



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología

**EFFECTO DE LA DIOSCINA EN EL POTENCIAL
PROLIFERATIVO Y CICLO CELULAR DE LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO, ASÍ
COMO SU CAPACIDAD INDUCTORA DE
APOPTOSIS.**

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
Montoya Díaz Maricarmen

Directora de tesis: Dra. Ma. Luisa Escobar Sánchez

Asesor interno: M en C. Luis Sánchez Sánchez





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*La frase más excitante que se puede oír en ciencia,
la que anuncia nuevos descubrimientos,
no es ¡Eureka! (¡Lo encontré!) sino "Es extraño ...".*

Isaac Asimov

DEDICATORIAS:

A MI FAMILIA

*Porque ríen y lloran junto conmigo
Por su apoyo siempre incondicional
Y sus incontables sacrificios*

A MIS PADRES

*Porque gracias a ellos soy lo que soy
y mis logros son primero de ellos*

A MI MADRE

*Por enseñarme que no hay adversidad infranqueable
y que juntos somos invencibles*

A MI PADRE

*Por enseñarme que la bondad es infinita
y que en todos puede haber un amigo*

A MI HERMANO

*Porque más que mi hermano
ha sido siempre mi mejor amigo*

AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. María Luisa Escobar Sánchez*, por su continua disponibilidad para resolver mis dudas y toda su ayuda para realizar este trabajo.

Al *M. en C. Luis Sánchez Sánchez*, por su constante paciencia y asertividad en todas sus enseñanzas prácticas y académicas.

Al *Biol. José Misael Vicente Hernández*, por compartir su valioso conocimiento siempre con una sonrisa.

Al *M. en C. Hugo López Muñoz*, por sus explicaciones y apoyo con los ensayos de linfocitos.

Al *Dr. Benny Weiss Steider*, al *Dr. Edelmiro Santiago Osorio* y al *M. en C. Edgar Ledesma Martínez*, por sus observaciones a este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, por su ayuda y compañía.

A Grupo Puebla, por sintetizar el compuesto con el que se realizó el trabajo.

A mis amigos, por todos los buenos momentos que pasamos juntos.

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción	7
La Célula.....	7
Ciclo Celular.....	7
Puntos de Control.....	7
Muerte celular: Necrosis y Apoptosis.....	11
Cáncer Cervicouterino.....	16
Tratamientos.....	19
Las Saponinas y la Dioscina.....	22
Planteamiento del Problema	26
Justificación	26
Objetivos	27
Hipótesis	28
Método	28
Resultados	34
Discusión	46
Conclusiones	49
Referencias	50
Apéndice	54

RESUMEN

El cáncer es la primera causa de muerte en todo el mundo según la OMS y la tercera en México conforme al INEGI. No obstante, tanto a nivel mundial como a nivel nacional, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer. Para su tratamiento, generalmente se utiliza radio y quimioterapia; sin embargo, debido a su limitada selectividad, estos procedimientos provocan molestos efectos secundarios que deterioran la calidad de vida del paciente; además de que resultan ineficientes en estados avanzados de la enfermedad. Es por tales motivos, que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas menos agresivas se lleva a cabo. Muchos compuestos esteroidales de origen vegetal han sido objeto de investigación científica para cumplir con este fin. La diosgenina y la dioscina, algunos de tantos, han exhibido actividad antiproliferativa y apoptótica en varias líneas celulares de cáncer, entre ellas, células HeLa. Sin embargo, no se ha reportado su efecto en líneas no tumorales ni en otras líneas de cáncer cervicouterino, así como tampoco se han publicado datos acerca de una posible citotoxicidad. En este trabajo se ha investigado el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la dioscina, así como su efecto en el ciclo celular; específicamente, en las líneas de cáncer cervicouterino CaSki, HeLa y ViBo, al igual que la selectividad de su efecto antiproliferativo y citotóxico en linfocitos normales de sangre periférica de individuos sanos. Después del tratamiento se observaron cambios morfológicos en las células cancerosas, los cuales están asociados con el proceso de apoptosis. Los resultados mostraron una susceptibilidad antiproliferativa al esteroide similar en las tres líneas celulares; no así, el efecto en el ciclo celular de éstas. La saponina mostró un efecto citotóxico leve en comparación con el control y el vehículo empleado (DMSO). En las células sanguíneas no se observó efecto citotóxico ni antiproliferativo.

INTRODUCCIÓN

LA CÉLULA

La teoría celular, propuesta en 1839 por Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann, postula que todos los organismos están compuestos por células, y que todas las células derivan de otras precedentes. De este modo, todas las funciones vitales emanan de la maquinaria celular y de la interacción entre células adyacentes; además, la tenencia de la información genética, base de la herencia, en su ADN permite la transmisión de aquella de generación en generación. Es por esta razón que la célula es considerada la unidad fundamental de la vida.

CICLO CELULAR

Según el tercer principio de la teoría celular, sólo se originan nuevas células a partir de otras células vivientes; este proceso se denomina división celular. Las etapas a través de las cuales pasa la célula desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo celular.

El ciclo celular se divide en dos fases principales, éstas son la fase M y la interfase. La interfase se compone de tres fases: G1, S y G2. En G1, la célula duplica su tamaño y aumenta la cantidad de organelos, enzimas y otras moléculas. En S, duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas. Entre la fase S y M, la célula está muy activa metabólicamente, lo cual le permite incrementar su tamaño (aumentando el número de proteínas y organelos) durante la fase G2. La fase M incluye: 1) mitosis, durante la cual los cromosomas duplicados se reparten entre dos núcleos, y 2) citocinesis, durante la cual toda la célula se divide físicamente en dos células hijas. La fase M de ordinario solo dura de 30 min a una hora, pero la interfase puede prolongarse horas, días, semanas o mayor tiempo según el tipo de célula (Karp, 1998).

PUNTOS DE CONTROL

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de la participación de complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas y los complejos que se forman entre ambas. Los complejos cinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases*, CDK) dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige.

Los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. Se conocen dos estadios donde operan puntos de control en el ciclo celular: uno al final de la fase G1 y la entrada a la fase S, y el otro, en la transición de la fase G2 a la fase M (Fig. 1). De manera general, en la mayoría de los casos, la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida. Las alteraciones en el proceso de interrupción del ciclo celular permiten que células con genomas inestables evolucionen a células cancerosas. (Peralta et al., 1997)

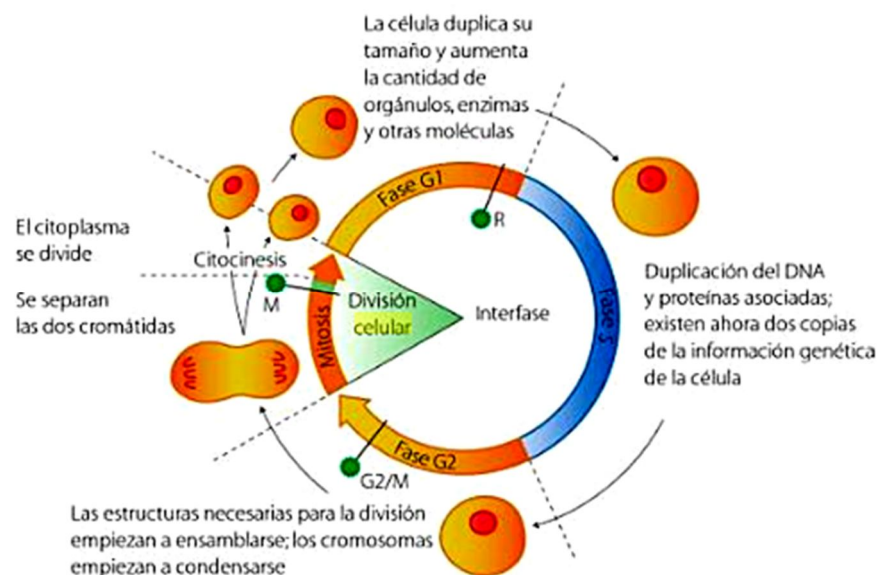


Figura 1. Fases del ciclo celular (G1, S, G2, M) y sus puntos de control (R, G2/M, M) señalados en verde. Después del punto R, que controla el tamaño celular adecuado y las condiciones ambientales favorables, se inicia la síntesis de ADN (fase S). Antes de la entrada en mitosis (fase M), el punto G2/M controla también el tamaño celular adecuado, las condiciones ambientales favorables y la replicación completa y correcta del ADN. Tras el correcto alineamiento de los cromosomas (punto de control M), finaliza la división celular. Imagen tomada de Montuenga, 2009.

citoesqueleto, como actina, plectrina, ROCK1 y gelsolina, conlleva a la compactación celular y la formación de cuerpos apoptóticos (Krammer et al, 2007). Actualmente se conocen dos vías de activación de las caspasas: la vía intrínseca y la extrínseca (Fig. 3).

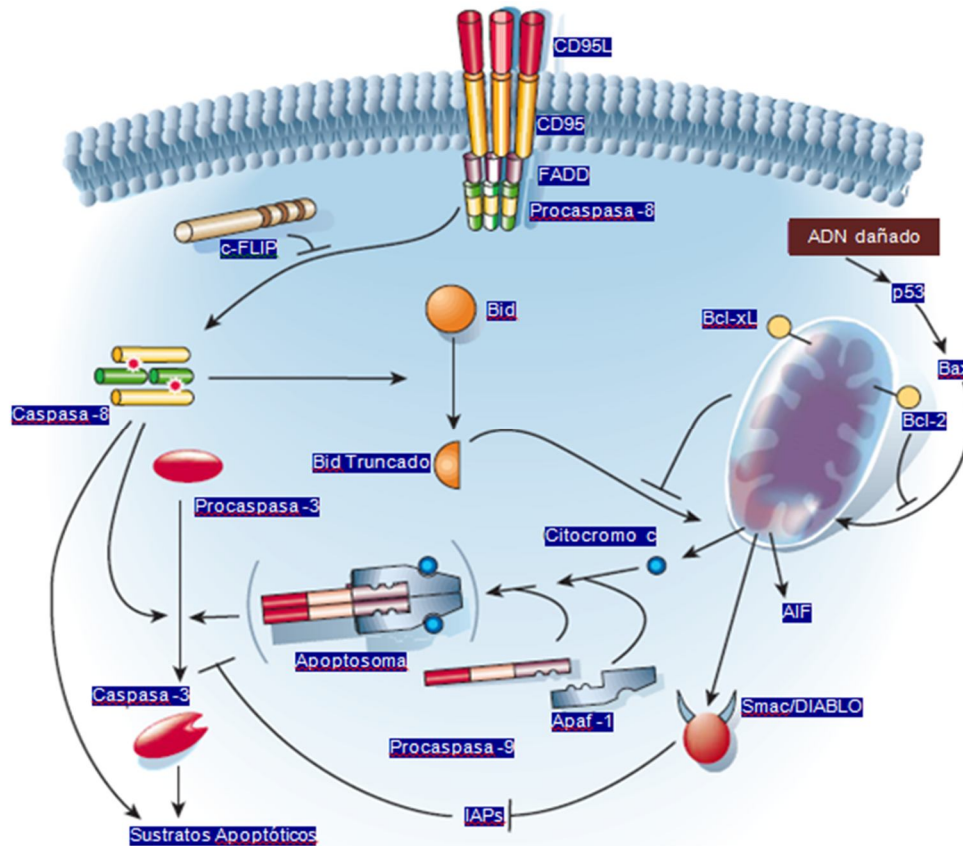


Figura 3. La vía del receptor de muerte (izquierda) es desencadenada por miembros de la superfamilia del receptor de muerte (como CD95 y el factor de necrosis tumoral 1). La unión del ligando de CD95 a CD95 induce el apiñamiento y formación del receptor de un complejo de señalización de inducción de muerte. Este complejo recluta múltiples moléculas de procaspasa -8 vía la molécula adaptadora FADD (Fas-associated death domain protein), lo cual resulta en la activación de la caspasa -8 a través de la proximidad inducida. La activación de la caspasa -8 puede bloquearse mediante el reclutamiento de la caspasa degradadora homóloga c-FLIP. La vía mitocondrial (derecha) es usada extensivamente en respuesta a salidas extracelulares y problemas internos como daño en el ADN. Ambas vías convergen en la mitocondria, con frecuencia a través de la activación de un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2. Los miembros de la familia Bcl-2 pro- y anti-apoptóticas se encuentran en la superficie de la mitocondria, donde se encargan de regular la salida del citocromo c, el cual se asocia con Apaf-1 y luego con la procaspasa -9 para formar el apoptosoma. Las vías del receptor de muerte y mitocondrial convergen al nivel de la activación de la caspasa -3. La activación de la caspasa -3 es antagonizada por proteínas IAPs, las cuales son reguladas por la liberación mitocondrial de Smac/DIABLO. Con la activación de la caspasa -3, el programa apoptótico se ramifica en una multitud de subprogramas, la cuenta de los cuales resulta en el ordenado dismantelamiento y eliminación de la célula. El cruce y la integración entre las vías del receptor de muerte y mitocondrial es provisto por Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2. El clivaje de Bid, mediado por la caspasa -8 incrementa grandemente su actividad promotora de muerte, y resulta en la translocación a la mitocondria, donde promueve la salida del citocromo c. Imagen tomada de Hengartner, 2000.

Cuando existe un error durante la replicación celular, la célula puede detener su división para repararlo y continuar más tarde, pero si el error no puede ser reparado, la célula iniciará un proceso de autodestrucción conocido como muerte celular programada o apoptosis.

El primer punto de control, se encuentra justo después del punto de restricción, aún en G1. En general podríamos decir que el primer control se encarga de: 1) revisar las condiciones del medio, buscando factores externos que induzcan el progreso del ciclo celular; 2) revisar que la célula haya crecido lo suficiente y 3) que el material genético esté intacto. La búsqueda de factores externos es muy importante, pues éstos estimulan la síntesis de proteínas como algunas cdk's y ciclinas, y sin éstas, la continuación y el control del ciclo celular serían imposibles.

Participan en este punto, el complejo cdk2-ciclina E, que como los implicados en el punto de restricción, también se encarga de inactivar a la proteína supresora de tumores Rb (*retinoblastoma protein*) y de favorecer el trabajo del factor de transcripción E2F para que estén listas las enzimas necesarias para comenzar la síntesis de ADN en la fase S.

Los encargados de la inhibición en este punto de control son un factor de transcripción y una CIP (proteínas inhibidoras de cdk's): p53 y p21, en ese orden. La p53 es uno de los más conocidos supresores de tumores, usualmente se encuentra en la célula pero es muy inestable en condiciones normales porque se encuentra unido a otra proteína llamada Mdm2, que funciona como un "marcador" para que la p53 se degrade. Pero, si existe una lesión en el ADN, se activan distintas enzimas, éstas ayudan a "separar" p53 de su "marcador", una mayor concentración de p53 estimula la síntesis de p21 (CIP) que se une a cdk2 y ciclina E, inhibiendo la acción del complejo. La célula entonces no puede entrar a la fase S.

La fase S no tiene como tal un punto de control, aun cuando algunos autores los consideran (Alberts et al., 2002); sin embargo es indispensable la presencia del complejo cdk2-ciclina A para que la síntesis de ADN se lleve a cabo. Como se explicó antes, durante la fase S el ADN se replica, para ello es necesario que se arme la "maquinaria" específica. Dentro de ellas hay un conjunto de

proteínas conocido como complejo de reconocimiento del origen u ORC que reconocen secuencias bien definidas de bases en el ADN llamadas orígenes de replicación.

Durante la fase G1, se forma el ORC, tras el cual otras proteínas (como cdc6 y mcm) se unen para formar el complejo de pre-replicación (pre-RC). El complejo cdk2-ciclina A se encarga de deshacerse de las proteínas del pre-RC y de unir las enzimas necesarias para la replicación (como la ADN polimerasa). Así se asegura que la "maquinaria" de replicación no vuelva a armarse hasta que se haya terminado el ciclo y la replicación sólo ocurra una sola vez.

El segundo punto de control se encuentra al final de G2. Los complejos cdk1-ciclina A y ciclina B permiten el paso a través de este punto. En conjunto la actividad de estos dos complejos se denominó Factor Promotor de la Mitosis (MPF). A grandes rasgos, el segundo punto de control se encarga de revisar: 1) que el material genético se haya duplicado completamente, 2) que el material genético no tenga errores y 3) que el medio extracelular sea adecuado.

Se sabe que una vez activado el complejo cdk-ciclina, éste se encarga de llevar a cabo tareas indispensables durante las primeras subfases de la mitosis. Los complejos cdk1-ciclina A y ciclina B, se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico y en parte de asegurarse que los cromosomas se unan a éste. Se encarga además de iniciar la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas, de desensamblar la envoltura nuclear fosforilando las láminas nucleares, de armar nuevamente el citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. En este punto actúa también la p53, que como ya vimos detecta alteraciones en el ADN y desencadena a la activación de la CIP p21 encargada de la inhibición de cualquier complejo cdk 1,2, 4 y 6-ciclina.

Las cohesinas son proteínas requeridas para mantener unidas a las cromátidas hermanas. Es durante la anafase cuando las cromátidas se separan. Para que esto suceda es necesaria la actividad de varios complejos proteicos. El principal de éstos es el complejo promotor de la anafase (APC). Este complejo es activado por la unión de una proteína semejante a una cdk, llamada cdc20 (cdc,

ciclo de división celular). Una vez activado, el APC se encarga de marcar a diversas proteínas para que se degraden, una de ellas es la securina, que inactiva a la separasa. Esta separasa es la proteína encargada de inactivar a las cohesinas eliminando las uniones entre las cromátidas hermanas.

El último punto de control se encuentra en la fase M, entre la metafase y la anafase. Se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico. Si detecta que uno de los cinetócoros no se encuentra unido, manda una señal negativa al sistema de control bloqueando la activación de proteínas implicadas en la separación de las cromátidas hermanas. Específicamente inactiva al conjunto APC-cdc20, lo que inhibe la liberación de la separasa, impidiendo que las cromátidas hermanas se separen hasta que la señal desaparezca.

MUERTE CELULAR: NECROSIS Y APOPTOSIS

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, que es característico para cada especie. Ese número depende de: (a) la multiplicación celular y (b) la muerte y eliminación de un número igual de células redundantes. El desequilibrio de esos procesos determina efectos que pueden ser letales, como atrofia de tejidos y órganos por destrucción defectuosa, hiperplasias o neoplasias (Dubin y Stoppani, 2000).

El término necrosis se refiere al proceso de degeneración celular sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. Durante la necrosis hay una pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado, el proceso finaliza con la lisis de la membrana celular liberando el contenido intracelular hacia los espacios extracelulares. Este fenómeno provoca que las células vecinas también mueran, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado.

A diferencia de la necrosis, en el proceso apoptótico las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos, por lo tanto, es considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003).

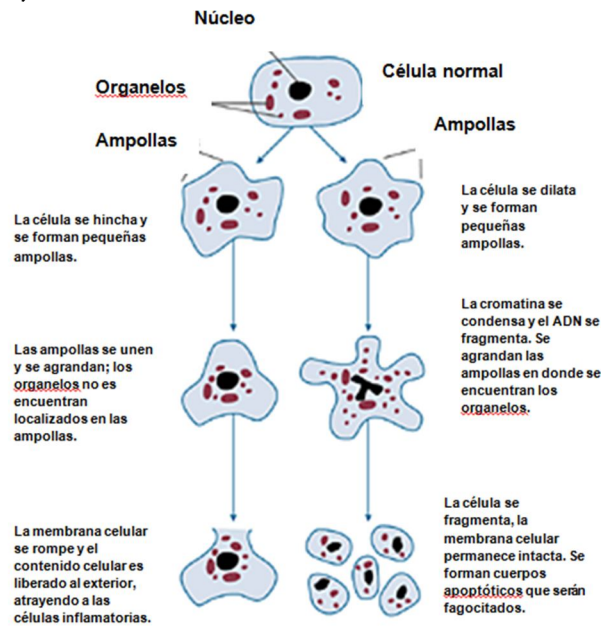


Figura 2. Diferencias en los cambios morfológicos necróticos y apoptóticos.
 Imagen tomada de Goodlett y Horn, 2001.

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es la forma de muerte celular que se caracteriza por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos adyacentes, por lo que no provoca respuesta inflamatoria (Hengartner, 2000). Es un mecanismo que permite la eliminación ordenada de células y, por tanto, participa en la morfogénesis, ontogenia y fisiología de las células, así como en la homeostasis de los aparatos y sistemas del organismo.

Las características morfológicas (Fig. 2) de la apoptosis incluyen: la formación de ampollas (*blebbing*) en la membrana citoplasmática, el encogimiento celular, la compactación de la cromatina como consecuencia del rompimiento de la doble cadena del ADN y finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos. La apoptosis es un proceso de eliminación celular en el cual participan las

proteasas denominadas caspasas. La apoptosis puede ser activada por dos rutas: la extrínseca que es mediada por un receptor a nivel de la membrana celular y la intrínseca, en la cual participa la mitocondria y la liberación del citocromo-C por parte de ésta; ambas rutas activarán a las caspasas cuya actividad proteolítica da origen a las diferentes características morfológicas del proceso.

La apoptosis es un proceso complejo en el que participan en cascada un grupo de cisteína proteasas, con especificidad sobre residuos de aspartato, conocidas como caspasas. Todas las caspasas se sintetizan como zimógenos y experimentan un procesamiento proteolítico durante su activación, contienen un prodominio seguido de una subunidad pequeña (p10) y otra larga (p20) (Jin y El-Deiry, 2005). Estas enzimas se pueden dividir en tres categorías; las caspasas inflamatorias (4, 5, 11, 12, 13), las caspasas iniciadoras (8, 9, 10) y el tercer grupo las caspasas efectoras (3, 6, 7), cuyas preformas inactivas se encuentran como dímeros principalmente en el citosol y para ser activas requieren cortarse por las iniciadoras o por la granzima B, serin-proteasa presente solo en linfocitos T citotóxicos.

Las caspasas iniciadoras se encuentran como monómeros y requieren de dimerización mediada por la interacción con proteínas adaptadoras y con los dominios intracitoplásmicos específicos de proteínas transmembranales que funcionan como receptores. Estos dominios se caracterizan por la presencia de una secuencia de aminoácidos, denominados Dominios de Muerte (*Death Domain*, DD), a su vez se divide en la subfamilia *Death Effector Domain* (DED) y *Caspase Recruitment Domain* (CARD), la cual media la interacción con proteínas adaptadoras (Jin y El-Deiry, 2005).

La activación de la cascada de caspasas da como resultado el procesamiento de un número importante de proteínas celulares conocidas como sustratos celulares de muerte (*cell-death substrate*, CDS), estas proteínas incluyen actina, la cual mantiene la integridad de la célula, al degradarse resulta en la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. El procesamiento del inhibidor de ADNasa activada por caspasa (*inhibitor of the caspase-activated DNase*, ICAD) produce la liberación de endonucleasas, que se traslocan al núcleo para fragmentar el ADN. La ruptura de proteínas del

Vía Extrínseca

La vía extrínseca depende de receptores celulares de la familia de Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor*, TNF), entre los que se incluyen el TNFR1 (CD120a), DR3/TNF (*death receptor 3/TNF*) y Fas (CD95). Estos receptores forman trímeros y contienen dominios intracitoplásmicos, llamados dominios de muerte (*death domains*, DD). Cuando estos ligandos se unen a sus receptores en el exterior de la célula, los DD se unen a proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado a Fas (*Fas associated Death Domain*, FADD), con excepción del TNFR1 (CD120a) que primero se une al dominio de muerte asociado a TRAIL (*TRAIL associated Death Domain*, TRADD). FADD tiene un dominio efector (*death effector domain*, DED) que a su vez se une a las caspasas iniciadoras 10 y 8, formando el “complejo inductor de la señalización de muerte” que es capaz de dimerizar a las caspasas efectoras (Krammer et al., 2000).

Vía Intrínseca

La vía intrínseca implica permeabilización de la membrana mitocondrial por alteraciones celulares como la hipoxia o disminución en el transporte de glucosa. En esta vía se libera el citocromo C de la mitocondria y se une a Apaf-1 en presencia de ATP. La interacción entre estas proteínas ocasiona un cambio conformacional de Apaf-1, y deja expuesto un sitio CARD, ocurre una oligomerización de Apaf-1 por la interacción CARD/CARD, resultando en una estructura “tipo rueda”, conocida como apoptosoma. La caspasa-9 tiene un dominio CARD el cual media la interacción específica con Apaf-1, y al procesarse la pro-caspasa-9, ésta activa a la caspasa-3 (Kukhta et al., 2003).

En condiciones normales Apaf-1 se encuentra separado del citocromo C por la membrana mitocondrial. Sin embargo, cuando esta membrana se permeabiliza se libera al citosol y se inicia la cascada de evento que lleva a la apoptosis. El proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) se encuentra regulado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2 (*B cell leukemia/lymphoma*). Estas proteínas pueden dividirse en dos grupos, antiapoptóticas y proapoptóticas. Las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, A1, Bcl-w y Mcl-1) previenen

la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C, en tanto que las proteínas proapoptóticas, que se clasifican de acuerdo a el número de dominios BH que poseen (*Bcl-2 homology domains*), pueden mediar la permeabilización de la membrana mitocondrial por si solas (Bax, Bak y Bok), o pueden activarse por otro subgrupo de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, denominadas solo dominio BH3 (Bim, Bid, Bad, Bmf, BNIP-3, Puma y Noxa) (Hengartner, 2000).

Existen otras proteínas que pueden promover la muerte o la sobrevivencia celular. Se liberan cuando la membrana mitocondrial se permeabiliza. Entre ellas, se encuentran el factor inductor de apoptosis (*apoptosis-inducing factor*, AIF), que pueden promover muerte celular de manera independiente a la activación de caspasas y otras proteínas, como Smac/DIABLO, que promueve apoptosis porque interfieren con la actividad de las proteínas inhibidores de apoptosis (*Inhibitor of Apoptosis Proteín*, IAP's) (Kukhta et al., 2003), las cuales se unen a las pro-caspasas impidiendo su activación.

CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células provocada por modificaciones en la información genética subyacente de las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales. En tanto el crecimiento del tumor permanezca localizado, la enfermedad se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y del tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar metástasis, es decir, células que se desprenden de la masa original que entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (Karp, 1998).

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y

progresiva evolución, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa. Estas alteraciones evolucionan a cáncer *in situ* en grado variable (Fig. 4), cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial y posteriormente, se clasifica como cáncer invasor cuando el daño traspasa la membrana basal.

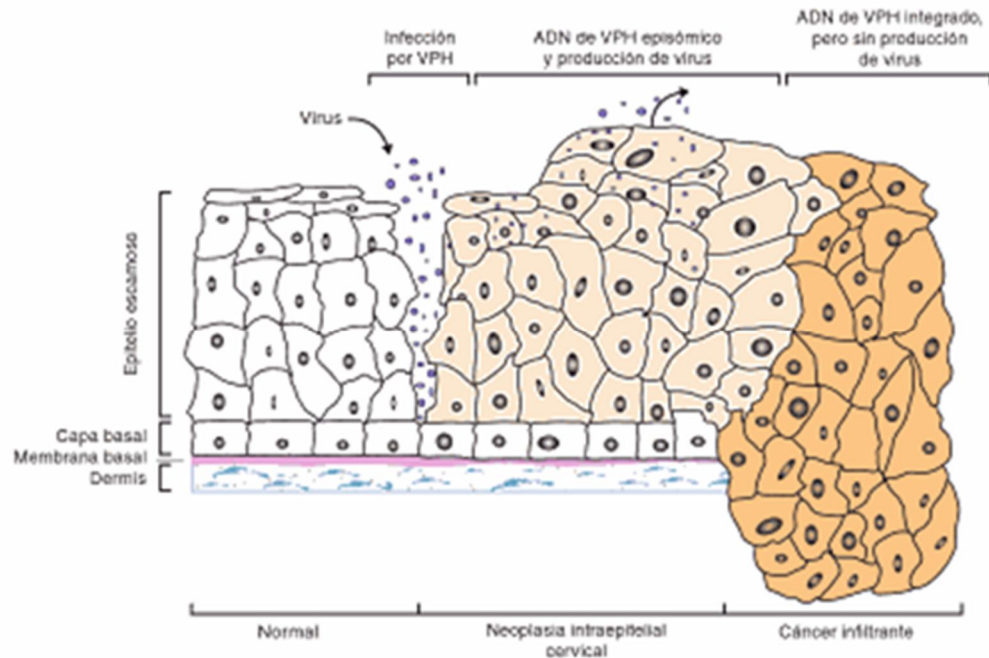


Figura 4. Progresión del carcinoma mediado por VPH. El VPH infecta a las células del cuello uterino, dentro de las cuales se replica, para madurar y liberar el virus cuando las células epiteliales sufren una diferenciación terminal. La estimulación del crecimiento de las células basales da origen a una verruga. En algunas células el genoma circular se integra en los cromosomas del anfitrión inactivando el gen E2. La expresión de los otros genes sin producción de virus estimula el crecimiento de las células y la posible progresión a una neoplasia. Imagen tomada de Murray, 2009.

El 99,8% de los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de un virus ADN tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH). Los virus del papiloma son un género de virus agrupados juntos por su tumorigenicidad y homogeneidad de ADN, que afectan a vertebrados. Actualmente se conocen más de 70 tipos del virus del papiloma humanos (HPV), mostrando cada tipo un tropismo particular por sitios anatómicos específicos, siendo comunes las infecciones de piel y de mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) de la OMS los clasifica como "carcinogénicos" (tipos 16 y 18), "probablemente carcinogénicos" (tipos 31 y 33), y "posiblemente carcinogénicos" (otros excepto 6 y 11) (Serman, 2002).

Los tipos de VPH más comunes en México son el 16 y el 18, altamente asociados a la presencia de cáncer cervicouterino (en un 54.38% y 11.27% respectivamente) (Doorbar, 2006) La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer (López y Lizano, 2006).

Histológicamente se va desarrollando a través de un proceso progresivo de alteraciones que van desde la displasia grave pasando por el carcinoma *in situ* hasta llegar a carcinoma invasor. Se puede presentar a cualquier edad, pero es más frecuente entre los 40 y 80 años de edad.

La sintomatología, aunque no es específica, consiste en metrorragias espontáneas o secundarias a traumatismo leve (sinusiorragia), leucorrea serosa, inicialmente fétida y sucia, después el dolor aparece en la fase terminal. Estos síntomas son más frecuentes y de mayor intensidad mientras más avanzado es el proceso.

Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer cervicouterino se encuentran:

- ITS (infección por *Clamidia trachomatis* y por herpes virus tipo 2)
- Edad temprana del primer coito
- Uso prolongado de anticonceptivos orales
- Tabaquismo
- Multiparidad
- Tener múltiples parejas sexuales
- Estado nutricional e inmunológico
- Laceraciones y traumatismos durante el parto
- Cervicitis
- Predisposición genética
- Pareja sexual con carcinoma de pene

TRATAMIENTOS

Existen tres tratamientos para el CaCu, cuya selección depende principalmente del tamaño del tumor, de los deseos de tener hijos de la paciente, así como de si el cáncer se ha diseminado.

Cirugía

La cirugía es una opción para las mujeres con estadio I o II de cáncer cervical. Consiste en extirpar el tejido que pueda contener células cancerosas.

- *Cervicectomía uterina radical*: Se extirpa el cérvix, parte de la vagina y los ganglios linfáticos en la pelvis. Esta opción es para pocas mujeres que tienen pequeños tumores y que quieren intentar quedar embarazadas más adelante.
- *Histerectomía total*: Se extirpa el cérvix y el útero.
- *Histerectomía radical*: Se extrae el cérvix, parte del tejido alrededor del cérvix, el útero y parte de la vagina. Ya sea con la histerectomía total o con la radical, el cirujano puede extirpar otros tejidos.
- *Trompas de Falopio y ovarios*: El cirujano puede extirpar tanto las trompas de Falopio como los ovarios. (Salpingooforectomía).
- *Ganglios linfáticos*: El cirujano puede extirpar los ganglios linfáticos cercanos al tumor para ver si tienen cáncer. Si las células cancerosas se diseminaron a los ganglios linfáticos, esto significa que la enfermedad puede haberse diseminado a otras partes del cuerpo.
- *Criocirugía*: consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.
- *Cirugía con rayo láser*: consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.

Radioterapia

Los médicos usan dos tipos de radioterapia para tratar el cáncer cervical. Algunas mujeres reciben ambos tipos de terapia.

- *Radioterapia externa:* Radiación gamma dirigida hacia la pelvis u otros tejidos donde se ha diseminado el cáncer.
- *Radioterapia interna:* Dentro de la vagina se coloca un tubo delgado que contiene un material radiactivo.

El tratamiento por radioterapia consiste en someter al paciente a una serie de radiaciones ionizantes. Al atravesar la célula, la radiación induce modificaciones en las moléculas presentes. Cuando el impacto tiene lugar en el ADN puede impedir la división celular, y por tanto morirá por bloqueo de su capacidad de proliferación. Las lesiones producidas en enzimas o lípidos, son fácilmente reemplazables y la célula se repara. Las células tienen una mayor radio-sensibilidad mientras su actividad reproductiva sea elevada; cuantas más divisiones tenga en el futuro y cuanto menos diferenciadas estén desarrolladas sus funciones. Son estas razones las que permiten utilizar la radioterapia en el tratamiento contra el cáncer; sin embargo, todas las células poseen cierto grado de radiosensibilidad, algunas son más radiosensibles que otras, lo cual provoca el padecimiento de efectos secundarios como: fatiga, náuseas, vómitos, diarrea, problemas urinarios, caída del cabello, debilitamiento del sistema inmune, así como enrojecimiento, resequedad, sensibilidad, comezón y ardor de la parte tratada (Tubiana, 1971).

Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Los fármacos para el cáncer cervical se suelen aplicar por vía intravenosa. Generalmente se combina con radioterapia para el tratamiento del cáncer de cérvix. Cuando el cáncer se ha diseminado a otros órganos, se puede usar sólo la quimioterapia.

Dependiendo del medicamento elegido, la quimioterapia afecta a las células en una de tres formas (Sen y D'Incalci, 1992):

- Dañando el ADN de las células de tal modo que éstas ya no puedan reproducirse. Esto sucede por la alteración de la estructura del ADN en el núcleo de la célula, evitando así la replicación.
- Durante la fase S del ciclo celular, inhibiendo la síntesis de ADN nuevo, de tal manera que no sea posible la replicación celular alguna. Esto ocurre cuando los fármacos bloquean la formación de los nucleótidos necesarios para la creación de nuevo ADN.
- Deteniendo el proceso mitótico de tal manera que la célula cancerosa no pueda dividirse. La formación de husos mitóticos es indispensable para desplazar el ADN original y el ADN replicado hacia lados contrarios de la célula y ésta pueda dividirse en dos células, por lo que alteraciones a esta estructura provoca que se inhiba el proceso de división celular.

La quimioterapia destruye células cancerosas que crecen con rapidez, pero los fármacos pueden también dañar las células normales que se dividen al mismo ritmo. Los efectos secundarios dependen principalmente de los fármacos que se usan y de la dosis. Pueden incluir debilitamiento del sistema inmune, debilidad, cansancio, pérdida del cabello, falta de apetito, náuseas, vómitos, diarrea, llagas en la boca y labios, salpullido en la piel, hormigueo o adormecimiento de las manos y pies, problemas auditivos, pérdida del equilibrio, dolor en las articulaciones e hinchazón de piernas y pies. Estos efectos colaterales y la escasa acción selectiva de los fármacos generan la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad. Actualmente ha surgido un fuerte interés en la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral y específicamente los de origen vegetal. Al respecto, se ha descrito que las saponinas esteroideas presentan actividad antitumoral, mostrando una actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis probada en diferentes líneas tumorales.

LAS SAPONINAS Y LA DIOSCINA

Muchos productos naturales tienen aplicaciones farmacológicas, particularmente ha llamado la atención el potencial para su uso en quimioprevención del cáncer. Los productos vegetales, en especial, son ampliamente usados en pruebas científicas debido a su baja toxicidad y gran valor medicinal. Es por ello que muchas investigaciones se han concentrado en la capacidad de diferentes extractos vegetales para inducir apoptosis de células cancerosas. (Cai et al., 2002).

Junto con los cuidados paliativos, muchos pacientes con cáncer usan medicinas alternativas, incluidas terapias con plantas. Entre estas terapias, la medicina tradicional China es probablemente la mejor establecida y codificada, con una historia de miles de años. Tradicionalmente, las hierbas chinas son usadas en combinaciones de plantas solas o prescripciones, llamadas fórmulas. Específicamente extractos vegetales y combinaciones, han sido diseñados para tratar enfermedades específicas incluyendo el cáncer. (Yan et al., 2009).

En China, el total de saponinas de dioscorea (TSD) ha sido usado como componente principal en medicinas herbales para varios tratamientos. Los ingredientes de TSD incluyen Dioscina, pseudoprotodioscina, protodioscina y metil protodioscina. El TSD es comúnmente usado en el tratamiento de diversas enfermedades como anticancerígeno, inmunomodulador, antidiabético y para mejorar la isquemia miocárdial. (Ren et al., 2008).

Las saponinas son glicósidos de esteroides y triterpenoides que están ampliamente distribuidos en las plantas terrestres y en algunos organismos marinos. En años recientes, las saponinas han recibido considerable atención debido a sus varias actividades biológicas. (Kaskiw et al., 2009).

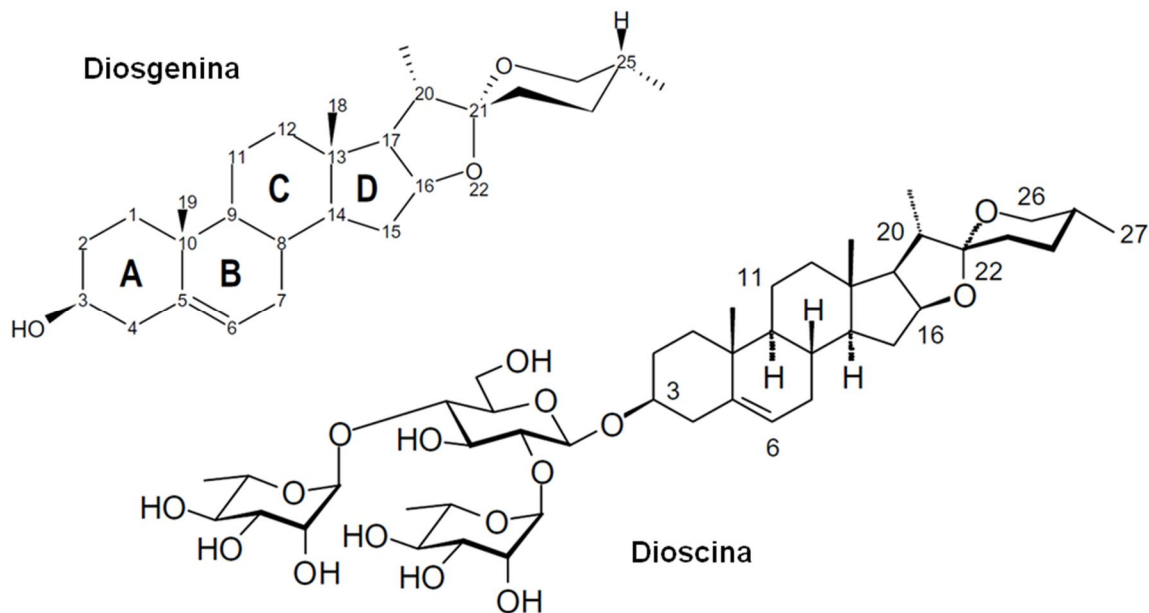


Figura 5. Estructura química de la Dioscina y su aglicona (Diosgenina). Imágenes tomadas de Trouillas et al., 2005; y de Kaskiew et al., 2008.

Estructuralmente están comprendidas por una aglicona liposoluble que consiste en un esteroide o más comúnmente en un triterpenoide y residuos de azúcar solubles en agua, diferentes en tipo y cantidad. Debido a su naturaleza anfífilica, tienen una fuerte actividad biológica aparente. Su actividad biológica se encuentra fuertemente relacionada a las estructuras químicas que poseen, las cuales determinan su polaridad, hidrofobicidad y acidez de cada compuesto. Las saponinas de diversos orígenes poseen un sabor amargo, además, a causa de su baja capacidad nutricional y su poca actividad enzimática, contribuyen al efecto retardante del crecimiento en animales.

La presencia de las saponinas ha sido reportada en más de 100 familias de plantas de las cuales al menos en 150 tipos de saponinas naturales se han encontrado propiedades anticancerígenas significativas (Man et al., 2010); exhiben propiedades permeabilizadoras de membrana, por lo que se ha investigado su potencial terapéutico (Yan et al., 2009).

La actividad biológica de las saponinas es diversa y depende del origen y tipo de saponina. Algunos estudios han indicado que las saponinas poseen propiedades anticarcinogénicas a través de diferentes mecanismos. No obstante, a causa de la heterogeneidad de sus estructuras químicas, es difícil generalizar su actividad biológica. Aunque se considera que el efecto anticarcinogénico de las

saponinas proviene de diferentes mecanismos, éstos no pueden ser completamente separados entre sí. A pesar de ello se cree que las características anfifílicas de las saponinas influyen su actividad biológica (Rao y Sung, 1995).

Algunos estudios han revelado que las diferencias entre las estructuras de las saponinas, incluidos el tipo y número de azúcares adheridos por una cadena glicosídica a C-3 influyen la respuesta biológica. Wang et al. han comparado la Dioscina (Fig. 5) y la metil protoDioscina con 26-O-glicopiranosido. Estos autores mostraron que sólo la Dioscina induce apoptosis aunque los compuestos son estructuralmente muy cercanos.

Otros estudios, además de atribuir la actividad biológica a la presencia de azúcares, también le confieren importancia al doble enlace 5,6. En estos estudios se han comparado las estructuras moleculares de diversos derivados de la diosgenina (Fig. 5) y se ha encontrado que la ausencia del doble enlace puede ser compensado por otras características estructurales referente a la inducción de apoptosis, sin embargo, no así con la detención del ciclo celular (Trouillas et al., 2005).

Como un esteroide vegetal producido por el metabolismo secundario, la diosgenina (aglicano de la Dioscina) muestra muchas funciones biológicas importantes en plantas y animales, actuando como un regulador de procesos fisiológicos y del desarrollo en el sistema animal. También ha sido ampliamente usada para sintetizar nuevas drogas esteroides. Recientemente, algunos estudios han sido dirigidos a su utilización en la terapia contra el cáncer (Lie et al., 2005). Estudios previos han demostrado que la Dioscina y la diosgenina, ambos pertenecientes a saponinas de espirostanol, tienen notables actividades antitumorales (Tabla 1). Pueden inducir diferenciación megacariocítica, inmunomodulación, citotoxicidad directa, detención del ciclo celular y apoptosis (Wang et al., 2006). Se ha reportado que la Dioscina presenta bioactividad antitumoral, antifúngica y antiviral (Li et al., 2005). Recientemente se reportó que la Dioscina induce diferenciación y apoptosis en la línea celular HL60 de leucemia humana (Wang et al., 2001). En 2002 se publicó un reporte sobre la actividad antiproliferativa y pro-apoptótica inducida por la Dioscina en células HeLa (Cai et al., 2002), en ese estudio se observó inducción de actividad apoptótica con

incremento en la actividad de las caspasas -3 y -9, aumento en la región sub-G1 y reducción de Bcl-2 a una concentración de 2 a 8 μ M. Sin embargo, hasta el momento no se han hecho estudios orientados a investigar su actividad biológica selectiva, ni existen reportes de su efecto en células normales.

Tabla 1. Antecedentes del compuesto

Compuesto	Línea celular	Tipo de cáncer	IC ₅₀ (μ M)	Ciclo Celular (24h)	Parámetros de muerte celular (positivos o aumentados)	Referencia
Dioscina	HL60	Leucemia	7.5	-	Apoptosis	Wang et al, 2001
Dioscina	MDA-MB-435	Melanoma/Seno	2.6	-	-	Wang et al, 2001
Dioscina	HeLa	Cérvix	4.5	-	-	Wang et al, 2001
Dioscina	H14	Embrión	0.8	-	-	Wang et al, 2001
Dioscina	HeLa	Cérvix	4.4	SubG1 aumenta	Caspasa 3 y 9	Cai et al, 2002
Diosgenina	HeLa	Cérvix	-	SubG1 aumenta	Fragmentación de ADN Caspasa 3	Huo et al, 2004
Dioscina	HL60	Leucemia	-	-	Caspasa 3 y 9	Liu et al, 2004
Dioscina	K562	Leucemia	-	G2/M aumenta S y G1 disminuyen	Apoptosis	Liu et al, 2004
Diosgenina	1547	Osteosarcoma	-	G1 aumenta S disminuye	Fragmentación de ADN	Trouillas et al, 2005
Metil-protoDioscina	HepG2	Hígado	20	G2/M aumenta G1 disminuye	Apoptosis	Wang et al, 2006
Dioscina	A549	Pulmón	4.2	-	-	Zhu et al, 2006
Dioscina	BGC-823	Estómago	2.0	-	-	Zhu et al, 2006
Dioscina	HGC-27	Estómago r	5.9	-	-	Zhu et al, 2006
Dioscina	SW1990	Páncreas r	0.50	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	BxPC3	Páncreas r	0.70	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	Capan2	Páncreas	0.05	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	PANC1	Páncreas	0.81	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	A549	Pulmón	0.70	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	Bel7402	Hígado	0.23	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	A2780	Ovario	4.46	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	HCT-8	Intestino	0.56	-	-	Wang et al, 2009
Dioscina	MCF-7	Seno	1.03	-	-	Wang et al, 2009
Diosgenina	LA795	Pulmón r	149.75 \pm 10.43	-	TUNEL Apoptosis	Yan et al, 2009

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La radioterapia y la quimioterapia, los tratamientos existentes contra el cáncer cervicouterino, producen efectos secundarios indeseables y su acción es poco selectiva, además de ser ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad. Por ello, surge la necesidad de buscar nuevas terapias basadas en compuestos que presenten una actividad antiproliferativa y de acción selectiva. Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos que presentan un fuerte interés por sus múltiples actividades biológicas, se encuentran las saponinas y sus derivados, los cuales han demostrado una diversa actividad biológica, como antifúngicas, antiinflamatorias e inclusive antitumorales. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado sobre el cáncer cervicouterino, por lo que resulta de interés investigar la actividad antiproliferativa y selectiva de la saponina Dioscina en líneas de cáncer cervical.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial; en 2008 se le atribuyeron 7,6 millones de las defunciones ocurridas (aproximadamente un 13% del total). Mientras que en México, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en 2007, provocando el fallecimiento de 68,128 personas, el volumen representa el 12.9% del total de las defunciones registradas. Las defunciones por tumores malignos representaron 11.8% del total de fallecimientos en los varones y 15.4% en las mujeres.

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Según las cifras reportadas por el INEGI, en 2007 el 15.7% de las defunciones a causa de cáncer en mujeres fueron debido a cáncer cervicouterino. Dentro de las nuevas alternativas terapéuticas con fines orientados hacia la quimioprevención y/o tratamiento del cáncer, está el uso de compuestos vegetales, entre los cuales podemos mencionar a las saponinas esteroidales, las cuales poseen actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en diferentes líneas tumorales, sin embargo, su actividad selectiva no ha sido probada, por lo que se espera hacer

alguna aportación sobre su acción selectiva al estudiar a la saponina Dioscina, evaluada en cultivos de células provenientes de cáncer cervicouterino.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto de la Dioscina en el potencial proliferativo, ciclo celular e inducción de apoptosis en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Objetivos Particulares

- Obtener las concentraciones a las cuales el compuesto produce una disminución del 50% (IC_{50}) en el número celular de las líneas HeLa, CaSki y ViBo, a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.
- Determinar si las IC_{50} 's obtenidas ejercen un efecto citotóxico en las líneas CaSki, ViBo y HeLa, así como en células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, por medio de la cuantificación de la actividad de la LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Evaluar si la saponina afecta la distribución del ADN en el ciclo celular de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, por citometría de flujo.
- Comprobar si la Dioscina induce apoptosis, evaluando la presencia de ADN fragmentado por medio de la técnica de *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling* (TUNEL), así como de Caspasa-3 activa por inmunocitoquímica.

- Evaluar el efecto de las IC_{50} 's sobre la proliferación celular de cultivos de células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana).

HIPÓTESIS

Se ha reportado que la Dioscina induce actividad antiproliferativa y pro-apoptótica en células HeLa (Cai et al., 2002) y otras líneas tumorales (Wang et al., 2006) por lo que se espera observar actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en las líneas celulares de CaCu CaSki y ViBo.

MÉTODO

Cultivo de células tumorales

Las células provenientes de cáncer cervicouterino de cada línea se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo RPMI-1640 con 5% de suero neonato de ternera (SNC) y rojo fenol, suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina. Fueron mantenidas en una atmósfera húmeda a saturación, con 5% de CO_2 y a $37^\circ C$ en una incubadora (Nuair US Autoflow).

Para el proceso de sembrado, las células se despegaron con verseno (para CaSki y HeLa) y tripsina al 0.05% en PBS (para ViBo); el conteo celular se realizó con un hemocitómetro.

Preparación del compuesto

Se preparó una solución stock con 1 mg de Dioscina disuelto en 100 μl de dimetil sulfóxido (DMSO). Las soluciones de trabajo se obtuvieron por medio de diluciones de la solución stock, por ejemplo: 10 μl de solución stock en 100 μl para obtener una concentración final de 10 $\mu g/10 \mu l$.

Obtención de la IC_{50} de cada línea celular, por medio de la tinción con cristal violeta

En cajas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc) fueron sembradas 7 500 células por pozo, en 100 μl de medio con 5% de SNC. Transcurridas 24 h fueron estimuladas con diferentes concentraciones

del compuesto disuelto en medio con 5% de SNC. En la misma caja se contempló células en condiciones normales de cultivo (control) y un control para el vehículo (DMSO). Las células con el vehículo fueron incubadas con las concentraciones de DMSO que se utilizaron para disolver el compuesto. El efecto se evaluó 24 h después de realizar el estímulo; para ello se utilizó el método de incorporación del colorante cristal violeta; éste consiste en retirar el medio de cultivo y fijar las células inmediatamente con glutaraldehído al 1.1% durante 10 min. Posteriormente se retira el fijador y se lava con agua desionizada, después se les añade el colorante cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico durante 20 min en agitación. El exceso de colorante es retirado con lavados de agua, evitando que el chorro de agua caiga directamente sobre las células. El colorante retenido en las células, se solubiliza con ácido acético al 10% durante 20 min en agitación. Finalmente, se mide la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro o lector de placas para ELISA.

Primero se probó con una dilución seriada para identificar el rango en el que se ubicaba la IC_{50} y posteriormente a partir de los datos obtenidos se realizaron nuevos ensayos con rangos cada vez más pequeños. Con los resultados obtenidos de cada ensayo se realizó una curva para obtener la IC_{50} matemática a corroborar.

Observación de cambios en la morfología celular

Los cambios en la morfología celular fueron evaluados por medio de un microscopio invertido, en el que los cultivos fueron fotografiados con una cámara SONY Super SteadyShot DSC-W90, con un zoom de 1.5 después de 24 h de inducción. Los cultivos también fueron observados con un microscopio óptico, utilizando el contraste de fases. Se observaron las células estimuladas con la IC_{50} obtenida para cada línea, así como los dos controles (medio al 5% y DMSO) con objetivos de 10 y 20X.

Evaluación del efecto en el ciclo celular por citometría de flujo.

En cuatro cajas de cultivo Petri de 50 mm, se sembraron 500 000 células por caja. A las 24 h se lavaron con medio al 5% de SNC. Las células fueron incubadas con la IC_{50} establecida previamente,

con DMSO y se incluyó un control que no tenía ninguno de los anteriores. Luego de 24 h, se despegaron las células de cada caja y fueron colocadas en tubos cónicos de plástico de 15 ml y se centrifugaron durante 5 min. Se lavaron los botones celulares con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH=7.2 y se fijaron con 1ml de metanol al 50 % en PBS por 15 min. Posteriormente se centrifugaron y se lavaron con PBS. Los botones se resuspendieron en 1 ml de ARNasa (2.5 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 20 min. Después se agregaron 15 µl de una solución de yoduro de propidio (0.2 µg/ml) y la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo.

Detección específica DNA fragmentado por medio de la técnica de Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Las células fueron sembradas en cubreobjetos y fueron tratadas con y sin la Dioscina a la concentración de IC₅₀ obtenida según la línea celular durante 24 h, posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 min. Las células se lavaron 3 veces con PBS y fueron permeadas con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min a 4° C. Se realizaron 3 lavados con PBS. Una vez permeadas las células se inició el desarrollo de la técnica de TUNEL colocando las preparaciones en una cámara húmeda y protegida de la luz. Primero se adicionó el buffer de equilibrio durante 15 min a temperatura ambiente, después se incubaron con enzima TdT durante 1 h. a 37°C. La reacción se detuvo con buffer de paro por 10 min en agitación. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anti-digoxigenina acoplada a Rhodamina durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 10µg/ml) para contrastar la cromatina, se realizaron nuevamente 3 lavados y finalmente se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield USA). Las preparaciones fueron evaluadas en un microscopio de epifluorescencia.

Detección específica de caspasa-3 activa por inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas en cubreobjetos y fueron tratadas con y sin la dioscina a la concentración de IC_{50} obtenida según la línea celular durante 24 h, posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 min. Las células se lavaron 3 veces con PBS y fueron permeadas con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min a 4° C. Se realizaron 3 lavados con PBS. A continuación, las células se bloquearon con PBS-BSA-Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se retiró el exceso de solución de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo primario (anti-caspasa-3 activa desarrollado en conejo, SIGMA) en una concentración 1:50 en PBS durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Enseguida, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (Cabra anti-conejo, SIGMA) en una concentración 1:100 en PBS en oscuridad durante 2 h. Las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con DAPI para evidenciar a la cromatina, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS. Las preparaciones se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield USA). Las preparaciones fueron evaluadas en un microscopio de epifluorescencia.

Evaluación de citotoxicidad mediante la cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH)

En una caja de 96 pozos (Corning Inc) se sembraron 7500 células con 100 μ l de medio RPMI al 5 % de SNC. Después de 24 h se retiró el medio de cultivo y se adicionó la concentración correspondiente a la IC_{50} en RPMI fresco al 5 % de SNC. Se consideró un control sin estímulo al cual se le hizo cambio de medio de cultivo fresco y un control del vehículo correspondiente a la cantidad de DMSO en el que se solubilizó la IC_{50} .

Cumplidas 24 h se retiró únicamente el medio de cultivo del control que contiene sólo RPMI al 5 % de SNC y las células fueron permeadas con 100 μ l de Tritón 1X-100 al 0.5% en PBS e incubadas por 1 h a 36°C en atmósfera húmeda (estas células fueron el control positivo de citotoxicidad). Después se extrajo el medio de cada uno de los pozos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min (con el fin de eliminar residuos celulares). Se recuperó el sobrenadante y se colocó

en una caja nueva de 96 pozos para así agregar 100 μ l de la mezcla de reacción (250 ml de catalizador y 11.25 ml de solución colorante (Kit BioVision K-311 400; 400 assays), se incubaron durante 30 min y se midió la absorbancia a 490–500nm en un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia de los controles fueron comparados con los de los tratamientos.

Evaluación del efecto de la Dioscina sobre la proliferación de linfocitos humanos a través de la proporción de carboxifluoresceína (CSFE).

Para el cultivo de linfocitos humanos: Por medio de tubos Vacutainer™ se colectaron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano. Se colocaron 5ml de sangre en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA) con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich) y se centrifugaron con una centrífuga clínica (Dinac, USA). La velocidad de centrifugado se fue incrementando de forma gradual hasta llegar a 1500 rpm y a esa velocidad se mantuvo durante 25 min. Tras la centrifugación, se formaron cuatro fases fácilmente distinguibles: A) fase con células eritrocíticas; B) ficoll; C) anillo de células leucocíticas; D) plasma. El plasma se retiró mediante una micropipeta y fue etiquetado y almacenado a -70°C. El anillo de leucocitos contenido en cada tubo fue transferido a un tubo esteril y resuspendido con 10 ml de RPMI-1640 y centrifugado a 1500 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue eliminado para resuspender el botón celular en 4 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. Las células se sembraron en una caja Petri de 100 mm de diámetro (Pirex, USA), en un volumen final de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB. Después de 1 h de incubación las células en suspensión fueron extraídas y colocadas en tubos y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Las células se lavaron en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. El número celular fue determinado con una cámara de Neubauer.

Para el ensayo de carboxifluoresceína (Zigma-Aldrich, USA), 1×10^6 células por ml de medio RPMI-1640, se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de una solución de Carboxifluoresceína (200 μ M) y se incubaron durante 15 min protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4

ml de RPMI al 20% de SFB. Para la activación con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos eppendorf a una densidad de 1×10^6 células por ml de RPMI suplementado con 20% de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina (10 μ g/ml por millón de células) (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con dioscina se trataron las células con la IC_{50} respectiva obtenida para cada línea celular. Las células contenidas en cada tubo eppendorf fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y se dejaron incubar durante 72 h. Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 ml de verseno frío durante 5 min, luego se centrifugó y se retiró el verseno, el botón fue resuspendido con 500 μ l de PBS y 500 μ l de paraformaldehido al 2%. Finalmente la fluorescencia en cada célula fue evaluada en un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACSAria II).

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza ANDEVA, con una significancia del 0.05, seguido de una prueba de Tukey, realizado en el SPSS Statistics 17.0 para Windows.

RESULTADOS

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN CÉLULAS TUMORALES

Con el propósito de establecer el efecto antiproliferativo de la Dioscina, la concentración de Dioscina requerida para inducir un decremento del 50% en la densidad celular (IC_{50}) de los cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fue determinada. Para ello, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo se trataron con 1.25 a 3 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo de la línea celular del esteroide y el número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (Fig. 6). Los resultados fueron linealizados y los valores para la IC_{50} fueron calculados conforme a la ecuación de la línea recta.

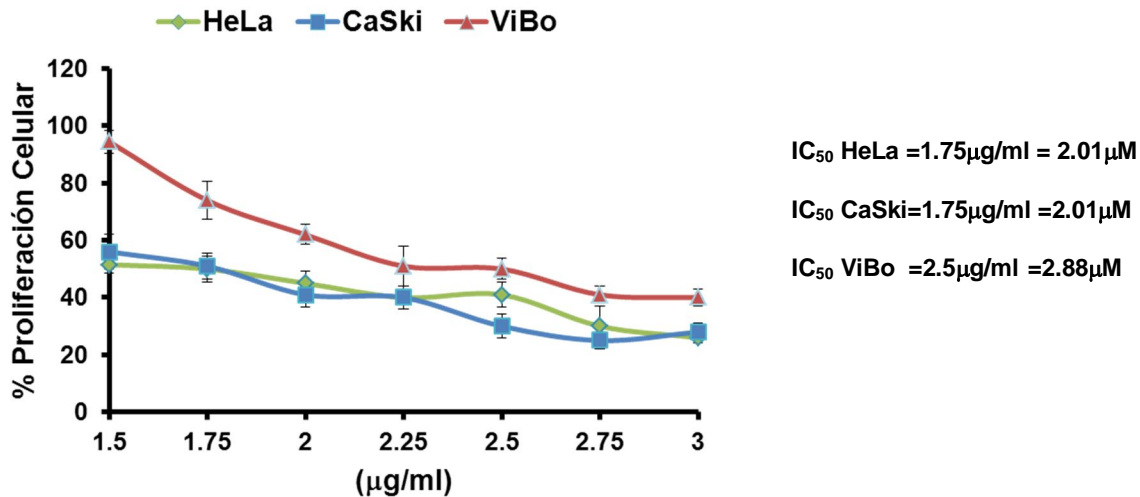


Figura 6. Efecto del esteroide Dioscina en el potencial proliferativo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo y determinación de la IC_{50} . El número celular fue determinado mediante la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos indican que la Dioscina ejerce una actividad antiproliferativa en las tres líneas tumorales cuyo efecto es dosis-dependiente, es decir, conforme se incrementa la concentración disminuye el número celular. Este efecto antiproliferativo fue observado en las tres líneas tumorales y los valores de la IC_{50} fueron muy parecidos en las tres líneas celulares. La IC_{50} de HeLa y CaSki resultó ser 1.75 $\mu\text{g/ml}$ y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ la de ViBo, indicando que las tres líneas celulares presentan una sensibilidad al esteroide muy similar.

EFFECTO EN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS

Para determinar si el compuesto induce un efecto selectivo, se establecieron cultivos de linfocitos humanos, los cuales fueron tratados con la IC_{50} más alta obtenida y posteriormente se evaluó el efecto del compuesto en la proliferación celular por medio de la técnica de carboxifluoresceína, para calcular el porcentaje de proliferación en los cultivos inducidos con Dioscina, se tomó como 100% el porcentaje obtenido en el control (Fig. 7). Los resultados muestran que la Dioscina no afecta la proliferación de los linfocitos.

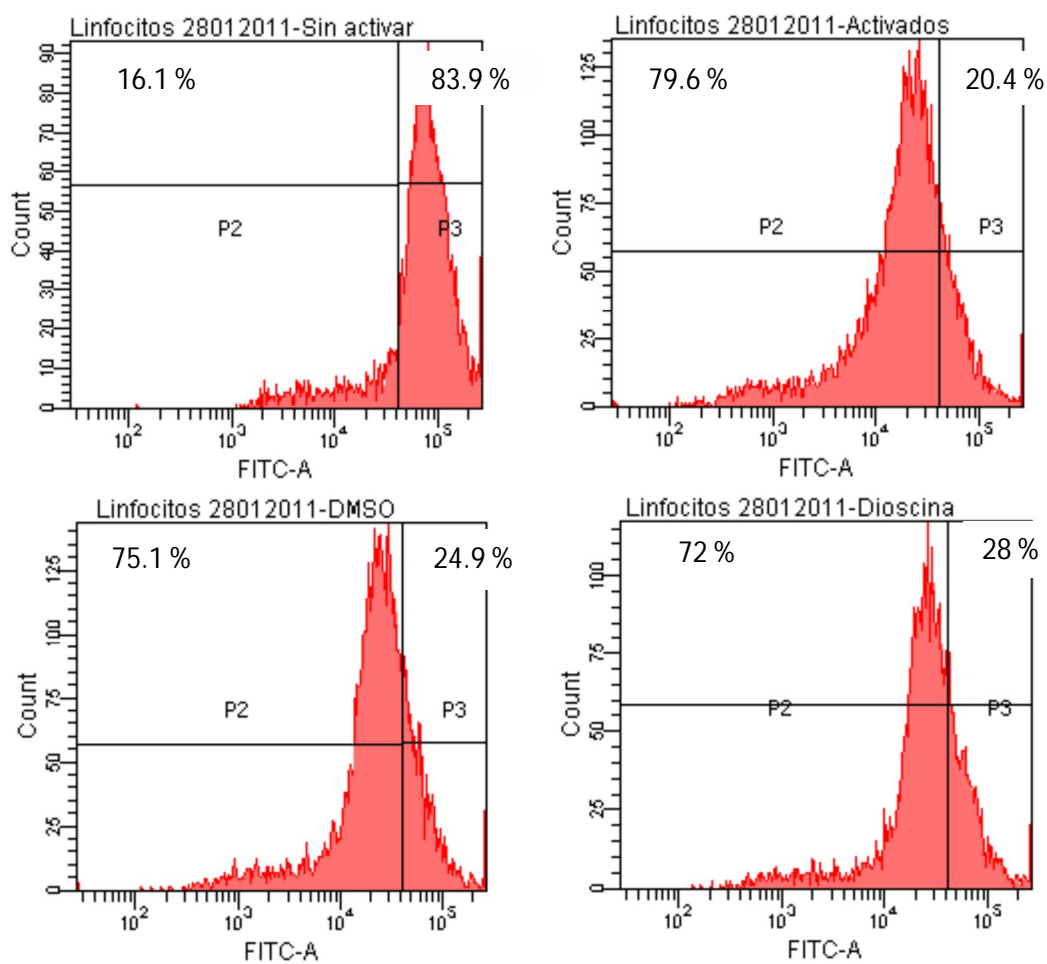


Figura 7. Efecto de la Dioscina en el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.

EFFECTO DE LA DIOSCINA EN LA MORFOLOGÍA DE CÉLULAS TUMORALES

Con la intención de evaluar el efecto de la Dioscina en la morfología celular de cada una de las líneas tumorales, cultivos de células HeLa y CaSki fueron estimulados con 1.75 $\mu\text{g/ml}$ y 2.5 $\mu\text{g/ml}$

de Dioscina para las células ViBo durante 24 h. Posteriormente, los cultivos celulares fueron fotografiados con una cámara SONY a un zoom de 1.5 y el efecto de los cultivos tratados con la Dioscina fueron comparados con los cultivos no tratados. La morfología de las células tratadas con el esteroide se vio alterada en comparación con las células del control y del vehículo. Mientras que los controles mantienen su citoplasma extendido y una forma poliédrica, las células tratadas con la Dioscina tienen una forma redondeada y el citoplasma reducido, observando células de menor tamaño (Fig. 8).

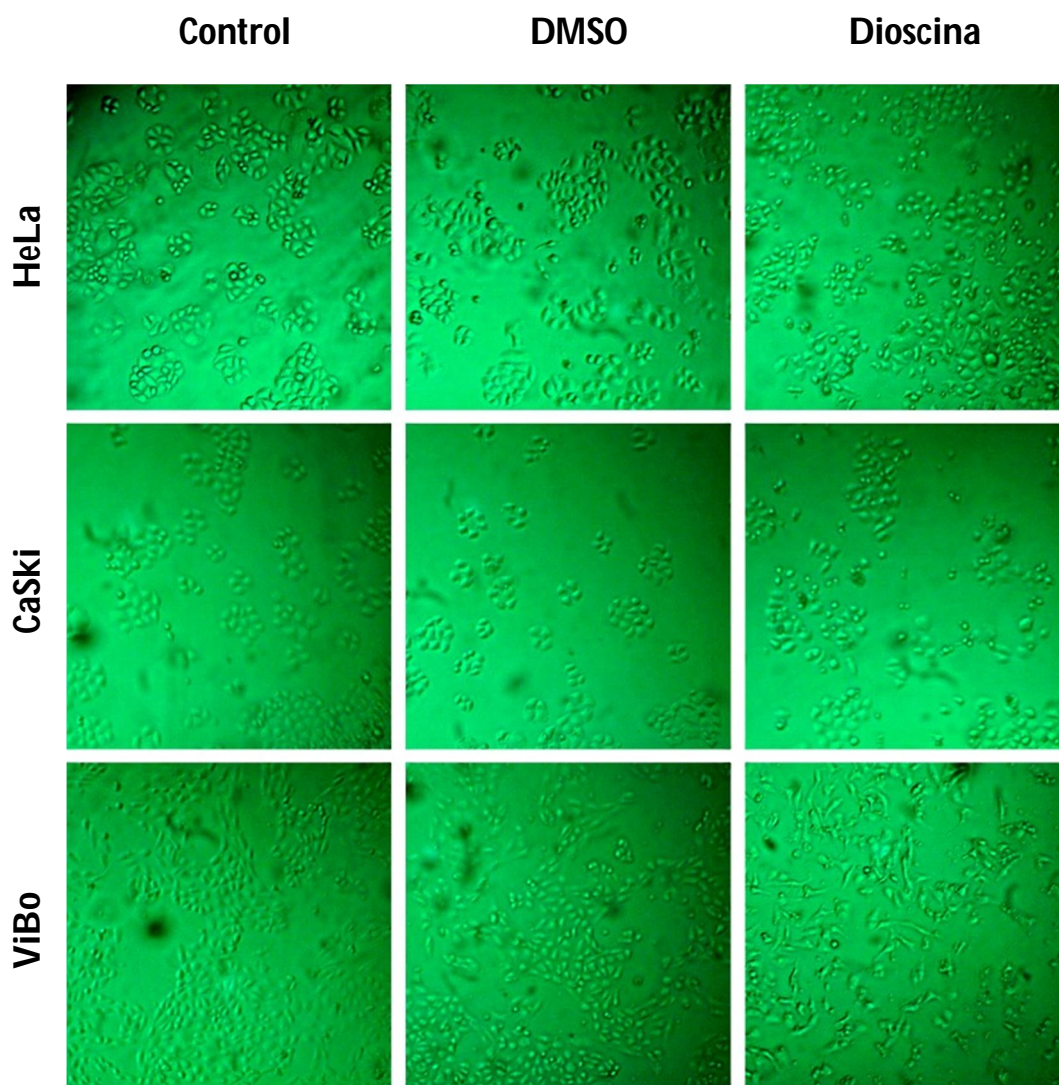


Figura 8. Efecto de la Dioscina en la morfología celular de cultivos de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron tratadas con Dioscina (3.5 g/ml para células HeLa y CaSki y con 3.4 g/ml para células ViBo) por 24 h. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio invertido, con una cámara SONY a un zoom de 1.5.

EFFECTO DE LA DIOSCINA EN EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS TUMORALES

Para determinar si la disminución del número celular observado en los cultivos tratados con Dioscina es dependiente o independiente del ciclo celular, los cultivos celulares de las líneas HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con Dioscina a las concentraciones correspondientes a las respectivas IC_{50} 's. Posteriormente la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular fue determinada por citometría de flujo (Fig. 9).

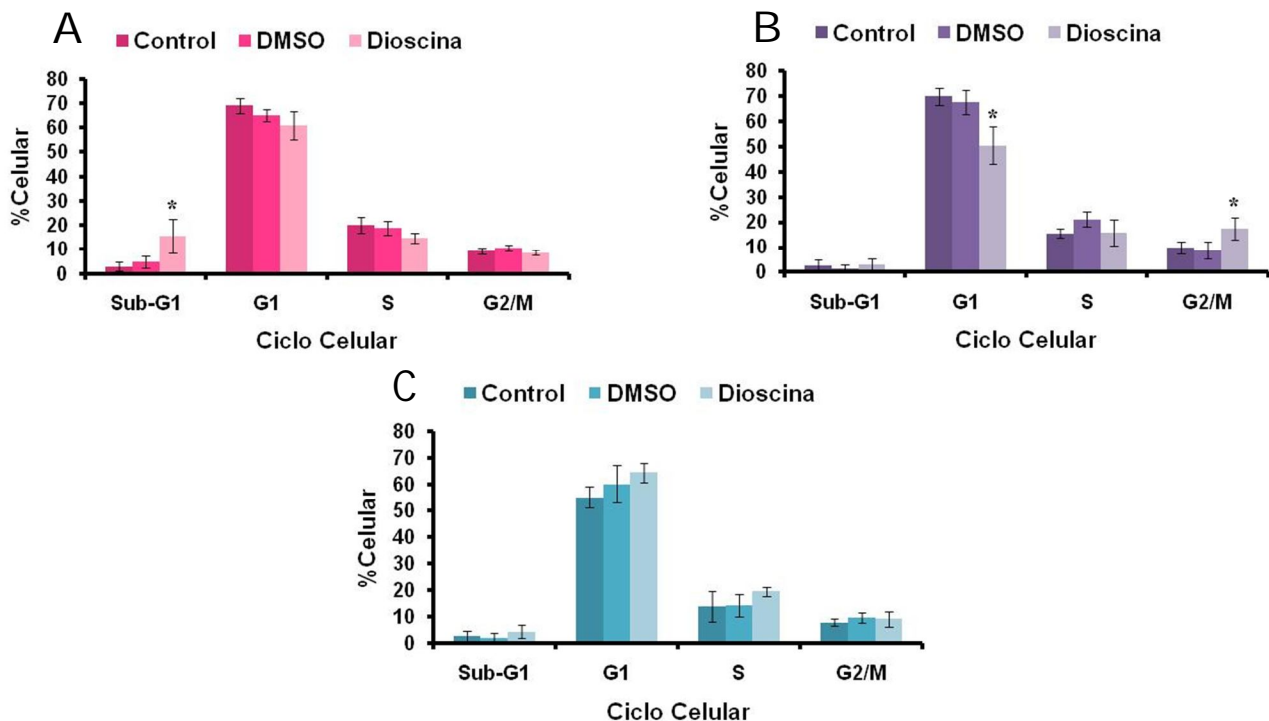


Figura 9. Efecto de la Dioscina en la distribución de la cantidad de ADN en las fases del ciclo celular de HeLa (A), CaSki (B) y ViBo (C) evaluado mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba ANDEVA seguida de la prueba de Tukey ($P > 0.05$). Los datos estadísticamente significativos con respecto a los controles se marcan con un asterisco.

Los resultados obtenidos en la figura 9 establecen que la Dioscina no afecta la distribución del DNA en las líneas tumorales HeLa y ViBo, indicando que la acción del esteroide en estas células es independiente del ciclo celular. Sin embargo, en células CaSki la Dioscina induce un decremento en el porcentaje de células que se encuentran en G1 y un incremento en las células que se encuentran en G2/M, indicando que el efecto del esteroide es dependiente de ciclo.

EFFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS TUMORALES

Con el propósito de descartar un posible efecto citotóxico por parte del compuesto, los cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo se trataron con sus respectivas IC_{50} 's de Dioscina y se midió la cantidad de LDH liberada en el sobrenadante del cultivo como un indicador de necrosis. Para establecer el porcentaje de citotoxicidad, se utilizó un control positivo en donde las células fueron tratadas con Tritón X-100. El control positivo fue tomado como el 100% de citotoxicidad (Fig. 10).

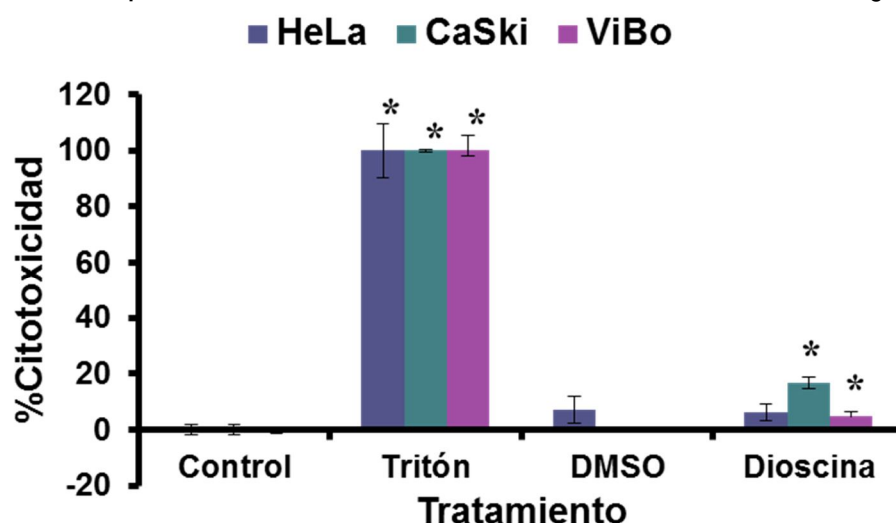


Figura 10. Evaluación del efecto citotóxico en las líneas de CaCu HeLa, CaSki y ViBo a través de la cuantificación de LDH. Los asteriscos muestran la significancia de los datos con respecto al DMSO.

El porcentaje de citotoxicidad causado por la Dioscina en las líneas de CaCu fue de 4.8% en ViBo, 16.8% en CaSki y 6.1% en HeLa. El efecto citotóxico del compuesto no fue significativo en las células HeLa con respecto al tratado con el vehículo, mientras que en CaSki y ViBo sí fue significativo (Fig. 10).

EFFECTO CITOTÓXICO EN LINFOCITOS

A continuación, se evaluó la liberación de LDH en células linfocíticas normales tratadas con la concentración más alta de las IC_{50} 's obtenidas (Fig. 11).

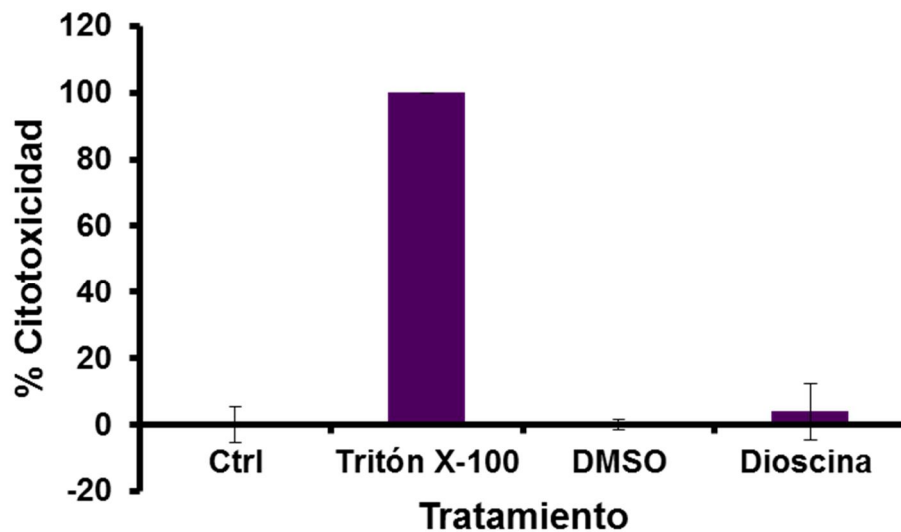


Figura 11. Cuantificación de LDH en linfocitos. En este gráfico se observa que no existe un efecto citotóxico del compuesto en las células.

Después del tratamiento con Dioscina, los datos indican que el compuesto no es citotóxico para los linfocitos.

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Posteriormente, a razón de determinar si la Dioscina induce muerte por apoptosis en las células de CaCu, los cultivos de HeLa, CaSki y ViBo se trataron con las IC_{50} 's del compuesto y consecutivamente se inmunodetectó a la caspasa-3 activa (Fig. 12-14), así como la fragmentación de ADN por medio de la técnica de TUNEL (Fig. 15-17).

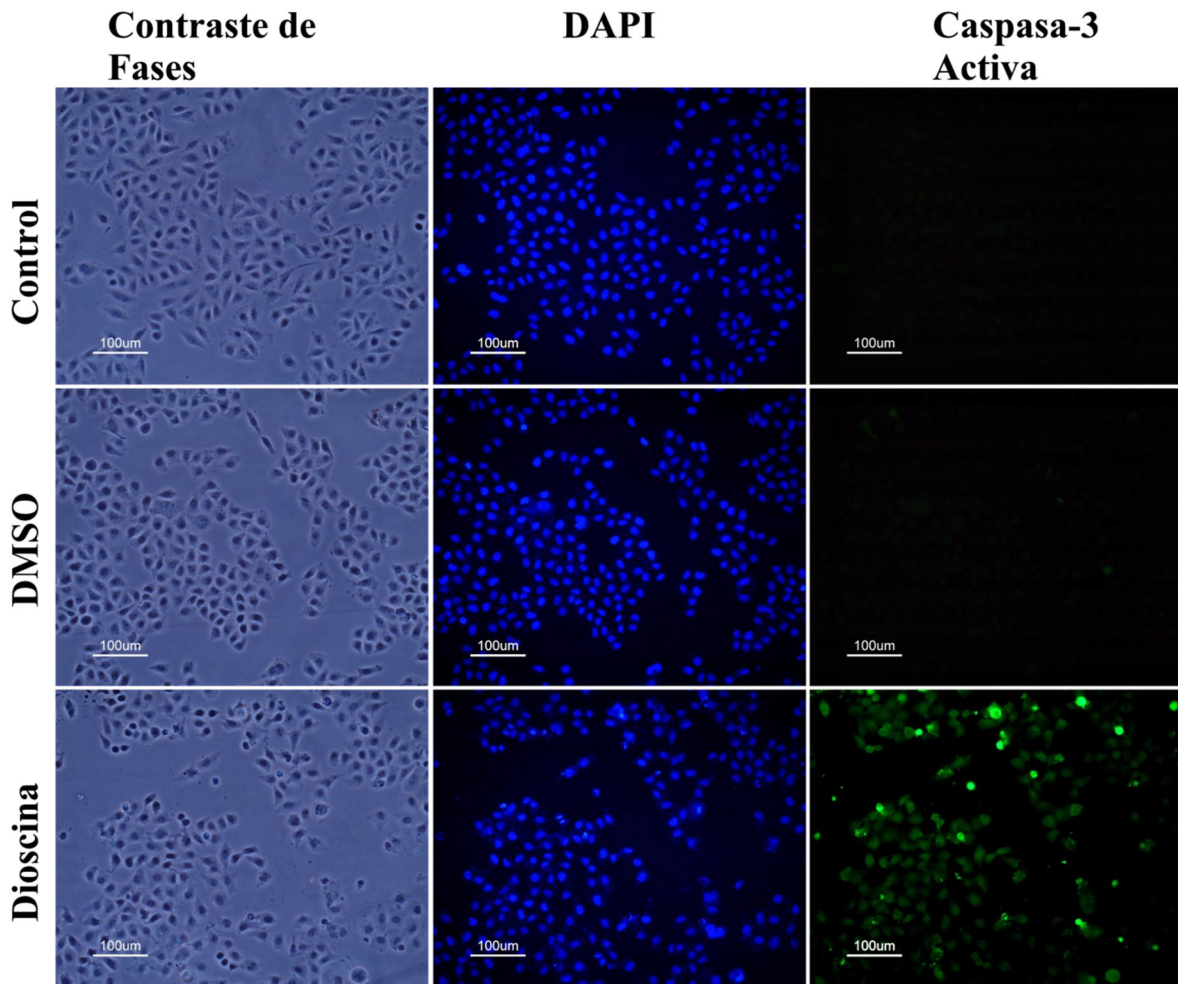


Figura 12. Inmunodetección de caspasa-3 activa en células HeLa. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Dioscina en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

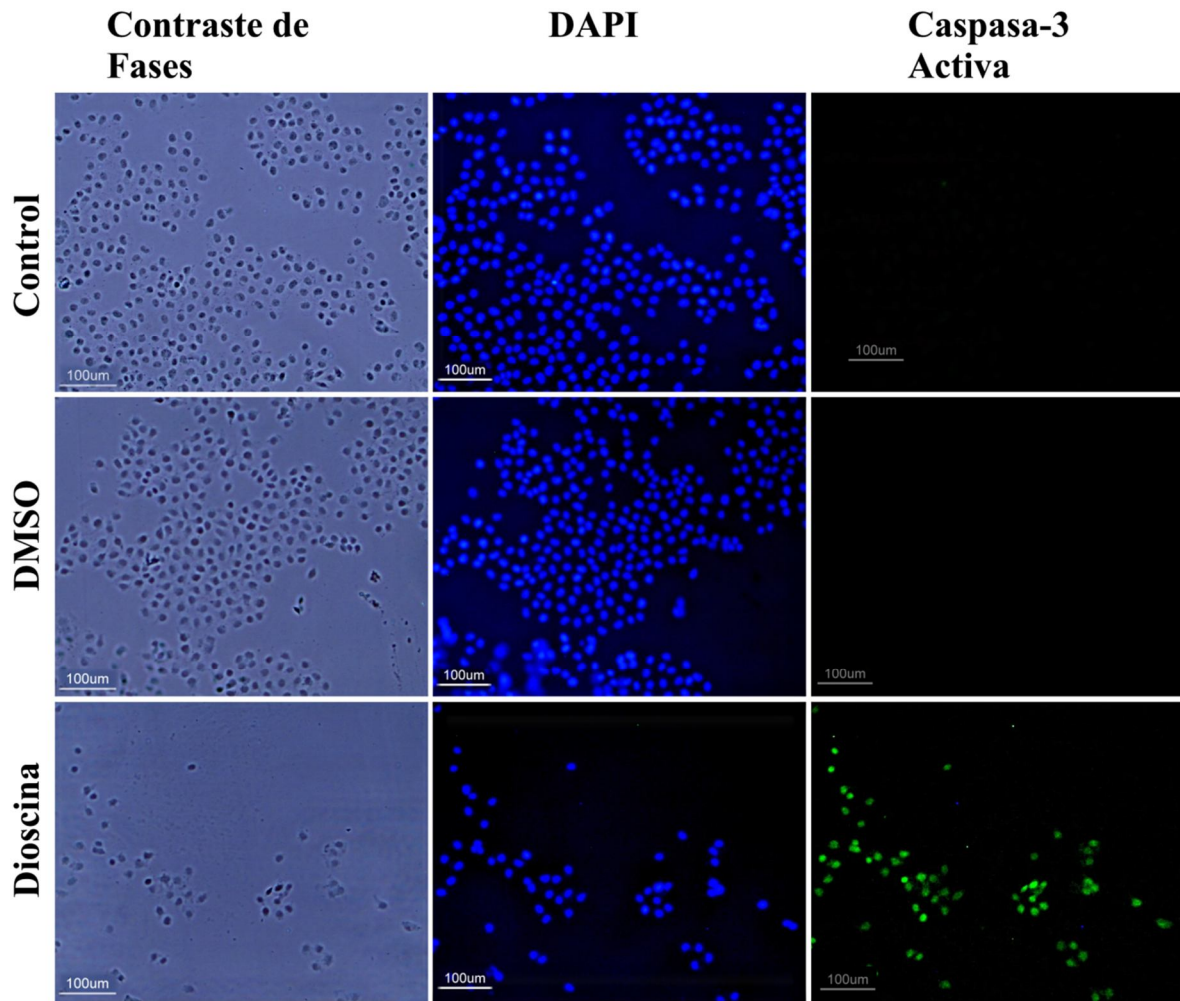


Figura 13. Inmunolocalización de caspasa-3 activa en células CaSki. Después del tratamiento con la Dioscina las células se ven alteradas en su morfología (contraste de fases). Las células con fuerte compactación de la cromatina son positivas a la inmunodetección de la caspasa-3 activa.

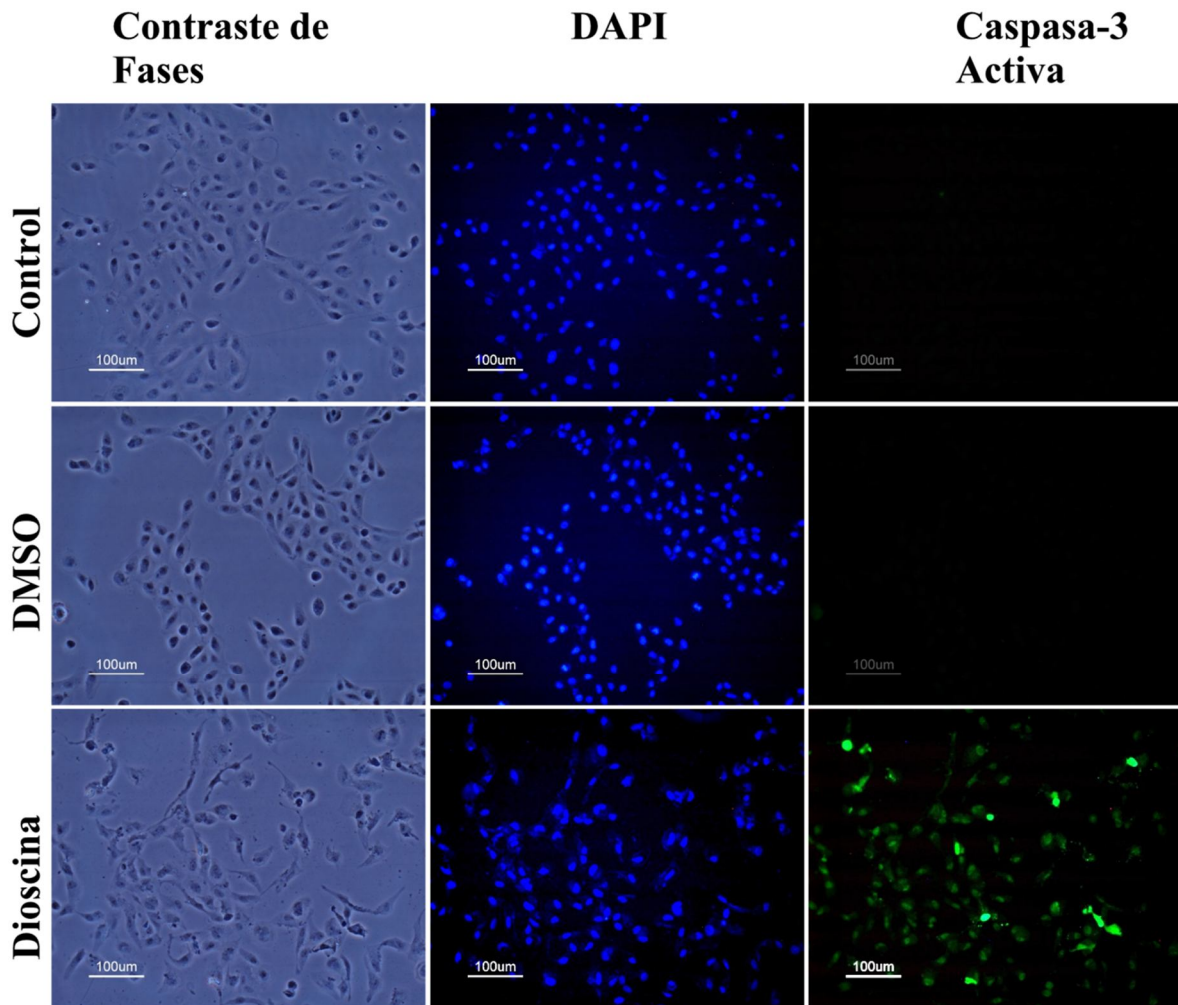


Figura 14. Inmunolocalización de caspasa-3 activa en células ViBo. Las células tratadas con la Dioscina muestran alteración en la morfología lo que se evidencia en la imagen de contraste de fases; éstas son positivas a la inmunodetección de la proteasa.

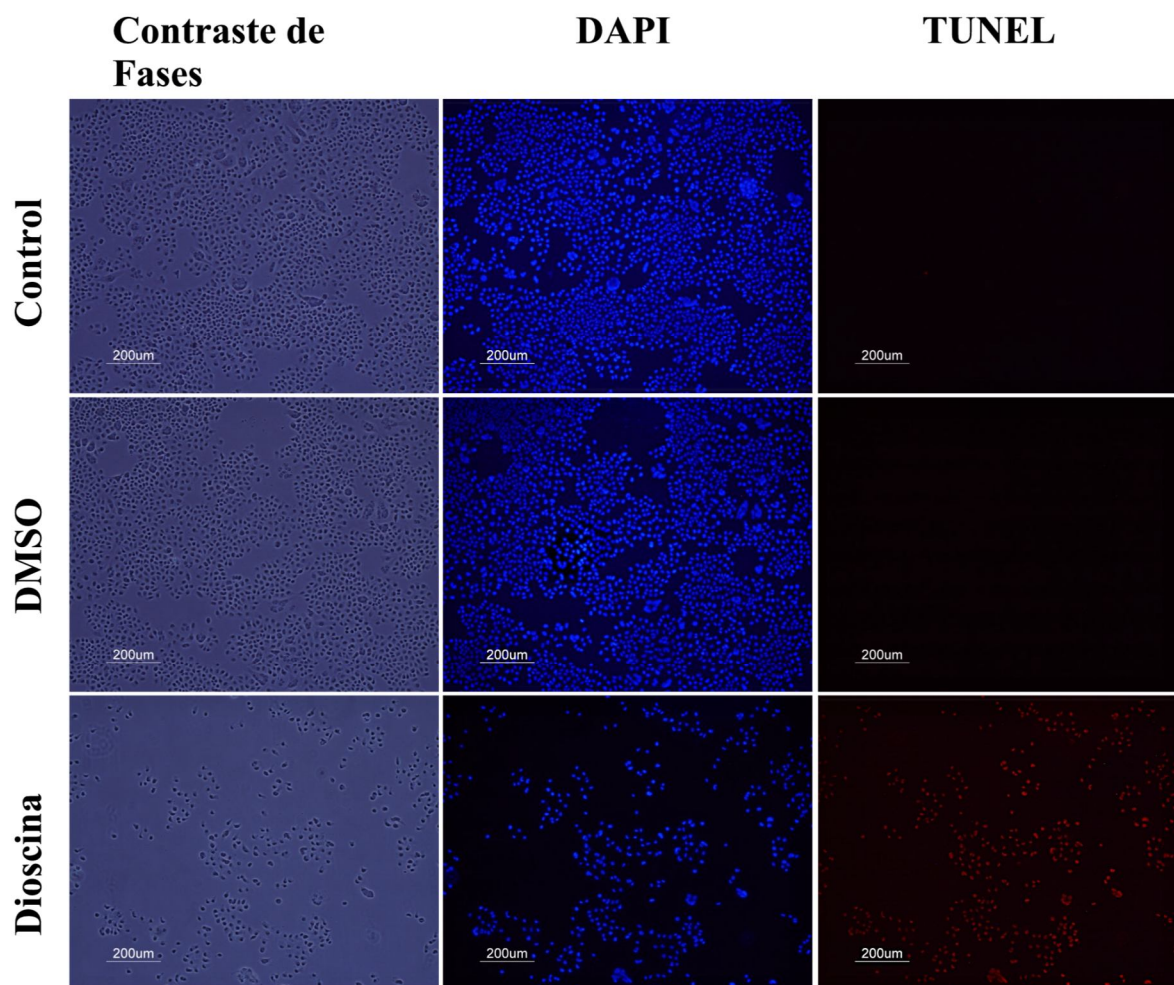


Figura 15. Técnica de TUNEL en células HeLa, las células tratadas con Dioscina muestran una fuerte compactación de la cromatina y positividad a la técnica de TUNEL.

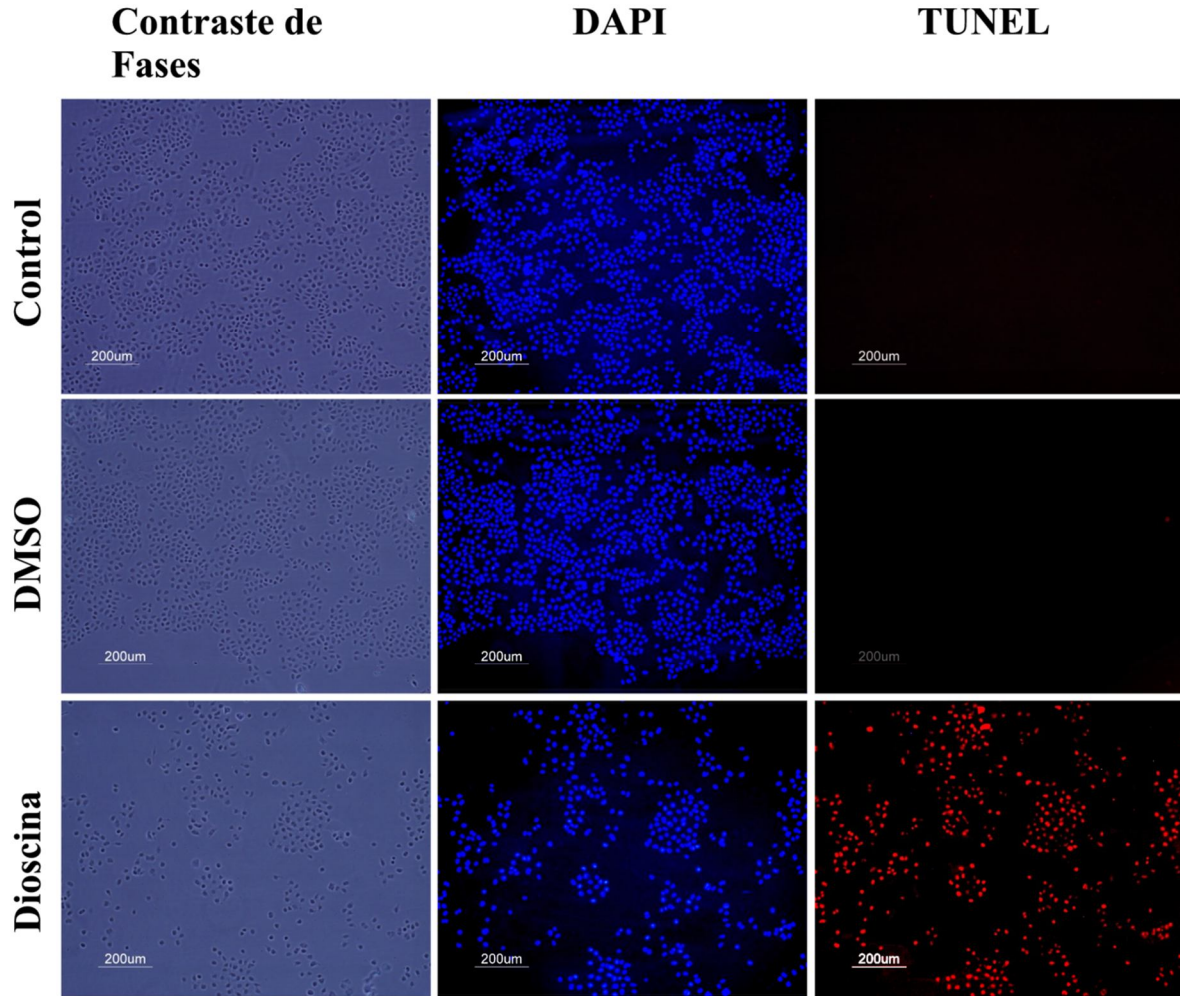


Figura 16. Técnica de TUNEL en células CaSki. Las células tratadas con la Dioscina muestran una fuerte compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

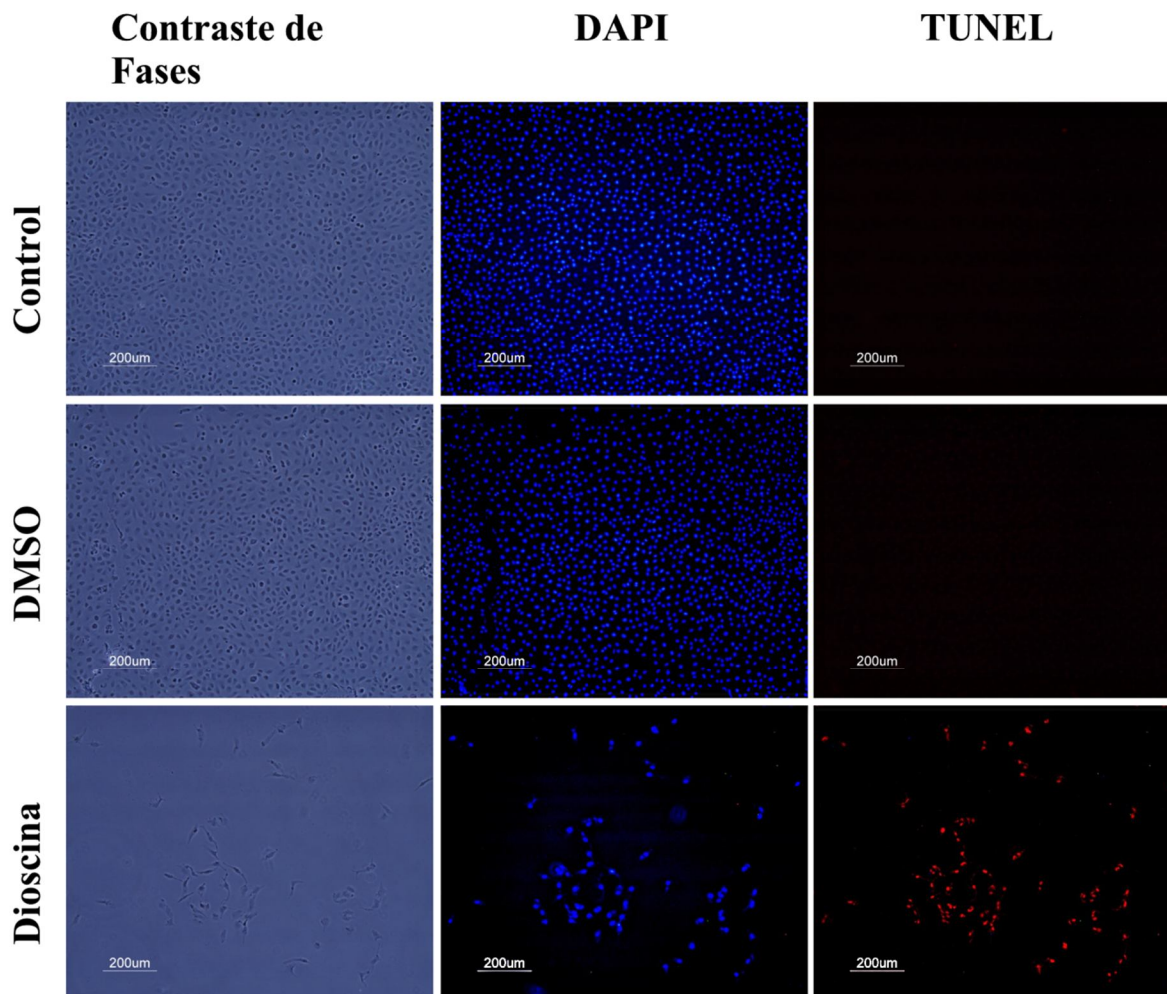


Figura 17. Técnica de TUNEL en células ViBo. El contraste de fases muestra los cambios morfológicos de las células tras el tratamiento con la Dioscina. Las células con fuerte compactación de la cromatina (azul) son positivas a la técnica (rojo).

Los resultados muestran que la Dioscina induce condensación de la cromatina (Fig. 9-14), activación de caspasa-3 (Fig. 12-14) y fragmentación de ADN (Fig. 15-17) en las tres líneas celulares.

DISCUSIÓN

Debido a la baja efectividad de los tratamientos tradicionales aplicados al cáncer cervicouterino en casos avanzados, así como a causa de los efectos secundarios que estos tratamientos generan, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas. Actualmente existe especial interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal que presenten actividad antiproliferativa, inductora de apoptosis y de acción selectiva. En el caso particular de la Dioscina, los resultados mostraron que ésta presenta una actividad antiproliferativa en las líneas tumorales de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, cuyo efecto es dosis-dependiente, es decir, conforme se incrementa la concentración, el número celular disminuye.

Con respecto a los valores obtenidos para las IC_{50} en cada una de las líneas tumorales, se aprecia que éstos son muy similares entre sí (2.01 μ M para células HeLa y CaSki y 2.88 μ M para células ViBo), y considerando que las células HeLa y CaSki están infectadas con el papiloma virus y las células ViBo son negativas a éste, posiblemente su acción antiproliferativa es independiente de la presencia del virus. Por otro lado, los valores de las IC_{50} obtenidos son cercanos a los resultados reportados por Cai y colaboradores quienes obtuvieron una IC_{50} de 4.4 μ M para HeLa (Cai et al., 2002) y con los de Wang y colaboradores, quienes obtuvieron una de 4.5 μ M para la misma línea (Wang et al., 2001). Así mismo, el ciclo celular de HeLa no se vio afectado después del tratamiento, sin embargo, se observó un incremento significativo en la región subG1, lo cual se ajusta con los resultados publicados (Cai et al., 2002). A diferencia de lo que ocurre con el efecto antiproliferativo, el efecto en el ciclo celular inducido por el compuesto no fue parecido en las tres líneas de cáncer cervicouterino. Mientras que en HeLa y en ViBo no se observó efecto en el ciclo, la región G1 se vio disminuida en CaSki y se incrementó la región G2/M.

Se encontró que la Dioscina afecta la morfología de las células tumorales, después del tratamiento las células se observaron de menor tamaño y de forma redondeada, mientras que las no tratadas conservaron su forma poliédrica y con citoplasma extendido, como se aprecia en las células

HeLa y CaSki. Estos cambios morfológicos son característicos de la apoptosis (Strasser, 2000), un tipo de muerte celular programada en la que debido a que las células no liberan su contenido celular a los tejidos intersticiales de los alrededores y a que son rápidamente fagocitadas por macrófagos o células adyacentes normales, esencialmente no hay reacción inflamatoria (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003).

Las dos rutas apoptóticas descritas para mamíferos, convergen en la vía de ejecución terminal iniciada por la activación de la caspasa-3 y que resulta en la fragmentación de ADN, con la posterior degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos por receptores de células fagocíticas y finalmente la realización de la fagocitosis (Elmore, 2007). Los resultados del presente trabajo muestran que la Dioscina induce muerte apoptótica en las líneas tumorales de CaCu, ya que por medio de inmunolocalización se observó la presencia de la caspasa-3 activa y la fragmentación de ADN después del tratamiento.

La necrosis es un tipo de muerte celular, consecuencia de algunos tipos de estímulos externos a la célula, la cual sigue una muerte independiente de energía en la que la pérdida de la integridad de la membrana resulta en la liberación del contenido citoplasmático a los tejidos circundantes, enviando señales químicas con el eventual reclutamiento de células inflamatorias (Elmore, 2007). En el presente trabajo, se evaluó también el posible efecto necrótico inducido por el compuesto por medio de la cuantificación de la liberación de LDH. Tanto en las células CaSki como en las células ViBo esta prueba resultó ser significativa, siendo la citotoxicidad más alta la obtenida con las células CaSki. Con respecto a esto, es sabido que la apoptosis y la necrosis pueden ocurrir simultáneamente en una población celular dependiendo de factores tales como la intensidad y la duración del estímulo, el consumo del ATP existente y la disponibilidad de las caspasas (Zeiss, 2003).

En el tratamiento tradicional contra el cáncer, el sistema inmunológico se ve fuertemente afectado. Se sabe que tanto la radioterapia como la quimioterapia pueden causar profundos efectos colaterales de inmunosupresión (Penn, 1981; Ferreiro et al., 2003), incluso se ha observado que el

número de linfocitos en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento puede disminuir hasta en un 50% (Dillman et al., 1984). Por esta razón, se investigó el efecto de la Dioscina sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, no se observó un efecto citotóxico significativo después del tratamiento, además, los ensayos con carboxifluoresceína tampoco mostraron que el compuesto indujera una inhibición en la proliferación de los linfocitos. Esto abre las perspectivas para el posible uso terapéutico de esta saponina, ya que en el tratamiento tradicional del cáncer, las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune (Martínez, 2005).

Actualmente, la mayoría de las sustancias, ya sea usadas en aplicaciones clínicas o en experimentación, ejercen efectos adversos en células normales debido a su falta de especificidad (Neuzil et al., 2001). En este trabajo, la Dioscina demostró ejercer un efecto selectivo en lo que respecta a proliferación celular, puesto que mientras las células tumorales mostraron un decremento del 50% en el número celular, los linfocitos tratados con la misma concentración de Dioscina no disminuyeron su proliferación.

En la medicina tradicional china, la Dioscina forma parte de los extractos de dioscorea que ya son usados en el tratamiento de diversas enfermedades entre las que se encuentra el cáncer (Ren et al., 2008). En este estudio se mostró que la Dioscina induce efecto antiproliferativo y apoptótico en las tres líneas celulares de cáncer cervicouterino evaluadas, así como efecto en el ciclo celular de CaSki, positivas a VPH tipo 16 y no mostró efecto en la proliferación celular de linfocitos. Estas características sitúan a este compuesto como candidato para que se sigan investigando sus propiedades anticancerosas; y posiblemente, después de más pruebas, pueda plantearse seriamente su introducción en la medicina formal.

CONCLUSIONES

- La Dioscina induce una disminución de la proliferación celular de manera dosis-dependiente en las tres líneas de cáncer cervicouterino.
- El compuesto Dioscina tiene una IC_{50} de 2.01 μ M para HeLa y CaSki, mientras que para las células ViBo es de 2.88 μ M.
- La Dioscina afecta la morfología celular de las tres líneas de cáncer cervicouterino.
- El compuesto no tiene efecto en el ciclo celular de HeLa ni de ViBo pero aumenta la región SubG1 en HeLa y detiene las células CaSki en la fase G2/M, mismas en las que disminuye G1.
- El esteroide induce muerte apoptótica: hay activación de caspasa-3 activa, condensación de la cromatina y fragmentación de ADN en las tres líneas tumorales.
- La saponina induce muerte necrótica en 4.8% en ViBo, 16.8% en CaSki y 6.1% en HeLa.
- El esteroide no es citotóxico para los linfocitos.
- La Dioscina no afecta el porcentaje de proliferación de linfocitos

REFERENCIAS

- ALBERTS, B et al. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona: Omega. pp. 918.
- CAI, J. et al. 2002. Apoptosis Induced by Dioscin in HeLa Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 25:193-196.
- DILLMAN, R. et al. 1984. Immunoincompetence in Cancer Patients: Assessment by In Vitro Stimulation Tests and Quantification of Lymphocyte Subpopulations. *Cancer*. 7: 1484-1491.
- DOORBAR, J. 2006. Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *Clinical Science* 110:525–541.
- DUBIN, M. y A. STOPPANI. 2000. Muerte Celular Programada y Apoptosis. *Medicina*. 60:375-386.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35:495–516.
- FERREIRO, J. et al. 2003. Quimioterapia: Efectos Secundarios. *Gaceta Médica de Bilbao*. 100: 69-74.
- GOODLETT, C. y K. HORN. 2001. Mechanisms of Alcohol-induced Damage to the Developing Nervous System. *Alcohol Research & Health*. 25:175–184.
- HENGARTNER, M. 2000. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*. 407:770-776.
- HUO, R. et al. 2004. Diosgenin Induces Apoptosis in HeLa Cells Via Activation of Caspase Pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25:1077-1082.
- JORDAN, J. 2003. Apoptosis: Muerte Celular Programada. *OFFARM*. 22:100-106.
- JIN, Z. y W. El-Deiry. 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*. 4:139-163.
- KARP, G. 1998. *Biología Celular y Molecular: Conceptos y Experimentos*. México: McGraw-Hill Interamericana. pp. 679 y 712.

- KASKIW, M. et al. 2008. Synthesis and Cytotoxic Activity of Diosgenyl Saponin Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16:3209–3217.
- KASKIW, M. et al. 2009. Structural Analogues of Diosgenyl Saponins: Synthesis and Anticancer Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17:7670–7679.
- KRAMMER, P. 2000. CD95's Deadly Mission in the Immune System. *Nature*. 407:789-795.
- KRAMMER, P. et al. 2007. Life and Death in Peripheral T Cells. *Nature Reviews Immunology*. 7:532-542.
- KUKHTA, V. et al. 2003. Molecular Mechanisms of Apoptosis. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. 75:5-9.
- KUROSAKA, K. et al. 2003. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *The Journal of Immunology*. 171:4672-4679.
- LI, K. et al. 2005. Characterization of the Pharmacokinetics of Dioscin in Rat. *Steroids*. 70:525–530.
- LIE, J. et al. 2005. Electrochemical Study of Breast Cancer Cells MCF-7 and Its Application in Evaluating the Effect of Diosgenin. *Analytical Sciences*. 21:561-564.
- LIU, M. et al. 2004. The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27:1059-1065.
- LÓPEZ, A. y L. LIZANO. 2006. Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no Termina. *Cancerología*. 1:31-55.
- MAN, S. et al. 2010. Chemical Study and Medical Application of Saponins as Anti-cancer Agents. *Fitoterapia*. 81:703-714.
- MARTÍNEZ, C. 2005. Modulación de la Respuesta Inmune. Tendencias Vigentes. *Medisan*. 9:3-5.
- MONTUENGA, L. 2009. *Técnicas en Histología y Biología Celular*. España: Elsevier. pp. 319.

- MURRAY, P. 2009. *Microbiología Médica*. España: Elsevier. pp. 502.
- NEUZIL, J. et al. 2001. Selective Cancer Cell Killing By A-Tocopheryl Succinate. *British Journal of Cancer*. 84:87–89.
- PENN, I. 1981. Depressed Immunity and the Development of Cancer. *Clinical & Experimental Immunology*. 46: 459-474.
- PERALTA, O. et al. 1997. Regulación del Ciclo Celular y Desarrollo de Cáncer: Perspectivas Terapéuticas. *Salud Pública de México*. 39:451-462.
- RAO, A. y M. SUNG. 1995. Saponins as Anticarcinogens. *The Journal of Nutrition*. 125: 717S-724S.
- REN, H. et al. 2008. The Disposition and Pharmacokinetics of Dioscorea Nipponica Makino Extract in Rats. *African Journal of Biotechnology*. 22: 4015-4018.
- SAVILL, J. y V. FADOK. 2000. Corpse Clearance Defines the Meaning of Cell Death. *Nature*. 407:784-788.
- SEN, S. y M. D'Incalci. 1992. Apoptosis: Biochemical Events and Relevance to Cancer Chemotherapy. *FEBS Letters*. 307:122-127.
- SERMAN, F. 2002. Cancer Cervicouterino: Epidemiología, Historia Natural y Rol del Virus Papiloma Humano. Perspectivas en Prevención y Tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 67:318-323.
- STRASSER, A. et al. 2000. Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry*. 69:217–45.
- TROUILLAS, P. et al. 2005. Structure–Function Relationship for Saponin Effects on Cell Cycle Arrest and Apoptosis in the Human 1547 Osteosarcoma Cells: a Molecular Modelling Approach of Natural Molecules Structurally Close to Diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13:1141–1149.
- TUBIANA, M. 1971. The Kinetics of Tumour Cell Proliferation and Radiotherapy. *British Journal of Radiology*. 44:325-347.

- WANG, Z. et al. 2001. Effects of Two Saponins Extracted from the Polygonatum Zanlanscianense Pamp on the Human Leukemia (HL-60) Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 24:159—162.
- WANG, G. et al. 2006. Methyl Protodioscin Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HepG2 Liver Cancer Cells. *Cancer Letters*. 241:102–109.
- WANG, H. et al. 2009. Synthesis and Cytotoxicities of Icogenin Analogues with Disaccharide Residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19:2796–2800
- YAN, L. et al. 2009. In Vitro and In Vivo Anticancer Activity of Steroid Saponins of *Paris polyphylla* var. yunnanensis. *Experimental Oncology*. 31:27-32.
- ZEISS, C. 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology*. 40:481-495.
- ZHU, S. et al. 2006. Synthesis and Cytotoxicities of Dioscin Derivatives with Decorated Chacotriosyl Residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16: 5629–5632.

APÉNDICE

Reactivos

Medio de cultivo

RPMI-1640 (Gibco BRL, EUA.)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma Chem. USA)	2 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm. Se almacena a 4 °C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino o con suero de ternera neonato, en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm.

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 Chem. USA)	0.4 g
NaCl (Sigma Chem. USA)	8 g
KCl (Sigma Chem. USA)	0.4 g
Tris (Sigma Chem. USA)	3.04 g

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

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de magnesio (Sigma Chem. USA)	0.10 g
Cloruro de calcio (Sigma Chem. USA)	0.10 g
Cloruro de sodio (Sigma Chem. USA)	8.00 g
Cloruro de potasio (Sigma Chem. USA)	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma Chem. USA)	2.16 g
Fosfato diácido de potasio (Sigma Chem. USA)	0.20 g

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

PBS para citometría de flujo (FACSFlow)

Agua destilada	1 l
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2.16 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
EDTA	0.8 g

Solución cristal violeta (0.1 %)

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

NaOH (Sigma Chem. USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma Chem. USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma Chem. USA)	1 g

Colorante Cristal Violeta

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

Desactivación del suero

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

Glutaraldehído

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño María sin que la temperatura rebase los 60°C.

Se almacena a 4°C.