



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

Efecto antitumoral de la saponina esterooidal O -[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido de (25*R*)-espirost-5-en-3 β -ilo (Diosgenina Di) en líneas celulares de cáncer cervicouterino

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:
MAURICIO MISAEI GONZÁLEZ BALLESTEROS



DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Luis Sánchez Sánchez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **GONZÁLEZ BALLESTEROS MAURICIO MISAEL**, con número de cuenta **306085192**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **4** del mes de **junio** de 2013 a las **16:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO Biól. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE M. en C. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE M. en C. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA



El título de la tesis que presenta es: **Efecto antitumoral de la saponina esteroideal O-[α-L-ramnopiranosil(1→4)]-β-D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3β-ilo (Diosgenina Di) en líneas celulares de cáncer cervicouterino.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 08 de mayo de 2013.

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

"Aunque la disposición química e interacción de los átomos y moléculas forman los bloques de construcción de la vida, **la cualidad misma de la vida, surge a nivel celular.** De manera que la célula es la unidad más pequeña de la vida y hemos sabido de ellas durante tanto tiempo en nuestra vida que hemos dejado de estar conscientes de lo extraordinarias que son en realidad" – Biología: ciencia y naturaleza. Audesirk T, *et al.*, 2003.

"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad."
(Julio Verne)

**"Quien con monstruos lucha cuide de convertirse a su vez en monstruo.
Cuando miras largo tiempo a un abismo, el abismo también mira dentro de ti."**
(Friedrich Nietzsche)

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad."
(Albert Einstein)

**"Cuando alguien evoluciona, también evoluciona todo a su alrededor...
Cuando tratamos de ser mejores de lo que somos, todo a nuestro alrededor también se vuelve mejor."**
(Paulo Coelho)

**"Sacúdete el miedo, ¡Mira hacia adelante!
Avanza, nunca dudes.
Huye y morirás, duda y morirás."**
(Tensa Zangetsu - Bleach)

**"Me dejaron escoger, ¿te lo conté alguna vez?
Escogí al Spartan que quise. Ya me conoces. Investigué, observé mientras te convertías en el soldado que necesitábamos que fueras.
Al igual que los demás, eras fuerte, rápido, valiente; un líder nato.
Pero tú tenías algo que los demás no tenían: algo que solo vi yo.
¿Lo adivinas? Suerte."
(I.A. Cortana – Halo 3)**

DEDICATORIAS:

Porque a pesar de todo el trabajo y esfuerzo, los logros y éxitos no poseen el mismo valor, si no tienes a las personas importantes de tu vida a tu lado, muchas gracias por estar conmigo.

A mi madre Ma. de los Ángeles por ser mi amiga, por escucharme, comprenderme, orientarme, por superar conmigo toda adversidad y creer en mi aun cuando yo dejaba de hacerlo. Por todo tu esfuerzo, trabajo, amor y dedicación todos mis logros también son tuyos. MUCHAS GRACIAS MAMÁ

A mi familia, Hipólito, Armando, Maribel, Daniela, Edith, Paola, Ángel y mis primitas por el inmenso amor y apoyo que demostraron sobre todo en los momentos más difíciles de mi juventud, por su paciencia y su fortaleza a lo largo de nuestras vidas juntos. Gracias.

A Lore, por su amistad invaluable, sinceridad, por compartir conmigo y el mundo su sonrisa la cual trae tanta alegría y cambia el color de nuestras vidas, muchas gracias por siempre hacerme saber que puedo confiar en ti.

A Viri, por siempre estar a mi lado, dándome todo tu cariño y comprensión, por cada hermoso momento que hemos vivido en este tiempo y darme ánimos cuando más lo necesitaba.

A mis amigos, a Lore Lupita, Marlene, Guadalupe, Fernando, Rogelio, Héctor, Giovanni, Diego, Karen, Anita, Yuritzi, Ana, Claudia, Natalia, Moy, Deborah, por todas esas parrandas, risas, buenos y malos momentos, fiestas, bromas, consejos, diversión, y su amistad de tantos años.

A mis mentores: Enrique Gil, Samuel Campos Lince, Hortensia Rosas Acevedo, María del Carmen Salgado Merediz, José Misael Vicente Hernández Vázquez, Hugo López Muñoz, Carlos Castillejos Cruz, Leticia Morales Ledesma, y a todos quienes comenzaron a sembrar la curiosidad del saber, muchas gracias por toda su paciencia, dedicación y conocimientos que me ha permitido formarme.

"Los momentos divertidos, los momentos tristes... Cada uno de ellos debemos compartirlos juntos. La felicidad de uno es la felicidad de todos, la ira de uno es la ira de todos y las lágrimas de uno son las lágrimas de todos. Porque eso significa ser un gremio, una familia y un amigo."

(Master Makarov - Fairy Tail)

A Lorena García Téllez

Siempre has estado a mi lado, tanto en las buenas como en las malas, por aconsejarme en mis momentos difíciles, por prestarme tu apoyo cada vez que lo necesito y por acompañarme en mis alegrías y tristezas, por mostrarme tu cálida sonrisa, porque ese es tu legado "una sonrisa" tu esencia queda impregnada en el alma, de cualquier persona que llegue a conocerte, gracias por todos esas risas y momentos inolvidables, eres una persona muy importante y especial, quien iba a pensar en ese momento, cuando nos presentaron que conocería a la mejor de mis amistades, No era mi intención pero te conocí, y desde ese día no nos hemos separado. Más que las amistades y los recuerdos, me une a ti tu corazón tan enorme que tienes (tan grande que caben todas las razas de perros), tu forma de ser, y tu simpatía. Muchas gracias por todo

A mis mejores amigas

Lupita, Marlene, y Lore; hay tantos momentos, tantas risas, en todo este tiempo. Son personas maravillosas con las que uno puede contar, gracias por estar aquí. Con ustedes supe lo que es apreciar una verdadera amistad, que no se encuentra todos los días. Muchas gracias por confiarme tus secretos y por guardar los míos, por alegrarme todos los días, gracias por estar en todos mis momentos difíciles, gracias por dejarme entrar a su corazón, por perdonar mis errores, por demostrarme que la vida es reír y amar, por enojarse cuando debían hacerlo, gracias por ser así como son, en fin hay tanto así que gracias por todo. Ustedes significan para mi más de lo que las palabras pudieran expresar.

"Nuestro corazón no está dentro de nuestros cuerpos.

Cuando pensamos en algo, o nos preocupamos por alguien, ahí es donde nuestros corazones están. Si fueras la única persona en el mundo entero, entonces tu corazón no estaría en ninguna parte. No hay nada de qué preocuparte. Si deseas con todas tus fuerzas quedarte aquí, aquí se quedará tu corazón. "

(Kaien Shiba – Bleach)

AGRADECIMIENTOS:

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

Al Biol. José Misael Vicente Hernández, por sus enseñanzas durante mi formación en el laboratorio, su paciencia, tiempo, sus anécdotas, y por compartir su valioso conocimiento conmigo, que me han llevado a considerarlo no solo un gran mentor, también un amigo.

Al M. en C. Hugo López Muñoz, por compartirme su experiencia, conocimientos, por siempre tener el tiempo de apoyarme a resolver mis dudas.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por compartir sus conocimientos y brindarme parte de su tiempo para poder realizar ésta tesis.

A los miembros del jurado:

- **M en IBSH Angélica Flores Ramírez**
- **M. en C. Luis Sánchez Sánchez**
- **Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez**
- **M. en C. Hugo López Muñoz**
- **M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava**

Por apoyarme que con sus aportaciones y observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo, permitiéndome concluirlo satisfactoriamente.

A la Dra. María Antonieta Fernández Herrera y al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, y al grupo de investigadores del laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por sintetizar y otorgar el compuesto para realizar el presente trabajo.

Al Dr. René García Sánchez, jefe de enseñanza del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, y al Dr. Dionisio Parra Roldán jefe del departamento de ginecología y perinatología del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, por habernos facilitado las muestras de cuello uterino con las que se realizó éste trabajo.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
La célula	3
Ciclo celular	4
Regulación del ciclo celular	6
Muerte celular	9
Necrosis	10
Apoptosis	11
<i>Vía extrínseca</i>	14
<i>Vía intrínseca</i>	14
Cáncer	16
Cáncer cervicouterino	20
Virus de papiloma humano	24
Tratamientos contra el cáncer	27
Cirugía	27
Radiación	28
Quimioterapia	28
Vacunas	29
Saponinas Esteroidales	30
Dioscina	32
Diosgenina	33
Diosgenina Di	33
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
IV. JUSTIFICACIÓN	36
V. HIPÓTESIS	37
VI. OBJETIVOS	38
VII. MATERIAL Y MÉTODO	39
VIII. RESULTADOS	47
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
X. CONCLUSIONES	68
XI. PERSPECTIVAS	69
XII. REFERENCIAS	70
XIII. APÉNDICE	76
XIV. CONGRESOS	80

I. RESUMEN

El cáncer tiene un importante impacto social y económico en el sistema de cuidado de la salud humana y es una de las principales causas de muerte en el mundo. En México el INEGI estimó que la mayor cantidad de defunciones, en el 2011 a causa de tumores malignos, en el caso de las mujeres fueron el cáncer de mama y cervicouterino (CaCu). No obstante el éxito de las terapias actuales contra el cáncer, éstas resultan ser ineficientes en pacientes terminales, costosas, poco selectivas y con efectos colaterales graves, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, las plantas han dado importantes avances en el tratamiento de numerosas enfermedades y muchos medicamentos derivados de ellas se encuentran actualmente en uso o bajo investigación para su tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer. En particular, las saponinas esteroideas, las cuales poseen una amplia gama de actividades biológicas entre las que destaca su actividad antitumoral y apoptótica en diversas líneas celulares de cáncer. Un ejemplo de éstas son la dioscina y la Diosgenina, ambas se han encontrado en las raíces de las especies *Dioscorea composita* y *Dioscorea floribunda*, las cuales muestran actividad antiproliferativa y proapoptótica en células HeLa (CaCu) en la línea celular HL60 de leucemia humana y HeL 92.1.7 y K562 (eritroleucemia), 1547 (osteosarcoma), HepG2, y HuH-7 (carcinoma hepatocelular), HCT-116, HT-29 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama), entre otras. Sin embargo, actualmente se han encontrado nuevas saponinas que requieren ser evaluadas como agentes con potencial antitumoral. Al respecto, la Diosgenina Di de la cual en el 2004 se encontró que inhibe la proliferación de células de cáncer humano, A2780 (adenocarcinoma de ovario), A431 (carcinoma epidermoide), A549 (adenocarcinoma de pulmón), HCT-15 (carcinoma de colon) y K562 (eritroleucemia), también induce apoptosis en las células HCT-15. No obstante esta información, la mayoría de los trabajos descritos de esta saponina carecen de evaluación en células no tumorales que permita determinar si este esteroide posee acción selectiva y de igual manera se desconoce su efecto en células de cáncer cervicouterino, por ello, en el presente estudio se evaluó la actividad antitumoral de la saponina esteroidea *O*-[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo (Diosgenina Di) en líneas celulares de

CaCu. Los resultados obtenidos muestran que la Diosgenina Di afecta el potencial proliferativo en las líneas de CaCu: HeLa, CaSki y ViBo, con una CI_{50} de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente a 24 horas del tratamiento. Interesantemente, el efecto antiproliferativo en las células no tumorales (de cérvix y linfocitos humanos) fue significativamente menor, 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 no tumorales (linfocitos y células no tumorales de cérvix) tratados con la Diosgenina Di, sugiere que esta saponina no induce muerte por necrosis tanto en células tumorales como en no tumorales. De igual manera, la Diosgenina Di indujo en estas líneas tumorales un cambio morfológico resaltando la compactación celular, la forma esférica, la pérdida de las proyecciones citoplasmáticas así como la observación de cuerpos apoptóticos, que junto con la detección de la caspasa 3 activa, indican que el compuesto induce a dichas células a una muerte por apoptosis. Además, el incremento en especies reactivas de oxígeno en los cultivos tratados con el fitoesteroide sugiere que la muerte apoptótica podría ser inducida a través de esta vía. Estos resultados le confieren a la Diosgenina Di ser considerado como un compuesto con actividad antitumoral de acción selectiva digno de ser evaluado en modelos *in vivo* con la intención de establecer su potencial terapéutico.

II. MARCO TEÓRICO

La célula

La célula es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos (Nelson y Cox, 2009), donde los procesos que asociamos a los organismos tienen su origen en ésta. Las actividades cotidianas como la protección, ingestión, digestión, absorción de metabolitos, eliminación de desechos, movimiento, reproducción e incluso la muerte, son reflejo de procesos similares que ocurren en cada una de las células; de modo que para que un organismo pluricelular crezca y se desarrolle adecuadamente requiere de una meticulosa regulación de las acciones antes mencionadas (Fig. 1) (Ross y Wojciech, *et al.*, 2007; Wayne, *et al.*, 2007).

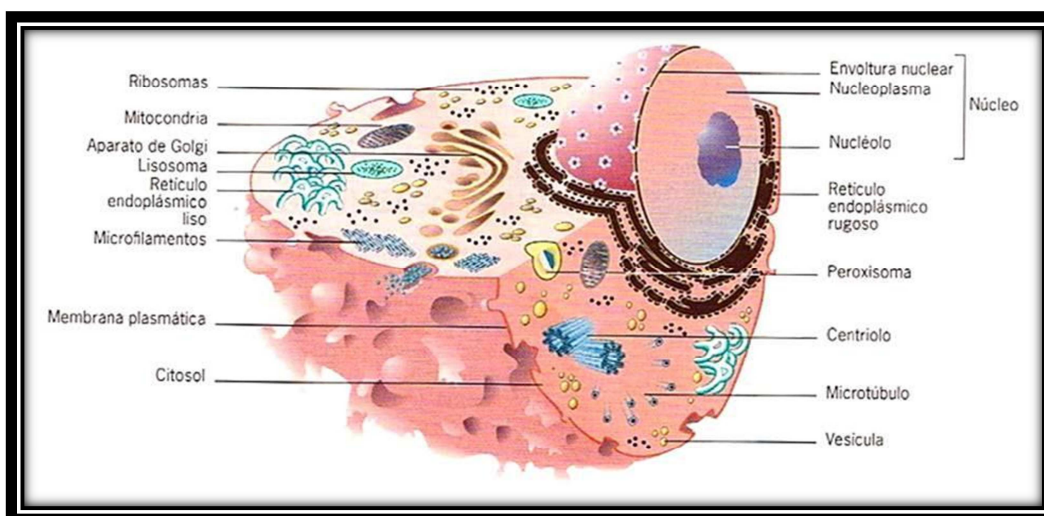


Fig. 1. Esquema general de una célula animal donde se muestra su interior y cada uno de sus organelos (Tomada y modificada de Karp, 2011).

Las células crecen, se desarrollan, reproducen y mueren dependiendo de las condiciones del medio que las rodea, es decir, su ciclo de vida está regulado por el medio ambiente (Alberts, *et al.*, 2008).

En 1855 el patólogo alemán Rudolf Virchow establece el tercer principio de la teoría celular el cual menciona: "*Las células proceden sólo por la división de otras preexistentes*". A este proceso se le conoce como ciclo celular.

Ciclo celular

Consiste en un intervalo de biosíntesis y crecimiento activo donde la célula aumenta su masa y contenido, seguido por un episodio relativamente breve de división nuclear (cariocinesis) que suele ir acompañado por la división del citoplasma (citocinesis) y la formación de una nueva frontera o límite para separar los núcleos y el citoplasma en un par de células hijas (Avers, 1996). El proceso debe estar controlado finamente, tanto en términos de determinar qué células se tienen que dividir y cuándo, como en saber cuándo debe parar. Las células poseen genes de control del ciclo celular; la función correcta de estos genes no sólo determina nuestro tamaño, sino que también evita que las células se dividan incontroladamente y desarrollen un cáncer (Bolsover, *et al.*, 2004). Para su estudio y comprensión se divide en dos fases principales, éstas son la interfase y la fase M (mitosis). El estadio inicial del ciclo, llamado interfase (que a su vez se subdivide en fase G1, S y G2) puede considerarse como el intervalo entre dos divisiones celulares (Fig. 2).

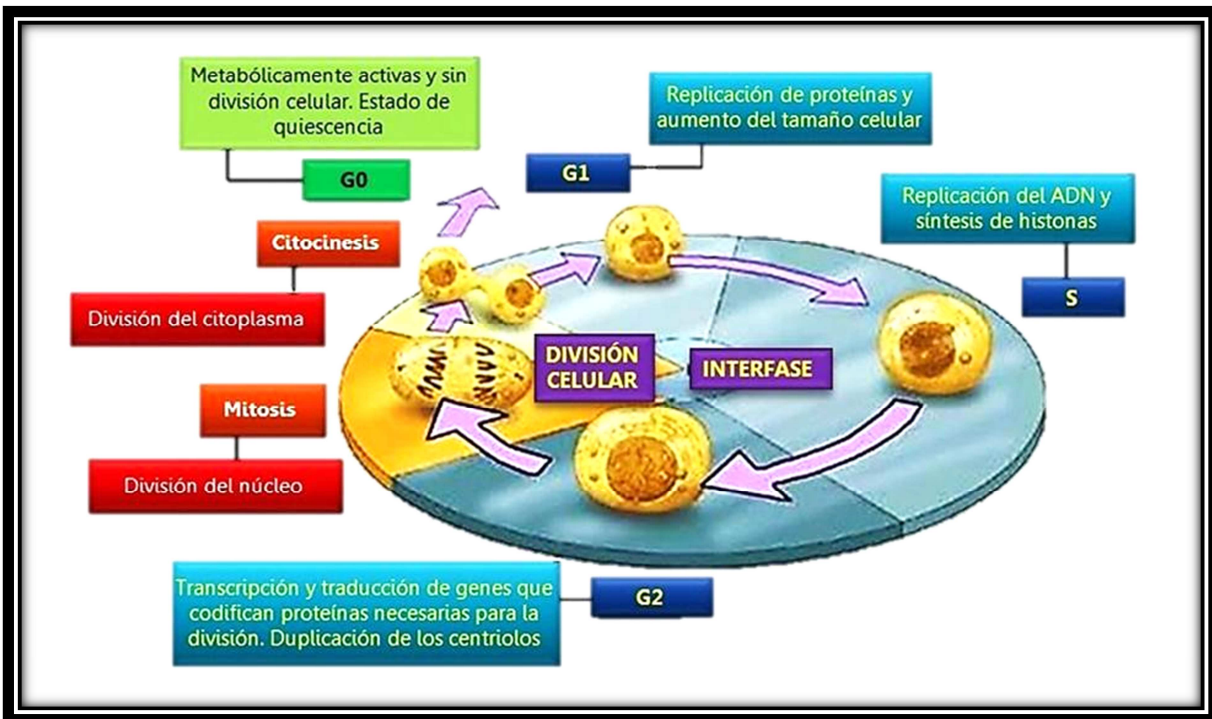


Fig. 2. Representación del ciclo celular el cual se divide en dos fases principales, éstas son la interfase y la fase M. La interfase se subdivide en G1, S, G2; en donde la fase S se genera la síntesis del ADN. La fase M incluye los eventos sucesivos de cariocinesis y citocinesis (Tomada y modificada de <http://biogenmol.blogspot.mx/2008/08/ciclo-celular.html>; Karp G., 2011).

La actividad bioquímica en la interfase se dedica al crecimiento celular y su funcionamiento normal, así como la replicación del ADN de cada cromosoma. El periodo en el que se sintetiza el ADN se denomina fase S y tiene lugar antes de que la célula inicie la mitosis. Existen dos periodos durante la interfase, antes y después de la fase S, en los que no se sintetiza ADN. Estas fases se denominan G1 y G2. En ambas fases, así como durante la fase S, hay intensa actividad metabólica, crecimiento celular. Hacia el final de la G2, el volumen celular prácticamente se ha duplicado, el ADN se ha replicado y se ha iniciado la mitosis (fase M). Citológicamente, la interfase se caracteriza por la ausencia de cromosomas visibles; en su lugar es evidente que el núcleo diferenciado está lleno de fibras de cromatina, que se han formado a medida que los cromosomas se han descondensado y dispersado después de la mitosis anterior. Una vez que se han completado G1, S y G2, se inicia la mitosis (Klug, *et al.*, 2006).

El término mitosis proviene de la palabra griega "*hebra*". Lo acuñó el biólogo alemán Walther Flemming para describir a los cromosomas que aparecían en forma misteriosa en las células animales justo antes de dividirse en dos. Es un proceso de división nuclear en el que las moléculas replicadas de ADN de cada cromosoma se reparten con exactitud en dos núcleos (cariocinesis). La mitosis suele acompañarse de la citocinesis, un proceso por el que una célula en división se separa en dos, con lo que el citoplasma se divide en dos paquetes celulares. Por tanto, la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para el crecimiento y el mantenimiento de un organismo. Por lo general, la mitosis se divide en cuatro etapas: *profase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*, cada una caracterizada por una serie particular de sucesos (Karp, 2011).

El final de la mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G1 o puede que la célula entre en G0 la cual no es una fase del ciclo celular si no que corresponde a un estado de reposo especial característico de algunas células, en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Lomanto, *et al.*, 2003). Al incremento del número de células por división, se le llama proliferación celular, por lo cual es muy importante que este regulado este proceso, para mantener una homeóstasis en el organismo.

El paso a través del ciclo celular se regula por las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) 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 y Cox, 2009).

Regulación del ciclo celular

La progresión del ciclo de división celular está controlada por un grupo de genes, denominados genes del ciclo de división celular "*cdc*", que pueden dividirse en dos grandes grupos. Primeramente, los genes que codifican proteínas necesarias para la progresión del ciclo (enzimas y precursores de la síntesis de ADN, enzimas para la síntesis y ensamblajes de las tubulinas del huso, etc.) y los que codifican proteínas que regulan positiva o negativamente el ciclo celular (Paniagua, *et al.*, 2007).

Los genes que regulan positivamente el ciclo corresponden a los denominados protooncogenes. Este sistema está a cargo principalmente de dos grupos de proteínas que son el producto de los protooncogenes y trabajan en asociación: las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés: Cyclin dependent kinases). Los genes que regulan negativamente el ciclo, reciben en conjunto el nombre de genes de verificación o en mamíferos genes supresores tumorales; los cuales tienen como misión asegurar la dependencia, entre dos procesos secuenciales del ciclo celular, es decir que no se continúe el proceso más allá de un punto si en este, se ha producido una alteración del proceso normal. Su principal función es asegurar la fidelidad del genoma durante su replicación y segregación (Paniagua, *et al.*, 2007). Dichos genes pertenecen a un sistema que regulan la progresión del ciclo celular y cumplen con varias funciones: en primer lugar deben asegurar que los eventos relacionados con cada fase del ciclo se lleven a cabo en el momento y en la secuencia apropiada, además deben asegurar, que la fase del ciclo se haya completado adecuadamente antes de que se inicie la siguiente, y por último, deben responder a las señales positivas o negativas al crecimiento y la duplicación (Wayne, *et al.*, 2007).

Entre los genes de verificación se encuentran los que codifican a los siguientes productos:

- Proteínas que previenen mutaciones de genes reguladores del ciclo.
- Proteínas inductores de la salida del ciclo, hacia un estado celular diferenciado o bien hacia la apoptosis. Entre las cuales se encuentran la *Bad*, la *Bax* y la *Bak*.
- Proteínas que inactivan las CDK por fosforilación o desfosforilación como la cinasa *Wee*, que fosforila los aminoácidos Thr 14 y Tyr 15 causando la inactivación de la CDK.
- Proteínas inhibidoras del ciclo tales como:
 - Un grupo de proteínas inhibidoras de las CDK como las proteínas p21 y p16, que interaccionan con las CDK.
 - La proteína del Retinoblastoma (*Rb*), que en su forma no fosforilada actúa como un represor génico al capturar los factores de transcripción necesarios para la replicación de ADN, y así, inhibe el paso de G1 a la fase S. La fosforilación de la proteína *Rb* provoca la liberación de estos factores y desencadena una trama compleja de señales en la que intervienen varios protooncogenes (*ras*, *c-myc*, *c-fos*).
 - La proteína p53 resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, desencadenando la detención del ciclo celular (Wayne B., *et al.*, 2007) en G1 al activar la síntesis de p21, la cual inhibe la formación de complejos CDK-ciclina y evita la fosforilación de la proteína *Rb*. También induce muerte celular por apoptosis, mediante la represión del gen *bcl-2*, o la activación de los genes *Bad*, *Bax* y la *Bak*. (Paniagua, *et al.*, 2007).

Este grupo de moléculas, son puntos de transición claves en el ciclo celular. Se sabe que en los mamíferos existen de manera general al menos tres los cuales requieren de ciertas condiciones para poder superarlo (Fig. 3):

1. Transición G1-S: factores de crecimiento, nutrientes, tamaño celular e integridad en el ADN.
2. Transición G2-M: tamaño celular, integridad del ADN original y del recién sintetizado.
3. Transición Metafase-Anafase: la adecuada unión de los cromosomas al huso mitótico.

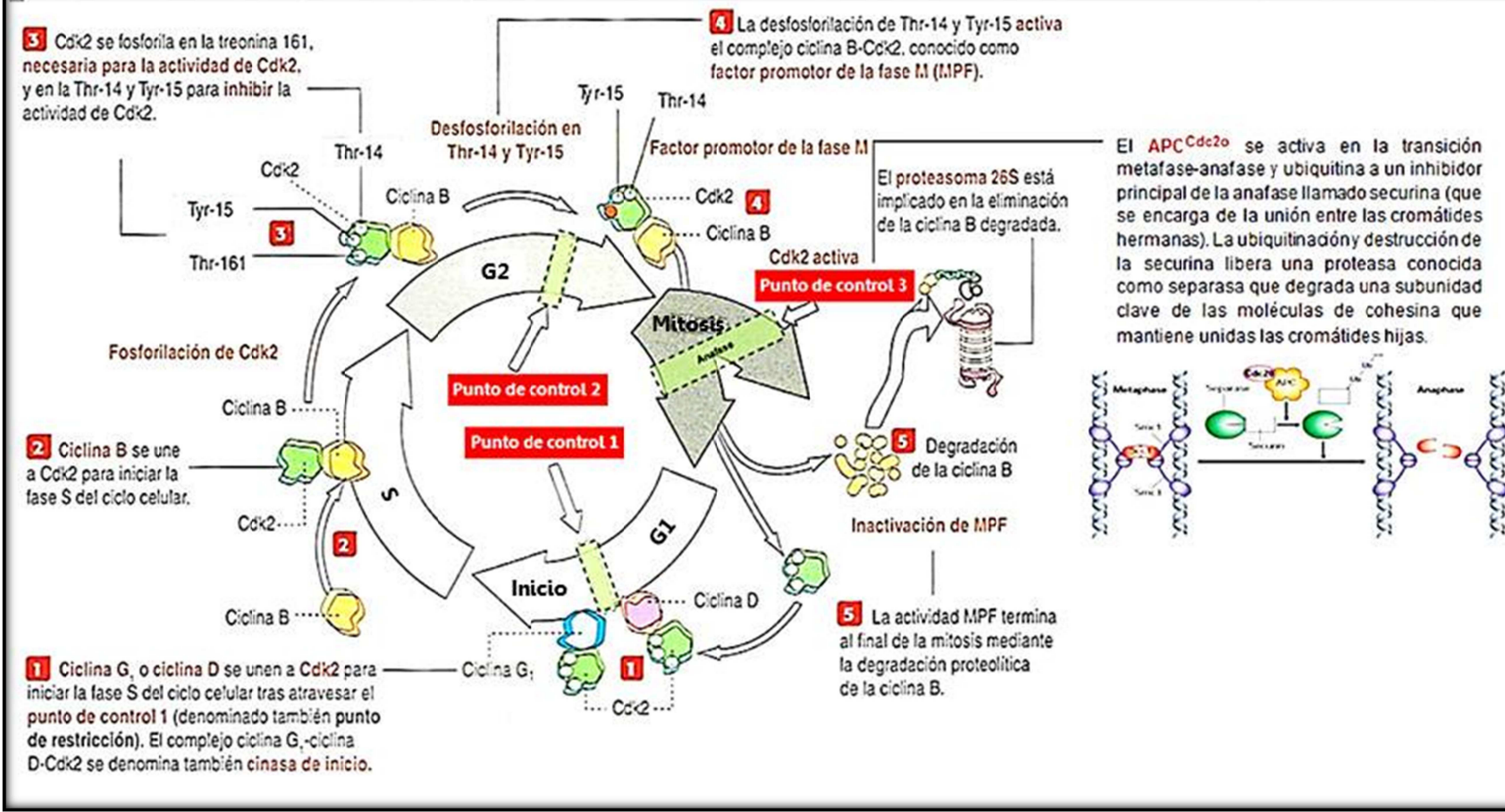


Fig. 3. Regulación del ciclo celular. Una gran variedad de moléculas supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular, regulando los puntos de transición claves en el ciclo celular (Tomado y modificado de Kierszenbaum, 2008).

Cuando las condiciones de las que depende superar algún punto de transición del ciclo de división no se cumplen, la maquinaria celular tratará de subsanar el daño; de no ser posible enmendar la afección, se puede desencadenar un proceso regulado de muerte (Wayne, *et al.*, 2007).

Muerte celular

Las células de los organismos pluricelulares son miembros de una comunidad sumamente organizada (Alberts, *et al.*, 2008). Por lo tanto, se ven reguladas, por los ritmos de proliferación como por los de muerte. Una anomalía en cualquiera de estos ritmos puede causar trastornos por acumulación celular (por ejemplo hiperplasia, cáncer, enfermedades autoinmunes) o trastornos por pérdida celular (por ejemplo; enfermedades degenerativas, isquemia, lesión, inmunodeficiencia). De tal manera, que el equilibrio entre proliferación celular y muerte debe mantenerse con precisión (Ross y Wojciech, *et al.*, 2007). Durante el desarrollo y también en el estado adulto, hay numerosas células que se deterioran y mueren. La muerte celular es un proceso fisiológico o patológico que conduce a la eliminación celular y que tiene una función esencial en la homeostasis de los tejidos y en los estados patológicos (Raff, 1998). Sin embargo, existen diferentes tipos de muerte celular, los cuales presentan características específicas y el comité de nomenclatura sobre la muerte celular o NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) en 2012 propuso una serie de recomendaciones para la definición de las distintas morfologías de muerte celular (Galluzzi, *et al.*, 2012), describiendo a catástrofe mitótico (Vitale, *et al.*, 2011), anoikis (Wen, *et al.*, 2011), parthanatos (Wang, *et al.*, 2011), netosis (Remijsen, *et al.*, 2011), entosis (Overholtzer, *et al.*, 2007), necroptosis (Galluzzi, *et al.*, 2012), cornificación (Corrales, *et al.*, 2010) pyroptosis (Kepp, *et al.*, 2010) y autofagia (Fulda, 2012); y los dos tipos, más estudiados de muerte celular que se reconocen en los organismos son la necrosis y la apoptosis, presentando diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia (Fig. 4) (Robbins, *et al.*, 1993).

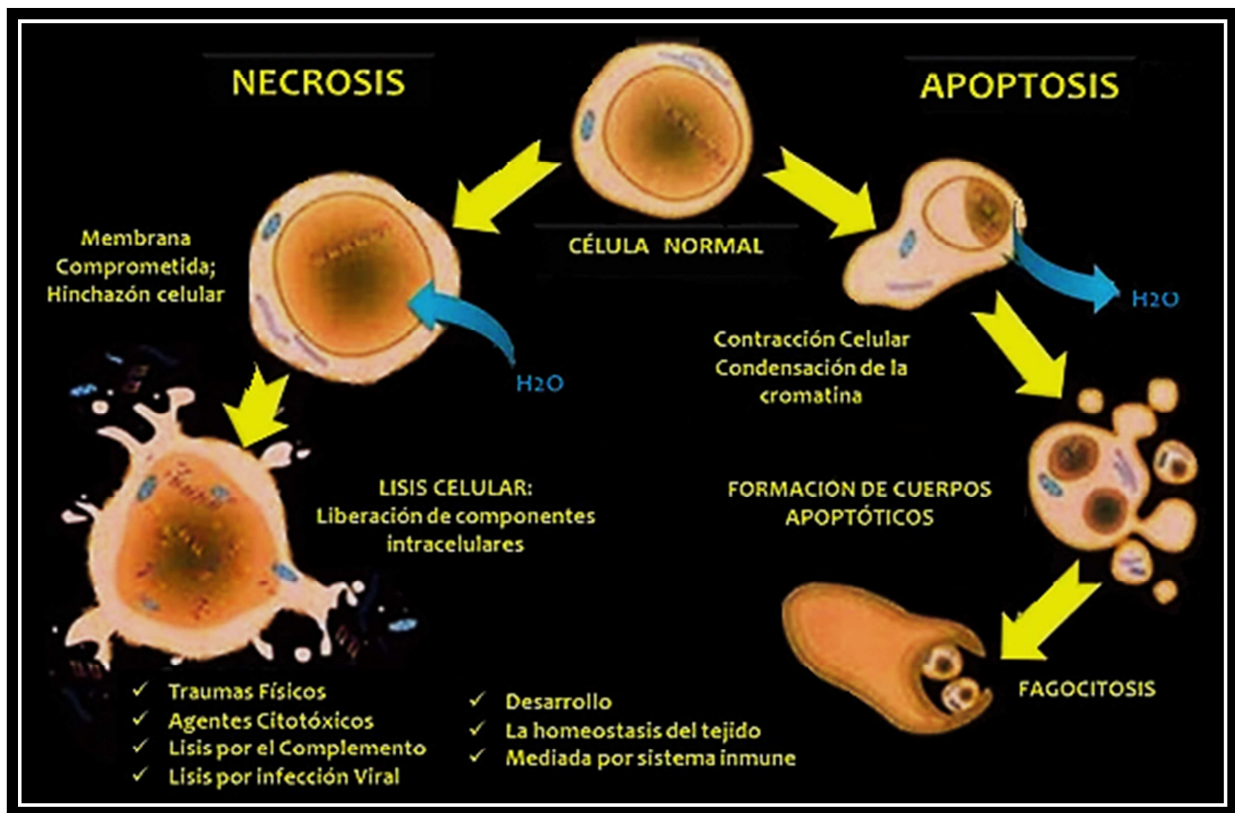


Fig. 4. Muertes celulares que se presentan habitualmente en el organismo: necrosis y apoptosis. Se muestran sus características morfológicas y bioquímicas (Tomada y modificada de <http://medicinembbs.blogspot.mx/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>).

Necrosis

La necrosis (del griego *nekrós* "muerte") es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia (Lizarbe, 2007). Puede ser definida como un evento degenerativo producido por un daño repentino y severo. Dentro de los factores desencadenantes pueden citarse la isquemia, la hipertermia, hipotermia severa, traumas físicos, químicos, radiación, pH bajo, hipoxia, así como concentraciones de agentes tóxicos. Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintivas: los cambios tempranos incluyen un aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células del tejido circundante.

La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar (Sánchez, 2003).

En condiciones fisiológicas el daño de la membrana plasmática también puede ser iniciado por virus, sustancias como el complemento o las proteínas llamadas perforinas (Fig. 4) (Ross y Wojciech, 2007).

La pérdida en la integridad de la membrana genera la liberación de toda la gama de enzimas localizadas en el citoplasma celular, un ejemplo es la lactato deshidrogenasa o LDH. Esta enzima corresponde a la categoría de las oxidorreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD⁺. Se encuentra distribuida en el citoplasma celular de casi todos los tejidos. Su contenido es especialmente alto en los riñones, el cerebro, el hígado, el músculo esquelético y el cardíaco, los eritrocitos y los tejidos tumorales. Las concentraciones de esta enzima en los tejidos son unas 500 veces superiores a las existentes en el plasma, por lo que incluso pequeños daños tisulares pueden provocar la liberación de la enzima y aumentar su concentración en plasma de forma significativa (Fuentes, *et al.*, 1998).

Apoptosis

El término apoptosis, del griego ἀπόπτωση "*caída*" de las hojas de los árboles o los pétalos de las flores, se acuña en 1972 por John F. Kerr, Andrew H. Wyllie y Alistair R. Currie (Kerr, *et al.*, 1972). Se considera a la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte (inherente al desarrollo celular), que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas, o por estimulaciones exógenas. Estas pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas, dando como resultado la activación de un programa genético que conduce generalmente, a la nucleólisis por la acción de las endonucleasas (Taylor, *et al.*, 2008).

Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes mecanismos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasis, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario (Arango, *et al.*, 1997).

La apoptosis está definida por una serie de distintas alteraciones morfológicas y bioquímicas, y ocurre en dos fases: la primera es un compromiso de muerte celular seguida de una fase determinada por dramáticos cambios morfológicos estereotipados en la estructura de la célula; así ocurre la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, compactación de los organelos, dilatación del retículo endoplásmico, disminución en el volumen celular, formación de vesículas y fusión con la membrana plasmática, y alteración en la membrana plasmática donde hay una translocación de la fosfatidilserina a la superficie celular que va actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitan la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación, Fig. 4 (Solary, *et al.*, 1996).

La apoptosis, como proceso activo dependiente de energía, se puede iniciar por una gran variedad de estímulos, intracelulares o extracelulares, participando las células en su propia muerte de una forma organizada y eficiente. Citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor*), radiaciones, falta de señales hormonales o de factores tróficos son algunos ejemplos de estímulos extracelulares que inducen apoptosis. Mitosis incompleta, incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO), de calcio citoplasmático o daños irreparables del ADN mediados por la molécula p53 son ejemplos de señales intracelulares (Lizarbe, 2007).

El programa de apoptosis se desarrolla en varias etapas. En la primera, etapa efectora o de determinación, la célula reacciona ante un estímulo determinado o ante su ausencia (señales de desarrollo, estrés celular, alteración del ciclo celular, etc.) decidiendo iniciar el proceso de apoptosis. En la segunda, etapa de ejecución o degradativa, la célula sufre un conjunto de alteraciones moleculares que desencadenan la muerte celular. A éstas hay que añadir la fase de limpieza o eliminación de los cuerpos apoptóticos, (Fig. 5) (Taylor, *et al.*, 2008).

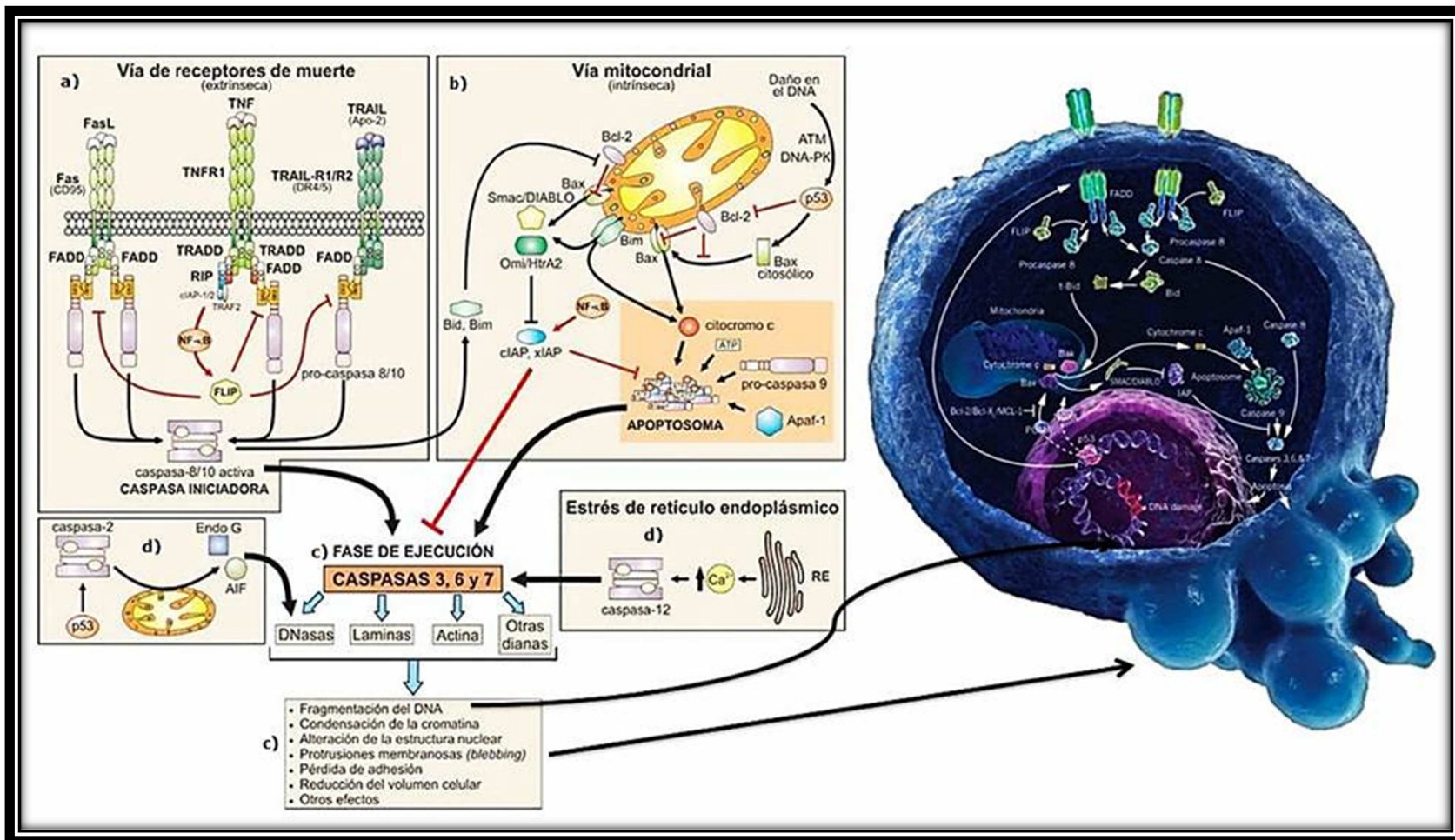


Fig. 5.- Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis. a) Vía extrínseca b) Vía intrínseca c) Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras, que son las desencadenantes de los diversos procesos celulares que conducen finalmente a la muerte celular por apoptosis, d) existen otras vías de activación como la que produce la activación dependiente de p53 de la caspasa 2 que, a su vez, induce la liberación mitocondrial de la oxidorreductasa AIF y la endonucleasa mitocondrial EndoG, que se dirigen al núcleo y promueven la degradación de nucleosoma de la cromatina. Otra vía es por el estrés del retículo endoplásmico en la que se altera la homeostasis de calcio; en esta ruta está implicada la caspasa-12 (Tomada y modificada de Lizarbe, 2007; <http://www.bioncology.com/biological-pathways/apoptosis/index.html>).

Vía extrínseca (o de los receptores de muerte)

Es la ruta de señalización del proceso de apoptosis que tiene su origen en la membrana celular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar el receptor con el resto de la maquinaria apoptótica. La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos (citoquinas proapoptóticas y proinflamatorias como FasL, TNF, etc.) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1, TRAILR1, etc.). La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular (Lizarbe, 2007).

Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Ese proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte DD (Death Domain) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína FADD (Fas Associated Death Domain). Así, se forma un complejo de señalización de muerte que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 o 10. La caspasa 8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras (Lizarbe, 2007). Una de ellas, la caspasa-3 que a su vez puede eliminar un dominio de la proteína Bid, amplifican la señal de muerte celular ya que causa daño a la mitocondria. (Taylor, *et al.*, 2008).

Vía intrínseca (o mitocondrial)

El orgánulo mediador central de una segunda vía es la mitocondria, que también puede ser mediador de la necrosis y de la autofagia. En este organelo se lleva a cabo la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PMPT) facilitando la salida de iones calcio de la matriz mitocondrial al citosol, el colapso del potencial ($\Delta\Psi$) de la membrana mitocondrial, el aumento en la producción de ERO y la depleción del GSH (glutatión reducido), del ATP y

del ADP en la matriz mitocondrial (Dubin y Stoppani, 2000). Las ERO como: superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, son potentes promotores de la apoptosis. La sobreproducción de ERO puede ser también la consecuencia de una expresión exagerada de la proteína p53 (Dubin y Stoppani, 2000), las que causan peroxidación lipídica y daños en la membrana (Orrenius, 2007).

Una gran parte de estímulos apoptóticos (estrés celular, drogas, radiaciones, agentes oxidantes, etc.) utilizan esta segunda ruta de señalización que se conoce como la vía mitocondrial o intrínseca, que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. En esta vía se llevan a cabo cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, causando la liberación al citoplasma de más de 40 moléculas implicadas en la apoptosis. Entre ellas se liberan diversas proteínas apoptogénicas como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G, entre otras. La liberación del citocromo c es un evento crítico ya que éste interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1). Esta última actúa como molécula adaptadora en esta vía, con dATP y, posteriormente con la procaspasa-9. Se forma el megacomplejo heptamérico conocido como apoptosoma que ejecuta el programa apoptótico. La formación del complejo conduce a un cambio conformacional y activación de la procaspasa 9 que, a su vez, rompe el prodominio de caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7, activándolas (Riedl y Salvesen, 2007).

La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es compleja. Y se puede iniciar a través de distintas vías dependiendo del estímulo recibido por la célula. Una vez iniciada la señal, ésta se transmite a través de distintas proteínas adaptadoras (Taylor, *et al.*, 2008).

Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas, que cortan a la proteína diana detrás de un residuo de aspártico, de ahí el nombre que reciben (cystein-dependent-aspartate-directed-proteases). Entre ellas, la caspasa más prevalente en la célula es la caspasa 3, la cual es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con la caspasa 6 y 7. Éstas son, en último término, las que degradan una amplia gama de sustratos durante la apoptosis (Lizarbe, 2007).

Entre las dianas de las caspasas se puede destacar a ICAD/DFF45 (Inhibitor of Caspase Activated DNase/ADN Fragmentation Factor 45) molécula que mantiene inhibida a la desoxinucleasa activada por la caspasa responsable de la degradación del ADN durante la apoptosis), y proteínas estructurales como las láminas nucleares los microfilamentos de actina y la citoqueratina (Lizarbe, 2007).

Cáncer

El término cáncer, proviene de "cangrejo" en latín, y fue acuñado por Hipócrates en el siglo V a.C. para describir enfermedades en las que los tejidos crecen y se diseminan de manera incontrolada por todo el organismo (Bolsover, *et al.*, 2004). Estas son producidas por cambios en la conducta de las células provocada por modificaciones en la información genética subyacente en las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales. En tanto el crecimiento del tumor permanezca delimitado, la enfermedad en ordinario se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y del tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar metástasis, es decir, células que se desprenden de la masa original entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (Karp, 2011).

Los genes que participan en la carcinogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma cuyos productos proteicos están implicados en actividades celulares como la progresión a través del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN y la adherencia entre las células vecinas (Karp, 2011). Estos genes se dividen en dos grandes categorías: oncogenes y genes supresores de tumores. Un oncogén, es un gen cuya presencia puede desencadenar el desarrollo del cáncer. Algunos oncogenes se introducen en las células por virus que causan cáncer, mientras que otros surgen por la mutación de genes celulares

normales. En cualquier caso, los oncogenes codifican proteínas que estimulan la proliferación celular excesiva y/o promueven la supervivencia celular. Los oncogenes surgen por mutación de genes celulares normales denominados protooncogenes. El término protooncogén se denomina a los genes que intervienen en la regulación positiva de los procesos involucrados en la proliferación celular, y por lo tanto, al presentarse mutaciones dominantes, lo que se provoca en potenciar su función, tales mutaciones pueden bloquear o afectar puntos de inducción de degradación, dominios de regulación negativa. Al contrario que los oncogenes, cuya presencia puede inducir la formación de cáncer, la pérdida o inactivación de los genes supresores de tumores puede también conducir al cáncer. Estos actúan como frenos en el proceso de la proliferación celular, mientras que los oncogenes funcionan como aceleradores de la proliferación (Wayne, *et al.*, 2007). Douglas Hanahan y Robert Weinberg en 2011 propusieron que las células tumorales presentan las siguientes características:

- *Autosuficiencia en señales de crecimiento.* Las células normalmente no proliferan si no se estimulan apropiadamente por un factor de crecimiento. Las células cancerosas escapan de estos requerimientos a través de la acción de oncogenes que producen cantidades excesivas o versiones mutadas de proteínas implicadas en las rutas estimuladoras del crecimiento.
- *Insensibilidad a las señales anticrecimiento.* Los tejidos normales están protegidos de la proliferación celular excesiva por una variedad de mecanismos inhibidores del crecimiento. Las células cancerosas deben evadir tales señales anticrecimiento si quieren continuar proliferando. La mayoría de las señales anticrecimiento actúan durante la parte final de G1 y ejercen sus efectos a través de la proteína Rb, cuya fosforilación regula el paso a través del punto de restricción hacia la fase S.
- *Evasión de la apoptosis.* La evasión de la apoptosis, que destruiría las células genéticamente dañadas, es crucial para la supervivencia de las células cancerosas. Con frecuencia, esto se lleva a cabo por la existencia de mutaciones con pérdida de función

en el gen supresor de tumores p53, que altera la vía principal de reparación o por la que si el ADN resulta dañado se desencadenaría la apoptosis.

- *Potencial replicativo sin límite.* El efecto global de los tres rasgos precedentes es desacoplar a las células cancerosas de los mecanismos que normalmente equilibran la proliferación celular con las necesidades de nuevas células del organismo. Sin embargo, esto no aseguraría la proliferación ilimitada en ausencia de un mecanismo de reincorporación de secuencias teloméricas que se han perdido de los extremos de cada cromosoma en cada ciclo de replicación del ADN. El mantenimiento de los telómeros, se consigue activando el gen codificador de la telomerasa, pero unas pocas células cancerosas activan un mecanismo alternativo para mantener los telómeros que implica el intercambio de información de las secuencias entre cromosomas. En cada caso, las células cancerosas, mantienen la longitud de los telómeros por encima de un umbral crítico y retienen de ese modo la capacidad para dividirse indefinidamente.

- *Angiogénesis sostenida.* En ausencia de un aporte sanguíneo, los tumores no crecerán más allá de unos pocos centímetros de diámetro. De esta manera, en algún punto del desarrollo temprano del tumor, las células cancerosas deben desencadenar la angiogénesis. Una estrategia común implica la activación de los genes que codifican a estimuladores de la angiogénesis combinada con la inhibición de genes que codifican a inhibidores de la angiogénesis. Por ejemplo: los oncogenes *ras* desencadenan el aumento en la expresión de los genes que codifican al activador de la angiogénesis VEGF.

- *Invasión del tejido y metástasis.* La capacidad para invadir tejidos circundantes y metastatizar en lugares alejados es la característica definida que diferencia un cáncer de un tumor benigno. Las células cancerosas muestran tres propiedades que desempeñan un papel crucial en estos acontecimientos: la adhesión célula a célula disminuida, motilidad aumentada y la producción de proteasas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. La adhesividad disminuida se produce con

frecuencia por cambios en la E-cadherina, que se pierde en la mayoría de los cánceres epiteliales o bien por mutación, expresión génica disminuida o destrucción de la propia E-cadherina (Weinberg y Hanahan, 2011).

Entre otras características se encuentran la inestabilidad genómica, la evasión de la senescencia celular, las alteraciones epigenéticas que modifican los genes relacionados con el cáncer, las alteraciones de la proliferación y diferenciación celular por microRNA, las alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa y la glutamina, la participación de las *stem cells* cancerosas en el mantenimiento de la proliferación celular, también de las células estromales en el microambiente tumoral, y las alteraciones en la presentación antigénica e inmunosupresión en el microambiente tumoral (Valdespino y Castillo, 2010).

Existen factores biológicos, químicos y físicos que contribuyen al desarrollo del cáncer. Dentro de los biológicos se encuentran los virus como el virus de papiloma humano que causa cáncer cervicouterino, el virus Epstein-Barr para linfoma de Burkitt, o algunas bacterias como *Helicobacter pylori* para cáncer de estómago (Wayne B., et al., 2007). En los químicos se puede mencionar sustancias cancerígenas como el benceno y dentro de los físicos se encuentra los rayos UV, todos muestran una propiedad común, provocan de manera directa cambios en el genoma, sin embargo la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen (Alberts, et al., 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2008 que la principal causa de muerte en el mundo es el cáncer (7.6 millones de casos), localizados en su mayoría en pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2008), mientras que en México el INEGI estimó que la mayor cantidad de defunciones en el 2011 a causa de tumores malignos fueron para los hombres pulmón y próstata mientras que en el caso de las mujeres fue en mama y cervicouterino (Fig. 6) (INEGI, 2012).

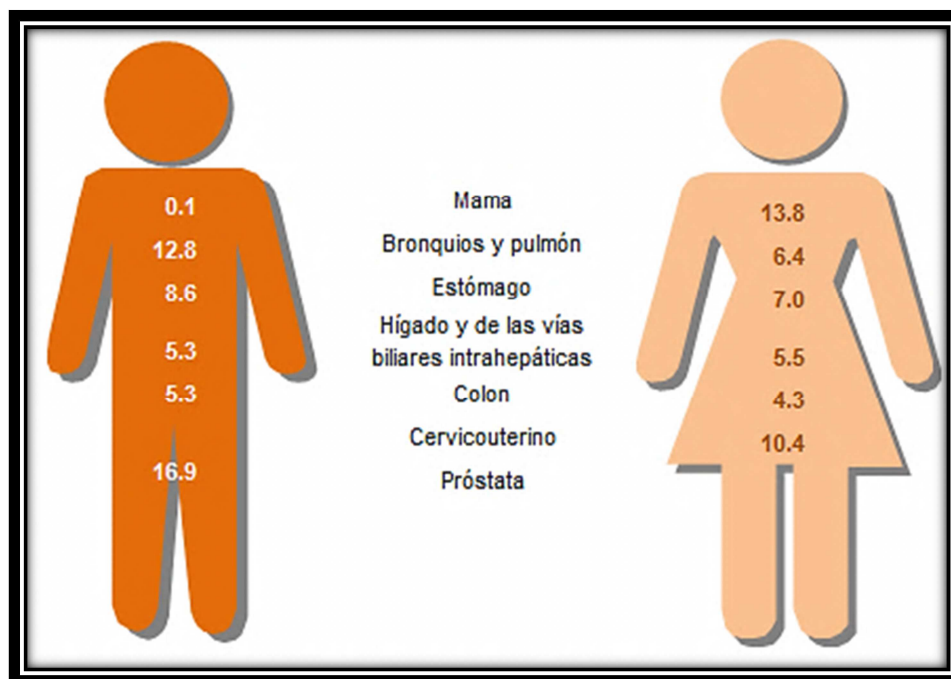


Fig. 6.- Porcentaje de defunciones en población de 20 años y más por tumores malignos según sexo en el 2011 (Tomado de INEGI 2012 estadísticas de mortalidad).

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) o carcinoma del cérvix es una enfermedad en la que se presentan cambios en las células que cubren las paredes del cuello uterino (porción muscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina). Estas células inicialmente normales, a la postre se convierten en precancerosas (Castillo, *et al.*, 2011). Es un tumor epitelial, que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La dispersión de la parte superior de la vagina, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación.

Los casos de CaCu primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano o glandular. Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en grado de diferenciación y características morfológicas (López y Marcela, 2006). De acuerdo a la OMS, el CaCu es el segundo tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial en la mujer (OMS, 2012).

El CaCu está caracterizado por una fase premaligna bien definida, la cual puede ser detectada por examen citológico de células cervicales exfoliadas (prueba de Papanicolaou)

Los cambios premalignos cervicales representan un espectro de anomalías histológicas que van desde una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) 1 (displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) y NIC 3 (displasia severa/carcinoma *in situ*) hasta cáncer invasivo, (Fig. 7) (Zaldívar, *et al.*, 2012).

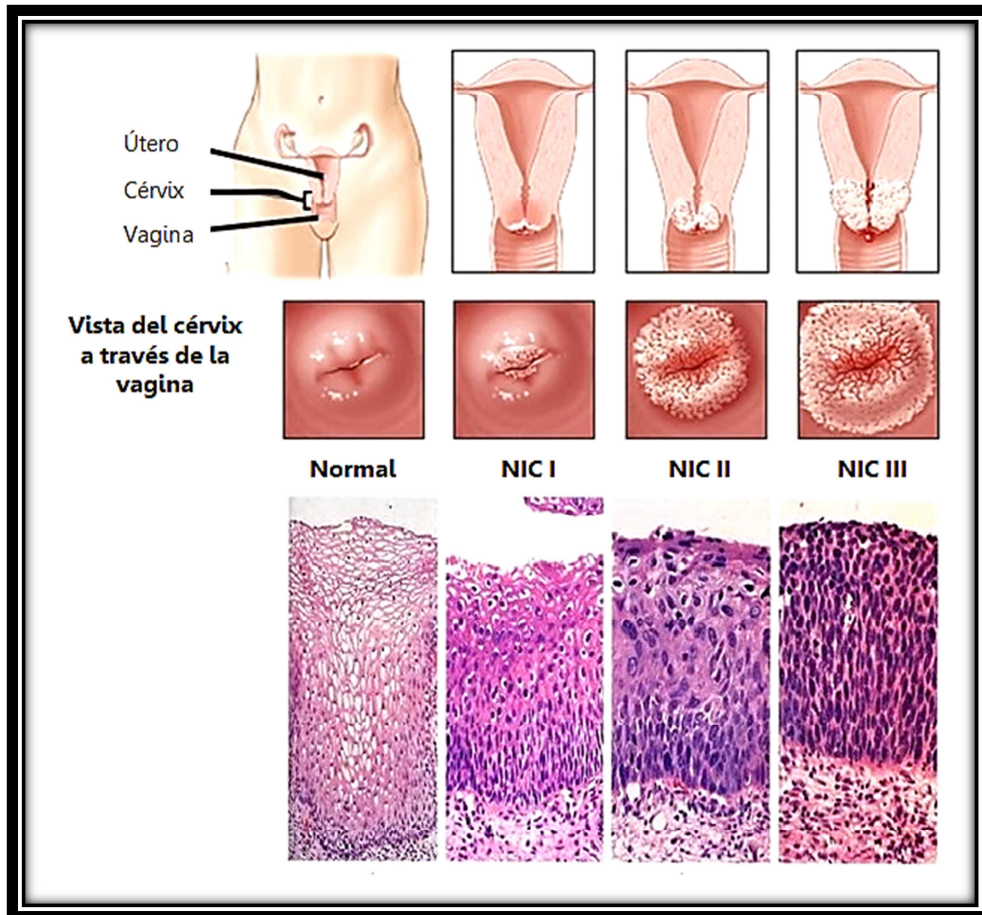


Fig. 7.- Los cambios premalignos cervicales que van desde una NIC 1 (displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) y NIC 3 (displasia severa/carcinoma *in situ*) según la clasificación de Bethesda (Tomada y modificada de: http://cancer-cervix-honduras.webatu.com/web_images/estados_de_cervix.jpg)

Se reconocen dos tipos histológicos principales: el epidermoide espinoso celular o de células escamosas y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical. El resto lo constituyen los carcinomas adenoescamosos y de células pequeñas, los cuales son relativamente raros (Lazcano, *et al.*, 2005).

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocido como un factor etiológico para el desarrollo del CaCu (Zaldívar, *et al.*, 2012).

Se han descrito más de 120 tipos de VPH y aproximadamente una tercera parte de ellos son capaces de infectar el epitelio del tracto genital (Moody y Laimins, 2010). Otros tumores relacionados con el VPH son del canal anal, vagina, vulva, pene y de boca, de tal manera que se ha estimado que el VPH es responsable del 5.2% de todos los cánceres en el mundo (Muñoz, *et al.*, 2007).

El 99.8% de los casos de CaCu se deben a tipos específicos de VPH. El enlace entre el CaCu y el VPH fue demostrado a principios de los años 80 por el doctor Haraldzur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad (López y Marcela, 2006).

La asociación observada entre VPH y el CaCu, está entre las más consistentes de las identificadas en cancerología humana, existiendo un consenso creciente en calificarla como causa necesaria, pero insuficiente, ya que no todas las infecciones por VPH persisten o progresan a CaCu (Tejada, *et al.*, 2007).

Los factores determinantes que se conocen para que esta progresión ocurra, son:

1. Factores dependientes del virus:

- *Tipo viral.* Dependiendo de los tipos virales, de alto riesgo o bajo riesgo forma un factor determinante en el desarrollo del cáncer (López y Marcela, 2006).
- *Persistencia de la infección en exámenes repetidos.* La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocitos (López y Marcela, 2006).
- *Carga viral por unidad celular.* Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales (Tejada, *et al.*, 2007).

2. Factores ambientales:

- *Anticoncepción hormonal oral.* Cuando se consumen durante cinco años o más, aunque el riesgo tiende a desaparecer en los 5 años siguientes a la interrupción del consumo (Castellsague y Muñoz, 2003). La región larga de control, (LCR por las siglas en inglés: *Long Control Region*) en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroides como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al ADN viral (López y Marcela, 2006).
- *Multiparidad.* Cuando se tienen más de 5 embarazos a término. Este factor junto con el anterior, sugieren una asociación positiva entre VPH y esteroides (López y Marcela, 2006).
- *Tabaquismo.* Se han aislado sustancias carcinogénicas presentes en el tabaco en el moco cervical, aunque no se conoce bien la dinámica de la interacción (López y Marcela, 2006).
- *Actividad sexual a temprana edad.* Es un conocido factor de riesgo. La prevalencia de VPH más alta comprende las edades inmediatas al inicio de las relaciones, y responde a los patrones de comportamiento sexual de la comunidad (López y Marcela, 2006).
- *Coinfecciones.* La *Chlamydia trachomatis* parece ser un cofactor que actúa por inducción de inflamación crónica y metabolitos mutagénicos. El Herpes simple tipo 2 también parece actuar como cofactor, con una evidencia algo más dudosa (Tejada, *et al.*, 2007). También citomegalovirus (CMV) herpes virus humanos tipos 6 y 7 (López y Marcela, 2006).
- *Deficiencias nutricionales y bajos niveles de antioxidantes* son otros factores propuestos (Tejada, *et al.*, 2007).
- *Estado inmunológico.* Además de la pérdida de inmunidad natural con la edad, los polimorfismos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y del gen supresor tumoral p53 son otros determinantes inmunológicos de susceptibilidad (Tejada, *et al.*, 2007).

- *Múltiples parejas sexuales.* Hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH (López y Marcela, 2006).
- *Predisposición genética.* Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (Tejada, *et al.*, 2007).

Virus de papiloma humano

El VPH, pertenece a la familia *Papillomaviridae*, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV). Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles (López y Marcela, 2006). Infecta la piel y mucosas como la cavidad bucal (Jiménez, *et al.*, 2001), produciendo proliferaciones epiteliales benignas o papilomas que pueden transformarse a malignas, por lo que su identificación es muy importante (Bekkers y Melchers, 2002).

Los VPH son virus pequeños, de 50 a 52 nm de diámetro, con ADN de doble cadena. Aunque el genoma viral puede variar ligeramente entre los diferentes tipos de VPH, se acepta que típicamente contienen cerca de 8 pares de bases. (Hebner y Laimins, 2006; Doorbar, 2006). La cápside del virus está formada por dos proteínas: la L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes, la proteína L2 es un componente menor del virión y se cree que puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión (Zaldívar, *et al.*, 2012). Esta proteína L2 interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad (Martinic y von Herrath, 2008).

Se subdividen en grupos de alto y bajo riesgo oncogénico. Dentro de los de alto riesgo, cabe destacar los tipos 16 y 18, que juntos se estima son responsables de aproximadamente el 70% de los casos de CaCu invasivo, y que están en más del 50% de los carcinomas basaloide y verrugoso de vulva, pene, y vagina, y en más del 50% de carcinomas de ano. Entre los tipos de VPH de bajo riesgo, hay que destacar el 6 y 11, que cursan predominantemente con condilomas acuminados y papilomatosis laríngea (Tejada, *et al.*, 2007). La infección por VPH requiere que las partículas virales accedan a la capa basal epitelial y penetren a las células basales en división. Es bien conocido que previo a que los VPH establezcan una infección, tienen que experimentar un complicado proceso para unirse y entrar a la célula huésped (Richards, *et al.*, 2006).

Cuando se produce una erosión o microtrauma en la capa superficial de los epitelios diana, se facilita que el virus pueda penetrar en las células de la capa basal, donde amplifica su genoma, expresando las proteínas E1, E2, E6 y E7 (Tejada, *et al.*, 2007). Las células en la capa basal consisten en troncales y en tránsito que se están dividiendo continuamente y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales. La infección de estas células por el VPH conduce a la activación de la expresión en cascada de los genes virales que provoca la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosómicas del ADN viral por célula. Este promedio de número de copias es establemente mantenido en las células basales indiferenciadas a través del curso de la infección (Zaldívar, *et al.*, 2012). Una vez en el interior celular, el genoma viral es dirigido al núcleo, donde se replica en forma episomal o replicación tipo plásmido; sin embargo cuando ya se ha generado el carcinoma de cérvix, el genoma viral puede encontrarse integrado al genoma celular, preservando siempre los oncogenes E6 y E7 y perdiendo o interrumpiendo uno o más genes virales. Las proteínas tempranas E6 y E7 son responsables de la transformación carcinogénica provocada por los virus de alto riesgo. La proteína E6 impide la translocación de p53 al núcleo y propicia su degradación por ubiquitinización, promueve la sobreexpresión de la telomerasa, e interactúa negativamente con Bax. E7 se une a proteínas supresoras de tumores de la familia de pRb y promueve la duplicación celular. Mientras que E1 y E2 son las proteínas responsables de la replicación viral, (Fig. 8) (López y Marcela, 2006).

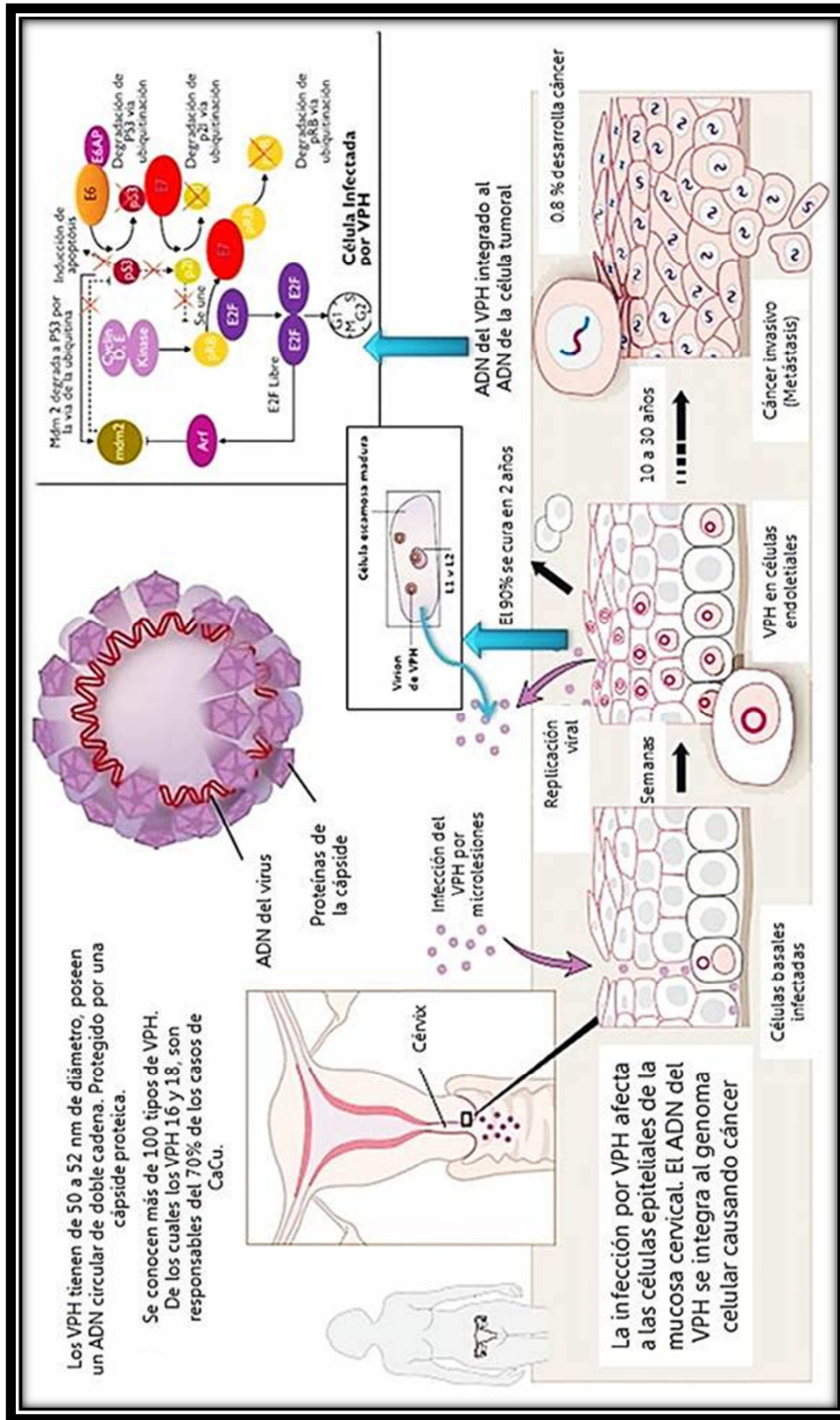


Fig. 8.- Proceso de infección y replicación del virus del papiloma humano. Un microtrauma en las capas suprabasales del epitelio de la unión escamo columnar facilita la infección del virus en las capas basales, permaneciendo en situación episómica, con baja expresión. La replicación y expresión viral se produce en las capas superiores. Las nuevas partículas virales se liberan con la descamación de las células más superficiales y diferenciadas del epitelio escamoso. Con el proceso de integración al ADN de la célula huésped se produce la síntesis de las oncoproteínas E6 y E7, que se ligan a las proteínas p53 y pRb respectivamente, degradándolas e inutilizándolas funcionalmente. Esta interacción en un epitelio inestable como es el de la unión escamocolumnar, conduce a una inestabilidad genómica, aumentando la probabilidad de producir mutaciones específicas (Tomado y modificado de: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/popular-medicineprize2008.pdf).

Los principales tratamientos para el cáncer se pueden categorizar en cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales se elegirán de acuerdo a la etapa clínica (National Cancer Institute, 2013).

Tratamientos contra el cáncer

- **La 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 (Noriega y Noriega, 2008).

Histerectomía. Se extirpa quirúrgicamente el útero, con otros órganos o tejidos o sin estos. En una histerectomía total, se extirpan el útero y el cuello uterino. En una histerectomía total con salpingooforectomía, se extirpan a) el útero más uno de los ovarios y una de las trompas de Falopio (unilateral), o b) el útero, ambos ovarios y ambas trompas de Falopio (bilateral). En una histerectomía radical, se extirpan el útero, el cuello uterino, ambos ovarios, ambas trompas de Falopio y el tejido circundante (Fig. 9) (National Cancer Institute, 2013).

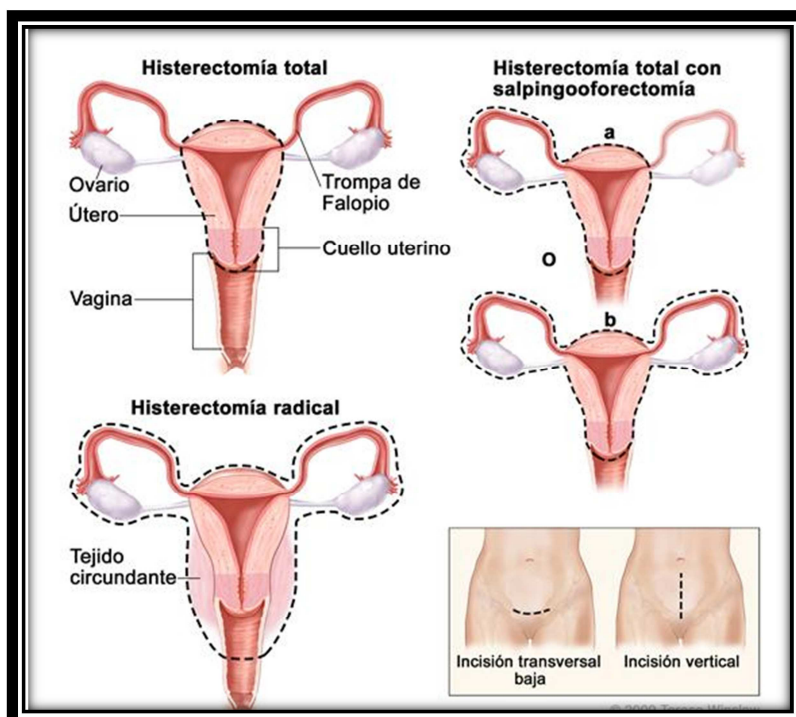


Fig. 9.- La cirugía que se utiliza a veces para tratar el cáncer de cuello uterino es la histerectomía y esta puede ser total, total con salpingooforectomía y radical (Tomado de <http://www.cancer.gov/PublishedContent/MediaLinks/398361.html>).

- **La radioterapia** en ella se utilizan ciertas longitudes de onda de alta energía como los rayos gamma, X, etc. 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. Hay dos tipos; la externa utiliza una máquina fuera del cuerpo que radia la región del crecimiento del tumor y la interna utiliza una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, cables o catéteres que se colocan directamente en el tumor o cerca del mismo (National Cancer Institute, 2013).

- **La quimioterapia** es un tratamiento contra el cáncer en el cual se utilizan medicamentos para interrumpir el crecimiento de células cancerosas, mediante su destrucción o evitando su multiplicación. Cuando se administra oralmente o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y afectan las células cancerosas en todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas en esas áreas (quimioterapia regional) (National Cancer Institute, 2013).

Los medicamentos aprobados para tratar el cáncer de cuello uterino son:

- Blenoxane (bleomicina)
- Hycamtin (Clorhidrato de topotecan)
- Platinol (cisplatino)
- Platinol-AQ (cisplatino)

La forma en que se administra la radioterapia y/o quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado (National Cancer Institute, 2013).

La vacunas Entre las nuevas opciones de prevención destacan el uso de las vacunas preventivas a VPH, las cuales están basadas en la producción de las partículas tipo virus (virus – likeparticles, VLPs) (Serrano y Pastrana, 2007).

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) ha aprobado dos vacunas para prevenir la infección por VPH: Gardasil y Cervarix. Ambas vacunas son muy efectivas en la prevención de infecciones por los tipos 16 y 18 de VPH, dos de los VPH de “alto riesgo” que causan la mayoría (70%) de los cánceres de cuello uterino y de ano. Gardasil impide también la infección por los tipos 6 y 11 de VPH, los cuales causan 90% de las verrugas genitales (Koutsky, *et al.*, 2002).

Actualmente se aplican estas 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, además de generar efectos secundarios graves demeritando la calidad de vida de los pacientes. Tal es el caso de los compuestos utilizados en la quimioterapia, cuyo principio de acción de la mayoría de estos compuestos, se basa en el potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con el de las células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no cancerosas que crecen y se dividen rápidamente como lo son las de la sangre. Una parte de la investigación en el desarrollo de estos fármacos, se enfoca en encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Por otro lado, algunos productos naturales, son metabolitos secundarios de plantas, hongos, y organismos marinos cuya función no se conoce con exactitud, aunque se cree que muchos se originaron en estos seres para defenderse de diversos agentes externos. Como consecuencia de ser el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, los productos naturales poseen actividades biológicas muy variadas, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos .

De esta forma, los productos naturales o sus derivados constituyen una buena parte del arsenal terapéutico disponible, además de resultar esenciales en algunos casos para identificar la diana de un fármaco sintético o establecer su implicación en una determinada ruta bioquímica (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Actualmente, la búsqueda de compuestos de origen natural es persistente, principalmente aquellos que son de origen vegetal. Al respecto ha llamado la atención las saponinas esteroideas, las cuales se han descrito con diversas actividades biológicas, incluyendo la actividad antitumoral.

Saponinas Esteroidales

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides se encuentran las saponinas, compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son metabolitos secundarios biosintéticos cuyos precursores son los esteroides, los cuales constituyen estructuralmente una clase diversa de productos naturales y son uno de los mejores componentes utilizados en la medicina tradicional (Min-Jie, *et al.*, 2005). Las saponinas (del latín: *sapo* = jabón) tienen en común la propiedad de producir abundante espuma en medio acuoso (Maier, 2009). Estas poseen actividad biológica diversa, por ejemplo, antimicrobiana (Jun-Dong, *et al.*, 2005), molusquicida (Abdel, *et al.*, 1999), insecticida, anticonceptiva, inhibidora del crecimiento vegetal, antiinflamatoria, hipocolesterolémica, inmunomoduladora, antioxidante, hipoglucemiante, hemolítica, antiviral (Rao, y Gurfinkel, 2000), citotóxica y antitumoral (Podolak, *et al.*, 1998; Hu., *et al.*, 1999; Mimaki, *et al.*, 2001; Kuroda, *et al.*, 2001).

Abundan especialmente en las monocotiledóneas: *Dioscoraceae*, *Amarylidaceae*, *Agacaceae* y *Liliaceae*. La actividad de las saponinas dependerá de su estructura química, un ejemplo es la presencia o ausencia de azúcares en la molécula, la diferencia entre el tipo y el número de azúcares influye en la respuesta biológica (Trouillas, *et al.*, 2005).

En pruebas *in vitro* se manejan como agentes citotóxicos que mejoran la especificidad en el tratamiento del cáncer; y que su actividad está relacionada con la estructura usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas (Hong-Ji, *et al.*, 2006). Las saponinas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicona (Fig. 10). La región aglicona puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal, por lo que las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas o saponinas esteroidales, respectivamente.

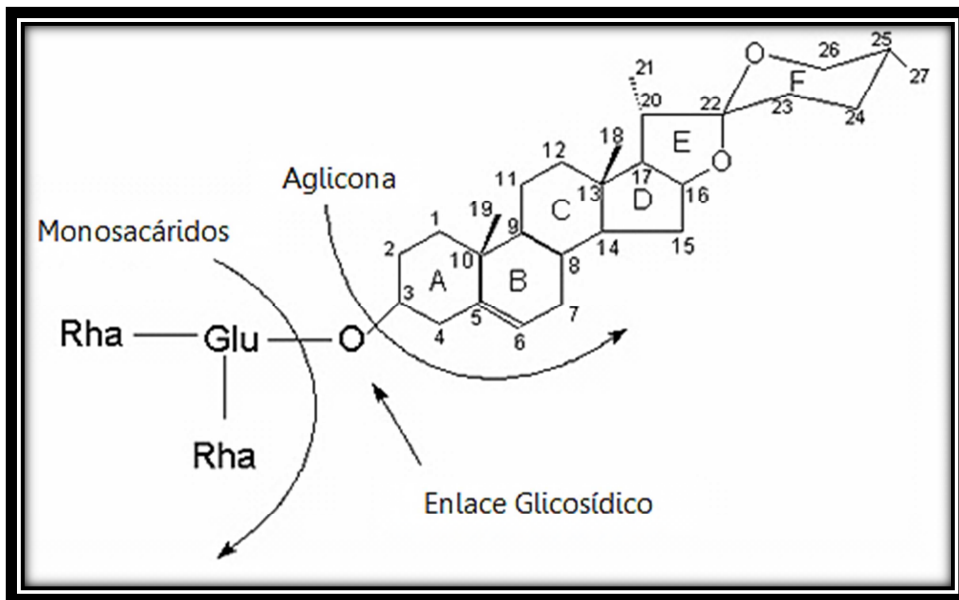


Fig. 10.- Ejemplo de la estructura molecular de una saponina esteroidal (Tomado y modificado de: <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/glucosidos/saponinas/estructura>).

Por hidrólisis de las saponinas esteroidales se obtienen las sapogeninas esteroidales, de gran interés para la industria farmacéutica por ser precursores en la síntesis de hormonas y corticoides (Eskander, *et al.*, 2010).

El papel fisiológico de saponinas en las plantas no es todavía plenamente entendido, no obstante hay un número de publicaciones que mencionan su identificación en las plantas, y sus múltiples efectos en las células animales y en hongos y bacterias, sólo unos pocos han dirigido su atención a su función en las células vegetales, muchas saponinas son conocidas por ser antimicrobianas, para inhibir los hongos, y para proteger las plantas del ataque de insectos (Francis, *et al.*, 2002).

Las saponinas pueden estar consideradas como parte de los sistemas de defensa, y como tal han sido incluidos en un grupo grande de moléculas protectoras. También ha sido sugerido que éstas podrían ser una fuente de monosacáridos y la materia prima para la síntesis de hormonas vegetales (Francis, *et al.*, 2002).

Si bien existe una gama de saponinas, son pocas las que han sido caracterizadas ampliamente. Entre las más conocidas tenemos a la Dioscina, Diosgenina, Hecogenina, Sarsasapogenina, entre otras. Sin embargo, un interés especial ha surgido por la Dioscina y sus derivados, ya que ésta se ha descrito con actividad biológica diversa y de gran potencia (Fernández, 2010).

Dioscina

Una de las saponinas espirostánicas más estudiadas es la Dioscina denominada: *O*-[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)][α -L-ramnopiranosil(14)]- β -D-glucopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo, (Fig. 11) la cual se aisló en 2001 a partir del extracto de *Polygonatum zanlanscianense* y también está presente en las raíces de las especies *Dioscorea composita* y *Dioscorea floribunda*. Por hidrólisis, se descompone en Diosgenina (Fig. 11), D-glucosa y 2 unidades de L-Ramnosa (Fernández, 2010). Se ha reportado que la Dioscina presenta actividad antitumoral, antifúngica y antiviral (Li, *et al.*, 2005). Y que induce diferenciación y apoptosis en la línea celular HL60 de leucemia humana (Wang, *et al.*, 2001). En 2002 se publicó un reporte sobre la actividad antiproliferativa y proapoptótica inducida por la Dioscina en células HeLa, en el que se observó inducción de actividad apoptótica con incremento en la actividad de las caspasas 3 y 9 (Cai, *et al.*, 2002).

Con el propósito de incrementar la actividad antitumoral de la Dioscina, se han sintetizado análogos de la Dioscina efectuando modificaciones en la parte hidrofílica de la molécula. Aún no se emplea a la Dioscina como agente terapéutico; sin embargo ya se encuentran reportes sobre la elucidación de sus mecanismos moleculares de acción (Fernández, 2010).

Diosgenina

Un ejemplo de sapogenina esteroide es la Diosgenina, denominada: (25R)-espirosta-5-eno-3 β -ol (Fig. 11) que fue aislada por primera vez en 1936 por Takeo Tsukamoto, a partir de *Dioscorea tokoro*. En la década de los cuarentas, Russell Marker encontró en México que la *Dioscorea composita*, conocida como barbasco, contiene de 7 a 9% de Diosgenina. Esta molécula se ha utilizado como materia prima en el proceso industrial de fabricación de cortisona y hormonas sexuales como la progesterona (Anaya, 2003). También se ha encontrado en *Dioscorea floribunda*. Se ha reportado, que la Diosgenina posee actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares, como HeLa (cáncer cervicouterino) (Mimaki, *et al.*, 1996), HeL92.1.7 y K562 (eritroleucemia), 1547 (osteosarcoma) (Son, *et al.*, 2007), HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), HCT-116, HT-29 (cáncer de colon) (Lepage, *et al.*, 2011) MCF-7 (cáncer de mama) y otras. Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis (Fernández, 2010).

Diosgenina Di

La Diosgenina Di denominada "*O*-[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido de (25*R*)-espirost-5-en-3 β -ilo" (Fig. 11), un glucósido triterpeno pentacíclico una vez llamado prosapogenina B de Dioscina, se aisló de *Dioscorea tokoro* por Kawasaki y colaboradores, por primera vez en 1968. Y recientemente un estudio sobre las sustancias bioactivas a partir de recursos naturales, aislaron este compuesto de *Dioscorea futschauensis*, la planta fuente de la medicina tradicional china "Mian Bi Xie", que se usa para tratar el reumatismo y las enfermedades del tracto urinario (Wang, *et al.*, 2004). En este estudio se mostró su efecto inhibitor en la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer humano revelando por primera vez que la Diosgenina Di muestra fuerte actividad contra el cáncer, mayor que la del cisplatino. Ya que inhibe la proliferación de células de cáncer humano, A2780 (adenocarcinoma de ovario), A431 (carcinoma epidermoide), A549 (adenocarcinoma de pulmón), HCT-15 (carcinoma de colon) y K562 (eritroleucemia), también se encontró que induce apoptosis en las células HCT-15 (Wang, *et al.*, 2004).

En México se logró aislar también a la Diosgenina Di, a partir de la *Dioscorea floribunda* M. Martens et Galeotti, la cual se obtuvo en el Municipio de Tuzamapán de Galeana en la Sierra Norte de Puebla. Se purificó por cromatografía en columna y se caracterizó en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el grupo de investigadores dirigido por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez. K (Fernández M., comunicación personal, 09 Febrero 2013).

Es necesario resaltar que la Dioscina y la Diosgenina han sido fuertemente estudiadas mientras que la Diosgenina Di solo existe el estudio de Wang S. y colaboradores, que en el 2004 muestran, que la Diosgenina Di posee actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células de cáncer de colon mediante la reducción del potencial mitocondrial y la liberación de citocromo c. Estos resultados sugieren que puede ser un buen candidato como un agente quimioterapéutico. Sin embargo, no existen estudios sobre el CaCu, por lo que resulta de interés investigar la actividad antiproliferativa y selectiva de la saponina Diosgenina Di en líneas de CaCu y células no tumorales.

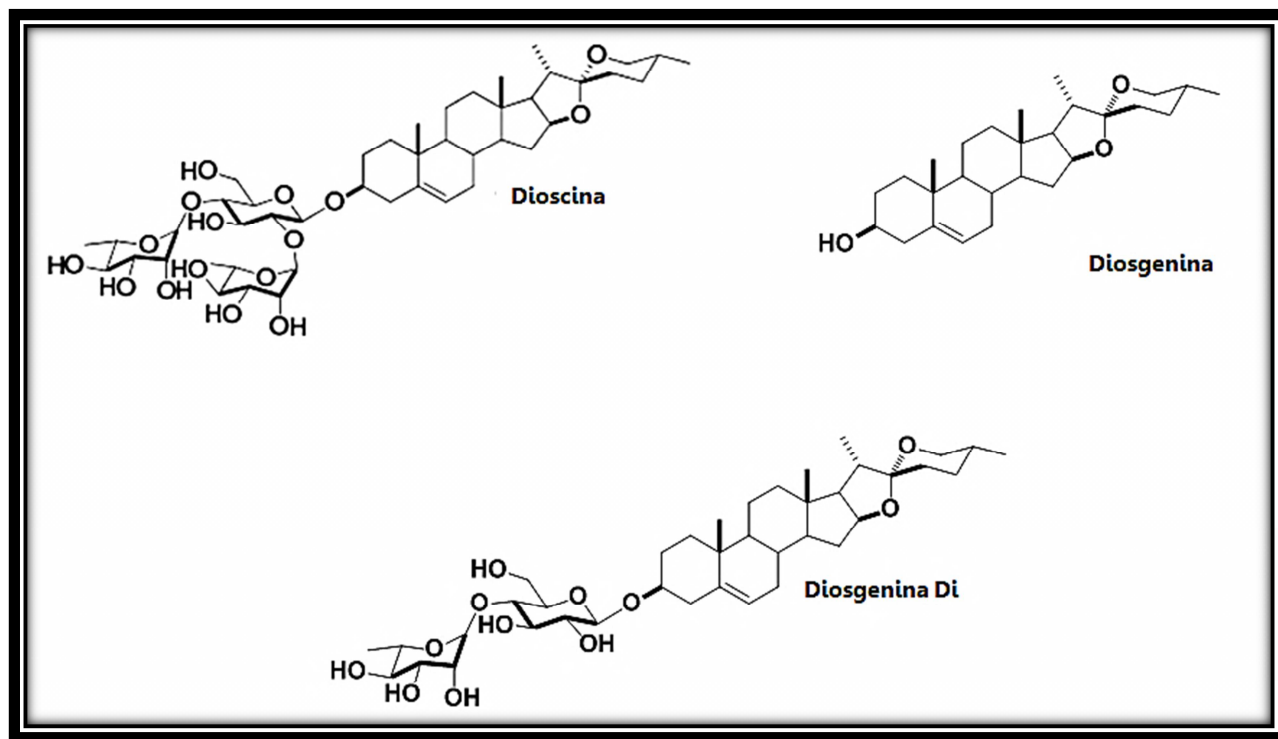


Fig. 11.- Estructura molecular de la Dioscina, de la Diosgenina y la Diosgenina Di
(Tomado y modificado de: Fernández, 2010).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu es considerado un importante problema de salud en México, debido a que es la segunda causa de defunciones por tumores malignos en mujeres. Existen una gran variedad de tratamientos que se aplican a los pacientes con cáncer; sin embargo, estos resultan ser poco selectivos, costosos, ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y generan efectos colaterales que demeritan la calidad de vida del paciente. Además, el efecto antitumoral de la mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento de esta patología está basado en su acción citotóxica con nula o baja acción selectiva por lo que surge la necesidad de generar nuevas alternativas basadas en compuestos que presenten una actividad antiproliferativa y de acción selectiva. Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos que presentan un fuerte interés son los compuestos de origen vegetal, particularmente las saponinas esteroidales como la Diosgenina y Dioscina, cuya actividad biológica es diversa, destacando la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis. La escasa información acerca de la Diosgenina Di genera la necesidad de determinar su actividad antitumoral, citotóxica y selectiva en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa CaSki y ViBo con el fin de aportar información que permita establecer el potencial terapéutico que posee esta saponina de origen natural.

IV. JUSTIFICACIÓN

El CaCu se encuentra entre los tipos de cáncer femeninos de mayor importancia a nivel mundial, y en México es la segunda causa de muerte en mujeres, ya que es precedido por el cáncer de mama. El reporte por parte del INEGI indica un total de 4,500 defunciones anuales lo que representa un gran problema de salud. La baja eficiencia de los diferentes tratamientos contra el cáncer en pacientes con la enfermedad avanzada o que presentan metástasis, ha generado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Actualmente existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos con potencial antiproliferativo, entre los que se destaca a las saponinas esteroidales. Por lo que es importante la valoración de nuevas saponinas como la Diosgenina Di, para determinar la actividad antitumoral en células de CaCu, HeLa, CaSki y ViBo y su efecto en células no tumorales, con el fin de aportar información que permita establecer el potencial terapéutico.

V. HIPÓTESIS

Es conocido que diferentes saponinas esteroidales presentan actividad antiproliferativa, tal es el caso de la Dioscina, y la Diosgenina. Dicha actividad antiproliferativa ha sido probada en diferentes líneas celulares tales como HeLa (cáncer cervicouterino), HeL 92.1.7 y K562 (eritroleucemia), osteosarcoma 1547, HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), HCT-116, HT-29 (cáncer de colon), HL60 (leucemia), MCF-7 (cáncer de mama). Con base a lo anterior, se espera que la Diosgenina Di, presente actividad antiproliferativa e inductora de muerte en líneas celulares de CaCu, HeLa, CaSki y ViBo.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluación del efecto antitumoral e inductor de muerte celular, de la saponina esteroidea "O-[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo" (Diosgenina Di) en líneas celulares de CaCu.

Objetivos Particulares

- ✓ Desarrollar cultivos de las líneas de CaCu así como de linfocitos de sangre periférica humana y células no tumorales provenientes del cérvix humano.
- ✓ Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de Diosgenina Di, en cultivos de células de CaCu.
- ✓ Evaluar el efecto de la Diosgenina Di en el potencial proliferativo de células no tumorales provenientes de cérvix humano y de linfocitos de sangre periférica humana.
- ✓ Determinar si la Diosgenina Di a la CI₅₀ obtenidas para las células tumorales ejercen daño en la integridad de la membrana plasmática de células tumorales y no tumorales, determinada por la cuantificación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) y mediante la incorporación celular de yoduro de propidio (IP).
- ✓ Determinar si la Diosgenina Di induce muerte por apoptosis en cultivos de células de CaCu, a través de la expresión de la caspasa 3 activa evaluada por citometría de flujo, así como la evaluación de la condensación de la cromatina y/o formación de cuerpos apoptóticos por observados microscopia por epifluorescencia.
- ✓ Observar el efecto de la Diosgenina Di en la morfología celular mediante la técnica de microscopia de contraste de fases.
- ✓ Evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno en células de CaCu mediante la técnica de diclorofluoresceína (DCFH) evaluada por citometría de flujo, como parte del mecanismo de inducción de muerte celular apoptótica.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

Preparación del stock del compuesto

La saponina esteroideal "O-[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo" (Diosgenina Di) se extrajo de la *Dioscorea floribunda* M. Martens Galeotti, la cual se obtuvo en el Municipio de Tuzamapán de Galeana en la Sierra Norte de Puebla. El material vegetal fue depositado en el Herbario y Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

El rizoma se secó y pulverizó. La extracción se realizó con isopropanol y el compuesto se halló junto con otros metabolitos como la Dioscina. Se purificó por cromatografía en columna y se caracterizó en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la BUAP a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

Se solubilizaron 1000 μ g de Diosgenina Di en 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) evitando que se generaran cristales o precipitados del compuesto en el medio de cultivo.

Cultivo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo

Con líneas celulares de carcinoma epidermoide de cuello uterino: HeLa positivo al VPH tipo 18, CaSki positivo al VPH tipo 16, y ViBo negativo a VPH, se establecieron cultivos celulares en cajas Petri de 100 mm de diámetro (Pirex, E.U.A.), con 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; Gibco, E.U.A.) con rojo fenol, suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) y SNT (suero de ternera neonata; Gibco, E.U.A.) al 5 %. Se mantuvieron a 37 $^{\circ}$ en una incubadora (NuAire, E.U.A.) con una atmósfera saturada al 5 % de CO₂ y humedad a punto de rocío. Posteriormente, se sembraron en cajas de 96 pozos (7500 células por pozo en 100 μ L) bajo las mismas condiciones, se dejaron durante 24 horas para su adherencia y fueron utilizadas para los diferentes experimentos (Cultek, 2013).

Procesamiento y obtención de células no tumorales de cérvix humano

Las células no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez obtenida la pieza quirúrgica fue transportada en medio de cultivo RPMI-1640 al 20 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (Hyclone, E.U.A.), y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en escindir el tejido en trozos pequeños (1 mm), y someterlos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.1 %, la cual se llevó a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, con 10 mL de tripsina a 37 °C en un baño maría durante 15 min en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vertió a través de una malla de nylon que permite sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. Posteriormente se llevó a cabo la segunda ronda de disgregación enzimática mediante tripsina al 0.1 % para volverse a filtrar. El filtrado fue centrifugado por 5 min a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón celular fue cultivado en cajas Petri de 60 mm, y se mantuvo en una incubadora al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas máximo. Después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio, de tal manera que fueron removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 % continuándose así hasta obtener un 70% de saturación celular (Cultek, 2013).

Efecto en la proliferación

- ✓ *Determinación de la CI₅₀ mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta en células tumorales: HeLa, CaSki y ViBo*

Se sembraron en placas de 96 pozos 7500 células (por pozo) provenientes de cáncer CaCu (HeLa, CaSki y ViBo), con 100 µL de medio RPMI-1640 al 5 % SNT. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se adicionó en RPMI 1640 fresco 5 % de SNT las diferentes concentraciones de Diosgenina Di a partir de una dilución seriada (que van de mayor a menor desde 200 100, 50, 25, 12.5 6.25 3.125 y 1.56 µg/mL). El ensayo control contempló la cantidad de disolvente utilizada en la concentración máxima a probar (al 1%) y un

testigo al cual se le realizó cambio de medio únicamente. El cultivo con el compuesto se mantuvo por 24 horas, Transcurrido el tiempo de estímulo, las células se fijaron durante 20 min con 50 µL/ pozo de glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, E.U.A.); posteriormente se lavó y se enjuagó con agua bidestilada y añadió 50 µL/ pozo del colorante cristal violeta al 0.1 % en solución amortiguadora de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A.) pH 6.0 y se mantuvieron durante 10 min en agitación constante. Después de la tinción, las cajas de cultivo fueron lavadas tres veces con agua bidestilada. Posteriormente, se añadieron 50 µL de ácido acético al 10 % y se dejaron en agitación durante 20 min. Finalmente, se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 590 nm, y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al control (Fernández, *et al.*, 2011).

Para calcular las CI_{50} (concentración inhibitoria media del número celular para cada línea celular tumoral), los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2010, para obtener las curvas dosis respuesta, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular. Posteriormente se realizaron ensayos a partir de los datos obtenidos, hasta obtener el intervalo que revelara la CI_{50} observada (los valores obtenidos por el lector de placas ELISA fueron promediados y comparados en porcentaje al grupo control). Una vez determinado el intervalo en el cual se realizaron curvas puntuales que abarcaban el intervalo y con los valores obtenidos se realizó la linealización de la curva y se obtuvo la ecuación lineal. Con base a ella se calculó la CI_{50} . Para comprobarla se evaluó experimentalmente la concentración obtenida mediante la ecuación lineal.

- ✓ *Evaluación del efecto de la Diosgenina Di sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE).*

Se colectaron 20 mL de sangre periférica de un donador sano en tubos con EDTA, posteriormente la sangre fue vertida en cuatro tubos cónicos de vidrio, 5 mL cada uno, los cuales ya tenían 5 mL de Histopaque™-1077 (Sigma-Aldrich, E.U.A.), y en seguida fueron centrifugados inicialmente a 300 rpm y se incrementaron gradualmente de 300 rpm más

cada 2 min hasta llegar a 1500 rpm, se dejaron centrifugar durante 25 min más. Posteriormente, se retiró el plasma sanguíneo y se colectó el anillo de leucocitos, el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendido con 10 mL de buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) cada uno, a continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante para resuspenderse en 5 mL de RPMI-1640 sin suero y se determinó el número celular en una cámara de Neubauer.

Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, E.U.A.) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 mL de PBS con 10 µL de carboxifluoresceína y se incubaron durante 15 min protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS al 5% de SFB luego se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y se resuspendieron en 4 mL de RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos a una densidad de 1 000 000 células/mL de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y 25 µL de fitohemaglutinina/mL (Micro Lab S.A., Méx.). Se prepararon las concentraciones del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1 000 000 células/mL de medio total (tubos por condición; activados y marcados con carboxifluoresceína, vehículo y tratamiento). Se realizaron dos lavados con PBS libre de suero. Para el tratamiento con la Diosgenina Di se trataron las células con diferentes concentraciones incluyendo la CI_{50} más alta de células de CaCu. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 µL e incubadas por 72 horas hasta su evaluación. Para ello se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de verseno frío por 5 min, se centrifugó y retiró. Posteriormente, se resuspendió con 500 µL de PBS (dos veces), para leerse en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems E.U.A.) y se analizaron con el programa FACSDiva versión 6.1.2. (Quah y Parish, 2012).

- ✓ *Evaluación del efecto de la Diosgenina Di sobre la proliferación de células no tumorales provenientes de cérvix humano mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta*

Se sembraron en placas de 96 pozos 10000 células (por pozo) de cérvix no tumorales, con 100 μ L de medio RPMI-1640 al 20% de SFB respectivamente. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se adicionó en RPMI 1640 fresco 20% de SFB con diferentes concentraciones de Diosgenina Di (que abarcan el rango de las CI_{50} de las células tumorales de 20 a 40 μ g/mL). De igual manera, el ensayo control contempló la cantidad de disolvente utilizada en la concentración máxima a probar y un testigo al cual se le realizó cambio de medio únicamente. El cultivo con el compuesto se mantuvo por 72 horas para las células no tumorales. Transcurrido el tiempo de estímulo, las células se fijaron durante 10 min con 50 μ L/ pozo de glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, E.U.A.); realizando el mismo procedimiento de tinción de cristal violeta para células tumorales. Finalmente, se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 590 nm, y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al control. Para calcular el porcentaje de proliferación celular los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2010 (Fernández, *et al.*, 2011).

Determinación de la actividad de Lactato deshidrogenasa

En placas de 96 pozos (Corning, E.U.A.), se sembraron 7500 células por pozo de las líneas de CaCu con 100 μ L de medio RPMI al 5 % de SNT durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se agregaron las CI_{50} correspondientes. Para el caso de los linfocitos, las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200000 células/pozo en un volumen de 200 μ L e incubadas hasta su evaluación. Después de 72 horas de cultivo las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio, y colectándolo en tubos cónicos de plástico de 0.6 mL de manera individual. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, y se colocaron 50 μ L de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación.

Para cada ensayo se tendrán considerados sus grupos control, basal (únicamente medio de cultivo), negativo (células con medio y suero al 5 %), positivo (Tritón X-100 al 1 %) y vehículo que contemplará la cantidad de disolvente máxima utilizada para solubilizar el compuesto, y una muestra por cada una de las CI_{50} .

Una hora antes de cumplir las 24 o 56 horas de estímulo (células de CaCu, y no tumorales de cérvix respectivamente), se cosecharon las células del positivo para lisarlas, agregando 100 μ L tritón X-100 al 1 %. Cumplidas las 24 horas se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos en tubos cónicos de plástico de 600 μ L y se centrifugaron a 2000 rpm. El medio fue colocado en una placa de 96 pozos, 50 μ L por pozo, y se le agregarán 50 μ L de mezcla de reacción del CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, E.U.A.). Se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad, y finalmente el ensayo se evaluó en un lector de placas de ELISA (Image Tecan Spectra), a 490 nm. Para calcular el porcentaje de citotoxicidad los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2010. Obteniendo gráficos, que muestran el efecto citotóxico del compuesto sobre la población celular. Los resultados se presentan como valores relativos al control positivo (Fernández, *et al.*, 2011).

Incorporación de yoduro de propidio

Fueron sembradas 30000 células por pozo en placas de cultivo de plástico de 48 pozos procedentes de líneas de CaCu en las condiciones antes descritas. Para el tratamiento con Diosgenina Di; se trataron con la concentración de la CI_{50} . Después de 24 horas de tratamiento, fueron cosechadas y se depositaron en tubos para citómetro en un volumen de 500 μ L (un tubo por condición). Posteriormente, se le agregó a cada muestra 2 mL de RPMI-1640 suplementado al 5 % de SFB. Para el control positivo, las células se permearon con 500 μ L de Etanol al 70 %. Un minuto antes de leer las muestras en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems E.U.A.) se le colocaron a cada muestra 3 μ L de yoduro de propidio (200 μ g/mL) y finalmente se analizaron con el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Expresión de caspasa-3 activa en las líneas tumorales por citometría de flujo

Fueron sembradas 50000 células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCu, en un volumen de 500 μ L de RPMI-1640 al 5% de SNT. Al paso de las 24 horas las células fueron tratadas con CI_{50} de Diosgenina Di con medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SNT, durante 24 horas y se realizó 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 al 70% en agua destilada durante 20 min, 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-Aldrich, E.U.A.) 1:1000 en PBS durante 24 horas 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, E.U.A.), manteniéndolas en oscuridad durante 3 horas.

Se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems E.U.A.) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2. (Marinia, *et al.*, 2001).

Efecto de la Diosgenina Di en la morfología y condensación de la cromatina de células tumorales a través de la tinción con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

Se sembraron 750,000 células de CaCu en cajas Petri de 50mm (Pirex, E.U.A.) sobre cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 5 mL de RPMI-1640 suplementado al 5% de SNT y se incubaron por 24 horas bajo las condiciones antes descritas. Se trataron las células con la concentración de la CI_{50} respectiva durante 24 horas. Al término, las células fueron fijadas y permeadas con Etanol al 70% durante 15 min. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS filtrado a través de un filtro de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 0.22 μ m. Las preparaciones fueron escurridas ligeramente en un papel

absorbente sin dejarlas secar. Enseguida se adicionó 5 μL a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, E.U.A.) formando un domo sobre cada cubreobjeto y se dejó incubar por 4 min a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, fueron lavadas las muestras con PBS y se montaron con medio de montaje (Vector Laboratories, E.U.A.) sobre portaobjetos, para evitar la salida del medio de montaje, y las muestras (cubreobjetos) fueron selladas con resina acrílica. Después de ser etiquetadas según corresponda, fueron guardadas en oscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia. Se tomaron fotografías en un microscopio de alta definición, para su análisis (Fernández, *et al.*, 2011).

Generación de especies reactivas de oxígeno

Las células provenientes de líneas celulares de CaCu fueron sembradas y estimuladas de la forma antes descrita por condición. Después del tiempo requerido del estímulo (de $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, y 5 horas), las células fueron cosechadas, lavadas con PBS complementado al 5% de SFB y recuperadas por condición en tubos para citómetro y fue completado el volumen a 1 mL. Posteriormente, se le agregó 1 μL del reactivo DCFH-DA (2',7' diclorofluoresceínadiacetato) 2 Mm disuelto en etanol y se dejaron incubar por 30 min. Después del tiempo requerido, al control positivo se le agregaron 102 μL de H_2O_2 al 30% y se dejaron incubar por 10 min. Se leyeron en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems E.U.A.) y se analizaron con el programa FACSDiva versión 6.1.2. (Marinia, *et al.*, 2001).

Análisis estadístico

A los datos experimentales fueron procesados en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2010, para calcular su media y \pm desviación estándar y se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 20.0 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.

VIII. RESULTADOS

Actividad antiproliferativa de la Diosgenina Di en células tumorales

Se ha encontrado que la Diosgenina Di inhibe la proliferación de células de cáncer humano, de ovario, pulmón, colon y en eritroleucemia. Sin embargo no existen estudios en células de CaCu así como en células no tumorales. Es por ello que con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de la Diosgenina Di cultivos de células provenientes de CaCu: HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con diferentes concentraciones de Diosgenina Di por 24 horas y el número celular fue cuantificado por la técnica de cristal violeta. Los resultados obtenidos muestran que la Diosgenina Di afecta el potencial proliferativo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo de manera dosis dependiente (Fig. 12 y Tabla 1).

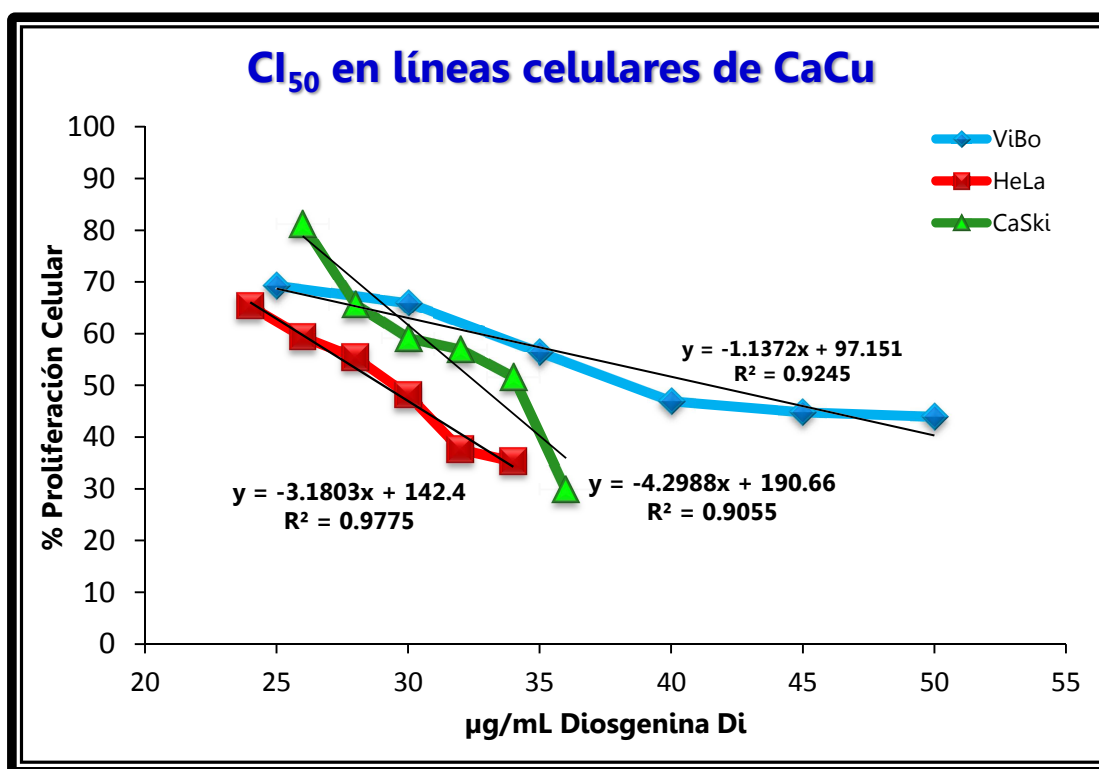


Fig. 12.- Efecto antiproliferativo de la Diosgenina Di en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. 7500 células HeLa, CaSki o ViBo fueron sembradas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de Diosgenina Di por 24 horas y el número celular fue cuantificado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta y la CI₅₀ fue calculada mediante la linearización de los datos y con ayuda de la ecuación de la línea recta. El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes.

La actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del esteroide para inducir un decremento del 50 % en el número celular (CI_{50}) mediante la ecuación de la línea recta obteniendo para HeLa, CaSki y ViBo una CI_{50} de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Dado que las CI_{50} fueron calculadas mediante la ecuación de la recta, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con las CI_{50} correspondientes para cada una de las líneas celulares y el número celular fue determinado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta con la intención de corroborarlas CI_{50} (Fig. 13).

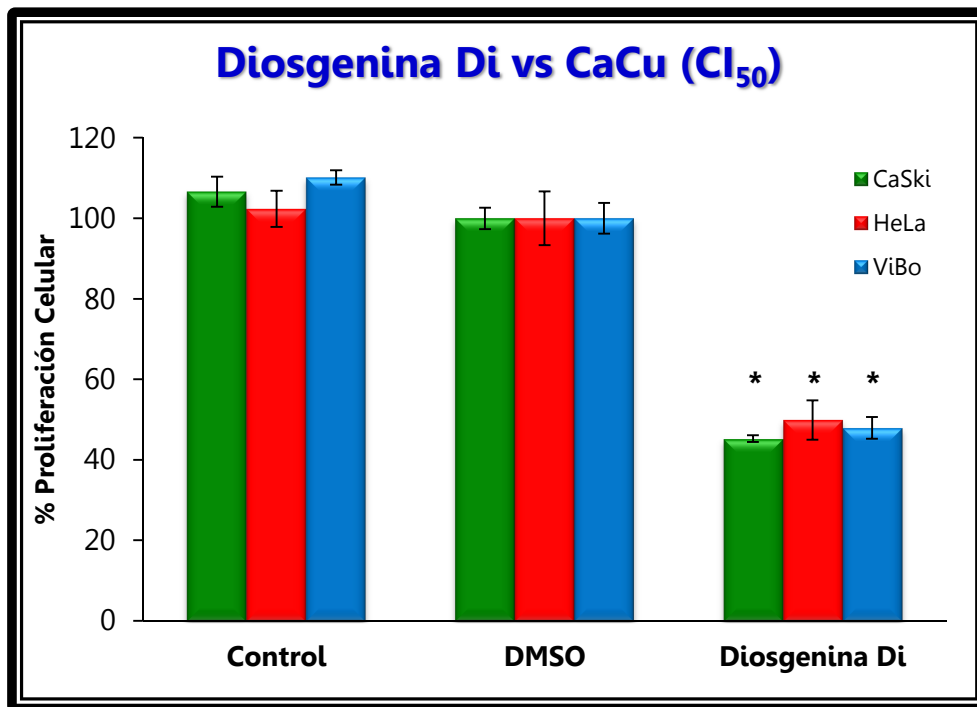


Fig. 13.- Confirmación del efecto antiproliferativo de la Diosgenina Di a las concentraciones de IC_{50} calculadas en las células HeLa, CaSki y ViBo (30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Se observa el control, cultivo de células CaCu sin tratamiento en RPMI al 5% de NSC; DMSO, tratadas con dimetilsulfóxido al 1%; Diosgenina di, cultivos estimulados con 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La barra I indica la desviación estándar y * Indican que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* $p < 0.05$ vs DMSO). Los resultados muestran un ensayo representativo de 3 pruebas independientes con al menos 3 repeticiones.

Una vez corroboradas las CI_{50} experimentalmente, se obtuvieron valores de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para HeLa CaSki y ViBo respectivamente, indicando que la sensibilidad de las tres líneas tumorales a este compuesto es muy similar entre ellas. Se realizó el cálculo a $\mu\text{mol}/\text{L}$ para poder compararlo con la literatura (Tabla 1).

Línea celular	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µmol/L)
HeLa	30.8 µg/mL	42.65 µmol/L
CaSki	32.6 µg/mL	45.15 µmol/L
ViBo	40 µg/mL	55.40 µmol/L

Tabla 1.- Concentración requerida de Diosgenina Di para inducir un decremento del 50 % en el número celular (CI₅₀) en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, expresada en µg/mL y/o µmol/L.

Actividad antiproliferativa de la Diosgenina Di en células no tumorales

Una vez determinado que la Diosgenina Di posee actividad antiproliferativa sobre las células de CaCu, se determinó si esta saponina afecta el potencial proliferativo de células no tumorales con el fin de establecer su acción selectiva. Se tomó como criterio de selectividad de la Diosgenina Di, la evaluación sobre el potencial proliferativo de células no tumorales provenientes de cérvix humano, debido a que son células que están dentro del microambiente tumoral para el caso del CaCu. Al respecto, cultivos de células provenientes de cérvix humano fueron tratadas con 30.8, 32.6 y 40 µg/mL durante 56 horas y el número celular fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos en la Fig. 15, muestran que la Diosgenina Di afecta el potencial proliferativo de las células fibroblásticas ya que todas las concentraciones muestran una diferencia significativa, sin embargo las CI₅₀ para HeLa y CaSki de 30.8 y 32.6 µg/mL, solo abaten en un 30 y 34 % respectivamente, la proliferación celular mientras que para el caso de la CI₅₀ de ViBo de 40 µg/mL abatió aproximadamente en un 50 % la proliferación celular a 56 horas del tratamiento.

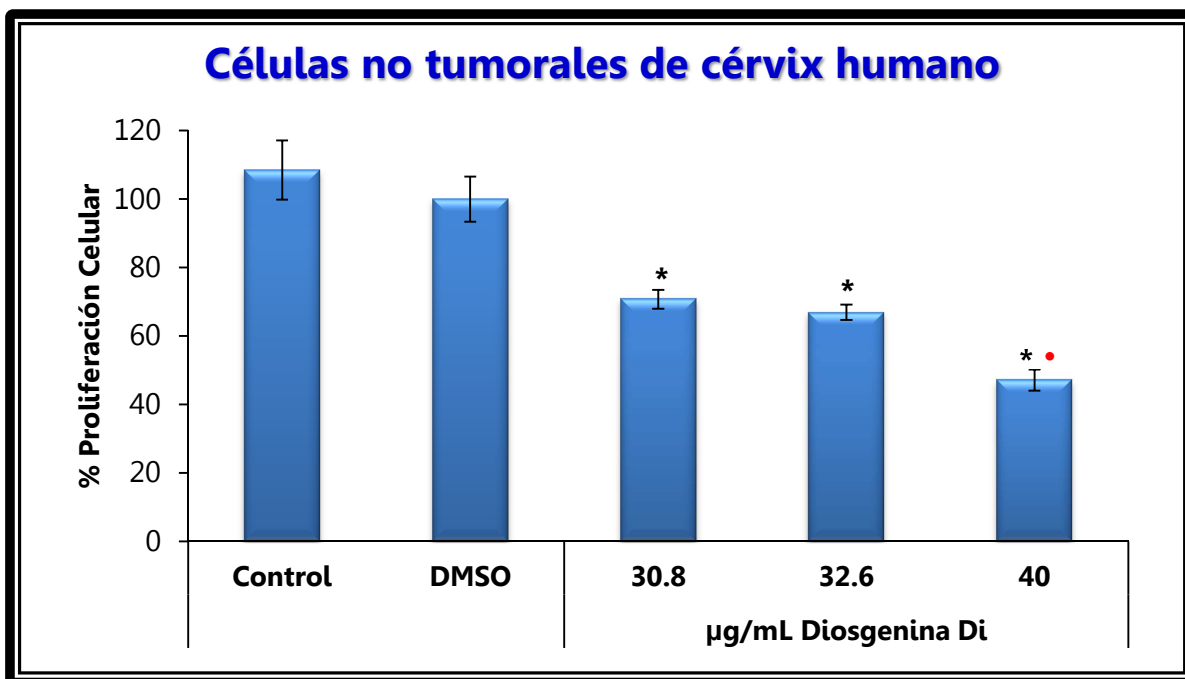


Fig. 15.- Efecto de la Diosgenina Di en el potencial proliferativo de células no tumorales de cérvix. Se observa el control, cultivo de células de cérvix no tumorales sin tratamiento en RPMI al 20% de SFB; DMSO, tratadas con dimetilsulfóxido al 1%; Diosgenina Di: cultivos estimulados con 30.8 32.6, y 40 µg/mL respectivamente. La barra I indica la desviación estándar y * Indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* p<0.05 vs DMSO y • p<0.05 vs Diosgenina Di 30 µg/mL). Los resultados muestran un ensayo representativo de 3 pruebas independientes.

También es común que en muchos tratamientos de quimioterapia, se observe un decremento en células del sistema inmune, por lo tanto un papel primordial a evaluar del compuesto Diosgenina Di, es averiguar la afección que podría causar al sistema inmune; es por ello que se evaluó el efecto sobre el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana Para ello, cultivos de células linfocíticas fueron tratados con 30.8, 32.6 y 40 µg/mL durante 72 horas y el potencial proliferativo fue evaluado mediante el marcaje con carboxifluoresceína (CFSE), cuantificada por citometría de flujo.

Los resultados que se muestran en la Fig. 16 indican que la Diosgenina Di afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas, ya que a una concentración de 40 µg/mL disminuyendo un 35 % la proliferación, sin embargo a concentraciones menores de 30.8 a 32.6 µg/mL el efecto antiproliferativo fue igual o menor al 30%, a 72 horas de tratamiento.

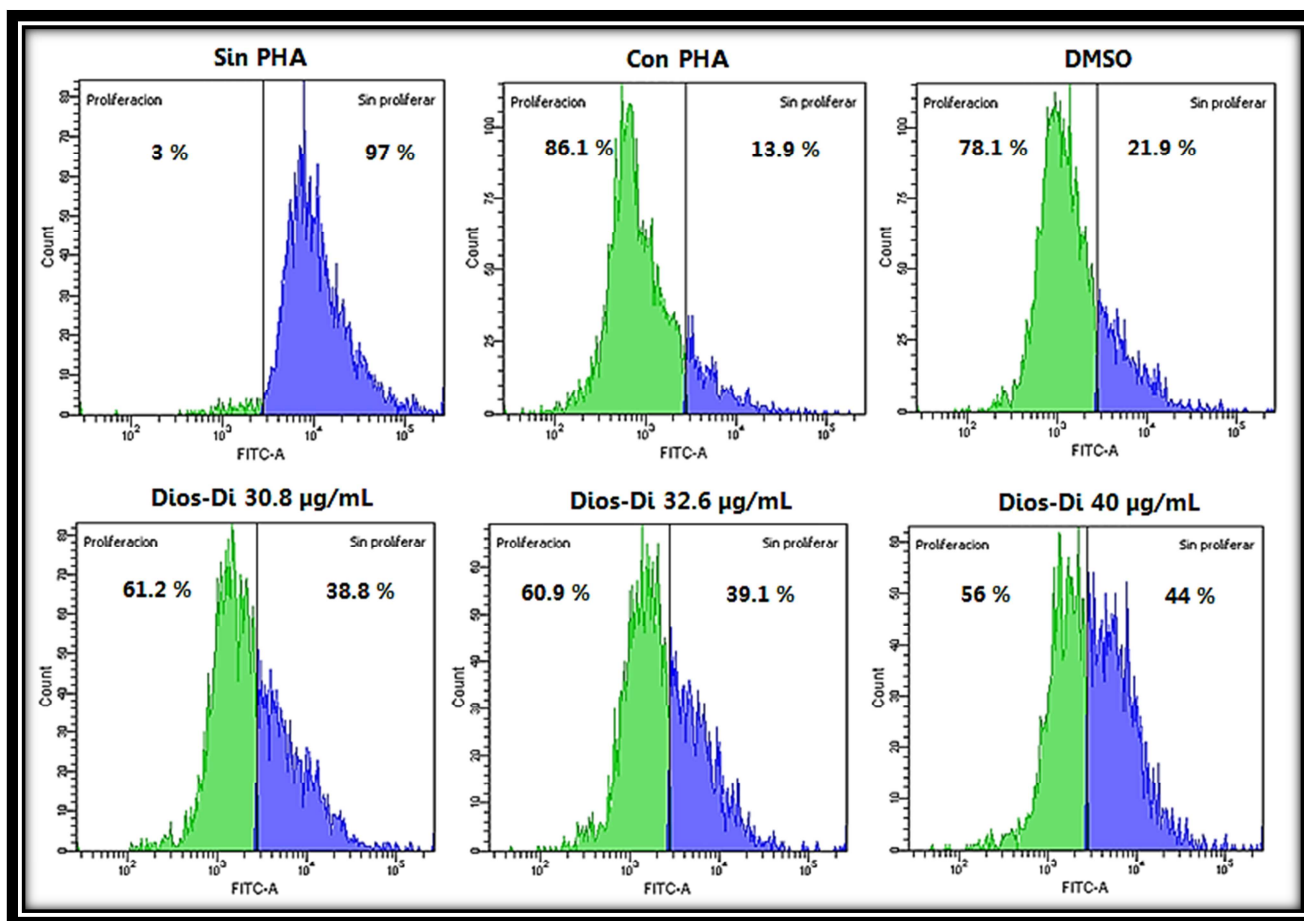


Fig. 16. Efecto de la saponina esteroideal Diosgenina Di en el potencial proliferativo de linfocitos humanos no tumorales. Los cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo. Para activar a los linfocitos se les agregó 25 µL fitohemaglutinina (PHA). Sin PHA: linfocitos sin activar con CFSE; Con PHA: linfocitos activados que son linfocitos marcados con CFSE y con PHA; DMSO: linfocitos marcados con CFSE, PHA y con DMSO a una concentración de 1%; y las concentraciones de Diosgenina Di: se refiere a linfocitos marcados con CFSE con PHA, y Diosgenina Di a 30.8, 32.6, 40 µg/mL. Los resultados muestran un ensayo representativo de por lo menos 3 pruebas independientes.

	Con PHA	DMSO	Dios Di 30.8 µg/mL	Dios Di 32.6 µg/mL	Dios Di 40 µg/mL
% Degr. CFSE	86.1	78.1	61.2	60.9	56
Proliferación	100	90.70	71.08	70.73	65.04

Tabla 2.- Se muestran los valores obtenidos por citometría de flujo tomando a los linfocitos con fitohemaglutinina (PHA) como máximo de proliferación.

Actividad citotóxica (necrótica) de la Diosgenina Di en células tumorales

Un parámetro importante en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales, es evitar que estos compuestos generen daños colaterales como los que causa la muerte celular necrótica (citotoxicidad). Con la finalidad de descartar que el decremento en el número celular inducido por la Diosgenina Di, en los cultivos de células tumorales es llevado a cabo mediante un posible efecto citotóxico (necrosis), cultivos de células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con su respectiva Cl_{50} , y la integridad de la membrana plasmática fue evaluada mediante la determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes así como a través de la incorporación celular de yoduro de propidio (IP). Ambas determinaciones fueron tomadas como un parámetro indicativo de daño a la membrana plasmática y/o de muerte necrótica. Como se puede apreciar en la Fig. 17 y 18, los cultivos de células tumorales de CaCu estimulados con la Diosgenina Di, no presentan actividad de LDH ni presentan una incorporación significativa de IP.

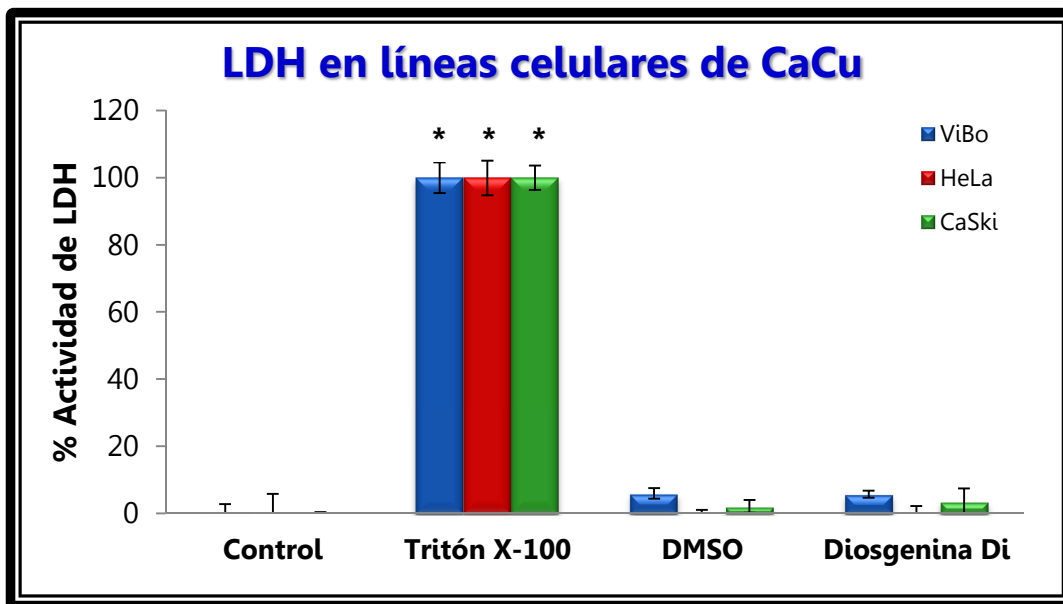


Fig. 17. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de las líneas ViBo, HeLa y CaSki estimuladas con las Cl_{50} respectivas de la saponina Diosgenina Di el DMSO se utilizó a una concentración del 1% mientras que el Tritón X-100 se manejó como control positivo. Tanto el DMSO como el tratamiento de Diosgenina Di no presentan diferencia significativa. La barra I indica la desviación estándar y * indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* $p < 0.05$ vs DMSO). Los resultados muestran un ensayo representativo de 3 pruebas independientes con al menos 3 repeticiones.

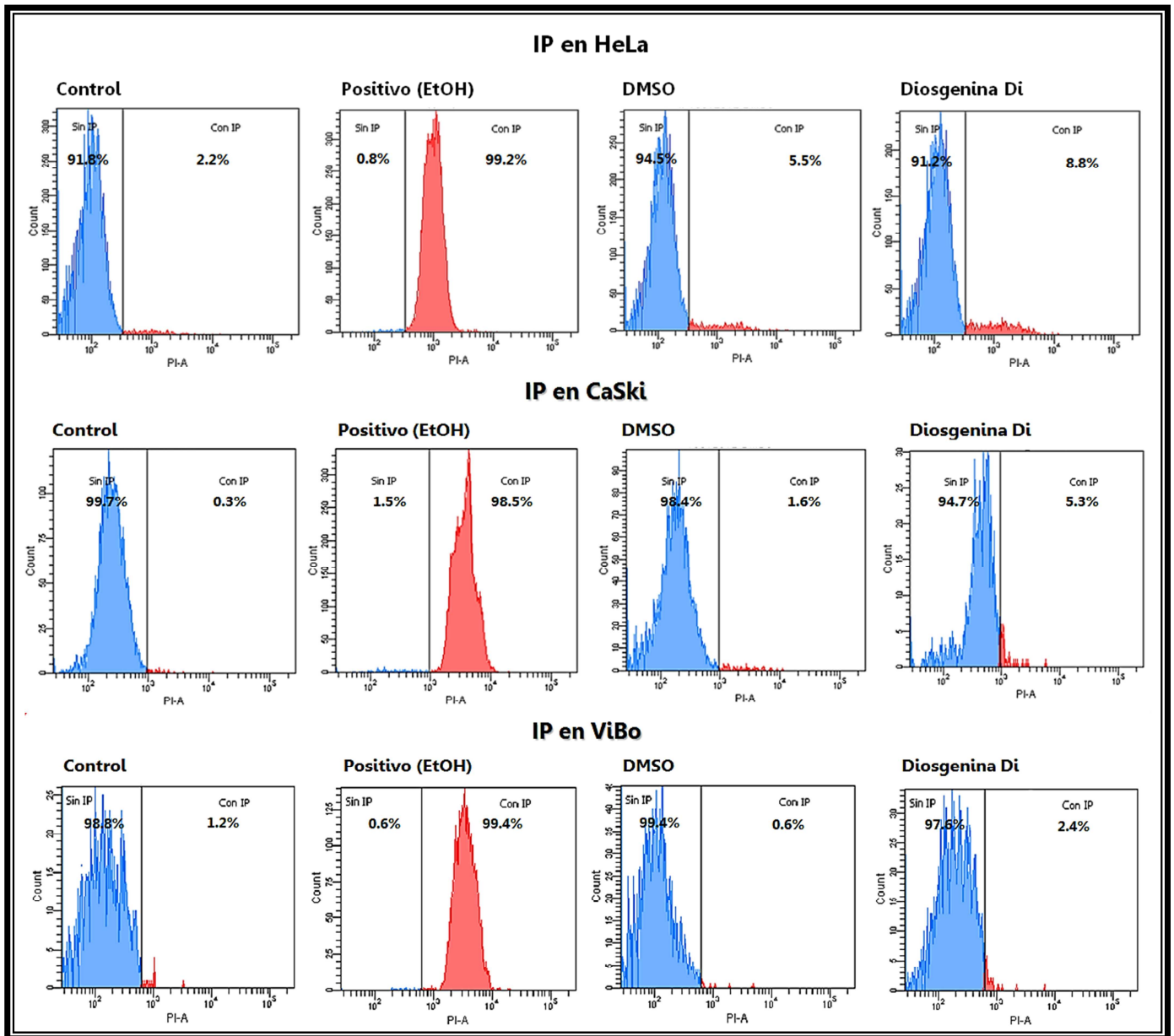


Fig. 18. Incorporación de yoduro de propidio (IP) por las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con saponina Diosgenina Di a la concentración de la CI_{50} correspondiente para cada línea tumoral, el DMSO se utilizó a una concentración del 1% mientras que para el control positivo se utilizó células fijadas con etanol. Gráfico representativo de 3 ensayos independientes.

De igual manera, para determinar que el decremento en el número celular inducido por la Diosgenina Di en los cultivos de células no tumorales es llevado a cabo mediante un posible efecto citotóxico (necrótico), cultivos de células de cérvix y linfocitos fueron inducidas con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la actividad de la enzima LDH fue determinada en los sobrenadantes de la misma manera como se determinó para las células tumorales.

Los resultados obtenidos en las figuras 19 y 20, muestran que los sobrenadantes provenientes de cultivos de células de cérvix así como de células linfocíticas no presentan actividad de LDH, indicando que la actividad antiproliferativa de este fitoesteroide no genera daño en la membrana plasmática.

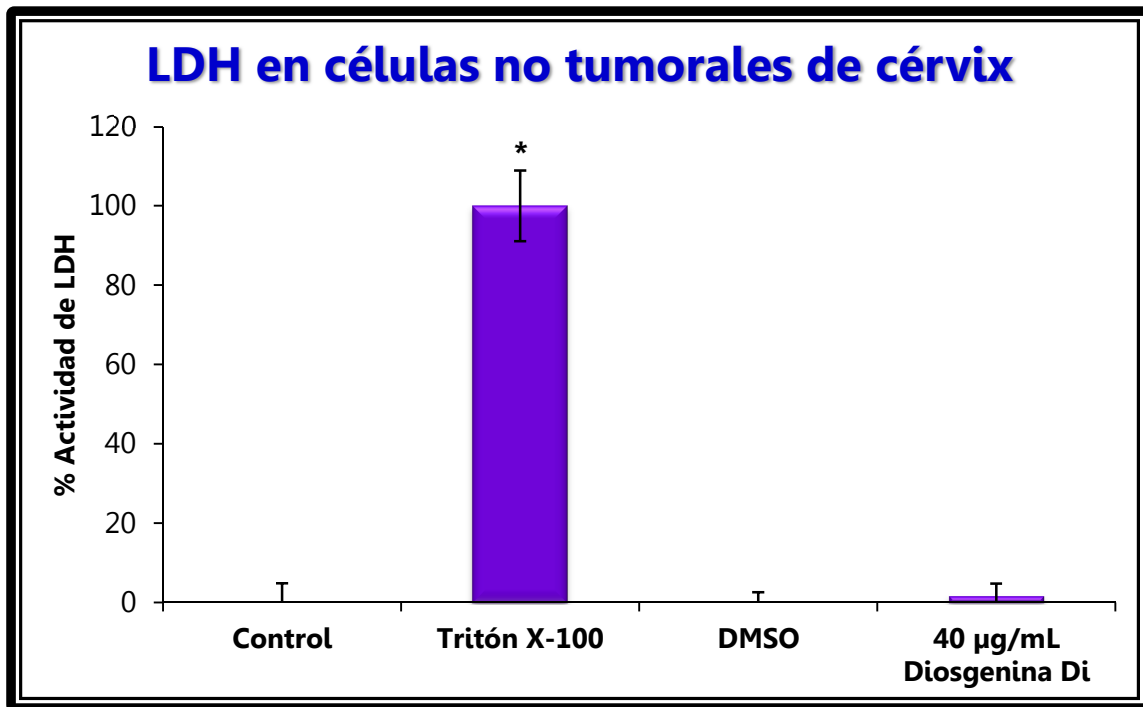


Fig. 19. Actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células de cérvix humano estimulados con la CI_{50} más alta que pertenece a ViBo (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 56 horas; el DMSO se utilizó a una concentración de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ mientras que el Tritón X-100 se manejó como control positivo. Tanto el DMSO como el tratamiento de Diosgenina Di no presentan diferencia significativa. La barra I indica la desviación estándar y * indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* $p < 0.05$ vs DMSO). Los resultados muestran un ensayo representativo de 3 pruebas independientes con al menos 3 repeticiones.

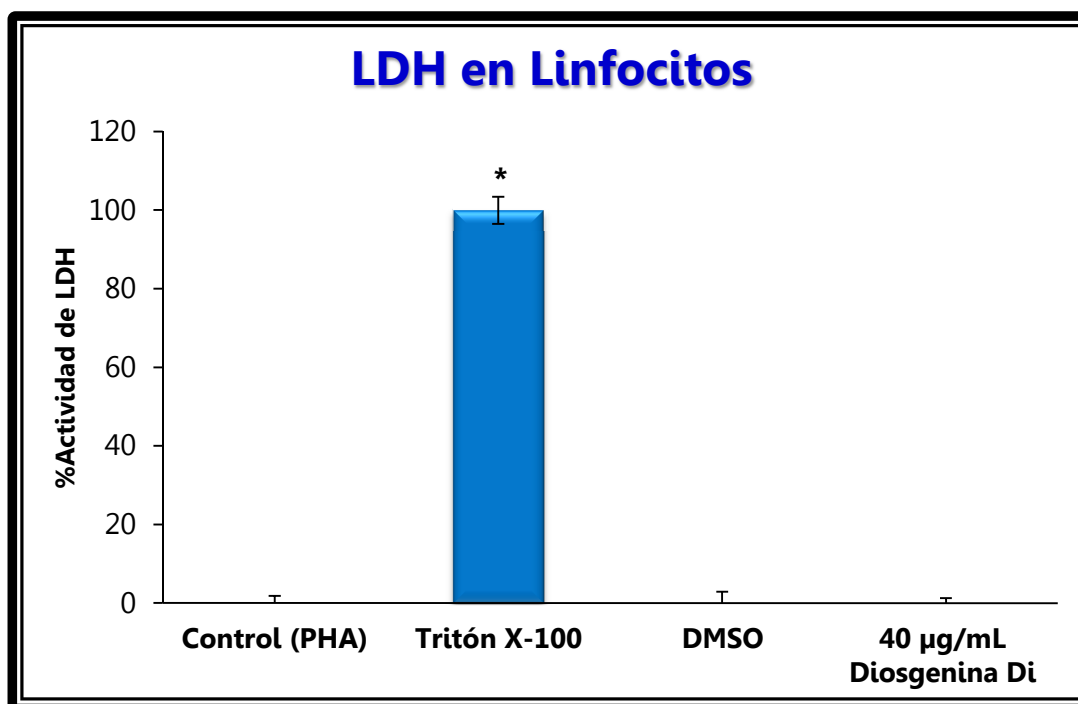


Fig. 20. Actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de linfocitos de sangre periférica humana estimulados con 40 µg/mL de Diosgenina Di por 72 horas; el DMSO se utilizó a una concentración de 10 µL/mL mientras que el Tritón X-100 se manejó como control positivo. La barra I indica la desviación estándar y * indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* $p < 0.05$ vs DMSO). Los resultados muestran un ensayo representativo de 3 pruebas independientes con al menos 3 repeticiones.

Inmunodetección de la caspasa-3 activa

Los resultados obtenidos muestran que la Diosgenina Di, no genera muerte celular necrótica, tanto en las células de CaCu así como en no tumorales, indicando que la actividad antiproliferativa presente en esta saponina es debida a una causa diferente a ella.

Otro tipo de muerte es la apoptosis ésta se caracteriza por la activación de caspasas entre otras. Por otro lado se ha descrito que muchas saponinas y sapogeninas esteroidales como la Dioscina y la Diosgenina entre otras, inducen apoptosis. Por lo que es fundamental de establecer si la Diosgenina Di induce muerte por apoptosis en células tumorales, para ello 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.

Como se muestran en las Fig. 21 a) y b) las células HeLa y CaSki expresaron fuertemente la caspasa 3 activa al ser tratadas con la Diosgenina Di de un 40 hasta un 45 %, sin embargo, las células ViBo Fig. 21 c) la expresaron pobremente en un 20 % aproximadamente.

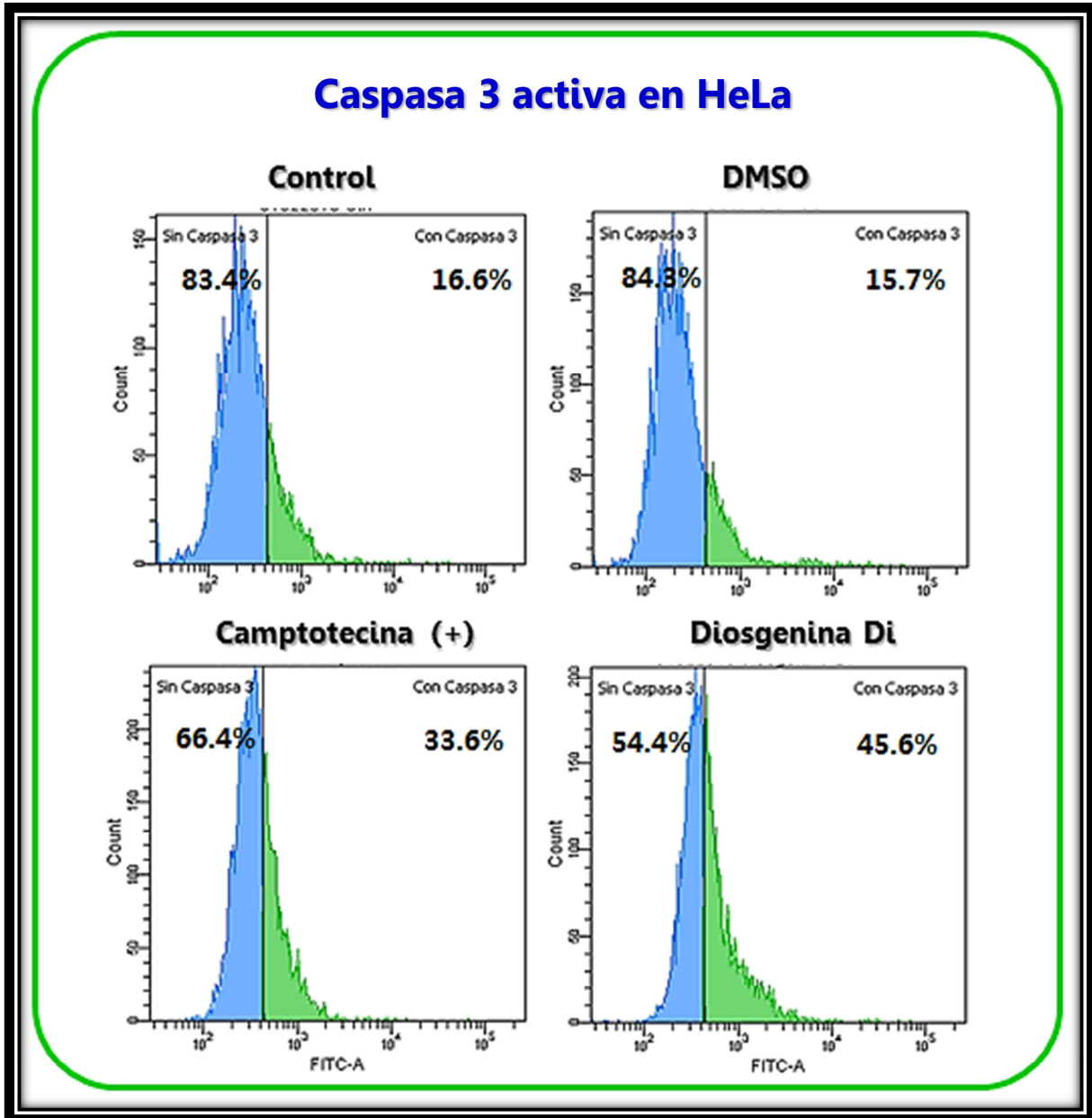


Fig. 21 a). Detección de caspasa 3 activa correspondiente a la línea de CaCu HeLa al ser estimuladas con 30.8 µg/mL de Diosgenina Di. El gráfico es un ensayo representativo de 3 ensayos independientes.

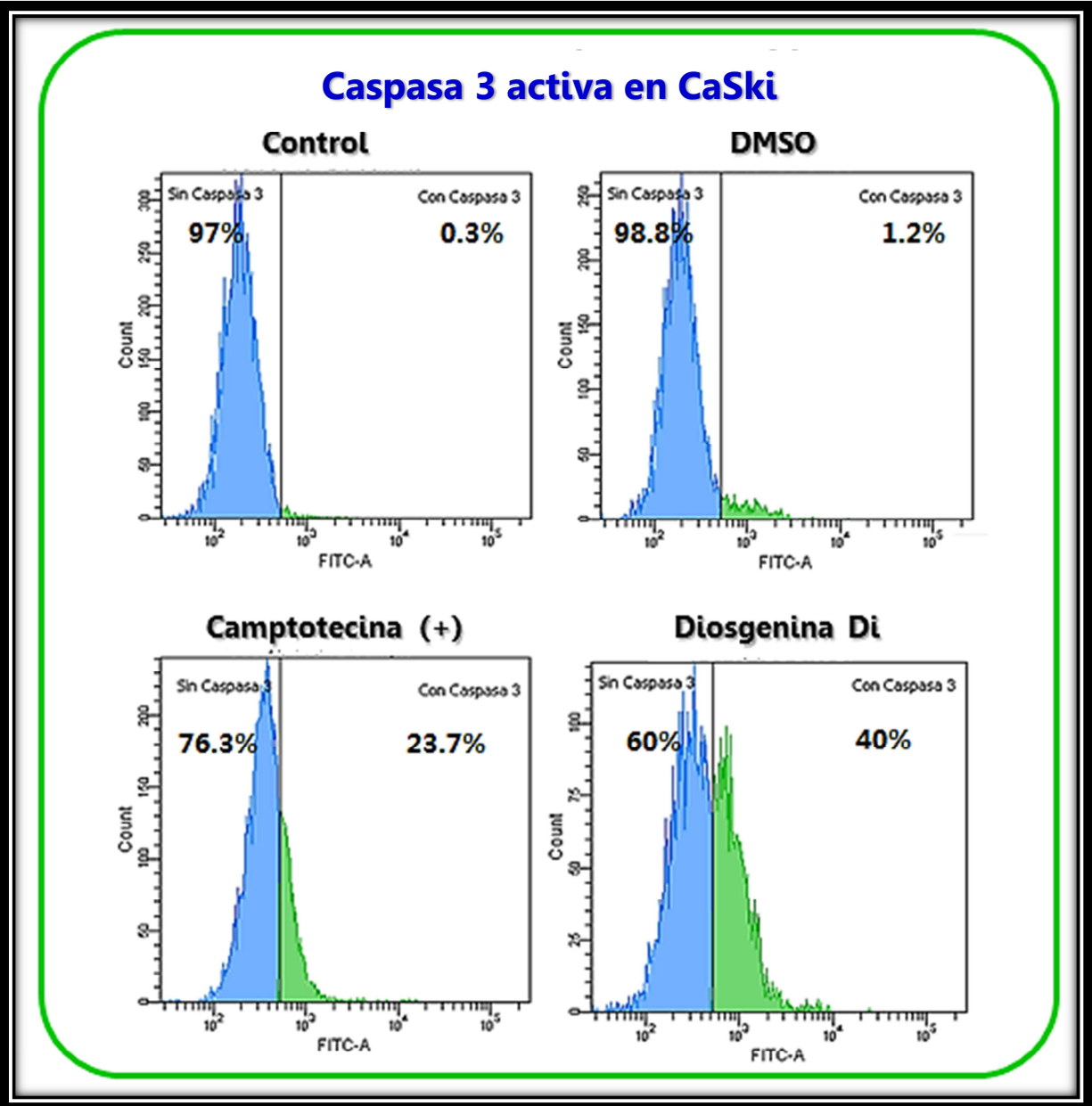


Fig. 21 b). Detección de caspasa 3 activa correspondiente a la línea de CaCu CaSki al ser estimuladas con 32.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Diosgenina Di. El gráfico es un ensayo representativo de 3 ensayos independientes.

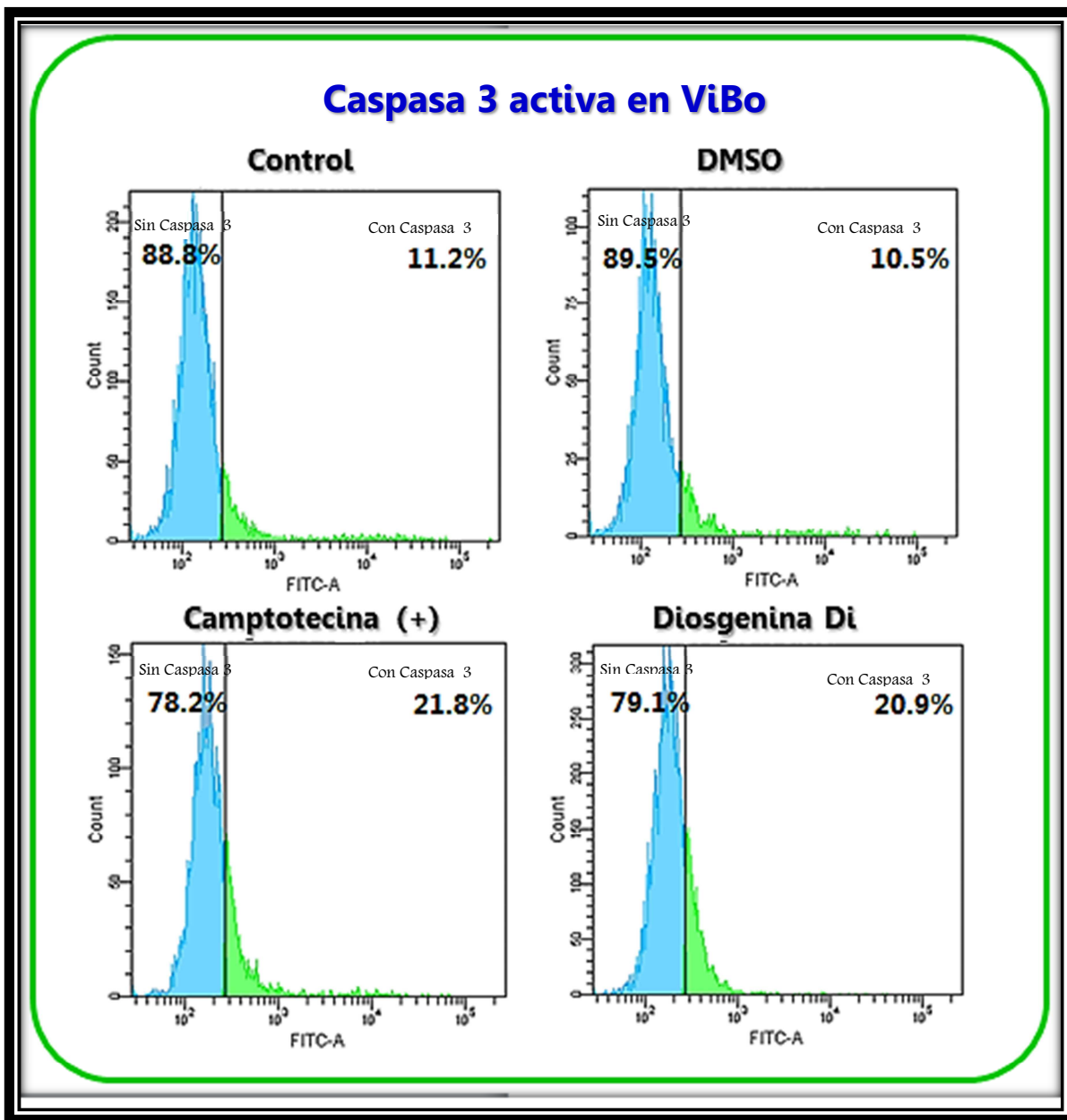


Fig. 21 c). Detección de caspasa 3 activa correspondiente a la línea de CaCu ViBo al ser estimuladas con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Diosgenina Di. El gráfico es un ensayo representativo de 3 ensayos independientes.

Además de la caspasa 3 se evaluó el cambio en la morfología, condensación y fragmentación de la cromatina, así como la presencia de cuerpos apoptóticos por microscopia de epifluorescencia y contraste de fases de las Cl_{50} en las células de CaCu.

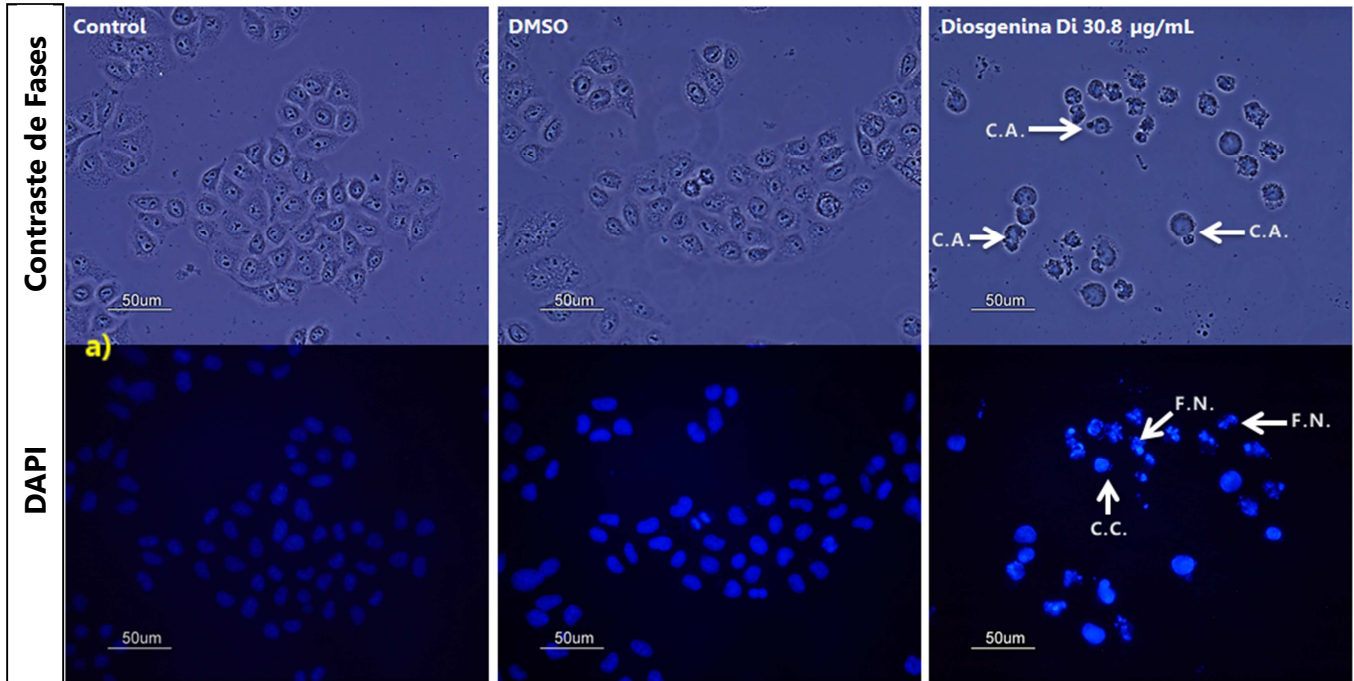
Efecto de la Diosgenina Di en la morfología celular y condensación de la cromatina

Cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron sembrados en cubreobjetos y estimulados con la CI_{50} respectiva para cada línea celular por 24 horas y las células fueron fijadas con etanol al 70% y teñidas con el fluorocromo DAPI para finalmente ser observadas en un microscopio de epifluorescencia.

Los resultados obtenidos en la Fig. 22 a), b) y c) muestran que la Diosgenina Di afecta la morfología celular de las tres líneas tumorales. El efecto de los cultivos tratados con la Diosgenina Di fueron comparados con los cultivos sin tratamiento. Apreciando por microscopia de contraste de fases las células tratadas con la saponina esteroideal poseen una forma esférica, de tamaño reducido, con escaso citoplasma, sin proyecciones citoplasmáticas, mientras que los controles mantienen su citoplasma extendido y una forma poliédrica, de la misma forma la observación por microscopia de epifluorescencia permitió ver núcleos compactos con la cromatina fragmentada y/o formando cuerpos apoptóticos.

Dichas características fueron fuertemente observadas en las células HeLa y CaSki Fig. 22 a), b), mientras que en las células ViBo el efecto fue menor o poco significativo, Fig. 22c). También en las células ViBo se observan vesículas intracelulares.

HeLa



CaSki

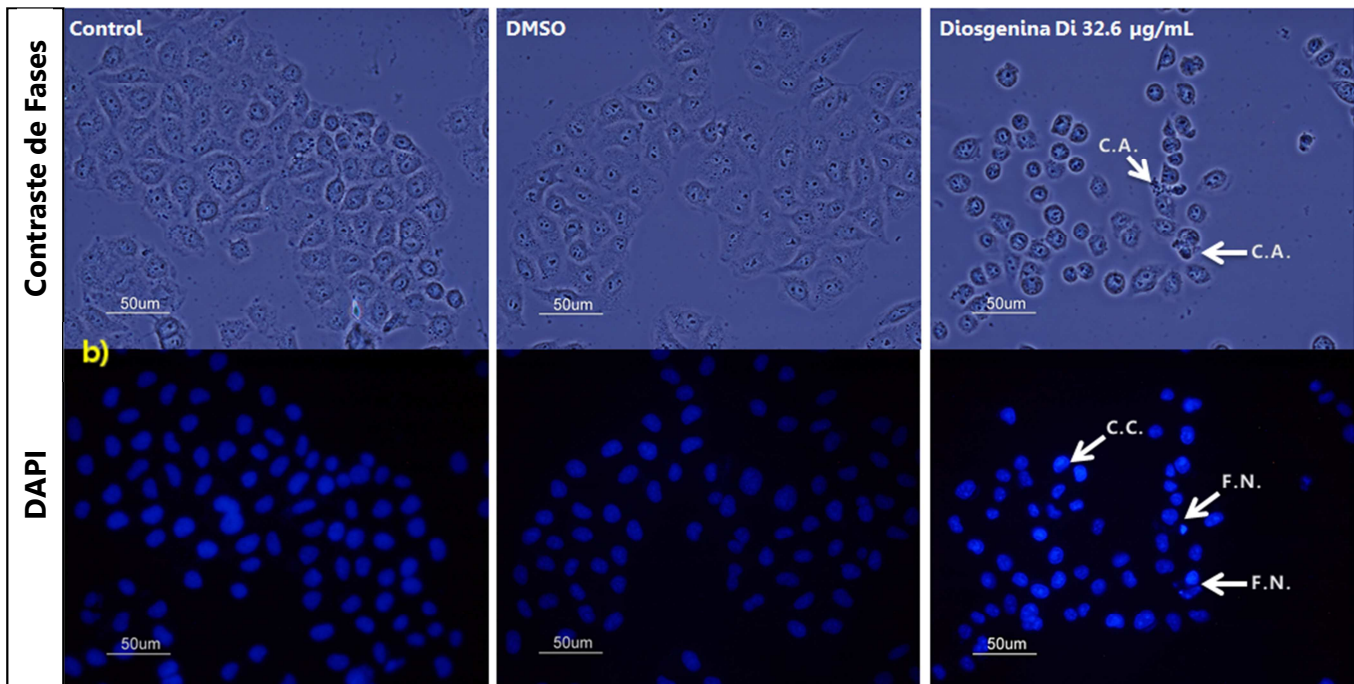


Fig. 22 a) y b). Efecto en la morfología celular y en la condensación de la cromatina en células de CaCu a) HeLa y b) CaSki. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento de su respectiva CI_{50} de Diosgenina Di en comparación con las células sin tratamiento en RPMI al 5% de NSC; DMSO, al 1%. Se observa compactación del citoplasma, también una condensación y fragmentación de la cromatina con la tinción de DAPI (azul). C.A.: Cuerpo apoptótico, F.N.: Fragmentación nuclear, C.C.: Condensación de la cromatina.

ViBo

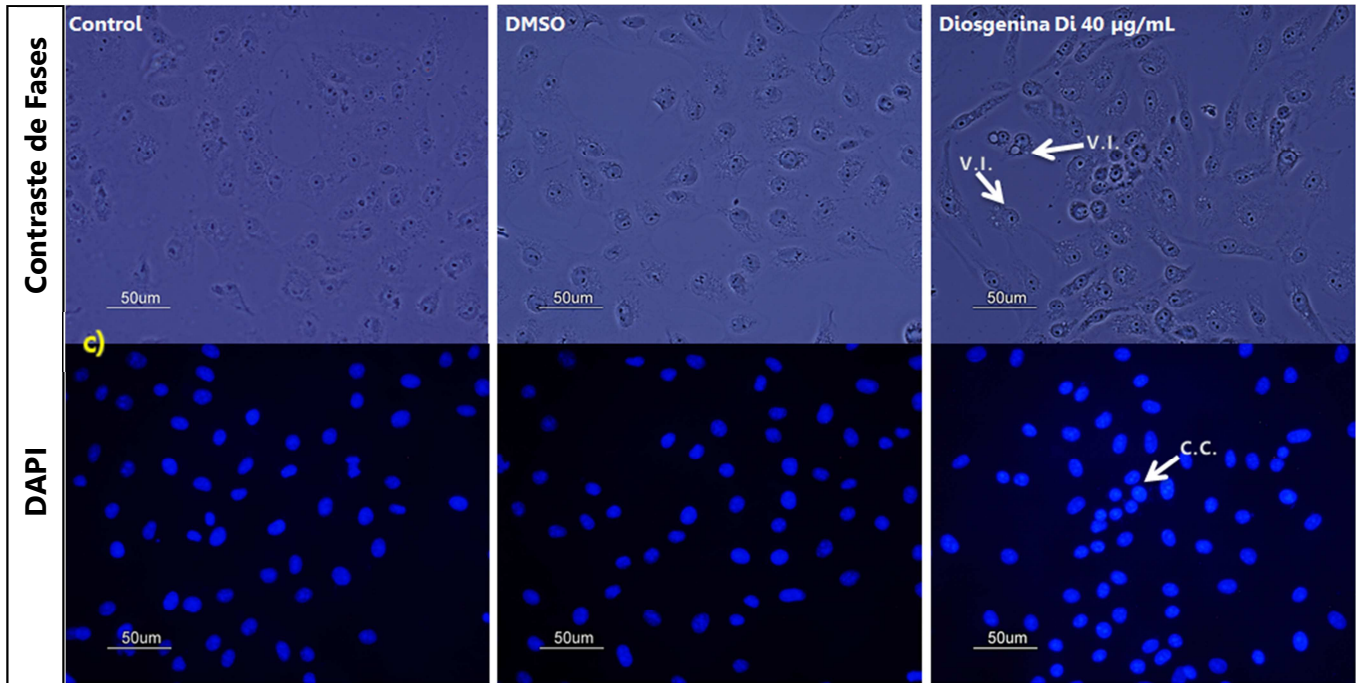


Fig. 22 c). Efecto en la morfología celular y en la condensación de la cromatina en células de CaCu ViBo. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con su CI_{50} de Diosgenina Di en comparación con las células sin tratamiento en RPMI al 5% de NSC; DMSO, al 1%. Se observa ligeramente una compactación del citoplasma, también se observa una condensación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). C.A.: Cuerpo apoptótico, F.N.: Fragmentación nuclear, C.C.: Condensación de la cromatina, V.I.: Vesículas intracelulares

Detección de especies reactivas de oxígeno

Finalmente, y conociendo que el proceso apoptótico puede ser inducido por la generación de ERO, cultivos de células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo fueron estimuladas con su respectiva CI_{50} , y la detección específica de ERO fueron determinadas durante 5 horas mediante el marcaje con DCFH-DA y cuantificado por citometría de flujo (Fig. 23).

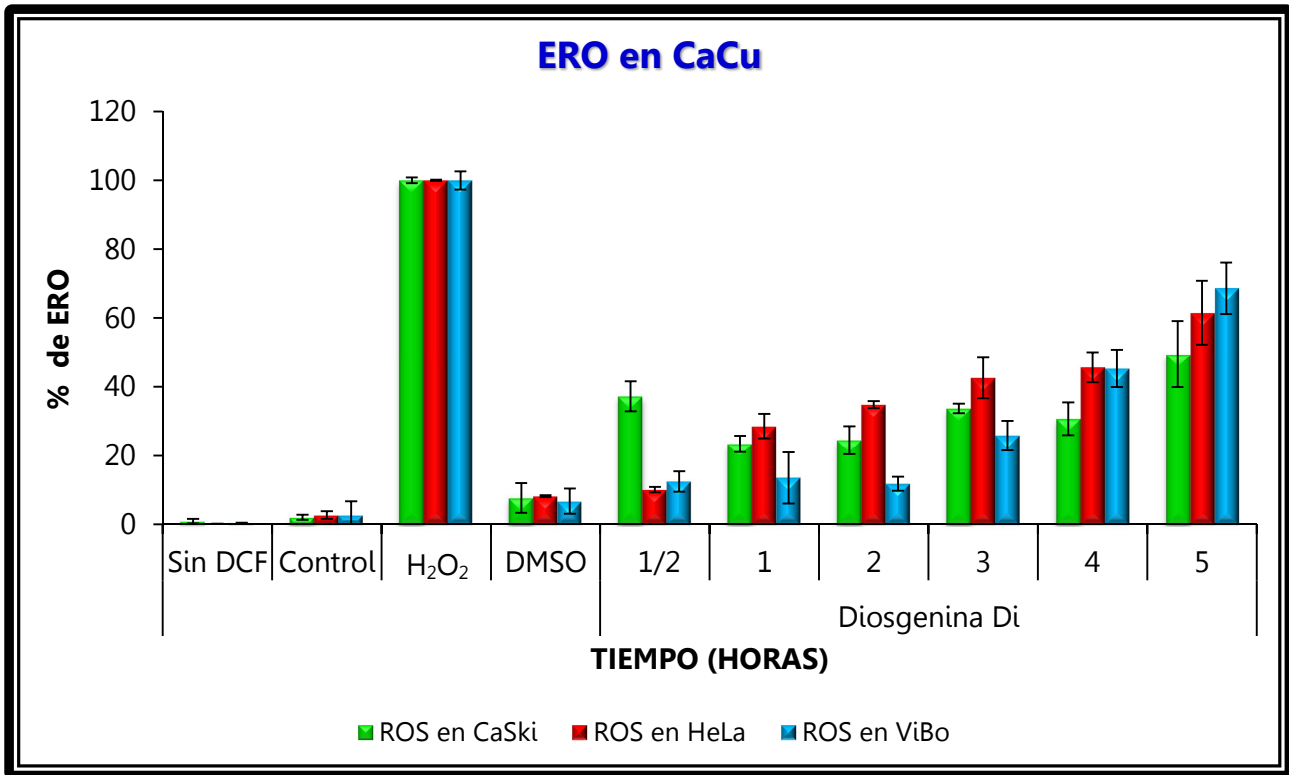


Fig. 23. Generación de ERO en células tumorales tratadas con Diosgenina Di. Cultivos de células de CaCu fueron tratados con su respectiva CI_{50} durante 5 horas y se cuantificó las ERO mediante la técnica DCFH por citometría de flujo. Sin DCF; células sin tratamiento y sin DCFH, Control; células sin tratamiento y con DCFH, H₂O₂; control positivo con H₂O₂, DMSO células con 1% de DMSO, y Diosgenina Di a sus respectivas CI_{50} . Se muestra que la saponina Diosgenina Di genera ERO y se observa que se incrementan conforme transcurre el tiempo. La barra I indica la desviación estándar.

Los resultados mostrados en la Fig. 22, establecen que las tres líneas tumorales generan ERO al ser estimuladas con la Diosgenina Di a sus respectivas IC_{50} , de manera dependiente del tiempo, por lo menos hasta las primeras cinco horas. Estos resultados sugieren que la generación de radicales libres en las primeras horas podrían ser la causa principal de la inducción de muerte apoptótica en las células tumorales.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer tiene un importante impacto social y económico en el sistema de cuidado de la salud humana y es una de las principales causas de muerte en el mundo (Jemal, *et al.*, 2011). Una parte de la investigación en el desarrollo de nuevos fármacos, se enfoca a encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios (Schlaepfer y Mendoza, 2010). Con respecto a las saponinas esteroidales, las cuales han atraído mucha atención debido a la amplia gama de actividades biológicas, se ha descrito su actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis entre otras (Zhou, *et al.*, 2005; Podolak, *et al.*, 2010; Qing, *et al.*, 2012).

En el caso particular de la Diosgenina Di, los resultados demuestran que ésta presenta actividad antiproliferativa en células tumorales humanas de cáncer cervicouterino con una CI_{50} entre 42 y 55 $\mu\text{mol/L}$. La escasa información sobre esta saponina en otras líneas celulares limita su análisis general, no obstante, Wang S. y colaboradores en 2004, mostraron que la Diosgenina Di inhibe la proliferación de células de cáncer humano a concentraciones que van desde 5.86 $\mu\text{mol/L}$ hasta 18.7 $\mu\text{mol/L}$. Sin embargo, la técnica utilizada para determinar su actividad antiproliferativa fue realizada mediante la reducción de la sal de tetrazolium, técnica que objetivamente mide la viabilidad celular mediante la actividad mitocondrial, por lo que los resultados de este trabajo en realidad indican el rango de concentración que se requiere para inducir muerte en las líneas celulares humanas, por lo que no se puede comparar con las concentraciones obtenidas en nuestro trabajo, ya que la técnica de cristal violeta evalúa el número celular no discrimina entre vivas y muertas.

No obstante la escasa información sobre esta saponina, la Diosgenina Di presenta una estructura muy similar a la de la Dioscina y Diosgenina, las cuales ya han sido estudiadas cuya actividad antiproliferativa está dado en concentraciones de 2 a 5 $\mu\text{mol/L}$ para la Dioscina (Cai, *et al.*, 2002; Fernández, 2010) y de 18 a 50 $\mu\text{mol/L}$ para la Diosgenina (Son, *et al.*, 2007; Fernández, 2010; Lepage, *et al.*, 2011).

Estos resultados comparativos muestran que la Diosgenina Di es menos potente en su actividad antiproliferativa que la Dioscina y la Diosgenina y que desde el punto de vista estructural, la diferencia entre la Dioscina y la Diosgenina Di es que la Dioscina presenta dos ramnosas en vez de una, sugiriendo que esta ramnosa en la Dioscina es la responsable de incrementar la actividad antiproliferativa, mientras que en la Diosgenina Di, su ausencia le genera un decremento. Con respecto a la Diosgenia, la diferencia estructural es que la molécula no presenta azúcares, solo presenta la parte aglicona y su actividad antiproliferativa es más potente que la Diosgenina Di y menos potente que la Dioscina, indicando que la aglicona presenta la actividad antiproliferativa, mientras que los azúcares le dan a esta actividad una mayor potencia.

Por otro lado, actualmente el principio de acción de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula tumoral en comparación con el de la células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no tumorales que crecen y se dividen rápidamente como lo son las de la sangre (linfocitos) (Schlaepfer y Mendoza, 2010). Además de presentar una alta actividad necrótica (citotoxicidad), generando los múltiples efectos secundarios como fatiga, náuseas, vómitos, caída del pelo, lesiones en la boca, y dolor (National Cancer Institute, 2013), de tal manera que en pacientes con cáncer avanzado o metastásico, no solo los tratamientos quimioterapéuticos resultan ser ineficientes, sino que además, los efectos colaterales resultan ser tan significativos, que afectan la calidad de vida del paciente, al grado de llevarlo a la muerte. Por ello, la búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa de nula o baja citotoxicidad es necesaria.

De tal manera, que en el presente trabajo se evaluó la actividad necrótica y antiproliferativa, en células de CaCu y no tumorales (linfocitos de sangra periférica humana y células de cérvix humano) mediante la técnica de actividad de la LDH e incorporación de IP. Y los resultados establecen que la Diosgenina Di, genera nula o baja actividad necrótica para células de CaCu y para no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana y de cérvix humano), ya que la característica principal de la muerte celular por necrosis es la

pérdida de la integridad de la membrana celular (Ross y Wojciech, 2007), y estas no lo presentan.

Sobre esto se ha reportado que tanto la Diosgenina, como la Dioscina poseen actividad necrótica en diferentes células tumorales (Podolak, *et al.*, 2010), además es bien conocido que en conjunto las saponinas tienen acción hemolítica (Francis, *et al.*, 2002), a pesar de esto la Diosgenina Di no genera necrosis en células de CaCu ni en células no tumorales, generando en este compuesto una relevancia en su mecanismo de acción con respecto a los quimioterapéuticos cuyo mecanismo de acción está basado en la citotoxicidad. No obstante la nula o baja citotoxicidad de la Diosgenina Di, ésta afectó el potencial proliferativo tanto de células tumorales así como de células no tumorales prácticamente a las mismas concentraciones, sin embargo, la relevancia de la acción selectiva de este compuesto está en el tiempo, ya que a una concentración de 40 µg/mL de Diosgenina Di que inducen un abatimiento del 50 % en el número celular en los cultivos de las células tumorales en un tiempo de 24 horas, esta concentración en células no tumorales afectan en un 35 y 50 % en el número celular, en linfocitos de sangre periférica humana y en células no tumorales de cérvix humano respectivamente, sin embargo requieren de 56 a 72 horas. Cabe destacar que la mayoría de las saponinas reportadas con actividad antitumoral no han sido probadas en cultivos de células no tumorales, dejando de lado su acción selectiva.

De igual manera se ha descrito que el mecanismo de la mayoría de los quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento contra el cáncer, inducen a la célula a una muerte celular por necrosis, la cual tiene el inconveniente de inducir una fuerte reacción inflamatoria, que es directamente proporcional a la cantidad de células dañadas pudiendo ir desde una inflamación local, fiebre y malestar hasta la anafilaxia (Sánchez, 2003). Por lo tanto, la necesidad de encontrar compuestos que induzcan a las células a una muerte que no provoque una respuesta inflamatoria es obligada. Al respecto, es conocido que las células normales del cuerpo humano son eliminadas mediante diferentes mecanismos de muerte programada, destacándose la apoptosis y la autofagia, las cuales eliminan a las células de una manera silenciosa sin generar una respuesta inflamatoria, interesantemente, se ha

descrito que las saponinas esteroidales presentan actividad inductora de apoptosis (Qing, *et al.*, 2012; Lepage, *et al.*, 2011; Lin, *et al.*, 2011), y la Diosgenina Di no es la excepción, ya que este fitoesteroide provocó en las células tumorales HeLa y CaSki disminuyeran su tamaño y que presentaran una forma esférica, además de presentar una condensación y fragmentación en la cromatina nuclear, estos cambios morfológicos son característicos de la apoptosis (Paniagua, *et al.*, 2007), un tipo de muerte celular programada en la que las células no liberan su contenido celular a los tejidos intersticiales de los alrededores ya que son rápidamente fagocitadas por macrófagos o células adyacentes normales, por lo que no hay reacción inflamatoria (Kurosaka, *et al.*, 2003; Taylor, *et al.*, 2008) y que en conjunto con los resultados observados en la expresión de la caspasa 3 activa, confirma esta aseveración.

Con relación a la Diosgenina Di, Wang y colaboradores en 2004 encontraron que induce apoptosis en células de carcinoma de colon HCT-15 donde se logró demostrar la liberación de citocromo c que es un proceso crucial en la vía intrínseca de la apoptosis (Riedl y Salvesen, 2007). Así como la sobre expresión de Bax que es una proteína pro-apoptótica y la fragmentación de ADN. De igual forma, se tienen registros de inducción de apoptosis de la Diosgenina y Dioscina mediante la activación de la caspasa-3 (Jayadev y Rekha, 2008; Ming-Ju, *et al.*, 2012). Estos antecedentes concuerdan con los resultados obtenidos para la saponina esteroideal Diosgenina Di, los cuales indican que este compuesto induce una sobreexpresión de la caspasa-3 activa, en las células HeLa y CaSki.

Sin embargo, en las células ViBo no muestra ser la causa principal de la disminución en el número celular. Por lo que sería importante evaluar tanto ciclo celular como otros tipos de muerte, ya que se ha encontrado que saponinas como la Dioscina inducen autofagia, en donde se expresan altos niveles de ERO (Ming-Ju, *et al.*, 2012).

Cabe mencionar que sería interesante evaluar si esta saponina induce muerte apoptótica en células no tumorales, de tal manera que la diferencia de tiempo que hay en respuesta al efecto antiproliferativo por parte de las células tumorales en comparación con las células no tumorales, sea una ventaja significativa, ya que las células tumorales estarían siendo eliminadas, antes que las células no tumorales.

Por otro lado, existe escasa información sobre el mecanismo de acción de las saponinas esteroidales, y los resultados establecen que la Diosgenina Di genera radicales libres provenientes del peróxido de hidrógeno, lo cual hace suponer que estos radicales son posiblemente los inductores de la muerte por apoptosis, que observamos en las células tumorales tratadas con el esteroide ya que como se ha descrito en la literatura las ERO cumplen funciones muy importantes, como participar en rutas de señalización, pero también pueden generar estados patológicos o conducir a la muerte celular. Las fallas en la funcionalidad mitocondrial conllevan a que las células produzcan y liberen ERO que desencadenan la muerte celular por apoptosis (Tarazona M., *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que hace falta caracterizar de forma precisa la vía de señalización que lleva a la activación de la apoptosis. Para ello sería conveniente la evaluación de la activación de la caspasa 9, la expresión de Bax, Bcl-2 u otras proteínas proapoptóticas o antiapoptóticas, fragmentación de ADN, el efecto en el potencial de la membrana mitocondrial, en células tumorales, también si es dependiente del ciclo celular tanto en células tumorales y no tumorales, y evaluar su efecto genotóxico.

Además existen reportes que mencionan que la Diosgenina inhibe la migración y la invasión de células de cáncer de próstata (Pin-Shern, *et al.*, 2011) mediante la reducción de la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular, por lo que sería importante evaluar si la Diosgenina Di presenta también esta actividad.

Estos resultados en conjunto, establecen que la Diosgenina Di presenta actividad antiproliferativa en células tumorales y no tumorales sin causar muerte necrótica, induciendo a las células tumorales a una muerte apoptótica posiblemente a través de la generación de radicales libres provenientes del peróxido de hidrógeno, haciendo de este compuesto un digno candidato para ser estudiado en modelos *in vivo* y ser evaluado como un agente con potencial antitumoral, cuya expectativa está basada en la ventaja de acción en el tiempo de administración y cuyos efectos colaterales serían leves o poco significativos.

X. CONCLUSIONES

- La Diosgenina Di afecta el potencial proliferativo de manera dosis dependiente en las tres líneas de CaCu.
- La saponina esteriodal Diosgenina Di presenta una CI_{50} de 42.65, 45.15 y 55.40 $\mu\text{mol/L}$ para las células HeLa CaSki y ViBo respectivamente a 24 horas de tratamiento.
- A concentraciones de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de la saponina reduce en un 30, 33 y 50 % respectivamente la proliferación de células no tumorales de cérvix humano a 56 horas de tratamiento. En linfocitos de sangre periférica humana a concentraciones de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g/mL}$ afectan en no más un 35 % en su proliferación a 72 horas de tratamiento.
- La Diosgenina Di no induce muerte necrótica en células CaCu: HeLa, CaSki y ViBo ni en células no tumorales.
- La Diosgenina Di induce muerte por apoptosis en células HeLa y CaSki a través de la sobreexpresión de la enzima caspasa 3 activa.
- La saponina Diosgenina Di afecta la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo en su respectiva CI_{50} además de condensar y fragmentar la cromatina nuclear y generar cuerpos apoptóticos en HeLa y CaSki.
- La Diosgenina Di es capaz de inducir un incremento en las especies reactivas de oxígeno a través del tiempo en las células de CaCu.

XI. PERSPECTIVAS

A pesar de demostrar que la saponina esteroideal Diosgenina Di presenta una actividad antiproliferativa y apoptótica en las líneas celulares provenientes de CaCu, sería conveniente ampliar el presente estudio, en más líneas celulares tumorales, tanto de CaCu como otros tipos de cáncer para tener una mayor perspectiva del comportamiento biológico de este compuesto. De igual manera, evaluarlo en otros tipos de células no tumorales como en diferentes células epiteliales, en hepatocitos, células renales, entre otras, para poder determinar si este compuesto tiene un efecto selectivo entre células tumorales y no tumorales.

También resulta de gran importancia estudiar el mecanismo de acción y las moléculas que intervienen, de tal forma que se pueda aportar más información sobre posibles blancos moleculares, que permitan valorar su potencial quimioterapéutico y evaluar la capacidad de resistencia que las células tumorales pueden generar contra la aplicación del compuesto.

La actividad antiproliferativa, no citotóxica e inductora de apoptosis presente en la Diosgenina Di hace de este compuesto un digno candidato para ser estudiado en modelos *in vivo* con la intención de evaluar su potencial terapéutico.

XII. REFERENCIAS

- Abdel M. El Sayed M. Abdel E.** (1999). Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia*. 70: 371-381.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2008). *Biología molecular de la célula*. Editorial Omega, 5a ed. P. 1728.
- Anaya L.** (2003). *Ecología Química*, UNAM, Plaza y Valdes editores. 2a ed. México P. 343.
- Arango M., Fernández L., Román T., García M.** (1997). La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Oncología*. 13: 126-134.
- Avers C.** (1996). *Biología Celular*. Grupo Editorial Iberoamérica, 2a ed. México P. 749.
- Bolsover R., Hyams J.S., Shephard E.A., White H. A., Widemann C.G.** (2004). *Cell Biology: A Short Course*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New York. P. 552.
- Cai J., Liu M., Wang Z., Ju Y.** (2002). Apoptosis Induced by Dioscin in HeLa Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25: 193-196.
- Castellsague X, Muñoz N.** (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31: 20-28.
- Castillo A., Torres I., Barrientos C., Ochoa D.** (2011). El cáncer cervico uterino, enemigo número uno de la salud de la mujer. *Revista electrónica Medicina, Salud y Sociedad*. 3: 1-15.
- Corrales R., Henriksson J., Paiva C., Li D., Bergmanson J., Farley W., Pflugfelder S.** (2010). Entrapment of Conjunctival Goblet Cells by Desiccation-Induced Cornification. *Investigative Ophthalmology y Visual Science*. 52: 3492-3499.
- Cultek.** (2013). Grupo Cultek, S.L. Madrid. Consulta virtual de datos. Consultada el 17 de mayo 2013. Disponible en: http://www.cultek.com/otros/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf
- Doorbar J.** (2006). Molecular biology of human papilloma- virus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110: 525-541.
- Dubin M., Stoppani A.** 2000. Muerte celular programada y apoptosis función de las mitocondrias. *Medicina* 60: 375-386.
- Eskander J., Lavaud C., Harakat D.** (2010). Acylation with diangeloyl groups at C21-22 positions in triterpenoidsaponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Fitoterapia*. 81: 371-374
- Fernández M.** (2010). *Síntesis De Derivados Esteroidales Con Actividad Biológica: Anticancerígenos Y Promotores Del Crecimiento Vegetal*. Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. México. P. 322.
- Fernández M., López H., Hernández J., López M., Sankar M., Escobar M., Sánchez L., Pinto M., Sandoval J.** (2011). Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-22-oxocholest-

5-en-26-yl β -d-glucopyranoside: A selective anticancer agent in cervicouterine cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46: 3877–3886.

Francis G., Kerem Z., Harinder P., Makkar and K. Becker. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*. 88: 587–605.

Fuentes X., Castiñeiras M., Queraltó J. (1998). *Bioquímica Clínica y Patología molecular*. Editorial Reverté S.A. Vol. 2. 2da ed. Barcelona. P. 540.

Fulda S. (2012). Autophagy and cell death. *Autophagic Punctum*. 8: 1250-1251.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams JM., Alnemri ES., Baehrecke EH., Blagosklonny MV., Dawson TM., Dawson VL., Fulda S., Gottlieb E., Green DR., Hengartner MO., Kepp O., Knight RA., Kumar S., Lipton SA., Malorni W., P Mehlen P., G Nuñez G., Peter ME., Piacentini M., Rubinsztein DC., P Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G, and Kroemer G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 19: 107–120.

Hebner C, Laimins A. (2006) Human papillomaviruses: basis mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology*. 16: 83-97.

Hong-Ji Q., Jyunichi K., Ken H., Xing-Ri C., Yasunori I., Seiichi K., Setsuo S. (2006). Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with various nucleophiles and pharmacological activities of the products. *Chemical y pharmaceutical bulletin*. 54: 72-79.

Hu. K., Kobayashi, H., Dong, A., Jing, Y., Iwasaki, S., Yao, X. (1999). Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta Medicinale*. 65: 35-38.

INEGI. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 19 de Febrero de 2013. www.inegi.gob.mx.

Jayadev R., Rekha M. (2008). Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin. *Nutrition and Cancer*. 61:1, 27-35.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman. (2011). Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 61: 69–90.

Jiménez C, Correnti M, Salma N, Cavazza M, Perrone M. (2001). Detección del virus del papiloma humano en entidades clínicas benignas de la cavidad bucal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación molecular. *Acta Odontológica Venezolana*. 39:1-7.

Jun-Dong Z., Yong-Bing C., Zheng X., Hui-Hua S., Mao-Mao A., Lan Y., Hai-Sheng C., Ping-Hui G., Yan W., Xin-Ming J y Yuan-Ying J. (2005). In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulusterrestris* l. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28: 78-85.

Karp G. (2011). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*, Editorial Mc. Graw-Hills, 6ta Ed. México. P. 899.

Kepp O., Galluzzi L., Zitvogel L., Kroemer G. (2010). Pyroptosis: a cell death modality of its kind? *European Journal Immunology*. 40: 595–65.

- Kerr J., Wyllie A., Currie A.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-257.
- Kierszenbaum A.** (2008). *Histología y Biología celular*. El sevier, 2da ed. España. P. 671.
- Klug W., Cummings M., Spencer C.** (2006). *Conceptos de Genética*. Prentice Hall. 8ª ed. Madrid. P. 920.
- Koutsky L., Ault K., Wheeler C.** (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *New England Journal of Medicine*. 347: 1645-1651.
- Kuroda M., Mimaki Y., Hasegawa F., Yokosuka A., Sashida Y. Sakagami H.** (2001). Steroidal glycosides from the bulbs of *Camassialeichtlinii* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 49: 726-731.
- Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y.** (2003). Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *The Journal of Immunology*. 171: 4672-4679.
- Lin G., Li F-R., Jiao P., Yao S-T., Sang H., SiY-H.** (2011). Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells Induced by Paris Chinensis Dioscin via a Ca^{2+} -Mediated Mitochondrion Pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 12: 1361-1366
- Li, K. Tang Y, Fawcett JP, Gu J, Zhong D.** (2005). Characterization of the Pharmacokinetics of Dioscin in Rat. *Steroids*. 70: 525-530.
- Lazcano E. Ruiz P., Hernández M.** (2005). *Cáncer cervicouterino: Diagnostico, prevención y control*. 2a Ed. Médica Panamericana. México. P. 385.
- Lepage C., Léger D., Bertrand J., Martin F., Beneytout J., Liagre B.** (2011). Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Letters*. 301: 193-202.
- Lizarbe M.** (2007) El suicidio y la muerte celular, *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.*, 101: 1-33.
- Lomanto D, Ortiz L, Bretón O, Gómez I, Mesa M.** (2003). El ciclo celular. *MEDUNAB Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga* 16: 21-29.
- López A., Marcela L.** (2006), *Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina*. *Cancerología*, 1: 31-55.
- Maier S.** (2009). Metabolitos secundarios bioactivos de organismos marinos pertenecientes al phylum Echinodermata. *Revista Industria y Química*. 255: 4-8.
- Marinia M., Frabettia F., Canaidera S., Dinib L., Falcieric E., Poirierd G.** (2001). Modulation of Caspase-3 Activity by Zinc Ions and by the Cell Redox State. *Experimental Cell Research*. 266: 323-332.
- Martinic M., von Herrath, M.** (2008), Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trends Immunol*. 29: 116-24.
- Mimaki Y., Kanmoto T., Sashida Y. Nishino A.** (1996). Steroidal saponins from the underground parts of *Chlorophytumcomosum* and their inhibitory activity on tumor-promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry*. 41: 1405-1410.

- Mimaki Y., Yokosuka A., Kuroda M., Sashida Y.** (2001). Cytotoxic activities and structure-citotoxic relationships of steroidal saponins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24: 1286-1289.
- Ming-Jie L., Zhao W., Yong J., Ngok-Shun W y Qing-Yu W.** (2005). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemistry and Pharmacology*. 55: 79-90.
- Ming-Ju H., Yang S-F., Hsieh Y-S., Chen T-Y., Chiou H-L.** (2012). Autophagy Inhibition Enhances Apoptosis Induced by Dioscin in Huh7 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 512-521.
- Moody C, Laimins A.** (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Review Cancer*. 10: 550-60.
- Muñoz N, Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L,** (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus ADN in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7:453-9.
- National Cancer Institute.** (2013). National Institutes of Health. U.S.A. Consulta virtual de datos. Consultada el 27 de abril 2013. <http://www.cancer.gov/>
- Nelson D., Cox M.** (2009), *Principios de Bioquímica*, Editorial Omega, 5ª ed. España P. 511.
- Noriega G., Noriega L.** (2008), El tratamiento actual del cáncer cervicouterino, *Ginecología y Obstetricia de México*. 76: 131-139 pp.
- OMS (Organización Mundial de la Salud).** Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad 2009. Consultada el 16 de marzo de 2013. <http://www.who.int/topics/en/>
- Orrenius S.** (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metabolism Reviews*, 39: 443-455.
- Overholtzer M., King R., Mailleux A., Cibas S., Mouneimne G., Brugge J., Schnitt S.** (2007). A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion *Cell*. 131: 966-979.
- Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Alvarez P., Anadón R., Sáez F.** (2007). *Biología Celular*. Mc Garw Hill. 3ª Ed. Madrid. P.390.
- Pin-Shern C., Shih Y-W, Huang H-C, Cheng H-W.** (2011). Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. *PLoS ONE*. 6: 164-175.
- Podolak I., Elas M. Cieszka K.** (1998). In vitro antifungal and cytotoxic activity of triterpenesaponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research*. 12: 570-573.
- Podolak I., Galanty A., Sobolewska G.** (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Review*. 9: 425-474.
- Quah, B., Parish C.** (2012). New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *Journal of Immunological Methods*. 379: 1-14.
- Raff M.** (1998). Cell suicide for beginners. *Nature*. 396: 119-122.

- Rao A. V. Gurfinkel D. M.** (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *DrugMetabolism and DrugInteractions*, 17: 211–35.
- Remijsen Q., Kuijpers T., Wirawan E., Lippens S., Vandenab P., Vanden T.** (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation* 18, 581–588.
- Richards R, Lowy D, Schiller J, Day P.** (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 522-527.
- Ross M., Wojciech P.** (2007). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana, 5ed. Buenos Aires. P. 992.
- Robbins S., Kumar V., Cotran R.** (1993). *Patología Humana*. Editorial Mc Graw Hill. México P. 374.
- Sánchez L.** (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Revista Técnica Pecuaria en México* 41: 49-62.
- Schlaepfer L., Mendoza J.** (2010). Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41: 18-27.
- Serrano M., Pastrana F.** (2007). Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología*. 30: 42–59.
- Solary E., Dubrez L Eymin B.,** (1996). The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *European Respiratory Journal* 9: 1293-1305.
- Son I., Kim J., Sohn H., Son K., Kim J. Kwon C.** (2007). Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Diosgenin, and Steroidal saponin of Yam (*Dioscorea ssp.*), on High-Cholesterol Fed Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 3063-3071.
- Tarazona M., Olivera A., Lenis Y.** (2010). Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro. *Archives Medicine Veteterinary*. 42: 125-133.
- Taylor R., Cullen S. y Martin S.** (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews molecular cell biology*. 9: 231-241.
- Tejeda M., Serrano M., Gómez F.** (2007). Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología*, 30: 42-59.
- 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 y Medicinal Chemistry*. 13: 1141-1149.
- Qing T., He, Y., Zhao, Q-B., Huang, W., Wu, X-H.,** (2012). Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscoreazingiberensis* Wright against cancer cells. *Steroids*. 77: 1219–1227.
- Valdespino V., Castillo C.,** (2010). Alteraciones celulares y moleculares no clásicas en el desarrollo del cáncer. *Gaceta Médica Mexicana* Vol. 146 No. 3, p 185-198.

Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., Kroemer G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12, 385-392.

Wang Y., Kim N., Haince J., Kang H., David K., Andrabi S., Poirier S., Dawson V., Dawson T. 2011 Poly(ADP-Ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical for PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos). *Science Signaling* 4: 20-34.

Wang S., Cai B., Cui C., Liu H., Wu C. Yao X. (2004). Diosgenin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside obtained as a new anticancer agent from *Dioscorea futschauensis* induces apoptosis on human colon carcinoma HCT-15 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *Journal of Asian Natural Products Research*. 6: 115-125.

Wang, Z. Zhou, J., Zhang, H., Liu, M., and Li, X. (2001). Effects of Two Saponins Extracted from the *Polygonatum Zanzlanianense* Pamp on the Human Leukemia (HL-60) Cells. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*. 24: 159-162.

Wayne B, Kleinsmith L, Hardin J. (2007). *El mundo de la célula*. Pearson Educación 6a ed. Madrid. 970pp.

Weinberg R., Hanahan D. (2011) The hallmarks of cancer: next generation. *Cell*. 144: 646-673.

Wen C., Valderas A., Sosa M., Girnius N., Farias E., Davis R., Ghiso A. (2011). p38 α Signaling Induces Anoikis and Lumen Formation During Mammary Morphogenesis. *Science Signaling*. 4: 34-50.

Zaldívar G., Ávila J., Molina F., Vega G., Sosa C., Lloret M. (2012). Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista chilena obstetricia ginecológica*. 77: 315 – 321.

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. *Journal of the National Cancer Institute*. 97: 1781-1785.

Fuentes electrónicas de imágenes

- **Representación del ciclo celular.** Consulta virtual de datos. Consultada el 16 de Abril de 2013. Tomado de: <http://biogenmol.blogspot.mx/2008/08/ciclo-celular.html>
- **Muertes celulares habituales en el organismo: necrosis y apoptosis.** Consulta virtual de datos. Consultada el 11 de marzo de 2013. Tomado de: <http://medicinembbs.blogspot.mx/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>
- **Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis.** Consulta virtual de datos. Consultada el 10 de Marzo de 2013. Tomado de: <http://www.biooncology.com/biological-pathways/apoptosis/index.html>
- **Los cambios premalignos cervicales.** Consulta virtual de datos. Consultada el 10 de Marzo de 2013. Tomado de: http://cancer-cervix-honduras.webatu.com/web_images/estados_de_cervix.jpg
- **Proceso de infección y replicación del virus del papiloma humano.** Consulta virtual de datos. Harald zur Hausen. 2008. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008. Consultada el 8 de Marzo de 2013. Tomado de: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/popular-medicineprize2008.pdf
- **La cirugía que se utiliza a veces para tratar el cáncer de cuello uterino es la histerectomía.** National Institutes of Health. U.S.A. Consulta virtual de datos. Consultada el 17 de abril 2013. Tomado de: <http://www.cancer.gov/PublishedContent/MediaLinks/398361.html>
- **Estructura molecular de una saponina esteroideal.** Consulta virtual de datos. Consultada el 7 de abril 2013. Tomado de: <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/glucosidos/saponinas/estructura>.

XIII. APÉNDICE

Medio de cultivo

RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; Gibco, E.U.A.) -----10.42 g

NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. Y se suplementa al 1% Estreptomicina/Penicilina. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino (SFB) o con suero de neonato de ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 µm.

Composición del RPMI-1640 (Gibco, E.U.A.)

SALES INORGÁNICAS		mg/L		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		100	L-triptofano	5
KCl		400	L-prolina	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O		100	L-tirosina	28.33
NaCl		6000	L-serina	30
NaHCO ₃		2000	L-valina	20
Na ₂ HPO ₄		800	L-treonina	20
AMINOÁCIDOS		mg/L	VITAMINAS	
L-arginina.HCl		200	biotina	0.200
L-asparagina.H ₂ O		50	antotolato de calcio	0.250
L-ácido aspártico		20	cloruro de colina	3
L-cistina		65.20	ácido fólico	1
L-ácido glutámico		20	inositol	35
L-glutamina		300	nicotinamida	1
glicina		10	ácido p-aminobenzóico	1
L-histidina.HCl.H ₂ O		15	piridoxina.HCl	1
hidroxiprolina		20	riboflavina	0.200
L-iso-leucina		50	tiamina.HCl	1
L-leucina		50	vitamina B12	0.005
L-lisina.HCl		40	OTROS COMPONENTES	
L-metionina		15	glucosa	2
L-fenilalanina		15	glutamina	1
			rojo de fenol	5

Desactivación del suero

Tanto el SFB (suero fetal bovino; Hyclone, E.U.A.) como el SNT (suero de neonato de ternera; Gibco, E.U.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 en tubos cónicos de plástico estériles para su mejor uso y manipulación.

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 solubilizan en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)----- 8.00 g

Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)----- 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)----- 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A.)----- 0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl1 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Ésta solución se esteriliza por calor húmedo, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

Solución de ácido acético (10%)

A 10 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker) se llevan a un volumen de 90 mL con agua bidestilada.

Glutaraldehído

Esta solución la utilizamos para fijar las células. La tendencia a formar uniones cruzadas hace del glutaraldehído un fijador útil además para mantener la integridad estructural de los tejidos. Se prepara tomando 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada, Se almacene a 4 °C.

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes (HeLa y CaSki) 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 (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	3.04 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	0.04 g
Etilen- diamen- tetra- acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----	0.40 g

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.

Tripsina

La tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Ésta solución se empleó para despegar las células ViBo, es preparada al 0.05% en Verseno.

Colorante cristal violeta (0.1%)

NaOH (Sigma-Aldrich, E.U.A.) ----- 3.96 g

Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A.)-----4.28 mL

Cristal violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A.)----- 1 g

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 debe ser filtrada.

XIV. CONGRESOS

- Un avance de este trabajo se presentó en la **“8va Reunión Internacional De Investigación En Productos Naturales”** con el título de: Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis de la saponina esteroideal Diosgenina-Di en la línea celular de cáncer cervicouterino CaSki y en células no tumorales y se llevó acabo del 23 al 25 de mayo del 2012 en la Universidad del Mar Campus Huatulco, Huatulco – Oaxaca.
- El trabajo ya finalizado se presentó en la **“9ª Reunión De La Academia Mexicana De Química Orgánica”** con el título de: Efecto antitumoral de la saponina esteroideal Diosgenina Di en líneas celulares de cáncer cervicouterino la cual se llevó acabo del 22 al 26 de abril del 2013 en la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana campus puerto de Veracruz, Boca de Río – Veracruz.

Ambos trabajos fueron presentados en la modalidad de cartel, sin embargo cabe mencionar que en la **9ª Reunión De La Academia Mexicana De Química Orgánica**, le fue otorgado un reconocimiento como uno de los mejores trabajos presentados.



La Universidad del Mar y
 La Universidad del Istmo
 otorgan la presente



Constancia

a

Mauricio Misael González Ballesteros, Ma. Luisa Escobar-Sánchez, María Antonieta Fernández Herrera,
 Jesús Sandoval Ramírez, Ma. Guadalupe Hernández Linares, Luis Sánchez Sánchez

por la presentación del trabajo titulado:

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, CITOTÓXICO E INDUCTOR DE APOPTOSIS DE LA
 SAPONINA ESTEROIDAL DIOSGENINA-DI EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER
 CERVICOUTERIO CASKI Y EN CÉLULAS NO TUMORALES

8va. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales

"Dr. Alfredo Ortega Hernández"

23 al 25 de mayo de 2012

Universidad del Mar, campus Huatulco

Dra. Mario Guadalupe Hernández Linares
 Presidencia del Comité Organizador



LA FACULTAD DE BIOANÁLISIS DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA,
 CAMPUS PUERTO DE VERACRUZ Y LA
 ACADEMIA MEXICANA DE QUÍMICA ORGÁNICA



otorgan el presente

Reconocimiento

González Ballesteros Mauricio Misael, Escobar-Sánchez Ma. Luisa,
 a Fernández Herrera Ma. Antonieta, Sandoval Ramírez Jesús,
 Hernández Vázquez J. M. Vicente, López Muñoz Hugo,
 Sánchez Sánchez Luis.

por haber presentado el cartel "Efecto antitumoral de la saponina esterooidal Diosgenina-Di
 en líneas celulares de cáncer cervicouterino." dentro de la 9^a Reunión de la Academia Mexicana
 de Química Orgánica, que se llevó a cabo del 22 al 26 de abril de 2013.

Boca del Río, Veracruz.



Universidad Veracruzana
 Facultad de Bioanálisis
 Dirección

Dra. Beatriz Torres Flores
 Directora de la Facultad de Bioanálisis
 de la Universidad Veracruzana

Dra. Carolina Barriguetes Salcedo
 Comité Organizador

Dr. José Mario Ordóñez Palacios
 Presidente de la AMQO



EFECTO ANTIPROLIFERATIVO, CITOTÓXICO E INDUCTOR DE APOPTOSIS DE LA SAPONINA ESTEROIDAL DIOSGENINA-DI EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER CERVICOUTERINO CASKI Y EN CÉLULAS NO TUMORALES



GONZÁLEZ BALLESTEROS MAURICIO MISAE¹, ESCOBAR-SÁNCHEZ MA. LUISA², FERNÁNDEZ HERRERA MARÍA ANTONIETA³, SANDOVAL RAMÍREZ JESÚS³, HERNÁNDEZ LINARES MA. GUADALUPE⁴, SÁNCHEZ SÁNCHEZ LUIS¹

¹Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 09230 México, D. F., México. luiss@servidor.unam.mx; ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D. F., México. ³Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla Pue. México. ⁴Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Istmo, Ciudad Universitaria s/n, Sta. Cruz Tagolaba, Tehuantepec, Oax. C.P.70760

ANTECEDENTES

Existe una gran variedad de productos naturales que tienen aplicaciones farmacológicas. Entre estos compuestos destacan las saponinas esteroidales, que son metabolitos secundarios que contienen una parte hidrofílica (un azúcar) y una hidrofóbica (una aglicona triterpénica (C₃₀) o esterooidal (C₂₇)), muchas de las cuales poseen actividad antitumoral. Algunos estudios han revelado que las diferencias entre las estructuras de las saponinas, incluidos el tipo y número de azúcares unidos por un enlace glicosídico en C-3 afectan la respuesta biológica.¹

Por otro lado, los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento del cáncer son citotóxicos, de baja selectividad e ineficientes en estados avanzados, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas, sobre todo en aquellas que están basadas en compuestos de origen vegetal, tal es el caso de la Dioscina (Fig. 1 B) y la Diosgenina (Fig. 1 A). Ambos compuestos son saponinas de espirstanol con actividad antiproliferativa, citotóxicas e inductoras de apoptosis.² Sin embargo, en el barbasco de la sierra madre de Puebla se aisló una molécula muy similar a la dioscina, cuya diferencia es que ésta presenta solo dos azúcares en el carbono 3 (Glucosa-ramnosa), mientras que la Dioscina presenta glucosa-ramnosa-ramnosa, por lo que se le asignó el nombre de Diosgenina-Di. Con la intención de evaluar la actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica de la Diosgenina Di (Fig. 1 C), cultivos de la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino (CaCu) CaSkI y cultivos de células no tumorales (Linfocitos de sangre periférica) fueron tratados con y sin este compuesto.

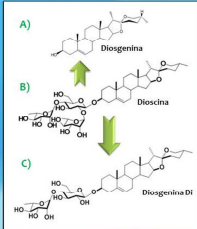


Fig. 1 A) Estructura química de la Diosgenina. B) Estructura química de la Dioscina. C) Estructura química de la Diosgenina Di

OBJETIVO

Evaluación del efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis de la saponina esterooidal "O-[α-L-rhamnopyranosil (1→4)]-β-D-glucopiranosido de (25R)-espirst-5-en-3β-ilo" (Diosgenina Di) en la línea celular de cáncer cervicouterino CaSkI y células no tumorales.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

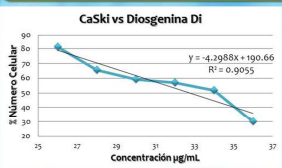


Fig. 2. Curva dosis-respuesta. Efecto de la Diosgenina Di sobre el potencial proliferativo de la línea de CaCu CaSkI. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para su adherencia y tratadas a diferentes concentraciones durante 24 h. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta.

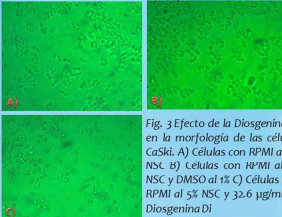


Fig. 3 Efecto de la Diosgenina Di en la morfología de las células CaSkI. A) Células con RPMI al 5% NSC. B) Células con RPMI al 5% NSC y DMSO al 1% C) Células con RPMI al 5% NSC y 32.6 µg/ml de Diosgenina Di

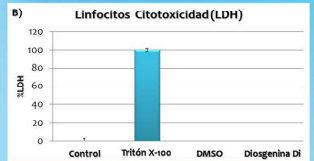
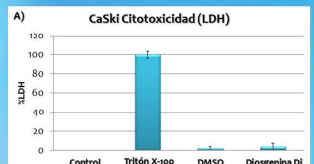


Fig. 4 Actividad citotóxica de la Diosgenina Di en cultivos de células CaSkI (A) y linfocitos (B), tratadas con 32.6 µg/ml de Diosgenina Di. La citotoxicidad fue evaluada en células CaSkI y células linfocitos a las 24 y 72 h de tratamiento respectivamente. Se colectaron 50 µl del medio de cultivo y se determinó la actividad de LDH a 490nm expresada en porcentaje.

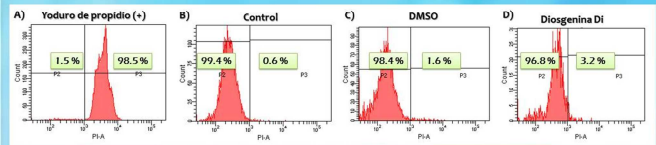


Fig. 5. Incorporación de yoduro de propidio (IP) en cultivos de células CaSkI. P₂: Región de células no marcadas con IP; P₃: Región de células marcadas con IP. A) Células permeadas con EtOH al 70% marcadas con IP; B) Células sin tratamiento; C) Células tratadas con DMSO; D) Células tratadas con 32.6 µg/ml Diosgenina Di.

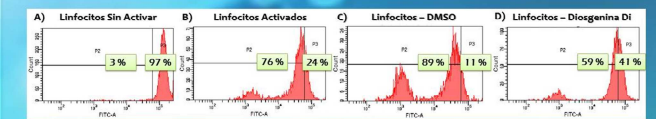


Fig. 6. Efecto de la Diosgenina Di en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de Linfocitos fueron marcados con carboxifluoresceína y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo. P₂: Región de células en proliferación; P₃: Región de células no proliferantes. A) Linfocitos Sin activar; B) Linfocitos Activados; C) Células tratadas con DMSO; D) Diosgenina Di 32.6 µg/ml.

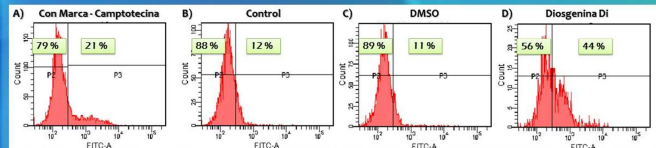


Fig. 7. Detección de la caspasa 3 activa por citometría de flujo en células CaSkI, permeadas con EtOH al 70% incubadas con anticaspasa 3 y anti-IgG acoplada a FITC. P₂: Región de células que no expresan caspasa 3 activa; P₃: Región de células que expresan caspasa 3 activa. A) Células tratadas con camptotecina; B) Células sin tratamiento C) Células tratadas con DMSO E) Células tratadas con Diosgenina Di 32.6 µg/ml.

DISCUSION

En el caso particular de los fitoesteroides como la Diosgenina, se ha reportado que presenta una actividad citotóxica, antiproliferativa e inductora de apoptosis en diferentes líneas tumorales.³ La Diosgenina Di se obtuvo por extracción alcohólica del barbasco, y estructuralmente no es muy diferente de la Dioscina, ya que solo carece de una L-ramnosa en el C₃.

	IC ₅₀ - CaSkI	% LDH CaSkI	%LDH Linfocitos
Dioscina	1.75 µg/ml	16	4
Diosgenina	13 µg/ml	10	0
Diosgenina Di	32.6 µg/ml	3.4	0

Estos resultados sugieren que la pérdida de una L-ramnosa de la Diosgenina Di con respecto a la Dioscina ejerce un efecto muy importante tanto en su actividad antiproliferativa como citotóxica. Además que la dioscina genera citotoxicidad en los linfocitos. Mostrando una ventaja por parte de la Diosgenina Di, ya que a pesar de necesitar más compuesto para lograr un mismo efecto en proliferación, genera un porcentaje menor de citotoxicidad en células CaSkI y nula actividad citotóxica.

A pesar de la diferente estructura de la Diosgenina Di, aún conserva su actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, además de no afectar gravemente la proliferación de linfocitos.

CONCLUSIONES

- La saponina esteroide Diosgenina Di reduce el potencial proliferativo en un 50% en la línea celular de cáncer cervicouterino CaSkI, a una concentración de 32.6 µg/ml sin generar citotoxicidad.
- La Diosgenina Di a una concentración de 32.6 µg/ml no afecta gravemente a la proliferación y no genera citotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana.
- La saponina induce muerte celular por apoptosis en la línea celular CaSkI debido a la expresión de caspasa-3 activa.

Las características de inducción de apoptosis, el efecto no citotóxico y selectivo hacia células tumorales, hace a este compuesto un candidato idóneo para ser evaluado en modelos *in vivo*, con el propósito de proponerlo como agente potencial terapéutico.

Fuentes de Consulta:
 1) K. Hostettmann, A. Marston 1995. Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Cambridge University Press, London.
 2) LIE, J., et al. 2005. Electrochemical Study of Breast Cancer Cells MCF-7 and Its Application in Evaluating the Effect of Diosgenin. Analytical Sciences. 21:561-564; RAO, A. y M. SUNG. 1995. Saponins as Anticarcinogens. The Journal of Nutrition. 125: 7175-7245; CAL, J. et al. 2002. Apoptosis Induced by Diosgenin in HeLa Cells. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 25: 919-926.
 3) Raju J.; Bird R. 2007. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. Cancer Lett. 255: 194-204;



Efecto antitumoral de la saponina esteroideal Diosgenina-Di en líneas celulares de cáncer cervicouterino



González Ballesteros Mauricio Misael¹ Escobar Sánchez Ma. Luisa,² Fernández Herrera Ma. Antonieta,³ Sandoval Ramírez Jesús,³ Hernández Vázquez J. M. Vicente,¹ López Muñoz Hugo,¹ Sánchez Sánchez Luis.¹

¹Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, 09230 México, D.F. ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, CU 04510 México, D.F. ³Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, CU 72570, Puebla, Pue. luiss@servidor.unam.mx

ANTECEDENTES

El cáncer tiene un importante impacto social y económico en el sistema de cuidado de la salud humana y es una de las principales causas de muerte en el mundo. En particular el cáncer cervicouterino (CaCu) es considerada actualmente como la segunda causa de muerte a nivel mundial. A pesar de los avances modernos de diagnóstico, prevención y tratamiento, la enfermedad todavía afecta a millones de pacientes en todo el mundo.¹ Además, la ineficiencia de los fármacos en pacientes terminales, la poca acción selectiva de éstos y la generación de efectos secundarios graves, abre la búsqueda de nuevos fármacos terapéuticos que sean más eficientes. Un buen ejemplo son las saponinas esteroidales, estas son metabolitos secundarios biosintéticos cuyos precursores son los esteroides, y que contienen una parte hidrofílica (un azúcar) y una hidrofóbica (una aglicona), estas poseen una amplia gama de actividades biológicas entre las que destaca su actividad antitumoral y apoptótica en diversas líneas celulares de cáncer.²

Un ejemplo de éstas son la dioscina y la diosgenina, éstas saponinas muestran actividad antiproliferativa y apoptótica en diferentes tipos de cáncer como en CaCu, leucemia humana, eritroleucemia, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, de colon y de mama entre otras. Otro ejemplo es la Diosgenina-Di un glicosido esteroide que en el 2004 se encontró que inhibe la proliferación de células de cáncer humano, como en adenocarcinoma de ovario, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de colon y eritroleucemia.³

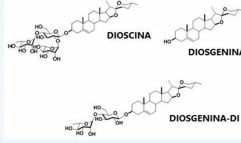


Fig. 1.- Estructura molecular de la dioscina, de la diosgenina y la Diosgenina-Di.

OBJETIVO

Evaluación del efecto antitumoral, citotóxica y apoptótica de la saponina esteroideal "O-[α-L-rhamnopyranosil (1→4)]-β-D-glucopiranosido de (25R)-espiro-5-en-β-ilo" (Diosgenina-Di) en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

MATERIAL Y MÉTODO



RESULTADOS

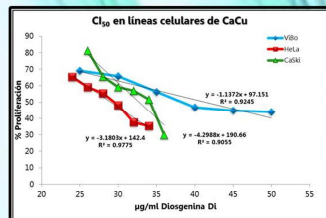


Fig. 2. Efecto antiproliferativo de la Diosgenina-Di en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSk1 y Vb10. 7510 células HeLa, CaSk1 o Vb10 fueron sembradas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de Diosgenina-Di por 24 horas y el número celular fue cuantificado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta y la Cl_{50} fue calculada mediante la linealización de los datos y con ayuda de la ecuación de la recta. El gráfico representa por lo menos dos ensayos independientes.

Table 1: Concentration of Diosgenin-Di for inducing a 50% decrease in cell number

Tabla 1.- Concentración requerida de Diosgenina-Di para inducir un decremento del 50 % en el número celular (Cl_{50}) en las células tumorales HeLa, CaSk1 y Vb10, expresada en $\mu\text{g/ml}$ y en $\mu\text{mol/L}$.



Fig. 3. Efecto de la Diosgenina-Di en el potencial proliferativo de células de cervix. Se observa el control, cultivo de células sin tratamiento en RPMI al 20% de SFB; DMSO, tratadas con dimetil sulfoxido al 1% Diosgenina-Di: cultivos estimulados con 30.8, 32.6, y 40 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. * indican que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* p<0.05 vs DMSO y ** p<0.05 vs Diosgenina-Di 30.8 $\mu\text{g/ml}$).

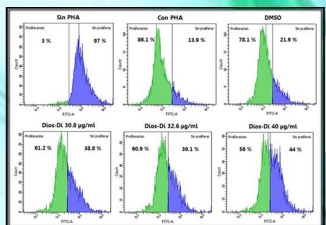


Fig. 4. Efecto de la Diosgenina-Di en la proliferación de linfocitos humanos no tumorales. Cultivos de Linfocitos fueron marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo. Para activar a los linfocitos se les agregó 25 μl fitohemaglutinina (PHA). Sin PHA: linfocitos sin activar; Con PHA: linfocitos activados y; DMSO: linfocitos con DMSO a 1%; y las concentraciones de Diosgenina-Di: se refiere a linfocitos con Diosgenina-Di a 30.8, 32.6, 40 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados muestran un ensayo representativo de por lo menos 3 pruebas independientes.

Table 2: Cell proliferation values for flow cytometry

Tabla 2.- Se muestran los valores obtenidos por citometría de flujo tomando a los linfocitos con PHA como máximo de proliferación.

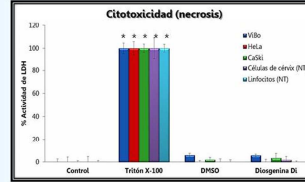


Fig. 5. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de las líneas Vb10, HeLa, CaSk1 y células no tumorales provenientes de cervix humano estimuladas con las Cl_{50} respectivas de la saponina Diosgenina-Di el DMSO se utilizó a una concentración del 1% mientras que el Tritón X-100 se manejó como control positivo. * Indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (*p<0.05 vs DMSO). Los resultados muestran un ensayo representativo de 3 pruebas independientes con al menos 3 repeticiones.

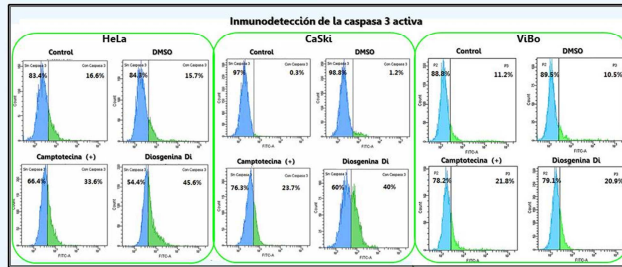


Fig. 6. Inmunodetección de la caspasa 3 activa por citometría de flujo en células de CaCu, permeadas con EtOH al 70% incubadas con anticaspasa 3 y anti-IgG acoplada a FITC. Sin cas 3: Región de células que no expresan caspasa 3 activa. Con cas 3: Región de células que expresan caspasa 3 activa; Control: Células sin tratamiento, DMSO; Células tratadas con DMSO al 1%, Camptotecina (+); Células tratadas con camptotecina y Diosgenina-Di: Células tratadas con sus respectivas Cl_{50} (30.8, 32.6, y 40 $\mu\text{g/ml}$)

Efecto en la morfología celular y cromatina nuclear

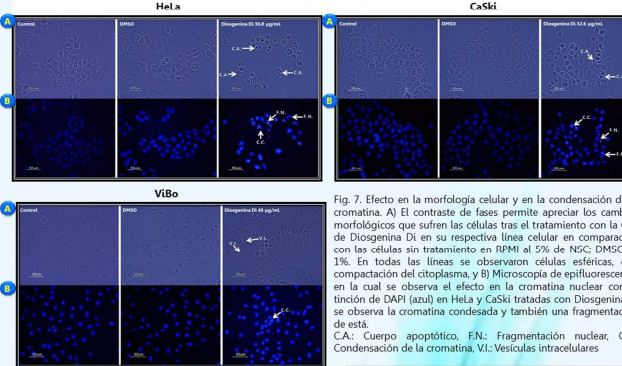


Fig. 7. Efecto en la morfología celular y en la condensación de la cromatina. A) El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Cl_{50} de Diosgenina-Di en su respectiva línea celular en comparación con las células sin tratamiento en RPMI al 5% de NSC; DMSO, al 1%. En todas las líneas se observaron células esféricas, con compactación del citoplasma, y B) Microscopía de epifluorescencia en la cual se observa el efecto en la cromatina nuclear con la tinción de DAPI (azul) en HeLa y CaSk1 tratadas con Diosgenina-Di se observa la cromatina condensada y también una fragmentación de ésta. CA: Cuerpo apoptótico; FN: Fragmentación nuclear; CC: Condensación de la cromatina; VI: Vesículas intracelulares

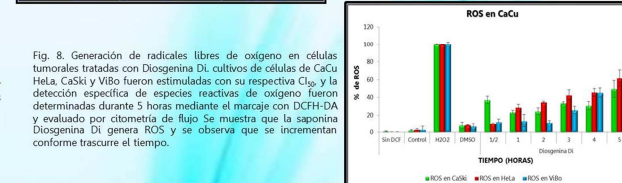


Fig. 8. Generación de radicales libres de oxígeno en células tumorales tratadas con Diosgenina-Di. Cultivos de células de CaCu HeLa, CaSk1 y Vb10 fueron estimuladas con su respectiva Cl_{50} y la detección específica de especies reactivas de oxígeno fueron determinadas durante 5 horas mediante el marcaje con DCFH-DA y evaluado por citometría de flujo. Se muestra que la saponina Diosgenina-Di genera ROS y se observa que se incrementan conforme trascurre el tiempo.

CONCLUSIONES

- La saponina esteroideal Diosgenina-Di presenta una Cl_{50} de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g/ml}$ para las células HeLa CaSk1 y Vb10 respectivamente a 24 horas de tratamiento.
- A concentraciones de 30.8, 32.6 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de la saponina reduce en un 30, 33 y 50 % respectivamente la proliferación de células no tumorales de cervix humano a 56 horas de tratamiento. En linfocitos de sangre periférica humana a estas mismas concentraciones afectan en no más un 35 % en su proliferación a 72 horas de tratamiento.
- El compuesto no induce muerte necrótica en células CaCu, ni en células no tumorales.
- La Diosgenina-Di induce muerte por apoptosis en células HeLa y CaSk1 a través de la expresión de la enzima caspasa 3 activa y afecta la morfología de éstas en su Cl_{50} respectiva, además de condensar fragmentar la cromatina nuclear y generar cuerpos apoptóticos en HeLa y CaSk1.
- La Diosgenina-Di es capaz de inducir un incremento en las especies reactivas de oxígeno a través del tiempo en las células de CaCu HeLa CaSk1 y Vb10.

REFERENCIAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman, Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
2. Fernández-Herrera M, López-Muñoz H, Hernández-Vázquez J, Sánchez-Sánchez L, Escobar-Sánchez M, Sandoval-Ramírez J. Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycosapogenins. *Braz J Med Chem* 2012; 34: 721-727.
3. Wang S-L, Cai B, Cai C, Liu H, Pei C. 190-R, Diosgenin-3-O-(6'-O-(2,6-diaminopyranosyl)-1 \rightarrow 4 \rightarrow -D-glucopyranoside) obtained as a new anticancer agent from *Dioscorea futschuensis* induces apoptosis on human colon carcinoma HCT-15 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *J Asian Nat. Prod. Res.* 2004; 62: 115-125.

