura 18. Liberación de LDH en cultivos de linfocitos humanos, tratados con 23 $\mu\text{g/ml}$ de 26-OH-Di-glu. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs Etanol, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

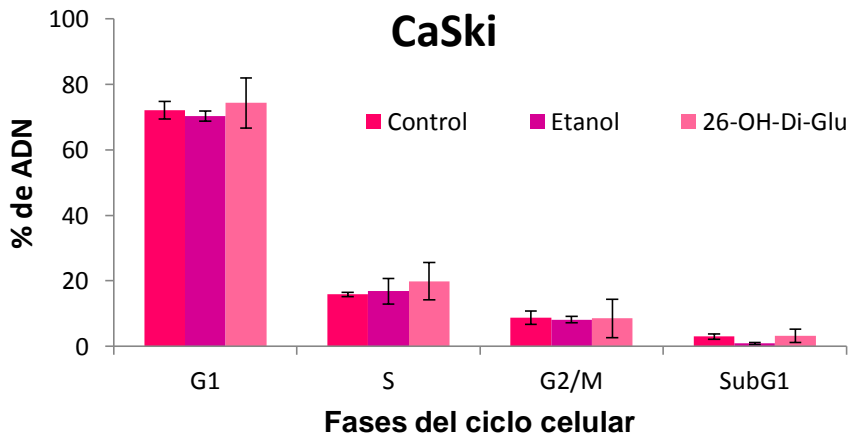
Como se aprecia en la figura 18, no se detectó actividad de la LDH en los sobrenadantes provenientes de cultivos de linfocitos tratados con el esteroide, sugiriendo que el 26-OH-Di-glu no produce necrosis en las células normales.

Efecto en el ciclo celular

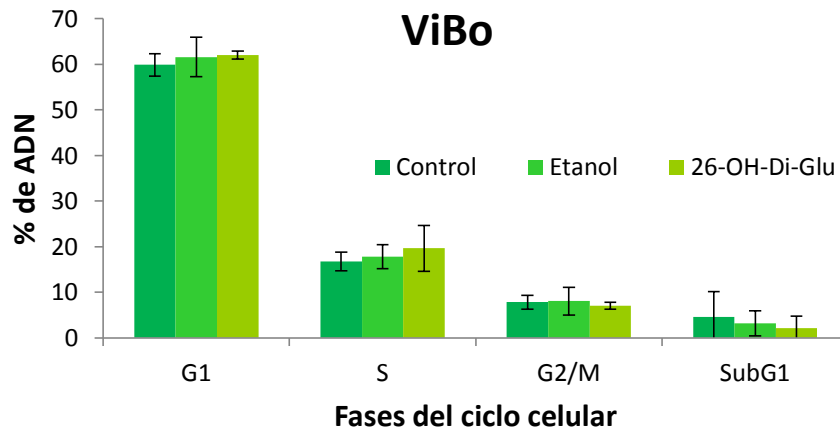
Con la intención de precisar, sí el decremento en el número celular observado en los cultivos celulares de cáncer cervicouterino está relacionado con la detención en alguna fase del ciclo celular, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con la IC₅₀ de 26-OH-Di-glu obtenida para cada línea y posteriormente la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular, fue determinada por citometría de flujo (figura 19 a, b, c).



a)



b)



c)

Figura 19. Efecto del 26-OH-Di-glu sobre la distribución del ADN en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular de las líneas de cáncer de cérvix a) HeLa, b) CaSki y c) ViBo. Las células fueron tratadas con las IC_{50} por 24 horas, la distribución de ADN fue evaluada por citometría de flujo. Las gráficas representan el promedio de 6 eventos independientes para las 3 líneas (* $p < 0.05$ vs Etanol, ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se aprecia en la figura 19, el 26-OH-Di-glu no afecta la distribución del ADN en ninguna de las fases del ciclo celular de las tres líneas de cáncer cervicouterino, sugiriendo que la actividad antiproliferativa del esteroide es independiente del ciclo celular.

Efecto apoptótico del 26-OH-Di-glu

Para determinar si la saponina 26-OH-Di-glu induce una muerte celular por apoptosis, los núcleos de las células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino fueron teñidas con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), para observar la condensación de la cromatina, debido a que durante el proceso temprano de apoptosis, se observa este rasgo característico, además del encogimiento de las células. Posteriormente los fragmentos celulares se separan dentro de cuerpos apoptóticos, manteniendo la integridad de los organelos y de la membrana plasmática.

En la figura 20, en las células CaSki y ViBo tratadas con las IC_{50} de 26-OH-Di-glu a las 24 horas se observó condensación de cromatina y en el caso de ViBo se puede apreciar la presencia de cuerpos apoptóticos (se indican con flechas blancas).

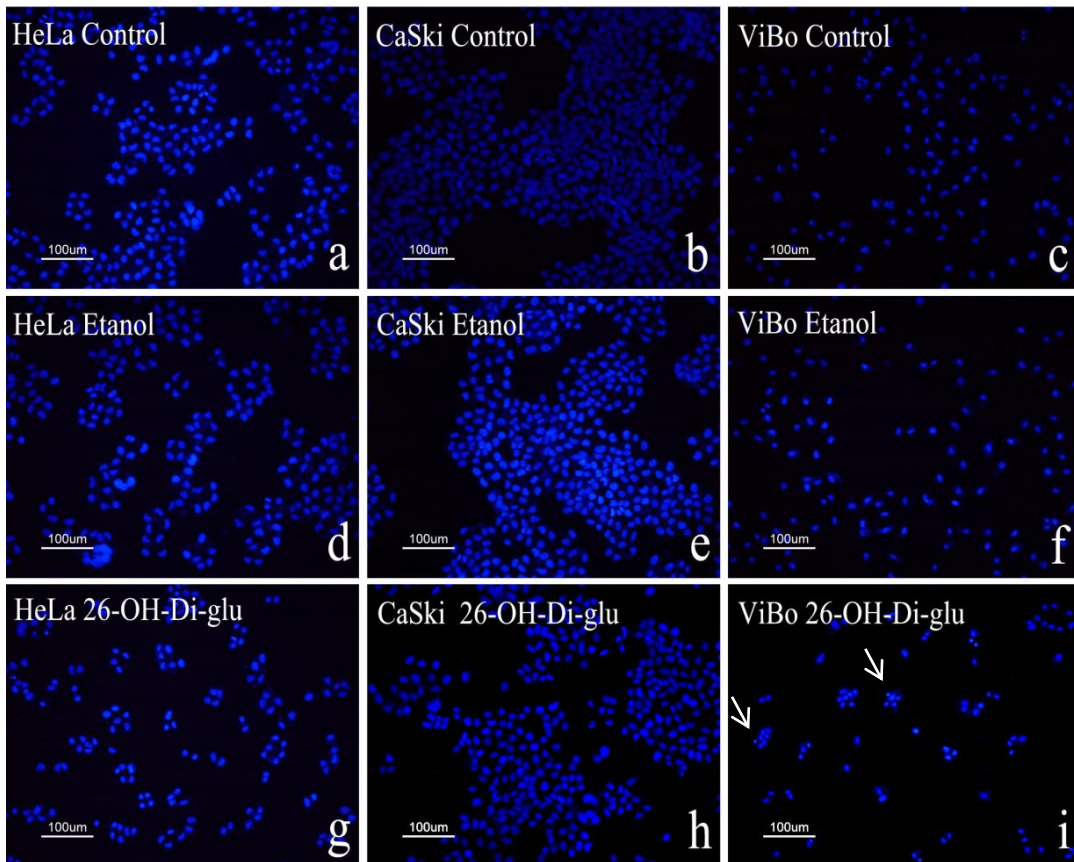


Figura 20. Compactación de la cromatina en células CaSki y ViBo tratadas con la IC_{50} de 26-OH-Di-glu a las 24 horas. 200,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, con 2 ml de RPMI-1640 al 5% con NCS. Las fotografías muestran los núcleos marcados con DAPI en color azul, los controles de HeLa, CaSki y ViBo (a, b, c), las células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con etanol (d,e,f) y las células tratadas con el 26-OH-Di-glu (g, h, i).

No obstante la condensación de la cromatina, así como la formación de cuerpos apoptóticos observados en los cultivos de células tumorales tratadas con el 26-OH-Di-glu, no es suficiente para concluir que la saponina induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte por apoptosis, por lo que se determinó la expresión de caspasa 3 activa (una caspasa ejecutora que se activa al final de la apoptosis) por inmunocitoquímica (figura 21).

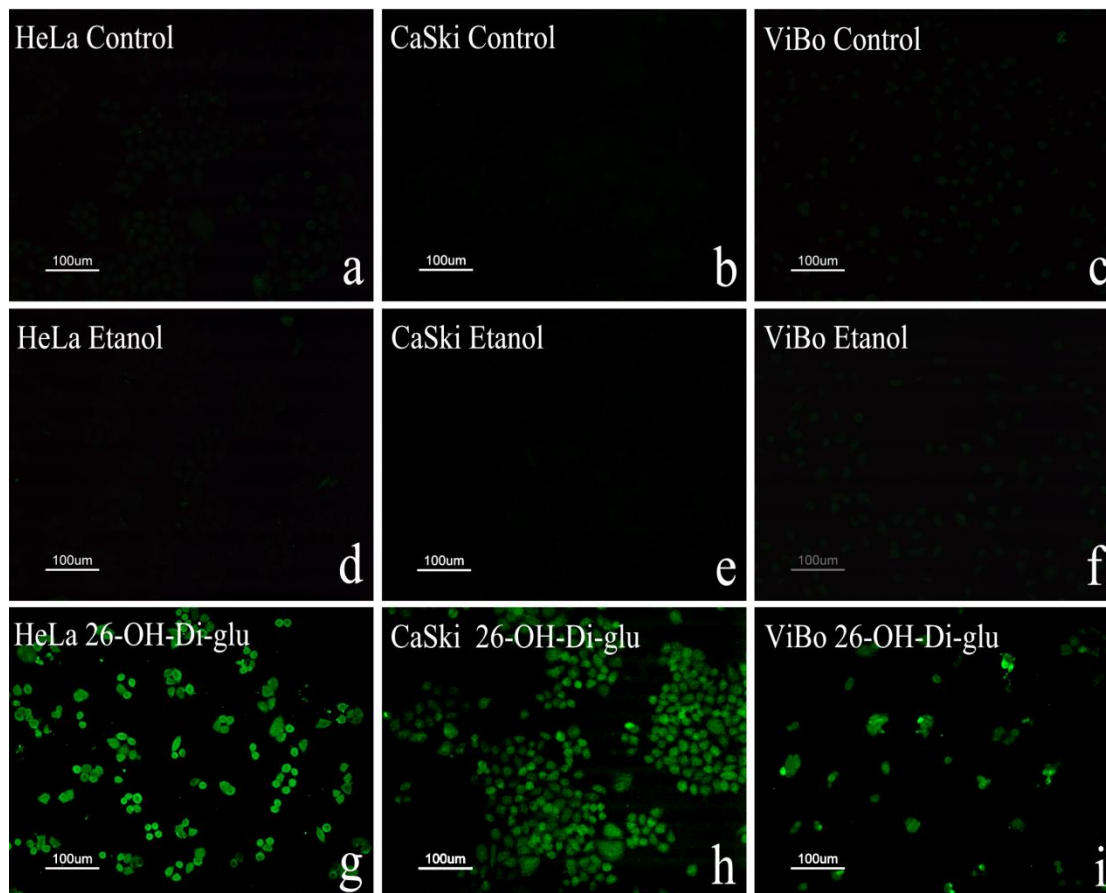


Figura 21. Evaluación de la expresión de la caspasa 3 en células CaSki y ViBo tratadas con la IC_{50} de 26-OH-Di-glu a las 24 horas. 200,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, con 2 ml de RPMI-1640 al 5% con NCS. Los controles de las células HeLa, CaSki y ViBo (a, b, c) y las células tratadas con etanol (d,e,f) no presentan expresión de caspasa 3, a diferencia de las células tratadas con el 26-OH-Di-glu donde la expresión de la caspasa 3 se puede apreciar en las células teñidas de color verde (g, h, i).

En la figura 21 se muestra que para las tres líneas tumorales el compuesto 26-OH-Di-glu induce la expresión de la caspasa 3 activa, indicando que el proceso apoptótico se activa.

Con la finalidad de establecer si el evento apoptótico inducido por el esteroide en las tres líneas tumorales se lleva a cabo hasta la fragmentación del ADN como consecuencia de la activación de la caspasa 3, cultivos de las líneas HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el compuesto 26-OH-Di-glu y la fragmentación del ADN fue determinada mediante la técnica de TUNEL, que consiste en marcar el extremo libre 3' OH del ADN con dUTP (desoxi-uridina trifosfato) (figura 22).

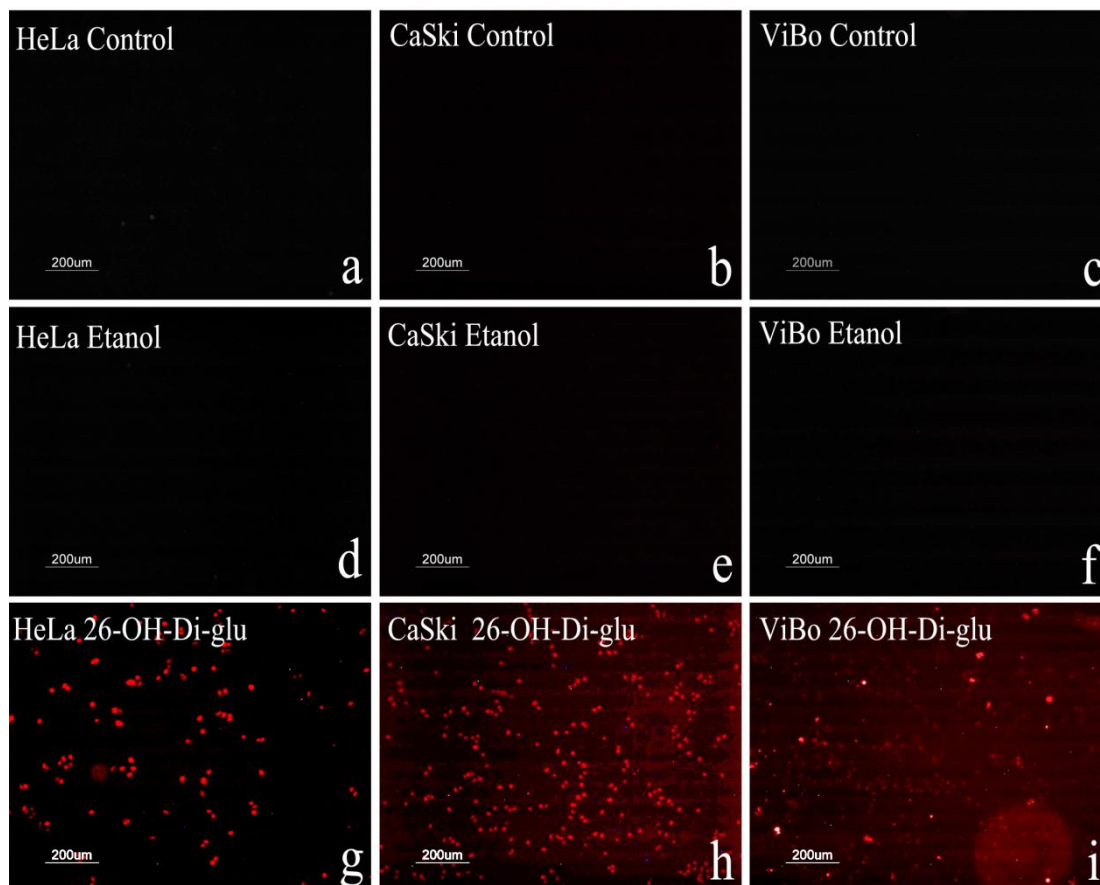


Figura 22. Fragmentación de ADN por efecto de las IC_{50} de 26-OH-Di-glu sobre las células HeLa, CaSki y ViBo a las 24 horas. 200,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, con 2 ml de RPMI-1640 al 5% con NCS. Los controles de las células HeLa, CaSki y ViBo (a, b, c) y las células tratadas con etanol (d,e,f) no presentan fragmentación de ADN, a diferencia de las células tratadas con el 26-OH-Di-glu donde la fragmentación de ADN se puede apreciar en las células teñidas de color rojo (g, h, i).

Como se observa en la figura 22, el esteroide 26-OH-Di-glu induce la fragmentación del ADN en las tres líneas tumorales, confirmando que el esteroide 26-OH-Di-glu induce a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a una muerte por apoptosis.

Actividad antiproliferativa en células linfocíticas.

De manera paralela, con la intención de evaluar si el 26-OH-Di-glu afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas (no tumorales), cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica de donadores sanos fueron inicialmente marcados con carboxifluoresceína, activados con fitohemaglutinina y estimulados con 23 $\mu\text{g/ml}$ del esteroide 26-OH-Di-glu por 72 horas. La proliferación celular fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando un FACS Aria II y los datos fueron analizados mediante el FACS-Diva software (figura 23).

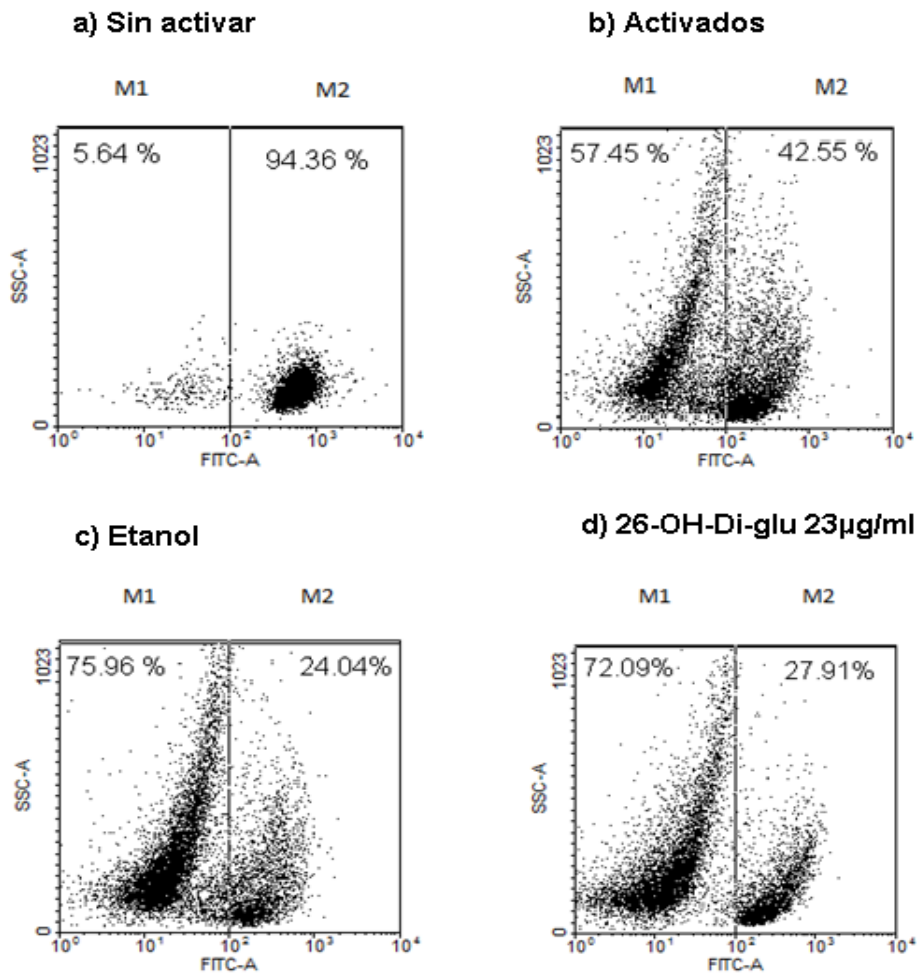


Figura 23. Efecto del 26-OH-Di-glu en el potencial proliferativo de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos fueron inicialmente marcados con carboxifluoresceína y tratados y no tratados con 23 $\mu\text{g/ml}$ de 26-OH-Di-glu. La proliferación fue medida por marcaje con carboxifluoresceína y evaluada 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) 23 $\mu\text{g/ml}$ de 26-OH-Di-glu.

Los resultados muestran que el 26-OH-Di-glu a una concentración de 23 $\mu\text{g/ml}$, no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas (figura 23), sugiriendo que el 26-OH-Di-glu ejerce una actividad antiproliferativa con acción selectiva a la concentración probada.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las saponinas son estructuralmente una clase diversa de glucósidos, las cuales han atraído mucha atención recientemente debido a la gran cantidad de actividades biológicas que presentan, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiproliferativas e inductoras de apoptosis, por lo que, constituyen una importante fuente de productos de origen natural que conducen al desarrollo de novedosos y prometedores quimioterapéuticos. De entre la diversa gama de saponinas que se han estudiado, la diosgenina es interesante porque se ha encontrado que presenta actividad antitumoral en varias líneas tumorales. No obstante esta característica, la diosgenina es poco útil para ser aplicada, debido a su acción necrótica y a su baja solubilidad en sistemas acuosos, generando la necesidad de crear análogos o derivados de estas moléculas.

Se ha reportado que la diosgenina inhibe la proliferación de células de melanoma maligno B16 con una IC_{50} de 10 μ M (Lee *et al.*, 2007), en células de leucemia K562 con una IC_{50} de 15 μ M (Liu *et al.*, 2005) y en las células de osteosarcoma 1547 con una IC_{50} de 40 μ M (Trouillas *et al.*, 2005), es importante mencionar que compuestos análogos o derivados de la diosgenina también tienen efecto sobre la proliferación celular de diferentes líneas tumorales. Por ejemplo, la metil-protodioscina tiene un efecto antiproliferativo en células de cáncer de hígado HepG2 con una IC_{50} de 20 μ M (Wang *et al.*, 2006), en células de leucemia K562 y NB₄ con una IC_{50} de 3 y 5 μ M respectivamente, y en células de colon HT-29 con una IC_{50} de 1.5 μ M (Liu *et al.*, 2005), además, en células de cáncer cervicouterino HeLa, moléculas análogas al OSW-1 disminuyen su proliferación en concentraciones que van desde 0.0071 a 14.9 μ M (Tang *et al.*, 2007; Pui-Kwong, 2007).

Una característica general en estos compuestos, es su actividad citotóxica y antiproliferativa. Con respecto al Diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 β ,16 β -diilo (26-OH-Di), el cual es un derivado diosgenínico sin la presencia del azúcar, fue evaluado en cultivos de células CaSki de cáncer cervicouterino produciendo un efecto antiproliferativo y apoptótico sobre ésta línea celular con una IC_{50} de 24 μ g/ml (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010); sin embargo, este compuesto presentó problemas de solubilidad a concentraciones mayores de 25 μ g/ml, por tal motivo, resultó difícil evaluarlo en otras líneas tumorales. Este resultado sugirió que es necesario incrementar la

solubilidad de este compuesto en sistemas acuosos, lo cual se logró adicionándole un azúcar en el carbono 26.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la solubilidad del esteroide 26-OH-Di-glu mejoró con respecto a la del 26-OH-Di, de manera que, permitió evaluarlo en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Además, al igual que otros esteroides saponínicos, el 26-OH-Di-glu presenta una actividad dependiente de la dosis y un efecto antiproliferativo similar (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010).

Desafortunadamente, la mayoría de los fármacos que se utilizan en las terapias contra el cáncer resultan ser citotóxicos, produciendo una muerte celular necrótica, no obstante, estudios de citotoxicidad han revelado que las saponinas presentan una baja actividad necrótica (Chun-Te *et al.*, 2007), además, se ha descrito que la diosgenina y sus derivados inducen muerte por apoptosis y solo algunos de ellos llegan a producir un efecto necrótico. Por ejemplo, la metil-protodioscina presenta actividad necrótica en varias líneas de cáncer humano (Wang *et al.*, 2006), las células de cáncer colorectal HCT-116 y osteosarcoma 1547 tratadas con diosgenina a una concentración de 35 μM , registran un efecto necrótico de 50 %, evaluada por la técnica de MTT (Raju y Bird, 2007) y en células K562 de leucemia al ser tratadas con una IC_{50} de 15 μM de diosgenina se registró una fuerte actividad necrótica (Liu *et al.*, 2005); mientras que la diosgenina no produce necrosis en células de osteosarcoma 1547 con una IC_{50} de 40 μM (Moalic *et al.*, 2001; Corbiere, 2003). Con respecto al 26-OH-Di-glu, éste mostró un bajo efecto necrótico en células HeLa y ViBo, presentando una actividad de la LDH de 6.35% y 11.01% respectivamente, mientras que para la línea celular CaSki se registró una nula actividad necrótica, lo cual también sucede con el 26-OH-Di para esta misma línea tumoral.

Desafortunadamente en la mayoría de los compuestos reportados con actividad antiproliferativa, solo se determina la actividad citotóxica de estos compuestos en cultivos de líneas celulares tumorales, sin contemplar pruebas en células normales. Lamentablemente existe escasa información del efecto de las saponinas y de los compuestos derivados de la diosgenina en células no tumorales que permitan establecer si estos compuestos presentan acción selectiva. No obstante esta escases de pruebas en células no tumorales, en el 2010 se reportó que el derivado diosgenínico 26-OH-Di no es necrótico a una concentración de 24 $\mu\text{g/ml}$ para la línea proveniente de cáncer

cervicouterino CaSki ni para células linfocíticas no tumorales (Fernández *et al.*, 2010), resultados que son coincidentes con los obtenidos en este trabajo para el 26-OH-Di-glu.

En cuanto al efecto en el ciclo celular, se ha reportado que la diosgenina detiene a las células de osteosarcoma humano 1547 en la fase G1 y S al ser tratadas con 40 μM (Trouillas *et al.*, 2005; Corbiere *et al.*, 2003), mientras que para las células de leucemia K562 al administrarles 15 μM las células se detienen en la fase G2/M (Liu *et al.*, 2005). En el caso de las células HeLa se ha descrito que la diosgenina no afecta su ciclo celular (Huo *et al.*, 2004), de la misma manera, el 26-OH-Di no afecta el ciclo celular de la línea tumoral CaSki (Fernández *et al.*, 2010), lo cual coincide con nuestros resultados ya que la actividad antiproliferativa de la saponina 26-OH-Di-glu es independiente del ciclo celular en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

De igual manera se ha descrito que la diosgenina y sus derivados inducen muerte por apoptosis. Al respecto, se ha reportado que la diosgenina activa muerte por apoptosis en células de leucemia humana k562 con una IC_{50} de 15 μM (Liu *et al.*, 2005), mientras que en células HeLa se indujo apoptosis con una IC_{50} de 30 μM (Huo *et al.*, 2004). También se sabe que moléculas análogas al OSW-1 generan apoptosis a concentraciones que van desde 0.0071 a 14.9 μM (Tang *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2007; Pui-Kwong, 2007). El hecho que también el 26-OH-Di induzca apoptosis en las células CaSki (López, 2010; Fernández *et al.*, 2010) y que el 26-OH-Di-glu, indujera apoptosis en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, sugiere que el azúcar en el carbono 26 del 26-OH-Di-glu no es el responsable de esta actividad.

Es de llamar la atención que la mayoría de los compuestos descritos y los utilizados en quimioterapias presentan una actividad necrótica con acción poco selectiva, generando efectos secundarios indeseables, demeritando fuertemente la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, se sabe que el OSW-1 no afecta a células de pulmón, fibroblastos de ovario y linfocitos normales (Peng *et al.*, 2007; Pui-Kwong, 2007). Con respecto al 26-OH-Di-glu, análogo del OSW-1, nuestros resultados establecen que éste presenta actividad antiproliferativa en las células tumorales de cáncer cervicouterino sin afectar el potencial proliferativo de las células linfocíticas (no tumorales), presenta escasa o nula actividad necrótica tanto en células tumorales así como en células normales (células linfocíticas) e induce muerte por apoptosis en células de cáncer cervicouterino, lo

que significa que conserva las propiedades selectivas del OSW-1. Estas características nos permiten proponer a este esteroide como un digno candidato para ser evaluado en modelos *in vivo* con la intención de valorar su potencial terapéutico para enfermedades como el cáncer cervicouterino.

CONCLUSIONES

- El compuesto 26-OH-Di-glu reduce la densidad celular en un 50% de cultivos de células HeLa y ViBo a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y 23 $\mu\text{g/ml}$ para las células CaSki.
- El esteroide 26-OH-Di-glu afecta la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo.
- El 26-OH-Di-glu induce a una muerte por necrosis en células HeLa y ViBo en un 6.35% y 11.01% respectivamente, mientras que en CaSki no se presenta un efecto citotóxico.
- El 26-OH-Di-glu no induce a una muerte por necrosis en células linfocíticas a una concentración de 23 $\mu\text{g/ml}$.
- El 26-OH-Di-glu no afecta el ciclo celular de las células HeLa, CaSki y ViBo a una concentración de 23 $\mu\text{g/ml}$.
- La condensación de la cromatina, el incremento en la expresión de la caspasa 3 activa y la fragmentación de ADN en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el 26-OH-Di-glu, indican la activación de una muerte por apoptosis.
- El 26-OH-Di-glu no afecta el potencial proliferativo ni induce muerte por necrosis en cultivos de linfocitos humanos a una concentración de 23 $\mu\text{g/ml}$.

PERSPECTIVAS

A pesar de demostrar que el esteroide 26-OH-Di-glu presentan una actividad antiproliferativa y apoptótica en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cervicouterino, sería conveniente repetir este trabajo con otras líneas de cáncer de cérvix infectadas con los tipos de alto riesgo del VPH, así mismo como con otros tipos celulares no infectados con este virus, con el propósito de confirmar y de ser el caso de generalizar la acción antiproliferativa de estos compuestos.

Por otro lado también sería conveniente realizar el análisis del efecto del compuesto 26-OH-Di-glu sobre otras líneas celulares de cáncer diferente a la de cáncer cervicouterino (pulmón, mama, próstata... etc.) con la intención de determinar si su efecto antitumoral es independiente del tipo del tumor, o es específico de tumores de cáncer de cérvix.

También es importante determinar la molécula o moléculas que están implicadas en la acción antiproliferativa y apoptótica, de tal forma que se pueda aportar más información sobre el mecanismo de acción del compuesto, con el propósito de valorar su potencial quimioterapéutico y evaluar la capacidad de resistencia que las células tumorales pueden generar contra la aplicación del compuesto.

LITERATURA CITADA

- Alberts B., Jhonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2004). *Biología Molecular de la Célula*. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona.
- Alcalá-Sánchez S. (2008). *Identificación funcional de moléculas inductoras de muerte celular: Implicación del transportador mitocondrial de fosfato en apoptosis*. Tesis doctoral; Universidad de Salamanca.
- Alonso de Ruiz P., Lazcano E. C. y Hernández M. (2000). *Cáncer Cervicouterino diagnóstico, prevención y control*. Editorial Médica Panamericana. México.
- Baumforth K. y J. Crocker. (2003). *Molecular and immunological aspects of cell proliferation*. En: *Molecular Biology in Cellular Pathology*. J. Crocker, P. G. Murray (eds) [Cd-Rom computer file]. John Wiley y Sons.
- Caballero B. A. y Morán J. (2002). *Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica*. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. 2 (4): 235-244.
- Camacho Z. E. (2010). *Efecto antitumoral del S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino*. Tesis, UNAM. México.
- 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.
- Cetina L., Wegman T., García Arias A., Candelaria M. y Dueñas A. (2006). *Radiosensibilizantes en cáncer cervicouterino*. Cancerología, 1:4-29.
- Chun-Te C., Tzong-Der W., Shang-Jie T. y Jen-Kun L. (2007). *Diosgenin, a naturally occurring steroid, supresses fatty acid synthase expression in her-overexpressing breast cancer cells through modulating-akt, m tor and jnk phosphorylation*. FEBS Letters, 30 (581): 5735-5742.
- Corbiere C. (2003). *Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin amd other plant steroids: hecogenin and tigogenin on human 1547 osteosarcoma cells*. International Journal of Oncology, 22 (4): 899-905.
- Curtis H. y Barnes N. (2005). *Biología*. Sexta edición, Editorial Médica Panamericana. México.
- Darnell J., Havey L. y Baltimore D. (1993). *Biología molecular de la célula*. Segunda edición. Scientific American Books. EUA.
- De Toro G. (2006). *Muerte celular progamada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular*. Actas del 8º CVHAP. 1:1-13.
- Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G., Mitchison T., Moskowitz M. y Yuan J. (2005). *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nature Chemical Biology 1: 112–119.
- Deng L., Wu H., Yu B., Jiang M. y Wu J. (2004). *Synthesis of OSW-1 analogs with modified side chains and their antitumor activities*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 14: 2781–2785.
- Djerassi C., Ringold H. y Rosenkranz G. (1951). *Steroidial sapogenins. XV. Experiments in the hecogenin series (part 3). Conversion to cortisone*. Journal of the American Chemical Society, 73: 5513-5514.
- Elmore S. (2007). *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic Pathology, 35 (4): 495–516.

- Fernández-Alnemri T, Wu J, Yu J-W, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri E. (2007). *The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation*. Cell Death and Differentiation, 14: 1590–1604.
- Fernández H. M. A., López M. H., Hernández V. J. M., 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 and Medicinal Chemistry, 18: 2474-2484.
- Fink S. y Cookson B. (2005). *Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells*. Infection and immunity, 73: 1907–1916.
- 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. México.
- Gómez E. y Zentella A. (1998). *Apoptosis y muerte celular programada*. Boletín de Educación Bioquímica de México, 17: 105-114.
- 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 and Ageing, 3: 1-8. Consultada 4 de marzo de 2010.
- Herdman C. y Sherris J. (2002). *Planificación de programas apropiados para la prevención del cáncer cervicouterino*. Tercera edición. Editorial Organización Panamericana de la Salud. México.
- Hernández M. M. y Ríos H. M. A. (1999). *Oncogenes y Cáncer*. Revista Cubana de Oncología, 15(2): 131-139.
- Hernández V. J. M. V. (2004). *Determinación de la actividad antitumoral del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y la de su derivado 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, sobre la proliferación de células provenientes de cáncer cérvico-uterino HPV-18: CaLo, HeLa e InBl*. Tesis, UNAM. México.
- Herrera C. (2005). *Anatomía patológica temas para enfermería*. Editorial Ecimed.
- Hostettmann K. y Marston A. (1995). *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press, New York.
- Huo R., Zhou Q., Wang B., Tashiro S., Onodera S. e Ikejima T. (2004). *Diosgenin induces apoptosis in Hela cells via activation of caspase pathway*. Acta Pharmacologica Sinica, China-Japan, 25 (8): 1077-1082.
- ICCE. (2007). *Intervenciones de enfermería para la prevención del cáncer cervicouterino*. Boletín de Información científica para el cuidado en enfermería. Secretaría de Salud.
- INEGI. *Consulta Interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad*. Consultada el 4 de febrero del 2008 www.inegi.com
- Jacobson M. D., Weil M. y Raff M. C. (1997). *Programmed cell death in animal development*. Cell, 88: 347-354.
- Jordán L. B. y Harrison D. J. (2003). *Apoptosis and cell senescence*. En: Molecular Biology in Cellular Pathology. J. Crocker, P. G. Murray (eds). [Cd-Rom computer file]. John Wiley y Sons.

- 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 and Pharmaceutical Bulletin, 28 (12): 78-85.
- Karp G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill. México.
- Kepp O., Galluzzi L., Zitvogel L. y Kroemer G. (2010). *Pyroptosis: a cell death modality of its kind?* European Journal Immunology 40: 595–65.
- 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 and Differentiation, 16: 3–11.
- Kubo S, Mimaki Y, Terao M, Sashida Y, Nikaido T, Ohmoto T. (1992). *Acylated cholestane glycosides from the bulbs of Ornithogalum saundersiae*. Phytochemistry, 31: 3969 – 73.
- Kueng W., Silver E. y Eppnberg V. (1989). *Cuantification of cell culture don 96-wells plates*. Analitical Biochemical, 186: 16-19.
- 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.
- Lavelly R. S. y Poen J. C. (1995). *Principios de oncología radiante en: ONCOLOGÍA PRÁCTICA*. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Lee J., Jung K., Shik Y. y Park D. (2007). *Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling*. Life Sciences, 81.
- León G. (2004). *Cáncer de cuello uterino. Aspectos Inmunológicos y genéticos de mayor relevancia*. Instituto Nacional de Oncología y Radiología. Revista Cubana de Medicina, 43:1.
- Lingappa V. R. y Farey K. (2000). *Physiological medicine, a clinical approach to basicmedical physiology*. McGraw-Hill. México.
- Liu M. J., Wang Z., Ju Y., Wong R. N. S. y Wu Q. Y. (2005). *Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis*. Cancer Chemother Pharmacol, 55: 79–90.
- López A., Marcela L. (2006), *Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina*. Cancerología, 1: 31-55.
- López D. M. (2010). *Efecto antitumoral de los esteroides diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo (26-OH-Di) y diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestan-3β-diilo (26-OH-He) en la línea tumoral de cérvix CaSki*. Tesis, UNAM. México.
- Mann J., Davidson R., Hobbs J., Banthorpe D., Harborne J. (1994). *Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance*. Longman Scientific and Technical: Essex.
- Mathews C. K. y Van Holde K. E. (1998). *Bioquímica*. McGraw-Hill. España.
- McLaughlin C. J. (1995). *Principios de la quimioterapia en: ONCOLOGÍA PRÁCTICA*. Editorial Médica Panamericana, Argentina.

- Mimaki Y., Kanmoto T., Sashida Y. y Nishino A.; (1996). *Steroidal saponins from the underground parts of Chlorophytum comosum and their inhibitory activity on tumor-promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells*. *Phytochemistry*, 41: 1405–1410.
- Mimaki Y., Yokosuka A., Kuroda M. y Sashida Y. (2001). *Cytotoxic activities and structure-citotoxic 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*, Séptima Edición, Editorial Elsevier. España.
- Mizushima N. (2004). *Methods for monitoring autophagy*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 2491–2502.
- Moalic S., Liagre B., Corbiere C., Bianchi A., Dauca M., Bordjic K., Beneytout J. (2001). *A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells*. *FEBS Letters*, 506: 225-230.
- Morgan S. J. y Darling D. C. (1993). *Cultivo de las células animales*. Editorial Oxford University Press. EUA.
- Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N. y Nakagawa S. (2010). *The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1b production, ROS production and endosomal rupture*. *Biomaterials*, 31: 6833-6842.
- Muñoz. N. y Bosch X. (1997). *Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention*. *Salud Pública México*. 39:174-282.
- Nelson D. L. y Cox M. M. (2005). *Principios de Bioquímica*. Cuarta Edición. Ediciones Omega, Barcelona.
- Pagani A., Castagno E., Rosasco M., Cancela M. y Salveraglio C. (1999). *Cáncer de cuello uterino con diferenciación neuroendócrina*. *Revista Médica del Uruguay*, 15: 146- 150.
- Pardo F. (1998). *Anatomía patología general y especial de las neoplasias*. España: Científico-Médico.
- 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.
- Pollard T. D. y Earnshaw W. C. (2004). *Cell biology*. Segunda Edición. Publicaciones Saunders-Elsevier, Philadelphia.
- Pui-Kwong C. (2007). *Acylation with diangeloyl groups at C21-22 positions in triterpenoid saponins is essential for citotoxicity towards tumor cells*. *Biochemical pharmacology*, 73: 341-350.
- Quisehuatl E. (2009). *Efecto antitumoral de los análogos de la Capsaicina: 12-fenilacetilrinvanil (12-FAR) y rinvanil en la línea celular HeLa proveniente de cáncer cervicouterino*. Tesis, UNAM. México.
- Raju J. y Bird R. (2007). *Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells*. *Cancer Letters*, 255.
- Rao A. V. y Gurfinkel D. M. (2000). *The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides*. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17: 211–35.
- Rivera Z., Delgado D., Painel P., Barrero P., Larraín H. (2006). *Mecanismo de Infección y Transformación Neoplásica producido por el Virus Papiroma Humano en Epitelio Cervical*. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 71(2): 135-140.

- Robbins S., Kumar V. y Cotran R. (1993). *Patología Humana*. Editorial Mc Graw Hill. México.
- Rohl A. (2008). *Infection HPV*. The Nobel Committee for Physiology or Medicine.
- Rosen E., Fan S. y Goldberg I. (1999). *The molecular and cellular basis of radioresitivity: implications for understanding how normal tissues and tumor respond to therapeutic radiation*. *Cancer Investigation*, 17:1 56-72.
- Ross M. H., Kaye G. I. y Pawlina W. (2005). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Cuarta edición, Editorial Panamericana.
- Saikumar P., Dong Z., Mikkhailov V., Denton M., Weinberg J. y Venkatachalam M. (1999). *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*. *American Journal of Medicine*, 107: 489-506.
- Sánchez L. E. y Diosdado F. (2003). *Apoptosis: el fenómeno y su determinación*. *Técnica Pecuaria en México*, 41 (1): 49-62.
- Son I. S., Kim J. H., Sohn H. Y., Son K. H., Kim J. S. y Kwon C. S. (2007). *Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Diosgenin, and Steroidal saponin of Yam (Dioscorea ssp.), on High-Cholesterol Fed Rats*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71 (12): 3063-3071.
- Sperandio S., De Belle I. y Bredesen D. (2000). *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death*. *PNAS*, 97: 14376-14381.
- Tang P., Mamdani F., Hu X., Liu J y Yu B. (2007). *Synthesis of OSW saponin analogs with modified sugar residues and their antiproliferative activities*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17: 1003-1007.
- Tirado-Gómez LL., Mohar-Betancourt A., López-Cervantes M., García-Carrancá A., Franco-Marina F. y Borges G. (2005). *Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas*. *Salud Pública México*, 47: 342-350.
- 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.
- 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 and 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.
- Waller G. y Yamasaki K. (1996). *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*. Plenum Press: New York.
- Wang Y., Li X., Wang L., Ding P., Zhang Y., Han W. y Ma D. (2004). *An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression*. *Journal of Cell Science*, 117: 1525-1532.
- Wayne M. B., Kleinsmith L. J., Hardin J. (2007). *El mundo de la célula*. Sexta edición. Pearson Educación S.A. Madrid.
- Williams G. T. (1991). *Programed cell death apoptosis and oncogénesis*. *Cell*, 65: 1097-1098.

- Willingham S., Bergstralh D., O'Connor W., Morrison A., Taxman D., Duncan J., Barnoy S., Venkatesan M., Flavell R., Deshmukh M., Hoffman H. y Ting J. (2007). *Microbial Pathogen-Induced Necrotic Cell Death Mediated by the Inflammasome Components CIAS1/Cryopyrin/NLRP3 and ASC*. *Cell Host and Microbe*, 2: 147–159.
- 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.
- Xu Q., Peng X. y Tian W. (2003). *A new strategy for synthesizing the steroids with side chains from steroidal sapogenins: synthesis of the aglycone of OSW-1 by using the intact skeleton of diosgenin*. *Tetrahedron Letters*. 44: 9375-9377.
- Xue J., Liu P., Pan Y. y Guo Z. (2008). *A Total Synthesis of OSW-1*. *Journal Organic Chemistry*, 73: 157-161.
- Zhou Y., Prieto C. G., Carney D. A., Xu R., Pelicano H., Kang Y., Yu W., Lou C., Kondo S., Liu J., Harris D. M., Estrov Z., Keating M. J., Jin Z. y Huang P. (2005). *OSW-1: a natural compound with potent anticancer activity and a novel mechanism of action*. *Journal of the National Cancer Institute*, 23 (97): 1781-1785.

APÉNDICE

Composición del RPMI-1640 (Sigma, EUA)

Sales inorgánicas	g/l
Nitrato de calcio 4 H ₂ O	100
Sulfato de magnesio 7 H ₂ O	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio 7 H ₂ O	0.8
Aminoácidos	
L-arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-cistina 2HCl	0.652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-histidina (base libre)	0.015
L- hidroxiprolina	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	0.05
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.02
Vitaminas	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
I-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Ácido p-aminobenzoico	0.001
Ácido d-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:

EDTA (Sigma, EUA)	0.4 g
NaCl (Sigma, EUA)	8 g
KCl (Sigma, EUA)	0.04 g
Tris (Sigma, EUA)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 minutos.

Amortiguador Salino de Fosfatos

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.

MgCl ₂ (Sigma, EUA)	0.1 g
CaCl ₂ (Sigma, EUA)	0.1 g
NaCl (Sigma, EUA)	8 g
KCl (Sigma, EUA)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma, EUA)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma, EUA)	0.2 g

El MgCl₂ y CaCl₂ se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1 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.

Glutaraldehído

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

Solución cristal violeta (0.1 %)

Para preparar 500 ml de cristal violeta a una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye muy bien y por último se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (Sigma, EUA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma, EUA)	4.28 g
Cristal violeta (Sigma, EUA)	1 g

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2 %)

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

Desactivación del suero fetal bovino (SFB) y de neonato de ternera (NCS)

El SFB es descongelado a temperatura ambiente, en seguida es puesto a baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. Posteriormente se preparan alícuotas de 50 ml en tubos cónicos de plástico en condiciones estériles para su mejor uso y manipulación.