



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO N° 2 DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ) LAB 2, P.B.

“Actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de
muerte celular de la saponina Hecogenina-3-glu en
líneas celulares de cáncer cérvicouterino”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

CORTÉS RAMIREZ MICHELL PAULINA

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, DF

ABRIL, 2016



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.

“Hay dos formas de ver la vida: Una es creer que no existen los milagros, la otra es creer que todo es un milagro ” (Albert Einstein).

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas” (Marie Curie).

“No es la más fuerte de las especies la que sobrevive, tampoco es la más inteligente la que sobrevive. Es aquella que se adapta más al cambio” (Charles Darwin).

“Una vez que hayas probado el vuelo siempre caminarás por la tierra con la vista mirando al cielo por que ya has estado allí, y allí siempre desearas volver” (Da Vinci).

Dedicatorias.

*Agradezco a **Dios**, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por ser mi guía en cada momento, pero sobre todo por haberme permitido conocer a todas y cada una de las personas tan maravillosas que han formado parte de mi vida.*

*A mis **padres Martin y Lupita** por amarme y ser fiel ejemplo del amor con su matrimonio, por enseñarme que es bueno soñar, pero es mejor hacer mis sueños realidad, por siempre confiar en mí, aun cuando en momentos deje de hacerlo, y por todos los sacrificios realizados para ayudarme a cumplir mis metas, hoy esto es para ustedes, les agradezco por haberme dado esta forma tan particular de ver la vida.*

*A mis hermanitos **Alexis y Karlita**, porque aunque quizá nunca se los dije cada día me esforzaba por ser el mejor ejemplo para ustedes, para no defraudarlos, para protegerlos, gracias por soportar mis documentales (aun cuando preferían ver caricaturas) por ser mis cómplices en travesuras y risas, por cada momento vivido.*

*A ti **Fredy** por perseverar por mi atención aun sin saber si valdría la pena, por nuestra conexión única, por las ya muchas etapas que hemos vivido juntos (y por las que faltan), por lograr abrir mi casi indescifrable corazón, por ser un buen compañero de mi vida, por hacerme tan feliz y por haberme regalado ese lado de ti que a veces hasta tu desconoces, gracias por ser parte de mi historia, Te amo.*

*A ti mi pequeña **Sofía**, por ser mi motivación cada día, con tu sonrisa y tu alegría me haces recordar que los milagros existen, y que tu eres uno de ellos, por ser una fuente inagotable de inspiración, por hacerme sentir el amor más puro e incondicional, aun sin conocerte ya te amaba, te agradezco mi pequeña princesa porque a tu corta edad tu ya has sido mi gran maestra de la vida.*

*A mis pequeños **Eymmi y Diego** mis amados sobrinos, que han sido motor de fuerza para impulsarme a salir adelante, con el solo hecho de existir, gracias por sus sonrisas, su amor y ternura.*

*A mis amigas y compañeras de vida, por hacerme los momentos de estudio más divertidos en diferentes etapas de mi vida, puedo decir que es un gusto que aun pertenezcan a ella; **Marlene, Cindy, Karina, Adriana, Jackeline, Itzel, Ara y Yutz.***

Agradecimientos.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme ser parte de su laboratorio, por todas sus enseñanzas, su paciencia. Digna labor y merecido reconocimiento por fomentar la educación de generación en generación, llenándonos de conocimiento, pero sobre todo de experiencias inolvidables y buenos valores.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por compartir conmigo su amplio conocimiento, por las pláticas interesantes y por sus aportaciones para concluir esta tesis.

Al Dr. Hugo López Muños, por su entrega con mi aprendizaje, por regalarme el tiempo que a veces ni usted tenía, sin embargo cuando lo necesite ahí estaba, gracias por su paciencia y porque más allá de ser un excelente maestro es una excelente persona.

A la Dra. Lucila Álvarez barrera, por sus revisiones y aportaciones a mi trabajo de tesis, y por el tiempo dedicado en este trabajo.

A la M. en C. Yolanda Córdova Galviz, por el tiempo invertido y por las revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis.

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

Esta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto PAPIIT: IN 222114

ABREVIATURAS

Concentración Inhibitoria Media	IC50
Organización Mundial de la salud	OMS
Organización Panamericana de la Saluda	OPS
Virus del Papiloma Humano	VPH
Lactato Deshidrogenasa	LDH
Cáncer Cérvicouterino	CaCu
Instituto Nacional de Estadística y Geografía	INEGI
Suero de Ternera Neonatal	STN
Cinasas Dependientes de Ciclina	CDK
1Factor 1 que activa proteasas	Apaf-
Blanco de Rampamicina	TOR
Alto Riesgo	AR
Papanicolau	Pap

ÍNDICE	
RESUMEN	8
MARCO TEÓRICO	10
La célula	10
Proliferación celular	11
Ciclo celular	11
Muerte celular	14
Necrosis	15
Apoptosis	16
Autofagia	19
Cáncer	20
Cáncer Cérvicouterino (CaCu)	21
Síntomas y Diagnóstico	24
Tratamiento	25
Saponinas	27
Hecogeninas	29
JUSTIFICACIÓN	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
MÉTODO	35
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	58
APÉNDICE	65

RESUMEN

El cáncer cérvicouterino es un problema de salud prioritario por su alta magnitud y trascendencia. En el mundo, este padecimiento ocasiona la muerte prematura de aproximadamente 274,000 mujeres cada año, mientras que en México ocupa el segundo lugar en causas de muerte por tumores malignos.

El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas, como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia. No obstante su innegable éxito, éstas resultan ineficientes en pacientes terminales o metastásicos, además de inducir efectos colaterales que van desde una reacción inflamatoria severa, pasando por la pérdida de la función del órgano u órganos hasta la muerte. Este hecho ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, sobre todo, aquellas que están encausadas en la búsqueda de compuestos de origen natural o sintético con actividad antiproliferativa, que presenten por bajos o nulos niveles de necrosis, inductores de muerte celular programada y de acción selectiva. Al respecto, actualmente se ha descrito que las saponinas, como la diosgenina, ejercen acción antiproliferativa e inductora de apoptosis en diversas líneas tumorales. Sin embargo, otras saponinas como la hecogenina presenta una baja solubilidad en agua, haciendo difícil su evaluación *in vitro*, emergiendo la necesidad de sintetizar compuestos que presenten la misma aglicona con la adición de grupos funcionales o moléculas que incrementen su solubilidad en agua. Al respecto, en este trabajo, se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del derivado de la hecogenina, la hecogenina-3-glu, en las líneas celulares provenientes de cáncer cérvicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Los resultados obtenidos indican que la hecogenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de las células HeLa, CaSki y ViBo de manera dosis dependiente, con una IC50 de 78.5, 38.1 y 25.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

La nula o baja actividad de la enzima citoplasmática Lactato deshidrogenasa (LDH) determinada en los sobrenadantes provenientes de cultivos de células tumorales tratadas con dicho compuesto, establece que la Hecogenina-3-glu presenta una nula o baja actividad necrótica (21% en la línea celular CaSki, mientras que en las células HeLa y ViBo no se detectó actividad). Con respecto a la actividad apoptótica de la hecogenina-3-glu, el incremento en la concentración de la caspasa-3 activa en las células tratadas con hecogeninan-3-glu así como la observación de características morfológicas apoptóticas en los cultivos tumorales tratados con el compuesto, sugieren que la hecogenina-3-glu induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte apoptótica.

Por otro lado al determinar el efecto antiproliferativo y necrótico de las concentraciones de IC_{50} (Concentración inhibitoria) respectivas para las células tumorales en cultivos de células linfocíticas, se obtuvo que la hecogenina-3-glu no afecta el potencial proliferativo de estas células ni ejerce actividad necrótica sobre las mismas, estableciendo con ello, que este compuesto presenta actividad antiproliferativa y citotóxica de acción selectiva, por lo que la hecogenina-3-glu es un digno candidato para ser evaluado en modelos *in vivo* con la intención de probar su potencial como agente terapéutico contra el cáncer.

MARCO TEORICO.

La célula.

La célula es la unidad básica estructural y funcional de los seres vivos. (Alberts *et al*, 2006). La región de la célula que se extiende entre la membrana plasmática y el núcleo es el citoplasma (Figura 1), que está compuesto del citosol y los orgánulos (Lodish *et al*, 2005). El organelo mas grande de las células es el núcleo el cual contiene la información genética de las células. Además es el sitio de replicación de ADN y de la síntesis de ARN en proteínas que tienen lugar en los ribosomas (Cooper, 2010).

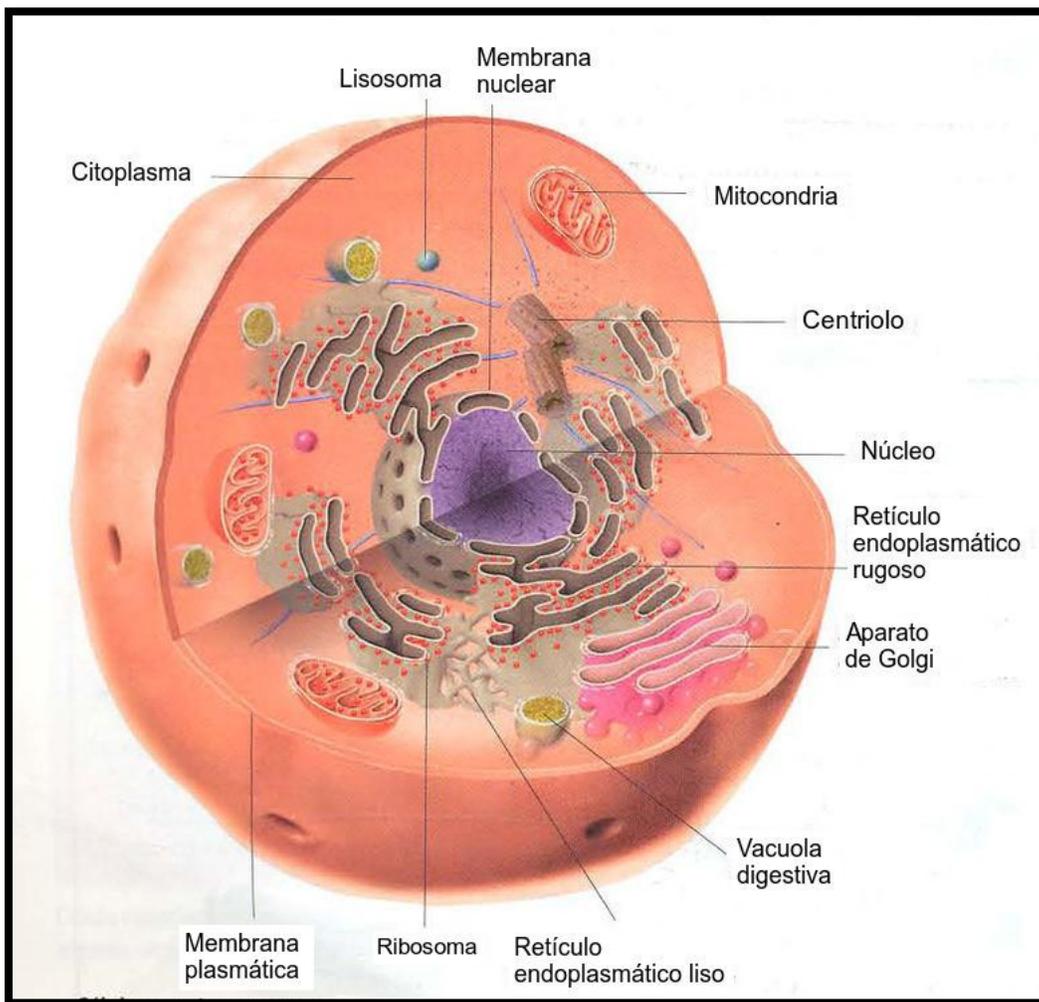


Figura1. Imagen de una célula animal donde se muestra su interior y cada uno de sus organelos (Tomada y modificada de http://elblogdecienciasde1b.blogspot.mx/2011/09/celulaanimal_30.html).

Las células obtienen y utilizan energía, llevan a cabo diferentes reacciones químicas, reaccionan a estímulos, realizan numerosas actividades mecánicas y poseen un programa genético y los medios para usarlo (Karp, 2006). Todas las células se reproducen mediante su división en dos, cada célula parental dando lugar a dos células hijas y a su vez pueden crecer y dividirse, dando lugar a dos células hijas al final del ciclo de división celular. Estas células hijas, a su vez pueden crecer y dividirse, dando lugar a una población celular a partir del crecimiento y la división de una única célula parental y de su progenie (Cooper, 2010). La división celular también es necesaria en el cuerpo para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada (Aguirre, 2000).

Proliferación celular.

La capacidad de autoreplicarse probablemente sea la característica fundamental de las células, al igual que podría decirse de los seres vivos. Todas las células se reproducen mediante su división en dos células hijas al final de cada ciclo de división celular. La división de todas las células ha de ser finalmente regulada y coordinada con el crecimiento celular y con la replicación de ADN, para asegurar la formación de una progenie de células que contengan sus genomas completos (Cooper, 2010).

Las células en proceso de proliferación pasan por lo que se conoce como ciclo celular, durante el cual las células replican todos sus componentes y se dividen en dos células hijas idénticas. En el ciclo celular, existen mecanismos de regulación como los receptores tirosina cinasas o cinasas ligadas a receptores y la cascada de las cinasas activadas por mitógenos, las cuales representan componentes importantes en la vía de señalización para células en proceso de proliferación. En todos los casos, las vías conducen en última instancia a la transcripción de los genes que controlan el ciclo celular (Rang *et al*, 2008).

Ciclo celular.

Las células al proliferar siguen una serie de etapas en las que se llevan a cabo los procesos necesarios para dar lugar a dos células hijas. Estas etapas deben completarse en orden, de un modo altamente regulado y constituyen lo que se denomina ciclo celular (Villaverde, 2006). Un ciclo celular típico se da en dos fases gigantes que son: la interfase que se divide en tres fases: G₁, S y G₂ y la mitosis que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis

(Alberts *et al*, 2006). En la interfase la primera fase es G1 donde la célula crece, la segunda es la fase S (síntesis), el ADN se replica y produce copias para las dos células hijas. En la fase G2, se sintetizan nuevas proteínas y la célula duplica su tamaño. Las células que están en la fase G1, antes de la replicación de ADN, pueden entrar en un estado de reposo denominado G0, característico de las células no proliferantes como las neuronas o en ausencia de nutrientes así como al predominar las señales antimitógenas (Vermeulen *et al*, 2003). Cuando recibe nuevas señales mitógenas, normalmente aportadas por moléculas de tipo proteico denominadas factores de crecimiento, la célula puede reanudar el ciclo celular y salir de G0, completando la fase G1, la replicación del ADN y la mitosis (Lozano *et al*, 2000). El paso a través del ciclo celular se regula por las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) (figura 2) que se activan al interactuar con unas pequeñas proteínas llamadas ciclinas, actuando en puntos específicos del ciclo, fosforilando proteínas clave y modulando sus actividades (Nelson *et al*, 2009).

Interfase

G1: El punto de control G1 controla la entrada en la fase S, asegurándose de que las células son lo suficientemente grandes para justificar una nueva ronda de síntesis de ADN, cualquier daño ocasionado al ADN será reparado, asegurando que las condiciones sean favorables para la división celular mitótica (Elledge, 1996). En esta fase la célula supervisa su entorno y su propio tamaño y cuando llega el momento, da el paso decisivo que la conducirá a la replicación del ADN (Alberts *et al*, 2006).

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

G2: La fase G2 es la preparación para la mitosis. Normalmente, esta fase se desencadena y completa siempre tras la fase S, lo que explica que la dotación cromosómica de las células somáticas sea diploide (Lozano *et al*, 2000). En esta fase ocurre un aumento en la síntesis de proteínas, conforme se realizan los pasos finales de la preparación de la célula para la división (Solomon *et al*, 2001). En esta fase la célula verifica que la replicación de ADN se ha completado, antes de dar inicio a la mitosis (Cooper, 2010).

Mitosis

La mitosis es un mecanismo de la división nuclear que ocurre en las células somáticas, siendo la base del aumento del tamaño durante el crecimiento, reposición de células dañadas y la reparación de los tejidos (Starr *et al*, 2008). Cuando comienza la mitosis en la profase, la envoltura nuclear se retrae hacia el retículo endoplasmático en la mayoría de las células de los eucariontes superiores y las membranas y el aparato de Golgi se fragmentan en vesículas. Durante el período de metafase de la mitosis en cada centrómero se forma un complejo multiproteico, el cinetocoro. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se asocian a continuación con microtúbulos que vienen de los polos opuestos del huso. Durante el período de anafase de la mitosis, las cromátidas hermanas se separan. Una vez que la separación de los cromosomas es completada, el huso mitótico se desarma y los cromosomas se descondensan durante la telofase. La envoltura nuclear se forma de nuevo alrededor de los cromosomas separados a medida que se descondensan. La división física del citoplasma, llamada citocinesis, produce dos células hijas (Lodish *et al*, 2005; Alberts *et al*, 2006). La alteración del ciclo celular puede causar que éste se detenga o que se active el mecanismo que induce a la célula a morir, por ejemplo, un daño irreparable en el ADN, induce a las células a una muerte por apoptosis.

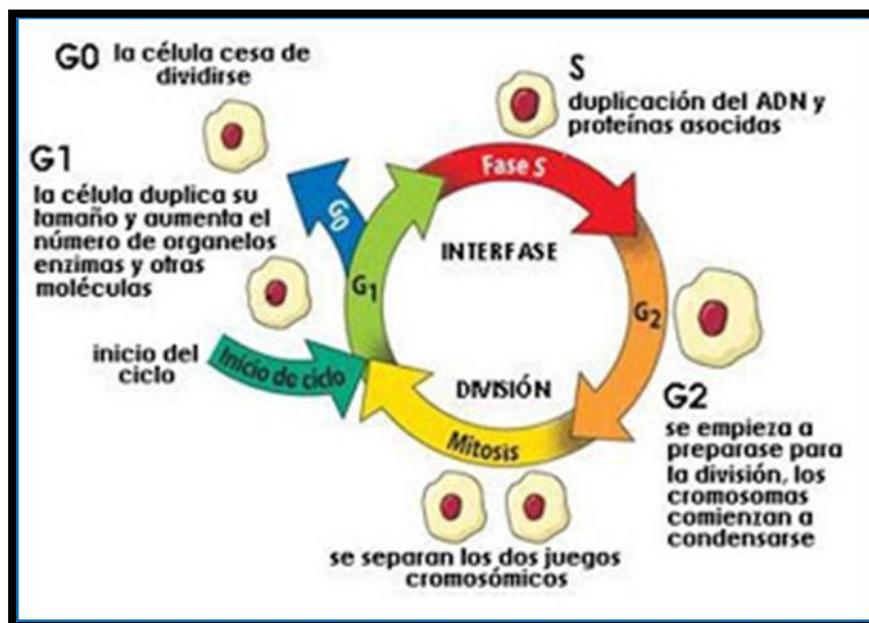


Figura 2. Fases del ciclo celular. (Tomada de <http://zeyramos.blogspot.mx/2013/06/el-ciclo-celular.htm?e=1>)

Muerte celular

Las células de los organismos pluricelulares son miembros de una comunidad sumamente organizada (Alberts *et al*, 2008). Por lo tanto, se ven reguladas, por los ritmos de proliferación como por los de muerte. Una anomalía en cualquiera de estos ritmos puede causar trastornos por acumulación celular (por ejemplo hiperplasia, cáncer, enfermedades autoinmunes) o trastornos por pérdida celular (por ejemplo; enfermedades degenerativas, isquemia, lesión, inmunodeficiencia). De tal manera, que el equilibrio entre proliferación celular y muerte debe mantenerse con precisión (Ross y Wojciech *et al*, 2007).

La muerte celular es un proceso fisiológico o patológico que conduce a la eliminación celular y que tiene una función esencial en la homeostasis de los tejidos y en los estados patológicos (Raff, 1998). Sin embargo existen diferentes tipos de muerte celular, los cuales presentan características específicas, donde los dos tipos más estudiados de muerte celular que se reconocen en los organismos, son la necrosis y la apoptosis, presentando diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia (Robbins *et al*, 1993).

La reproducibilidad en tiempo y espacio con la que se lleva a cabo el proceso de muerte celular durante el desarrollo, ha dado lugar a la denominación de “muerte celular programada”. Esta muerte natural de las células está diseñada de tal forma que el contenido intracelular no se vierta al exterior, como ocurre en la muerte accidental de algunas células durante condiciones nocivas extremas, causando daño al tejido adyacente y, en el organismo adulto, inflamación. (Jiménez, 2011).

La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003). Existen diferentes características comparativas, entre la necrosis y apoptosis (Figura 3). Entre los tipos de muerte celular, siendo los más importantes la necrosis y apoptosis, las cuales difieren fundamentalmente en su morfología, bioquímica y biología (Majno *et al*, 1995).

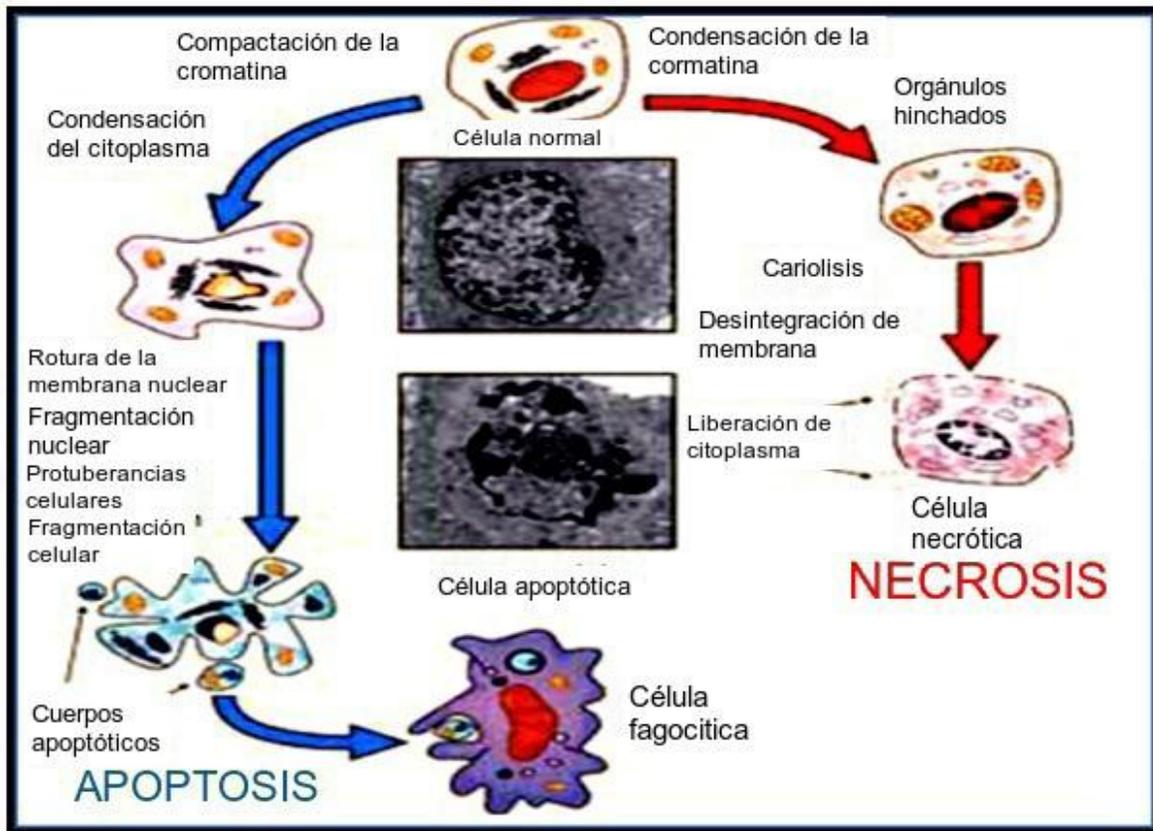


Figura 3. Fases de la muerte celular por apoptosis y necrosis (Tomado y modificado de Iracheta, 2007).

Necrosis

Es un mecanismo habitual de lesión de los tejidos y órganos en respuesta a agentes físicos, químicos o biológicos. Un dato característico de la necrosis es la afectación de células que están en contigüidad (Arellano, 2013). La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por un aumento en el volumen celular (oncosis), hinchazón de orgánulos, la rotura de la membrana plasmática y la subsiguiente pérdida o salida del contenido citoplasmático al espacio extracelular induciendo una respuesta inflamatoria que daña a las células vecinas (Karp, 2006).

La necrosis tiene lugar durante un daño provocado por hipoxia severa, hipertermia, infección por virus líticos, exposición a toxinas y agentes químicos (Socarrás, 2001).

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

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

Apoptosis

Se considera a la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte (inherente al desarrollo celular), que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas, o por estimulaciones exógenas. Estas pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas, dando como resultado la activación de un programa genético (Taylor *et al*, 2008) que conduce generalmente a la condensación del núcleo (en su interior los cromosomas están fragmentados y su ADN cortado en fracciones de tamaño que son múltiplos perfectos entre ellas para formar vesículas), estas vesículas están rodeados de citoplasma cuya membrana nunca se rompe aunque se modifica estructuralmente. Este citoplasma contiene los organelos desestructurados de la célula inicial (Roseto, 1999).

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

Podríamos decir entonces, que una célula que sufre muerte celular programada se atomiza en varios cuerpos apoptóticos, compuestos de citoplasma con su membrana modificada pero íntegra, contienen a las vesículas en su interior. Esos cuerpos apoptóticos atraen a los macrófagos (por las moléculas características que aparecen en las membranas de células apoptóticas) que los fagocitan sin

dejar rastros ni producir inflamación. Nunca una célula apoptótica libera moléculas de su interior porque su membrana no se rompe (Roseto, 1999).

Existen diferentes mecanismos de control de muerte por apoptosis (Figura 4) como son la vía intrínseca (activación de vía mitocondrial por daño al citosol o núcleo) y extrínseca (cuando los receptores de muerte son reconocidos por su ligando específico, o en su defecto se presenta una supresión de factores de crecimiento u hormonales).

Vía extrínseca

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

Vía intrínseca

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

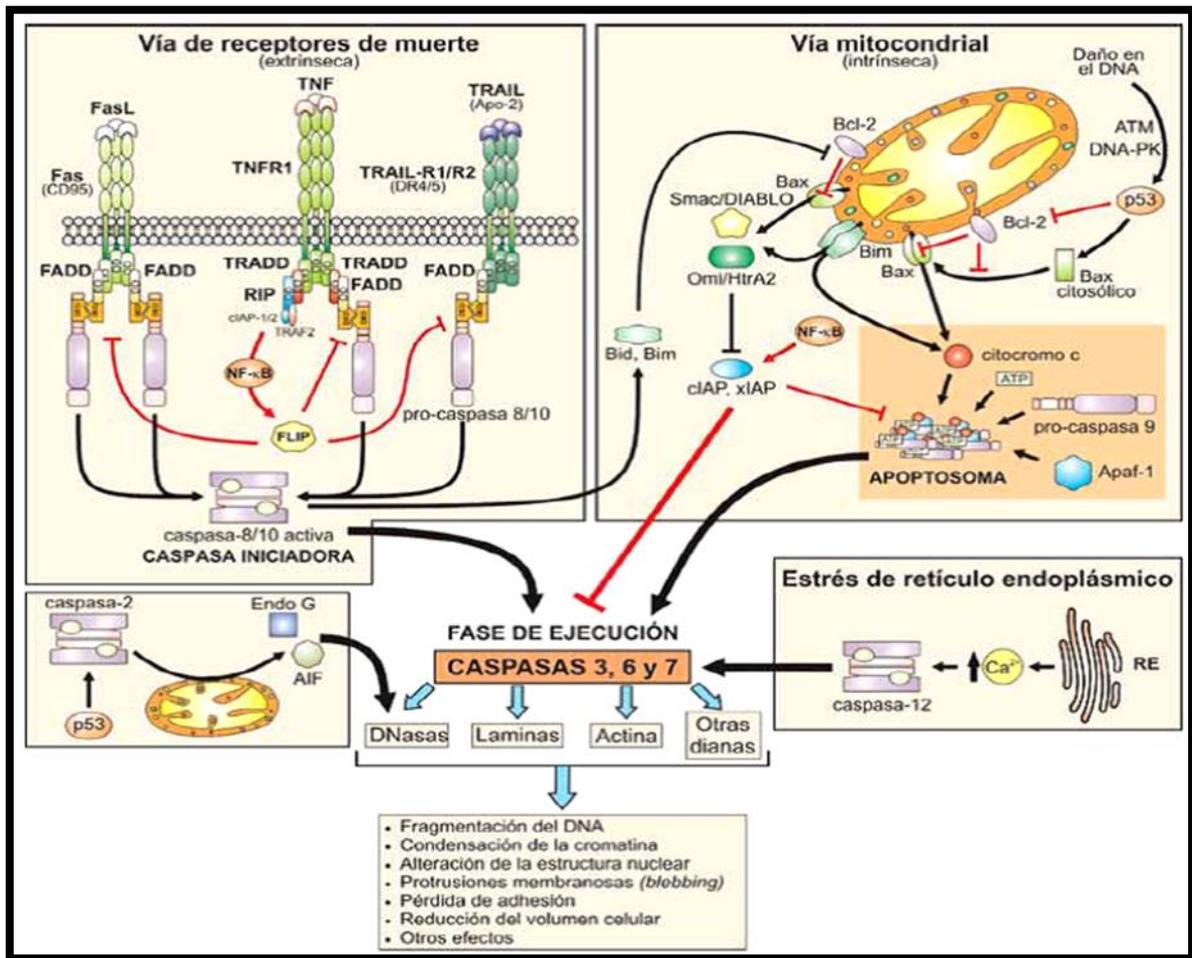


Figura 4. Rutas de muerte por apoptosis, se aprecia la ruta intrínseca y extrínseca, (Iracheta, 2007).

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

Existe una familia de diversas proteínas que actúan regulando el proceso de apoptosis en seres humanos. Miembros de la familia Bcl-2 contienen distintos dominios estructurales como BH1, BH2, BH3 y BH4 que corresponden a segmentos helicoidales, unos actúan como antiapoptóticos como Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 y otros funcionan como proapoptóticos los cuales son Bax, Bad, Bak, Blk y Bid (Schinoni *et al*, 2006).

El mecanismo central de la maquinaria de muerte en cualquier célula está constituido por una familia de proteasas, a las que se han denominado caspasas (Alnemri *et al*, 1996), independientemente de la naturaleza del estímulo inductor de muerte, el proceso siempre resulta en la activación de las caspasas que conduce a la fragmentación del material genético de forma rápida y controlada, sin causar daños en el entorno celular.

Caspasas.

Son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis (Elinos *et al*, 2003).

Autofagia.

Autofagia deriva del griego comer (fagia) uno mismo (auto), o sea autodigestión. Este es un proceso altamente conservado en la evolución, que ocurre en virtualmente todas las células eucariotas, desde las levaduras a los mamíferos, como parte de su desarrollo normal. Es un proceso en el cual el citoplasma y organelos son engullidos en vesículas con membrana celular duplicada, liberando su contenido dentro de lisosomas, para su degradación y reciclaje de macromoléculas. Así como el recambio proteico esta mediada por ubiquitinación y degradación por el proteosoma, el recambio de grandes proteínas y organelos, es atribuido parcialmente a la autofagia

La autofagia sirve como respuesta al estrés producido por la falta de alimentos y es uno de sus principales roles en los organismos unicelulares. A nivel de membrana, existen moléculas que actúan como sensores del medio extracelular, activando vías regulatorias intracelulares. Uno de estos sensores es la proteína TOR (Blanco de rapamicina), el cual inhibe la Autofagia en un medio rico en nutrientes.

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la autofagia y procesos similares se ha dividido en 7 pasos secuenciales:

- 1.- Inducción
- 2.- Selección carga y embalaje
- 3.- Nucleación y formación de la vesícula
- 4.- Expansión de la vesícula y maduración
- 5.- Direccionamiento
- 6.- Contacto y fusión de la vesícula con el lisosoma
- 7.- Quiebre de la vesícula intraluminal con formación del cuerpo autofágico y reciclaje de las macromoléculas constituyentes (Toro *et al*, 2006).

Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja, que surge ante las alteraciones genéticas que interfieren con las funciones celulares encargadas de regular la proliferación, apoptosis y envejecimiento (Grillo *et al*, 2008). Se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas (alteración en p53) y epigenéticas (metilación del ADN, acetilación de histonas y metilación de histonas), que permiten a las células sobrevivir, replicarse y bloquear mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y ciclo celular (Meza *et al*, 2006).

El cáncer se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de cien tipos distintos de cáncer que pueden diferir sustancialmente en su comportamiento y respuesta al tratamiento. La mayoría de los cánceres se incluyen en uno de tres tipos principales: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfomas (Cooper, 2010).

Carcinoma: Son los más comunes de cáncer. Se forman en células epiteliales (con frecuencia tienen forma como de columna), las cuales son las células de piel o tejidos que revisten los órganos internos.

Sarcoma: Son cánceres que se forman en hueso y tejidos blandos, incluso músculo y tejido adiposo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y en tejido fibroso (tendones y ligamentos).

Leucemia: Comienza en los tejidos que forman la sangre en médula ósea y desplazan a los glóbulos normales de la sangre.

Linfoma y mieloma: Empiezan en células del sistema inmunitario (Linfocitos T y B y células plasmáticas).

Sistema nervioso central: Hay diferentes tipos de tumores de cerebro y médula espinal. (Instituto Nacional del Cáncer EE.UU)

En general el cáncer se caracteriza por el conjunto de mutaciones que conducen a la proliferación celular descontrolada, estas mutaciones aportan a las células los atributos que las hacen ser consideradas cancerígenas, y en seguida se muestran en orden jerárquico.

1. Autosuficiencia de señales de crecimiento.
2. Insensibilidad a las señales anticrecimiento.
3. Potencial replicativo sin límite.
4. Desregula negativamente la apoptosis.
5. Transformación del metabolismo celular.
6. Evasión del sistema inmune.
7. Modificación de los mecanismos de adhesión.
8. Angiogénesis sostenida.
9. Invasión del tejido y metástasis.

(Wayne *et al*, 2007; Hsu and Sabatini, 2008; Nakamura *et al*,2004; Cress and Nagle, 2006).

A diferencia de las células normales características de los organismos multicelulares, comprometidas a colaborar, a coordinar su comportamiento y a dejar que las células reproductoras sean las que mantengan la supervivencia de la especie, por estar ellas mismas destinadas a morir, las células cancerosas se comportan egoístamente al ignorar estas reglas, proliferar de manera continua, prosperar a expensas de sus células vecinas y terminar destruyendo la sociedad entera de células que constituyen al individuo que padece de cáncer (Cortinas,2006).

Cáncer Cérvicouterino.

El cáncer cérvicouterino es un tipo de cáncer frecuente en mujeres, ya que ocupa el segundo sitio en cáncer más frecuente en mujeres de las regiones menos desarrolladas, y en 2012 aproximadamente 270 000 mujeres murieron. El CaCu es una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. Por lo general es un cáncer que crece lentamente, que puede no tener síntomas. La principal causa de cáncer cérvicouterino es casi

siempre por infección del Virus del Papiloma Humano (VPH). Existen dos tipos de PVH (16 Y 18) son los causantes del 70% de los CaCu y de las lesiones precancerosas del cuello uterino (OMS, 2012). Se sabe que existen diferentes factores que pueden causar este tipo de cáncer a continuación se mencionan algunos factores.

Factores de riesgo del Cáncer Cérvicouterino:

- Inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años.
- Infección por VPH.
- Mujeres de 25 a 64 años.
- Múltiples parejas sexuales (del hombre y la mujer).
- Antecedentes de haber padecido enfermedades de transmisión sexual.
- Tabaquismo.
- Desnutrición.
- Deficiencia de antioxidantes.
- Pacientes con inmunodeficiencias.
- Nunca haberse practicado un estudio citológico.

La causa subyacente primaria del cáncer cérvicouterino es la infección por una o más sepas oncógenas del VPH, un virus que se transmite por vía sexual. La relación entre cáncer cérvicouterino y Virus del Papiloma Humano, fue propuesta a principios de los 80's por el doctor Harald zur Hausen y continua siendo hoy eclorada por diversos estudios (Lopez y Lizano, 2006).

Se ha identificado al virus del papiloma humano (VPH) como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad; no obstante CaCu invasor se asocia con la presencia de VPH en un 99.7% de los casos. Existen 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo (AR), por encontrarse asociadas al CaCu en más de 95% de los casos. Por otra parte, los de tipo 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación con CaCu denominándose, por tanto, de bajo riesgo (Alonso, 2005). El virus infecta las células basales, parabasales o de reserva, las cuales se pueden dividir y diferenciar en epitelio escamoso, glandular o neuroendocrino; en

cuanto a las células con diferenciación escamosa, su maduración se programa y ordena a través del engrosamiento del epitelio (Figura 5), tanto morfológica como molecularmente; por ello si el VPH infecta dichas células pueden ocurrir diferentes secuencias de eventos (De Ruiz y Lazcano, 2005)

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

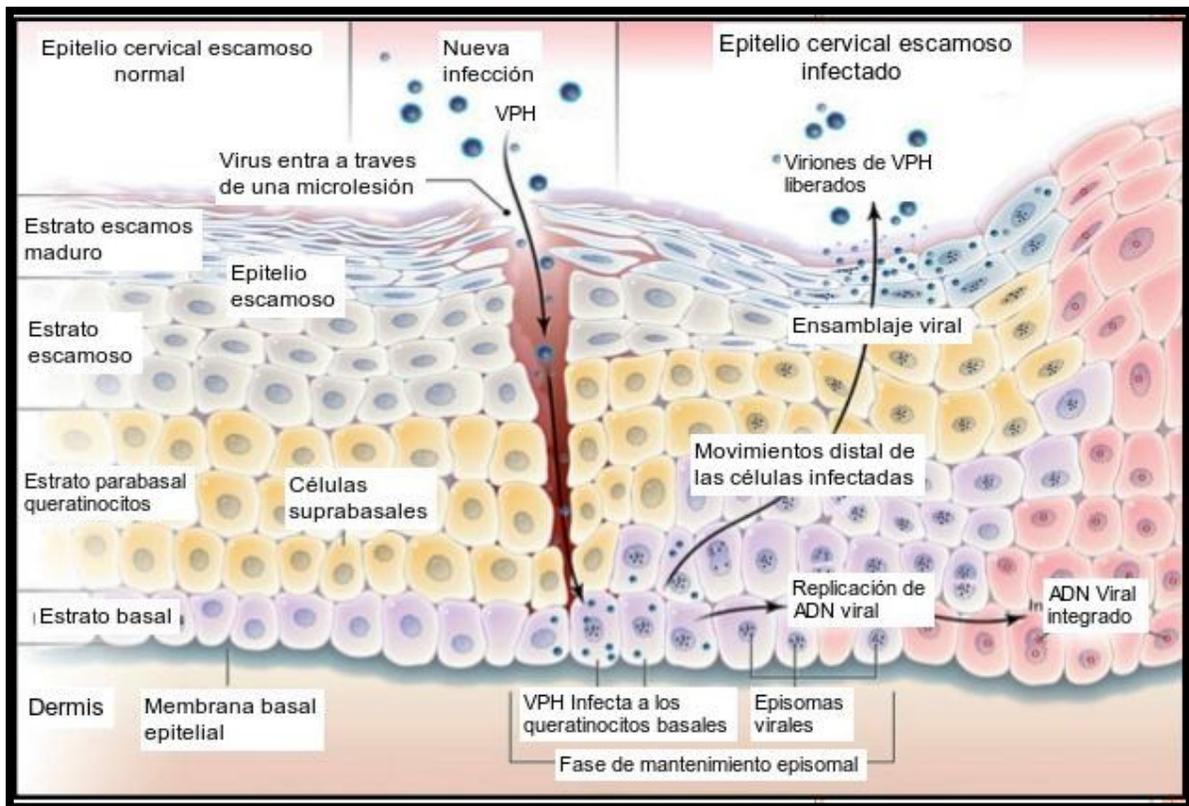


Figura 5. Proceso viral en el epitelio estratificado. (Tomado y modificado de: <http://es.slideshare.net/franciscoleonreyes/pvh-leon-reyes>).

Síntomas

Los síntomas del cáncer cervical por lo general no aparecen hasta que células anormales se vuelven cancerosas e invaden tejido cercano (Hazzard, 2005). Cuando esto sucede, el síntoma más común es el sangrado anormal, que puede incluir:

- Sangrado entre periodos menstruales regulares.
- Sangrado después de las relaciones sexuales, duchas vaginales, o un examen pélvico (más común).
- Sangrado menstrual que dura más tiempo y es más abundante de lo normal.
- Sangrado después de la menopausia.
- Secreción vaginal incrementada que no es sangre

Diagnóstico.

Los exámenes para diagnosticar cáncer cérvicouterino incluyen:

Examen de Papanicolaou: detecta cáncer cervical así como tejidos precancerosos en el cérvix, llamada displasia cervical. El médico recolecta una muestra de células del cérvix para su examinación. Es importante que una mujer sexualmente activa reciba un examen anual de Papanicolaou, y que dé seguimiento a cualquier resultado anormal. Nuevos estudios indican que las mujeres mayores de 30 años de edad que han tenido tres o más exámenes anuales normales de Papanicolaou pueden prolongar con seguridad la revisión de Papanicolaou a una vez cada tres años. **Examen de VPH:** se puede examinar el mismo material de la prueba de Papanicolaou para detectar virus de VPH (subtipos de alto riesgo).

Colposcopia: examinación de la vagina y cérvix usando un instrumento iluminado con aumento llamado colposcopio. La colposcopia indica si un examen de Papanicolaou sugiere displasia cervical (precáncer) o cáncer.

Biopsias: se realizan en cualquier área sospechosa y se examinan para detectar la presencia de células cancerígenas (Mount, 2005).

Tratamiento.

Existen tratamientos para todas las pacientes con cáncer cérvicouterino. Se emplean tres clases de tratamiento:

- Cirugía (extracción del cáncer en una operación).
- Radioterapia (uso de rayos X de alta energía u otros rayos de alta energía para eliminar las células cancerosas).
- Quimioterapia (uso de medicamentos para eliminar las células cancerosas).

El médico puede emplear uno de varios tipos de cirugía disponibles para el carcinoma in situ con el fin de destruir el tejido canceroso:

- La criocirugía consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.
- La cirugía con rayo láser consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.

La **histerectomía** es una operación en la cual se extrae el útero y el cuello uterino además del cáncer. Si el útero se extrae a través de la vagina, la operación se llama histerectomía vaginal. Si se extrae mediante un corte (incisión) en el abdomen, la operación se llama histerectomía abdominal total.

La **radioterapia** consiste en el uso de rayos X de alta energía para eliminar células cancerosas y reducir tumores. La radiación puede provenir de una máquina fuera del cuerpo (radioterapia externa) o se puede derivar de materiales que producen radiación (radioisótopos) a través de tubos plásticos delgados que se aplican al área donde se encuentran las células cancerosas (radiación interna). La radioterapia puede emplearse sola o además de cirugía.

La **quimioterapia** consiste en el uso de medicamentos para eliminar células cancerosas. Puede tomarse en forma de píldoras o se puede depositar en el cuerpo por medio de una aguja introducida en la vena. La quimioterapia se considera un tratamiento sistémico ya que el medicamento es introducido al

torrente sanguíneo, viaja a través del cuerpo y puede eliminar células cancerosas fuera del cuello uterino.

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

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

Las **vacunas** entre las nuevas opciones destacan el uso de vacunas preventivas a VPH, las cuales están basadas en la producción de las partículas tipo virus (virus-likeparticles, VPLs). 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 efectivas en la prevención de infecciones por los tipos 16 y 18 de VPH, los cuales causa 90% de las verrugas genitales (Koutsky, *et al.*, 2002)

Debido a que las terapias usadas contra el cáncer no resultan suficientemente satisfactorias, se han desarrollado diversas líneas de investigación encaminadas a buscar alternativas terapéuticas.

Las terapias dirigidas contra el cáncer son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al actuar sobre moléculas específicas, denominadas blancos moleculares. Incluyen los fármacos que interfieren con la transducción de señales de crecimiento celular o de formación de vasos sanguíneos de tumores, que promueven la muerte específica de células cancerosas, que estimulan el sistema inmunitario para que destruya células cancerosas y para que dichas células inmunitarias entreguen sustancias tóxicas a las células cancerosas.

Un punto clave en el que recientemente se ha concentrado a la investigación de nuevos agentes terapéuticos del cáncer, es el papel de la inducción de la apoptosis en células tumorales y más recientemente en la acción selectiva (NCI, 2010). A este respecto los compuestos de origen vegetal han atraído fuertemente la atención, por ello resulta de gran valor su investigación (Lynn y Link, 2000; Domínguez *et al*, 2010).

Saponinas Esteroidales.

Las saponinas esteroidales se encuentran por lo general en familias de clase monocotiledonea, como son *Liliaceae* (*Agavaceae*), *Discoreaceae* y *Amarillydiaceae*. En el género *Agave* se han identificado varias saponinas como: hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsapogenina, texogenina, esmilagenina, gotogenina y clorogenina (Hernández *et al*, 2005). La familia *Agavaceae* es uno de los grupos vegetales más representativos de México. Su importancia va desde su valoración ecológica y económica, hasta su aspecto cultural (Dominguez *et al*, 2008). La familia *Agavaceae* comprende 18 géneros y 600 especies, propias de zonas tropicales y subtropicales perfectamente adaptadas para sobrevivir en condiciones semidesérticas (Martínez y Pacheco, 2006).

Las saponinas son metabolitos secundarios de naturaleza glicosídica ampliamente distribuida en las plantas superiores y presente también en algunos invertebrados marinos. El nombre saponina proviene de la palabra en latín *sapo* y hace alusión a las propiedades detergentes de esta familia de compuestos y a su capacidad para formar espumas estables al agitar sus disoluciones acuosas. El comportamiento en agua se explica por su naturaleza anfifílica, resultado de la combinación de elementos hidrofóbicos e hidrofílicos en la misma estructura. Al aglicón o porción no sacarídica de la saponina se le llama *genina*. Dependiendo del tipo de genina presente, las saponinas se dividen en tres clases

fundamentales: glicósidos, esteroidales, triterpénicos o alcaloides-esteroidales (Pérez, 2012).

Desde hace siglos a las saponinas se les ha dado diversas aplicaciones, desde la limpieza, la pesca y principalmente se les ha dado uso medicinal. Actualmente se les relaciona a un amplio rango de actividades biológicas tales como su acción antimicótica (Zamilpa, *et al.* 2002), antiviral (Aquino *et al.*, 1991), anticancerígena (Sung *et al.*, 1995), antiinflamatoria (Da Silva *et al.*, 2002) y molusquicida (Abdel *et al.*, 1999; El-Sayed, 1998).

Las saponinas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicona (Figura 6). La región aglicona puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal, por lo que las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas o saponinas esteroidales respectivamente (Orestes, 2008). Generalmente los sacáridos se enlazan en el C-3 de la genina (Pérez, 2012).

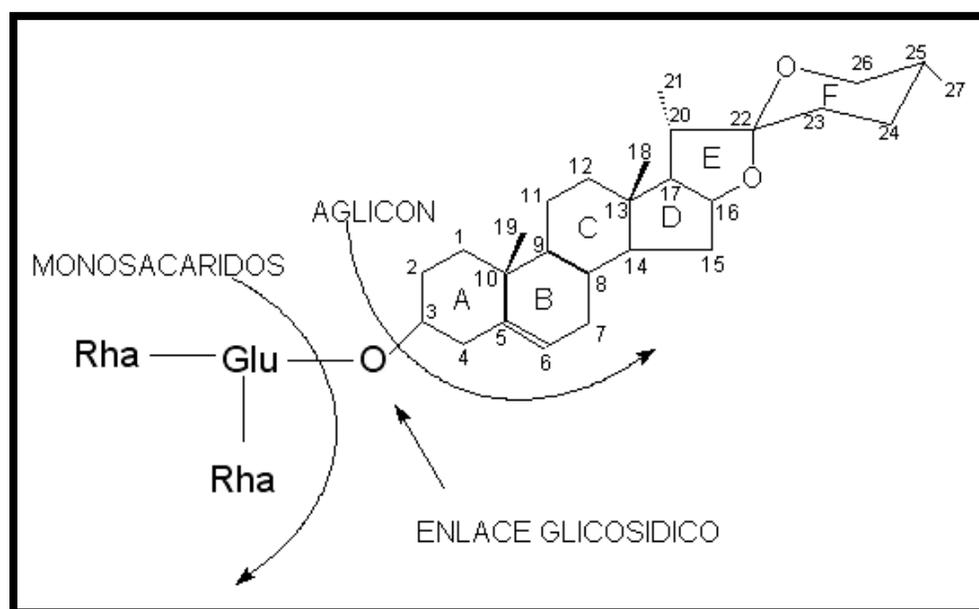


Figura 6. Ejemplo de saponina esteroidal. (Tomado de: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEAAFIAIIZAmfjzJKp.php>).

La porción de carbohidrato está formada por oligosacáridos de cadenas cortas, lineales o ramificadas. Entre los monosacáridos que se presentan con más frecuencia están la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-xilosa y ácido D-glucurónico. A la complejidad estructural de esta familia de compuestos contribuyen, por una parte, la presencia de diferentes sustituyentes, grupos funcionales y variabilidad en la cadena lateral del aglicón y por otra; la naturaleza, número y secuencia de los monosacáridos que forman la porción oligosacáridica. Esto justifica la diversidad de propiedades fisiológicas, inmunológicas y farmacológicas de estas sustancias (Francis, 2002).

Hecogenina.

La hecogenina es una saponina que se extrae del *Agave sisalana*; se empleó fuertemente en los años 50's debido a que a partir de ella se sintetizaron corticosteroides (Kongkathio *et al*, 2006). En algunos estudios se ha relacionado la actividad de estas saponinas con actividades biológicas tales como: antibacteriana (Dong *et al*, 2006), antifúngica (Zhang *et al*, 2006), antiinflamatoria (Quilez *et al*, 2004), actividad inhibidora en células HeLa (Mimaki *et al*, 1996; Yokosuka *et al*, 2009), reducción selectiva de la viabilidad ante fibroblastos de ratón con p53 humana mutante transfectada (Itabashi *et al*, 2000) y aumento en la supervivencia celular de miocitos ventriculares de neonato (Sun *et al*, 2008). Como saponina (sin azúcares) la hecogenina ha sido pobremente estudiada, ya que su baja solubilidad en agua limita su estudio *in vitro*. No obstante ha sido reportada con actividad antioxidante en neutrófilos (Ma *et al*, 2001), actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células de artritis reumatoide (Liagre *et al*, 2007).

Por lo anteriormente dicho, grupos de investigación han decidido tratar de encontrar la relación entre la estructura molecular y la actividad antitumoral, para ello han desarrollado moléculas análogas y derivados, modificando de forma puntual la estructura molecular y evaluando su efecto biológico, se ha visto que

algunas modificaciones han permitido incluso mejorar las propiedades fisicoquímicas de ésta.

Algunas investigaciones han permitido entender por ejemplo que las modificaciones en los anillos de carbono A, D, E y F del esteroide son significativos en el aumento a la potencialidad del compuesto derivado, en comparación al de origen (Camoutsis, *et al.* 2005; Boonananwong, *et al.* 2008).

Se dice que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de los glicósidos esteroidales; por ejemplo incrementando la solubilidad de estos en medio fisiológico, ayudando en la permeabilidad celular y al tiempo de acción, y dirigiendo a la molécula al sitio activo (Yamasaki *et al.*, 1987) En general, reportes indican que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si encuentra glicosilado y que al eliminar los azúcares de la molécula, esta disminuye su actividad antitumoral. Al respecto, en el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico e inductor de muerte apoptótica de la saponina Hecognina-3-glu (Figura 7), el cual es un derivado de la hecogenina que se destaca por presentar una glucosa en el carbono tres de la aglicona.

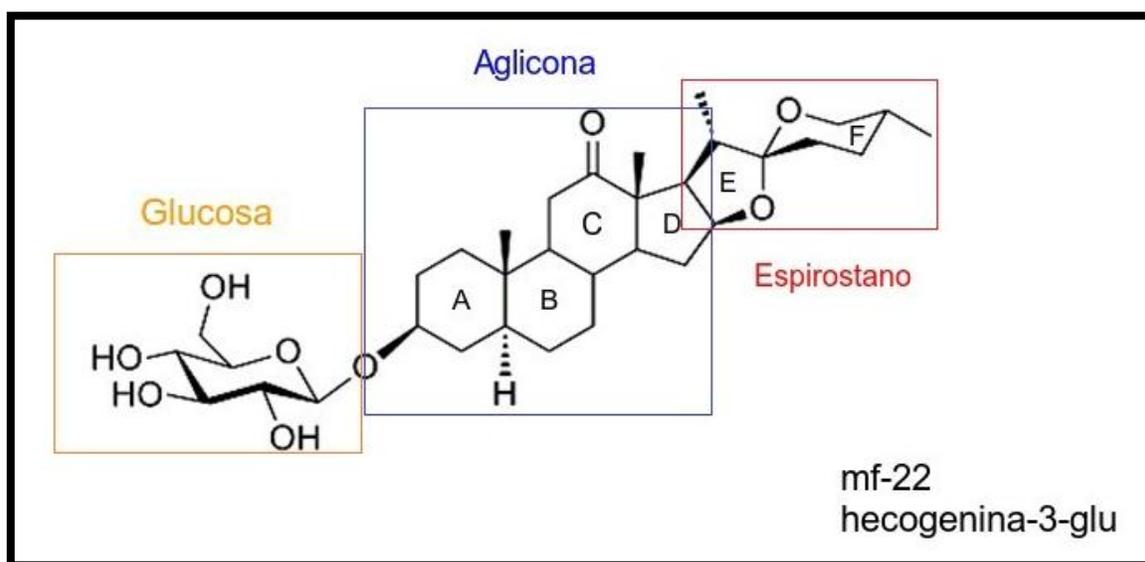


Figura 7. Estructura de la hecogenina-3-glu. Tomada y modificada de (Pérez, 2012).

JUSTIFICACIÓN.

En nuestro país el cáncer cérvicouterino (CaCu) es una de las enfermedades con mayor incidencia en mujeres entre los 35 y 65 años de edad y representa la segunda causa de mortalidad debida a cáncer (INEGI, 2010) Se asocia con la presencia de VPH en un 99.7% de los casos (Doorbar, 2008), donde el tipo 16 y 18 se consideran de mayor incidencia y por tanto de alto riesgo (Lewis,2004). Existe un creciente número de resultados en investigación básica que emplean compuestos de origen vegetal que están orientados hacia la prevención y tratamiento del cáncer, dentro de este grupo de compuestos encontramos a las saponinas esteroidales, a las cuales se les han encontrado efecto antitumoral, entre otros (Orestes. 2008; Mikami,1992; Fernández, 2010; Pérez, 2012) sin embargo se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el CaCu, por lo que es necesario generar información acerca de la actividad de las saponinas esteroides como agente terapéutico contra el cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se aplican terapias contra el cáncer que resultan ser efectivas cuando el tumor está en una fase temprana de desarrollo, sin embargo resultan ineficientes en estados avanzados de la enfermedad. Además, el efecto antitumoral de la mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento, están basados en su acción citotóxica, con nula o baja acción selectiva (afectan a todas las células en general), por lo que surgen la necesidad de generar nuevas alternativas terapéuticas. Por ello es importante valorar la actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de muerte celular de más compuestos con intención de encontrar mejores medicamentos terapéuticas contra el cáncer. Es por ello que el presente trabajo tiene como propósito evaluar si la Hecogenina-3-glu presenta actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica en líneas celulares de CaCu.

HIPÓTESIS.

Recientemente se ha demostrado que las saponinas como la Hecogenina, presentan propiedades farmacológicas tales como antifúngica, hipocolesterolemica, antidiabética, actividad antioxidante, anticancerígenas e inductoras de apoptosis. En especial, se ha reportado que la Hecogenina presenta actividad antiproliferativa en la línea de CaCu HeLa, entre otras y algunos estudios revelaron que la presencia de glicósidos en las saponinas favorecen la biodisponibilidad de las moléculas haciéndolas más eficientes, por lo que se espera que la Hecogenina-3-glu, presente actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, en células provenientes de CaCu.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del compuesto Hecogenina-3-glu en las líneas celulares provenientes de Cáncer Cérvicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Evaluar la actividad antiproliferativa de la hecogenina-3-glu expresada como la concentración requerida de la saponina para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}), en células de cáncer cérvicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

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

Valorar el efecto necrótico de la Hecogenina-3-glu en cultivos de células de cáncer cérvicouterino HeLa, CaSki y ViBo mediante la incorporación celular de Ioduro de Propidio y a través de la detección de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Determinar si la Hecogenina-3-glu induce muerte por apoptosis en cultivos de células de cáncer cérvicouterino HeLa, CaSki y ViBo mediante la observación de características morfológicas propias de la apoptosis, así como la formación de cuerpos apoptóticos, tomados en conjunto como dos indicadores de muerte apoptótica.

Evaluar si las concentraciones de IC_{50} de la Hecogenina-3-glu inducen la expresión de la Caspasa-3 activa en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo.

MÉTODO.

Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares provenientes de CaCU fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm de diámetro (PYREX USA) con medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), rojo fenol y suero de ternera neonata (STN) GIBCO, USA) al 5%, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO₂ y a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuair, USA). Para realizar las pruebas biológicas, las células fueron tomadas de cultivos a una densidad de máximo 70 %. (Morgan et al., 1993). Las líneas celulares de CaCU que se utilizaron en éste trabajo son: Hela, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2012). CaSki, células provenientes de carcinoma cérvicouterino, que fueron establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2012) y ViBo células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al*, 1992).

Preparación del stock de Hecogenina-3-glu.

5000µg de Hecogenin-3-glu (Sintetizada por la Dra. Maria Antornieta Fernández Herrera y el Dr. Jesús Sandoval Ramírez del laboratorio de Síntesis Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla) fueron solubilizados en 500µl de 2-Etoxietanol (vehículo) en un tubo cónico de plástico de 1000 µl. Posteriormente se prepararon 25 alícuotas de 200 µg/20 µl de 2-Etoxietanol y almacenados a -20°C hasta su uso.

Determinación de IC₅₀.

Para establecer la IC₅₀ (concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular) en las líneas tumorales provenientes de CaCU, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron sembradas (7,500 células/pozo) en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100µl de medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de STN, durante 24 horas. Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI-1640 al 5% de NCS con el compuesto

Hecogenina-3-glu, a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.5, 0.7 $\mu\text{g/ml}$. En el ensayo se utilizó como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 10 μl de 2-Etoxietanol. A las 24 horas de estímulo, fue evaluado el número celular por la técnica de cristal violeta la cual consiste en: retirar el RPMI-1640 de los pozos de la placa y posteriormente agregar una solución de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1 % durante 15 min. A continuación la solución de glutaraldehído fue retirada y la placa se dejó secar al aire. Una vez seca la caja se agregó el colorante cristal violeta al 0.1 % durante 20 min. Al término de éste tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar al aire. Por último, el colorante se solubilizó con una solución de ácido acético al 10 % en agitación durante 20 min. Finalmente la absorbancia fue determinada a 590 nm en un lector de placas (CHROMATE, USA). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007 y se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para poder determinar la concentración a la cual se disminuyó en un 50 % la población celular, para dar el valor de IC_{50} de las líneas tumorales de CaCU.

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

Fueron sembradas 5×10^4 células tumorales/pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 1ml de RPMI-1640 al 5 % de STN durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con la IC_{50} de Hecogenina-3-glu con medio de cultivo RPMI- 1640 al 5 % de STN, al control solamente se le cambió el medio de cultivo por medio fresco RPMI1640 a 5 % de STN, como vehículo se utilizó 2-Etoxietanol en una concentración de 10 $\mu\text{l/ml}$ de RPMI-1640 a 5 % de STN y se dejaron los tratamientos durante 24 h Una vez concluido el tiempo, las células se despegaron y se mantuvieron en medio de cultivo y el control fue permeado con etanol durante 20 min, posteriormente se añadieron 3 μl de una solución de yoduro de propidio (IP)(Sigma-Aldrich, USA) (200 mg/l) a los tratamientos y las células positivas al IP fueron determinadas por citometría de flujo (marca FACSAria II) previamente calibrado con células negativas al IP y los datos obtenidos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Fueron sembradas 5×10^4 células tumorales/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN. Al paso de las 24 h, células fueron tratadas con la IC_{50} de Hecogenina-3-glu 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. Brevemente el procedimiento consiste en: las células fueron despegadas y fijadas a las 24 horas de cultivo, con etanol al 70 % en agua destilada durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente después fue adicionado el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en conejo (SIGMA) 1:250 en PBS durante 24 h a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), mantenido en oscuridad durante 3 horas, se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Ensayo de necrosis por liberación de LDH en células tumorales y linfocitos

Para el ensayo de necrosis se sembraron 5×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de STN y fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO_2 , por 24 horas, posteriormente se les colocó la IC_{50} de la Hecogenina-3-glu en medio de cultivo fresco durante 24 h. A los controles se les realizó únicamente cambio de medio, y como vehículo se utilizó el 2-Etoxietanol a una concentración de 10 μ l/ml de RPMI-1640 a 5 % de STN. Una hora antes de cumplir con las 24 h, al control positivo se le realizó un segundo cambio de medio por medio fresco al 1% de tritón X-100, condición que se mantuvo por 1 h, posteriormente fue recuperado el medio de cultivo cumplidas las 24 h. a los distintos tratamientos y subsecuentemente fueron centrifugados a 14000 rpm (Becton Dickinson, USA) durante 10 minutos. Después fueron transferidos 40 μ l/pozo de sobrenadante de cada tratamiento a una placa de 96 pozos por separado, se añadieron 40 μ l de mezcla de reacción del kit (Cytotoxi 96 Non-Radio Cytotoxicity assay) a cada pozo y se incubaron durante 20 minutos, protegidos de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA (CHROMATE, USA) a 490 nm. Finalmente se determinó el porcentaje de citotoxicidad.

Evaluación del efecto de la Hecogenina-3-glu sobre la expresión de la caspasa-3 activa (DAPI)

Fueron sembradas 50 000 células procedentes de CaCu en cubreobjetos de 1 x 1 cm, por 24h. Al término de las 24h se procedió a tratar a las células con la IC₅₀ de la Hecogeninan-3-glu en medio de cultivo RPMI al 5% de SNT por 24 h, también se contempló un control sin estímulo y un control vehículo, y se realizó la detección de la caspasa-3 activa por inmunocitoquímica, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% (SIGMA ALDRICH, EUA) en PBS durante 15 minutos, al término del tiempo se procedió a lavar cuidadosamente 3 veces con PBS las muestra, posteriormente se permeó con Tritón X-100, (Calbiochem, EUA) durante 5 minutos, se lavaron nuevamente 3 veces la muestras con PBS, después se adicionó el anticuerpo primario (anticaspasa 3 activa CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:100 en PBS) durante un periodo de 2½ h en cámara húmeda; al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (Goat anti-Rabbit IgG, Fc Secondary Antibody, FITC conjugate, Thermo Scientific, EUA 1:200 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1½ h, posteriormente se lava la muestra 3 veces con PBS para después aplicar “DAPI” (4',6-Diamidina-2'-fanilindol dihidroclorido, Roche, EUA) durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a montar las muestras y sellar con resina de nitrocelulosa. Una vez realizadas las preparaciones, se procedió a tomar fotografías (65,02 x 52,02 cm) en un microscopio de fluorescencia a alta definición (59,055 pixeles/cm) (Nikon, Japón), para su posterior análisis.

Proliferación de linfocitos humanos con fitohemaglutinina y detección con Carboxifluoresceina (CSFE).

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 (PYREX, USA), con 5 ml de Histopaque(Sigma-Aldrich, USA), un total de 4 tubos fueron cubiertos y se centrifugaron (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 µl se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendidos en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue retirado y el paquete

celular fue resuspendido en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 1% 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 (PYREX, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se tomaron todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, fue retirado el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 ml, y fue determinado el número celular utilizando la cámara de Neubauer. Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ M por mililitro de solución/millón de células) y fueron incubados 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregaron en cada tubo cónico de plástico de 1.6ml, la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 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 células por mL de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 μ L/mL de fitohemaglutinina (Micro-Lab S.A., Méx.) y se incubaron durante 72 horas. Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, fue retirado el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm y fue retirado el sobrenadante, posteriormente se resuspendieron 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 FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Análisis estadísticos.

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

RESULTADOS

Efecto antiproliferativo (IC₅₀).

Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de la Hecogenina-3-glu, cultivos de las líneas tumorales provenientes de cáncer cérvicouterino (CaCu) CaSki, HeLa y ViBo, fueron tratados con diferentes concentraciones de Hecogenina-3-glu y la concentración requerida del compuesto para abatir en un 50 % la densidad celular (IC₅₀) fue calculada (Figura 8).

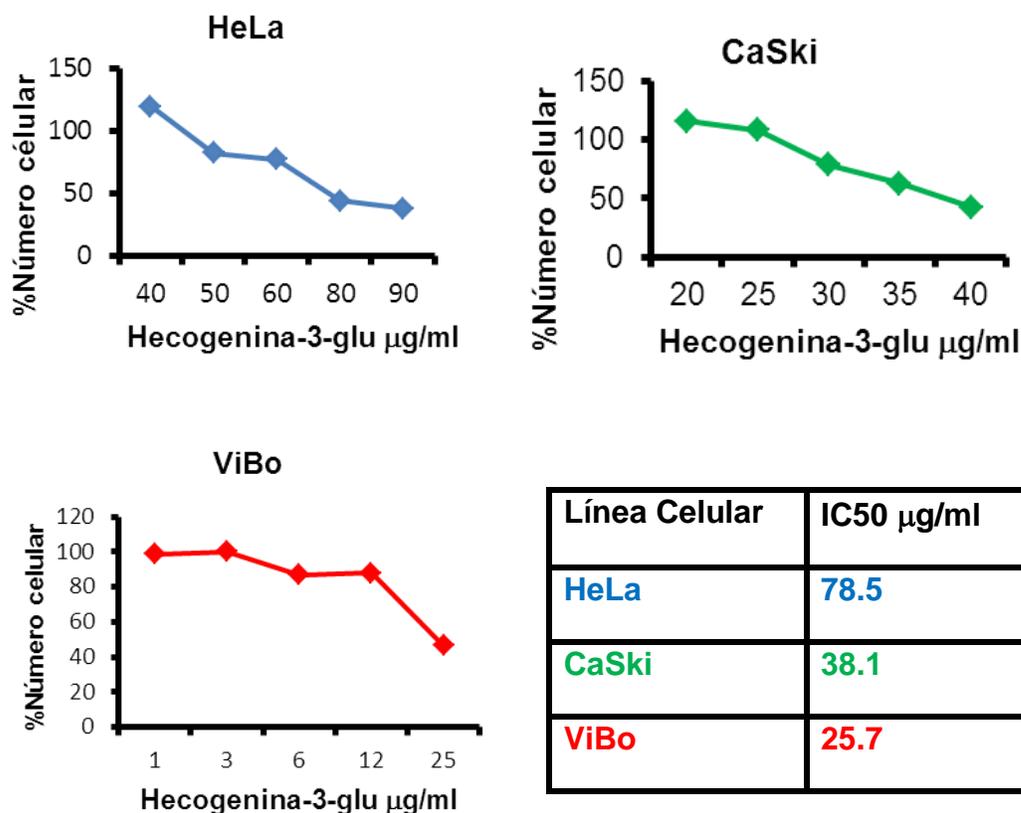


Figura 8. Efecto antiproliferativo de la Hecogenina-3-glu sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 horas para permitir su adherencia y posteriormente fueron estimuladas con diferentes concentraciones de Hecogenina-3-glu por 24 horas. La IC₅₀ fue calculada para cada una de las líneas celulares. Los gráficos representan el promedio de por lo menos tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos establecen que la Hecogenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, con una IC₅₀ de 78.5 µg/ml para las células HeLa, mientras que para las células CaSki y ViBo fueron de 38.1 y 25.7 µg/ml respectivamente.

Confirmación de IC₅₀ en las líneas celulares de CaCu.

Con la intención de confirmar las IC₅₀ calculadas, cultivos de las tres líneas celulares fueron tratadas con sus respectivas concentraciones de IC₅₀ y el número celular fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta (Figura 9).

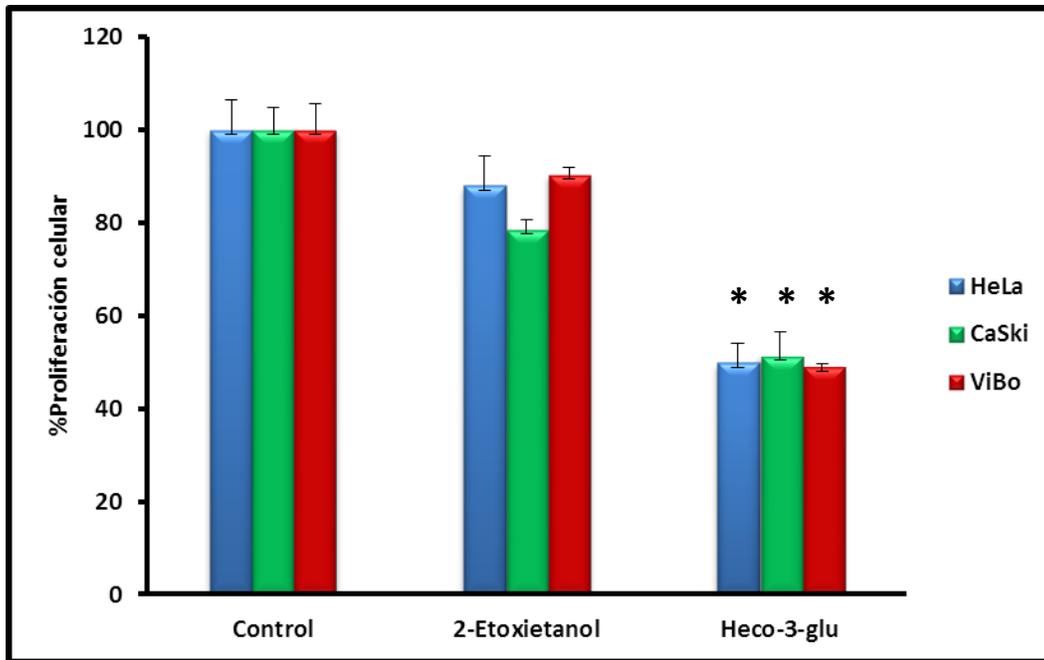


Figura 9. Efecto de la IC₅₀ de la Hecogenina-3-glu sobre las líneas de CaCu. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para su adherencia y tratadas con las diferentes concentraciones de IC₅₀ de Hecogeninan-3-glu durante 24 h. La proliferación celular fue evaluada a través de la técnica de cristal violeta. La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado.*p>0.05vs2-Etoxiol (ANDEVA seguida de una prueba T de student análisis de medios independientes).

Los resultados mostrados en la figura 5, confirman la actividad antiproliferativa de la Hecogenina-3-glu en las líneas tumorales de CaCu HeLa, CaSki y ViBo así como sus respectivas IC₅₀.

Efecto de la Hecogenina-3-glu en la morfología celular.

Con el propósito de establecer el efecto de la Hecogenina-3-glu en la morfología de las líneas HeLa, CaSki y ViBo, las células tumorales fueron tratadas con la Hecogenina-3-glu a la concentración de sus respectivas IC_{50} y posteriormente los cultivos celulares fueron observados y fotografiados en un microscopio invertido (Aus Jena SEDIVAL, Germany) (Figura 6).

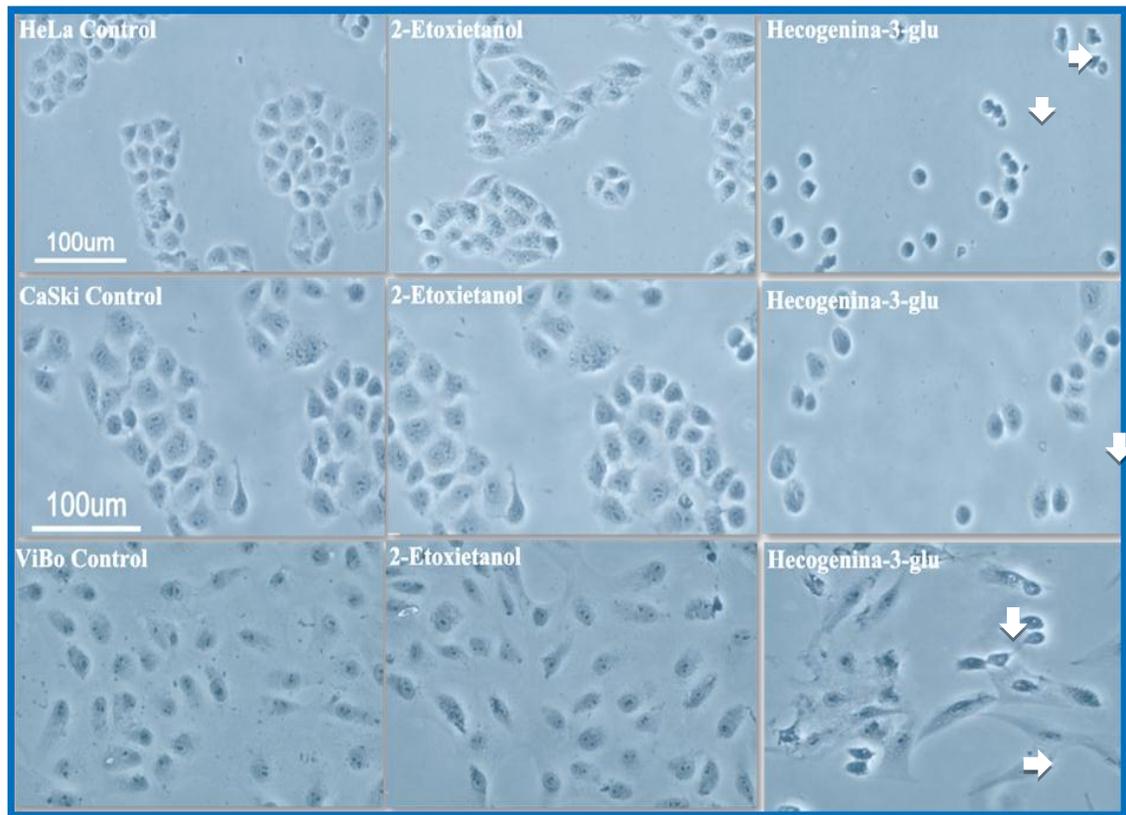


Figura 6. Efecto de la Hecogenina-3-glu en la morfología celular de las líneas HeLa, CaSki y ViBo. Control: Células en RPMI al 5% de SNT; 2-Etoxiolol: células en RPMI-1640 al 5% de SNT y 1% de 2-Etoxiolol; Heco-3-glu: células en RPMI-1640 al 5% de SNT, 1% de 2-Etoxiolol y tratadas con las concentraciones de IC_{50} correspondientes a cada línea celular durante 24 h. Marcada con flechas podemos observar que la morfología celular es esférica, incluso ver lo que podrían ser cuerpos apoptóticos.

Los resultados obtenidos en la figura 6, muestran que los cultivos control y con 2-etoxiolol las células mantienen una forma poliédrica, extendidas, con proyecciones citoplasmáticas (adheridas a la placa) y abundante citoplasma, sin embargo, los cultivos tratados con la hecogenina-3-glu, las células pierden su forma poliédrica, tomando una forma esférica, con reducción del volumen celular, escaso citoplasma, disminución de número celular.

Actividad citotóxica de la Hecogenina-3-glu en células HeLa, CaSki y ViBo.

Considerando que la actividad antiproliferativa de la hecogenina-3-glu en las líneas tumorales implica un decremento en el número celular y con el propósito de establecer si este decremento es debido a una actividad citotóxica del compuesto, fueron tratados cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo con la hecogenina-3-glu a la concentración de sus respectivas IC_{50} y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes de los cultivos celulares y tomado como un parámetro de pérdida de la integridad de la membrana plasmática y como una característica primordial de la muerte celular necrótica (Figura 10, Tabla 1).

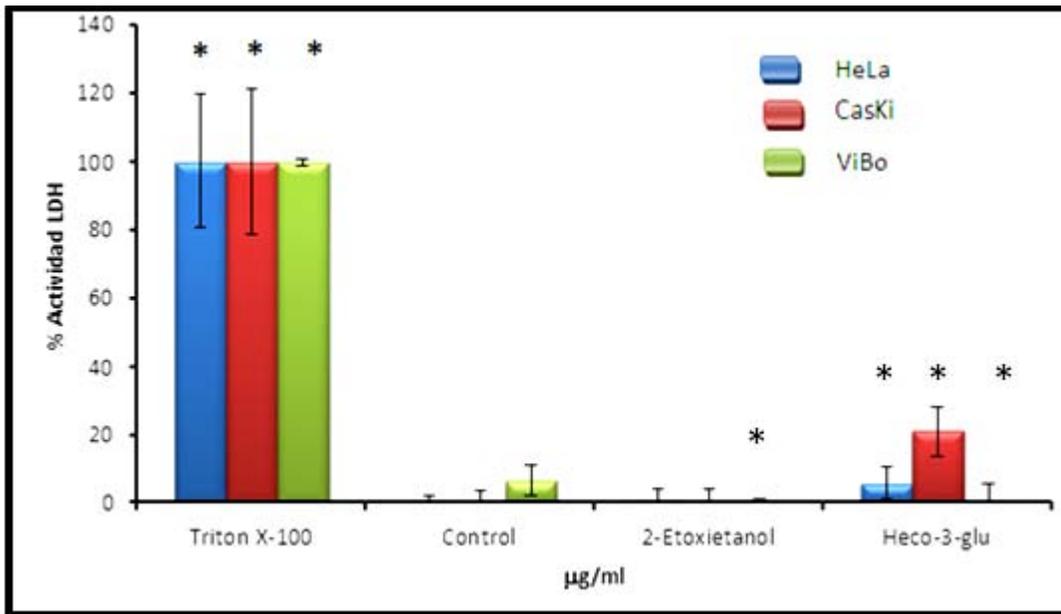


Figura 10. Determinación de la actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo (7500 células/pozo en placa de 96 pozos), estimuladas con la IC_{50} correspondientes para cada línea celular por 24h. La liberación máxima de LDH se determinó mediante Tritón X-100 a las 48h de cultivo de un tratamiento control, la actividad de la enzima liberada se tomó como el 100% de la actividad. La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado. * $p > 0.05$ vs Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

% de citotoxicidad (liberación de LDH al medio)	
Línea celular	Hecogenina-3-glu
HeLa	5.61
CaSki	21
ViBo	0

Tabla 1. Determinación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos de células tumorales tratadas con Hecogenina-3-glu.

Los resultados obtenidos en la Fig. 10 y la Tabla 1, pueden indicar que la Hecogenina-3-glu indujo a las células tumorales a una baja o nula liberación de LDH, estableciendo que este compuesto es de baja o nula actividad necrótica. La línea celular CaSki al ser tratada con la hecogenina-3-glu mostró la mayor actividad de LDH (21%) sugiriendo que esta línea celular es más sensible al efecto necrótico de la hecogenina-3-glu.

Con la intención de confirmar la actividad necrótica presente en la Hecogenina-3-glu, los cultivos de células tumorales fueron tratados con dicho compuesto, y fue evaluada la integridad de la membrana celular, mediante la incorporación celular de yoduro de Propidio (IP), y cuantificada por Citometría de flujo (Fig.11, Tabla 2).

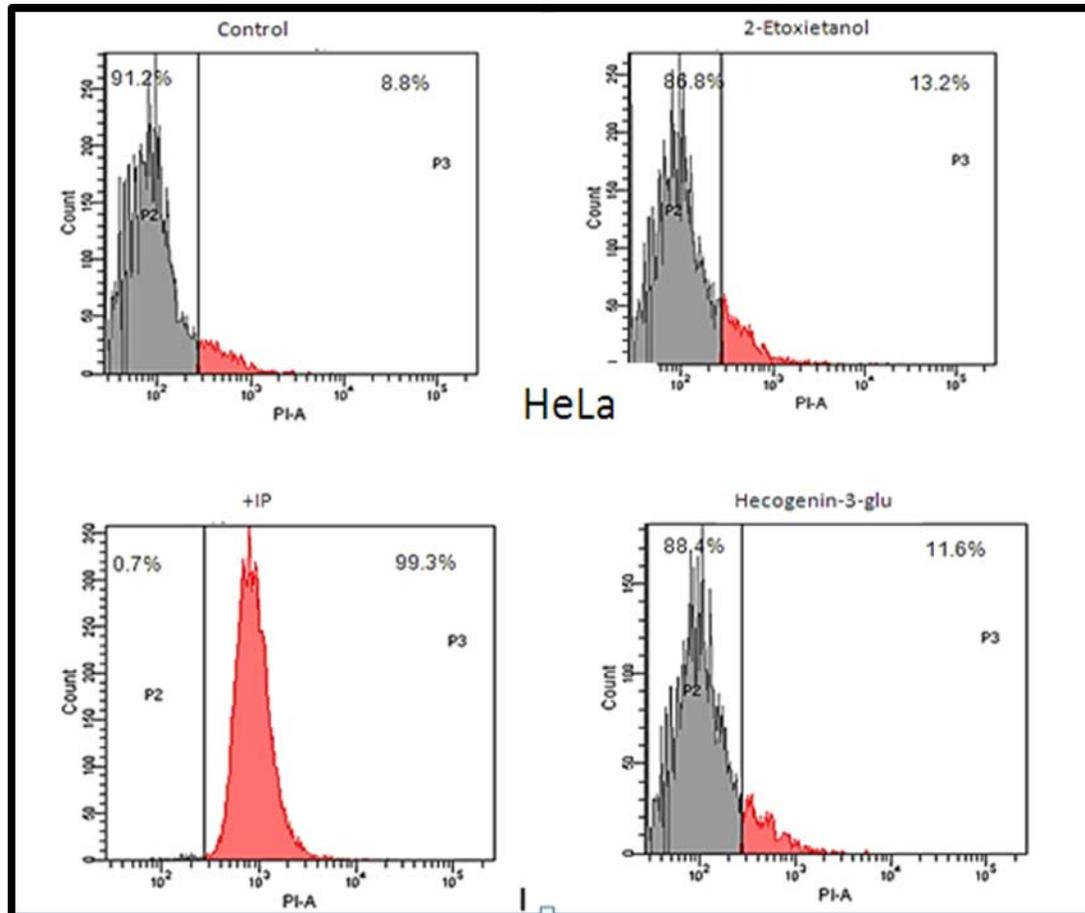


Figura 11a. Efecto citotóxico de la Hecogenina-3-glu sobre la línea HeLa. Fueron sembradas las células en una placa de 48 pozos y estimulados con las concentraciones de IC₅₀ respectivas de cada línea y el efecto citotóxico fue evaluado mediante la incorporación celular de yoduro de Propidio (IP) y cuantificado por citometría de flujo. El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes.

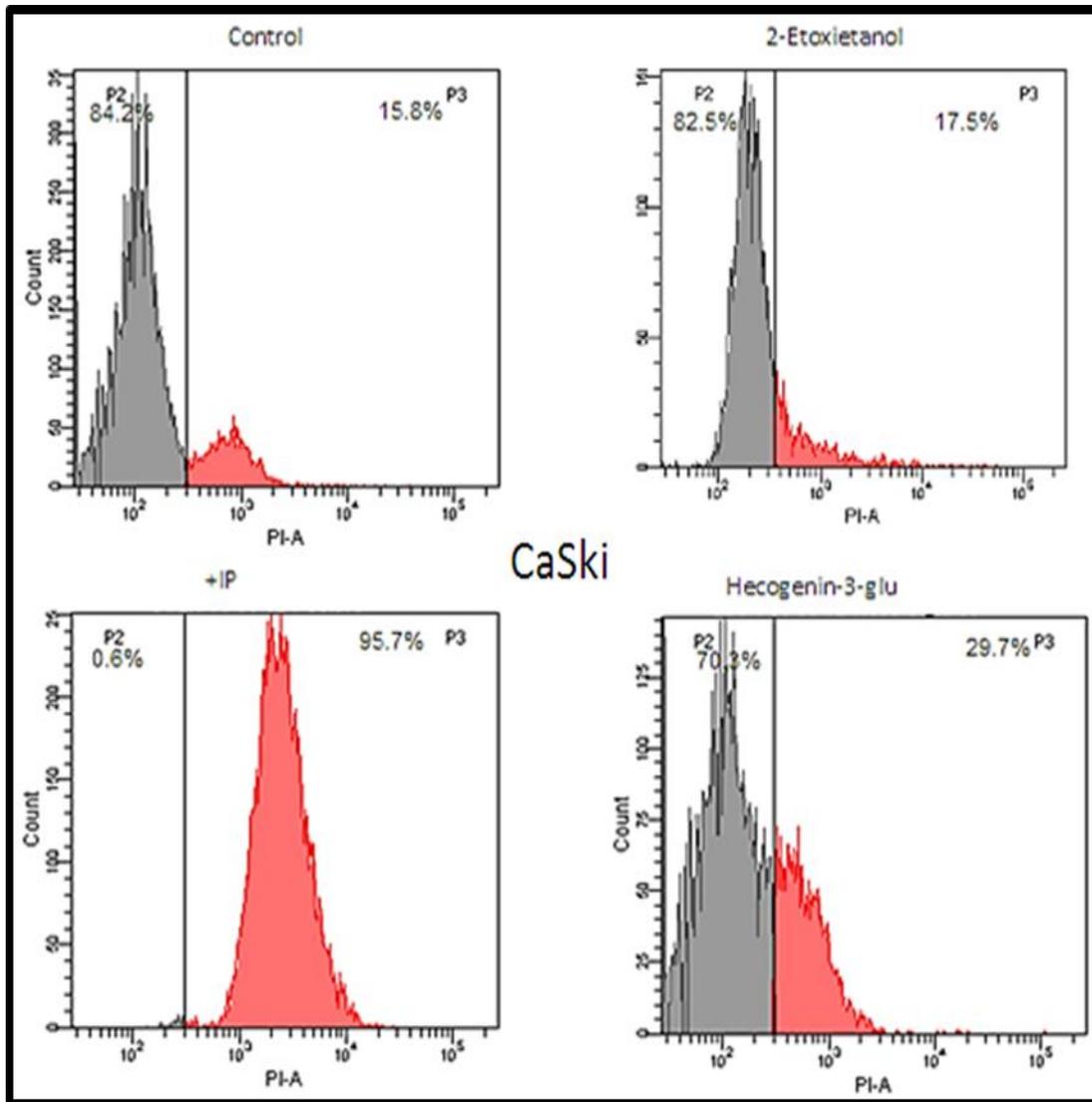


Figura 11b. Efecto citotóxico de la Hecogenina-3-glu sobre la línea celular CaSki. Fueron sembradas las células en una placa de 48 pozos y estimulados con las concentraciones de IC₅₀ respectivas de cada línea y el efecto citotóxico fue evaluado mediante la incorporación celular de Ioduro de Propidio (IP) y cuantificado por citometría de flujo. El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes.

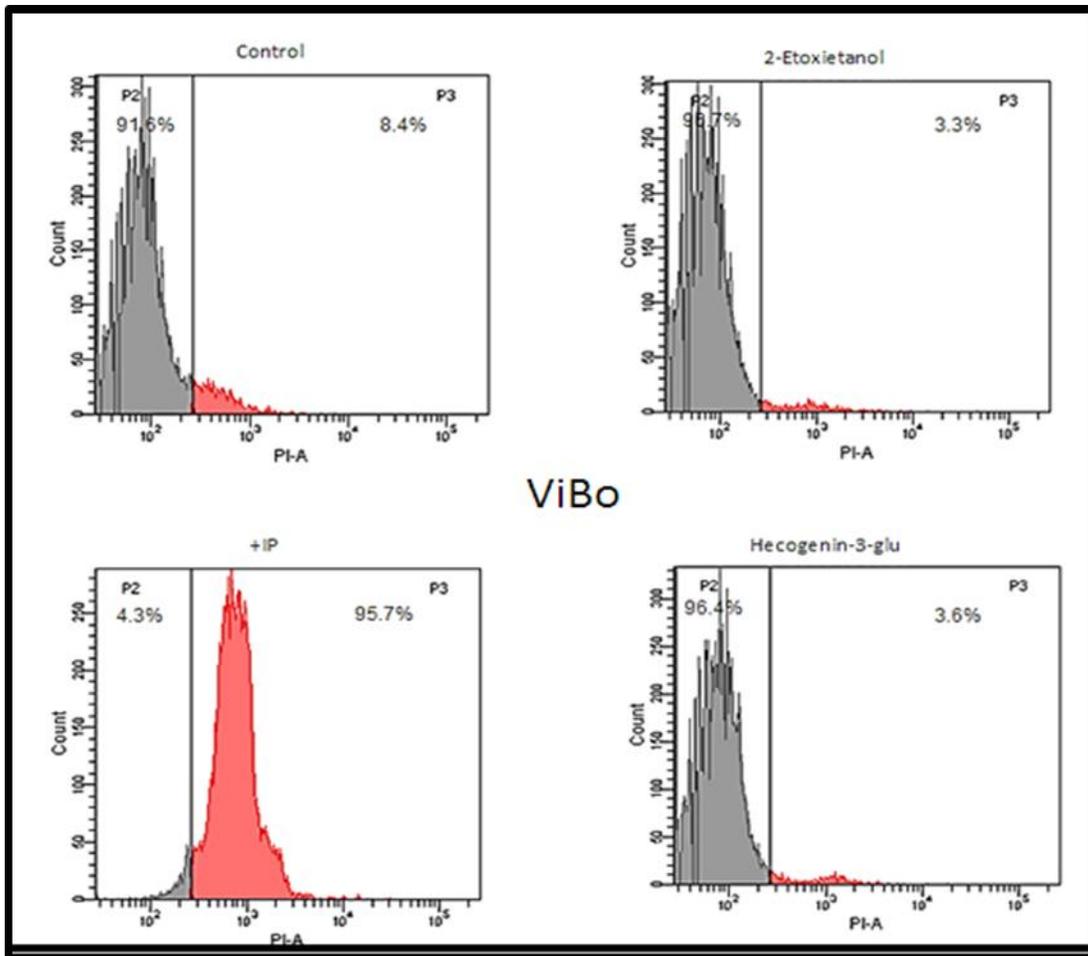


Figura 11c. Efecto citotóxico de la Hecogenina-3-glu sobre la línea ViBo. Fueron sembradas las células en una placa de 48 pozos y estimulados con las concentraciones de IC₅₀ respectivas de la línea y el efecto citotóxico fue evaluado mediante la incorporación celular de Ioduro de Propidio (IP) y cuantificado por citometría de flujo. El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes.

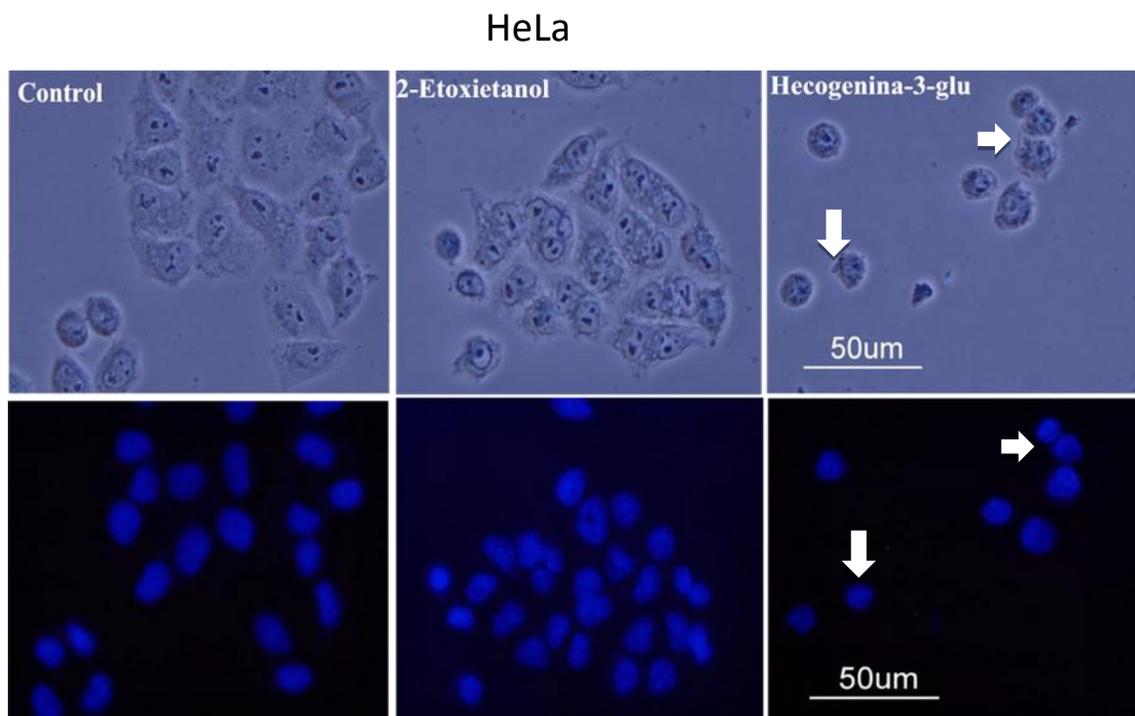
% de Ioduro de Propidio incorporado	
Línea Celular	Hecogenina-3-glu
HeLa	11.6
CaSki	29.7
ViBo	3.6

Tabla 2. Determinación de la incorporación de IP en células tumorales tratadas con Hecogenina-3-glu.

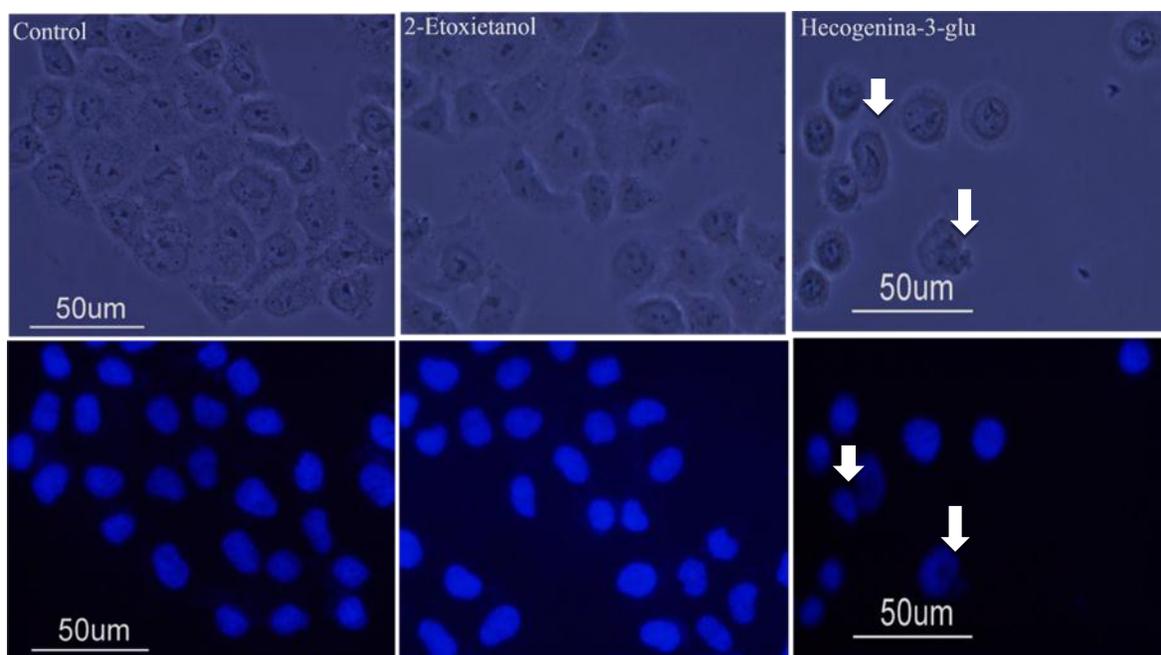
Los resultados obtenidos en las figuras 11 a, b y c representados en la tabla 2, nos muestran otro señalamiento que indica que la Hecogenina-3-glu presenta baja o nula actividad necrótica en las líneas celulares HeLa y ViBo, puesto que la incorporación de IP es considerablemente baja, en contraste con las células CaSki que reiteran ser las más sensibles a la actividad necrótica de este compuesto, al presentar mayor incorporación de IP por tanto, mayor permeabilidad de la membrana, que es clave para la necrosis.

Actividad apoptótica en células tumorales.

Debido al decremento celular observado en los cultivos de las líneas tumorales inducido por la hecogenina-3-glu, causado por un mecanismo diferente al de la muerte necrótica y con la intención de evaluar si la hecogenina-3-glu presenta actividad apoptótica en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con el compuesto a las concentraciones de IC_{50} respectivas y la morfología celular y nuclear fue evaluada con la intención de establecer si la hecogenina-3-glu induce a las células tumorales a expresar una morfología típica de células apoptóticas (Figura 12).



CaSki



ViBo

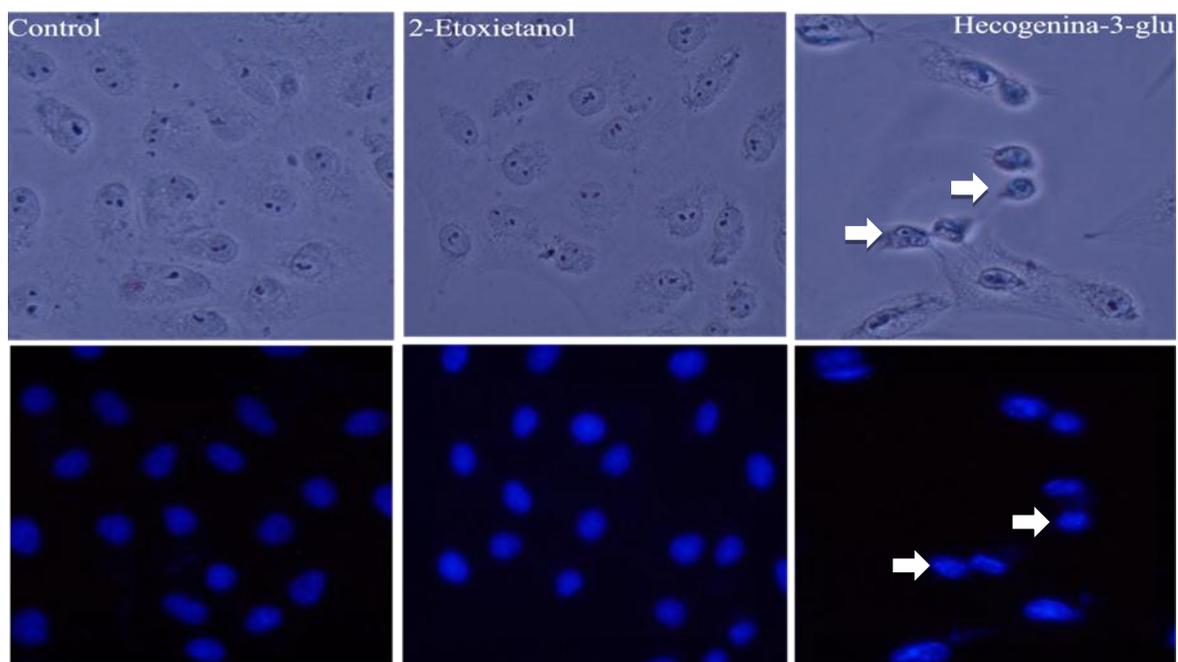


Fig. 12 Efecto de la hecogenina-3-glu en la morfología celular y nuclear en las líneas de CaCu. Las células fueron sembradas en cubre objetos y tratadas por 24 horas con las IC_{50} respectivas, posteriormente los cultivos fueron marcados con el fluorocromo DAPI y la morfología celular y nuclear fue observada y fotografiada en un microscopio NIKON en contraste de fases y por epifluorescencia.

Los resultados obtenidos en la (figura 12) establecen que la hecogenina-3-glu afecta la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo, induciéndolas en comparación con el control y el vehículo a presentar un menor tamaño (contracción celular), escaso citoplasma, pérdida de las proyecciones citoplasmáticas, pérdida de adhesión celular, disminución del tamaño nuclear y condensación de la cromatina, las cuales son características morfológicas típicas de células apoptóticas, sugiriendo que la hecogenina-3-glu induce a las células tumorales a una muerte apoptótica.

Inmunodetección de Caspasa-3 activa.

Para concluir que la Hecogenina-3-glu induce a las células tumorales a una muerte celular por apoptosis, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas por 24 h con sus respectivas IC_{50} y la actividad de la Caspasa-3 activa fue determinada por citometría de flujo (Figuras 13,14 y 15).

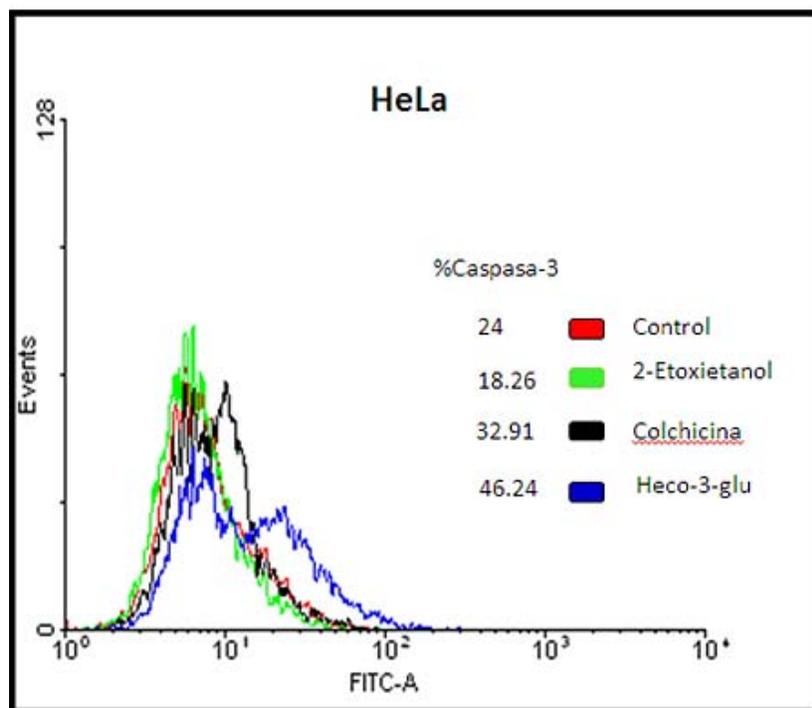


Figura 13. Detección de Caspasa-3 activa correspondiente a la línea HeLa de CaCu, al ser tratada con 78.5 μ g/ml de Hecogenina-3-glu

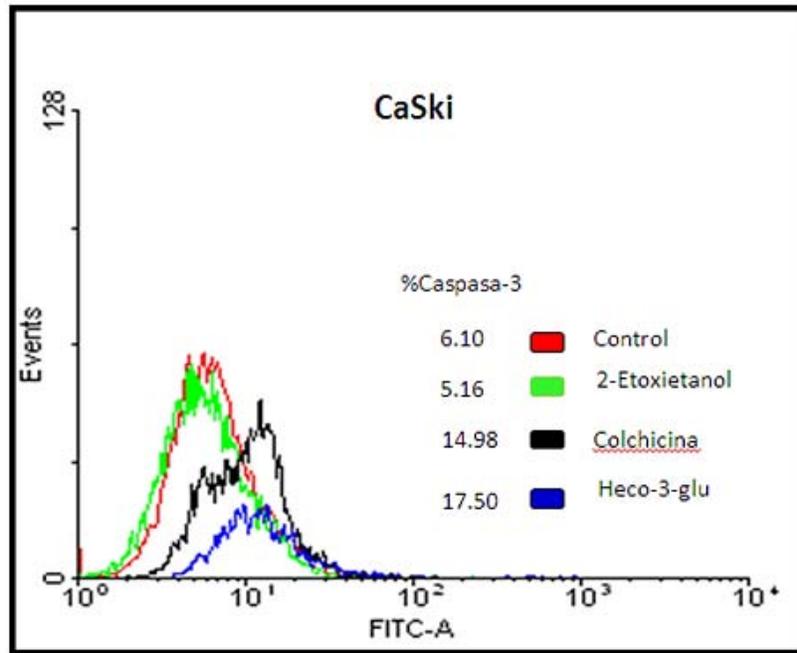


Figura 14. Detección de Caspasa-3 activa correspondiente a la línea CaSki de CaCu, al ser tratada con 38.1 $\mu\text{g/ml}$ de Hecogenina-3-glu.

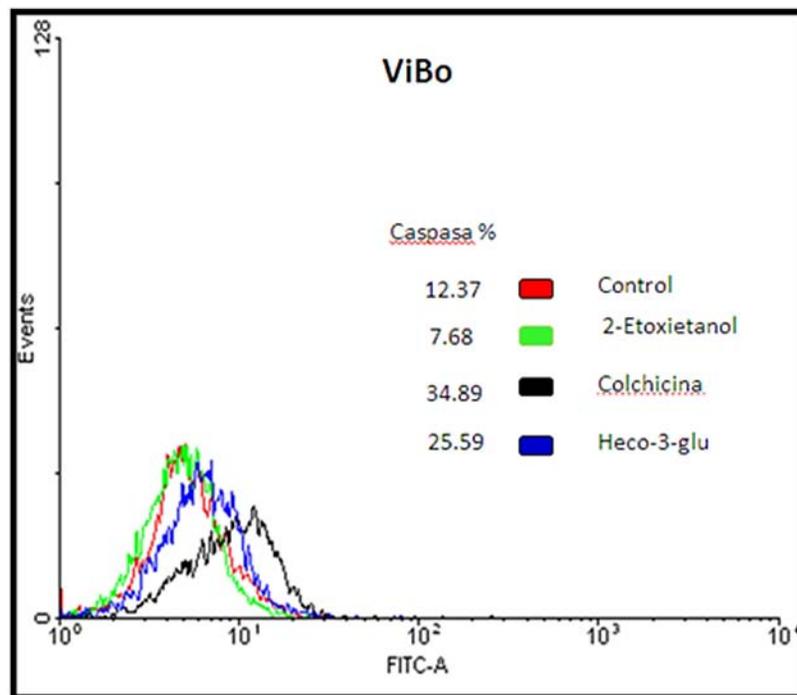


Figura 15. Detección de Caspasa-3 activa correspondiente a la línea ViBo de CaCu, al ser tratada con 25.7 $\mu\text{g/ml}$ de Hecogenina-3-glu.

Los resultados obtenidos muestran que las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo incrementaron la cantidad de caspasa 3 activa al ser tratadas con la hecogenina-3-glu en un 28, 12 y 18 % respectivamente, indicando que esta saponina induce a las células tumorales a expresar la caspasa 3 activa, que en conjunto con la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas, sugieren que la hecogenina-3-glu induce a las células tumorales de CaCu a una muerte celular por apoptosis.

Efecto de la Hecogenina-3-glu sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos.

Una vez establecido que la Hecogenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de los cultivos celulares tumorales induciendo en ellos una muerte apoptótica, surge la duda si este compuesto afecta de la misma forma a células no tumorales y para resolver esta cuestión se procedió a determinar el efecto de este compuesto sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana como parámetro de selectividad. Para ello, cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana, fueron tratados con 78.5, 38.2 y 25.7 μ g/ml de compuesto y el potencial proliferativo fue evaluado mediante la técnica de marcado celular con carboxifluoresceína y cuantificada por citometría de flujo (Figura 16).

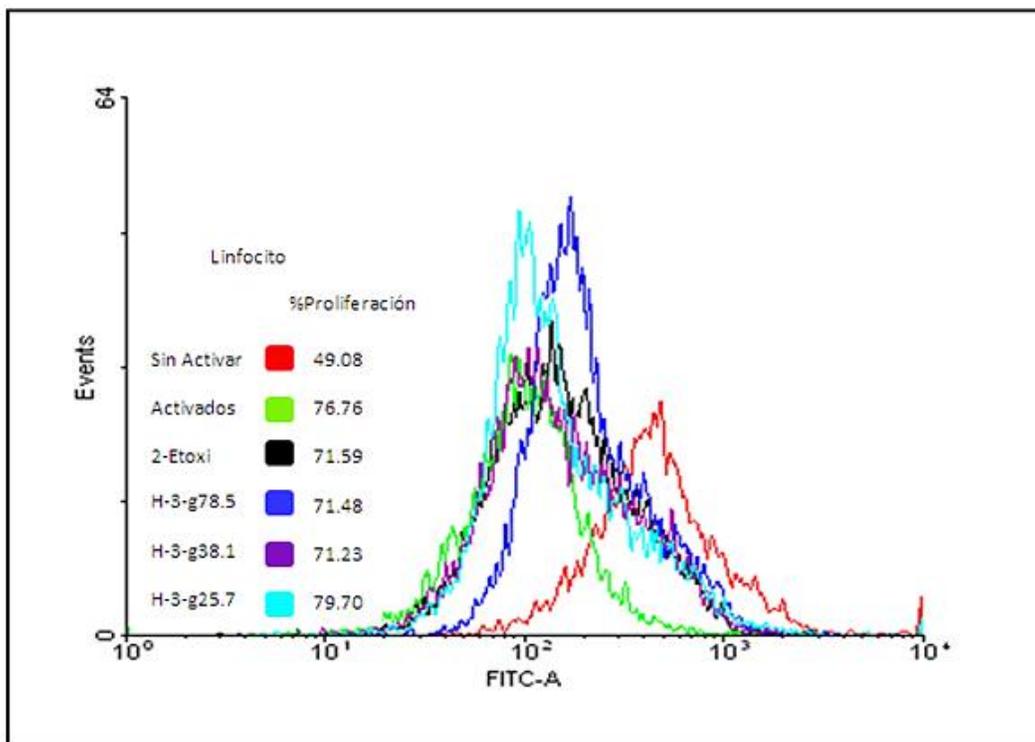


Figura 16. Efecto del compuesto Hecogenina-3-glu sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, marcados con carboxifluoresceína, activados con fitohemaglutinina y tratados con las concentraciones de 78.5, 38.2 y 25.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de compuesto durante 72h. La marca fue evaluada por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSAria II y los resultados fueron analizados con el programa WinMDI versión 2.8 para Windows. El gráfico es representativo de por lo menos 3 ensayos con tres repeticiones por ensayo.

Los resultados obtenidos en la (figura 16) muestran una distribución de marca similar entre el control, el vehículo (2-etoxietano) y los tratados con diferentes concentraciones de Hecogenina-3-glu, indicando que esta saponina no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas, además es importante mencionar que estas condiciones activaron a los linfocitos humanos.

Actividad necrótica de la Hecogenina-3-glu en linfocitos humanos de sangre periférica.

Para determinar si la Hecogenina-3-glu induce a las células linfocíticas a una muerte por necrosis, cultivos de linfocitos humanos (células no tumorales) fueron tratados con 78.5, 38.2 y 25.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de compuesto y la actividad de la enzima citoplasmática LDH fue evaluada en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 17).

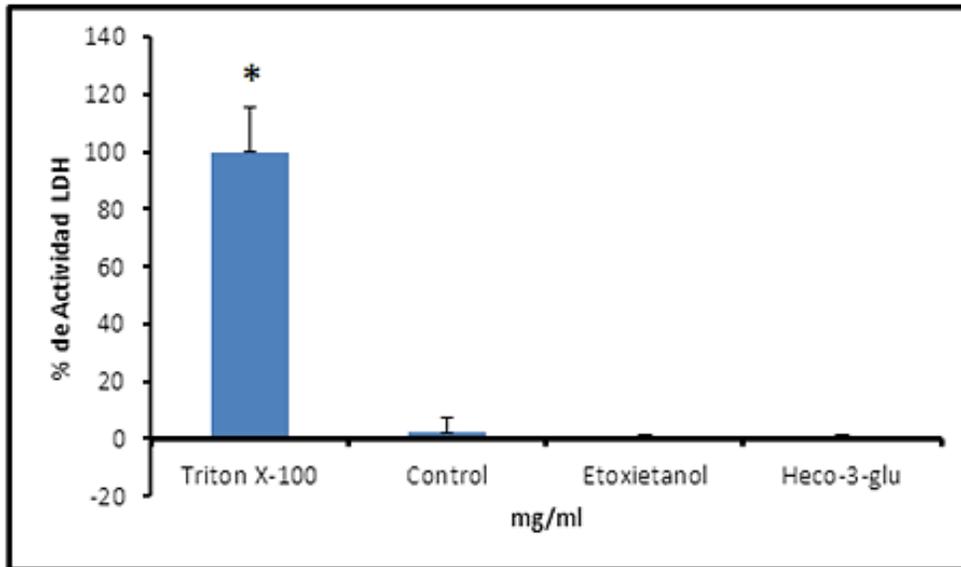


Figura 17. Determinación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes provenientes de cultivos de linfocitos humanos, estimulados con 78.5µg/ml. La grafica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado. ANDEVA seguida de una prueba de T de student (* $p > 0.05$ Control)

Los resultados obtenidos muestran que los sobrenadantes provenientes de cultivos de células linfocíticas tratadas con el compuesto no se observa actividad de la enzima citoplasmática LDH, indicando que esta saponina no induce a las células linfocíticas a una muerte necrótica.

DISCUSIÓN

Las saponinas son estructuralmente una clase diversa de glucósidos, las cuales han atraído mucha atención debido a las actividades biológicas que presentan, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiproliferativas e inductoras de apoptosis (Zhou *et al*, 2005; Hsu *et al*, 2004), por lo que, constituyen una importante fuente de productos de origen natural que conducen al desarrollo de novedosos y prometedores quimioterapéuticos. La presencia de saponinas, ha sido reportada en más de 100 familias de plantas de las cuales al menos 150 tipos de saponinas naturales se ha encontrado que poseen importantes propiedades anticancerígenas (Man *et al*, 2010). Con respecto a la hecogenina, se le ha descrito con actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis (Konoshima *et al*, 1998; Podolak *et al*, 1998; Rao, 2000; Mimaki *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2001). De entre las diversas saponinas que se han estudiado, la Hecogenina ha generado fuerte interés debido a que se le ha reportado con actividad antitumoral. Cuando Corbiere y colaboradores (2003) evaluaron el efecto de tres saponinas, entre ellas Hecogenina, en células de osteosarcoma 1542, encontraron actividad antiproliferativa, no citotóxica, acción independiente del ciclo celular, poca afección a la morfología celular, fragmentación del ADN y sobreexpresión de bax y PARP α ; sin embargo, al tratar de solubilizar la Hecogenina en medios con electrolitos, tanto en las condiciones señaladas por diversos autores, así como probando diversos solventes, el esteroide resulta insoluble, ya que al ser extraída la pérdida de sus azúcares trae como consecuencia que la molécula presente una baja solubilidad y una considerable disminución en su actividad biológica, haciéndola difícil de estudiar. Con la intención de mejorar su solubilidad y con ello aumentar la biodisponibilidad para las células, en este trabajo se utilizó a la Hecogenina con una glucosa unida en el carbono tres. Esta Hecogenina glucosilada (Hecogenina-3-glu) presentó una buena solubilidad y una actividad antiproliferativa al ser probada en células de cáncer cérvicouterino, obteniendo unas IC₅₀ de 78.5, 38.1 y 25.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, mientras que se ha reportado que la Hecogenina (3 β -hidroxi-5 α , 25R-espirostan-12-ona) a una concentración de 17.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (40 μM) inhibe la proliferación de células de osteosarcoma 1547 en un 38% (Trouillas, *et al.*, 2005), además en células de cáncer cervicouterino HeLa, a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ logra inhibir la proliferación en un 17.2% y a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ el compuesto es tóxico para las células (Mimaki *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos para la hecogenina-3-glu indican que la glucosa unida al carbono tres le dio mayor solubilidad. De igual manera, el encontrar que la hecogenina-3-glu a la

concentración de 78. 5µg/ml no es citotóxica, indica que este azúcar es importante para disminuir la actividad citotóxica presente en la Hecogenina y que el decremento observado en el número celular es debido a causas diferentes a la necrosis. Al respecto, la Hecogenina-3-glu induce a las células tumorales de cáncer cérvicouterino a expresar una morfología celular típica de células apoptóticas, dato que junto con el incremento de la caspasa-3- activa en las líneas HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el fitoesteroide, sugieren que la hecogenina-3-glu induce a las células tumorales de cáncer cérvicouterino a una muerte por apoptosis. Este dato resulta relevante ya que compuestos que inducen apoptosis en células tumorales son considerados como potenciales agentes anticancerígenos (Rankfurt y Krishan, 2003), puesto que la apoptosis tiene una ventaja respecto a la muerte por necrosis al no activar una respuesta inmune y por lo tanto evitar la inflamación característica de la necrosis.

El estudio realizado por Camoutsis y colaboradores (2005) indica que ninguno de los análogos de la Hecogenina sintetizados en dicho trabajo mostró actividad genotóxica ni inhibidora de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana. Nuestros resultados alentadoramente, concuerdan con este trabajo ya, ya que muestran que el esteroide Hecogenina-3-glu, no afecta la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana, sugiriendo que la acción inductora de necrosis y posiblemente apoptosis de este esteroide es selectiva. Cabe destacar que los linfocitos y fibroblastos humanos no tumorales son un buen parámetro de selectividad, ya que resultan células muy sensibles tanto a la administración de fármacos, como a la quimioterapia y radioterapia, en las que es característica la fibrosis (muerte y queratinización de fibroblastos) (Montero, *et al.* 2005; Di Giorgio, *et al.* 2001), así como la muerte de un número importante de células del sistema inmune (linfocitos) del paciente.

En la mayoría de los compuestos descritos con actividad antitumoral no se han evaluado en células no tumorales, careciendo de una prueba de acción selectiva. La actividad antiproliferativa presente en la Hecogenina-3-glu sobre células tumorales, así como el nulo efecto antiproliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana, sugiere que el compuesto Hecogenina-3-glu presenta características que lo hacen un digno candidato para ser evaluado como un agente con potencial terapéutico, ya que presenta actividad antiproliferativa, induce muerte por necrosis y apoptosis en células tumorales y presenta selectividad respecto a células normales. Estas propiedades lo convierten en un digno candidato para estudiarlo en modelos *in vivo* con la intención de evaluar su potencial terapéutico.

CONCLUSIONES.

- La Hecogenina-3-glu reduce la proliferación celular de un 50% en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo con una concentración de 78.5µg/ml, 38.2µg/ml y 25.7µg/ml respectivamente para cada línea celular.
- La Hecogenina-3-glu induce una liberación de LDH en células HeLa 5.61% y CaSki 21%, además de que en la línea celular ViBo no induce a liberación de LDH.
- La hecogenina-3-glu induce a la pérdida de la integridad de la membrana celular en HeLa y CaSki, asimismo induce a una pérdida mínima de integridad de la membrana celular en ViBo.
- La Hecogenina-3-glu induce a la activación de la caspasa-3 en las células HeLa y CaSki y ViBo.
- La Hecogenina-3-glu en su concentración más alta 78.5µg/ml no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas de sangre periférica humana, incluso en concentraciones más bajas demuestra que las ayuda a proliferar.
- La concentración máxima 78.5µg/ml de Hecogenina-3-glu, no induce un efecto necrótico en células linfocíticas de sangre periférica humana.

REFERENCIAS.

- ☞ Aguirre A., (2002) Guía practica del ciclo celular y miteosis, Norma, Cali ed, p. 651.
- ☞ Abdel-Gawada MM, El-Sayed M.M., Abdel-Hameeda E.S. 1999. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. 2008. *Farmacología*. 6 Ed. Editorial Elsevier, Barcelona España. Pp: 72
- ☞ Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y P. Walter. 2006. *Introducción a la biología celular.*, 2 Ed. Editorial Panamericana, Madrid. Pp: 1
- ☞ Alonso de Ruiz Patricia. 2005. *Cáncer Cervicouterino diagnostico prevención y control*. México D.F., México: UNAM Facultad de Medicina. Pp.59
- ☞ Alnemri E., Livingston D., Nicholson D., Salvesen G., Thornberry N., Wong W. & Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, Vol. 87, 171pp.
- ☞ Aquino R, Conti C, DeSimone F, Orsi N, Pizza C, Stein ML. 1991. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. *J. Chemother*;3:305-309.
- ☞ Arango M., Fernandez L., Román T., Garcia M., (1997) La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Oncología* 13:126-134 pp.
- ☞ Arellano P.2013. Manual de patología general. 7 Ed. Editorial Elsevier, Barcelona España. Pp: 64
- ☞ Boonananwong S, Kongkathip B, Kongkathip N. 2008. First synthesis of 3,16,20-polyoxygenated cholestanes, new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. *Steroids*; 73:123–1127.
- ☞ Camoutsis C, Mourelatos D, Pairas G, Mioglou E. 2005. Synthesis and cytogenetic studies of structure biological activity relationship of esters of Hecogenin and aza-homo-Hecogenin with N,N-bis(2-chloroethyl) aminocinnamic acid isomers. *Steroids*;70: 586–593
- ☞ Corrales R., Henriksson J., Barrientos C., Ochoa D. (2011) El cáncer cervico uterino, enemigo numero uno de la salud de la mujer. *Revista electrónica Medicina, Salud y Sociedad*. 3:1-15.
- ☞ Cooper .2010. La célula 5ª ed. Editorial Pearson, México.
- ☞ Corbiere C., Liagre B., Bianchi A., Bordji K., Dauca M., Netter P y Beneytout J. L. (2003). *Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. Internationa Journal of Oncology*, 22:899.
- ☞ Cress AE, Nagle RB. 2006. Cell adhesion and cytoskeletal molecules in metastasis. Springer. 1-47.
- ☞ Cuello F., Kato C., Sadarangani K., Saez S., Gejman E., Owen G.,Lipkowitz S., (2006), Muerte celular mediada por receptores : Rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducidas por el

- ligando "TRAIL" en cánceres ginecológicos, Boletín escuela de Medicina U. c., Vol 31 no 1, 5-15 pp.
- ☞ Da Silva BP, De Sousa AC, Silva GM, Mendes TP, Parente JP. 2002. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *J. Biosci.* 57, 423-428.
 - ☞ Di Giorgio, Taja M, Durán MR, Bonomi M, Menéndez M, Pogany PR, Abbet C, Zaderajko M, Roth M. 2001 ¿Es posible predecir la radiosensibilidad individual en pacientes con cáncer de cuello uterino mediante el test de micronúcleos?. Presentado en el 2o Congreso Iberoamericano y del Caribe de Física Médica, Venezuela 16-19 octubre 2001. Disponible en: <http://200.0.198.11/MenoriaT/Mt-01/MT19A-01.pdf>. Consultado el 1 de octubre de 2015.
 - ☞ De Ruiz A. y Lazcano E. 2005. Cáncer Cervicouterino: Diagnostico, prevención y control. Medica panamericana. México DF. P 386.
 - ☞ Deigner H., Kinscherf R. (1999), Modulating Apoptosis: Current Applications and Prospects for Future Drug Development., *Current Medical Chemistry*, Vol. 6, no. 5, 399-414 pp
 - ☞ Domínguez R.; Alpuche S.; Vasco M. y Pérez M.: (2008) "Efectos de citocininas en la propagación in vitro de agaves mexicanos", en revista Fitotecnia Mexicana, vol. 31, n. 004, pp. 317-322
 - ☞ Domínguez-Lorenzo W, Rodríguez-Alonso JR, Domínguez-Álvarez R, Nicot-Vidal LF. 2010. Terapias alternativas contra el cáncer. Universidad Tecnológica del Chocó. Disponible en: http://www.utchvirtual.net/recursos_didacticos/documentos/salud/terapias-alternativas-cancer.pdf. Consultado 20 Septiembre de 2015. Y en: <http://www.elportaldelasalud.com>. Consultado 20 Septiembre de 2015.
 - ☞ Dong LP, W. Ni, Jy Dong, JZ Li, CX Chen, HY Liu. 2006. A New Neolignan Glycoside from the Leaves of *Acer truncatum*. *Molecules*; 11:1009-1014.
 - ☞ Doobar J., (2006) Molecular biology of human papilloma- virus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110:525-541.
 - ☞ Elinos-Baez C. M., Maldonado V. Melendez- Zajgla J. (2003), Caspasas inductoras de apoptosis . *Gaceta Medica Mexico*. 139(1): 492-500
 - ☞ Elledge S. (1996), Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* , Vol. 274, 1664–1672 pp.
 - ☞ El-Sayed MM. 1998. Molluscicidal steroidal saponins from *Agave ferox*. *J Pharm Sci.*; 7: 73-79.
 - ☞ Fernández H., López M., Hernández V., López D., Escobar S., Sánchez S., Pinto B., Sandoval R. (2012). Synthesis of 26-hydroxy-22 oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:2474–2484.
 - ☞ Fuentes X., Castiñeiras M., Queralto J. (1998). *Bioquímica clínica y Aptología molecular*, Editorial Reverté S.A. Vol.2. 2da ed. Barcelona P.540.
 - ☞ Gogvadze V, Orrenius S. (2006) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact.*, Vol.163, 4-14 pp.

- ☞ Hazzard R. William. (2005). Principles of geriatric medicine and gerontology. 4ta edición. Ed. Mc.Graw Hill. pp. 125–187.
- ☞ Hernández, R.; Lugo, E.; Díaz, L. y Villanueva, S.: (2005) “Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey”, en revista e-Gnosis, vol. 3, , pp. 1-9.
- ☞ Hsu Y., Kuo P., Chiang L., Lin C. (2004), Involvement of p53, nuclearfactor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cellcycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines, CancerLett , Vol. 213, 213–221pp.
- ☞ INEGI (2011). Consulta interactiva de datos. Estadísticas demortalidad. Consultada el 9 de enero del 2014. Disponible en: HYPERLINK "http://www.inegi.gob.mx" www.inegi.gob.mx
- ☞ Iracheta L. (2007) El suicidio y la muerte celular, Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat., Vol 101, no. 2, 1-33 pp.
- ☞ Itabashi M, Segawa K, Ikeda Y, Kondo S, Naganawa H, Koyano T, Umezawa K. 2000. A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida*. Carbohydrate Research; 323:57–62
- ☞ Jiménez C, Correti M., Salma N., Cavazza M, Perrone M. (2011). Detección del virus del papiloma humano en entidades clínicas benignas de la cavidad bucal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación molecular. Acta Odontológica Venezolana 39: 1-7.
- ☞ Jordán J. (2003), Apoptosis: Muerte celular programada, Bioquímica Vol. 22, no. 6, 100- 106 pp.
- ☞ Karp G. (1996), Biología celular y molecular, 1a edición, Editorial McGraw Hill, México, 658 pp.
- ☞ Karp G. (2006), Biología celular y molecular, 4a edición, Editorial McGraw Hill, México, 4-6 pp.
- ☞ Kaufmann H., Earnshaw W. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Experimental Cell Research, Vol. 256:42–49.
- ☞ Kaufmann H., Gores J. (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure, BioEssays, Vol. 22, no. 11, 1007-1017 pp.
- ☞ Kongkathip B, Hasakunpaisarn A, Boonananwong S, Kongkathip N. 2010. Synthesis of cytotoxic novel 9,11-secosterol analogs: Structure/activity studies. Steroids; 75:834–847
- ☞ Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H., Nishino H., Duc N. M., Kasai R. y Yamasaki K. (1998). Anti-tumor-promoting activity of majonoside-R2 from vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Haet Grushv. (l). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21:834–838.
- ☞ Koutsky L., Ault K., Wheeler C. (2002), A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. New England Journal of Medicine, Vol. 347, no. 21, 1645–1651 pp
- ☞ Kuroda M., Mimaki Y., Hasegawa F., Yokosuka A., Sashida Y. y Sakagami H. (2001). Steroidal glycosides from the bulbs of *Camassia leichtlinii* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49:726–731.
- ☞ Laguna J., Piña G., Martínez M., Pardo V., Riveros R. (2009), Bioquímica de Laguna, 6ª edición, Editorial El manual Moderno, México, 457-458 pp.

- ☞ Lewis M. (2004). Analisis de la situación de cáncer cévico-uterino en America Latina y el Caribe . Wshignton, Estados Unidos : Organización panamericana de la salud.
- ☞ Liagre B, Vergne-Salle P, Leger DY, Beneytout JL. 2007. Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2, *International Journal of Molecular Medicine*; 20:451-460
- ☞ Lynn Helen, Link Ann. 2000. El negocio del cancer. *Revista de Medicinas Complementarias. Medicina Holística*; 58:52-56.
- ☞ Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A., Krieger M., Scott P., Zipursky L., Darnell J., (2005), *Biología celular y molecular*, 5ª edición, Editorial Medica Panaamericana, 854-864 pp.
- ☞ López D. (2010). Efecto antitumoral de los esteroides diacetato de(25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3β,16β-diilo (26-OH-Di) y diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5α-colestan-3β-diilo (26-OH-He) en la línea tumoral de cérvix CaSki. Tesis. UNAM. México.63 pp.
- ☞ Lozano J., Galindo J., Borrón G., Liarte M., Peñafiel R., Solano F., *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*, 2ª edición, Editorial McGraw Hill, España, 326 pp.
- ☞ Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C. (2010), Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents, *Fitoterapia*, Vol. 81, no. 7, 703–714 pp.
- ☞ Ma D, Zhang J, Sugahara K, Sagara Y, Kodama H. 2001. Effect of sarsasapogenin and its derivatives on the stimulus coupled responses of human neutrophils. *Clinica Chimica Acta*; 314:107–112.
- ☞ Majno G., Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, necrosis an overview of cell death. *American Journal of Pathology*, Vol. 146, 3-16 pp.
- ☞ Martínez, M. y Pacheco, J.: “Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker”, en revista *Agronomía Colombiana*, vol. 24, n. 2, 2006, pp. 207-213.
- ☞ Mimaki Y, Kanmoto T, Sashida Y, Nishino A, Satomi Y, Nishino H. 1996. Steroidal Saponins from the underground parts of *Chlorophytum comosum* et their inhibitor activity on tumor promoter-inducer phospholipids metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry*; 41:140-1410
- ☞ Monroy G., Rangel C., Rocha Z., Trejo B., Ramírez G., Martínez R., Weiss-Steider B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Revista Mexicana de Oncología*, Vol. 7, 69–76 pp
- ☞ Montero A, Hervás A, Morera R, Sancho S, Córdoba S, Corona J A, Rodríguez I, Chajón E, Ramos A. 2005. Cuidados continuos en oncología radioterápica. *Oncología*; 28:147-156.
- ☞ Mount SL, Papillo JL. (2005). A study of 10,296 pediatric and adolescent.
- ☞ Nakamura RM, Grody WW, Wu JT, Nagle RB. 2004. *Cancer Diagnostics. Humana Press, USA*. 3-25, 185-307.

- ☞ National Cancer Institute (2012), National Institutes of Health. U.S.A. Consultada: 25 de Octubre del 2015, Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es#tipos>
- ☞ Nelson D., Cox M. (2009), Principios de Bioquímica, 5ª edición, Editorial Omega, 5-11 pp.
- ☞ Organización Mundial de la Salud (OMS). Revisado el 8 de septiembre del 2015: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- ☞ Orestes Guerra de León José. 2008. Las saponinas y sapogeninas esteroideas. monografias.com. Disponible en: Monografias.com <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas-sapogeninas.shtml>. Consultado: 21 de Mayo 2014. y RevistaCiencias.com. Disponible en <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEAFAIIZAmfjzJKp.php>. Consultado: 16 de Ago. 2014.
- ☞ Pérez Labrda K., (2012) Tesis doctoral: Síntesis y caracterización de análogos y meméticos de saponinas espirostanicas. Universidad la Habana, Facultad de Química
- ☞ Podolak I., Elas M. y Cieszka K. (1998). *In vitro* antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research*, 12: 570–573.
- ☞ Porter A., Urbano A. (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death? *Bioessays* 28: 834-843 pp.
- ☞ Quilez AM, Garcia MD, Saenz MT, Martinez-Dominguez ME, R. de la Puerta. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*; 71:395–400.
- ☞ Raff M. (1988) Cell suicide for beginners. *Nature*, 336:119-122.
- ☞ Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Flower R. J. (2008) Farmacología. Elsevier. Barcelona. P797.
- ☞ Rankfurt O. S. y Krishan F. A. (2003). Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anticancer Drug*, 14:555–561.
- ☞ Rao A. V. y Gurfinkel D. M. (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17:211–35.
- ☞ Ross M., Wojciech P., (2007) Histología: text y atlas color con biología celular y molecular. Ed. Médica Panamericana, 5ed. Buenos Aires. P.992
- ☞ Robbins S., Kumar V., Contran R., (1993). Patología Humana. Editorial Mc Graw Hill. México. P374.
- ☞ Sanchez L. (2013) Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Revista Técnica en México* 41:49-62.
- ☞ Schinoni I., Paraná R. (2006), Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado, *Acta Gastroenterol Latinoam*, Vol.. 36, no 4, 211-217 pp.
- ☞ Shen H., Pervaiz S. (2006) TNF receptor superfamily- induced cell death: redox-dependent execution, *Faseb J.*, Vol. 20, 1589-1598 pp

- ☞ Socarrás S. (2001), Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica, *Revista Cubana De Investigación Biomédica*, Vol. 20, no 4, 266-274 pp.
- ☞ Solomon P., Berg R., Martin W. (2001), *Biología*, 5ª edición, Editorial Mc Graw Hill, México, 74 pp
- ☞ Starr C., Taggart R. Evers A., Starr L., Betancourt P., Moreno C. (2008), *Biología: La unidad y diversidad de la vida*, 11a edición , Editorial Cengage Learning, México, 142 pp
- ☞ Sun Wei, Li H, Yang SJ. 2008. A triterpene saponin from *Tribulus terrestris* attenuates apoptosis in cardiocyte via activating PKC signalling transduction pathway. *Journal of Asian Natural Products Research*; 10:39-48
- ☞ Sung, M. K.; Kendall, C. W. C.; Rao, A. V. 1995. Effect of saponins and Gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. *Food Chem. Toxicol.* 33, 357-366.
- ☞ Taylor R., Cullen S., y Martin S. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews molecular cell biology.* 9:231-241.
- ☞ Trouillas P., Corviere C., Liagre B., Duroux J. L., Beneytout J. L. (2005) Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest apoptosis in the human 1547osteosarcoma cells: a molecular modeling approach of natural molecules structurally close to disogenin. *Biorganic and medicinal Chemistry.* 13:1141-1149.
- ☞ Toro de Méndez, Morelva C. 2006. Caracterización inmunofenotípica del cancer de cuello uterino asociado a la infección por virus papiloma humano (HPV). Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=7279>. Consultado 10 Agosto 2014.
- ☞ Velázquez M., Andrade M., Lagunas M., Zajgla M., (2004), *SMAC/Diablo y su papel en la regulación de la apoptosis*, Vol 23, no. 2, 64-70 pp.
- ☞ Vermeulen K., Bockstaele V., Berneman N. (2003), *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*, *Cell Prolif.*, Vol. 36, 131-149 pp.
- ☞ Villaverde N. (2006), *Genética Humana*, Editorial Pearson, España, 17-18 pp.
- ☞ Wang Y., Kim N., Haince J., Kang H., David K., Andrabi S., Poirier S., Dawson T. (2011) Poly(ADP-Ribose) (PAR) Binding to apoptosis-Inducing Factor Is Critical for Par Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos). *Sciences Signaling* 4:20-34
- ☞ Wayne MB, Kleinsmith LJ, Hardin J. 2007. *El mundo de la célula.* 6ª edición. Pearson Educación S.A. Madrid; 3-12, 429-463, 557-570, 605-660, 833-870
- ☞ Wen C., Valderas A., Molina F., vega G., Sosa C., Llires M. (2012) P38 a signaling Induces anoikis and Lumen Formation Durin Mammary Morphogenesis. *Sciences Signaling.* 4:34-50.
- ☞ Yamasaki Y., Ito K., Enomoto Y., Sutko J. L. (1987). Alterations by passive calcium permeability and sodium-calcium exchange activity of

canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*.897:481-487.

- ☞ Yokosuka A and Mimaki Y. 2000. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*; 70:807–815.
- ☞ Zamilpa, A, Tortoriello J, NavarroV, Delgado G, Alvarez L. 2002. Five New Steroidal Saponins from *Solanum chrysotrichum* Leaves and Their Antimycotic Activity. *J. Nat. Prod*, 65, 1815-1819.
- ☞ Zhang, J.; Meng, Z.; Zhang, M.; Ma, D.; Xu, S.; Kodama, H. 1999. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin. Chim. Acta*. 289, 79-88.
- ☞ Zhou J, Sun X., Stenzel D., (1991), Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. Vol.185,no. 1, 251–257 pp.

ÁPENDICE

Preparación de reactivos.

Verseno

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

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm durante 15 minutos. Se almacena a 4 °C.

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)

Na Cl (Sigma Chem. USA)	8 g
K Cl (Sigma Chem. USA)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma Chem. USA)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma Chem. USA)	0.2 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm durante 15 minutos. Se almacena a 4 °C.

PBS para citometría de flujo (FACSFlow)

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

Glutaraldehído

A 2.75 ml de glutaraldehído (25 % v/v) se aforan a 100 ml de agua bidestilada, Se almacene a 4 °C.

Solución cristal violeta (0.1 %)

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

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Desactivación del suero fetal bovino (SFB)

El SFB es descongelado a temperatura ambiente, posteriormente es puesto a baño de agua a 56° C durante 30 minutos. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico.

Especificaciones para la congelación de células.

Medio de congelación de células

Medio de cultivo	
Dimeti sulfoxido	10%
Suero neonato de ternera	20 %

Colectar 1 millón de células por 1 ml de medio de congelación, 1 ml de volumen por vial

- Congelación gradual
- -20°C, - 70°C, - 196 °C
- Prueba de viabilidad con Azul tripano

Composición del RPMI-1640(Sigma,USA).

Reactivos	Cantidad (g/l)
Sales inorgánicas.	
Sulfato de magnesio(anhidro)Cloruro de potasio	0.1 0.04884
Cloruro de Sodio	0.4
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	6
Nitrato de Calcio-4H ₂ O	0.8
Aminoácidos	
L-Arginina	0.2
L-Aspargina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina 2HCl	0.0652
L-ácido glutaramico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-leucina	0.05
Lisina HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03
L-treonina	0.02
L-Triptofano	0.005
L-Tirosina 2Na y 2H ₂ O	0.02883
L-Valina	0.02
Vitaminas	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Ácido p-aminobenzoico	0.001
D-ácido pantoténico(hemicalcium)	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Rivoflavina	0.0002
Timina HCL	0.001
Vitamina B12	0.000005
Otros	
Glutación (reducido)	0.001
Rojo de fenol Na	0.0053
Adicionar	2
Bicarbonato de Sodio	