



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

LABORATORIO 2 PB DEL EDIFICIO DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ)

**“Efecto antitumoral del derivado de la diosgenina β -D-Maltopiranosido de
(25R)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) en la línea proveniente de cáncer
cervicouterino CaSki.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

GONZÁLEZ GARCÍA JORGE LUIS

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



NOVIEMBRE 2014



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.

«La ciencia es el simple sentido común llevado al máximo: observación cuidadosa y rigor ante las falacias lógicas» **Thomas Henry Huxley (1825-1895). Naturalista evolucionista inglés**

«Si no conozco una cosa, la investigaré» **Louis Pasteur (1822-1895) Químico y microbiólogo francés**

«Cada descubrimiento abre un nuevo campo para la investigación de los hechos, nos muestra la imperfección de nuestras teorías. Se ha dicho oportunamente, que cuanto mayor es el círculo de luz, mayor es el límite de la oscuridad de que está rodeado» **Sir Humphry Davy (1778 - 1829), químico inglés**

«El cuerpo es un estado celular en la que cada célula es un ciudadano. La enfermedad no es más que el conflicto entre los ciudadanos de ese estado provocado por la acción de fuerzas externas» **Rudolf Virchow, (1821-1902) patólogo alemán**

«Al igual que el constante aumento de la entropía es la ley fundamental del universo, igualmente la ley fundamental de la vida es ser cada vez más estructurada y luchar contra la entropía» **Václav Havel (1936-2011), político y escritor checoslovaco**

«Cualquier célula viva lleva consigo la experiencia de unos mil millones de años de experimentación por parte de sus predecesoras» **Max Delbrück (1906 - 1981), biofísico estadounidense de origen alemán, Premio Nobel de Medicina en 1969**

«La biología molecular ha mostrado que hasta los más sencillos de todos los sistemas vivientes en la Tierra hoy, las células bacterianas, son objetos tremendamente complejos. Aunque las células bacterianas más diminutas son increíblemente pequeñas, y pesan menos de 10^{-12} g, cada una es en realidad una verdadera fábrica microminiaturizada que contiene miles de piezas exquisitamente diseñadas de intrincada maquinaria molecular, compuesta en total de más de cien mil millones de átomos, mucho más complicada que cualquier máquina construida por el hombre y absolutamente sin paralelo en el mundo inanimado. **Michael Denton (1943) Bioquímico Británico-Australiano**

«Casi todos los aspectos de la vida se organizan en el nivel molecular, y si no entendemos las moléculas nuestra comprensión de la vida misma será muy incompleta» **Francis Crick (1916 -2004), biólogo británico**

«La dosis hace al veneno» **Paracelsus (1493-1541), alquimista, médico y astrólogo suizo.**

A mi familia por su confianza y apoyo.

A mi madre Norma A. García y a mi Padre Jorge González.

A mis abuelas Rosa Ma. Regil. y Elvira Pineda

A mis hermanos Emiliano, Matías y Uriel.

A Lirio por acompañarme, ayudarme y brindarme su apoyo.

AGRADECIMIENTOS.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por permitir integrarme a su equipo de laboratorio, por su apoyo, consejos, paciencia y enseñanzas que forman parte de mi formación académica.

A los Profesores **Vicente y Hugo** por compartir sus conocimientos, por su apoyo y asesoría en el laboratorio.

A los miembros del jurado:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

M en C. Luis Sánchez Sánchez.

Dra. María de Lourdes Mora García

M en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez.

Dr. Hugo López Muñoz.

Por enriquecer este trabajo con sus comentarios y aportaciones.

A los compañeros de laboratorio por brindarme su apoyo cuando lo necesitaba, y por compartir sus conocimientos.

Este trabajo fue realizado con apoyo del proyecto IN222114-3 perteneciente al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y al Proyecto PE206812 correspondiente al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME).

ÍNDICE	
	<i>Página</i>
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	10
<i>La célula</i>	10
<i>Ciclo celular</i>	10
<i>Muerte celular</i>	11
<i>Necrosis</i>	12
<i>Apoptosis</i>	12
<i>Autofagia</i>	13
<i>Caspasas</i>	14
<i>Cáncer</i>	16
<i>Cáncer Cervicouterino</i>	18
<i>Células tumorales CaSki VPH 16</i>	19
<i>Biología molecular del virus del papiloma humano</i>	19
<i>Genoma del virus del papiloma humano</i>	19
<i>Factores de riesgo para la infección</i>	20
<i>Diagnóstico y tratamiento</i>	21
<i>Esteroides y cáncer</i>	25
<i>Saponinas, Sapogeninas y cáncer</i>	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
JUSTIFICACIÓN	34

<i>HIPÓTESIS</i>	35
<i>OBJETIVOS</i>	36
<i>MATERIAL Y MÉTODO</i>	37
<i>RESULTADOS</i>	42
<i>DISCUSIÓN</i>	54
<i>CONCLUSIONES</i>	60
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	61
<i>APÉNDICE</i>	68

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una tumoración maligna que se presenta en el cuello de la matriz. En los países en vías de desarrollo el CaCu está todavía asociado a una alta mortalidad y México no es la excepción, ya que actualmente se encuentra entre las principales causas de muerte por tumores malignos en la población femenina. Hoy en día los tratamientos utilizados para combatir el cáncer son poco selectivos e ineficientes en estados avanzados de ésta enfermedad, debido a ello, surge la necesidad de buscar tratamientos alternativos, por ejemplo, compuestos de origen vegetal que además generen menos efectos secundarios que los que presentan la radioterapia y quimioterapia. Algunas saponinas esteroides han mostrado tener un efecto antiproliferativo *in vitro* en líneas de cáncer humano. Una de las sapogeninas esteroides mejor estudiadas y de la que se ha reportado presenta actividad sobre el cáncer es la Diosgenina que se encuentra en diversas especies de *Dioscorea*. En el presente trabajo se utilizó el compuesto β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) sintetizado a partir de la diosgenina y se evaluó la actividad antitumoral de dicho compuesto (MD-OH) en células provenientes de cáncer cervicouterino de la línea CaSki. Los resultados obtenidos indican que se requiere de una concentración de 36.24 μ g/ml (49 μ M) del compuesto MD-OH para disminuir en un 50% la densidad celular (CI_{50}), la evaluación de la liberación de lactato deshidrogenasa indica que no hay muerte por necrosis. Adicionalmente, al evaluar el incremento de la expresión de la caspasa 3 activa en las células tratadas con el MD-OH indica que éste induce una muerte por apoptosis. Por otro lado, el MD-OH a una concentración de 36.24 μ g/ml (49 μ M) afecta levemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica, mostrando cierta selectividad entre células no tumorales y tumorales lo que le confiere un fuerte potencial para ser usado en aplicaciones terapéuticas en el CaCu.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Esto es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que producen la degeneración de las células con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis) (OMS, 2011).

Las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres mayores de 20 años en 2011 fueron por cáncer de mama (13.8%) y cervicouterino (10.4 por ciento) (INEGI, 2013).

El Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es un tipo frecuente de cáncer en mujeres y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas en los tejidos del cuello uterino. El factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % de los casos (Vázquez-Ortiz *et al.*, 2005). Entre los VPH más incidentes se tienen principalmente a los tipos de 16 y 18 con un 50.8 % y 15.5 % respectivamente (Berumen-Campos, 2003).

El diagnóstico de esta neoplasia se realiza con estudio histopatológico mediante una biopsia dirigida, ya sea mediante colposcopia en caso de no observarse una lesión o mediante toma directa si existe tumor visible (Jemal, *et al.*, 2011).

En cuanto a los tratamientos para esta patología, se ha observado que son poco eficientes en estadios avanzados de la enfermedad, con efectos secundarios graves debido a su acción citotóxica, generando la necesidad de implementar nuevas alternativas terapéuticas por lo que existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal con propiedades anticancerígenas. No obstante de la diversa cantidad de compuestos con actividad antitumoral descritos en la literatura, ha llamado fuertemente la atención las saponinas esteroidales, las cuales han sido reportadas como compuestos con propiedades detergentes (saponificables) y en particular han sido descritas con actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis (Sánchez, *et al.*, 2008). Las saponinas son glicosidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas

por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa. Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en monocotiledóneas, mientras que las saponinas terpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas. La gran diversidad estructural de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas, y en el uso que se hace de ellas en jabones, antimicrobianos, anticancerígenos y hemolíticos, entre otros (Díaz, 2009).

Al respecto, la diosgenina, una aglicona de baja solubilidad en agua al igual que otras saponinas presenta actividad antiproliferativa en diferentes líneas tumorales. Sin embargo, su baja o nula solubilidad limita fuertemente su estudio en cultivos celulares, por lo que es necesario sintetizar moléculas con la estructura de la diosgenina a la cual se le unan azúcares para incrementar su solubilidad y poder de esta forma evaluar su actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis (Sánchez, et al., 2008).

En ese sentido, en el presente trabajo, se evalúa la actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis, del derivado de la diosgenina, β -D-Maltopiranosido de (25R)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) en la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino CaSki.

MARCO TEÓRICO

La célula

Es la unidad estructural de la vida, es el elemento básico con la cual todos los organismos están compuestos y en donde se reconocen todas las funciones de los organismos vivos. Ésta se auto reproduce y experimenta procesos de desarrollo, diferenciación y muerte. En organismos pluricelulares las células guardan una estrecha interrelación entre sí, organizándose en una estructura jerarquizada y colaborando para mantener un estado de homeostasis en donde las condiciones de un ambiente relativamente constante son sostenidas para la sobrevivencia (Anthony & Thibodeau, 1991).

Ciclo Celular

En cada ciclo de división la célula tiene que replicar su ADN. La mayoría de las células también aumentan y duplican todo su contenido. En la Figura 1 se muestran las fases del ciclo celular. Durante la fase M los cromosomas replicados se segregan (por mitosis) en núcleos separados y la célula se divide en dos (por citocinesis). La otra parte del ciclo conocida por interfase es mucho más larga. Este periodo de crecimiento continuo comprende la fase S, en la cual tiene lugar la replicación del ADN, y dos lapsos de tiempo, las fases G1 y G2, entre la fase S y la fase M. La secuencia de procesos del ciclo celular está regulada por un sistema de control de ciclo celular que cíclicamente pondrá en marcha los procesos básicos de la reproducción celular, tales como la replicación de ADN y la segregación cromosómica (Alberts *et al.*, 2002).

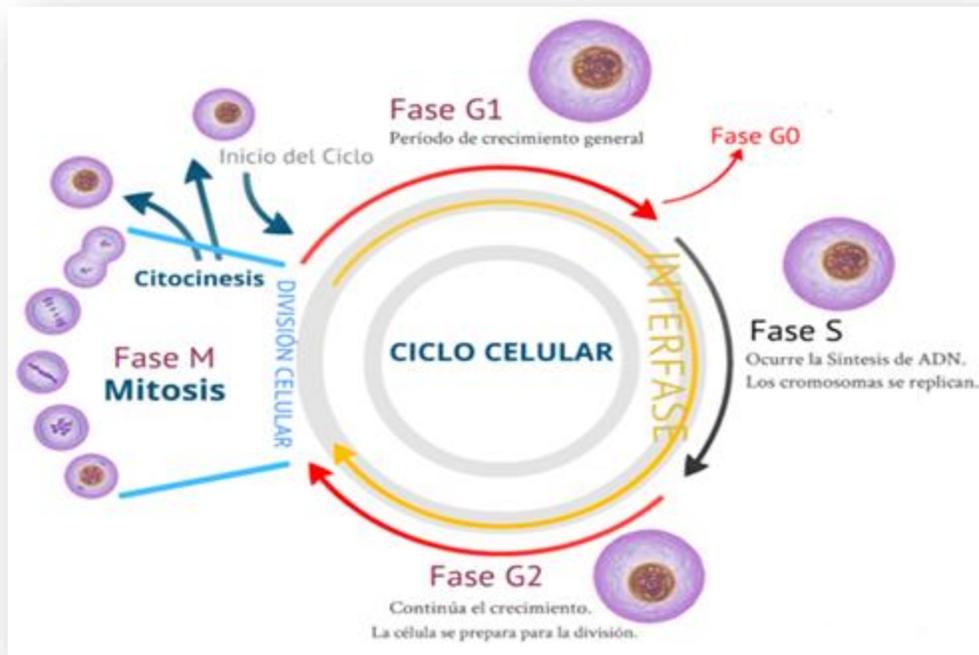


Figura 1. Proceso de división celular. Tomado de <http://www.acercaciencia.com/wp-content/uploads/2012/10/Ciclo-celular.png>

Muerte celular

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes.

La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos no regulados (necrosis) y regulados (apoptosis, autofagia) (Degterev, *et al.*, 2008).

Necrosis

La muerte celular se puede producir por **necrosis**, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (del griego *nekrós* "muerte") es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. (Lizarbe, 2007).

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. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, las estructuras celulares se deterioran, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Lizarbe, 2007).

Apoptosis

Otros tipos de muerte celular conllevan la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca un **suicidio** o **muerte celular programada**: una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada. Estos mecanismos fisiológicos de muerte son empleados por los organismos multicelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas (Degterev, *et al.*, 2008). Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al conjunto del organismo

durante su ciclo vital. Para definir a este último proceso, y como sinónimo de muerte celular programada, se acuñó el término **apoptosis**, neologismo tomado del griego clásico (*apo*: “fuera de” o “separación” y *ptosis*: “caída”) (Kerr, *et al.*, 1972). La muerte por apoptosis es más limpia que la necrosis; se detectan cambios morfológicos particulares y la membrana celular, que no se destruye, engloba a los cuerpos apoptóticos o material celular (Figura 2). No se produce inflamación ya que las células fagocitarias reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos. La apoptosis se puede definir como “*el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos*”. En este caso, una serie de estímulos o señales hacen que la célula decida su propia muerte; es lo que se ha calificado como la muerte que permite vivir. Este tipo de muerte se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nemátodos y los mamíferos (Lizarbe, 2007). El programa de autodestrucción es complejo y se requiere una precisa coordinación entre la activación y la ejecución de varios subprogramas de la maquinaria de muerte.

Estos dos tipos de muerte celular programada no dan cuenta de otros mecanismos que hoy se conocen. Existen procesos intermedios que difícilmente pueden ser clasificados en uno u otro grupo ya que pueden compartir algunas de las características de la apoptosis y de la necrosis; en otros casos, los mecanismos de muerte no se ajustan a ninguno de estos dos. Además de la apoptosis, se han descrito otros tipos de muerte celular programada, que se consideran en el último epígrafe, que pueden solapar en alguna característica o ser mutuamente exclusivos (Degterev, *et al.*, 2008). La autofagia se encuentra entre ellos, y se ha clasificado como una de esas formas alternativas de muerte celular programada (Debnath, *et al.*, 2005).

Autofagia

La autofagia, proceso catalítico conservado a lo largo de la evolución e implicado en la remodelación tisular durante el desarrollo, es una ruta de degradación celular implicada en la eliminación tanto de orgánulos subcelulares como de proteínas, dañados o superfluos. Este proceso también se utiliza como mecanismo de defensa frente a una invasión viral y

bacteriana. La autofagia, como mecanismo de supervivencia, hace que los constituyentes celulares se reciclen proporcionando una fuente de energía alternativa durante períodos de estrés metabólico y participa, de esta forma, en el mantenimiento de la homeostasis y viabilidad celular (Maiuri, *et al.*, 2007). Se ha observado una excesiva degradación con signos de autofagia en células que mueren, por lo que la **autofagia** (“comerse a uno mismo”, del griego *auto* “actuar sobre sí mismo” y *phagos* “comer”) se ha clasificado como una forma alternativa de muerte celular programada. Esto ocurre, por ejemplo, en algunos sistemas en condiciones de deficiencia en nutrientes por lo que grupos de células asociadas o tejidos mueren. A nivel molecular se ha propuesto que puede existir una maquinaria de respuesta con rutas comunes entre la apoptosis y la autofagia. Aunque la relación entre los dos procesos es compleja, la célula, en función de las señales que recibe, puede morir por cualquiera de estas dos vías o por una combinación de las mismas (Debnath, *et al.*, 2005).

En la ejecución de la apoptosis, participan un grupo de proteasas, las caspasas, por lo que esta vía de muerte celular programada es dependiente de su actuación. En varios organismos, incluyendo vertebrados, en algunos casos la muerte fisiológica transcurre a través de mecanismos que son independientes de la participación de las caspasas. A modo de ejemplo, los queratinocitos pierden su núcleo como parte de un programa normal de diferenciación y se desprenden de la piel, o los glóbulos rojos sobreviven 120 días después de la pérdida de su núcleo y, finalmente, son fagocitados (Vaux-Korsmeyer, 1999).

Caspasas

La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es compleja. 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. Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteína-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*). Las caspasas son las encargadas, en último término, de ejecutar el proceso de muerte celular y activan a otras enzimas que degradan múltiples proteínas, con el consiguiente

desmantelamiento de la arquitectura celular. La implicación de estas proteasas en los procesos de apoptosis está ampliamente documentada (Taylor, *et al.*, 2008).

Hasta el momento, en humanos se conocen 11 miembros de esta familia de proteínas (Degterev, *et al.*, 2008). La primera proteasa descrita en mamíferos se denominó ICE (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*) o caspasa-1. Ésta es precisamente uno de miembros de la familia al que no se le ha relacionado con el proceso de la apoptosis sino con el de la inflamación, ya que es responsable de la ruptura y activación de la interleuquina 1 β , una citoquina proinflamatoria. El análisis filogenético revela que existen dos subfamilias de caspasas (Earnshaw, *et al.*, 1999). La subfamilia de la caspasa-1 (caspasas 1, 4, 5 y 11-14), que se han implicado en el control de la inflamación, y la subfamilia de la caspasa-3 (caspasas 3 y 6-10), que están especializadas en desencadenar y ejecutar la muerte por apoptosis. La caspasa-2 es estructuralmente similar a la subfamilia de la caspasa-1 pero su función la ubica en la subfamilia de la caspasa-3. (Lizarbe, 2007).

La proteólisis de muchos de los sustratos de caspasas es la responsable de los numerosos cambios metabólicos y estructurales que se desencadenan durante el proceso de apoptosis. Actúan sobre un gran número de proteínas, tanto citoplasmáticas como nucleares, con actividades y participación en procesos celulares tan diversos como: metabolismo y reparación del DNA, fosforilación de proteínas, transducción de señales, regulación del ciclo celular y proliferación. Además, están relacionadas con proteínas responsables de enfermedades genéticas humanas y proteínas que participan directamente en apoptosis (Narita, *et al.*, 1998). Entre las dianas de las caspasas se puede destacar a ICAD/DFF45 (*Inhibitor of Caspase Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45*; molécula que mantiene inhibida a la desoxinucleasa activada por caspasa responsable de la degradación del DNA durante la apoptosis), las relacionadas con la reparación del DNA y con los procesos de replicación y transcripción del DNA (Lizarbe, 2007).

Tanto la apoptosis como la necrosis son procesos de muerte celular, sin embargo muestran características que las diferencian, como se observa en la figura 2.

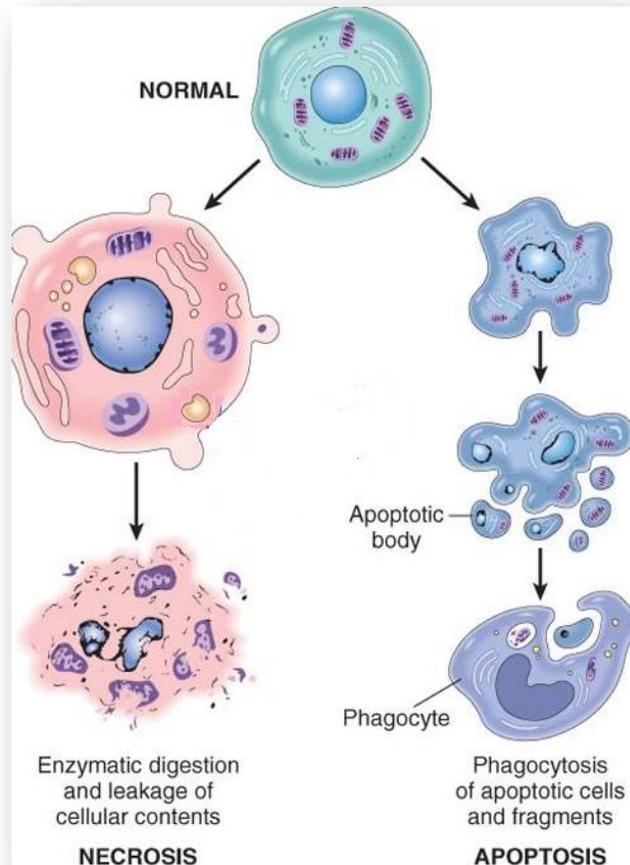


Figura 2. Diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis. Tomado de Elsevier. Kumar *et al*: Robbins Basic Pathology.

El cáncer

Es una enfermedad producida por diversas alteraciones en las que participan un conjunto de oncogenes cuyos productos ejercen funciones básicas como el control del crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (Darnell *et al.*, 1993).

Las células tumorales presentan características que las distinguen de las normales: se reproducen de manera descontrolada, son capaces de invadir y colonizar tejidos, además de órganos distantes en lugares en donde normalmente no pueden crecer, proceso al que se le denomina metástasis (Alberts *et al.*, 2002).

Los controles que regulan la multiplicación celular en raras ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre comienza a dividirse en forma descontrolada, al margen de las necesidades del organismo de más células de este tipo. Cuando esta célula tiene descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida, por último, este clon de células no deseadas forma una masa, denominado tumor. Así el cáncer es una enfermedad en la cual clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas, destruyendo finalmente toda la sociedad celular y se produce a una escala temporal de meses o años en una población de células del organismo (Schmitt *et al*, 2002).

Existen dos diferencias claves entre el cáncer y otras enfermedades genéticas. La primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen, sobre todo en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en la línea germinativa; la segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino, más bien, de la acumulación de entre 3 y 20 mutaciones en genes que regulan la multiplicación celular normal. Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias: ella y su progenie se reproducen a pesar de las restricciones normales e invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células. La combinación de estas características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso (Alberts *et al.*, 2002).

Las células cancerosas tienen una capacidad disminuida para responder a los estímulos que desencadenan la apoptosis. La mayoría de las células normales desarrollan una dependencia de factores ambientales específicos para mantener su viabilidad, por su parte las células tumorales desarrollan cierto grado de independencia de estos factores ambientales, aparentemente son inmortales en el sentido de que continúan dividiéndose de manera indefinida mientras las condiciones de nutrientes y de cultivo sean adecuadas para su sobrevivencia (Karp, 2006).

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo de célula a partir del cual se originan (Alberts *et al*, 2002). En el primer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen

inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. El segundo grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo (Pardo, 1998). El tercer grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas, los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas; los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes como el CaCu (Pardo, 1998).

Cáncer Cervicouterino

El útero es un órgano hueco, en forma de pera invertida, donde se desarrolla el feto. El cuello o cérvix uterino es una abertura que conecta el útero con la vagina o canal de nacimiento. Las lesiones malignas del cuello uterino pueden ser intraepiteliales, preinvasivas, o invasoras. Los carcinomas invasores se pueden originar en el epitelio escamoso del exocérvix o en el epitelio glandular del endocérvix. Según el lugar de origen se denominan carcinomas escamosos o adenocarcinomas, respectivamente (Pagani *et al.*, 1999).

Las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres mayores de 20 años en 2011 son por cáncer de mama (13.8%) y cervicouterino (10.4 por ciento) (INEGI, 2013).

Este tipo de cáncer, aparece en la unión del canal cervical y del ectocérvix, que es el sitio donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o más factores de riesgo, ya sean biológicos (mutaciones, virus, edad), socioculturales (escolaridad, hábitos de higiene), e incluso factores medioambientales a los que todos estamos expuestos. Las anomalías tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad. Para que el NIC evolucione a CaCu invasor necesita de 8 a 20 años y en la mayoría de los casos se requiere de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren a la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos. Una vez ocurrido esto, las pacientes que no han recibido

tratamiento, o que no han respondido a éste mueren usualmente en un periodo de 3 a 5 años (Lazcano *et al.*, 1999)

El factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % (Vázquez-Ortiz *et al.*, 2005) de los casos. Entre los VPH más incidentes se tienen principalmente a los tipos de 16 y 18 con un 50.8 % y 15.5 % respectivamente (Berumen-Campos, 2003). Los VPH han convivido con la especie humana durante decenas de miles de años y sufren relativamente pocos cambios en su composición genética. Se ha identificado más de 100 tipos diferentes de VPH (Castellsagué, 2008).

Células CaSki

La línea tumoral de cáncer cervicouterino CaSki fue establecida de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado de una paciente de 40 años de edad. Las células contienen integrado el genoma del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16, cerca de 600 copias por célula) así como secuencias relacionadas con VPH-18 (Pattillo, 1977).

Biología molecular del virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (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) por sus siglas en inglés. 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 (De Villiers, *et al.* 2004).

La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (De Villiers, *et al.* 2004).

El genoma del virus del papiloma humano

El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, de tamaño pequeño, (aproximadamente de 8000 pares de bases). Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías L1 y L2 (De Villiers, *et al.* 2004) como se puede observar en la Figura 3.

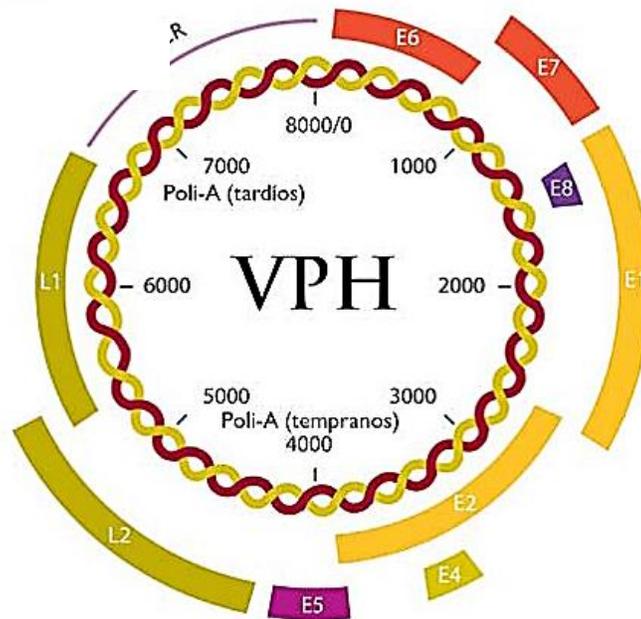


Figura 3. Genoma del VPH. Tomado de <http://www.zervita.de/share/Handbooks/HPVHandbook1-1.pdf>

Factores de riesgo para la infección

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCu sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente.

- Promiscuidad. 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 (Burk *et al.*, 1996).
- Actividad sexual a temprana edad.
- Tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente.

- Verrugas genitales, test de Papanicolaou con resultados anormales.
- Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
- Edad. La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer (Adam *et al.*, 2000).
- Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer. 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 (Negrini *et al.*, 1990).
- Uso prolongado de anticonceptivos hormonales. La región larga de control, LCR por sus siglas en inglés, en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroidales como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos hormonales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos hormonales y la alta positividad al ADN viral (Negrini *et al.*, 1990).
- Coinfección con otros virus, como el del herpes simple (VHS) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7 (HHV-6), detectados todos en el cérvix (Negrini *et al.*, 1990).
- Carga viral. Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales (Negrini *et al.*, 1990).
- Predisposición genética. Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor (Negrini *et al.*, 1990).

Diagnóstico y tratamiento

La detección temprana y el tratamiento oportuno del CaCu en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Los métodos citológicos como el Papanicolaou, buscan cambios en las células de la zona de transformación (Figura 4). Recientemente se

han introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas. Las pacientes con resultados de Papanicolaou anormales que no tienen una lesión cervical seria son evaluadas por colposcopia y por toma de biopsia o cono. (Negrini *et al.*, 1990).

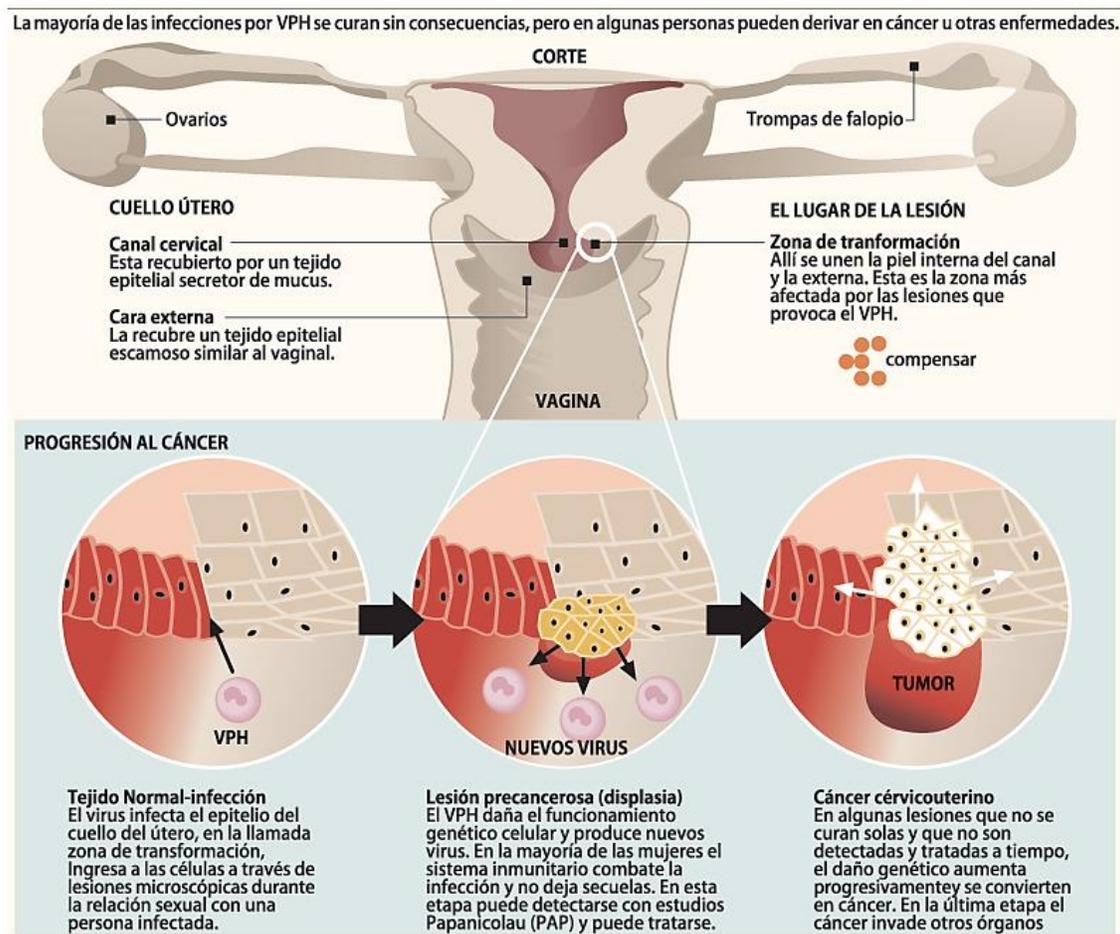


Figura 4. De la infección por VPH al Cáncer Cérvicouterino. Tomado de <http://www.blogdefarmacia.com/cancer-de-cuello-uterino-y-vph/>

Tratamientos contra el cáncer.

Los tres tratamientos principales del cáncer son: cirugía, radioterapia y quimioterapia y se aplican de forma separada o conjunta. Estas técnicas se usan para curar ó prevenir que el tumor crezca y/o paliar los síntomas cuando la enfermedad está muy avanzada. En el tratamiento preventivo destacan las vacunas contra VPH.

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 (National Cancer Institute, 2013).

La radioterapia en ella se utiliza 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 este 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).

Las 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 también impide 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 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).

Esteroides y cáncer

A pesar de los indudables beneficios que cualquiera de estos dos tratamientos aportan en la lucha contra el cáncer, sus efectos secundarios son de consideración, caída del pelo, mucositis, disfagia, vómito o náuseas, por lo cual la calidad de vida del paciente se ve disminuida drásticamente. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial terapéutico. Actualmente existe un fuerte interés en probar compuestos de origen vegetal y en particular en esteroides, a los cuales se les han atribuido diferentes actividades biológicas, entre las que se destaca la actividad antitumoral.

Los esteroides junto con los terpenoides son derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado perhidrociclopentanofenantreno, y son conocidos genéricamente como isoprenoides. Los esteroides no son verdaderos triterpenos, en el sentido de que su estructura no se apega al patrón C30; poseen esqueletos C27-C29 (o más pequeño), pero está correctamente clasificado dentro del grupo de los triterpenos verdaderos, ya que todos derivan del mismo precursor; el escualeno, molécula que puede ciclarse de manera diversa o bien, epoxidarse, dando origen a una gran variedad de estructuras esteroidales (Anaya, 2003).

Los esteroides difieren entre sí, en el número y la posición de sus dobles enlaces, en el tipo, localización y número de sus grupos funcionales sustituyentes, en la configuración (α o β) de los enlaces entre los grupos sustituyentes y la configuración que adoptan los anillos entre sí, ya que el hidrocarburo original posee seis centros de asimetría. Los principales puntos de sustitución son el carbono 3 del anillo A, el carbono 11 del anillo C y el carbono 17 del anillo D. El primer producto esteroide importante es el lanosterol que es el precursor del colesterol en los tejidos animales. El colesterol y el lanosterol son miembros de un gran subgrupo de esteroides llamados esteroides; son alcoholes esteroides que contienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo A. El colesterol aparece muy raramente en las plantas superiores las cuales contienen otros tipos de esteroides conocidos colectivamente como fitosteroides (Nelson, *et al.*, 2005).

Debido a su diversa acción biológica, varios esteroides de origen natural y sintético son rutinariamente utilizados en medicina (Mann, *et al.*, 1994).

Los derivados esteroideos se han manejado como agentes citotóxicos que mejoran la especificidad en el tratamiento del cáncer. El descubrimiento de estos nuevos agentes con propiedades anticancerígenas es en base a sustancias con estructura y citotoxicidad conocidas (Camoutsis, *et al.*, 2005).

Recientemente se ha encontrado que algunos compuestos esteroideos presentan actividad anticancerígena; sin embargo, aún no tienen el avance clínico necesario si se les compara con otros agentes de uso terapéutico; como por ejemplo la mitomicina C, derivados de la camptotecina, la adriamicina, el cisplatino o bien los taxoides. Debemos tomar en cuenta que todos los compuestos empleados actualmente en quimioterapia presentan problemas de selectividad y producen reacciones secundarias indeseables, por lo que la búsqueda de nuevas moléculas con actividad anticancerígena prosigue. El curso de esta investigación avanza velozmente y continuamente se genera información acerca del tratamiento satisfactorio de ciertos tipos de cáncer utilizando compuestos esteroideos.

Aunque la aglicona juega el papel más importante en la actividad biológica, es bien conocido que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de los glicósidos esteroideos; por ejemplo, incrementando la solubilidad de éstos en medio

fisiológico, ayudando a la permeabilidad celular y al tiempo de acción; y dirigiendo a la molécula al sitio activo. Por consiguiente, es de gran interés continuar con la búsqueda de nuevas variantes de glicósidos esteroidales que posean actividad. En general se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado (Fernández, 2010).

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides, se encuentran las saponinas, que son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, poseen una compleja estructura anfifílica formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de sacáridos. La especie humana ha aprendido a emplear en su provecho la amplia actividad biológica de las saponinas; además, muchas de ellas son muy utilizadas en síntesis para la obtención de compuestos de origen natural (Hostettmann, *et al.*, 1995).

Saponinas, Sapogeninas y Cáncer

La investigación sobre saponinas ha tomado recientemente un nuevo auge debido a que se encontró que muchas de ellas poseen actividad antiproliferativa. En el caso de las saponinas, un ejemplo muy característico es el OSW-1 y sus análogos naturales. Este compuesto que se extrajo por primera vez del *Ornithogalum saundersiae* ha llamado especial atención debido a que su actividad citotóxica es 100 veces mayor a la del paclitaxel (Fernández, 2010).

Las saponinas esteroides son metabolitos secundarios biosintéticos cuyos precursores son los esteroides, especialmente el colesterol, éstos constituyen estructuralmente una clase diversa de productos naturales y son uno de los mejores componentes en la medicina tradicional china (Ming-Jie, *et al.*, 2005). Son compuestos naturales caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glicósidos y/o éster entre una genina poco polar y restos glucósidos, con una estructura esteroidal (C27) o triterpénica (C30). La remoción del sacárido por hidrólisis ácida produce lo que es una sapogenina (Omoruyi, 2008).

Las saponinas reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y como los jabones, causan la formación de espuma, por esto se han utilizado ampliamente por sus propiedades detergentes. Esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares; tienen propiedades hemolíticas, son tóxicas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas (Anaya, 2003).

Las saponinas esteroidales no están tan ampliamente distribuidas en la naturaleza, como las triterpenoides; las saponinas esteroidales abundan especialmente en las monocotiledoneas: *Dioscoraceae*, *Amarylidaceas*, *Agavaceae* y *Liliaceae*. También existen saponinas esteroidales en algunos equinodermos. Los compuestos farmacológicamente activos de *Dioscorea* incluyen a la diosgenina la cual es una sapogenina esteroideal, y la dioscina una saponina de la diosgenina con azúcares unidos a su estructura (Anaya, 2003). Algunas de las saponinas esteroides aisladas recientemente han mostrado ser anti diabéticos y antitumorales en asociación con la modificación del sistema inmune entre otros. Se ha reportado que la actividad de las saponinas está relacionada con la estructura para un efecto antihepatitis, usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas, derivadas sintéticamente (Hong-Ji, *et al*, 2006).

De la hidrólisis enzimática o química de las saponinas, se obtienen sapogeninas esteroidales, las cuales poseen 27 átomos de carbono y además del núcleo esteroideal presentan dos anillos más: los anillos E (tetrahidrofuránico) y F (tetrahidropiránico). Un aspecto muy importante al definir la estructura de las sapogeninas, es la estereoquímica de los átomos de carbono 5, 22 y 25. En la naturaleza, la mayoría de las sapogeninas poseen la configuración R en el carbono espirocetálico C-22, aunque se han llegado a conocer excepciones con la configuración 22 S (Tobari, *et al.*, 2000).

En la década de los cuarentas, las sapogeninas adquirieron gran relevancia por su uso en la síntesis de derivados pregnánicos como la diosgenina y la sarsasapogenina que fueron transformadas en progesterona (Kongkathip, *et al.*, 2006).

Sin duda la más útil de todas las sapogeninas esteroides es la diosgenina (Anaya, 2003). La diosgenina es una sapogenina esteroideal 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 y desarrolló un proceso para sintetizar progesterona, proceso que fue conocido como la “Degradación de Marker”. La diosgenina se ha utilizado también como material de partida para la obtención de diversos compuestos esteroidales de interés en síntesis parcial. Recientemente, se encontró que la diosgenina posee actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares; como HeLa (cáncer cervicouterino), HeL 92.1.7 y K562 (eritroleucemia), osteosarcoma 1547, HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), HCT-116, HT-29 (cáncer de colon), HL60 (leucemia), MCF-7 (cáncer de mama) y otras. Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo. Debido a ello, se abrió un nuevo campo de estudio en el ámbito de las saponinas (Fernández, 2010).

La dioscina ha mostrado en ensayos de drogas preclínicas poseer actividad antiproliferativa potente contra la mayoría de células de líneas de leucemia y tumores sólidos. Experimentos con células cultivadas de carcinoma de cuello uterino de la línea HeLa, mostraron un efecto dependiente de dosis y tiempo para inducir apoptosis a través de la vía mitocondrial (Cai, *et al.*, 2002). El análisis proteómico reveló que la expresión de proteínas mitocondriales asociadas fue modificada sustancialmente en células HL-60 por el tratamiento con dioscina. También se encontraron cambios en el proteoma mitocondrial además de proteínas relacionadas con mecanismos apoptóticos inducidos por dioscina en células HL-60 (Wang, *et al.*, 2006).

Hay un gran número de informes sobre los mecanismos antitumorales de saponinas diosgeninas como; Polifilina D Opiogonina C, la Polifilina C y la prosapogenina B. (Cheung *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2008;.. Siu *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009), FC (Nam *et al.*, 2008) y Dioscina (Liu *et al.*, 2004;.. Wang *et al.*, 2006). Estos compuestos mostraron efectos antitumorales, que provocan apoptosis a través de una disfunción mitocondrial y detención del ciclo celular (Cheung, *et al.*, 2005.; Lee, *et al.*, 2005). La saponina PD (Polifilina D) es un potente inductor de apoptosis a través de la disfunción mitocondrial en células HepG2 resistentes a los medicamentos (Cheung, *et al.*, 2005) y tiene efectos inhibidores sobre el crecimiento de células de cáncer de mama (Lee, *et al.*, 2005). PD induce un efecto

citotóxico mediante un mecanismo iniciado por estrés del retículo endoplásmico seguido de apoptosis a través de la vía mitocondrial (Siu, *et al.*, 2008).

Como se ha visto una de las saponinas espirostánicas más estudiadas es la dioscina, denominada: O -[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)] [α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno- β -ilo; la cual se aisló en 2001 a partir del extracto de *Polygonatum zanlanscianense*. Con el propósito de incrementar la actividad anticancerígena, algunos grupos de investigación sintetizaron análogos y derivados de la dioscina, parte glicosilada de la diosgenina efectuando modificaciones en la parte hidrofílica de la molécula (Fernández, 2010); entre los cuales destaca la síntesis de una saponina derivada de la diosgenina; el β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) que se muestra en la figura 5.

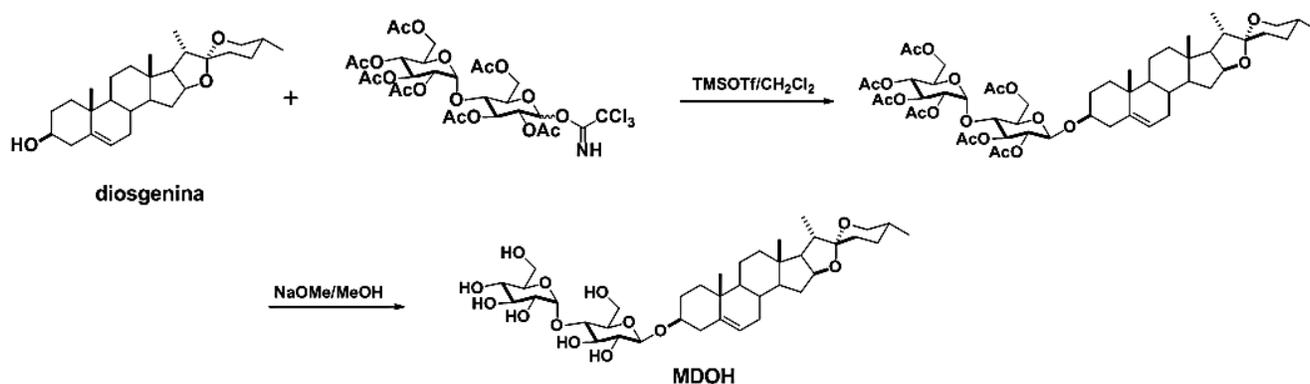
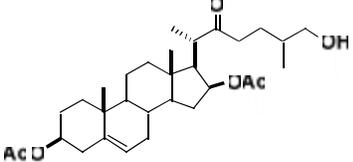
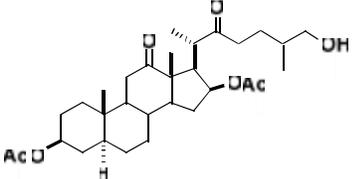
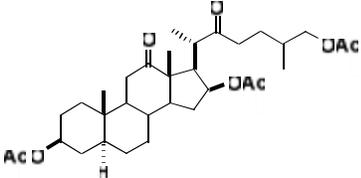
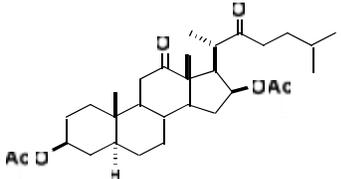
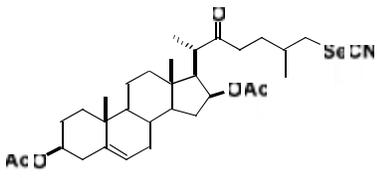
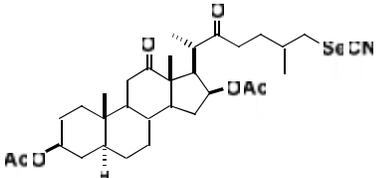


Figura 5. Ruta de síntesis del β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH). Tomado de Fernández, 2010.

La modificación de la estructura química en la síntesis de compuestos análogos y derivados afecta la actividad biológica como se muestra en la tabla 1 donde se comparan diversos compuestos esteroidales.

COMPUESTO ESTEROIDAL	HeLa Cl ₅₀ μM	CaSki Cl ₅₀ μM	Caspasa 3 activa	Estructura molecular
Diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo	-	47.1	+	
Diacetato de (25 <i>R</i>)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo	46.9	188	+	
Triacetato de (25 <i>R</i>)-12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β,26-triilo	146.3	-	Sin Datos	
Diacetato de 12,22-dioxo-5α-colestano-3β,16β-diilo	96.8	190.8	+	
Diacetato de (25 <i>R</i>)-22-oxo-26-selenocianocolest-5-eno-3β,16β-diilo	10.2	14.9	+	
Diacetato de (25 <i>R</i>)-12,22-dioxo-26-selenociano-5α-colestano-3β,16β-diilo	95.1	96.7	+	

β-D-Glucopiranosido de (25 <i>R</i>)-3β,16β-diacetoxi-22-oxocolest-5-eno-26-ilo	29.5	33.9	+	
ξ-D-Glucopiranosido de (25 <i>R</i>)-3β,16β-diacetoxi-12,22-dioxo-5α-colestano-26-ilo	65	65	+	
Dioscina	4	4	+	
3-glucolaxogenina	94	120	+	

Tabla 1. Efecto antiproliferativo (CI_{50}) e inductor de apoptosis (Detección expresión caspasa 3 activa) de derivados y análogos de compuestos esteroideos que demuestra que la modificación en la estructura química tiene impacto en la actividad biológica en células tumorales CaCu líneas HeLa y CaSki. Tomado y modificado de Fernández, 2010.

También se han realizado ensayos con células linfocíticas no tumorales donde se encontró que compuestos esteroideos de la tabla 1 presentan selectividad. Los compuestos que mejores resultados arrojaron fueron el Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo; El β-D-Glucopiranosido de (25*R*)-3β,16β-diacetoxi-22-oxocolest-5-eno-26-ilo y el 3-glucolaxogenina con 56.8, 63.7 y 69.3% de proliferación respectivamente donde incluso indujeron a los linfocitos a proliferar; esto indica que la inhibición de la proliferación celular en células tumorales sigue un mecanismo selectivo (Fernández, 2010).

El encontrar los compuestos adecuados con propiedades antitumorales es difícil ya que dicha actividad tiene que estar basada en el efecto diferencial que debe tener el compuesto entre las células tumorales y no tumorales. Es por ello anterior se decidió que el compuesto esteroideo derivado de la diosgenina MD-OH que es una saponina por presentar un azúcar maltosa que le confiere mayor solubilidad que las agliconas es un buen candidato como agente quimioterapéutico contra el cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen diversas terapias aplicadas contra el cáncer como la cirugía, y la radioterapia que resultan ser efectivas solo cuando el tumor se encuentra localizado y en una fase temprana de desarrollo, sin embargo resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad. Esto ha generado un gran interés en obtener compuestos de origen vegetal con actividad antitumoral, como es el caso de las saponinas que pudieran ser más eficientes contra esta enfermedad. En ese sentido se ha reportado que la diosgenina es una saponina esteroide comúnmente encontrada en las plantas y exhibe citotoxicidad en varias líneas de células tumorales.

Adicionalmente se ha demostrado que la modificación estructural de algunas moléculas puede mejorar su actividad biológica, hecho que ha generado la necesidad de sintetizar análogos o derivados de diferentes compuestos de los que se ha reportado cierta actividad antitumoral como la diosgenina, cuyo cambio estructural permita mejorar su actividad biológica. Por ello en el presente trabajo se evaluó al derivado de la diosgenina β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) esperando que presente actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica sobre líneas celulares de CaCu.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra entre los cánceres femeninos de mayor importancia a nivel mundial, de modo que en México es una de las principales causas de muerte y de morbilidad hospitalaria entre las mujeres. Siendo el VPH 16 el de mayor incidencia en el país. 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 interés en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antiproliferativo, apoptóticos, y de acción selectiva, en los que destacan las sapogeninas y saponinas. A éstas se les ha atribuido un efecto citotóxico e inhibitorio de la proliferación de células tumorales; sin embargo, la modificación en la estructura del compuesto se cree que podría eliminar la citotoxicidad o bien mejorar la actividad antiproliferativa, por lo que es necesario evaluar a los derivados sapogenínicos de la Diosgenina como es el caso del MD-OH, el cual presenta una adición de un azúcar maltosa, donde no se sabe si favorece o afecta la actividad anticancerígena de este compuesto. No obstante lo descrito sobre nuevos compuestos, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica que éstos ejercen sobre el carcinoma de cérvix, por lo que es necesario generar información acerca de la actividad de saponinas sobre células tumorales de cáncer cervicouterino.

HIPÓTESIS.

Se sabe 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 tumorales 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 el MD-OH, derivado de la diosgenina presente actividad antiproliferativa e inductora de muerte en la línea celular de CaCu, CaSki.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si el compuesto esteroidal β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) derivado de la diosgenina, presenta actividad selectiva, antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis en la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino CaSki.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar cultivos de la línea celular CaSki proveniente de cáncer cervicouterino.
- Evaluar la concentración requerida del compuesto MD-OH para inducir un decremento del 50 % en el número celular (CI_{50}), en cultivos de células CaSki.
- Evaluar si la CI_{50} determinada en las células CaSki afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana como parámetro comparativo de células no tumorales.
- Evaluar el efecto citotóxico y/o necrótico del MD-OH en cultivos de células CaSki mediante la detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares.
- Evaluar si el MD-OH induce a las Células CaSki a presentar una morfología apoptótica así como la expresión de la caspasa 3 activa, como dos indicadores de muerte por apoptosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de la línea tumoral CaSki.

La línea celular de carcinoma epidermoide de cérvix (CaCu) CaSki, positivo al VPH tipo 16 fueron sembradas en cajas De Petri de cristal de 100 mm (Pirex USA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, USA) con rojo fenol suplementado con bencilpenicilina (Grünenthal, Mex) y al 5 % de suero de ternera neonata (STN, Gibco, USA) desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair USA). Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales hasta un 70 % de saturación (fase de crecimiento exponencial) (Morgan y Darling, 1993).

Para la realización de los ensayos con cultivos de células CaSki, se utilizó un control (Células en RPMI-1640 con 5 % de STN), un vehículo (Células en RPMI-1640 con 5 % de STN y 1 % de mezcla de Etanol-Dimetilsulfóxido en proporción 3:1 respectivamente) y los tratamientos (Células en RPMI-1640 con 5 % de STN, 1 % de Etanol-DMSO, 3:1 y la concentración de MD-OH). Básicamente se dejaron adherir las células CaSki en una caja de Petri (Pirex USA), placa de 96 pozos (Corning, USA) con medio de cultivo RPMI-1640 con rojo fenol suplementado con STN al 5 % (Gibco, USA), posteriormente se les cambió el medio de cultivo por: RPMI-1460 al 5 % de STN (control); RPMI-1640 al 5 % de STN y adicionando el 1 % de Etanol-DMSO proporción 3:1 (Et-DMSO.; vehículo); y RPMI-1640 al 5 % de STN con las concentraciones de tratamiento del MD-OH las cuales fueron de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/ml (dilución seriada) por 24 h, finalmente los cultivos se utilizaron para la determinación de la CI₅₀, la expresión de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), la incorporación de Yoduro de Propidio (IP), que son indicadores de la citotoxicidad del compuesto sobre el cultivo celular así como para la detección de la activación de la enzima caspasa 3 indicadora de apoptosis y la selectividad con linfocitos.

Preparación del Stock del compuesto MD-OH.

El stock consiste en pesar 1 mg del compuesto (MD-OH) y solubilizarlo en 100 µl de una mezcla de Etanol/DMSO proporción 3:1. El compuesto (MD-OH) fue sintetizado en el

Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

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

Se sembraron 7500 células de la línea celular CaSki, en cajas de 96 pozos (Corning. USA), con 100 µl de medio RPMI-1640 al 5 % de STN, en las cuales se usaron concentraciones del compuesto de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/ml durante 24 h. para establecer el rango de la CI_{50} . La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al.*, (1989), para ello, se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pozos, se dejó secar al aire e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma- Aldrich. USA) por 15 minutos, al cabo del tiempo, se retiró el fijador y se dejó secar muy bien al aire, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma- Aldrich. USA) por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada. Nuevamente, se dejó secar al aire. Por último, el colorante se solubilizó en ácido acético (J.T.Baker, Mex) al 10 % en agitación por 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector ELISA (ImageTecanSpectra, USA). Los resultados de los grupos tratados se compararon con el respectivo control y se graficaron.

Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH en células tumorales y linfocitos humanos.

El ensayo de citotoxicidad se realizó con el kit de LDH (BioVision, USA). En la placa de 96 pozos se sembraron 200,000 linfocitos por pozo, se aplicó la CI_{50} del MD-OH así como los controles y se incubaron por 72 h. Para las células tumorales se sembraron 7500 células por pozo se dejaron adherir durante 24 h, se aplicó la concentración de MD-OH correspondiente a la CI_{50} y se incubaron por 24 h más. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, después se tomaron 40 µl de sobrenadante y se transfirieron a una placa de 96 y se añadieron 40 µl de mezcla de reacción (250 µl de solución catalítica y 11.25 µl de solución de marcado) a cada pozo y se incubó durante 30 minutos, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo

se leyó la absorbancia en un lector de placas ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = $[(\text{muestra} - \text{control negativo}) / (\text{control alto} - \text{control negativo})] * 100$.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Se sembraron 5×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos de la línea CaSki de CaCu, en un volumen de 500 μl de RPMI-1640 al 5 % de STN. Al paso de 24 h. las células fueron tratadas con la CI_{50} de MD-OH con medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de STN, durante 24 h. y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo, el procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: las células fueron cosechadas y fijadas a las 24 h. de cultivo con Et-OH al 70 % durante 20 minutos a 4 °C, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente se adicionó el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en conejo (SIGMA) 1:250 en PBS durante 24 h. a 4 °C. Al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), mantenido en oscuridad durante 3 h, después se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizarlas en el citómetro de flujo marca FACS Aria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Proliferación de linfocitos humanos por incorporación de carboxifluoresceína (CFSE).

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) (un total de 4 tubos); se cubrió y se centrifugó (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μl se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo se transfirió a tubos limpios y se resuspendió en 10 ml de PBS (por tubo); se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB (el total de células quedó contenido en un solo tubo con un

volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubó durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular utilizando la cámara de Neubauer. Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ M por ml de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó en cada tubo cónico de plástico de 1.6 ml la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 de células/ml de medio total. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 1×10^6 de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l/ml de fitohemaglutinina y la concentración de 36.25 μ g/ml del compuesto MD-OH (Micro-Lab S.A., Méx.). Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno, se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500 μ l de PBS dos veces por separado, y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo marca FACS Aria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Análisis estadístico.

Los datos experimentales fueron presentados como la media \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes con seis repeticiones y fueron estadísticamente analizados usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparado contra el control. Se empleó el software IBM SPSS Statistics 20.

RESULTADOS

Con la intención de establecer si el MD-OH presenta actividad antiproliferativa en células tumorales, cultivos de células CaSki fueron tratadas con diferentes concentraciones de MD-OH y la cantidad requerida del compuesto para disminuir en un 50 % (CI_{50}) el número celular fue determinada mediante la técnica de tinción con cristal violeta (figura 6).

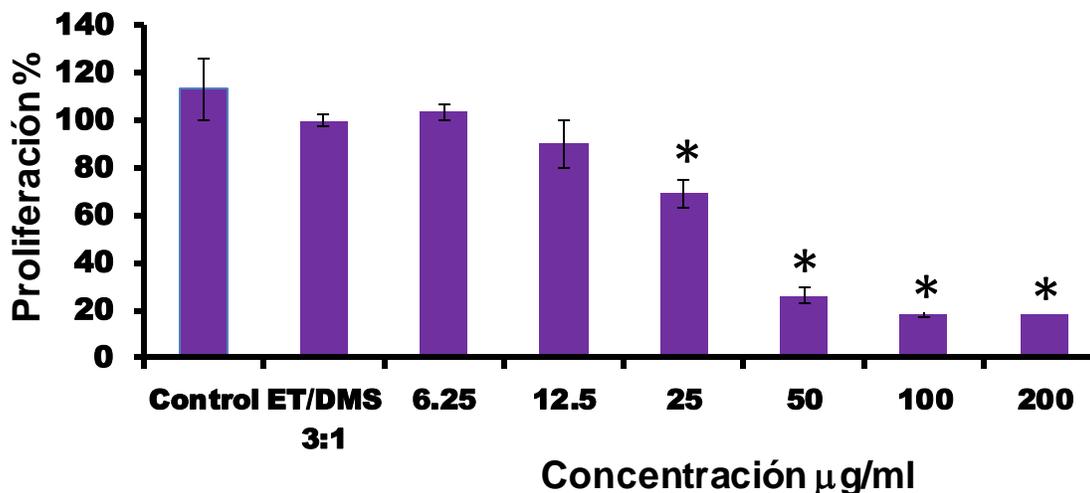


Figura 6. Efecto del MD-OH sobre la proliferación de cultivos de la línea celular CaSki proveniente de CaCu. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para su adherencia y tratadas con las diferentes concentraciones de MD-OH durante 24 h. Control: células sin tratamiento, solo RPMI-1640 al 5 % de STN; ET/DMS 3:1 RPMI-1640 al 5 % de STN y adicionando el 1 % de EtOH-DMSO 3:1. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan por lo menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. ANDEVA seguida de una prueba Tukey: (* $p < 0.05$ Vs Et-OH-DMSO).

Como se puede apreciar en la figura 6, la saponina MD-OH afectó el potencial proliferativo de la línea tumoral CaSki de manera dependiente de la dosis, es decir conforme se incrementa la concentración del compuesto, el número celular disminuye. Para determinar la CI_{50} , los datos obtenidos en la figura 6 fueron utilizados y con la ayuda de la ecuación de la recta se obtuvo un valor de CI_{50} de 36.24 $\mu\text{g/ml}$, como se muestra en la figura 7.

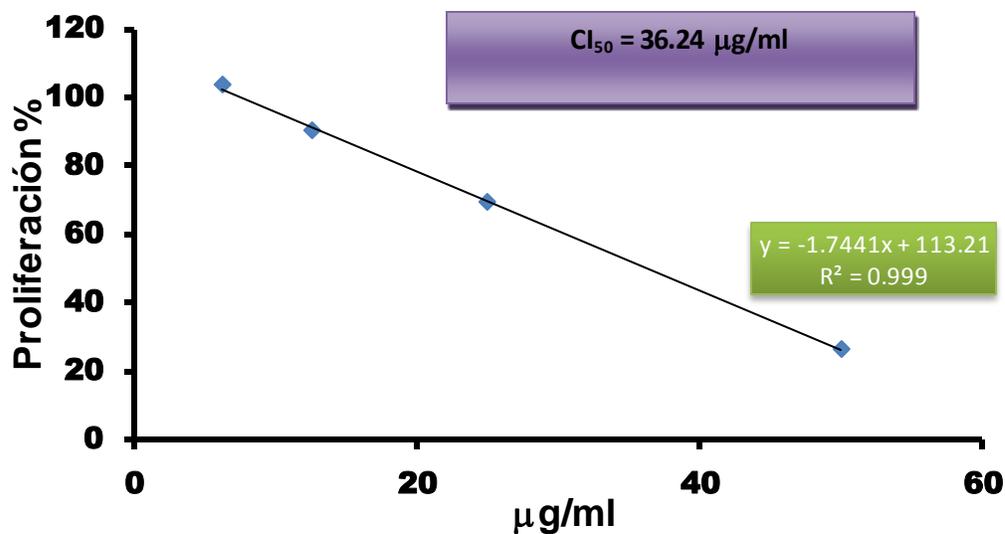


Figura 7. Obtención de la CI_{50} calculada matemáticamente. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para su adherencia y tratadas con 36.2 µg/mL de MD-OH durante 24 h. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta.

Una vez obtenida la CI_{50} del compuesto en células CaSki, se procedió a confirmar este resultado.

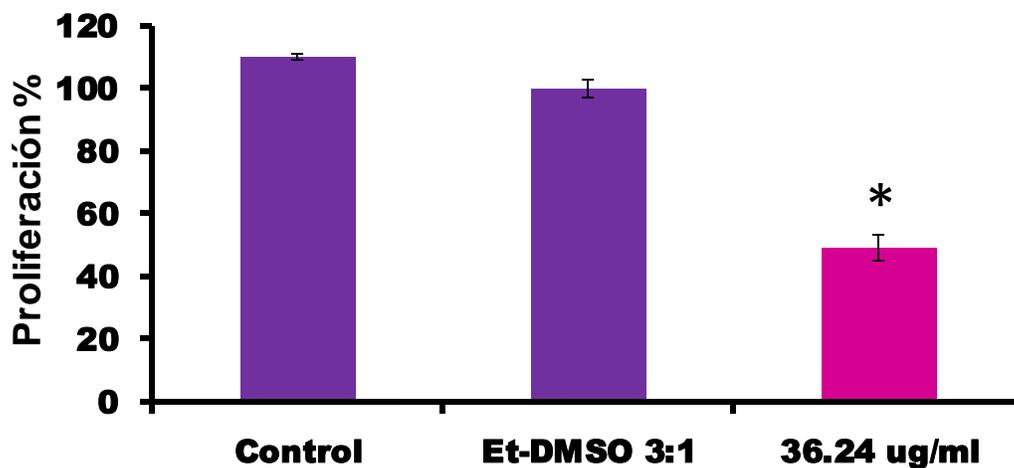


Figura 8. Confirmación de la CI_{50} para la línea celular CaSki. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para su adherencia y tratadas con 36.24 µg/ml de MD-OH durante 24 h. Control: células sin tratamiento, solo RPMI-1640 al 5 % de STN; Et-DMSO: RPMI-1640 al 5 % de STN y adicionando el 1 % de Et-OH/DMSO 3:1. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey: (* $p < 0.05$ Vs Et-OH-DMSO).

La figura 8 confirma que 36.24 µg/ml de MD-OH reduce en un 50 % la proliferación de células CaSki. Una vez corroborado éste dato y con el propósito de establecer si el MD-OH

induce a las células tumorales a expresar una morfología necrótica o apoptótica, se procedió a evaluar el efecto del MD-OH en la morfología de las células CaSki (Figura 8). Para ello, cultivos de células CaSki fueron tratadas con el MD-OH a la concentración de 36.24 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h y posteriormente los cultivos fueron fotografiados con un microscopio invertido de campo claro (NIKON).

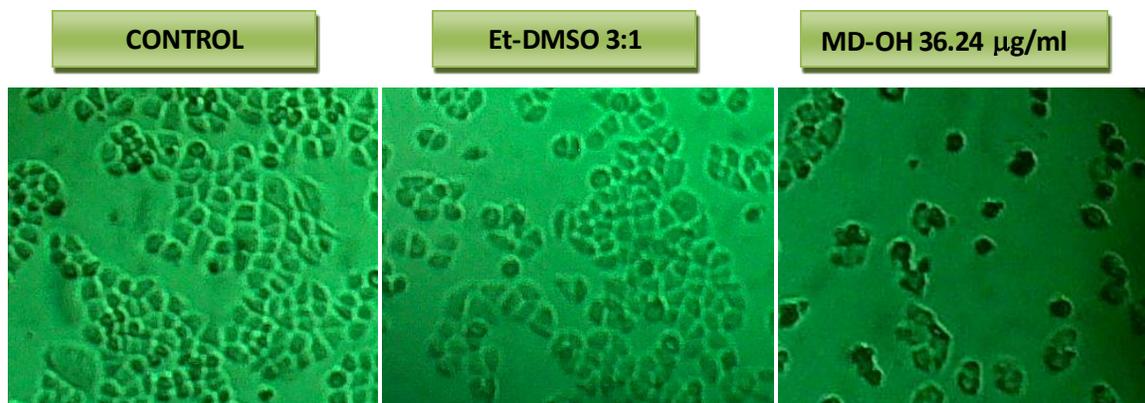


Figura 9. Efecto del MD-OH en la morfología celular de la línea de CaCu CaSki. Control: células sin tratamiento, solo RPMI-1640 al 5 % de STN; Et-OH/DMSO: RPMI-1640 al 5 % de STN y adicionando el 1 % de Et-OH-DMSO proporción 3:1. MD-OH: células tratadas con la concentración de 36.24 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h. Aumento 10x.

Como se observa en la figura 9, las células CaSki tratadas con el MD-OH presentan una modificación importante en su estructura, ya que las células se ven más pequeñas, donde la forma poliédrica se pierde, generando células de forma redonda que denotan pérdida de adherencia a la placa de cultivo, además de mostrar una fuerte compactación celular, indicando que el compuesto MD-OH no sólo afecta el potencial proliferativo de las células CaSki sino que además induce en ellas una muerte celular. Por ello, con la intención de determinar si el MD-OH induce una muerte necrótica en las células tumorales, cultivos de células CaSki fueron tratadas con 36.2 $\mu\text{g/ml}$ y el efecto citotóxico del MD-OH fue evaluado mediante la determinación de la actividad de la enzima citoplasmática Lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 10).

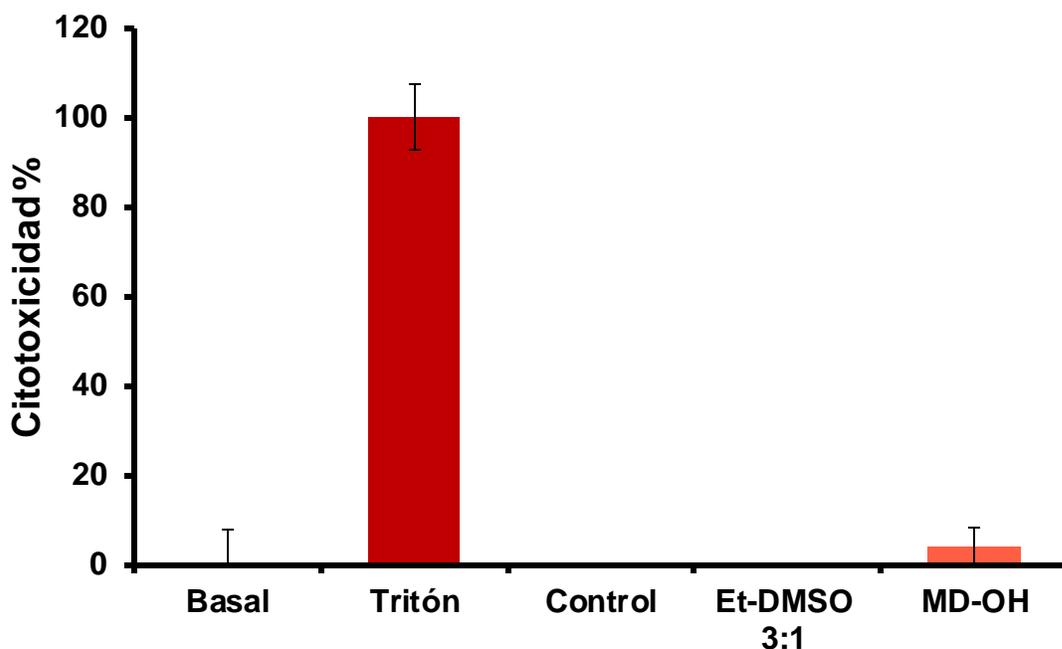
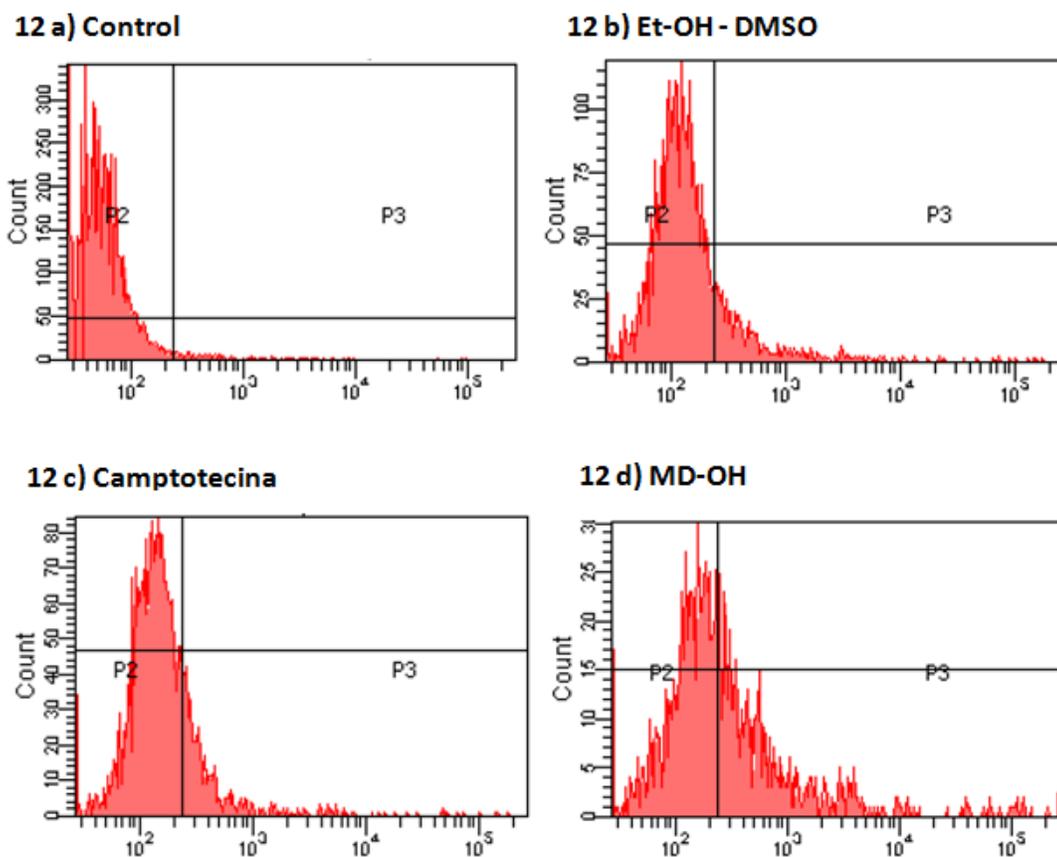


Figura 10. Evaluación de la inducción de muerte por necrosis mediante la determinación de la actividad de la enzima citoplasmática en cultivos de células CaSki. 25000 células CaSki fueron sembradas en placas de cultivo de 48 pozos. La actividad citotóxica fue determinada por la determinación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes y expresada en porcentaje. Basal: Sin células, solo RPMI-1640 al 5 % de STN; Tritón: RPMI-1640 al 5 % de STN adicionado con 1 % de tritón X-100; Control: células con RPMI-1640 al 5 % de STN; Et-DMSO 3:1 RPMI-1640 al 5 % de STN y adicionando el 1 % de Et-OH/DMSO 3:1; MD-OH: células tratadas con 36µg/ml de MD-OH. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey: (*p<0.05 Vs Tritón)

Los resultados (Figura 10) indican que el compuesto MD-OH no induce significativamente la liberación de la enzima citoplasmática LDH al sobrenadante de los cultivos celulares, indicando que no hay una pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática y por lo tanto no induce una muerte por necrosis en las células CaSki y que el decremento observado en el número celular es debido a causas diferentes a la muerte por necrosis.

Una vez que se determinó que el compuesto MD-OH no induce muerte necrótica, se procedió a evaluar si la disminución en el número celular observado se debe a otro tipo de muerte. En ese sentido se ha descrito que algunos fitoesteroides como la dioscina y la hecogenina inducen muerte por apoptosis. Por ello fue importante determinar si el MD-OH es capaz de inducir muerte por apoptosis en las células tumorales. Al respecto, cultivos de células tumorales CaSki fueron tratadas con el esteroide y la población celular positiva a la caspasa 3 activa fue cuantificada por citometría de flujo.

POSITIVIDAD A CASPASA 3 ACTIVA (FITC)

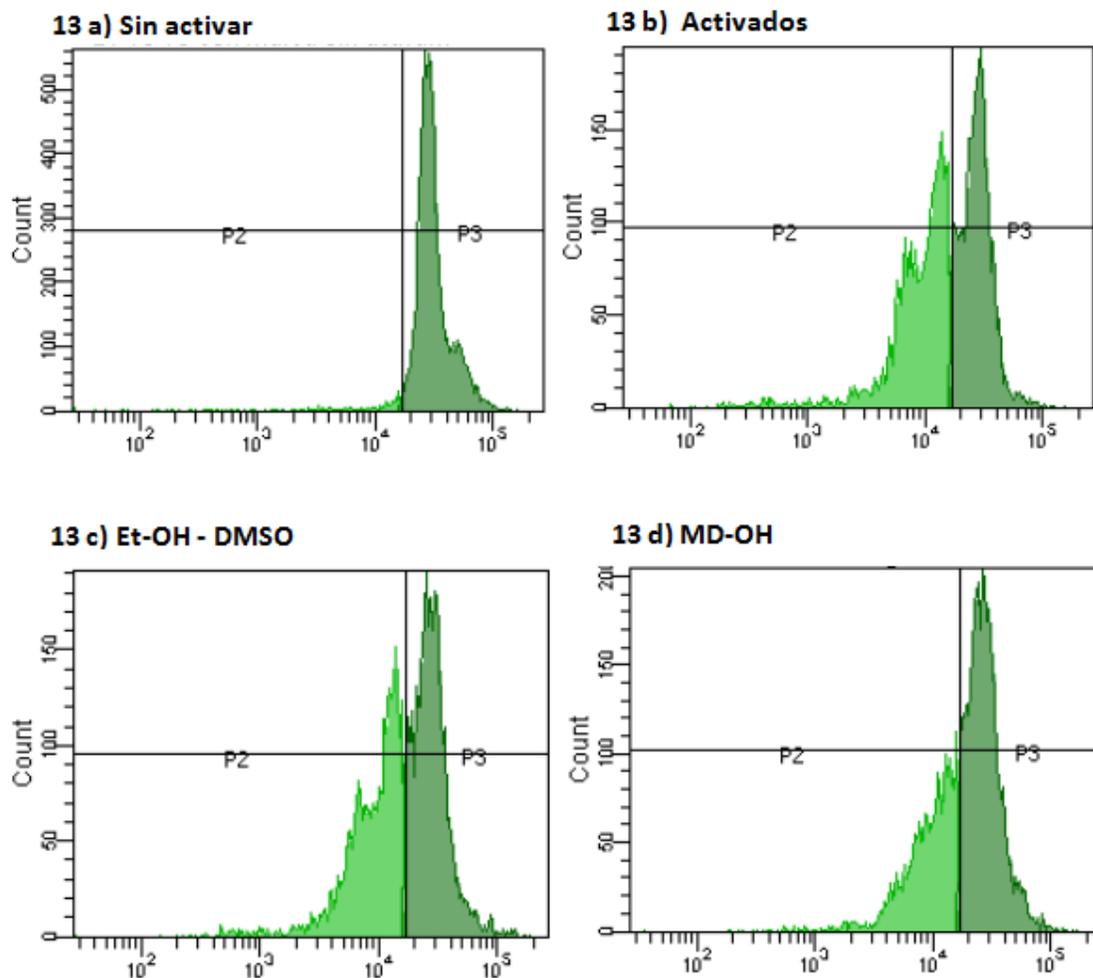


CasKi	% de Positividad a Caspasa 3 activa (FITC)
Control	2.1 %
Etanol-DMSO	17.7 %
Camptotecina	20.7 %
MD-OH	43.5 %

Figura 11. Efecto del compuesto MD-OH sobre la inducción de muerte por apoptosis en células CaSki. a) Control sin marca b) células tratadas con 1 % de mezcla etanol-DMSO 3:1; c) Control positivo (camptotecina); d) células tratadas con 36.24 µg/ml de MD-OH. El gráfico es un ensayo representativo de 3 ensayos independientes.

Los resultados obtenidos en la figura 12 indican que el MD-OH induce un incremento en los niveles de expresión de la caspasa 3 activa del 25.8 % con respecto al Etanol-DMSO en células de la línea CaSki, indicando que además de no inducir muerte por necrosis, este esteroide induce en las células tumorales una muerte por apoptosis.

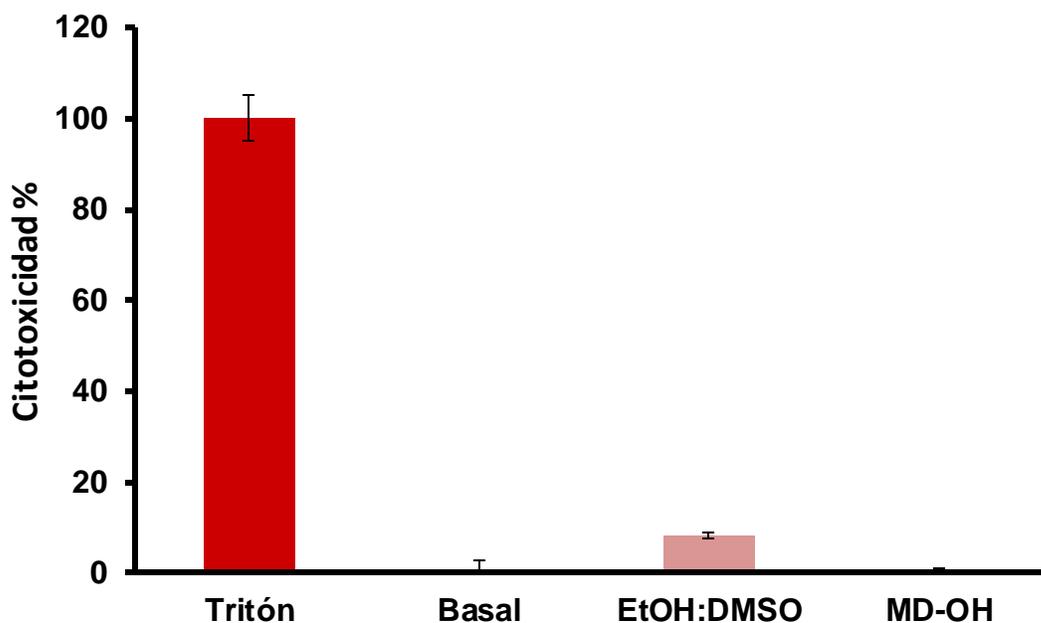
Una vez determinado que el compuesto MD-OH induce a las células tumorales a una muerte apoptótica, se procedió a evaluar si este compuesto afecta de forma diferencial a células no tumorales humanas como un parámetro de selectividad usando para ello cultivos de linfocitos humanos. Para cumplir con este propósito, cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana fueron marcadas con carboxifluoresceína y tratadas con 36.24 $\mu\text{g/ml}$ de MD-OH y su potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo (Fig. 12).



CaSki	% Proliferación
Sin activar	4.0 %
Activados	50.4 %
Et-OH-DMSO	46.7 %
MD-OH	37.5 %

Figura 12. Efecto de la saponina esteroide MD-OH en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron marcadas con carboxifluoresceína acetato succinimidil éster (CFSE) y evaluados por citometría de flujo. P2: región de células en proliferación y P3: región de células que no proliferan. a) Linfocitos sin activar, b) linfocitos activados con fitohemaglutinina, c) Linfocitos tratados con 1 % mezcla Et-OH-DMSO 3:1 y d) Linfocitos tratados con 36.24 $\mu\text{g/ml}$ de MD-OH.

El resultado observado en la figura 13 muestra que los 36.24 μg de MD-OH que afectan en un 50 % el número celular en los cultivos de las células tumorales, en los cultivos de células linfocíticas solo disminuye en un 20 % la proliferación con respecto al vehículo (Et-OH/DMSO), indicando cierta selectividad de este compuesto. El hecho de observar un decremento en el potencial proliferativos de las células linfocíticas, abre la posibilidad de que el MD-OH presente actividad necrótica en estas células, por lo que se procedió a evaluar si el MD-OH induce liberación de la enzima LDH en cultivos de linfocitos humanos como parámetro de muerte necrótica (Figura 13).



CaSki	Total de LDH %
Tritón	100 %
Basal	0 %
Et-OH/DMSO	8.32 %
MD-OH	0 %

Figura 13. Determinación de la actividad necrótica del MD-OH en cultivos de células linfocíticas. 20000 células linfocíticas fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos y la actividad de la enzima LDH fue evaluada a las 72 h en los sobrenadantes de los cultivos celulares.; Tritón: células tratadas con 1 % de tritón x-100; Basal: células sin tratamiento; EtOH:DMSO: células tratadas con 1 % de mezcla Etanol- DMSO 3:1 ; MD-OH: células tratadas con 36.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MD-OH. La actividad citotóxica fue determinada por la actividad de la enzima LDH y expresada en porcentaje. ANDEVA seguida de una prueba de Tukey: (* $p < 0.05$ Vs Basal).

La figura 13 muestra que el compuesto MD-OH no induce muerte necrótica en las células linfocíticas, lo cual sugiere que el decremento en la proliferación se debe a causas diferentes a la necrosis.

DISCUSIÓN

Las saponinas son compuestos naturales caracterizados estructuralmente por presentar enlaces glicosídicos y/o éster entre una genina poco polar y un azúcar, con una estructura esteroidal (C27) o triterpénica (C30). La remoción del sacárido por hidrólisis ácida produce lo que es una sapogenina (Omoruyi, *et al.* 2008).

Sin duda la más útil de todas las sapogeninas esteroides es la diosgenina, que se encuentra en diversas especies de *Dioscorea*; este metabolito está disponible relativamente en grandes cantidades (5 a 10 %) en los rizomas de estas plantas y es utilizado como materia prima en el proceso industrial de fabricación de cortisona y hormonas sexuales como la progesterona (Anaya, 2003).

Las saponinas son estructuralmente una clase diversa de glucósidos, las cuales han atraído mucha atención debido a la gran cantidad de actividades biológicas que presentan, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiproliferativas e inductoras de apoptosis (Zhou *et al.*, 2005), por lo que, constituyen una importante fuente de productos de origen natural que conducen al desarrollo de novedosos y prometedores quimioterapéuticos. El descubrimiento de estos nuevos agentes con propiedades anticancerígenas es en base a sustancias con estructura y citotoxicidad conocidas (Camoutsis *et al.*, 2005). Sin embargo, el encontrar los compuestos adecuados con propiedades antitumorales es difícil ya que dicha actividad debe estar basada en el efecto diferencial que debe tener el compuesto entre células tumorales y células no tumorales.

La diosgenina se encuentra limitada debido a su escasa solubilidad en sistemas acuosos al carecer de azúcares, generando la necesidad de crear análogos o derivados de esta molécula que sean más solubles y con mayores rendimientos en su síntesis. Es por ello que se realizaron pruebas con mezclas de varios solventes para que el compuesto MD-OH, derivado de la diosgenina tuviera mayor solubilidad, quedando la mezcla de Et-OH/DMSO 3:1 como disolvente del compuesto, generando una buena solubilidad en el medio de cultivo, incrementando su biodisponibilidad. El MD-OH se mantiene disuelto después de

varias semanas, a diferencia de la diosgenina que después de un día se precipita y pierde su solubilidad.

Según reportes de Fernández y colaboradores (2012), la diosgenina induce un decremento del número celular del 50 % generando muerte apoptótica en la línea CaSki a una concentración de 80 μM . La Dioscina, saponina nativa en las plantas, presenta un efecto de CI_{50} sobre las línea CaSki a una concentración de 2.01 μM . También se ha reportado que la saponina Diosgenina-3-glu tiene una CI_{50} en CaSki de 60 μM . Con respecto a lo anterior la saponina MD-OH conserva y presenta un efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis en la línea CaSki a una concentración de 49 μM indicando que es más potente que la Diosgenina, más potente que la Diosgenina-3-glu y menos potente que la Dioscina. Es interesante resaltar que las moléculas de Diosgenina (sin azúcar), Diosgenina-3-glu (monosacárido), el MD-OH (disacárido) y la Dioscina (trisacárido) son idénticas en la aglicona y lo único que cambia es el tipo de azúcar que presentan añadida al carbono tres de la aglicona. Esto sugiere que el papel de los azúcares en la diosgenina no solo sirven para dar solubilidad en medio acuoso, sino que además podrían regular la actividad biológica.

La dioscina es una de las saponinas esteroidales más comunes y se ha aislado de más de veinte géneros de plantas, incluyendo varios vegetales y plantas medicinales. Se encuentra entre las saponinas espiroestánicas con mayor actividad antiproliferativa y exhibe citotoxicidad frente a varios tipos de células cancerosas incluyendo el cáncer cervicouterino (Pérez, 2012). Sin embargo, la dioscina presenta la dificultad de obtenerla en grandes cantidades, por lo que se busca generar nuevos compuestos diosgenínicos que puedan sintetizarse en el laboratorio y que su obtención sea más económica y rápida. En ese sentido en el presente trabajo encontramos que el derivado MD-OH mantiene su actividad antiproliferativa en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino de la línea CaSki, que ejerce un efecto dependiente de la dosis y que la CI_{50} se encuentra en 36.24 $\mu\text{g/ml}$ (49.05 μM) que es menor en comparación con reportes de diversos compuestos esteroidales tales como el Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo (47.1 μM), el Diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -colestano-

3 β ,16 β -diilo (188 μ M), el Diacetato de 12,22-dioxo-5 α colestano-3 β ,16 β -diilo (190.8 μ M), el Diacetato de (25*R*)-12,22-dioxo-26-selenociano-5 α -colestano-3 β ,16 β -diilo (96.7 μ M) el ξ -D-Glucopiranosido de (25*R*)-3 β ,16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α colestano-26-ilo (65 μ M) y 3-glucolaxogenina (120 μ M) (Fernández 2010).

Se conoce además, que algunas saponinas activan el sistema inmunológico, por lo que se utilizan como adyuvantes en la formulación de vacunas (Pérez, 2012). Un hallazgo relevante en nuestros resultados es que el MD-OH inhibió en un 20 % el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas no tumorales en 72h, a diferencia del 50 % que se ve inhibido en células tumorales de CaCu línea CaSki a 24h, ambas a una concentración de 36.24 μ g/ml, lo que indica que el MD-OH presenta una actividad antiproliferativa con acción selectiva. Sin embargo, sería conveniente en un futuro probar este compuesto en diferentes tipos celulares no tumorales, como epitelios, células fibroblásticas, hepatocitos, células renales, entre otras para determinar cuán selectivo es. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que el MD-OH no induce muerte necrótica en células tumorales ni en células no tumorales, sugiriendo que los efectos colaterales asociados a la necrosis serían mínimos, ya que la respuesta inflamatoria sería mínima, ayudando a una rápida recuperación de los tejidos o del órgano.

También se ha descrito que la diosgenina induce una muerte por apoptosis en diferentes líneas tumorales, incluyendo el cáncer cervicouterino (Fernández, 2010). En el caso del MD-OH encontramos que cuando las células de CaCu CaSki son tratadas con 36.24 μ g/ml de este compuesto, se induce en ellas una muerte apoptótica, actividad que resulta ser fuertemente relevante ya que indica que las células tumorales serán eliminadas de manera silenciosa sin activar alguna respuesta inmunológica y muy probablemente sin generar daños colaterales significativos en otros órganos o tejidos.

Con respecto a los medicamentos que se utilizan con más frecuencia para tratar el CaCu incluyen: Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel (Taxol[®]), Topotecán, Gemcitabina (Gemzar[®]) docetaxel (Taxotere[®]), ifosfamida (Ifex[®]), y 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecán (Camptosar[®]), y mitomicina. A menudo se utilizan combinaciones. Sin embargo, éstos generan fuertes efectos secundarios. Algunos medicamentos (paclitaxel y cisplatino) causan daño a nervios

fuera del cerebro y la médula espinal, además de aumento en el riesgo de leucemia. Algunos problemas asociados con la terapia de cisplatino incluye efectos dependiente de dosis, los más importantes son neurotoxicidad, resultando en la neuropatía periférica, tinnitus y pérdida auditiva de alta frecuencia (Decatris *et al.*, 2004). Otros efectos que se pueden encontrar son la disminución de células sanguíneas; incrementando la probabilidad de infecciones (debido a la escasez de glóbulos blancos). También se puede generar la pérdida de sangre o hematomas después de cortaduras o lesiones menores (debido a la escasez de plaquetas), dificultad para respirar (por la disminución de los niveles de glóbulos rojos) (American Cancer Society, 2014). No obstante estas desventajas presentes en los quimioterapéuticos actuales, éstos resultan ser muy exitosos en pacientes con tumores únicos detectados tempranamente y de fácil localización. Sin embargo, en pacientes terminales o metastásicos, estos compuestos resultan de poca ayuda, por lo que compuestos con actividad antiproliferativa, no citotóxicos, inductores de apoptosis y de acción selectiva resultan ser relevantes para ser considerados fuerte candidatos para ser evaluados como agentes con potencial anticancerígeno.

Es relevante resaltar que las características encontradas en el MD-OH (antiproliferativo, no citotóxico, inductor de apoptosis en células tumorales de CaCu, ligeramente antiproliferativo y sin efecto citotóxico en células no tumorales) sugieren que esta saponina podría ser considerada como un fuerte candidato para ser evaluado en modelos *in vivo*, con la intención de establecer su potencial terapéutico como agente con actividad antitumoral.

CONCLUSIONES

El compuesto MD-OH reduce la proliferación celular en un 50 % en cultivos de células CaSki a una concentración de 36.24 $\mu\text{g/ml}$ (49 μM).

El compuesto MD-OH no induce muerte por necrosis en células de CaCu CaSki ni en linfocitos humanos provenientes de sangre periférica a una concentración de 36.24 $\mu\text{g/ml}$ (49 μM).

El compuesto MD-OH a una concentración de 36.24 $\mu\text{g/ml}$ (49 μM) induce muerte por apoptosis en células CaSki a través del incremento en la expresión de la enzima caspasa 3 activa.

El MD-OH a una concentración de 36.24 $\mu\text{g/ml}$ (49 μM) afecta en un 20 % el potencial proliferativo de cultivos de linfocitos humanos a 72h.

REFERENCIAS

- Adam, E., Berkova Z., Daxnerova, Z. (2000). *Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease*. Am. J. Obstet. Gynecol. Vol. 182. pp. 257-264.
- Agency for Research on Cancer. (1997). Scientific Publications number 143. Lyon; IARC.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Raberts, K., Watson. (2002). *Molecular biology of the Cell*. 4a ed. Garland Publishing Inc. New York. Pág 1294.
- Alfaro, M. E. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Subdirección de Investigación Básica Instituto Nacional de Cancerología. Vol. 46, Núm. 4. pp. 275-280
- American Cancer Society, Inc. 2014. All rights reserved. The American Cancer Society is a qualified 501 (c) (3) tax-exempt organization. Cancer.org is provided courtesy of the Leo and Gloria Rosen family.
- Anaya, L. (2003). *Ecología Química*, UNAM. Plaza y Valdés editores. México. pp. 53-59.
- Anthony, C. P. & G. A. Thibodeau. (1991). *Anatomía y fisiología*. 10ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. pág. 724.
- Berumen-Campos J. (2003). *Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix*. Gac. Méd. Méx. Vol.139, Suplemento No. 4
- Bioorganic & Medicinal Chemistry. (2009). *Structural analogues of diosgenylsaponins*. Synthesis and anticancer activity. Vol. 17. Pp.670-679.
- Burk, R.D., Ho, G.Y., Beardsley, L. (1996). *Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women*. J. Infect. Dis. Vol. 174, Núm.4. pp. 679-89.
- Cai, J., Liu, M., Wang, Z., and Ju, Y. (2002). Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 25. pp.193-96.
- Cameron R. (1995). *Oncología Práctica*. Ed Médica Panamericana. España. pp. 5-24.

- Camoutsis, C., Trafalis, D. (2005). *On the formation of 4-[N, N-bis (2-chloroethyl) amino] phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity.* *Farmacologia*, Vol. 60, Núm. 10. pp. 826-829.
- Castellsagué, X. (2008). *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.* *GynecolOncol.* Vol. 110. pp. 4-7
- Cheung, J. Y., Ong, R. C., Suen, Y. K., Ooi, V., Wong, H. N., Mak, T. C., Fung, K. P., Yu, B., and Kong, S. K. (2005). Polifilina D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells. *Cancer Lett.* Vol. 217. pp. 203-211
- Darnell, J., Havey, L., Baltimore, D. (1993). *Molecular cell biology.* Second edition. Scientific American Books. USA. Pág. 920
- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., ZurHausen, H. (2004). *Classification of papillomaviruses.* *Virology.* Vol. 324, Núm.1. pp. 17-27.
- Debnath, J., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. (2005). *Does autophagy contribute to cell death?* *Autophagy.* Vol. 1. pp. 66-74.
- Decatris, M. P., Sundar, S. & O'Byrne, K. J. (2004). *Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status.* *Cancer Treat Rev.* Vol. 30. pp. 53-81.
- Degterev, A. & Yuan J. (2008). *Expansion and evolution of cell death programmes.* *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* Vol. 9. pp. 378-390.
- Díaz, P. L. (2009). *Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión.* *Revista de Estudios Transdisciplinarios* Vol. 1. Núm. 2. pp. 36- 37
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. (1999). *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.* *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 68. pp. 383-424.
- Eifel, P., Berek, T. J. (2001). *Cancer of cervix, vagina and vulva.* In: De Vita V. Hellman S, Rosenberg S. (Eds) *cancer: principles and practice of oncology.* Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp. 1526-1572
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D. M.(2002). *Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide.* iarc cancer base no. 5. Version 2.0,

- Fernández, H. M. (2010). *Síntesis de derivados esteroideos con actividad biológica: Anticancerígenos y Promotores del crecimiento vegetal*. "Tesis doctoral". Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. pág. 154
- Hong-Ji Q., Jyunichi K., Ken H., Xing-Ri C., Yasunori I., Seiichi K., Fusao K., & Setsuo S. (2006). *Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with Various Nucleophiles and Pharmacological Activities of the Products*. Chem. Pharm. Bull. Vol. 54. pp. 72-79.
- Hostettmann, K., Marston, A. (1995). *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press: New York.
- Hu, Y., Xia, Z., Sun, Q., Orisi, A., and Rees, D. (2005) .*A new approach to the pharmacological regulation of memory: sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory deficit rat models*. Brain Res, Vol. 1060. pp. 26-39
- INEGI. Consulta Interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. 2013
- Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin. Vol. 61, Núm.2. pp. 69-90
- Karp, G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. 4ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. Pág. 899.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie. (1972). "*Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*." Br J Cancer. Vol. 26, Núm.4. pp. 239-57.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer. Vol. 26. pp. 239-257.
- Khoury, S. & Dasmin, C. (1981). *Cáncer: los grandes especialistas responden*. Librería Hachette. España. pp. 221-227.
- Kongkathip, N., Kongkathip, B. & Noimai, N. (2006) *Synth. Commun.* Vol. 36. pp. 865-874.
- Koutsky, L., Ault, K., Wheeler, C. (2002). *A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine*. New England Journal of Medicine. Vol. 347. pp. 1645–1651.

- Kueng, K., E. Silber, & V. Eppenberger. (1989). *Quantification of cells cultured on 96-well plates*. Anal. Biochem. Vol. 182. pp.16-19.
- Kumar, V., Cotran, R. S & Robbins, S.L. (1997). *Patología humana. Introducción a la Patología General Veterinaria*. 6ª ed. ED. McGraw-Hill-Interamericana.
- Lazcano-Ponce, E., Moss, S., De Ruiz, P., Castro, J., & Avila, M. (1999). *Cervical cancer screening in developing countries. Why is it ineffective? The case of Mexico*. Archives of Medical Research. Vol. 30. pp. 240-250.
- Lee, M. S., Yuet-Wa, J. C., Kong, S. K., Yu, B., Eng-Choon, V. O., Nai-Ching, H. W., Chung-Wai, T. M., and Fung, K. P. (2005). Effects of Polifilina D, a steroidal saponin in Paris polyphylla, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft. *Cancer Biol. Ther.* Volo.4. pp. 1248-1254
- Liu, M. J., Wang, Z., Ju, Y., Zhou, J. B., Wang, Y., and Wong, R. N. (2004). The mitotic-arresting and apoptosis-inducing effects of diosgenyl saponins on human leukemia cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 27. pp. 1059-1065
- Lizarbe, I. M. A. (2007). *El suicidio y la muerte celular*. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (esp). Vol. 101, Núm. 2. pp, 1,2.
- López-Saavedra & Lizano-Soberón. (2006). *Cancerología*. Vol. 1. Pág. 32
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. (2007). *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Vol. 8. pp. 741-752.
- Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B. (1994). *Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance*. Longman Scientific &
- Matthew, J., Kaskiw, A., Tassotto, M., Mac Moka, S., Tokar, L., Pyckoa, R., Th'ng, J., Jiang. Z. (2009). *Structural analogues of diosgenylsaponins: Synthesis and anticancer activity*. Bioorg. Med. Chem. pp. 1-7.
- Ming-Jie, L., Zhao, W., Yong, J., Ngok-Shun, W. & Qing-Yu, W. (2005). *Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis*. Can Chem Pharm. Vol. 55. pp.79-90.
- Miyashita, T. & Reed, J. (1993). *Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line*. Blood. Vol. 81. pp. 151-157.

- Morgan, S. J. and Darling, D. C. (1993). *Introduction to Basic Cell Culture: Animal Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. Pág.162
- Nam, D. H., Jeon, H. M., Kim, S., Kim, M. H., Lee, Y. J., Lee, M. S., Kim, H., Joo, K. M., Lee, D. S., Price, J. E., Bang, S. I., and Park, W. Y. (2008). Activation of notch signaling in a xenograft model of brain metastasis. *Clin. Cancer Res.* Vol. 14. pp. 4059-4066
- Narita, M., Shimizu, S., Ito T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1998). *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95. pp. 14681-14686.
- National Cancer Institute. (2011). *Human Papillomavirus (HPV)*. Vaccines. Vol. 8 No. 3.
- Negrini, B. P., Schiffman, M.H., Kurgan, R. J. (1990). *Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix*. Cancer Res. Vol. 50, Núm. 15. pp. 4670-4675.
- Nelson, D. & Cox, M. (2005). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 4a Edición. Ediciones Omega, Barcelona. Pág. 669.
- Omoruyi F.O., McAnuff M. A., Morrison E. Y., Asemota H. N. (2005). *Changes in some liver enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (Dioscorea polygonoides) or commercial diosgenin*. West Indian medical journal. Vol.54, Núm.2. pp. 97-101.
- Ong, R. C., Lei, J., Lee, R. K., Cheung, J. Y., Fung, K. P., Lin, C., Ho, H. P., Yu, B., Li, M., and Kong, S. K. (2008). Polifilina D induces mitochondrial fragmentation and acts directly on the mitochondria to induce apoptosis in drug-resistant HepG2 cells. *Cancer Lett.*, Vol. 261. pp. 158-164
- Pagani, A., Custogno, E., Rosasco, M., Cancela, M., Salveraglio, C. (1999). *Cáncer de cuello uterino con diferenciación neuroendócrina*. Rev. Med. Uruguay. Vol. 15. pp.146- 150
- Pardo, F. (1998). *Anatomía patología general y especial de las neoplasias*. Editorial Científico- Médico. España. Pág. 335

- Parkin, D.M., Whelan, S.L., Ferlay, J. (1997). *Cancer incidence in five continents*. International.Vol.7.
- Pattillo, R. A. (1977). *Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line*. Science. Vol. 196. pp. 1456-1458.
- Pérez, L. K. (2012). *Síntesis y caracterización de análogos y miméticos de saponinas espirostánicas*. "Tesis doctoral".Universidad de La Habana Facultad de Química Centro de Estudios de Productos Naturales. Cuba. pp. 8, 12.
- Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. (2003). México.
- Sánchez, S. L., López, D. M., Hernández, V. J., López, M. H., Escobar, S. M., Fernández, H. M., Sandoval, R. J. (2008). Efecto antitumoral del derivado diosgenínico 26-OH-DI sobre células tumorales de cérvix. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. México.
- Schlaepfer, L., Mendoza, J. (2010). *Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 41. pp. 18-27.
- Schmitt, C., Friedman, J., Yang, M., Baranow, E., Hoffman, R., & Lowe, S. (2002). *Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo*. Cancer Cell. Vol.1. pp. 289-91.
- Siu, F. M., Ma, D. L., Cheung, Y. W., Lok, C. N., Yan, K., Yang, Z., Yang, M., Xu, S., Ko, B. C., He, Q. Y., and Che, C. M. (2008). Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin (Polifilina D): induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways. *Proteomics*. Vol.8. pp. 3105-3117.
- Son I., Kim J., Sohn H., Son K., Kim J. & Kwon C. (2007). *Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Diosgenin, a Steroidal Saponin of Yam (Dioscorea spp.), on High-Cholesterol Fed Rats*. Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 71. pp. 3063-3071.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. (2008). *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Vol. 9. pp. 231-241. Technical: Essex. pp. 331-332.
- Tobarí, A., Teshima, M., Koyanagi, J., Kawase, M., Miyamae, H., Yoza, K., Takasaki, A., Nagamura, Y., Saito, S. (2000). *Eur. J. Med. Chem.* Vol. 35. pp. 511-527.

- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. (1999). *Cell death in development*. Cell. Vol. 96. pp. 245-254.
- Vázquez-Ortíz G., Piña-Sanchez P., Hidalgo A., Lazos, M., Moreno, J., Alvarado, I., Cruz, F., Hernández, D., Pérez-Plascencia C., Salcedo, M. (2005). *Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados*. Rev. Invest. Clin. Vol. 57. pp. 434-441.
- Wang, Y., Cheung, Y., Yang, Z., Chiu, J., Che, C., He, Q. (2006). *Proteomic approach to study the cytotoxicity of dioscin (saponin)*. Proteomics. Vol. 6. pp. 2422-2432
- Xiao, X., Bai, P., Bui Nguyen, T. M., Xiao, J., Liu, S., Yang, G., Hu, L., Chen, X., Zhang, X., Liu, J., and Wang, H. (2009). The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol. Cancer Ther.* Vol. 8. pp. 1179.
- Zhang, S. P. (2007). Research progression chemical constituents and pharmacological effect of Genus Paris. *Strait Pharmaceutical Journal*. Vol. 19. pp.4-7
- Zhou, J., Sun, X., Stenzel, D. (1991). *Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of PV virion-like particles*. Virology. Vol. 185, Núm. 1. pp. 251-257.

Fuentes electrónicas de imágenes

- ❖ <http://www.acercaciencia.com/wp-content/uploads/2012/10/Ciclo-celular.png>
- ❖ <http://www.zervita.de/share/Handbooks/HPVHandbook1-1.pdf>
- ❖ <http://www.blogdefarmacia.com/cancer-de-cuello-uterino-y-vph>

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 1 N 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 ternera neonatal (STN), 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	L-triptofano	5
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1	L-prolina	2
KCL	4	L-tirosina	28.33
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	L-serina	3
NaCl	6000	L-valina	2
NaHCO ₃	2000	L-treonina	2
Na ₂ HPO ₄	8	VITAMINAS	mg/L
AMINOÁCIDOS	mg/L	Biotina	0.200
L-arginina.HCL	2	pantotenato de calcio	0.250
L-asparigina.H ₂ O	5	cloruro de colina	3
L-ácido aspártico	2	ácido fólico	1
L-cistina	65.20	Inositol	3
L-ácidoglutâmico	2	nicotinamida	1
L-glutamina	3	ácido-p-aminobenzóico	1
Glicina	1	piridoxina.HCL	1
L-histidina.HCL.H ₂ O	1	Riboflavin	0.200
Hidroxiprolina	2	tiamina.HCL	1
L-isoleucina	5	vitaminaB12	0.005
L-leucina	5	OTROS COMPONENTES	mg/L
L-lisina.HCL	4	Glucose	2
L-metionina	1	Glutationa	1
L-fenilalanina	1	rojo de fenol	5

Desactivación del suero

Tanto el SFB (suero fetal bovino; Hyclone, E.U.A.) como el STN (suero de ternera neonatal; 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 HCl 1 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Esta 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 almacena a 4 °C.

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes (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- acetico (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.

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.