



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN**  
**EXPERIMENTAL ZARAGOZA**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**Efecto antitumoral de la saponina 26-OH-Sa-Glu en células  
provenientes de cáncer cervicouterino.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**Canela Pérez Israel Felipe.**

**Director de Tesis: 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.

*En el campo de la Biología, nada tiene sentido si no es a la luz de la evolución y a lo largo de este trabajo de investigación puedo concluir que el Homo sapiens es la única especie que se resiste a la selección natural.*

*“Por ahora resulta muy fácil subestimar a las células. Hemos sabido de ellas durante tanto tiempo en nuestra vida que hemos dejado de estar conscientes de lo extraordinarias que son en realidad” Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James Watson (Molecular Biology of Cell, 1983),*

*Dedicado a Charles Darwin, Alfred Russel Wallace, Theodosius Dobzhanski, Jean Baptiste Lamarck, Gregor Mendel, Carolus Linnaeus, Robert Hooke, Anton van Lewwenhoek, Theodor Schwann, Matthias Schleiden, Rudolf Virchow, Francesco Redi, Louis Pasteur, Stanley Miller, Alexander Oparin, John Haldane, Harold Urey, Linus Pauling, Rosalind Franklin, James Watson, Francis Crick, George Gey, Erwin Schrödinger.....*

*Dedicado a mis padres por su apoyo durante mis estudios, y en especial mi mamá por su inquebrantable cuidado y atención durante mi infancia, a mi hermana por sus gastos invertidos en mi progreso académico, a mis sobrinos, a mis tíos Paco y Mari, así como a mi prima Lizzie, a todos mis familiares, a Gaby por sus consejos y apoyo incondicional, a mis compañeros de laboratorio y licenciatura en general, a todos mis profesores por compartir sus conocimientos, a todos mis amigos y aquellas personas que han dedicado un tiempo de su vida para hacer de mí un mejor ser humano.*

## *Agradecimientos*

*Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente durante mi formación académica, así como todos sus consejos y tiempo para encaminarme en el campo científico.*

*Al M. en C. Hugo López Muñoz, por dedicarme parte de su tiempo, consejos y pláticas interesantes.*

*Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por ser muy estricto, platicar conmigo y sobre todo por sus consejos durante todo este tiempo.*

*A la Dra. María Luisa Escobar, por explicarme y enseñarme sus conocimientos en laboratorio.*

*A la M. en C. Rosalva Rangel Corona, por sus revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis, así como por compartir sus conocimientos durante mi licenciatura.*

*Al M. en C. Edgar Ledesma Martínez por sus revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis.*

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

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

*Ésta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto PAPIIME: PE 206812 y del proyecto CONACYT 84380*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	-1-
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	-2-
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	-3-
<b>La célula</b> .....	-3-
<b>Ciclo celular</b> .....	-4-
Interfase.....	-5-
Mitosis.....	-5-
<b>Muerte celular</b> .....	-6-
Necrosis.....	-8-
Apoptosis.....	-8-
Caspasa 3.....	-11-
<b>El cáncer</b> .....	-12-
<b>El cáncer cervicouterino (CaCu)</b> .....	-14-
<b>Terapia del cáncer</b> .....	-18-
Cirugía.....	-18-
Radiación.....	-18-
Quimioterapia.....	-19-
Vacuna.....	-19-
<b>Esteroides</b> .....	-19-
Saponinas.....	-20-
Sarsasapogenina.....	-20-
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	-23-
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	-24-
<b>HIPÓTESIS</b> .....	-25-
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	-26-
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	-26-
<b>MÉTODO</b> .....	-27-
<b>RESULTADOS</b> .....	-33-
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	-44-
<b>CONCLUSIONES</b> .....	-47-
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	-48-
<b>REFERENCIAS</b> .....	-49-
<b>APÉNDICE</b> .....	-59-

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial, precedido por el cáncer de mama. Con respecto a su tasa de mortalidad el CaCU, muestra una clara distribución geográfica mayormente en los estados del sur y sureste de México. (INEGI, 2011). Actualmente los compuestos que se aplican en las terapias contra el cáncer resultan ser efectivos cuando el tumor está en una fase temprana de desarrollo, sin embargo resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad. Esto ha generado un gran interés en aislar compuestos de origen vegetal con actividad antitumoral, como es el caso de las saponinas, entre las cuales se encuentra el compuesto (25S) 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -espirostano (Sarsasaponina) de la cual se tiene reportado actividad antitumoral en células de carcinoma de hígado HepG2 (Ni et al., 2008), así como disminución en la proliferación de células de CaCUHeLa (King et al., 2008). También, se ha observado que la modificación en la estructura de las saponinas puede potencializar sus efectos biológicos. Así en el presente estudio se evaluó la actividad antitumoral del compuesto derivado de la Sarsasapogenina,  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (25S)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-22-oxo-5 $\beta$ -colestano-26-ilo (26-OH-Sa-Glu), obteniendo un efecto antiproliferativo en las líneas tumorales de CaCUHeLa, CaSki y ViBo, con una CI<sub>50</sub> de 15.9, 14.12 y 14.0  $\mu$ g/ml respectivamente. De igual manera el 26-OH-Sa-Glu indujo en estas líneas tumorales un cambio morfológico resaltando la compactación celular y la forma esférica. Sin embargo, el compuesto 26-OH-Sa-Glu no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas no tumorales a una concentración de 15.9  $\mu$ g/ml, indicando una acción antiproliferativa de acción selectiva. Por otro lado, la nula detección de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales y linfocitos no tumorales tratados con el 26-OH-Sa-Glu, sugiere que este esteroide no induce muerte por necrosis ni en células tumorales ni en células no tumorales. No obstante estos resultados, el 26-OH-Sa-Glu indujo en las células HeLa, CaSki y ViBo un incremento en la expresión de la caspasa 3 activa en un rango de 24 a 45 %, y fragmentación de DNA en un 4 al 13 %, sugiriendo que este compuesto induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis. Estos resultados generan una fuerte relevancia, ya que los compuestos que se aplican hoy en día al tratamiento del cáncer son citotóxicos (necróticos), poco selectivos y con efectos secundarios significativos. La actividad antiproliferativa del 26-OH-Sa-Glu en células tumorales sin afectar a las células no tumorales así como el de inducir a las células tumorales a una muerte apoptótica, permite proponer a este compuesto como un digno candidato para ser evaluado en modelos in vivo con la intención de encontrar un compuesto con actividad antitumoral de acción selectiva y con efectos secundarios poco significativos.

## INTRODUCCIÓN

Cada año surgen en todo el mundo aproximadamente medio millón de casos nuevos de cáncer cervicouterino, enfermedad que puede llegar a ocasionar la muerte de mujeres a consecuencia de esta neoplasia. En México el cáncer cervicouterino (CaCU) es una de las principales causas de muerte en mujeres, generando una mayor tasa de mortalidad en los estados de Chiapas, Campeche, Veracruz, Quintana Roo, Tamaulipas, Morelos, Yucatán, Guerrero, Nayarit y Oaxaca (INEGI, 2011). México presenta un cúmulo de factores de riesgo para el CaCU, la prevalencia del virus de papiloma humano (VPH) afecta hasta el 15% de las mujeres mayores de 35 años de edad (Alonso et al., 2005). Entre los factores de riesgo que se relacionan con el CaCU son: infección con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, el inicio temprano de la vida sexual, el uso de anticonceptivos hormonales, y el tabaquismo (Tirado, et al., 2005). En los últimos años se ha logrado una marcada declinación en la mortalidad gracias a la prueba de Papanicolaou (Serman, 2002). Los tratamientos que se utilizan actualmente como son la cirugía, radioterapia, quimioterapia y vacuna para tratar el cáncer cervicouterino, han resultado tener buenos resultados, sin embargo el efecto citotóxico generado en las quimioterapias ocasionan efectos secundarios en la salud de las pacientes, reduciendo la calidad de vida de éstas, ocasionado por el daño realizado a las células normales. Debido a esta razón, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral, continúa. Esta búsqueda ha generado un gran interés en las saponinas esteroidales como la Sarsasapogenina, aislada de la planta *Yucca Filifera*, a la que se le atribuye un efecto antidiabético y de mejora de la memoria (Attele et al., 2002), actividad inductora de apoptosis en células HepG2 (Wenna et al., 2007), así como la de inhibir la proliferación de células de osteosarcoma humano 1547 (Trouillas et al., 2005). De igual manera el derivado de la sarsasapogenina TAIll induce autofagia seguida de apoptosis en células HeLa (King et al., 2008), indicando que sus análogos podrían mantener la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis. En este trabajo se evaluó el derivado de la Sarsasapogenina llamado 26-OH-Sa-Glu, determinando su actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis en células de CaCU y células no tumorales y saber si existe un efecto selectivo.



## MARCO TEÓRICO

### La célula

La célula es la unidad estructural y funcional de todos los seres vivos (Nelson et al., 2009), cada organismo o bien es una única célula o está formado por células (Becker et al., 2007). El botánico Mathias Schleiden (1838) y el zoólogo Theodor Schwann (1839) fueron los primeros en señalar que las plantas y animales se componen de células, más tarde Rudolph Virchow (1855) propuso que se forman nuevas células a partir de células preexistentes (Solomon et al., 2001). Todas las células comparten ciertas características estructurales ( Figura 1).

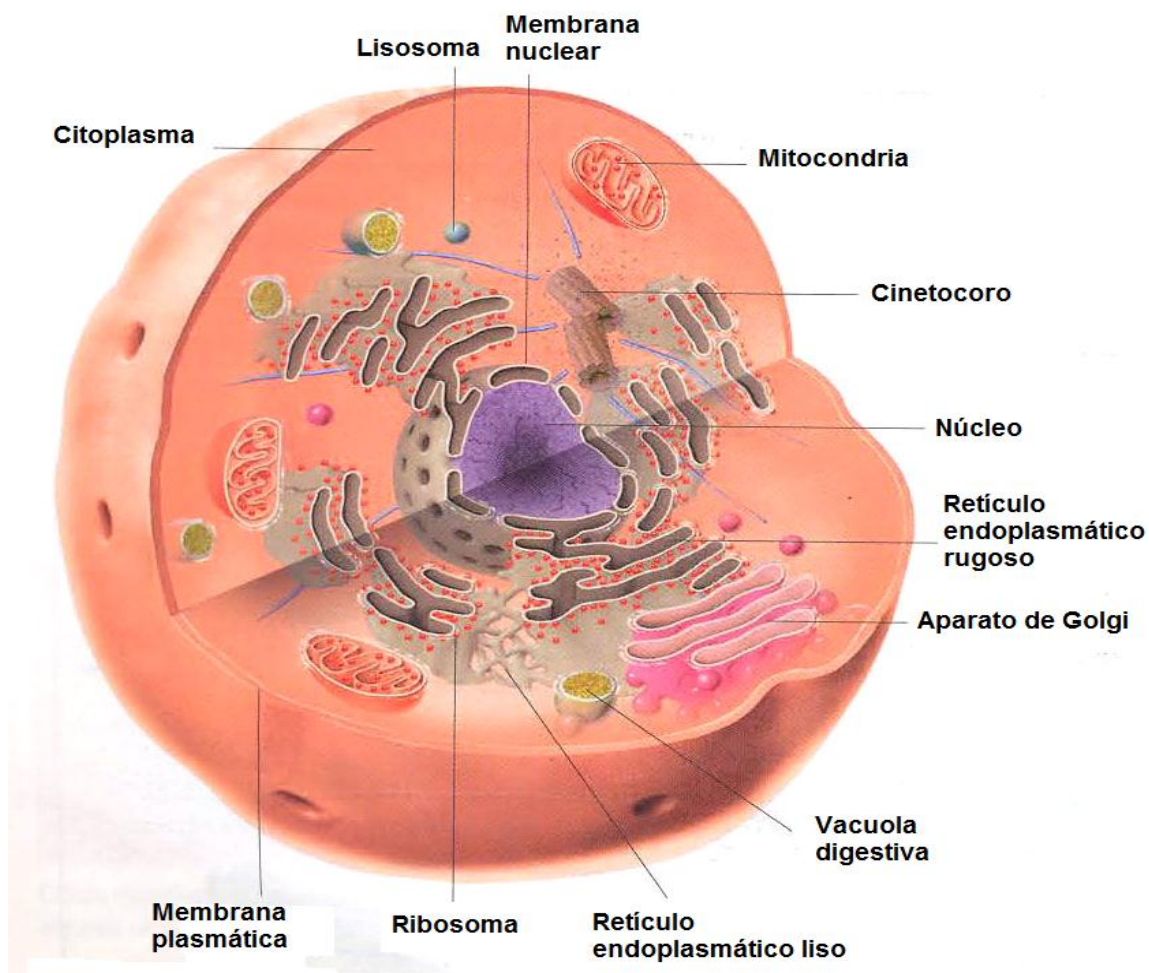


Figura 1. Imagen de una célula animal donde se muestra su interior y cada uno de sus organelos (Tomada y modificada de <http://fyqicod.blogspot.mx/2010/09/celulas-3-esomaterial-descargable.html>)

Las células al igual que otros organismos, se generan por reproducción, un proceso en el cual el contenido de una célula se distribuye dentro de dos células hijas. Después de la división, el material genético se duplica con éxito y cada célula hija comparte la misma información genética. Las células obtienen y utilizan energía, llevan a cabo diferentes reacciones químicas, reaccionan a estímulos, realizan numerosas actividades mecánicas y poseen un programa genético y los medios para usarlo (Karp, 2006). Todas las células tienen un ciclo de vida en el cual crecen, se reproducen y en algún momento tienen que morir, a este proceso se le denomina ciclo celular.

### **Ciclo celular**

Las células al proliferar siguen una serie de etapas en las que se llevan a cabo los procesos necesarios para dar lugar a dos células hijas. Estas etapas deben completarse en orden, de un modo altamente regulado y constituyen lo que se denomina ciclo celular (Villaverde, 2006).

El ciclo celular consta de dos etapas principales. La primera es la interfase, el periodo entre las divisiones celulares en el que la célula crece, se desarrolla y se prepara para su división. La segunda es la fase M (fase mitótica), el periodo de división celular activa. La fase M incluye la mitosis, es decir, el proceso de división nuclear que se divide en profase, metafase, anafase, telofase y la citocinesis o división citoplasmática (Pierce, 2005).

La interfase se divide en tres fases, la primera es G1 donde la célula crece, la segunda es la fase S (síntesis), el ADN se replica y produce copias para las dos células hijas. En la fase G2, se sintetizan nuevas proteínas y la célula duplica aproximadamente su tamaño. Las células que están en la fase G1, antes de la replicación de ADN, pueden entrar en un estado de reposo denominado G0, característico de las células no proliferantes como las neuronas o en ausencia de nutrientes así como al predominar las señales antimitógenas (Vermeulen et al., 2003). Cuando recibe nuevas señales mitógenas, normalmente aportadas por moléculas de tipo proteico denominadas factores de crecimiento, la célula puede reanudar el ciclo celular y salir de G0, completando la fase G1, la replicación del ADN y la mitosis (Lozano et al., 2000) El paso a través del ciclo celular se regula por las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) (figura 2) que se activan al interactuar con unas pequeñas proteínas llamadas ciclinas, actuando en puntos específicos del ciclo, fosforilando proteínas clave y modulando sus actividades (Nelson et al., 2009).

## **Interfase**

**G1:** El punto de control G1 controla la entrada en la fase S, asegurándose de que las células son lo suficientemente grandes para justificar una nueva ronda de síntesis de ADN, cualquier daño ocasionado al ADN será reparado, asegurando que las condiciones sean favorables para la división celular mitótica (Elledge, 1996).

**S:** Se caracteriza por una intensa actividad bioquímica en el núcleo celular, que es responsable de duplicar el material genético. La fosforilación de la proteína Rb es mediada por el complejo Cdk4/ciclina D, es indispensable para la iniciación de la fase S (Laguna et al., 2009).

**G2:** La fase G2 es la preparación para la mitosis. Normalmente, esta fase se desencadena y completa siempre tras la fase S, lo que explica que la dotación cromosómica de las células somáticas sea diploide (Lozano et al., 2000). En esta fase ocurre un aumento en la síntesis de proteínas, conforme se realizan los pasos finales de la preparación de la célula para la división. El fin de la fase G2 es marcado por el comienzo de la mitosis (Solomon et al., 2001).

## **Mitosis**

La mitosis es un mecanismo de la división nuclear que ocurre en las células somáticas, siendo la base del aumento del tamaño durante el crecimiento, la reposición de células dañadas y la reparación de los tejidos (Starr et al., 2008). Cuando comienza la mitosis en la profase, la envoltura nuclear se retrae hacia el retículo endoplasmático en la mayoría de las células de los eucariontes superiores y las membranas de Golgi se fragmentan en vesículas. Durante el período de metafase de la mitosis en cada centrómero se forma un complejo multiprotéico, el cinetocoro. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se asocian a continuación con microtúbulos que vienen de los polos opuestos del huso. Durante el período de anafase de la mitosis, las cromátidas hermanas se separan. Una vez que la separación de los cromosomas es completada, el huso mitótico se desarma y los cromosomas se descondensan durante la telofase. La envoltura nuclear se forma de nuevo alrededor de los cromosomas separados a medida que se descondensan. La división física del citoplasma, llamada citocinesis, produce dos células hijas (Lodish et al., 2005; Alberts et al., 2002).

La alteración del ciclo celular puede causar que éste se detenga o que se active el mecanismo que induce a la célula a morir, por ejemplo, un daño irreparable en el ADN, induce a las células a una muerte por apoptosis.

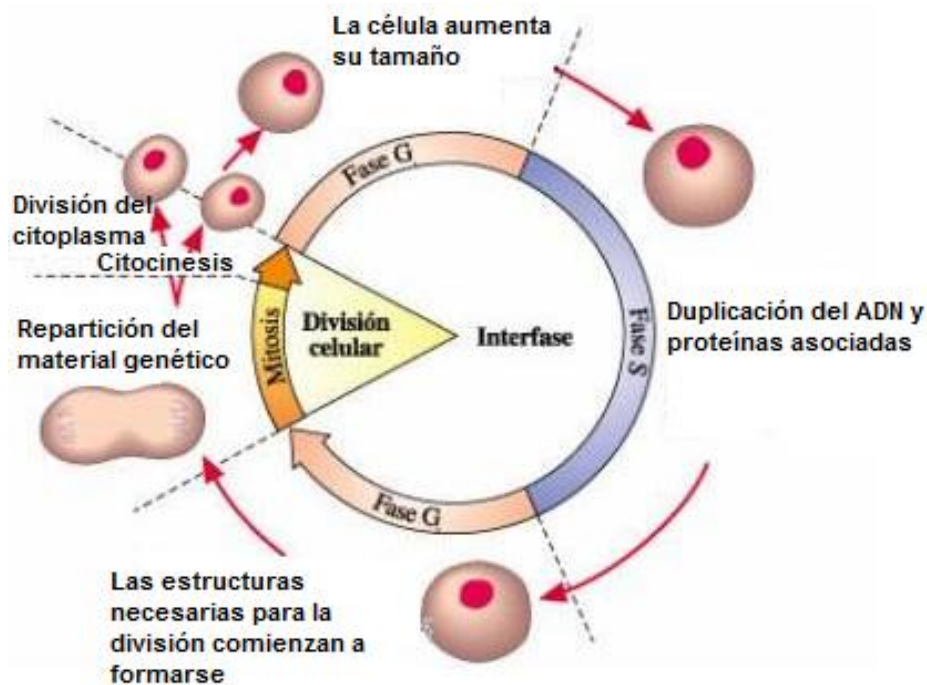


Figura 2. Fases del ciclo celular. (Tomada y modificada de [http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celular\\_Ciclo.html](http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celular_Ciclo.html)).

## Muerte celular

La muerte celular fisiológica fue descrita por primera vez en 1858 por Virchow, él describió los procesos de muerte celular observados en el microscopio, definiéndolos como degeneración, mortificación y necrosis. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Currie establecieron el término apoptosis, que evoca a la caída de las hojas de los árboles en la estación otoñal o la caída de los pétalos de una flor. Entre los tipos de muerte más estudiados se encuentran la apoptosis, la necrosis y la autofagia.(Kerr et al., 1972).

El término necrosis reúne los procesos desordenados y no programados genéticamente, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. En ella tiene lugar la pérdida de la regulación de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular y en organismos superiores, desencadenan un proceso inflamatorio (Majno et al., 1995).

La muerte celular por apoptosis también se conoce como muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis parece ser un proceso activo que juega un papel en el desarrollo de órganos y tejidos (Lockshin et al., 2001). La apoptosis es por tanto 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). Existen diferentes características comparativas, entre la necrosis y apoptosis (Figura 3). Los dos modos de muerte celular, apoptosis y la necrosis difieren fundamentalmente en su morfología, bioquímica y biología (Majno et al., 1995).

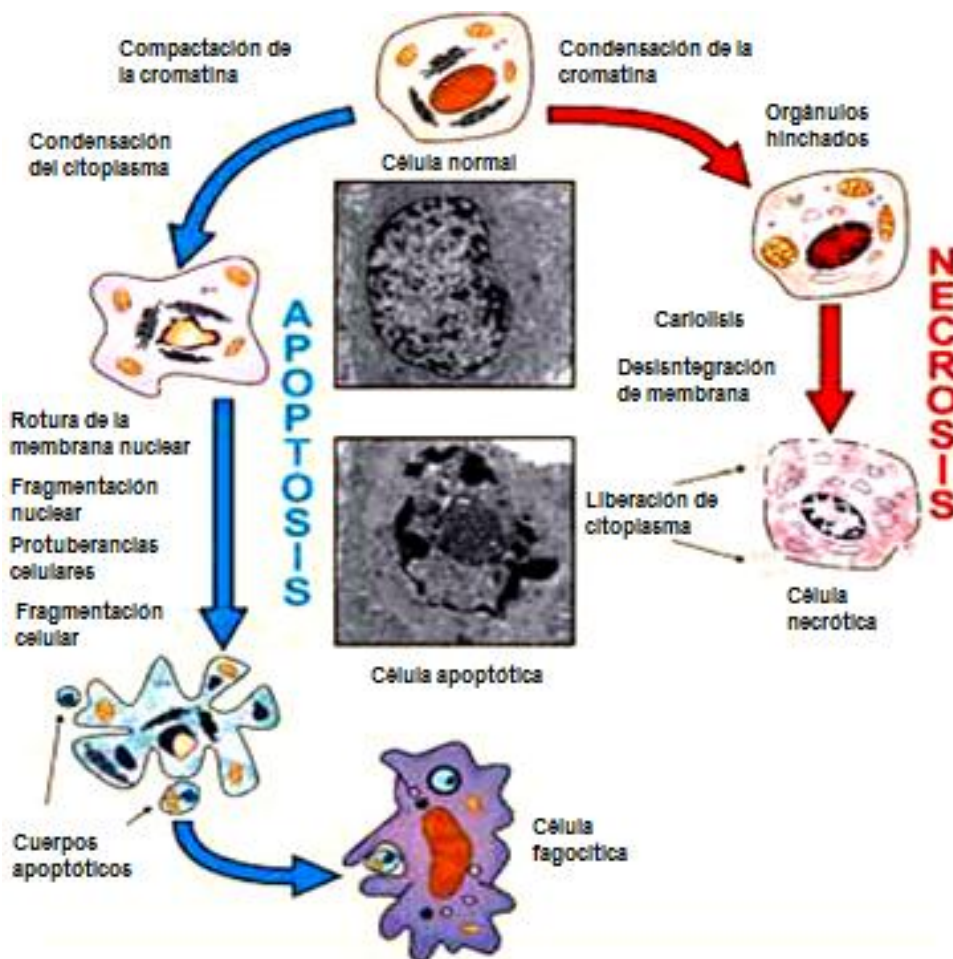


Figura 3. Fases de la muerte celular por apoptosis y necrosis (Tomado y modificado de Iracheta, 2007)

## **Necrosis**

La necrosis es un tipo de muerte celular que se asocia con la pérdida temprana en la integridad de la membrana plasmática. También llamada muerte celular patológica que ocurre cuando las células son expuestas a una variación extrema de las condiciones fisiológicas que conducen a la pérdida en la integridad de la membrana celular que puede iniciarse con un daño en la membrana plasmática conocido como necrosis temprana (Majno et al., 1995). La necrosis tiene lugar durante un daño provocado por hipoxia severa, hipertermia, infección por virus líticos, exposición a toxinas y agentes químicos (Socarrás, 2001). Es característico de las células necróticas, un aumento de tamaño y finalmente explotan, liberando el contenido intracelular, causando inflamación lo que se puede considerar como una necrosis tardía (Lodish et al., 2005). Durante este proceso se activan varios componentes celulares del sistema inmune, como los macrófagos y los neutrófilos que liberan  $H_2O_2$  dañando a cualquier célula con la que entran en contacto, ocasionando la destrucción de células de tejido circundante.

## **Apoptosis**

La muerte celular programada es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis, así como su renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia. Esta muerte es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta (De la Rosa et al., 2000), la regulación de una respuesta inmunológica (Abbas et al., 1997), así como la muerte natural de las células diferenciadas en el final de su vida útil (Lockshin et al., 2001). La apoptosis es un tipo de muerte celular ordenada y programada genéticamente, en la cual la célula responde a ciertas señales iniciando una respuesta normal que conduce a su propia muerte, que se caracteriza por la compactación total de la célula y su núcleo, la disección ordenada de la cromatina en pedazos por la acción de una endonucleasa especial que separa ADN y el rápido engullimiento de la célula por fagocitosis (Karp, 1996). Muchos de los mecanismos moleculares de la apoptosis se han conservado a lo largo de la escala evolutiva desde nematodos hasta mamíferos (Vaux et al., 1992).

Existen diferentes mecanismos de control de muerte por apoptosis como son la vía intrínseca y extrínseca (Figura 4). Existe una familia de diversas proteínas que actúan regulando el proceso de apoptosis en seres humanos. Miembros de la familia Bcl-2 contienen distintos dominios estructurales como BH1, BH2, BH3 y BH4 que corresponden a segmentos helicoidales, unos actúan como anti-

apoptóticos como Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 y otros funcionan como proapoptóticos los cuales son Bax, Bad, Bak, Blk y Bid (Schinoni et al., 2006). El mecanismo central de la maquinaria de muerte en cualquier célula está constituido por una familia de proteasas, a las que se han denominado caspasas (Alnemri et al., 1996), independientemente de la naturaleza del estímulo inductor de muerte, el proceso siempre resulta en la activación de las caspasas que conduce a la fragmentación del material genético de forma rápida y controlada, sin causar daños en el entorno celular.

### **Vía extrínseca**

La vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores en la membrana celular en respuesta a señales extracelulares (Cuello et al., 2006). En esta vía, los receptores como TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 o DR-5, interactúan con sus respectivos ligandos. Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas. Finalmente, la caspasa 8 puede activar a la caspasa 3, iniciándose así el programa de muerte celular (Shen et al., 2006), o bien puede escindir a Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2. Bid se traslada del citoplasma a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma (Velázquez et al., 2004).

### **Vía intrínseca**

Una señal determinada de muerte, como agentes genotóxicos utilizados en quimioterapia y radiación, determinan una respuesta de estrés celular que induce apoptosis a través de esta vía (Cuello et al., 2006), donde intervienen numerosas proteínas proapoptóticas, tales como citocromo C, AIF y SMAC/DIABLO (Porter et al., 2006). El citocromo c liberado se une a Apaf-1 para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa 9. La caspasa 9 activa a su vez a las procaspasas 3 y 7 (Velázquez et al., 2004), que son las responsables de la escisión de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Gogvadze et al., 2006).

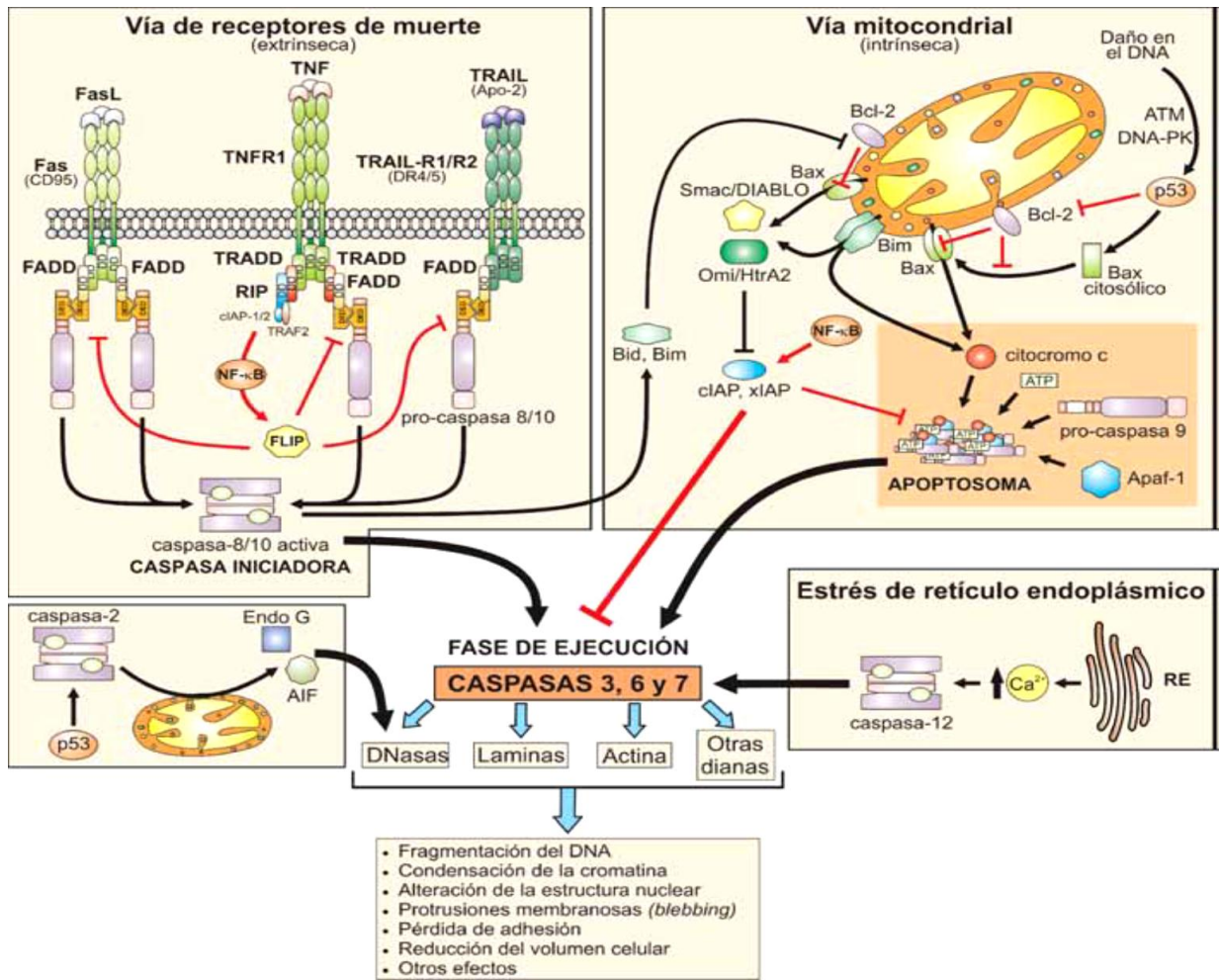


Figura 4. Rutas de muerte por apoptosis, se aprecia la ruta intrínseca y extrínseca (Iracheta, 2007).

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que una variedad de agentes anticancerígenos, inducen apoptosis en células tumorales (Kaufmann y Earnshaw, 2000). Existen diferentes drogas inductoras de apoptosis utilizadas como agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, doxorubicina, pleomycina, cyticina, arabinosida, metotrexato, vincristina (Deigner et al., 1999).

Varias alteraciones que inhiben tanto el receptor de muerte y vías mitocondriales se han identificado en diversos tipos de cáncer como leucemia en células T (Friesen et al., 1996), células de hepatoma (Müller et al., 1997), células de neuroblastoma, meduloblastoma y glioblastoma (Fulda et al., 1998). La inhibición de la apoptosis en células cancerígenas ha conducido a una mejor comprensión de las vías de apoptosis, también ha llevado al desarrollo de nuevas terapias dirigidas directamente a la maquinaria apoptótica (Kaufmann y Gores, 2000).



### Caspasa 3

La caspasa 3 (Figura 5) es una proteasa que se encuentra en el citoplasma y participa en la cascada de activación de las caspasas responsables de la ejecución de la apoptosis. En el inicio de la apoptosis se escinde proteolíticamente poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en un enlace '216-Asp-|-Gly-217 '. Escinde y activa a las caspasas 6, 7 y 9. Pertenece a la familia C14A peptidasa, es un heterotetrámero que consta de dos heterodímeros dispuestos antiparalelamente, cada uno formado por unos 17 kDa (P17) y unos 12 kDa (P12) (Cell signaling Technology, 2012).

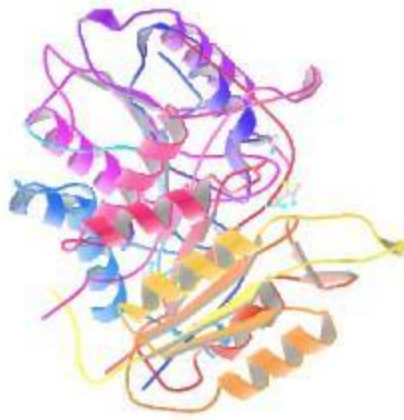


Figura 5. Estructura tridimensional de la enzima Caspasa 3 (Tomado y modificado de <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=4672&showAllSites=true>.)

## Cáncer

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas e importantes características (Figura 6a). Éstas incluyen la pérdida parcial de la diferenciación, la autosuficiencia en las señales de crecimiento, el potencial de replicación sin límites y la disminución de sensibilidad a los fármacos (Hanahan et al., 2000). La progresión del cáncer es a menudo concebida y presentada como la transformación de una célula a través del tiempo a partir de un fenotipo benigno en una entidad invasiva. Las células neoplásicas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, proceso llamado metástasis (National Cancer Institute, 2012).

Las etapas de esta transformación están marcadas por una gran variedad de puntos de control genético e histopatológico, incluyendo la amplificación o la inactivación de genes específicos, la expresión de marcadores de tumores, alteraciones en el fenotipo de la célula y la arquitectura del tejido (Kumar et al., 2009). La carcinogénesis es un proceso multifactorial en el que hay una interacción entre factores hereditarios, genéticos y ambientales que conducen al crecimiento celular descontrolado (Algranti et al., 2010). El daño del ADN y las mutaciones posteriores son los eventos clave en la iniciación del proceso de la carcinogénesis, que en última instancia conduce a la enfermedad (Preston et al., 2005). Muller fue el primero en señalar que "el efecto de los rayos X, de vez en cuando producen cáncer, lo que se asocia a su acción en la producción de mutación" (Muller, 1927). El medio hipóxico activa una cascada señalizadora que induce o reprime la transcripción de muchos genes implicados en la angiogénesis, la metástasis, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia celular (Boticario et al., 2010).

Los protooncogenes son los genes celulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación. La ocurrencia de mutaciones dominantes en éstos puede resultar en variantes alteradas u oncogenes que codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que mantienen a la célula estimulada para pasar de una mitosis a otra. En los tumores humanos hay varios oncogenes celulares amplificados (Menéndez et al., 1999), como son RET (GDNF-R), ERBB1 (EGF-R), ERBB2 (HER2), PDGF-Rb, SRC, K-RAS, N-RAS, H-RAS, PRAD1/cyclin D1, C-MYC, BCL2, ABL, MDM2 (Kopnin, 1999). Es un hecho probado que independientemente de la existencia de los oncogenes y de su interrelación con los factores carcinógenos ya señalados, nuestro organismo dispone de un complicado sistema de células y moléculas que garantizan la vigilancia inmunológica. Este sistema inmune puede reconocer y destruir las

células malignas que se forman constantemente (Grossman et al., 1986). Sin embargo la evasión del sistema inmunológico por los tumores, se debe a que las células tumorales expresan con frecuencia concentraciones bajas de moléculas MHC clase I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I) y esto ocasiona que los linfocitos Tc reconocen solo al antígeno relacionado con el MHC clase I (Goldsby et al., 2004). Del mismo modo se sabe que para que una terapia inmunológica tenga éxito, es necesario disminuir la masa tumoral, mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia (Roitt et al., 2003)

En el proceso de metástasis a medida que la lámina basal se desintegra, las células tumorales invaden el tejido conjuntivo que posteriormente ingresaran al sistema vascular o sistema linfático, pero menos de 1 de cada 10.000 células que escapan del tumor primario sobreviven para colonizar otro tejido y formar un tumor metastásico secundario. Además de escapar del tumor original y entrar en la sangre, las células que sembrarán nuevos tumores deben adherirse a una célula endotelial que reviste un capilar y migrar a través de ella hacia el tejido subyacente (Lodish et al., 2005). (Figura 6b)

Se han descrito más de 100 formas distintas de cáncer. Los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90% de los cánceres y que se generan en los epitelios. Entre ellos los más comunes son los que afectan al pulmón, al intestino grueso, mama y cuello uterino (Boticario, 2005). En mujeres de edad madura hasta la vejez una de las principales causas de muerte es el cáncer y dentro de estos tumores malignos, se destacan el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino (INEGI, 2011).

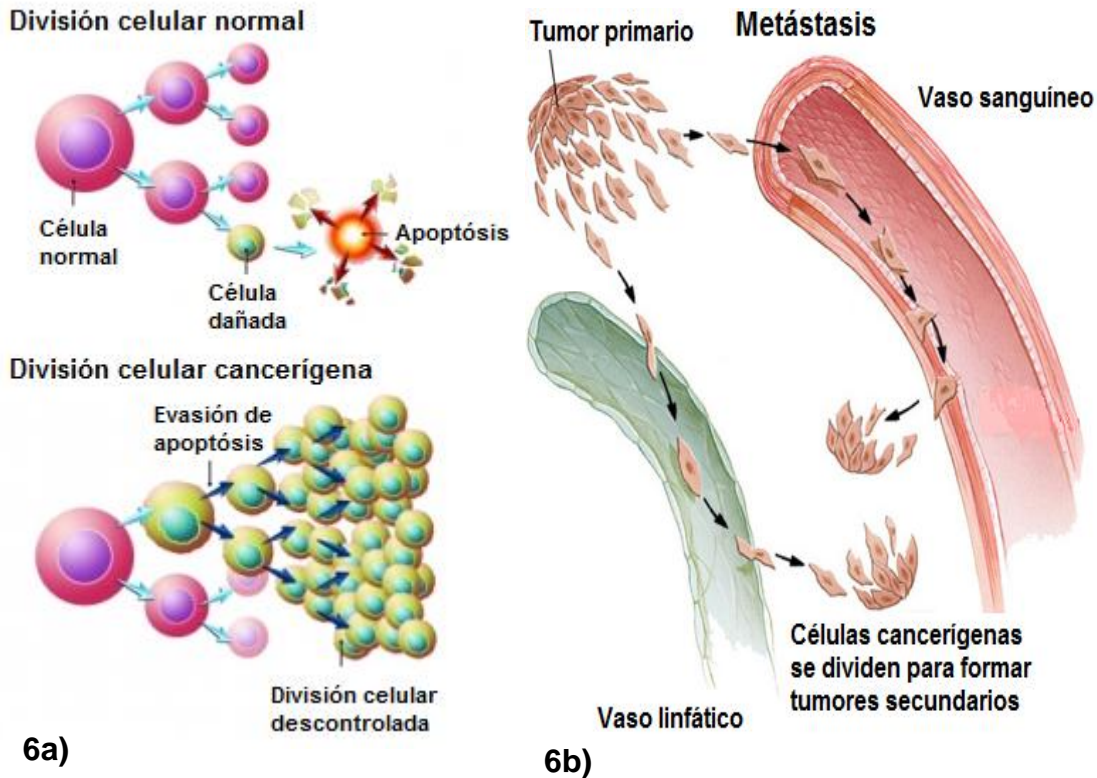


Figura 6a. Comparación en la división celular entre una célula cancerígena y una no cancerígena. (Tomada y modificada de <http://www.aurorahealthcare.org/yourhealth/healthgate/getcontent.asp?URLhealthgate=%22103616.html%22>) Figura 6b. Proceso de metástasis a partir de un tumor primario. (Tomado y modificado de <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Met%C3%A1stasis>)

## Cáncer cervicouterino

El cérvix es parte del sistema reproductor de la mujer, está ubicado hacia la región inferior del útero y forma un canal que comunica el interior del útero hacia el canal vaginal. (Figura 7). El aparato reproductor femenino está en contacto con los ganglios linfáticos y durante la menstruación, la sangre corre desde el útero por el cérvix hacia la vagina. El cérvix produce mucosidad que sirve como protección y sirve a los espermatozoides para moverse desde la vagina por el cérvix hacia el interior del útero. Durante el embarazo, el cérvix se encuentra fuertemente cerrado para ayudar a mantener al feto dentro del útero (National Cancer Institute, 2012).

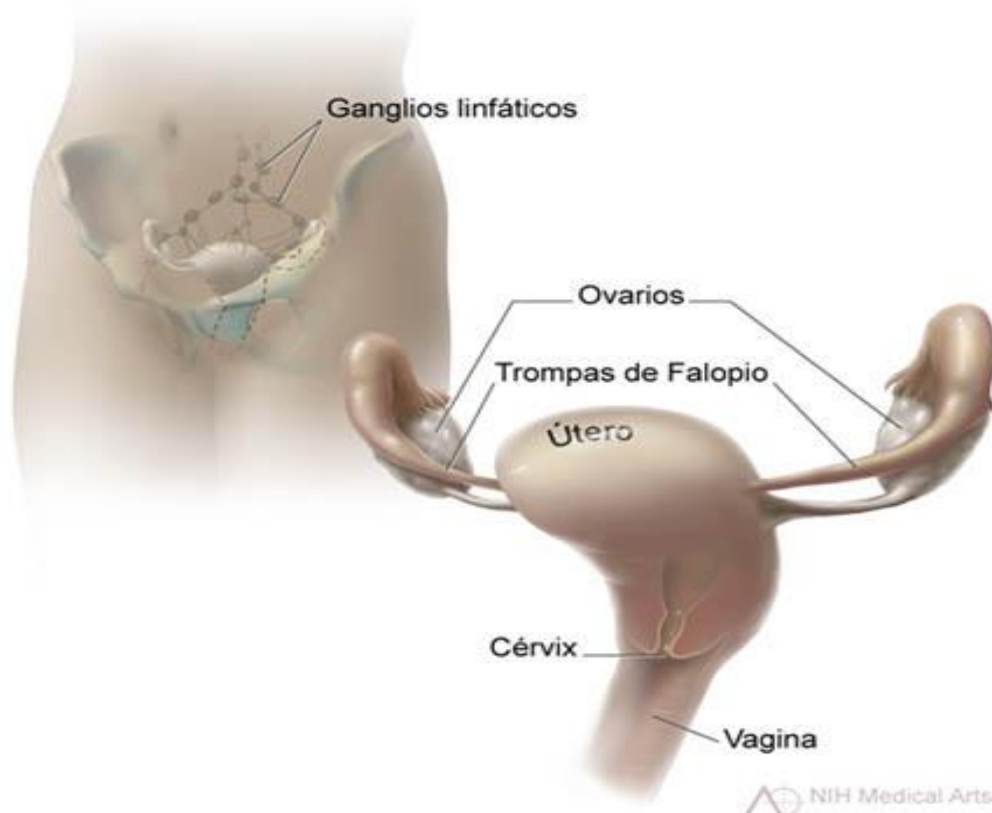


Figura 7. Esquema anatómico que muestra el útero, el cérvix o cuello uterino del sistema reproductor de la mujer (National Cancer Institute, 2012).

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial, precedido por el cáncer de mama (Melo et al, 2003) (Figura 8). Con respecto a su tasa de mortalidad el CaCU, muestra una clara distribución geográfica mayormente en los estados del sur y sureste de México. (INEGI, 2011).



Fig. 8. Distribución porcentual de las defunciones por tipo de tumores malignos en mujeres de 25 años y más, 2009. (INEGI, 2011).

El cáncer cervicouterino es un tumor epitelial (Figura 9), que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La dispersión de la parte superior de la vagina, los paramétrios, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación. Los casos de cáncer cervicouterino primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano o del epitelio glandular. Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en grado de diferenciación y características morfológicas (Toro et al., 2006).

Aunque existe un programa nacional de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), mediante la prueba de Papanicolaou (Pap) (Figura 10), desde 1974 en México, el CaCU sigue siendo una de las principales causas de muerte para las mujeres mexicanas (Lazcano et al., 1997). El examen de Pap no es un examen de diagnóstico. Es una prueba de tamizaje que detecta a las mujeres que pueden tener una morfología celular anómala en el cuello del útero a diferencia de las mujeres sanas (Hidalgo, 2006).

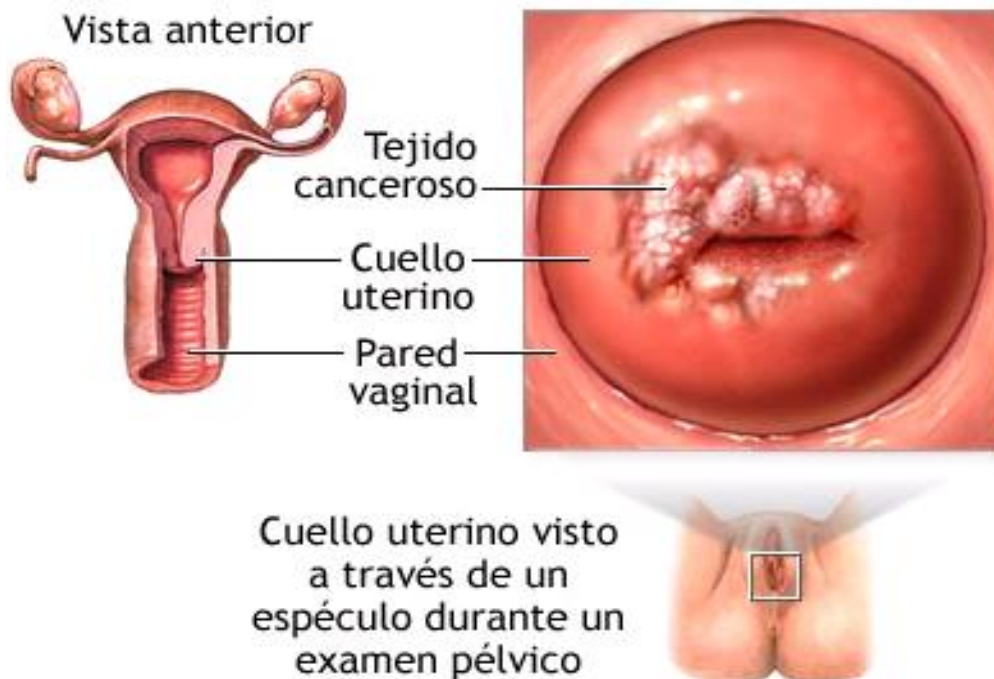


Figura 9. Esquema donde se muestran las partes que conforman el aparato reproductor de la mujer y el cérvix con una neoplasia maligna (Tomada y modificada de <http://www.spog.org>).

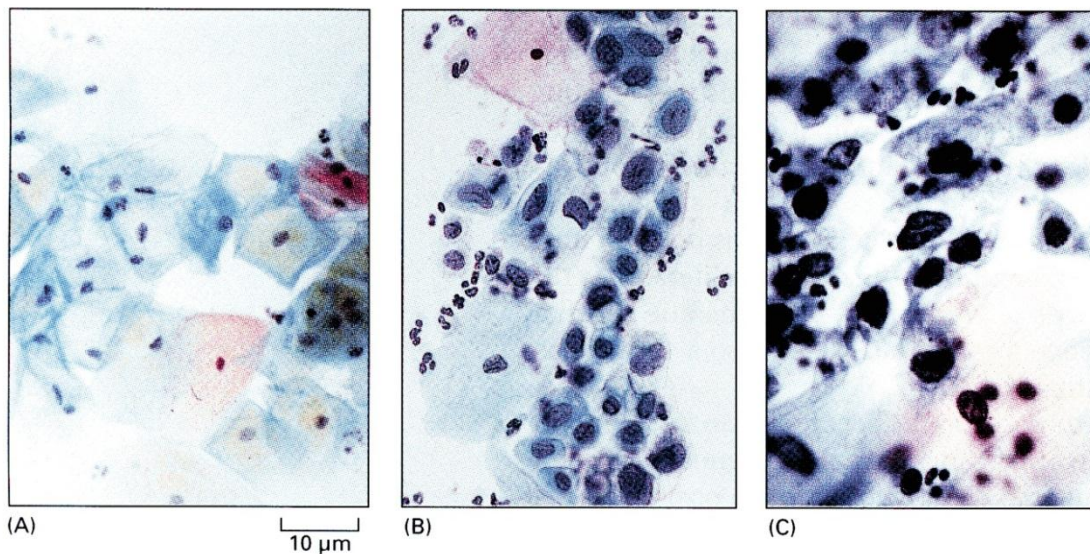


Figura 10. Fotografías tomadas por raspado de cuello uterino. A) Células grandes bien diferenciadas, con núcleos muy condensados. B) Células en varias etapas de diferenciación. C) Carcinoma invasivo, todas las células aparecen indiferenciadas (Alberts *et al.*, 2002).

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus pequeño, de 55 nm de diámetro, cubierto por una cápside que contiene una doble hebra de DNA circular (Moya *et al.*, 2006). El vínculo entre las infecciones genitales por virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer cervicouterino fue demostrado por primera vez a principios de 1980 por Harold zur Hausen, virólogo alemán (Burd, 2003). El VPH es el factor de riesgo más importante para desarrollar lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino (Walboomers *et al.*, 1999).

La clasificación de los VPH se maneja en alto y bajo riesgo. Los VPH de alto riesgo son capaces de iniciar el desarrollo del cáncer cervicouterino y ano, también pueden transformar queratinocitos humanos en células tumorales, inducir aberraciones cromosómicas, como consecuencia del efecto de las oncoproteínas virales en el descontrol celular (Panduro, 2000). Los papilomavirus humanos de bajo riesgo infectan epitelios estratificados queratinizados con una alta especificidad y están asociados con la aparición y persistencias de neoplasias benignas (Álvarez *et al.*, 1995). Entre los VPH de alto riesgo se incluyen (los tipos: 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58) los cuales están relacionados en mayor proporción con la presencia de cáncer cervicouterino y cáncer anal (Organización panamericana de la salud, 2002).

## **Terapias para el cáncer cervicouterino.**

Los principales tratamientos para cáncer metastásico se pueden categorizar en cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales se elegirán de acuerdo a cada etapa clínica (National Cancer Institute, 2012). Desde el año 1999, la evidencia ha recomendado el uso concomitante de radioterapia y quimioterapia con cisplatino en mujeres con tumores clínicamente mayores de 4 cm., o que a la Anatomía Patológica tengan presente algunos de los factores desfavorables (Keys et al., 1999; National Cancer Institute, 2012). Es posible que se necesiten realizar pruebas para evaluar el grado del cáncer y el tipo de tratamiento dependerá de los resultados de la prueba, así como de otros factores tales como la edad y la historia clínica de la mujer.

### **Cirugía**

La cirugía fue el primer tipo de tratamiento utilizado para combatir el cáncer y hasta la fecha sigue siendo la opción más utilizada para remover tumores sólidos. En la actualidad se utiliza para tratar el cáncer que no ha formado metástasis, pero también se puede aplicar para eliminar el cáncer que ha pasado a otros tejidos, como nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, para asegurar que todo el tejido afectado ha sido extraído. Las cirugías que se utilizan en el CaCU son: criocirugía, cirugía con laser, biopsia de cono, histerectomía básica y radical (Noriega et al., 2008).

### **Radiación**

Desde que en 1915 y 1917 Regaud, Forsell, Bailey y Heymm sentaron los principios y técnicas de aplicación de radioterapia en el tratamiento del carcinoma uterino y en 1932 se utilizó como agente terapéutico de elección (Noriega et al., 2008). La radiación utiliza ciertas longitudes de onda de alta energía como los rayos gamma para eliminar las células malignas. Esta técnica se puede utilizar a varios niveles para destruir a las células transformadas o para prevenir que las células normales o malignas proliferen y formen tumores. En éste tratamiento se llegan a eliminar a todas las células que se encuentran ciclando, incluyendo a células no tumorales. Se ha demostrado que para la sobrevivencia de las pacientes con cáncer invasor es muy importante que el tratamiento de radioterapia se haya completado en 8 semanas (The Royal College of Radiologists, 2012).



## **Quimioterapia**

La quimioterapia es un tratamiento con fármacos que puede eliminar o detener la proliferación de células tumorales. Sin embargo, también puede dañar células sanas, lo que produce efectos secundarios (National Cancer Institute, 2012). Los primeros registros de la quimioterapia datan desde principios del siglo XVI cuando se administraban por vía sistémica metales pesados en el tratamiento del cáncer, aunque la toxicidad era severa y sólo podían curar algunos tipos de cáncer. Desde entonces, se han buscado nuevos agentes antitumorales que logren curar, controlar u ofrecer tratamientos paliativos para el cáncer (Baquiran et al., 2001).

## **Vacuna**

Zhou y colaboradores (1991) desarrollaron las partículas tipo virus (virus – like particles, VLP) expresando las proteínas L1 y L2 de la envoltura viral de VPH 16 en células eucariontes (Zhou et al., 1991). Posteriormente otros científicos detallaron la técnica y demostraron que solo L1 era suficiente para el ensamble de las VLP (Kirnbauer et al., 1992). Recientemente se reportaron resultados exitosos de la aplicación de la vacuna profiláctica VLP de L1 en 2 pruebas fase 2B multicéntricas, y mostraron protección al 100% contra infección persistente de VPH 16 y VPH 18. Gardasil previene también contra la infección por los tipos 6 y 11 de VPH, los cuales causan 90% de las verrugas genitales (Koutsky et al., 2002).

## **Esteroides**

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales. La familia de los esteroides incluye una gran variedad de compuestos como son las hormonas, los emulsionantes y muchos componentes de la membrana celular (Wade, 2004). Otros participan en los mecanismos de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos (Castillaa et al., 2009). El primer esteroide con actividad hormonal fue aislado de una fuente natural, brassinólido, en 1979 a partir del nabo silvestre *Brassica napus*. Posteriormente se aislaron numerosos compuestos esteroidales de plantas entre los que se encuentran las saponinas, dentro de los cuales podemos encontrar las saponinas con estructura triterpénica (30 carbonos) o esteroidal (27 carbonos). Las saponinas esteroides son glicósidos esteroides con un núcleo espirostano que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar espuma abundante al agitar sus soluciones acuosas (Hostettman et al., 1995; Konoshima et al 1996).

## **Saponinas**

Las saponinas son una clase importante de productos naturales que funcionan como metabolitos secundarios en plantas y algunos animales. Las saponinas esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares mediante los ensayos de la espuma, hemólisis de glóbulos rojos por el método de Liebermann-Burchard y ensayos para carbohidratos (Rao et al., 2000). Las saponinas esteroides se encuentran principalmente en varias familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae (Agavaceae). En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias Solanaceae y Scrofulariaceae. La actividad de las saponinas dependerá de su estructura química, un ejemplo es la presencia o ausencia de azúcares en la molécula, diferencia entre el tipo y el número de azúcares influye en la respuesta biológica (Trouillas et al., 2005).

Algunas saponinas esteroides han mostrado diversas actividades biológicas entre las que destacan: antimicrobiana, citotóxica (Hu et al., 1999), antitumoral, ictiotóxica, molusquicida (Abdel et al., 1999), insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, antiúlceras, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, antifertilidad, antihepatotóxica, hemolítica (Takechi et al., 1998), antifúngica (Moreno et al., 1981) entre otros. Fundamentalmente se han constituido desde hace bastante tiempo, como precursores únicos de muchos medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, anticonceptivos orales y diuréticos (Hostettmann et al., 1995). Si la saponina tiene azúcares tendrá una mejor disponibilidad en la célula, ya que aumentará la permeabilidad de la membrana celular (Yamasaki et al., 1987). Las saponinas se denominan con nombres que terminan en ina de manera común. La IUPAC establece el nombre de éstas a partir del núcleo básico espirostanos.

## **Sarsasapogenina**

El compuesto (25S) 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -espirostanos (sarsasapogenina) es una saponina que se encuentra en la raíz de la zarzaparrilla (*Smilax medica*) y en diferentes especies de yuca, como la *Yucca schottii*, por hidrólisis ácida produce dos moléculas de glucosa y ramnosa, formando la aglicona llamada sarsasapogenina. Marker demostró en el año de 1939 que la sarsasapogenina tiene 2 anillos heterocíclicos uno furánico y otro piránico con un átomo de carbono común para ambos, formando un sistema espiránico. Este sistema está constituido por un grupo cetónico formando un cetol con dos grupos oxhidrilos, uno de ellos secundario, situado en el anillo ciclopentánico y otro primario, substituido en el

extremo de la cadena (Marker y Rohrmann, 1939, 1940; Marker, 1940). Se tienen reportes acerca de la sarsasapogenina con actividad biológica como antidepresivo, antidiabético y mejora la memoria (Attele et al., 2002; Hu et al., 2005; Ren et al., 2006). La sarsasapogenina, al ser extraída pierde sus azúcares, por lo que también su actividad hemolítica, característica de las saponinas, disminuyendo su actividad antitumoral, ya que al eliminar los azúcares la molécula pierde solubilidad, por lo que es necesario crear a partir de sus derivados un compuesto glicosilado que mantenga sus propiedades antiproliferativas y apoptóticas. Se tienen reportes de que la sarsasapogenina tiene actividad antitumoral en células de carcinoma de hígado HepG2 (Ni et al., 2008). Disminuye la proliferación en células de CaCU HeLa (King et al., 2008).

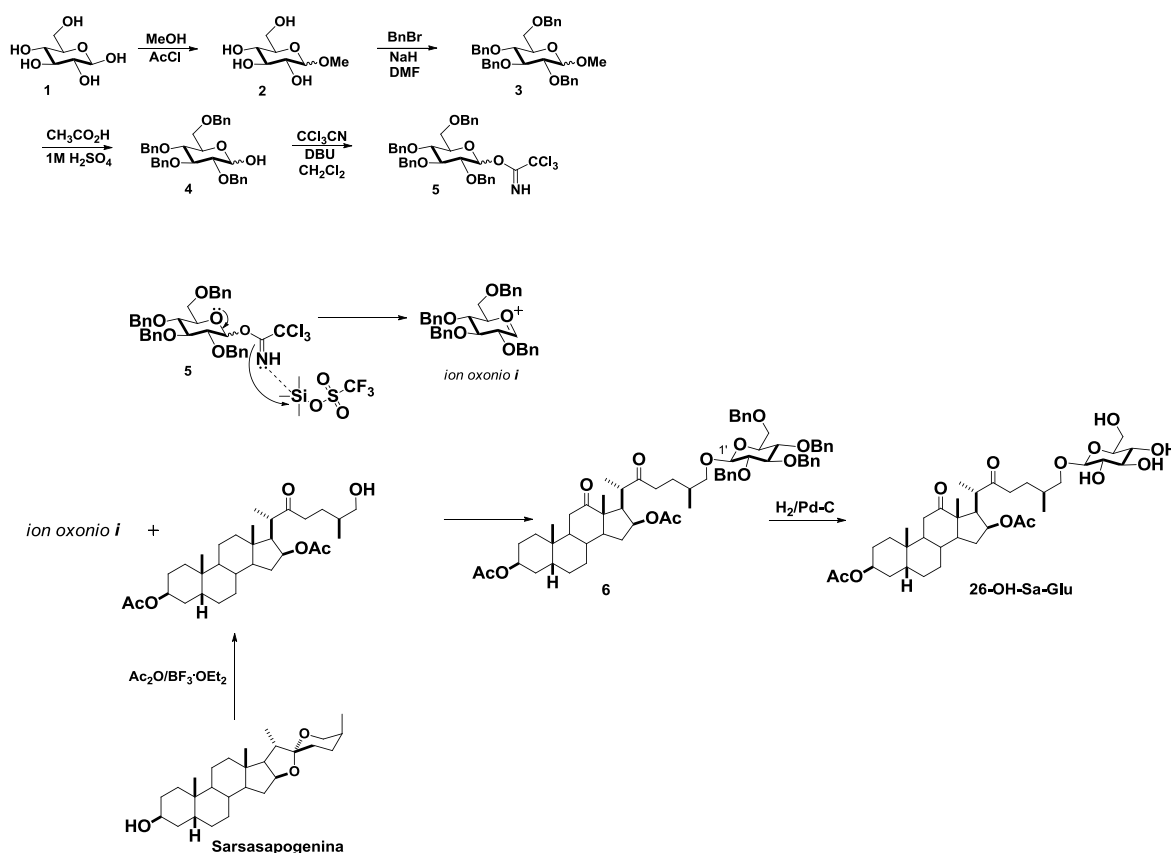


Figura 11. Síntesis del compuesto 26-OH-Sa-Glu. (Fernández, 2010).

El compuesto  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (25S)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-22-oxo-5 $\beta$ -colestano-26-ilo (26-OH-Sa-Glu) es un derivado glicosilado de la sarsasapogenina, sintetizado en el laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cuenta con un peso molecular de 680.866 y una fórmula química de C<sub>37</sub> H<sub>60</sub> O<sub>11</sub> (Figura 11). El compuesto 26-OH-Sa-Glu es una saponina espirostánica que contiene una molécula de glucosa en el Carbono 26 a diferencia de la sarsasapogenina, lo cual aumenta su solubilidad. El compuesto 26-OH-Sa-Glu es soluble en DMSO a una concentración de 1 mg/100  $\mu$ l.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Actualmente se aplican terapias contra el cáncer que resultan ser efectivas cuando el tumor está en una fase temprana de desarrollo, sin embargo resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad. Esto ha generado un gran interés en aislar compuestos de origen vegetal con actividad antitumoral, como es el caso de las saponinas. Entre éstas encontramos a la sarsasapogenina que ha sido reportada con actividad antitumoral y antidepresiva. Este hecho ha generado la necesidad de sintetizar análogos o derivados de la sarsasapogenina, cuyo cambio estructural permita mantener la actividad antitumoral. Por esta razón este trabajo tiene como propósito evaluar al derivado de la sarsasapogenina 26-OH-Sa-Glu esperando que presente actividad antiproliferativa y apoptótica sobre líneas celulares de CaCU, sin ser necrótico.

## **JUSTIFICACIÓN**

El cáncer cervicouterino (CaCU) se encuentra entre los cánceres femeninos de mayor importancia a nivel mundial, de modo que en México es la segunda causa de muerte en mujeres, siendo precedido por el cáncer de mama. El reporte por parte del INEGI indica un total de 4,500 defunciones anuales representando un gran problema de salud.

## **HIPÓTESIS**

Existen reportes de la sarsasapogenina que la describen con actividad antitumoral y apoptótica en células Hep-G2 y células HeLa, también se sabe que al modificar la estructura química de algunos compuestos, se puede potenciar su actividad biológica, como es el caso de la Timosaponina AIII(TAIII), un derivado de la sarsasapogenina que induce apoptosis en células HeLa con una menor cantidad de compuesto. Por lo tanto, se espera que el compuesto derivado de la sarsasapogenina 26-OH-Sa-Glu presente actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de CaCU.

## **OBJETIVO**

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del derivado de la sarsasapogenina  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (25S)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-22-oxo-5 $\beta$ -colestano-26-ilo (26-OH-Sa-Glu) en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

Realizar cultivos de las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Evaluar la concentración requerida del compuesto 26-OH-Sa-Glu para inducir un decremento del 50% en la proliferación celular ( $CI_{50}$ ), en células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Evaluar si las  $CI_{50}$  determinadas en las células tumorales afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana como parámetro comparativo.

Evaluar el efecto necrótico del 26-OH-Sa-Glu en cultivos de células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo mediante la incorporación de Ioduro de Propidio y la detección de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH).

Evaluar si el 26-OH-Sa-Glu induce la expresión de la caspasa 3 activa, así como la fragmentación del ADN en cultivos de células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo como dos indicadores de muerte por apoptosis.



## **MÉTODO**

### **Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino.**

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares provenientes de CaCU fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), rojo fenol y NCS (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5%, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuair, USA). Para realizar las pruebas biológicas, las células fueron tomadas de cultivos a una densidad del 70 %. (Morgan et al., 1993).

Las líneas celulares de CaCU que se utilizaron en éste trabajo son: Hela, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2012). CaSki, células provenientes de carcinoma cervicouterino, que fueron establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2012) y ViBo células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy et al., 1992).

### **Compuesto 26-OH-Sa-Glu.**

El compuesto  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (25S)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-22-oxo-5 $\beta$ -colestano-26-ilo (26-OH-Sa-Glu) fue sintetizado por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez, con la colaboración de la Dra. Ma. Antonieta Fernández Herrera, en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Para llevar a cabo las pruebas biológicas se preparó un stock del compuesto 26-OH-Sa-Glu solubilizado en DMSO a una concentración de 1 mg/100  $\mu$ l y se tomaron las concentraciones correspondientes a la CI<sub>50</sub> de cada línea celular tumoral para la evaluación biológica.

### **Determinación de $CI_{50}$ .**

Para establecer la  $CI_{50}$  (concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular) de las líneas tumorales provenientes de CaCU, fueron sembradas 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS, durante 24 horas.

Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI-1640 al 5 % de NCS con el compuesto 26-OH-Sa-Glu, a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.5, 0.7  $\mu$ g/ml. En el ensayo se utilizó como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 10  $\mu$ l de DMSO. A las 24 horas se evaluó el número celular por la técnica de cristal violeta la cual consiste en: retirar el RPMI-1640 de los pozos de la placa y posteriormente agregar una solución de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1 % durante 15 min. A continuación la solución de glutaraldehído fue retirada y la placa se dejó secar al aire. Una vez seca la caja se agregó el colorante cristal violeta al 0.1 % durante 20 min. Al término de éste tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar al aire. Por último, el colorante fue solubilizado con una solución de ácido acético al 10 % en agitación durante 20 min. Finalmente la absorbancia fue determinada a 590 nm en un lector de placas (SofMaxPro USA). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007 y se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50 % la población celular, donde "Y" se sustituye por 50 y el valor de X puede ser calculado para dar el valor de  $CI_{50}$  de las líneas tumorales de CaCU.

### **Ensayo de citotoxicidad por medio de la incorporación de yoduro de propidio (IP) en células tumorales.**

Fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células tumorales/pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 1ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con la  $CI_{50}$  de 26-OH-Sa-Glu con medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS, al control solamente se le cambio el medio de cultivo por medio fresco RPMI-1640 a 5 % de NCS, como vehículo se utilizó DMSO en una concentración de 10 $\mu$ l/ml de RPMI-1640 a 5 % de NCS y se dejaron los tratamientos durante 24 h. Una vez concluido el tiempo, las células fueron cosechadas y mantenidas en medio de cultivo y el control fue permeado con etanol durante 20 min., posteriormente se añadieron 3  $\mu$ l de una solución de

ioduro de propidio (IP)(Sigma-Aldrich, USA) (200 mg/l) a los tratamientos y las células positivas al IP fueron determinadas por citometría de flujo (marca FACSAria II) previamente calibrado con células negativas al IP y los datos obtenidos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

### **Ensayo de necrosis por liberación de LDH en células tumorales y linfocitos no tumorales.**

El ensayo de necrosis se realizó sembrando  $5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS y se incubaron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, por 24 horas, posteriormente se colocó la CI<sub>50</sub> del 26-OH-Sa-Glu en medio de cultivo fresco, a los controles se les realizó únicamente cambio de medio y como vehículo se utilizó DMSO a una concentración de 10 µl/ml de RPMI-1640 a 5 % de NCS y se dejaron reposar durante 24 h. los tratamientos. Una hora antes de cumplir con las 24 h., al control positivo se le realizó un segundo cambio de medio por medio fresco al 1% de tritón X-100, condición que se mantiene por 1 h., posteriormente se recupera el medio de cultivo cumplidas las 24 h. a los distintos tratamientos y subsiguientemente se centrifugaron a 14000 rpm (Becton Dickinson, USA) durante 10 minutos. Después se transfirieron 40 µl de sobrenadante de cada tratamiento a un pozo de una placa de 96 pozos por separado, se añadieron 40 µl de mezcla de reacción del kit Non-radiative Cytotoxicity assay (250 µl de solución catalítica y 11.25 ml de solución de marcado) a cada pozo y se incubó durante 20 minutos, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = [(muestra – control negativo)/(control positivo control negativo)]\*100.

### **Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.**

Fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con CI<sub>50</sub> de 26-OH-Sa-Glu con medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS, durante 24 h y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo, el procedimiento se detalla de la siguiente manera: las células fueron cosechadas y fijadas a las 24 horas de cultivo, con etanol 70 % en agua destilada durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente después fue adicionado el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en

conejo (SIGMA) 1:250 en PBS durante 24 h. a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), mantenido en oscuridad durante 3 horas, se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

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

Para la técnica de TUNEL se utilizó el kit ApopTag (Chemicon International, USA). Para la cual fueron sembradas  $50 \times 10^4$  células en placas de 24 pozos en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al paso de las 24 horas se procedió a estimular a las células con  $CI_{50}$  del 26-OH-Sa-Glu en medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al término de 24 horas del cultivo, las células fueron cosechadas y fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS el cual fue preparado al momento. Se lavaron 3 veces con PBS y se permearon con tritón X-100 0.5 % en PBS, durante 5 minutos a 4 °C. Se lavaron con PBS 3 veces. Posteriormente se adicionó inmediatamente el buffer de equilibrio (20-30  $\mu$ l) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se incubó inmediatamente por 1 hora con enzima Tdt (33  $\mu$ l de enzima Tdt más 77  $\mu$ l de buffer de reacción) en cámara húmeda. La reacción fue detenida con buffer de paro (Chemicon international, USA) (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua bidestilada), agitando suavemente por 10 minutos. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS, 1 minuto cada lavado. Se incubó con antidigoxigenina acoplada a rodamina, 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (Chemicon international, USA) (68  $\mu$ l de solución bloqueó más 62  $\mu$ l de antidigoxigenina-rodamina). Se realizaron los respectivos lavados 3 veces con PBS, dos minutos cada lavado. Finalmente se analizaron en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

### **Proliferación de linfocitos humanos confito hemaglutinina y detección con carboxifluoresceína (CSFE).**

En tubos vacutainer con EDTA, fueron obtenidos 20 ml de sangre periférica de un voluntario y colocados (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) (un total de 4 tubos), se cubrió con aluminio y se centrifugó (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y

aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000  $\mu$ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB (el total de células quedo contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanezcan en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugo 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 tomo una alícuota de 20 ml, y se determinó el número celular utilizando la cámara de Neubauer.

Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10  $\mu$ l de carboxifluoresceína (12  $\mu$ M por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó en cada tubo cónico de plástico de 1.6ml, la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de  $1 \times 10^6$  de células/ml de medio total.

Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de  $1 \times 10^6$  de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 $\mu$ l/ml de fitohemaglutinina (Micro-Lab S.A., Méx.). Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS dos veces por separado, y 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

### **Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos se les aplicaron un análisis de varianza (ANDEVA) y para comparación entre medias, se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows 7 seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05

## RESULTADOS

### Efecto antiproliferativo ( $CI_{50}$ )

La sarsasapogenina es un compuesto de baja solubilidad en diversos solventes tanto polares como no polares, que presenta actividad antitumoral en la línea celular de Carcinoma de hígado HepG2 (Ni et al., 2008), sin embargo, la sarsasapogenina es poco soluble y su síntesis genera rendimientos bajos. La modificación de esta molécula ha permitido la síntesis de análogos o derivados que han incrementado su solubilidad, tal es el caso del  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (25S)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-22-oxo-5 $\beta$ -colestano-26-ilo (26-OH-Sa-Glu), el cual presenta una glucosa en el carbono 26 que la hace totalmente soluble en DMSO. No obstante que el 26-OH-Sa-Glu presenta mejor solubilidad en DMSO que la misma sarsasapogenina, no se han determinado sus propiedades antitumorales y apoptóticas. Con el propósito de evaluar si el 26-OH-Sa-Glu afecta el potencial proliferativo de las líneas tumorales de CaCU HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con 15.9, 14.12 y 14.0  $\mu$ g/ml respectivamente. Los cultivos de las líneas celulares fueron estimuladas de manera independiente con diferentes concentraciones de la saponina esteroidal, y las concentraciones que inhiben la densidad celular en un 50 % fueron calculadas ( $CI_{50}$ ), (Figura 12).

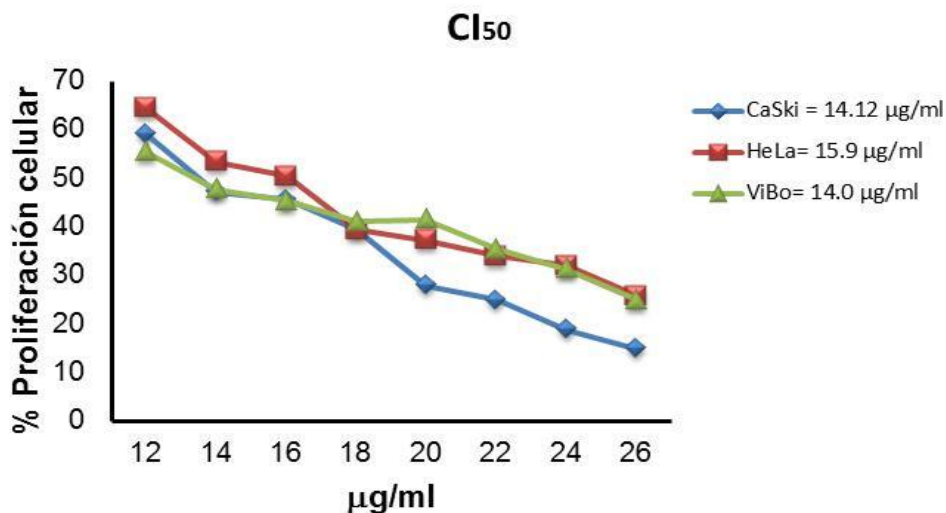


Figura 12. Efecto del 26-OH-Sa-Glu sobre la proliferación de células de CaCU, HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con las diferentes concentraciones de 26-OH-Sa-Glu durante 24 h. La  $CI_{50}$  fue calculada para cada una de las líneas celulares mediante una linearización de los datos obtenidos (ver material y métodos). El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que del 26-OH-Sa-Glu ejerce un efecto inversamente proporcional a la concentración en las tres líneas tumorales, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto el número celular disminuye. De igual manera, las  $CI_{50}$  de las líneas de CaCU HeLa, CaSki y ViBo fueron calculadas y corroboradas utilizando la ecuación de la recta, obteniendo valores de 15.9, 14.12 y 14.0  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, indicando que la sensibilidad de las tres líneas tumorales a este compuesto es muy similar entre ellas.

### **Efecto del 26-OH-Sa-Glu en la morfología celular.**

En distintos trabajos se menciona que el efecto de compuestos antitumorales generan un cambio en la morfología de las células (Camacho, 2010; Galicia, 2010; López, 2010; Fernández et al., 2010). Con el fin de establecer el efecto del 26-OH-Sa-Glu en la morfología de las líneas de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo, las células tumorales fueron tratadas con el 26-OH-Sa-Glu a la concentración de 15.9, 14.12 y 14.0  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y posteriormente se tomaron fotografías de las células control, las células con DMSO a una concentración de 10  $\mu\text{l/ml}$  de medio de cultivo y las tratadas con el compuesto (Figura 13).

Como se muestra en la figura 13, las células HeLa y ViBo tratadas con 26-OH-Sa-Glu presentan una compactación celular mostrando una morfología esférica característica de la muerte apoptótica. Sin embargo, las células CaSki no mostraron un cambio en la morfología celular.



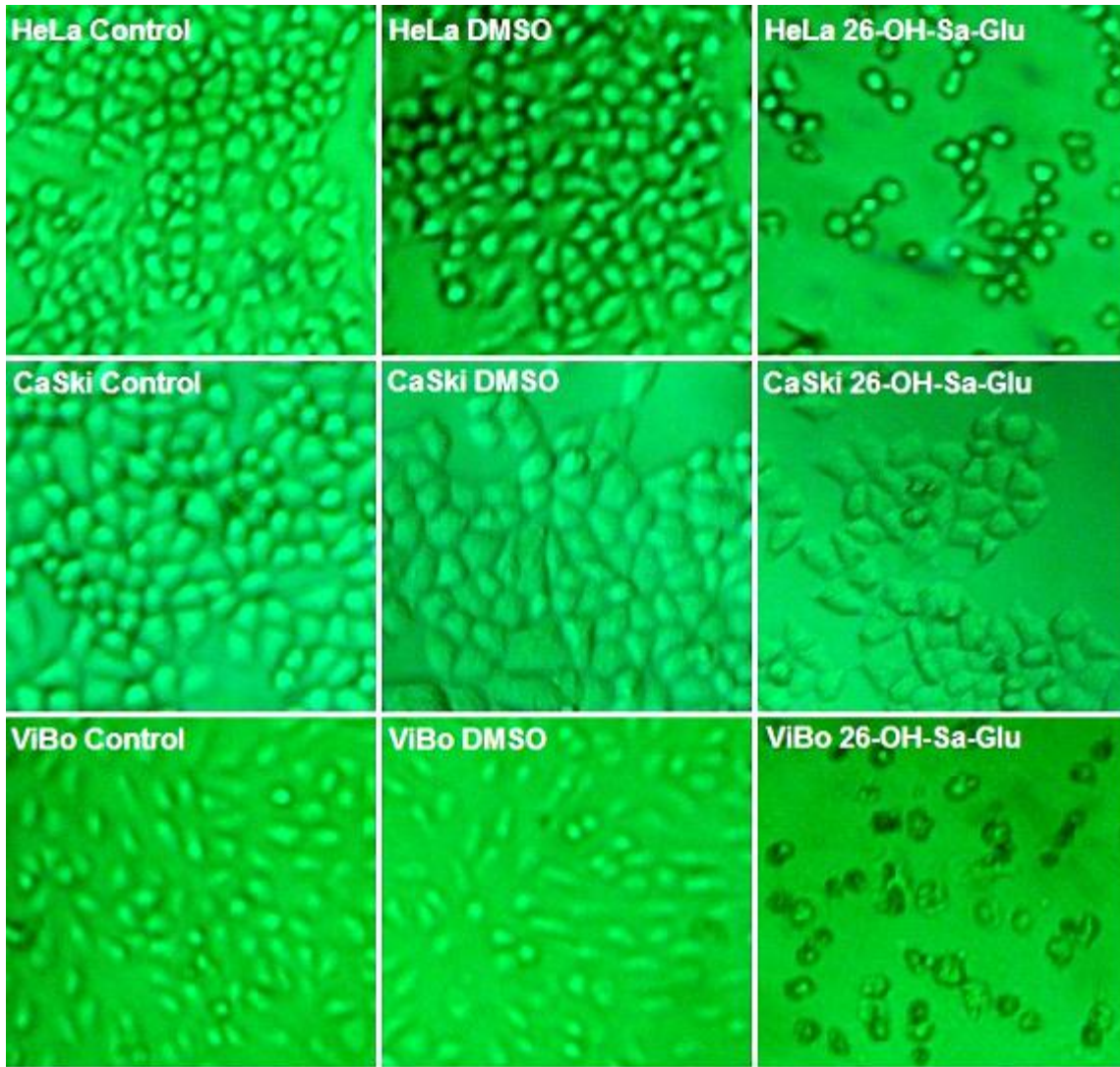


Figura 13. Efecto del 26-OH-Sa-Glu en la morfología celular de las líneas de CaCU. HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas y tratadas con las concentraciones de 15.9, 14.12 y 14.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del esteroide respectivamente por 24 horas.

### Actividad antiproliferativa en células linfocíticas humanas no tumorales.

Con la intención de establecer si el 26-OH-Sa-Glu afecta el potencial proliferativo de células no tumorales como parámetro comparativo, los cultivos de células linfocíticas humanas fueron marcados con carboxifluoresceína (CSFE) y tratados con 15.9  $\mu\text{g/ml}$  del esteroide ( $\text{CI}_{50}$  de mayor concentración en las células tumorales) durante 72 h y el porcentaje de proliferación celular fue determinado por citometría de flujo (Figura 14). Los resultados obtenidos indican que los linfocitos tratados con DMSO proliferaron 83.8 %, mientras que las células tratadas con la  $\text{CI}_{50}$  de 26-OH-Sa-Glu se encuentra en un 89 % de proliferación, indicando que este compuesto no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas.

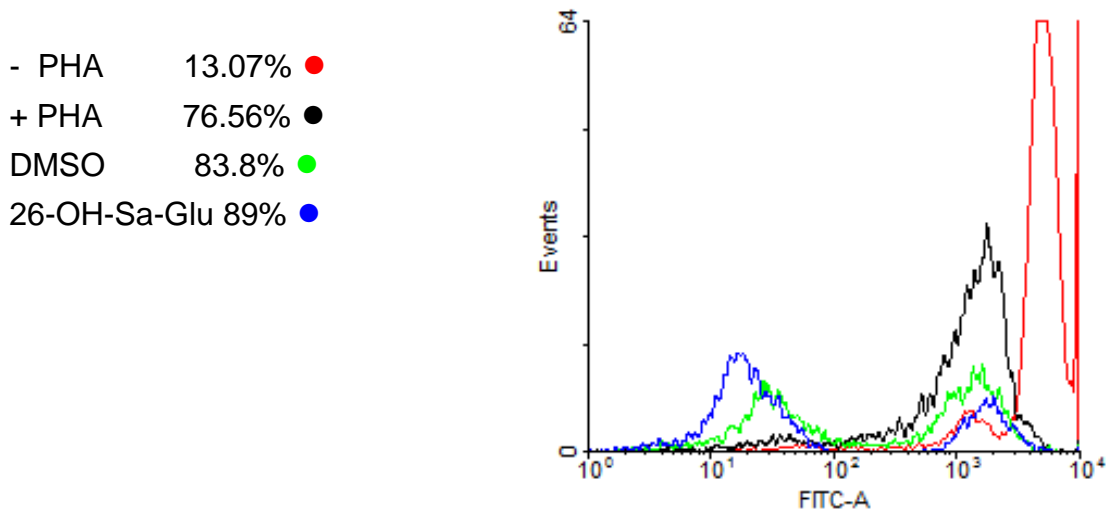


Figura 14. Efecto del 26-OH-Sa-Glu en el potencial proliferativo de linfocitos humanos no tumorales. Los cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína (CSFE) y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo. Se utilizaron varios controles entre los cuales tenemos sin activar que son linfocitos marcados con CSFE y sin fitohemaglutinina (PHA); Activados que son linfocitos marcados con CSFE con PHA; DMSO: linfocitos marcados con CSFE, PHA y con DMSO a una concentración de 10  $\mu\text{l/ml}$  de medio de cultivo; 26-OH-Sa-Glu se refiere a linfocitos marcados con CSFE con PHA, con DMSO 10  $\mu\text{g/ml}$  de medio de cultivo y 15.9  $\mu\text{g/ml}$  de 26-OH-Sa-Glu.

## Actividad necrótica

El hecho de observar un decremento en el número celular en los cultivos de células tumorales de CaCU tratadas con el 26-OH-Sa-Glu indica que este decremento podría ser consecuencia de la inducción de una muerte celular. Al respecto y con el propósito de evaluar si el fitoesteroide induce una muerte necrótica en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con la concentración de 15.9, 14.12 y 14.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente de la saponina durante 24 h y la incorporación de yoduro de propidio por las células tumorales se tomó como un marcador de necrosis temprana, mientras que la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes como un marcador de necrosis tardía (Figura 15 y 16).

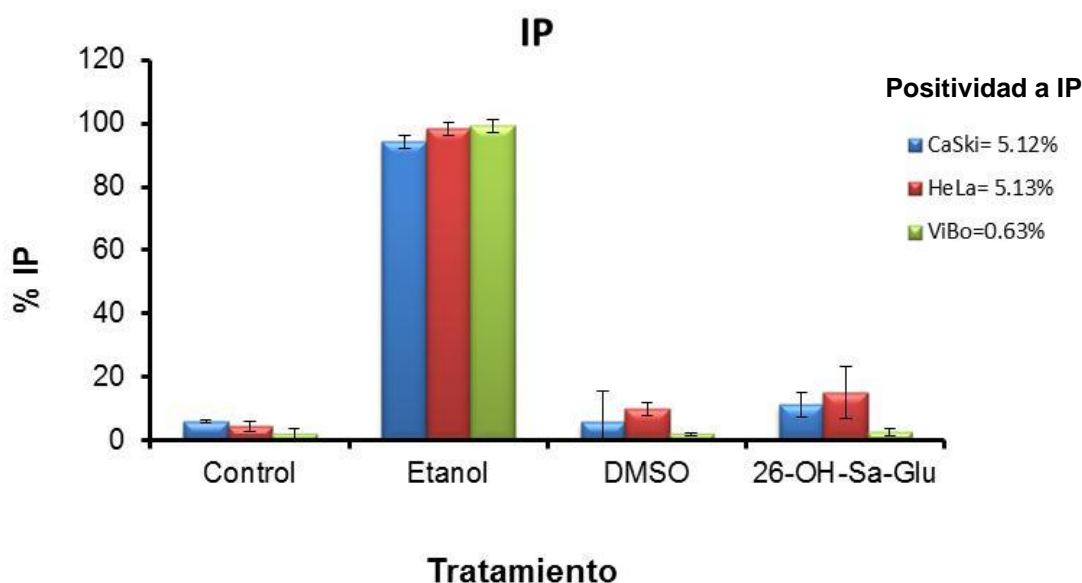


Figura. 15. Incorporación de Yoduro de Propidio (IP) por las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el 26-OH-Sa-Glu a la concentración de la  $CI_{50}$  correspondiente para cada línea tumoral, el DMSO se utilizó a una concentración de 10  $\mu\text{l/ml}$  mientras que el Etanol se utilizó como control positivo. Los datos no mostraron diferencia significativa. \* $p < 0.05$  vs DMSO (ANDEVA).

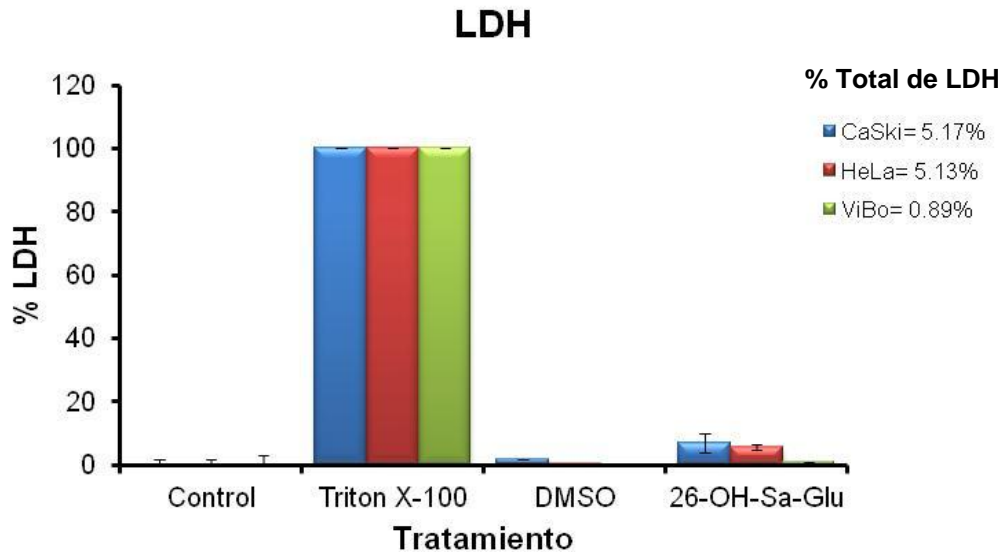


Figura 16. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de las líneas HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con las  $Cl_{50}$  respectivas del 26-OH-Sa-Glu, el DMSO se utilizó a una concentración de 10  $\mu$ l/ml mientras que el Tritón X-100 se maneja como control positivo. Los datos no mostraron diferencia significativa \* $p < 0.05$  vs DMSO (ANDEVA).

Como se puede observar en las figuras 15 y 16, las células tumorales tratadas con el 26-OH-Sa-Glu no presentan una muerte necrótica ni temprana ni tardía, ya que no presentaron una significativa incorporación de yoduro de propidio ni actividad de LDH, indicando que el decremento celular observado es generado por una muerte diferente a la necrosis.

### **Inducción de necrosis en células linfocíticas humanas no tumorales.**

Con el propósito de evaluar si el 26-OH-Sa-Glu induce una muerte necrótica en células no tumorales, los cultivos de células linfocíticas fueron tratadas con el compuesto 26-OH-Sa-Glu a una concentración de 15.9  $\mu$ g/ml durante 72 h y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes como un marcador de necrosis (Figura 17).

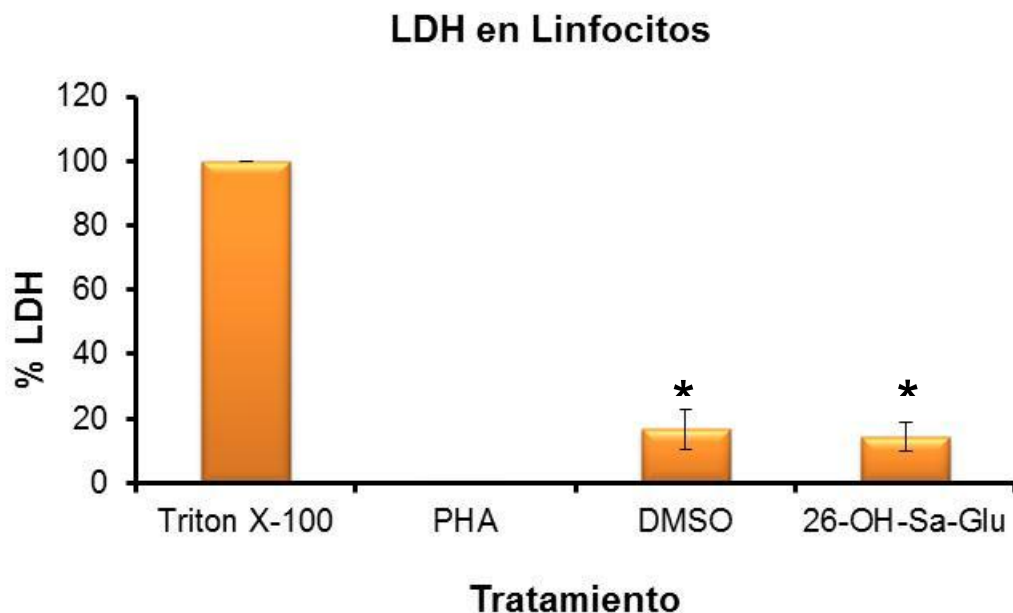
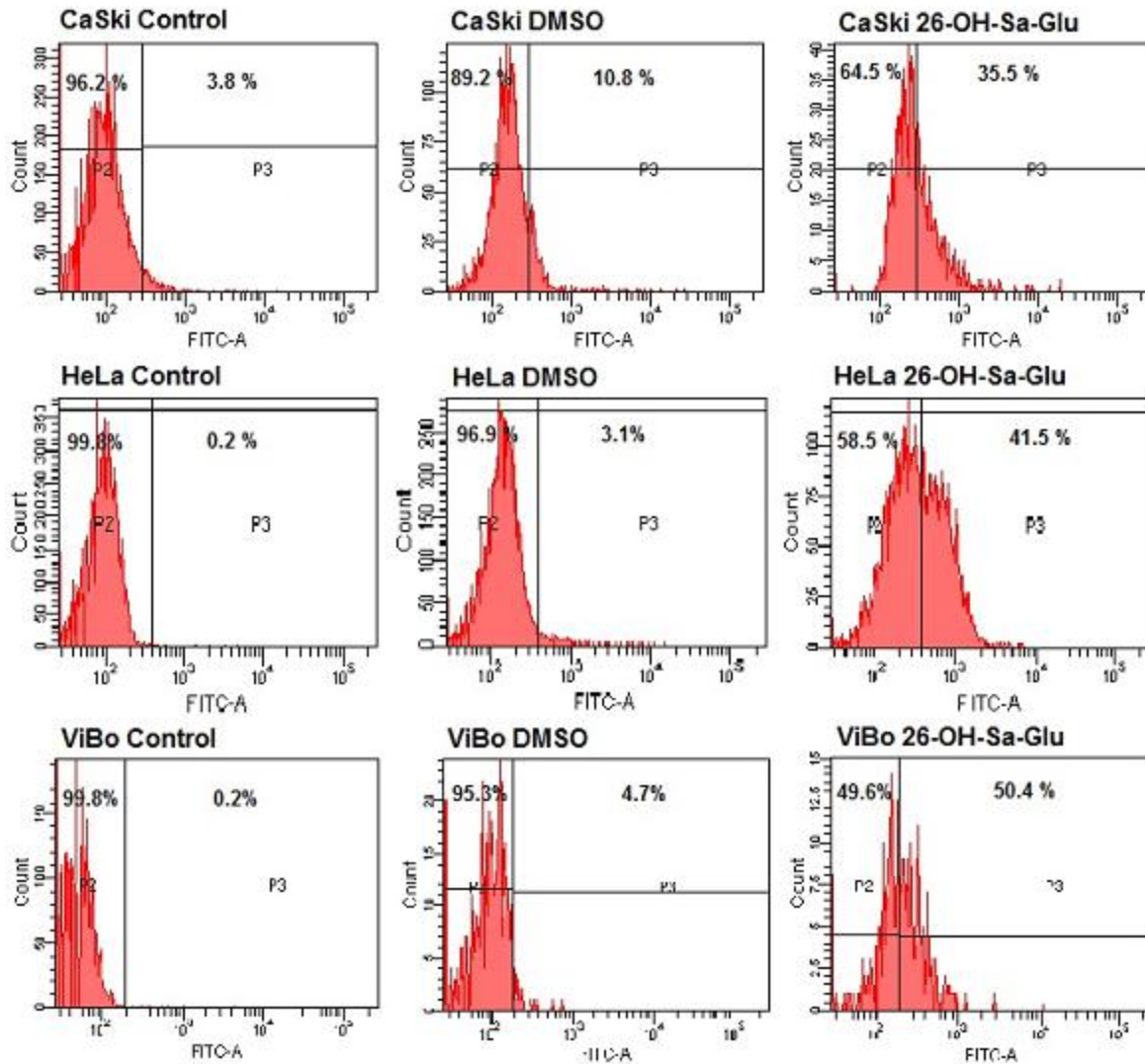


Figura 17. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células linfocíticas estimuladas con el 26-OH-Sa-Glu a una concentración de 15.9  $\mu\text{g/ml}$ , el DMSO se utilizó a una concentración de 10  $\mu\text{l/ml}$ , mientras que la Fitohemaglutinina (PHA) se utilizó para activar la proliferación de los linfocitos. Se realizó un análisis ANDEVA y se encontró una diferencia significativa entre PHA con el DMSO y el 26-OH-Sa-Glu con una  $*p < 0.05$ .

Como se puede observar en la figura 17, y al igual que en las células tumorales de CaCU (Figura 16), no se detectó LDH en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de células linfocíticas, sugiriendo que el 26-OH-Sa-Glu no induce a una muerte necrótica ni en células tumorales ni en células no tumorales y el decremento en el número celular observado en las células tumorales es generado por una muerte diferente a la necrosis.

Otro tipo de muerte celular muy conocida es la muerte celular programada, la cual es una muerte celular natural que se presenta en células normales, cuyo propósito es eliminar a las células senescentes o disfuncionales. Ésta se caracteriza por inducir condensación de la cromatina, contracción celular, formación de cuerpos apoptóticos, activación de caspasas y fragmentación del ADN. Se ha descrito que algunos fitoesteroides como la dioscina, la hecogenina entre otras, inducen muerte por apoptosis. Es importante determinar si esta saponina es capaz de inducir muerte por apoptosis en las células tumorales. Para ello es necesario determinar si el proceso apoptótico es llevado a cabo hasta su término, siendo necesario evaluar la activación de caspasas efectoras que participan en la fase tardía de la apoptosis, como la caspasa 3 activa y de igual manera evaluar la fragmentación del ADN como el evento concluyente de este tipo de muerte. Al respecto, cultivos

de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el esteroide y la población celular positiva a la caspasa 3 activa fue cuantificada por citometría de flujo así como la fragmentación del ADN fue detectada mediante la técnica de TUNEL y cuantificada por citometría de flujo (Figura 18a, 18b, 19a y 19b).



18a)

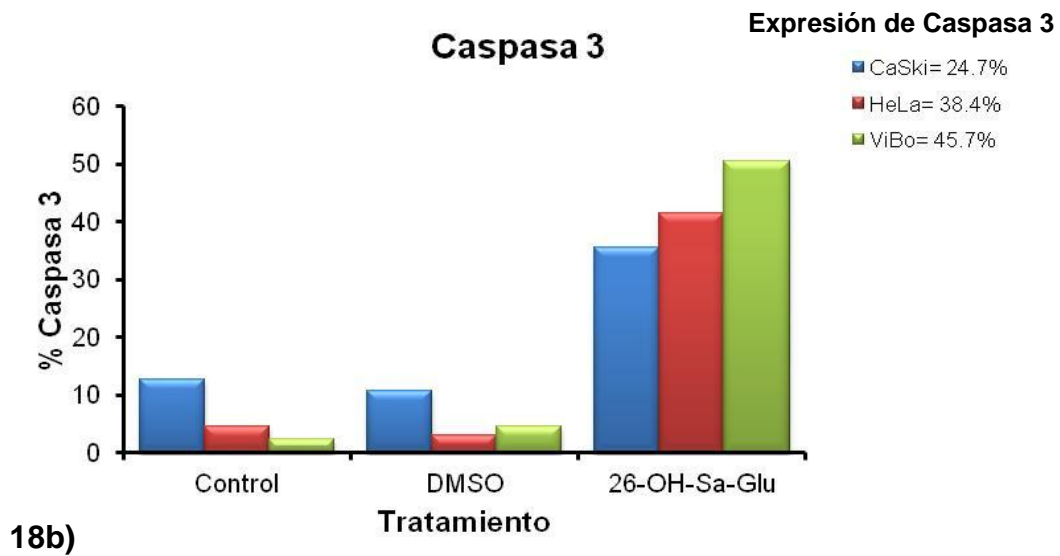
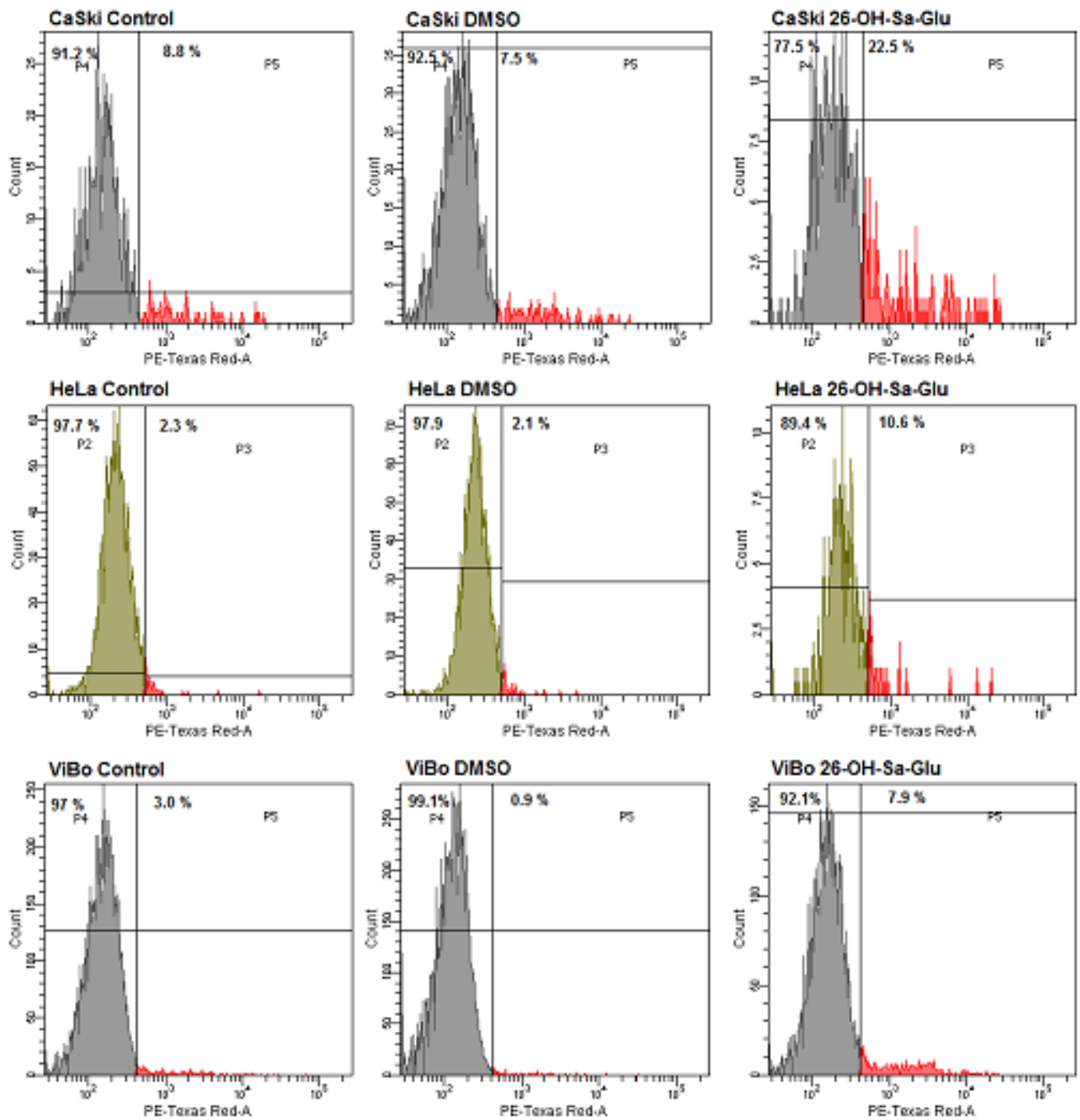
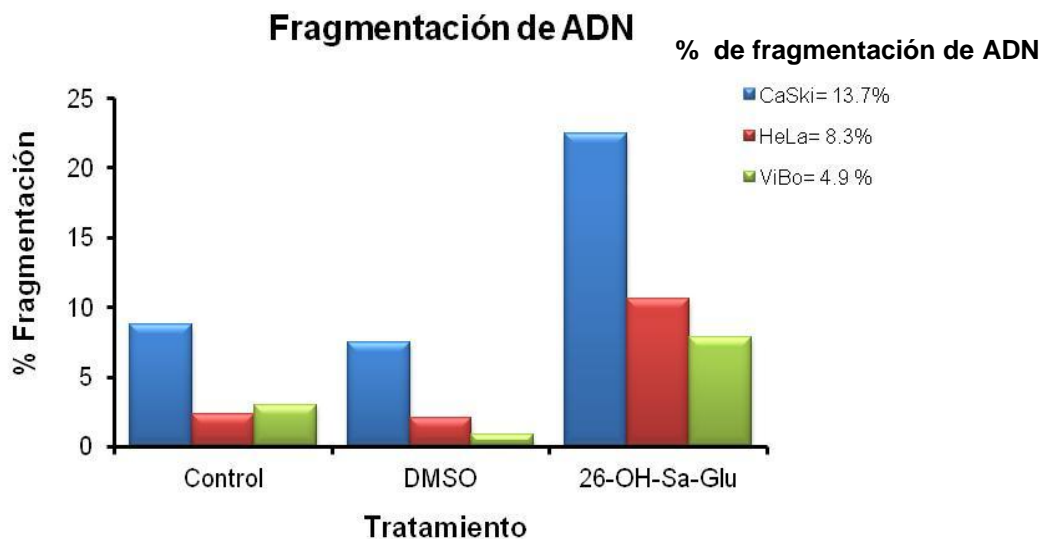


Figura 18a. Detección de caspasa 3 activa correspondientes a las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo al ser estimuladas con el 26-OH-Sa-Glu. Figura18b. Efecto del compuesto 26-OH-Sa-Glu mostrando el porcentaje en la expresión de la enzima caspasa 3 activa en cultivos de células de CaCU donde se muestran los valores restados de los controles mayores. El DMSO se utilizó a una concentración de 10  $\mu$ l/ml como vehículo. El gráfico es un ensayo representativo de 3 ensayos independientes correspondiente a los histogramas.



19a)





**19b)**

Figura 19a. Fragmentación de ADN en células tumorales CaSki, HeLa y ViBo al ser tratadas con el 26-OH-Sa-Glu. Figura 19b. Efecto del compuesto 26-OH-Sa-Glu en la fragmentación de ADN en células tumorales HeLa, CaSki y ViBo mostrando los valores restados de los controles. El DMSO se utilizó a una concentración de 10  $\mu$ l/ml. Los datos mostrados en el gráfico son representativos de un solo ensayo de tres ensayos independientes correspondiente a los histogramas.

Los resultados obtenidos indican que el 26-OH-Sa-Glu induce la expresión de la caspasa 3 activa en las tres líneas tumorales, así como la fragmentación del ADN, indicando que el esteroide induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis.

## DISCUSION DE RESULTADOS.

Las saponinas son estructuralmente una clase diversa de glucósidos, las cuales han atraído mucha atención debido a la gran cantidad de actividades biológicas que presentan, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiproliferativas e inductoras de apoptosis (Zhou et al., 2005; Hsu et al., 2004), por lo que, constituyen una importante fuente de productos de origen natural que conducen al desarrollo de novedosos y prometedores quimioterapéuticos. La presencia de saponinas, ha sido reportada en más de 100 familias de plantas de las cuales al menos 150 tipos de saponinas naturales se ha encontrado que poseen importantes propiedades anticancerígenas (Man et al., 2010). De entre la diversa gama de saponinas que se han estudiado, la saponina esterooidal sarsasapogenina presenta actividad antitumoral en varias líneas tumorales (Ni et al., 2008; Wenna et al., 2007; King et al., 2008). No obstante, la sarsasapogenina se encuentra limitada para ser estudiada debido a la disminución en su solubilidad en sistemas acuosos al carecer de azúcares, generando la necesidad de crear análogos o derivados de esta molécula que sean más solubles y con mayores rendimientos en su síntesis. Al respecto el 26-OH-Sa-Glu, derivado de la sarsasapogenina fue disuelto en DMSO, generando una buena solubilidad en el medio de cultivo, incrementando su biodisponibilidad. Su actividad antiproliferativa ( $CI_{50}$ ) en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino está en el rango de los 14 a 16  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que los valores reportados para la sarsasapogenina en diferentes líneas tumorales como HepG2 están en el rango de 25 a 45  $\mu\text{g/ml}$  que nos indica un menor rendimiento comparado con el 26-OH-Sa-Glu. Existe un reporte de actividad antiproliferativa de la sarsasapogenina en células tumorales HeLa con una  $IC_{50}$  de 56.4  $\mu\text{mol/l}$  (King et al., 2008), mientras que con el 26-OH-Sa-Glu la  $IC_{50}$  fue de 20.5  $\mu\text{mol/l}$ , sugiriendo que el 26-OH-Sa-Glu es 2.75 veces más potente que la sarsasapogenina. Un hallazgo relevante en nuestros resultados es que el 26-OH-Sa-Glu no afectó el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas no tumorales a una concentración de 15.9  $\mu\text{g/mL}$ , implicando que el 26-OH-Sa-Glu presenta una actividad antiproliferativa con acción selectiva. No obstante este resultado, sería conveniente en un futuro probar esta saponina en otros tipos celulares no tumorales, como epitelios, células fibroblásticas, hepatocitos, células renales, entre otras. Por otro lado, la mayoría de los compuestos reportados con actividad antiproliferativa también inducen cambios en la morfología (Camacho, 2010; Galicia, 2010; López, 2010; Fernández et al., 2010). El 26-OH-Sa-Glu no es la excepción, éste provocó que las células tumorales disminuyeran su tamaño y presentaran una forma esférica, lo que parece indicar que este compuesto podría inducir una muerte por apoptosis, ya

que esta es una característica fundamental de este tipo de muerte ó bien podría estar afectando la adhesión celular, aunque para afirmar esto sería prudente realizar las pruebas correspondientes en un futuro y así poder aseverar que se ve afectada la adhesión celular. Estas características morfológicas son fuertemente presentadas en células apoptóticas.

Con respecto a la actividad necrótica, no se tienen reportes acerca de un efecto necrótico inducido por la sarsasapogenina o por su derivado TAIII, sin embargo, el 26-OH-Sa-Glu no presentó actividad necrótica temprana (Fig. 14) ni tardía (Fig. 15), en células tumorales, sugiriendo que la sarsasapogenina podría no ejercer una actividad necrótica sobre células tumorales. De igual manera el 26-OH-Sa-Glu no indujo necrosis en células linfocíticas, indicando que el decremento en el número celular observado en las células tumorales tratadas con el esteroide es debido a un proceso diferente a la necrosis y en células no tumorales indica que a las concentraciones utilizadas del esteroide éste no ejerce actividad necrótica sobre estas células. El hecho de que el 26-OH-Sa-Glu no induzca necrosis es muy importante, ya que los efectos secundarios generados por los fármacos antitumorales que se aplican actualmente se debe a su actividad necrótica, que dañan tanto a células tumorales así como a células no tumorales. Es importante mencionar que sería necesario evaluar el efecto inflamatorio del compuesto 26-OH-Sa-Glu en modelos in vivo y así poder tener una relación con el efecto necrótico.

Cabe mencionar que existen reportes de una inducción de apoptosis en células tumorales HepG2 y Hep3B con extractos obtenidos de la planta *Smilax glabra* (Fei et al., 2008) que se sabe es una especie vegetal de la que se extrae la sarsasapogenina. Con respecto a la sarsasapogenina se sabe que induce apoptosis en células tumorales, tal es el caso de las células de hepatocarcinoma HepG2 donde se logró demostrar la liberación de citocromo c que es un proceso crucial en la vía intrínseca de la apoptosis (Ni et al., 2008). También, se tienen registros de inducción de apoptosis por medio del derivado de la sarsasapogenina llamado TAIII donde se demuestra la activación de esta ruta de muerte mediante la activación de la caspasa 3 (King et al., 2008). Estos antecedentes concuerdan con los resultados obtenidos para el compuesto 26-OH-Sa-Glu, los cuales indican que este compuesto induce muerte por apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 activa, además de fragmentar el ADN de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo. Este hecho resulta de gran trascendencia ya que la apoptosis es un tipo de muerte silenciosa, donde las células son eliminadas sin generar un proceso de inflamación ó respuesta inmune exacerbada, como ocurre con los fármacos antitumorales como el cis-platino, entre otros, de modo que no se ha podido evaluar si realmente induce apoptosis (Kaufmann y Earnshaw, 2000). Es

importante mencionar que sería importante realizar ensayos de TUNEL por inmunocitoquímica para poder aseverar una fragmentación de ADN. Los beneficios de un fármaco con actividad inductora de apoptosis no necrótico son fuertemente relevantes, ya que sus efectos colaterales serían leves y de fácil manejo, sugiriendo que este tipo de compuestos podrían ser dignos candidatos para ser evaluados in vivo, con la intención de valorar su potencial terapéutico.

## CONCLUSIONES

El compuesto 26-OH-Sa-Glu reduce la proliferación celular en un 50 % en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo a una concentración de 15.9, 14.1 y 14  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

El compuesto 26-OH-Sa-Glu no induce necrosis en células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.

El compuesto 26-OH-Sa-Glu induce muerte por apoptosis en células HeLa, CaSki y ViBo a través de la activación de la enzima caspasa 3 activa.

El 26-OH-Sa-Glu no afecta el potencial proliferativo ni induce muerte por necrosis en cultivos de linfocitos humanos.

## **PERSPECTIVAS**

Evaluar el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis del compuesto 26-OH-Sa-Glu en más líneas celulares tumorales, tanto de CaCU como otros tipos de cáncer para tener una mayor perspectiva del comportamiento biológico de este compuesto.

Evaluar el efecto del compuesto 26-OH-Sa-Glu sobre una gama de células no tumorales como en células epiteliales del cérvix, en hepatocitos, células renales, entre otras, para poder determinar si este compuesto tiene un efecto selectivo entre células tumorales y no tumorales.

Evaluar el efecto del compuesto 26-OH-Sa-Glu en modelos in vivo.

Evaluar el mecanismo de acción que permita identificar las moléculas participantes, con el fin de entender la manera en que estas moléculas inhiben la proliferación celular, así como la inducción de muerte por apoptosis en células tumorales sin afectar a células no tumorales, mediante la detección de proteínas ó la expresión de genes participantes en las distintas rutas de la muerte por apoptosis.

## REFERENCIAS

1. Abbas A., Lichtman H., Pillai J. (1997). Inmunología celular y molecular, 6ª edición, Editorial Elsevier, pp. 255.
2. Abdel G., El S., Abdel H. (1999), Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*, *Fitoterapia*, Vol.70, no.4, 371-381 pp.
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson D., (2002). *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. España, 505 pp.
4. Algranti E., Buschinelli J., De Capitani E. (2010), Occupational lung cancer, *J Bras Pneumol*, Vol. 36, no. 6, 784 -794 pp.
5. Alnemri E., Livingston D., Nicholson D., Salvesen G., Thornberry N., Wong W. & Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, Vol. 87, 171pp.
6. Alonso R., Lazcano P., Hernández Ávila. (2005), *Cáncer cervicouterino: Diagnostico, prevención y control*, 2ª edición, Editorial Medica Panamericana, 251-253 pp.
7. Álvarez S., López B. (1995), Regulación genética de los papilomavirus humanos genitales. *Salud Pública de México*, Vol. 37, 240 -247 pp.
8. ATCC (2012), Product details. Cell biology: CaSki y HeLa. Consultada: 25 de Febrero 2012. Disponible en: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1550&Template=cellBiology>
9. Attele A., Zhou Y., Xie J., Wu J., Zhang L., Dey L. (2002), Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, Vol. 51, 1851- 1858 pp.
10. Baquiran D., Gallagher J. (2001), *Lippincott's cancer chemotherapy handbook*. 2a edición. Editorial Lippincott Williams y Wilkins Philadelphia, Estados Unidos de América, 129 pp.
11. Becker W., Lewis J., Hardin J. (2007), *El mundo de la célula*, 6a edición, Editorial Pearson, España, 1 pp.

12. Boticario B. (2005). ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer?, *Anal. Real Acad. Nac. Farm.*, Vol. 71, 609-633 pp.
13. Boticario B., Angosto C. (2010), Hipoxia y cáncer, *An. R. Acad. Nac. Farm.* Vol.76, no. 3, 379-408 pp.
14. Burd M. (2003), Human Papillomavirus and Cervical Cancer, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, no 1, 1-17 pp.
15. Camacho Z. (2010). Efecto antitumoral del S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino. Tesis, UNAM. DF México, 54 pp.
16. Castillaa V., Ramírez P., Coto C. (2009). Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Revista Química Viva*, Vol. 1, 56-67 pp.
17. Cuello F., Kato C., Sadarangani K., Saez S., Gejman E., Owen G., Lipkowitz S. (2006), Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducidas por el ligando "TRAIL" en cánceres ginecológicos, *Boletín escuela de Medicina U. C.*, Vol. 31, no 1, 5-15 pp.
18. De la Rosa E., Díaz B., Sánchez N. (2000), Muerte celular Programada: Un proceso clave en la fisiología y patología, *Ciencia al Día Internacional*, Vol. 3, no. 3, 1- 13 pp.
19. Deigner H., Kinscherf R. (1999), Modulating Apoptosis: Current Applications and Prospects for Future Drug Development., *Current Medical Chemistry*, Vol. 6, no. 5, 399-414 pp.
20. Elledge S. (1996), Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* ,Vol. 274, 1664–1672 pp.
21. Fei S., Jian L., Kwok P., Ying Z., Ming Y., Yi T., (2008), Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines, *Chem Biol Interact.*, Vol. 171, no. 1, 1-14 pp.
22. Fernández H., López M., Hernández V., López D., Escobar S., Sánchez S., Pinto B., Sandoval R. (2010). Synthesis of 26-hydroxy-22 oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:2474–2484.



23. Friesen C., Herr I., Krammer P., Debatin K.(1996), Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells, *Nature Med.*, Vol. 2, 574–577 pp.
24. Fulda S., Scaffidi C., Pietsch T., Krammer P., Peter M., Debatin K. (1998), Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells, *Cell Death Diff*, Vol. 5, 884–893 pp.
25. Galicia O. (2010). Efecto del compuesto S-metil-N, N-dietilditiocarbamato-S-óxido (MeDDTC-SO), sobre el potencial proliferativo, muerte y ciclo celular de las líneas tumorales HeLa y CaSki provenientes de cáncer cervicouterino. Tesis, UNAM. DF México.51 pp.
26. Gogvadze V, Orrenius S. (2006) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact.*, Vol.163, 4-14 pp.
27. Goldsby A., Kindt J., Osborne A., Kuby J. (2004), *Inmunología*, 5a edición, Editorial Mc Graw Hill, México, 547 pp.
28. Grossman Z, Herberman R., (1986), Inmune surveillance without immunogenicity. *Immunol Today*, Vol.7, 128-31pp.
29. Hanahan D. Weinberg R. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, Vol.100, 57-70 pp.
30. Hidalgo M. (2006), El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna, *Rev Biomed*, Vol. 17, no. 1, 81-84 pp.
31. Hostettman K., Marston A. (1995), *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. 1a edición, Editorial Copyrighted Material, New York, 548 pp.
32. Hsu Y., Kuo P., Chiang L., Lin C. (2004), Involvement of p53, nuclear factor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines, *Cancer Lett* , Vol. 213, 213–221pp.
33. Hu K., Kobayashi H., Dong A., Jing Y., Iwasaki S., Yao X. (1999), Antineoplastic Agents III: Steroidal glycosides from *Solanum nigrum* , *Planta medica*, Vol. 65, 35-38 pp.

34. Hu Y., Xia Z., Sun Q., Orisi A., Rees D. (2005), A new approach to the pharmacological regulation of memory: sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models, *Brain Res*, Vol. 1060, 26-39 pp.
35. INEGI (2011). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 9 de enero del 2012. Disponible en: HYPERLINK "<http://www.inegi.gob.mx>" [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
36. Iracheta L. (2007) El suicidio y la muerte celular, *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.*, Vol 101, no. 2, 1-33 pp.
37. Jordan J. (2003), Apoptosis: Muerte celular programada, *Bioquímica*, Vol. 22, no. 6, 100- 106 pp.
38. Karp G. (1996), *Biología celular y molecular*, 1a edición, Editorial Mc Graaw Hill, México, 658 pp.
39. Karp G. (2006), *Biología celular y molecular*, 4a edición, Editorial Mc Graw Hill, México, 4-6 pp.
40. Kaufmann H., Earnshaw W.(2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, Vol. 256:42–49.
41. Kaufmann H., Gores J. (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure, *BioEssays*, Vol. 22, no. 11, 1007-1017 pp.
42. Kerr J., Wyllie A., Currie A. (1972), Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, Vol. 26, 239-257 pp.
43. Keys H., Bundy B., Stehman F., (1999), Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma, *N Engl J Med.*, Vol.340, 1154-1161 pp.
44. King L., Cheong S., Nam C. (2008), Timosaponin A-III Induces Autophagy Preceding Mitochondria-Mediated Apoptosis in HeLa Cancer Cells, *Cancer Research*, Vol. 68, 10229-10237 pp.
45. Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., (1992), Papillomavirus L1 major capsid protein self – assembles into virus – like particles that are

- highly immunogenic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, no. 24, 12180–12184 pp.
46. Konoshima T., Waller G., Yamazaki K. (1996), Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, Vol. 404, 87-100.
  47. Kopnin P. (1999), Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis, Biochemistry (Moscow), Vol. 65, no. 1, 2-27 pp.
  48. Koutsky L., Ault K., Wheeler C. (2002), A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. New England Journal of Medicine, Vol. 347, no. 21, 1645–1651 pp.
  49. Kumar S., Weaver V. (2009), Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell, Cancer Metastasis Rev, Vol. 28, no 1-2, 113–127 pp.
  50. Laguna J., Piña G., Martínez M., Pardo V., Riveros R. (2009), Bioquímica de Laguna, 6ª edición, Editorial El manual Moderno, México, 457-458 pp.
  51. Lazcano P., Rascon P., Lozano A., Velasco M. (1997), Mortality from cervical carcinoma in Mexico: Impact of screening 1980-1990, Acta cytol., Vol. 40, no. 3, 506-512 pp.
  52. Lockshin R., Zakeri Z. (2001), Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory, Nature reviews, Vol. 2, 545-550 pp.
  53. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A., Krieger M., Scott P., Zipursky L., Darnell J., (2005), Biología celular y molecular, 5ª edición, Editorial Medica Panaamericana, 854-864 pp.
  54. López D. (2010). Efecto antitumoral de los esteroides diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (26-OH-Di) y diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 $\alpha$ -coleston-3 $\beta$ -diilo (26-OH-He) en la línea tumoral de cérvix CaSki. Tesis. UNAM. México. 63 pp.
  55. Lozano J., Galindo J., Borrón G., Liarte M., Peñafiel R., Solano F., Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud, 2ª edición, Editorial McGraw Hill, España, 326 pp.
  56. Majno G., Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, necrosis an overview of cell death. American Journal of Pathology, Vol. 146, 3-16 pp.

57. Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C. (2010), Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents, *Fitoterapia*, Vol. 81, no. 7, 703–714 pp.
58. Marker R. (1940), Sterols. CV. The Preparation of Testosterone and Related Compounds from Sarsasapogenin and Diosgenin, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 62, no. 9, 2543–2547 pp.
59. Marker R., Rohrmann E., (1939), Sterols LXXXI. Conversion of Sarsasapogenin to Pregnanediol-3( $\alpha$ ),20( $\alpha$ ), *J. Am. Chem. Soc.*, Vol 61, no.12, 3592–3593 pp.
60. Marker R., Rohrmann E. (1940), Sterols LXXXVIII. Pregnanediols from Sarsasapogenin, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.62, no.3, 518–520 pp.
61. Melo A., Montenegro H., Hooper T., Capurro V., Roa S., Roa E. (2003), Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma de cuello uterino en mujeres de la IX región – Chile, *Rev. Méd.* Vol. 131, 1382-1390 pp.
62. Menéndez H., Hernández R. (1999), Oncogénes y cáncer, *Rev Cubana Oncol*, Vol.15, no. 2, 131-139 pp.
63. Monroy G., Rangel C., Rocha Z., Trejo B., Ramírez G., Martínez R., Weiss-Steider B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Revista Mexicana de Oncología*, Vol. 7, 69–76 pp.
64. Moreno M., Rodríguez V. (1981), *Phytochemistry*, Vol. 20, 1446-1447 pp.
65. Morgan S., Darling D. (1993). *Cultivo de las células animales*, Editorial Acriba, España, 159 pp.
66. Moya S., Gómez E., Aragón V., Garza P. (2006) Detección y tipificación mediante Biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales, *Rev Esp Quimioterap*, Vol. 19, no. 2, 161-166.
67. Muller H.,(1927), Artificial transmutation of the gene, *Science*, Vol. 66, 84–87 pp.

68. Müller M., Strand, S., Hug H., Heinemann E., Walczak H., Hofmann W., Stremmel W., Krammer P., Galle P. (1997), Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1-Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53, *J. Clin. Invest.*, Vol. 99, 403–413 pp.
69. National Cancer Institute (2012), National Institutes of Health. U.S.A. Consultada: 25 de Febrero del 2012, Disponible en: <http://www.cancer.gov/>.
70. Nelson D., Cox M. (2009), *Principios de Bioquímica*, 5ª edición, Editorial Omega, 5-11 pp.
71. Ni Y., Gong X., Lu M., Chen H., Wang Y. (2008), Mitochondrial ROS burst as an early sign in sarsasapogenin-induced apoptosis in HepG2 cells, *Cell Biology International*, Vol. 32, 337-343 pp.
72. Noriega G., Noriega L. (2008), El tratamiento actual del cáncer cervicouterino, *Ginecol Obstet Mex.*, Vol. 76, no. 2, 131-139 pp.
73. Organización Panamericana de la SALUD (2002). Situación del CaCu en la América. PAHO: Consulta 25 de Febrero de 2012, Disponible en: [www.paho-org/Spanish/ad/dpc/nc/cancer](http://www.paho-org/Spanish/ad/dpc/nc/cancer).
74. Panduro A. (2000), *Biología Molecular en la Clínica*, Editorial McGraw-Hill. México, 130-140 pp.
75. Pierce B. (2005), *Genética: Un enfoque conceptual*, 2a edición, Editorial Medica Panamericana, España, 24 pp.
76. Porter A., Urbano A. (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death? *Bioessays* 28: 834-843 pp.
77. Preston R., Williams G. (2005). DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard, *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 673–683.
78. Rao A., Gurfinkel D. (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, Vol. 17, 211–235 pp.
79. Ren L., Luo Y., Li X., Zuo D., Wu Y. (2006), Antidepressant-like effects of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge (Liliaceae), *Biol Pharm Bull*, Vol. 29, 2304-2306 pp.

80. Roitt M., Delves J. (2003), Inmunología Fundamentos, 10a edición, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 440 pp.
81. Schinoni I., Paraná R. (2006), Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado, Acta Gastroenterol Latinoam, Vol.. 36, no 4, 211-217 pp.
82. Serman F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. perspectivas en prevención y tratamiento, Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología, Vol. 67, no 4, 318-323 pp.
83. Shen H., Pervaiz S. (2006) TNF receptor superfamily- induced cell death: redox-dependent execution, Faseb J., Vol. 20, 1589-1598 pp.
84. Socarrás S. (2001), Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica, Revista Cubana De Investigación Biomédica, Vol. 20, no 4, 266-274 pp.
85. Solomon P., Berg R., Martin W. (2001), Biología, 5ª edición, Editorial Mc Graw Hill, México, 74 pp.
86. Starr C., Taggart R. Evers A., Starr L., Betancourt P., Moreno C. (2008), Biología: La unidad y diversidad de la vida, 11a edición , Editorial Cengage Learning, México, 142 pp.
87. Takechi M., Kousaka Y., Uno C., Tanaka Y. (1998), Biological activities of synthetic triterpenoid and steroid beta-D-glucopyranosyl-(1-->2)-alpha-D-glucopyranosides, Planta Med., Vol. 64, no. 2, 179 pp.
88. The Royal College of Radiologists, Consulta interactiva de datos, Guide to job planning in clinical oncology, Consultada el 11 Marzo 2012. Disponible en: [www.rcr.ac.uk](http://www.rcr.ac.uk)
89. Tirado G., Betancourt M., Cervantes L., Carrancá G., Marina F., Borges G. (2005), Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas, Salud pública de México, Vol. 47, no. 5, 342- 350 pp.
90. Toro M., Morelva C., (2006). Caracterización inmunofenotípica del cáncer de cuello uterino asociado a la infección por virus papiloma humano (HPV). Tesis, Universidad de Valencia, España. 332 pp.

91. Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J., Beneytout J. (2005), Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 13, 1141-1149pp.
92. Vaux D., Weissman I., Kim S. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2, *Science*, Vol. 258, 1955-1957.
93. Velázquez M., Andrade M., Lagunas M., Zajgla M., (2004), SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis, Vol 23, no. 2, 64-70 pp.
94. Vermeulen K., Bockstaele V., Berneman N. (2003), The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif.*, Vol. 36, 131-149 pp.
95. Villaverde N. (2006), *Genética Humana*, Editorial Pearson, España, 17-18 pp.
96. Wade G. (2004), *Química Orgánica*, 5ª ed., Editorial Pearson Prentice Hall, Madrid, 1171 pp.
97. Walboomers J., Jacobs M., Manos M., Bosch F., Kummer J., Shah K. (1999), Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol*, Vol. 189, 12-9 pp.
98. Wenna B., Haifeng P., Min L., Yuan N., Rui Z., Xingguo G. (2007), The apoptotic effect of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* on HepG2 human hepatoma cells, *Cell Biology International*, Vol. 31, 887-892 pp.
99. Yamasaki Y., Ito K., Enomoto Y., Sutko J. (1987), Alterations by saponins of passive calcium permeability and sodium-calcium exchange activity of canine cardiac sarcolemmal vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 897, 481–487 pp.
100. Zhou J, Sun X., Stenzel D., (1991), Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. Vol.185, no. 1, 251–257 pp.

101. Zhou Y., García P., Carney D., Xu R., Pelicano H., Kang Y., Yu W., Lou C., Kondo S., Liu J., Harris D., Estrov Z., Keating M., Jin Z., Huang P. (2005). OSW-1: a natural compound with potent anticancer activity and a novel mechanism of action. J Natl Cancer Inst, Vol. 97,1781–1785 pp.

## FUENTES ELECTRÓNICAS

1. <http://fyqicod.blogspot.mx/2010/09/celulas-3-eso-material-descargable.html>
2. [http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celular\\_Ciclo.html](http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celular_Ciclo.html)
3. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=4672&showAllSites=true>.
4. <http://www.aurorahealthcare.org/yourhealth/healthgate/getcontent.asp?URLhealthgate=%22103616.html%22>
5. <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Met%C3%A1stasis>
6. <http://www.spog.org>.



## **APÉNDICE**

### **Verseno**

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

Tris base 3.04 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de sodio 8.00 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de potasio 0.04 g (SIGMA, U.S.A)

Etilen- diamen- tetra- acético (EDTA) 0.40 g (SIGMA, U.S.A)

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

### **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

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

Cloruro de sodio 8.00 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de potasio 0.20 g (SIGMA, U.S.A)

Fosfato mono-ácido de sodio 2.16 g (SIGMA, U.S.A)

Fosfato di-ácido de potasio 0.20 g (SIGMA, USA)

El Cloruro de Sodio se disuelve, el Cloruro de Potasio, el Fosfato mono-ácido de sodio y el Fosfato di-ácido de potasio se disuelven en 900 ml de H<sub>2</sub>O bi-destilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

### **Colorante Cristal Violeta**

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

### **Desactivación del suero**

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone,U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 40 ml. para su mejor uso y manipulación.

### **Glutaraldehído**

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

### **Solución de ácido acético (10 %)**

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

### **Paraformaldehído (2 %)**

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

**Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).**

<b>Sales inorgánicas</b>	<b>Cantidad (g/l)</b>
Nitrato de Calcio • 4H <sub>2</sub> O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0.8
<b>Aminoácidos</b>	
L-Arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina • 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-iso-leucina	0.05
L-leucina	0.05
L-Lisina • HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02

L-serina	0.03
L-treonina	0.02
L-triptófano	0.005
L-Tirosina • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.02883
L-valina	0.02
<b>Vitaminas</b>	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
myo-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
ácido p-aminobenzoico	0.001
D-ácido pantoténico (hemicalcium)	0.00025
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
<b>Otros</b>	
Glutación (reducido)	0.001
Rojo de fenol • Na	0.0053
Bicarbonato de Sodio NaHCO <sub>3</sub>	2