



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***“ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE SAPONINAS ESTEROIDALES EN LÍNEAS TUMORALES
DE CÁNCER CERVICOUTERINO.”***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GERARDO DÍAZ VÁZQUEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FES Zaragoza, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”
DRA. ISABEL SOTO CRUZ
FES Zaragoza, UNAM**

Ciudad de México, Agosto 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de mayo de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **DÍAZ VÁZQUEZ GERARDO** con número de cuenta **88169589** con la tesis titulada **"ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE SAPONINAS ESTEROIDALES EN LÍNEAS TUMORALES DE CÁNCER CERVICOUTERINO"**, bajo la dirección del Tutor Principal, **DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
Vocal: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 03 de agosto de 2016.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGARDECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta trabajo.

Principalmente a mi tutor el M. en C. Luis Sánchez Sánchez por compartir sus conocimientos y experiencias, sin los cuales no hubiera sido posible la culminación de la tesis.

A los miembros de mi comité tutorial por su paciencia y las acertadas aportaciones en la realización de este trabajo:

Dra. Rebeca López Marure

Dra. María Isabel Soto Cruz

Agradezco a:

La Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su ayuda en las técnicas de microscopia, con lo cual contribuyó en la culminación de este trabajo.

El Dr. Hugo López y el M. en C. Vicente Hernández, principalmente por su amistad, así como por la paciencia y tiempo para dirigirme y aconsejarme con sus experiencias y conocimientos.

A los compañeros de laboratorio por su ayuda y compañía.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. Laboratorio No. 2, planta baja del edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES Zaragoza.

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Introducción</i>	3
<i>Saponinas</i>	5
Generalidades.....	5
Actividad antitumoral de las Saponinas.....	7
<i>Antecedentes</i>	9
Cáncer	9
Cáncer cérvico uterino	10
Ciclo celular y cáncer.....	12
Receptores de esteroides y el cáncer.....	14
<i>Planteamiento del problema</i>	15
<i>Hipótesis</i>	15
<i>Objetivo General</i>	16
<i>Objetivos particulares</i>	16
<i>Materiales y Métodos</i>	17
<i>Resultados</i>	23
<i>Discusión</i>	39
<i>Conclusiones</i>	43
<i>Referencias</i>	44
<i>Apéndice</i>	50

Figuras y Tablas

Figura 1. Estructura general de las saponinas _____	5
Figura 2. Clasificación de saponinas _____	6
Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos: (A) 26-OH-He y (B) 26-Glu-He _____	8
Figura 4. Ciclo celular _____	13
Figura 5. Efecto antiproliferativo del compuesto 26-OH-He en células tumorales _____	24
Figura 6. Efecto antiproliferativo del compuesto 26-Glu-He en células tumorales _____	25
Figura 7. Efecto del compuesto 26-Glu-He sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos _____	27
Figura 8. Efecto del compuesto 26-OH-He sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos _____	28
Figura 9. Determinación de la enzima LDH de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo _____	29
Figura 10. Determinación de la enzima LDH en sobrenadantes de cultivos de células linfocíticas _____	31
Figura 11. Micrografías de células HeLa tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He _	33
Figura 12. Micrografías de células CaSki tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He _	34
Figura 13. Micrografías de células ViBo tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He __	35
Figura 14. Detección de la caspasa-3 activa en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo _____	37
Tabla 1. IC ₅₀ de los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo _____	26
Tabla 2. Valores de la LDH en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo _____	30
Tabla 3. Valores de la actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos humanos _____	31

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México, el CaCu ocupa el segundo lugar de mortalidad entre los diferentes tumores malignos. En la actualidad, los tratamientos existentes para este padecimiento son ineficaces en estadios avanzados, altamente necróticos y por consiguiente con severos efectos secundarios, lo que genera la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, las saponinas y sapogeninas como la dioscina, hecogenina, sarsasapogenina entre otras, han generado un fuerte interés, ya que se han descrito como moléculas con actividad antiproliferativa en diversas líneas de origen tumoral. Sin embargo, la actividad antitumoral de análogos o derivados de estas moléculas, aún se ha determinado. En el presente trabajo se evaluó el efecto anti-proliferativo, citotóxico y apoptótico de dos derivados esteroidales de origen vegetal (26-OH-He y 26-Glu-He) en cultivos de células tumorales provenientes de CaCu. Los resultados obtenidos establecen que ambos compuestos afectan el potencial proliferativo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo con una respuesta dependiente de la concentración. La nula presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) en la mayoría de los cultivos de células tumorales y de linfocitos, es indicio que estas moléculas no producen un efecto necrótico. La presencia de características morfológicas típicas de células en apoptosis, así como el incremento de la expresión de la caspasa-3 activa sugieren que ambas saponinas inducen a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte apoptótica, estableciendo que el 26-OH-He y el 26-Glu-He podrían ser candidatos para ser evaluados como agentes con potencial terapéuticos contra el cáncer.

Abstract.

Cervical cancer (CaCu) is one of the main causes of death in the world. CaCu is a major health problem in Mexico, occupying the second place of mortality among malignant tumors in the female population. Presently, the available treatments for this disease are non-effective on advanced stages of cancer, highly necrotic, and yield severe side effects; which creates the need to develop new alternative treatments. In this regard, saponins and sapogenins like dioscin, hecogenin and sarsasapogenin to mention some, have generated strong interest as they have been reported as molecules with antiproliferative activity in diverse lines of tumor origin. However, analogs or derivatives of these molecules have not yet been determined as having antitumor activity. In this work, we evaluated the antiproliferative, cytotoxic and apoptotic effect of two steroidal plant derivatives: 26-OH-He and 26-Glu-He in tumor cells derived from CaCu. Our results establish that both compounds affect the proliferative potential of tumor in lines HeLa, CaSki and ViBo on a dose-dependent manner. None or low activity of the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme were detected in the supernatants from these cultures as well as human lymphocytes, indicate that these molecules have low cytotoxicity. The observation of typical morphological characteristics of apoptotic cells as well as the increased expression of active caspase-3 suggest that the saponins induce apoptotic death to HeLa, CaSki and ViBo cells, establishing that the 26-OH-He and the 26-Glu-He could be strong candidates to be evaluated as potential therapeutic agents for cancer.

Introducción.

Los compuestos de origen natural y principalmente los de origen vegetal han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional de diversas culturas, como tratamiento de las enfermedades que acompañan al ser humano. A pesar de ello, el empleo de compuestos naturales disminuyó drásticamente a mediados del siglo XX, esto debido básicamente, a la dificultad que presentaba la extracción, aislamiento, purificación e identificación de sus principios activos, esto sin contar además con el bajo porcentaje de recuperación del compuesto de interés, a partir de grandes cantidades de muestra.¹ Además, en la mayoría de los casos, la molécula de interés que se aísla presenta una estructura química compleja, lo que complica proponer una ruta sintética sencilla con rendimientos favorables.

Actualmente, el avance tecnológico así como nuevas metodologías de cribado han logrado facilitar significativamente la extracción, aislamiento e identificación de moléculas de origen natural, con lo que el interés sobre la actividad biológica de estos compuestos ha retomado un nuevo auge. Un gran número de investigaciones han validado las actividades biológicas de estos compuestos y se han encontrado una gran variedad de propiedades farmacológicas entre las que se incluyen: antibacterianas, antimicóticas, hipoglucemiantes, antihiperlipidémicas, antitumoral, entre muchas otras.^{2,3}

Por otro lado, mediante procesos semi-sintéticos, la estructura es manipulada y modificada en sitios específicos para producir derivados, esto con la finalidad de lograr mejorar la molécula nativa en cuanto a eficiencia, potencia, menos efectos secundarios, especificidad etc.⁴

Las moléculas de origen natural, son generalmente metabolitos secundarios de organismos marinos, plantas y hongos, los cuales son utilizados como defensa hacia el medio externo, tal es el caso de la penicilina o las estatinas. Su amplia distribución en la naturaleza, origina que exista una gran diversidad de estructuras químicas complejas, por nombrar solo algunas con interés farmacológico tenemos a los: aminoglucósidos, polifenoles, flavonoides, macrólidos, poliéteres, terpenos y esteroides de origen vegetal, entre otros.^{4,5}

Saponinas

Generalidades

Los esteroides de origen vegetal, son catalogados como derivados triterpenoides, están conformados por un sistema de 3 anillos de seis carbonos y 1 anillo de cinco carbonos fusionados como núcleo central y el cual se comparte entre varios compuestos naturales biológicamente activos como: esteroles, glucósidos cardiacos, corticosteroides y saponinas.

Las saponinas, están constituidas básicamente por este núcleo esteroidal (fracción no polar) y regularmente metilados en las posiciones 10 y 13 (Fig. 1); además de una fracción sacárida (polar) que se encuentra unida al núcleo en diferentes posiciones. La porción no-sacárida de la molécula se conoce como aglicona y se denomina también “genina” o “sapogenina”. De manera general las saponinas poseen 27 carbonos y además del núcleo esteroidal algunas poseen dos anillos más, o en su lugar por hidrolisis química o enzimática una cadena carbonada, así dependiendo del tipo de genina presente, las saponinas se dividen en triterpenoides, esteroideas y alcaloides (Fig. 2).

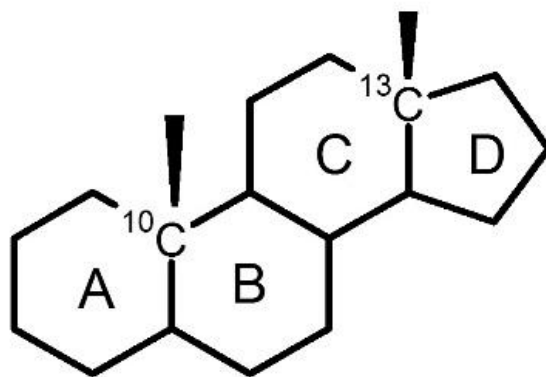
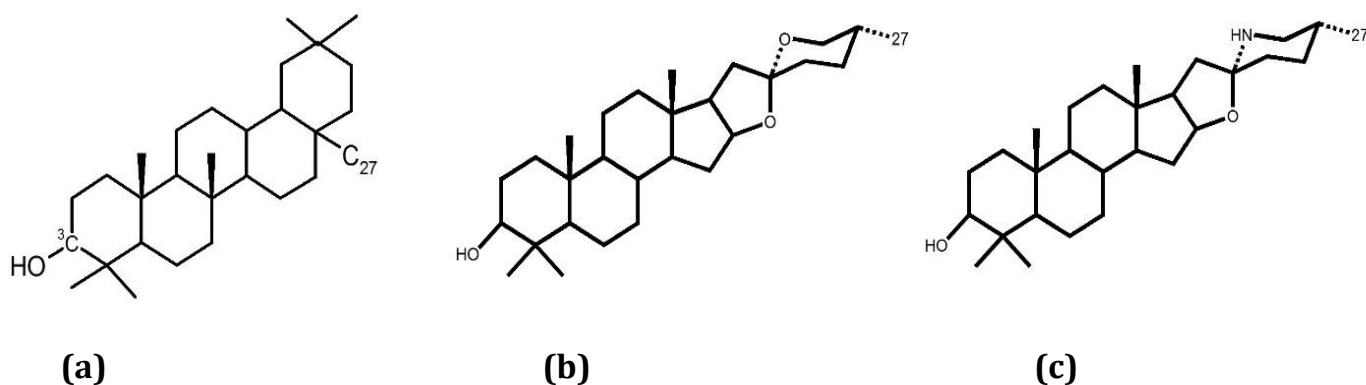


Figura 1. Estructura química general de las saponinas.

Las agliconas están normalmente hidroxiladas o glicosiladas en el C-3 de manera natural y algunos de sus metilos se encuentran oxidados en alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos. En general las saponinas pueden presentar uno o más sacáridos unidos a su genina, nombrándose monodesmosídica y bidesmosídica a aquellas agliconas que presentan uno y dos azúcares respectivamente en su estructura.⁶



(Obtenida de: Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Cambridge University Press. New York. 1985)

Figura 2. Clasificación de las saponinas: a) Triterpénica b) Esteroidal c) Alcaloidea

Las saponinas se encuentran principalmente en plantas y algunos animales marinos, presentan una gran variedad de propiedades químicas y farmacológicas, se caracterizan por producir soluciones jabonosas cuando están en solución acuosa; además, presentan propiedades hemolíticas, antiinflamatorias, antimicóticas, bactericidas, entre otras. En la industria farmacéutica son la estructura de partida en la preparación de diversos fármacos esteroidales, tal es el caso de la diosgenina y la sarsasapogenina que fueron transformadas en progesterona y de la hecogenina la cual se utiliza para la síntesis de corticosteroides como la cortisona y la betametasona.⁶⁻¹⁰

Actividad antitumoral de las Saponinas

Uno de los principales objetivos de la investigación científica es el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividades farmacológicas. La extracción, aislamiento y caracterización de productos naturales son tan solo una opción para lograr este objetivo. Un alto porcentaje de fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration*, (FDA) para enfermedades infecciosas y cáncer provienen de moléculas de origen natural.¹¹

Las saponinas han demostrado poseer varios efectos farmacológicos, ejemplo de ello son su capacidad para permeabilizar las membrana celular y lisar los eritrocitos humanos, también disminuye los niveles de colesterol sanguíneo, tiene efectos inmunoreguladores y provoca la estimulación y liberación de la hormona luteinizante.^{12,-15}

Las saponinas tienen influencia sobre la proliferación de células tumorales, presentando actividades citotóxicas y citostáticas, además disminuyen la invasión celular y promueven la apoptosis, entre otros.¹⁶ En cuanto a los efectos ejercidos sobre la proliferación celular, se ha demostrado que las saponinas disminuyen el potencial proliferativo de las líneas celulares de cáncer de próstata LNcaP¹⁶, células tumorales de pulmón A549¹⁷ y células HeLa de cáncer cérvico uterino entre otras¹⁷. Ejemplo de ello son, la saponina esteroideal OSW-1, extraída por primera vez del *Ornitógala saundersiae* y la cual presenta una actividad citotóxica 100 veces mayor a la del paclitaxel en líneas celulares de cáncer de estómago^{18,19} así como la hecogenina, saponina obtenida del *Agave sisalana*, que se presenta como una molécula inductora de apoptosis en la línea celular de osteosarcoma²⁰ y que además se utilizó en los años cincuenta como precursor en la síntesis de corticoesteroides.

La manipulación química de las saponinas se realiza ampliamente, para la producción de diferentes derivados con actividades farmacológicas diversas. Fuchs y colaboradores reportaron el uso de acetato de hecogenina en la síntesis de una subunidad de la cefalostatina²⁷. Por otro lado, el grupo de Jiménez publicó la síntesis de un análogo tipo cefalostatina/ritterazina a partir de hecogenina y 22-epi-hipuristanol²⁸.

En cuanto a su actividad antineoplásica, los derivados acetilados de la hecogenina demostraron inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno y detener el ciclo en la línea celular A549.

La manipulación químico-sintética de las moléculas, además de generar un cambio en su estructura, provoca al mismo tiempo el aumento o disminución de sus efectos terapéuticos, en un estudio realizado por Patrick y colaboradores, se demostró que hay una relación significativa entre la estructura de las saponinas y sus efectos biológicos sobre células de osteosarcoma humano.²¹⁻²⁶

En el presente trabajo se evaluaron dos compuestos derivados de esteroides colestánicos y de estructura similar (Fig. 3) en las líneas tumorales de CaCu HeLa, CaSki y ViBo. Dichos compuestos fueron sintetizados por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez con la colaboración de la Dra. Antonieta Fernández Herrera, esto en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, Facultad de Ciencia Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

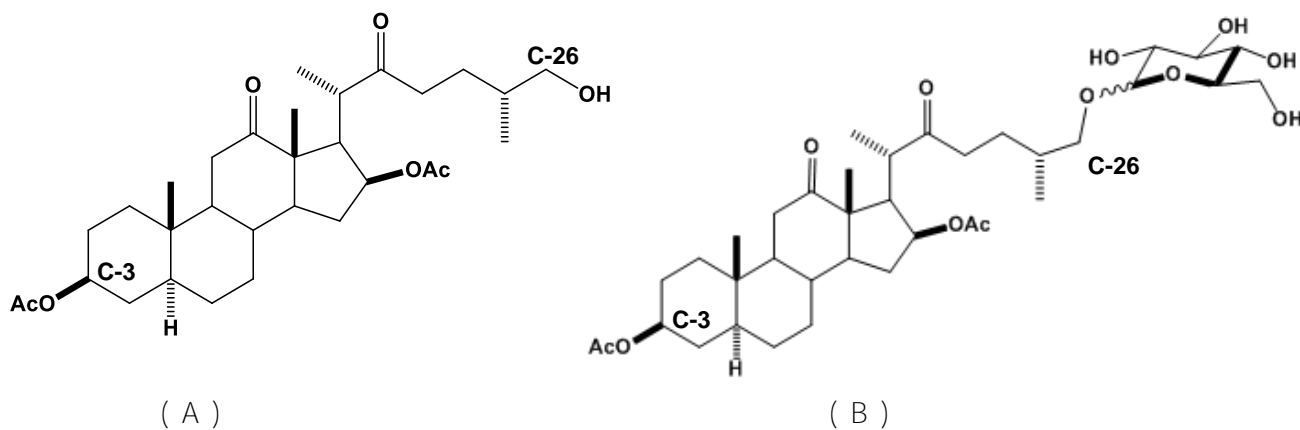


Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos: (A) 26-OH-He y (B) 26-Glu-He

Antecedentes

Cáncer

El cáncer es una de las dos principales causas de muerte en todo el mundo, superada solo por las cardiopatías, afectando a uno de cada tres individuos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2012 se generaron 14 millones de nuevos casos de cáncer, y refiere que las muertes aumenten de 8.2 millones a 13 millones en un año. Los tipos más frecuentes de cáncer son diferentes en el hombre y en la mujer. Los varones principalmente presentan cáncer de pulmón, estómago, riñón, colon y esófago; mientras que las incidencias de cáncer en mujeres son de seno, pulmón, estómago, colon y cérvix. Asimismo, se destaca que aproximadamente 70% de los decesos por cáncer, se presentan en países de ingresos bajos y medios donde se dificulta la atención de esta enfermedad. Las infecciones que pueden provocar cáncer, como las causadas por los virus de las hepatitis B y C y el del papiloma humano, son responsables del 20% de las muertes por cáncer en estos países y del 7% en los países de ingresos altos.²⁹

En México, el INEGI informó (Feb-2015), que en 2013, aproximadamente 10 % del total de la población falleció por algún tumor. En ese año, el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con un estimado de 15.1% de defunciones, mientras en los hombres fue la cuarta causa con un 11.8% del total de defunciones. En las mujeres los principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2013 fueron: el de mama (13.8%) y el cervicouterino (12.1%).³⁰

Actualmente para combatir este padecimiento se emplean diversos tratamientos como la cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales son poco efectivos en estadios avanzados del padecimiento y presentan una baja o nula selectividad, además de deteriorar al paciente por su gran cantidad de efectos colaterales.

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida en el control de la proliferación y muerte celular programada, esto debido a que los genes que controlan la reproducción celular son dañados ya sea por agentes físicos, químicos o biológicos. Junto con la pérdida de su funcionalidad primitiva, las células cancerosas adquieren además la capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático e invadir otros tejidos en un proceso conocido como metástasis.

Se conocen más de 100 diferentes tipos de cáncer y se clasifican de acuerdo con el origen embrionario del tejido del que se deriva.

- Carcinomas: Son tumoraciones que se originan en tejidos endodérmicos o ectodérmicos, como la piel, pulmones, colon, próstata, ovarios y otros.
- Leucemias: Son tumores malignos que se generan de las células hematopoyéticas de la médula ósea.
- Sarcomas: son malformaciones menos frecuentes, se derivan de tejidos conjuntivos mesodérmicos como hueso, grasa, cartílago y músculo.
- Linfomas: se originan en los ganglios linfáticos y en los tejidos del sistema inmunológico del cuerpo.³¹⁻³⁴

Cáncer cérvico uterino

Las neoplasias malignas del aparato reproductor femenino tienen, desde el punto de vista histológico, orígenes y comportamientos de acuerdo con los sitios anatómicos establecidos mundialmente por el comité internacional contra el cáncer (UICC). El cáncer de cuello de útero es uno de los más comunes en la mujer; su mayor incidencia ocurre entre la cuarta y quinta décadas de la vida. Existen en su origen factores de riesgo que favorecen la iniciación del mismo, tales como: las relaciones sexuales antes de los dieciocho años, el hábito de fumar, varias parejas sexuales y la falta de protección sexual.³⁵

El cáncer cervicouterino (CaCu) consiste en lesiones malignas del cuello uterino, los carcinomas se originan en el epitelio escamoso del exocérvix (carcinoma escamoso o epidermoide) con una prevalencia de entre el 80 y 85% y en el epitelio glandular del endocérvix (adenocarcinoma) con una prevalencia de 15-20%.³⁶

El CaCu presenta etapas precancerosas bien definidas, llamadas displasias, estas se clasifican desde leves (I) a moderadas (II) y severas (III); si estas displasias se tratan adecuadamente, puede evitarse el CaCu. Además, existen pruebas sencillas para su detección precoz, como la prueba citológica vaginal, de bajo costo y alta eficacia.³⁶

Se ha demostrado con certeza que el virus del papiloma humano (VPH) constituye un principal factor causal y participa en la iniciación y progresión de la enfermedad y provoca más del 95 % del cáncer de cérvix.^{37,38}

El VPH es un virus con ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, que infecta la mucosa y el tejido epitelial y se transmite por vía sexual, se conocen aproximadamente 118 tipos de VPH, los cuales se clasifican como de alto o bajo riesgo. Los VPH de alto riesgo causan la transformación maligna, mientras que los de bajo riesgo causan verrugas benignas y lesiones.³⁹

Todos los VPH presentan una organización genómica común y codifican 8 proteínas, seis de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y 2 de expresión tardía L1 y L2. Las proteínas oncogénicas principales son E6 y E7 y su expresión se controla normalmente durante el ciclo de vida viral, cuando el genoma viral se integra en el huésped. La sobre-expresión de las proteínas E6 y E7 conduce a la transformación maligna de las células y la tumorigénesis.⁴⁰

El epitelio cervical presenta una organización estratificada, donde las células de la capa basal conservan su capacidad mitótica, después de la división celular, una de las dos células generadas migra al estrato superior para completar su diferenciación terminal y la otra permanece en el estrato basal. Al ocurrir la infección con el VPH, el genoma viral es sintetizado en las células basales a partir de copias episomales, afectando a la progenie en cada división celular.

Ciclo celular y cáncer

El ciclo celular es el proceso natural mediante el cual las células eucariotas se reproducen, esto permite el desarrollo y crecimiento de los organismos de manera ordenada, manteniéndose así la homeostasis celular. Este proceso, está regulado por un conjunto de señales extra e intercelulares que dirigen el inicio y fin del ciclo celular, la pérdida de respuesta a estas señales provoca una división permanente, característica del cáncer.⁴¹

El ciclo está dividido en estadios o fases denominados G1, S, G2 y M, cada uno presenta eventos bien caracterizados. El ciclo comienza por acción de señales extracelulares, como factores de crecimiento, los cuales son captados por receptores celulares específicos en la membrana celular. Tras este evento, la célula abandona un estado de latencia o de no división (quiescencia) denominado como G0 y dará lugar a las fases del ciclo celular, G1, S, G2 y M. En ausencia de señales estimuladoras la célula puede permanecer en el estado G0 indefinidamente. Tras su entrada a la fase G1, la célula verifica las condiciones de su entorno así como las internas y si estas son propicias continua con el ciclo y avanza hacia la fase (S) y es en esta fase donde se realiza la duplicación del ADN que permitirá el posterior reparto de los cromosomas en la fase M. (Fig. 4).

El ciclo celular, está monitoreado por mecanismos de vigilancia que se encargan de verificar que los eventos en cada fase sean completados y correctos, estos puntos de control son conocidos como “checkpoints” y están localizados tanto en la parte final de la fase G1 como en la interface de G2-M y son vitales para el funcionamiento armónico de la división celular. Una anomalía en este proceso de verificación, dará lugar a que la célula se divida en condiciones anormales como: daño en el ADN o que los cromosomas no sean repartidos equitativamente. Estos fenómenos irregulares producen inestabilidad genómica, característica necesaria pero no exclusiva para la generación de cáncer.⁴¹⁻⁴²

Todos los eventos del ciclo celular están regulados por procesos de fosforilación intracelular, en los que interviene proteínas-quinasas denominadas ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDKs). Las ciclinas son unidades reguladoras de las CDKs y juntas forman complejos ciclina-CDKs que fosforilan a sustratos específicos que impulsan el inicio y la progresión del ciclo.

Las ciclinas son sintetizadas y degradadas de manera ordenada a lo largo del ciclo, en la fase inicial G1, las ciclinas D (D1, D2 y D3) se asocian y fosforilan a las CDK4 y CDK6, formando un complejo activo que a su vez fosforila a la proteína de retinoblastoma (Rb). La fosforilación de Rb libera a la proteína E2F y este factor nuclear de transcripción promueve la síntesis proteica incluyendo a la ciclina E, la cual es requerida para superar el primer checkpoint conocido como punto de restricción R.^{43,44}

En conjunto, todas estas moléculas representan componentes críticos de los mecanismos de control del ciclo celular; las alteraciones en los genes que las codifican ya sea en sobreexpresión o mal funcionamiento conllevan junto con otros factores a la producción y desarrollo del cáncer.⁴³

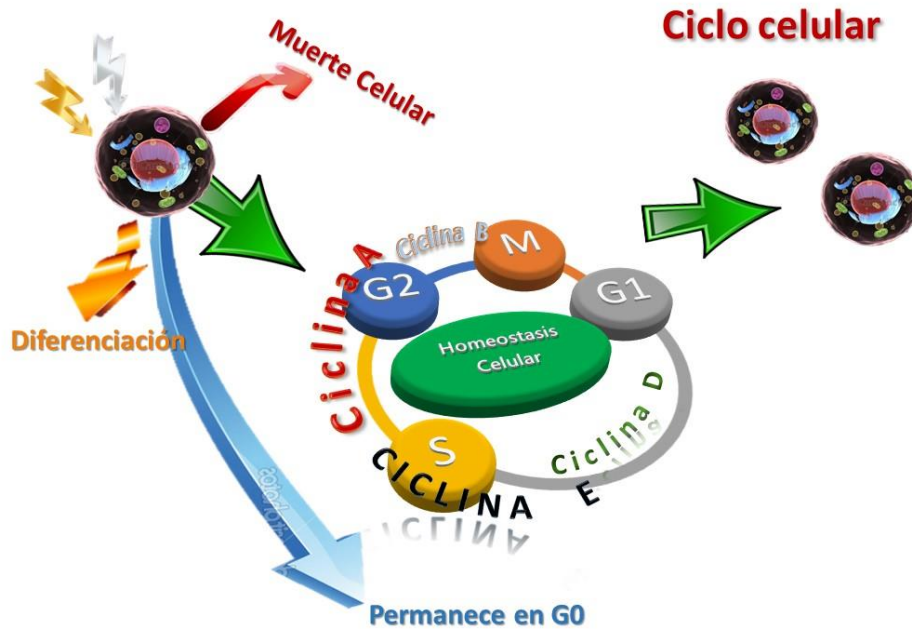


Figura. 4. Ciclo celular.

Receptores de esteroides y el cáncer

Las hormonas esteroideas estimulan el crecimiento celular de una manera muy diferente a otro tipo de factores mitogénicos. Su naturaleza lipofílica les confiere la capacidad de atravesar la membrana celular, atravesar el citoplasma y unirse a una familia particular de receptores específicos denominados receptores nucleares esteroideos (RNE).

Los RNE, son factores de transcripción activados por ligando y regulan la expresión de sus genes blanco. Pertenecen a una superfamilia de receptores endocrinos y participan en varios procesos fisiológicos tales como: señalización endocrina, reproducción, homeostasis celular y apoptosis. Cuando los receptores actúan directamente sobre el ADN se le denomina mecanismo genómico.⁴⁴

Se clasifican en base al ligando que reconocen y se dividen en receptores para; glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), estrógenos (ER), andrógenos(AR) y progesterona (PR). Estos receptores intervienen en diversos procesos biológicos vitales como: desarrollo, señalización endógena, reproducción y homeostasis así como procesos de muerte celular programada (Apoptosis), eventos que están regulados por el control en la expresión de genes blanco por parte de estos receptores y que pueden producir un mecanismo heterogéneo de inducción o inhibición del proceso apoptótico, según del tipo celular y de otros factores alternativos dentro de los genes blanco y co-moduladores.⁴⁴

De las hormonas que activan estos receptores, los glucocorticoides regulan una gran variedad de funciones biológicas, dentro de las que destacan su poder apoptótico. Se tiene conocimiento que los receptores a glucocorticoides GR junto con los MR, regulan la apoptosis en células de hipocampo en el sistema nervioso,⁴⁵ así como de atenuar la respuesta inflamatoria e inducen apoptosis en células hematopoyéticas, incluidos macrófagos, monocitos y linfocitos T.⁴⁶ En contraste se conoce que los GR provocan la inhibición de la apoptosis en neutrófilos.⁴⁷

Además de los mecanismos genómicos, se han descritos otros no genómicos, tal es el caso de los GR y su translocación a la mitocondria, paso fundamental para desencadenar la apoptosis.⁴⁸

Planteamiento del problema

El CaCu en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México durante el 2013, tuvo una prevalencia del 12.1% sólo por debajo del cáncer mamario (INEGI 2015). Para combatir esta enfermedad, existen diversos tratamientos, sin embargo, éstos son muy agresivos, poco selectivos y de nulo efecto en pacientes en fases avanzadas o terminales, lo que genera la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. Actualmente existe un gran interés por el empleo de compuestos de origen vegetal como método alternativo contra este padecimiento, entre las moléculas naturales se destacan las saponinas esteroidales y sus derivados, que han demostrado tener efectos antiproliferativos y apoptóticos en otros tipos de cáncer. Lo anterior permite proponer el empleo de dos nuevos compuestos para tratar líneas celulares de CaCu y evaluar su efecto sobre la proliferación celular, inducción de apoptosis y paralelamente, analizar si tiene nulo o bajo efecto necrótico y capacidad selectiva.

Hipótesis

Las saponinas presentan propiedades antifúngicas, hipocolesterolémicas, antidiabéticas, antioxidantes, anticancerígenas e inductoras de apoptosis. Diversos estudios revelaron que cambios estructurales en las saponinas influyen en la respuesta biológica por lo cual, se espera que los compuestos esteroidales, (26-OH-He y 26-Glu-He) derivados de la hecogenina, presenten actividad antiproliferativa, inductora de apoptosis, selectiva y no necrótica en las líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa, CaSki y ViBo

Objetivo General

Evaluar el efecto antiproliferativo, selectivo, no necrótico e inductor de apoptosis de los compuestos, 26-OH-He y 26-Glu-He, en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.

Objetivos particulares

1. Determinar la actividad antiproliferativa, expresada como la concentración requerida de los diferentes compuestos para inducir un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}).
2. Evaluar un efecto no-necrótico en las concentraciones de IC_{50} , en células HeLa, CaSki y ViBo así como en células linfocíticas de humano, mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos.
3. Determinar si los compuestos a la concentración de IC_{50} , inducen a las células HeLa, CaSki y ViBo a presentar una morfología característica de células apoptóticas y provocar la expresión de la proteína caspasa-3 en su forma activa.
4. Establecer si los compuestos en sus concentraciones de IC_{50} , afectan el potencial proliferativo de células linfocíticas, con el propósito de establecer un parámetro de selectividad.

Materiales y Métodos

Condiciones del cultivo celular.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad.

Las líneas celulares (CaSki, HeLa obtenidas de la ATTC y ViBo obtenida de la UMIEZ) provenientes de CaCu fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con 10 ml medio de cultivo RPMI-1640 con rojo de fenol (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX) y 5% de suero de neonato de ternera (SNT; Gibco, USA), previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos y ensayos que necesitaron de incubación se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂ y a una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuaire, USA). Para realizar las pruebas biológicas, las células fueron tomadas de cultivos proliferantes a una densidad del 70%.

Preparación de las soluciones de los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He.

- 1 mg de compuesto (**26-OH-He o 26-Glu-He**) fue disuelto en 100 µl de disolvente (Etanol) para una concentración final de 10 µg/µl.

Ensayo de proliferación celular

Determinación de la concentración que disminuye en un 50 % el número celular

Para establecer la IC_{50} (índice de concentración en la cual se disminuye en un 50% el número celular) en las líneas tumorales provenientes de CaCu, se sembraron 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), una placa para cada una de las líneas celulares (HeLa, CaSki y ViBo) con 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SNT por pozo e incubadas durante 24 h. Al término de este periodo se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100 μ l a cada pozo de RPMI-1640 al 5% de SNT con los compuestos correspondientes, 26-OH-He y 26-Glu-He a concentraciones de 3.125, 6.25, 25, 50, 100 μ g/ml. En el ensayo se utilizaron, células control a las que sólo se les reemplazó el medio de cultivo y células para evaluar el efecto del disolvente, a estas últimas se les agregaron 100 μ l de medio RPMI-1640 al 5% de SNT, al 10 % de etanol. El número celular se evaluó a las 24 h mediante la técnica de cristal violeta. Se retiró el medio de cultivo de los pozos se agregaron 50 μ l el fijador glutaraldehído (Sigma, USA) al 1.1% en agua desionizada y se mantuvo durante 20 min. Posteriormente se retiró el fijador, se lavó la placa 3 veces con agua destilada y se dejó secar al aire, posteriormente se agregaron 50 μ l el colorante cristal violeta (Sigma, USA) al 0.1% en ácido fórmico (Sigma, USA) durante 20 min. Al término de este tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada para retirar el exceso de colorante. Se dejó secar al aire. Por último, se solubilizó el colorante con 50 μ l de una solución de ácido acético al 10% (J.T. Baker, MEX) y se mantuvo en agitación durante 10 min para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en lector de placas (Image Tecan Spectra). Cada uno de los tratamientos se realizó por sextuplicado. En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal para la obtención de la concentración que disminuye la población celular en un 50% (IC_{50}).

Ensayo de citotoxicidad por liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

El ensayo de citotoxicidad se realizó con el kit de LDH Cyto Tox 96 (Promega, USA). En placas de 96 pozos y de manera independiente para cada línea celular (CaSki, HeLa y ViBo) fueron sembradas 7,500 células/pozo en 100 µl de RPMI 5% de SNT y se mantuvieron en condiciones de incubadora por 24 h. Se ubicaron en la placa de cultivo, células control, células para control positivo a LDH, células para evaluar el efecto del etanol y células para evaluar el efecto de los compuestos. Tras las primeras 24 h se retiró el medio y se realizaron los siguientes tratamientos: remplazo por medio fresco a las células control negativo y positivo (100 µl), adición de la IC₅₀ del compuesto en RPMI al 5% de SNT (100 µl) y adición RPMI-Etanol (100 µl) para evaluar el efecto del disolvente. Después de otras 23 h de incubación, al control positivo le fue remplazado el medio por 100 µl de medio fresco al 1% de Triton-X-100 y regresado a incubación. A término de 24 h totales se recolectó individualmente el medio de cultivo en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml los cuales fueron centrifugados a 14 000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados y transferidos a una placa de 96 (50 µl por pozo). Se adicionaron además 50 µl de mezcla de reacción a cada pozo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 30 min., tiempo tras el cual, se determinó la absorbancia de las muestras a 490 nm. en un lector de placas para Elisa (ChroMate, USA). Los datos fueron analizados haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100 y la actividad fue determinada por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 100 \times \frac{(\text{Densidad Optica } 490\text{nm}) \text{ Liberación experimental LDH}}{(\text{Densidad Optica } 490\text{nm}) \text{ Liberación máxima de LDH}}$$

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación de la proliferación de linfocitos humanos por la incorporación de carboxifluoresceína

La sangre periférica de un donador presuntamente sano (20 ml) fue vertida en tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pyrex, USA) con 5 ml de Histopaque (Sigma, USA) (un total de 4 tubos). Se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA) inicialmente a 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, velocidad a la cual se mantuvo por 25 minutos más. Terminado el tiempo de centrifugación, se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos. El paquete celular de cada tubo fue transferido a tubos limpios en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. y se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (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 incubó durante 1 h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 min., se lavaron 3 veces y se retiró el sobrenadante, el botón se resuspendió en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para marcar las células linfocíticas con carboxifluoresceína (CSFE) (Sigma, USA), los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l/ml de solución carboxifluoresceína (2 mM) o por millón de células y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS al 5% de SFB, se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y nuevamente fueron resuspendidos en 4 ml de RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (FHG), los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10^6 células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 μ l de FHG/ml (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realizó en ese momento: control sólo con medio de cultivo con y sin FHG, control para el disolvente al cual se le agregó la cantidad de etanol empleada en la

preparación de la IC₅₀ más alta y más baja obtenida para las células CaCu y las correspondientes para los compuestos

Las células contenidas en cada tubo cónico se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 µl medio de cultivo y fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 hrs. Para la evaluación las células se cosecharon extrayendo todo el medio de cultivo y recolectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de verseno frío y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó de nuevo y se retiró el verseno. El botón celular se resuspendió con 500 µl de PBS y se agregaron 500 µl de p-formaldehído al 2 %. El índice de proliferación se determinó por citometría de flujo y los datos fueron procesados con el programa WinMDI 2.9. (Purdue University Cytometry Laboratories)

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares

Las células provenientes de CaCu se sembraron en cajas de 24 pozos a una densidad inicial de 50,000 células/pozo en 500 µl de RPMI-1640 al 5 % de SNT e incubadas durante 24 hrs. Posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se sustituyó con 500 µl medio fresco conteniendo los compuestos en su IC₅₀ determinada para cada línea celular, colchicina 20 µl/ml y un control solo con cambio por medio de cultivo al 5% de SNT fresco. El tratamiento se mantuvo por 24 hrs. Las células se cosecharon y fijaron en etanol al 70 % por 30 min. a 4°C, al término del tiempo fueron lavadas 2 veces con PBS.

Posteriormente se adicionaron 50 µl de una solución de anticuerpo primario policlonal anti-caspasa 3 desarrollado en conejo a una dilución de 1:500 en PBS y se incubaron por 12 hrs. a 4°C. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS y se adicionaron 25 µl de una solución de anti-anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FIT-C) en una dilución 1:250 en PBS y se dejó incubar por 2 hrs. a 4°C. Al término del tiempo, las células fueron lavadas 2 veces con 0.5 ml de PBS y el botón fue suspendido en

500 μ l de PBS y las células marcadas fueron cuantificadas por citometría de flujo, en un citómetro (FACSAria II BD); los datos fueron procesados con el programa WinMDI 2.9. (Purdue University Cytometry Laboratories)

Condensación de cromatina por tinción con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Las células tumorales de las líneas de CaCu, CaSki, HeLa y ViBo (30,000) fueron sembradas en cubreobjetos de 1X1 cm a una densidad celular de 30,000 en un volumen de 5 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT en cajas de Petri de 50 mm, 1 caja por condición. Al paso de las 24 hrs. se procedió a retirar el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos en un volumen de 5 ml: un control al que únicamente se le hizo un cambio de medio de cultivo, un control con un volumen de etanol igual al empleado para preparar la IC₅₀ correspondientes a cada uno de los compuestos, los tratamientos con los compuestos a la concentración IC₅₀ determinada para cada línea celular y un control positivo de colchicina a una concentración de 20 μ l/ml. El estímulo se mantuvo por 24 hrs. Posteriormente las células se fijaron con para-formaldehído al 2 % en PBS (el cual se preparó al momento) por 15 minutos. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS. A continuación se procedió a incubar con DAPI (Sigma-Aldrich, USA) por 60 segundos, las muestras se lavaron 3 veces con PBS en cámara húmeda; 1 minuto cada lavado. Las preparaciones se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, USA), se etiquetaron y guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Japan).

Análisis estadístico.

Los datos fueron presentados como la media SD y analizados por una prueba de Tukey.

Resultados

Actividad antiproliferativa en células tumorales HeLa, CaSki y ViBo

Para determinar la actividad antiproliferativa de los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He en células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados a concentraciones crecientes en un rango de 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$ y la actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto que abate en un 50% el número celular (IC_{50}).

Los resultados obtenidos (Fig. 5 y 6) demuestran que los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He provocan una disminución de la población celular en las tres líneas tumorales y que este decremento es dependiente de la concentración.

Las células CaSki presentaron una mayor sensibilidad al compuesto 26-OH-He, en tanto que las células ViBo lo hicieron al compuesto glicosilado con las IC_{50} de 14 $\mu\text{g/ml}$ y 31 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. A la concentración más alta (100 $\mu\text{g/ml}$) el porcentaje de proliferación es aproximadamente 20% en todas las líneas celulares y para ambos compuestos.

Compuesto 26-OH-He

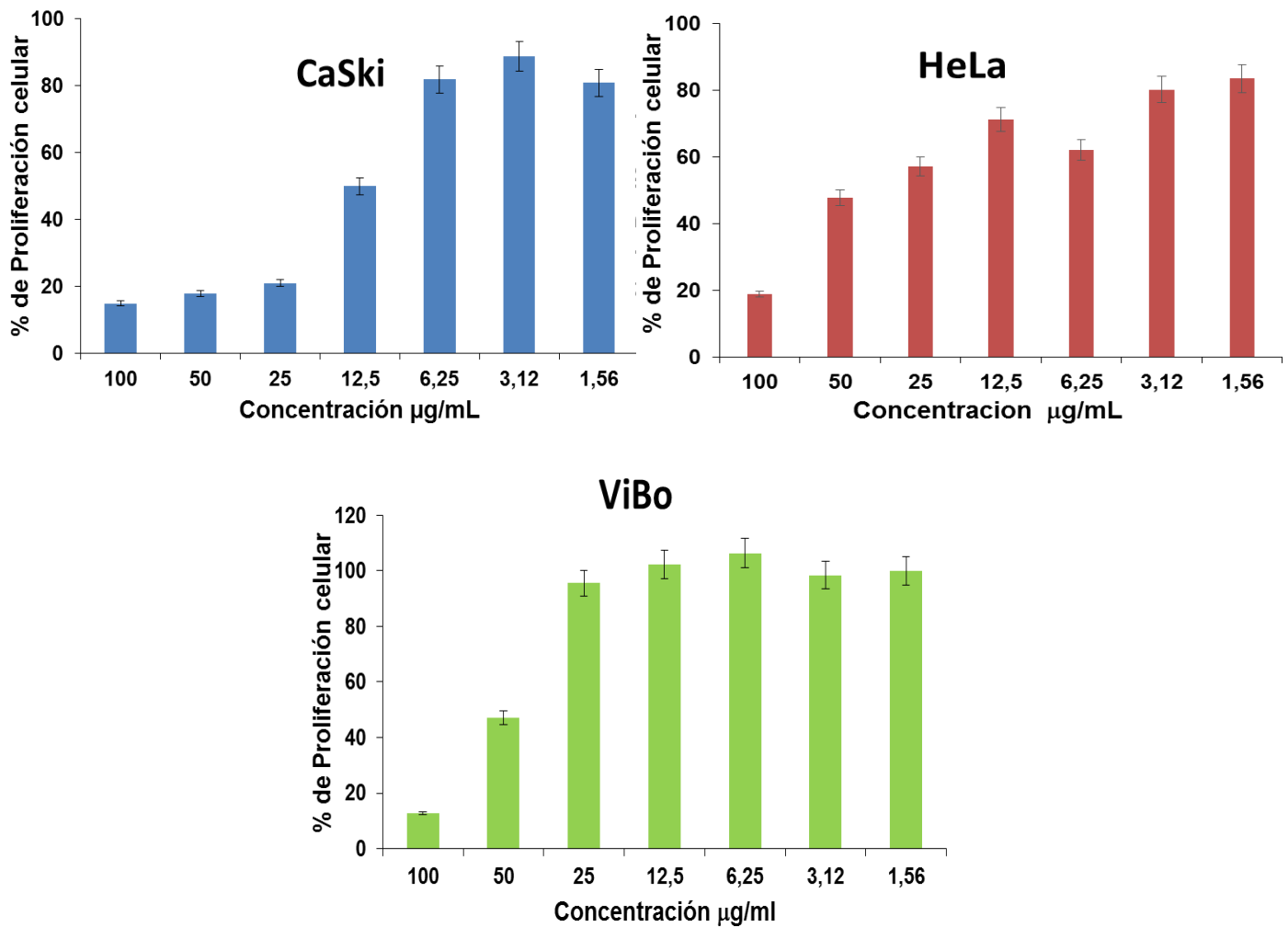


Figura 5. Efecto del compuesto 26-OH-He sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. Las células se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7,500 células/pozo por 24 hrs. y posteriormente fueron expuestas al compuesto en dosis de 1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml por 24 hrs. El número celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes. Cada punto representa la media de cada condición evaluada por sextuplicado.

Compuesto 26-Glu-He

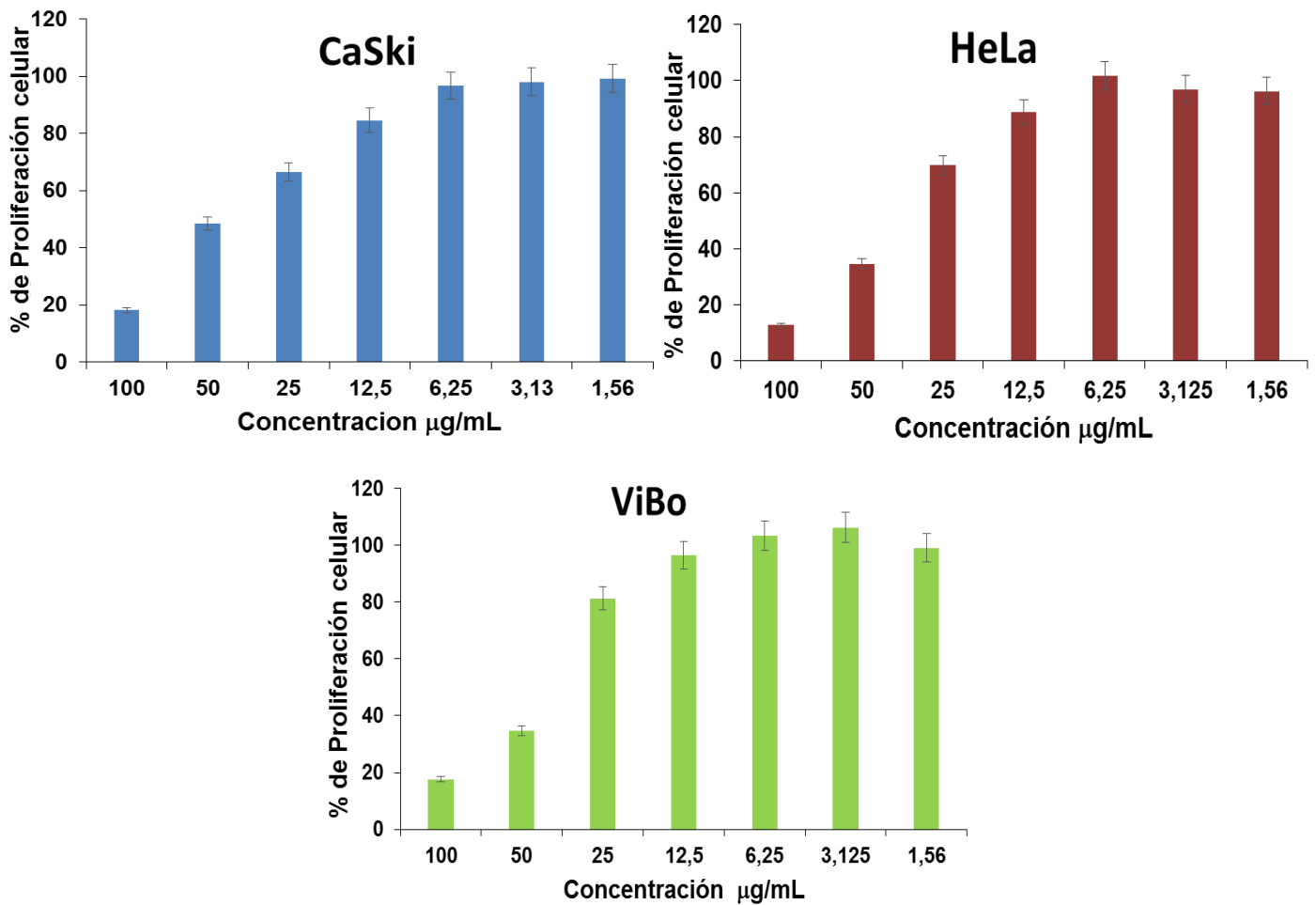


Figura 6. Efecto del compuesto 26-Glu-He sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo. Las células se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7,500 células/pozo por 24 hrs. y posteriormente fueron expuestas al compuesto en dosis de 1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml por 24 hrs. El número celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes. Cada punto representa la media de cada condición evaluada por sextuplicado.

IC₅₀ calculadas

Concentraciones que abaten el 50% del número celular

LINEA	IC ₅₀ 26 - OH - He $\mu\text{g/ml}$	IC ₅₀ μM
HeLa	50	94
CaSki	14	26
ViBo	52	97
	IC ₅₀ 26 - Glu- He $\mu\text{g/ml}$	
HeLa	45	65
CaSki	44	63
ViBo	31	44

Tabla 1. IC₅₀ de los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He en las líneas celulares HeLa y CaSki y ViBo.

Actividad antiproliferativa en linfocitos de sangre periférica humana (LSPH)

Las principales desventajas de los compuestos antitumorales son; su elevada citotoxicidad y nula selectividad, con la finalidad de establecer la selectividad de nuestros compuestos, linfocitos de sangre periférica humana de individuos presuntamente sanos, fueron expuestos a las concentraciones de IC₅₀ obtenidas para los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He y el número celular fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína y cuantificado por citometría de flujo (Fig. 7 y Fig. 8).

Los resultados demuestran que el 26-Glu-He no disminuye la proliferación de los linfocitos de sangre periférica humana, en tanto que el compuesto 26-OH-He si inhibe su proliferación en hasta en un 90 % en la concentración de 52 $\mu\text{g/ml}$.

Compuesto 26-Glu-He

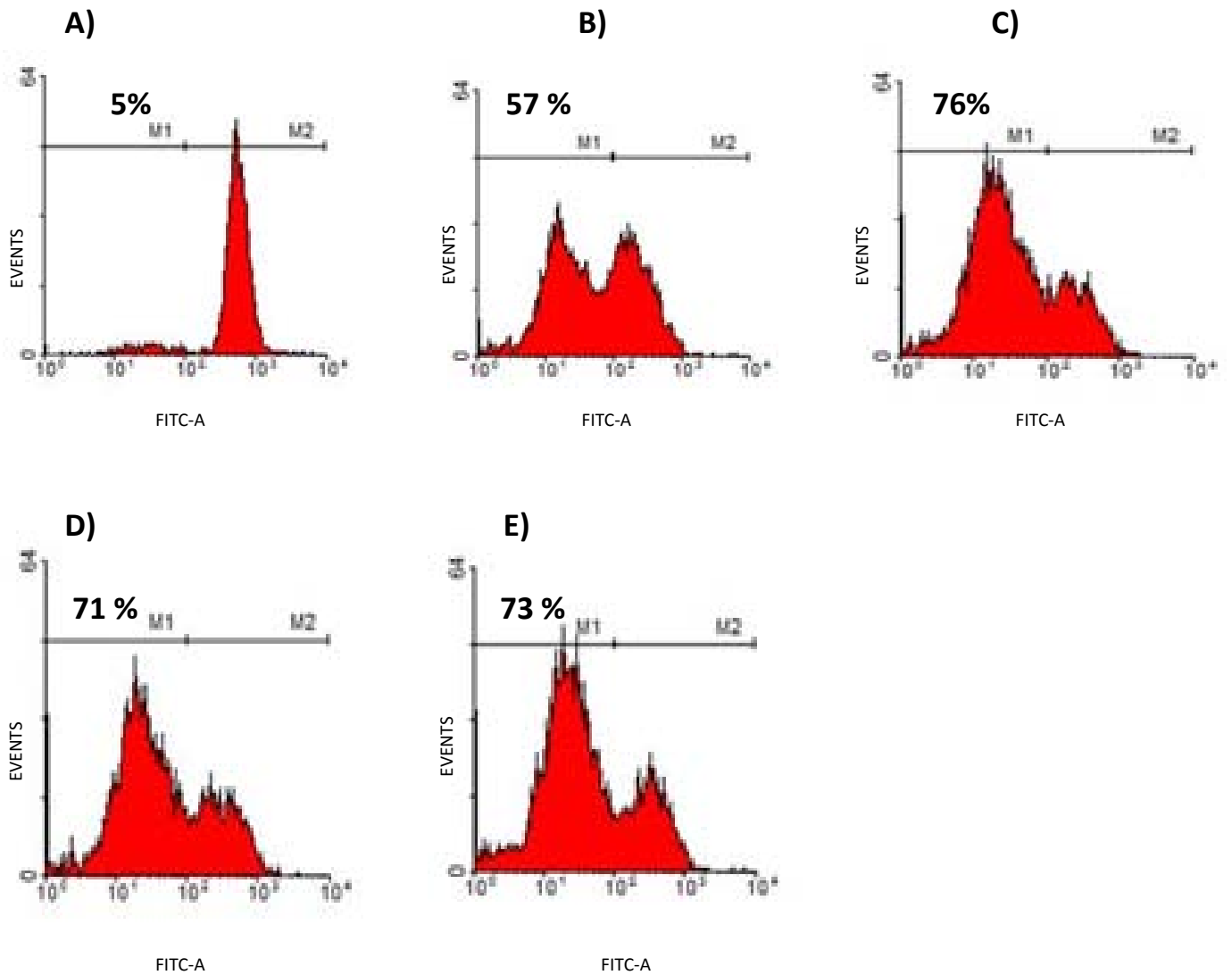


Figura 7. Efecto del compuesto 26-Glu-He sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. A) LSPH sin tratamiento. B) LSPH en presencia de FHA C) LSPH con 4.5 μ l de etanol D) LSPH expuestos a la IC₅₀ 45 μ g/ml E) LSPH expuestos a la IC₅₀ 31 μ g/ml. M1 es la región de proliferación y M2 región de no-proliferación.

Compuesto 26-OH-He

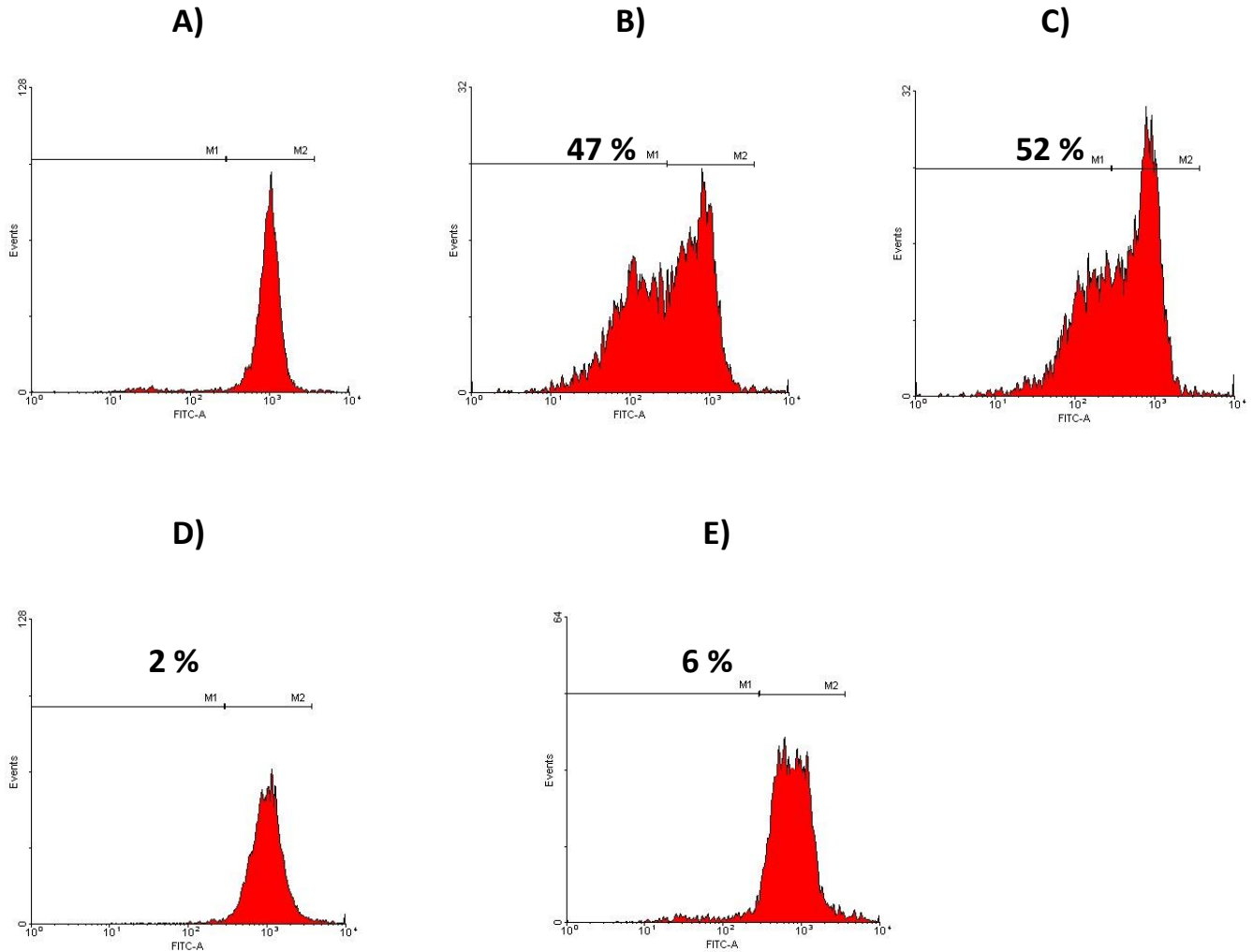


Figura 8. . Efecto del compuesto 26-OH-He sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. A) LSPH sin tratamiento. B) LSPH en presencia de FHA C) LSPH con 5 μ l de etanol D) LSPH expuestos a la IC₅₀ 52 μ g/ml E) LSPH expuestos a la IC₅₀ 50 μ g/ml. M1 es la región de proliferación y M2 región de no-proliferación.

Evaluación de la citotoxicidad de las saponinas 26-OH-He y 26-Glu-He en líneas tumorales de CaCu

Con la finalidad de establecer si el decremento celular originado por los compuestos se debe a un efecto citotóxico, evento biológico caracterizado entre otros aspectos por daño en la membrana celular y consecuente liberación del contenido citoplasmático, entre los que se encuentra la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH), cultivos de las tres líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con sus respectivas IC₅₀ de ambos compuestos y la enzima LDH fue cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante el Kit Cytotox (figura 9 tabla 2).

Liberación de LDH en células tumorales HeLa, CaSki y ViBo

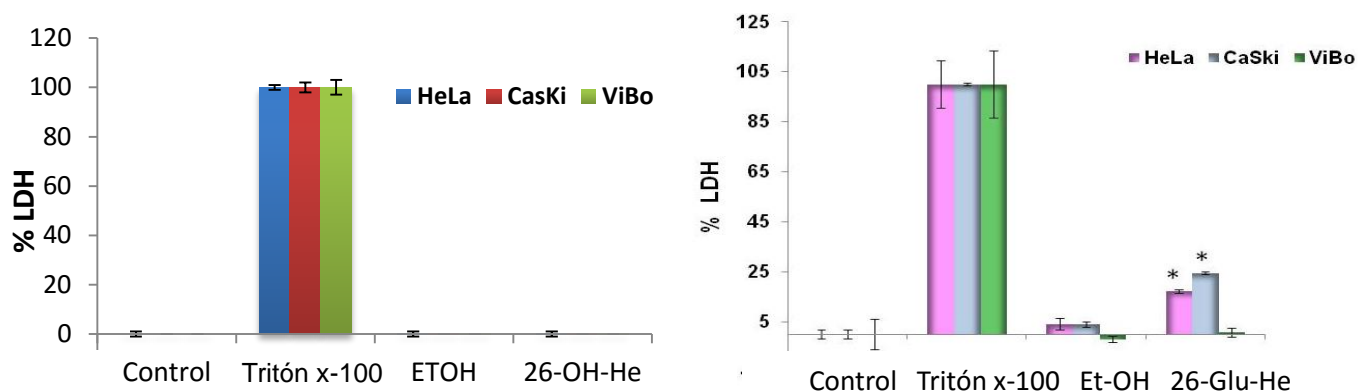


Figura 9. Determinación de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares tumorales. Células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron expuestas a las concentraciones de IC₅₀ de 26-OH-He y 26-Glu-He por 24 hrs. La liberación máxima de la LDH se determinó con tritón X-100 en un cultivo como control (Positivo) y el resultado fue tomado como el 100 % de actividad. El control (Negativo) consistió en células sin tratamiento, además se utilizó etanol para evaluar el efecto del disolvente. La gráfica muestra uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se realizó por triplicado.

C é l u l a s t u m o r a l e s			
Línea Celular	Compuesto	IC₅₀ (µg/ml)	% LDH
CaSki		14	3
HeLa	26-OH-He	50	5
ViBo		52	5
CaSki		44	24
HeLa	26-Glu-He	45	17
ViBo		31	0.79

Tabla 2. Valores de la actividad de la LDH en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo tratadas con sus respectivas IC₅₀ de los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He medido como porcentaje de células lisadas.

Los resultados mostrados indican que el 26-OH-He no induce liberación de la LDH en los cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo, mientras que el compuesto 26-Glu-He induce actividad de la LDH en un máximo de 25%, indicando que ambos compuestos son de nula o baja actividad citotóxica.

Evaluación de la citotoxicidad mediante la liberación de la LDH en células no tumorales (Linfocitos Humanos)

Con la finalidad de establecer si los compuestos 26-OH-He y el 26-Glu-He inducen necrosis en las células no tumorales, cultivos de células linfocíticas fueron tratados con las dosis de IC₅₀ de estos compuestos de manera independiente y la presencia de la LDH fue determinada mediante el kit Cytotox (Promega, USA) (Fig. 10, Tabla 3).

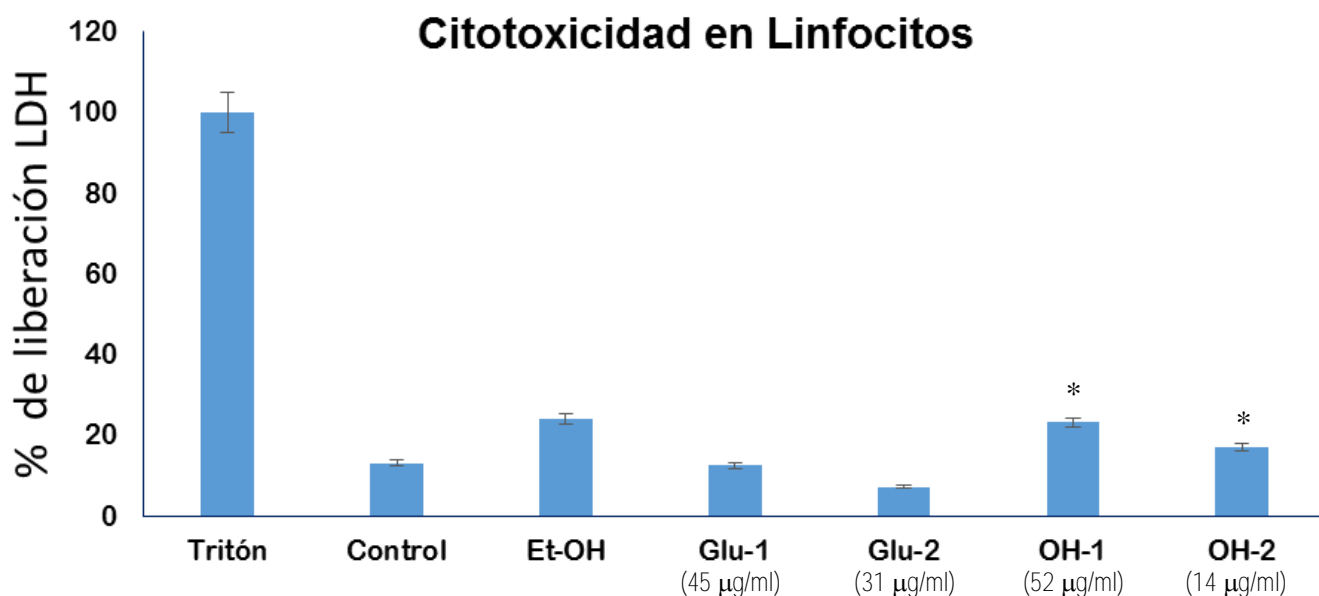


Figura 10. Determinación de la enzima LDH en sobrenadantes de cultivos de células linfocíticas. Sobrenadantes provenientes de los cultivos de linfocitos humanos tratados con la IC_{50} respectiva de cada compuesto, fueron centrifugados para la determinación de la presencia de la LDH. Glu-1 (26-Glu-He; 45 $\mu\text{g/ml}$), Glu-2 (26-Glu-He; 31 $\mu\text{g/ml}$); OH-1 (26-OH-He 52 $\mu\text{g/ml}$), OH-2 (26-OH-He; 14 $\mu\text{g/ml}$). La liberación máxima (100%) se determinó con Tritón X-100 y se tomó como control positivo. Para el control se utilizaron células sin tratar y fue empleado Etanol como control de disolvente. La gráfica muestra uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se realizó por triplicado.

Linfocitos humanos		
Compuesto	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	% LDH
OH-1 (26-OH-He)	52	10
OH-2 (26-OH-He)	14	3
Glu-1 (26-Glu-He)	45	0
Glu-2 (26-Glu-He)	31	0

Tabla 3. Valores de la determinación de la LDH en los sobrenadantes de medios cultivos de Linfocitos humanos.

La fig. 10 representa los niveles de LDH liberados en las células linfocíticas tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He y se aprecian niveles de liberación de la LDH bajos o nulos, lo que demuestra que los compuestos no inducen muerte necrótica en linfocitos. (Tabla 3)

Morfología celular

Las células que mueren por apoptosis presentan ciertas características morfológicas que distinguen a este proceso de eliminación; disminución del tamaño celular, condensación y compactación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Para evaluar si el 26-OH-He y el 26-Glu-He son capaces de dirigir a la célula a una muerte por apoptosis, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo se trataron con las IC_{50} respectivas para cada línea celular y las características morfológicas celulares fueron evaluadas a nivel de microscopia óptica, utilizando la iluminación de contraste de fases, así como la tinción fluorescente del núcleo con el colorante 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Los resultados demuestran que tras el tratamiento con los compuestos, las células adquieren cambios morfológicos evidentes con respecto los controles. (Fig. 11, 12 y 13)

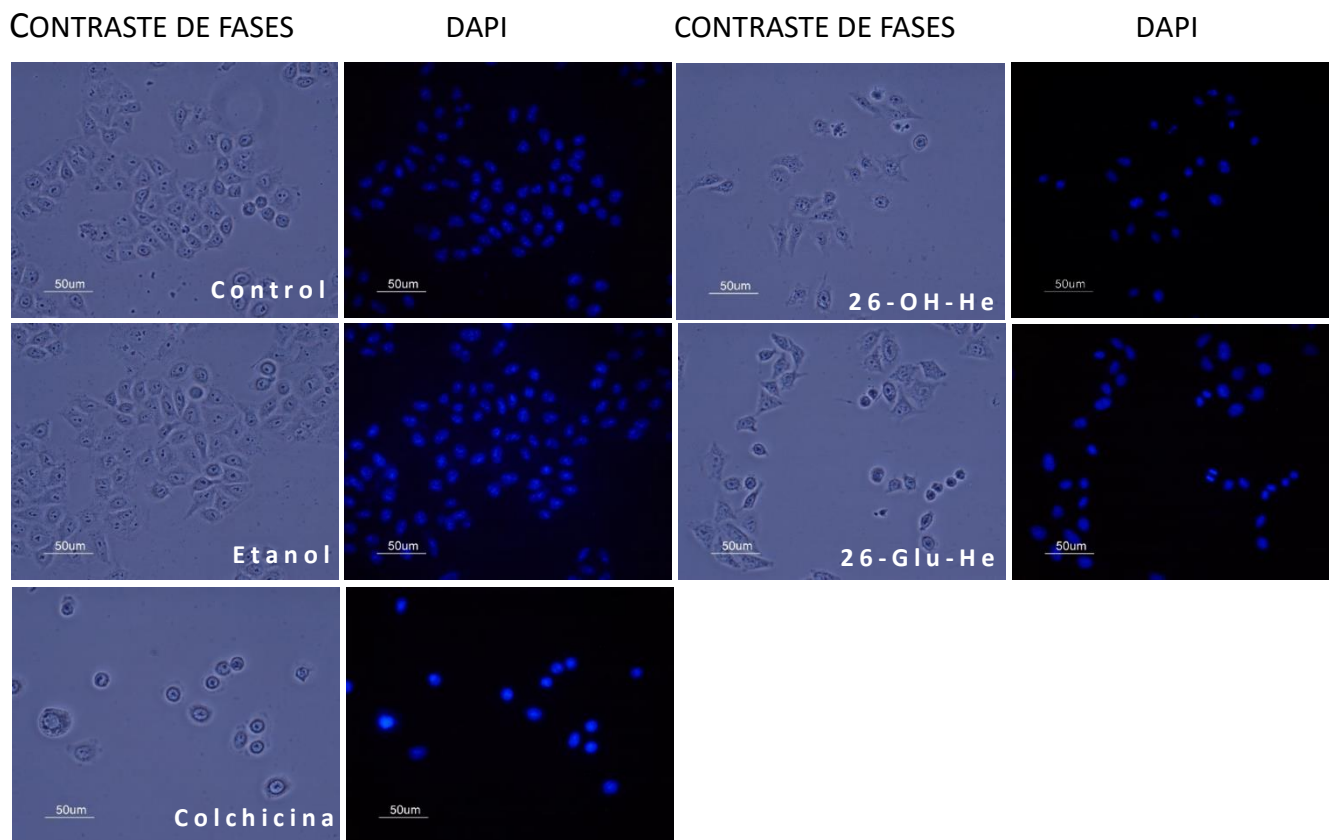


Figura 11. Micrografías ópticas de células HeLa tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He. Las células fueron tratadas con la IC_{50} por 24 hrs. y teñidas por la técnica de DAPI. Para el control positivo de apoptosis, se utilizó colchicina $10 \mu\text{l/ml}$ al 0.5%. En contraste de fases se puede observar la morfología celular. En azul, DAPI se evidencia la distribución y compactación de la cromatina nuclear en los diferentes tratamientos.

CONTRASTE DE FASES

DAPI

CONTRASTE DE FASES

DAPI

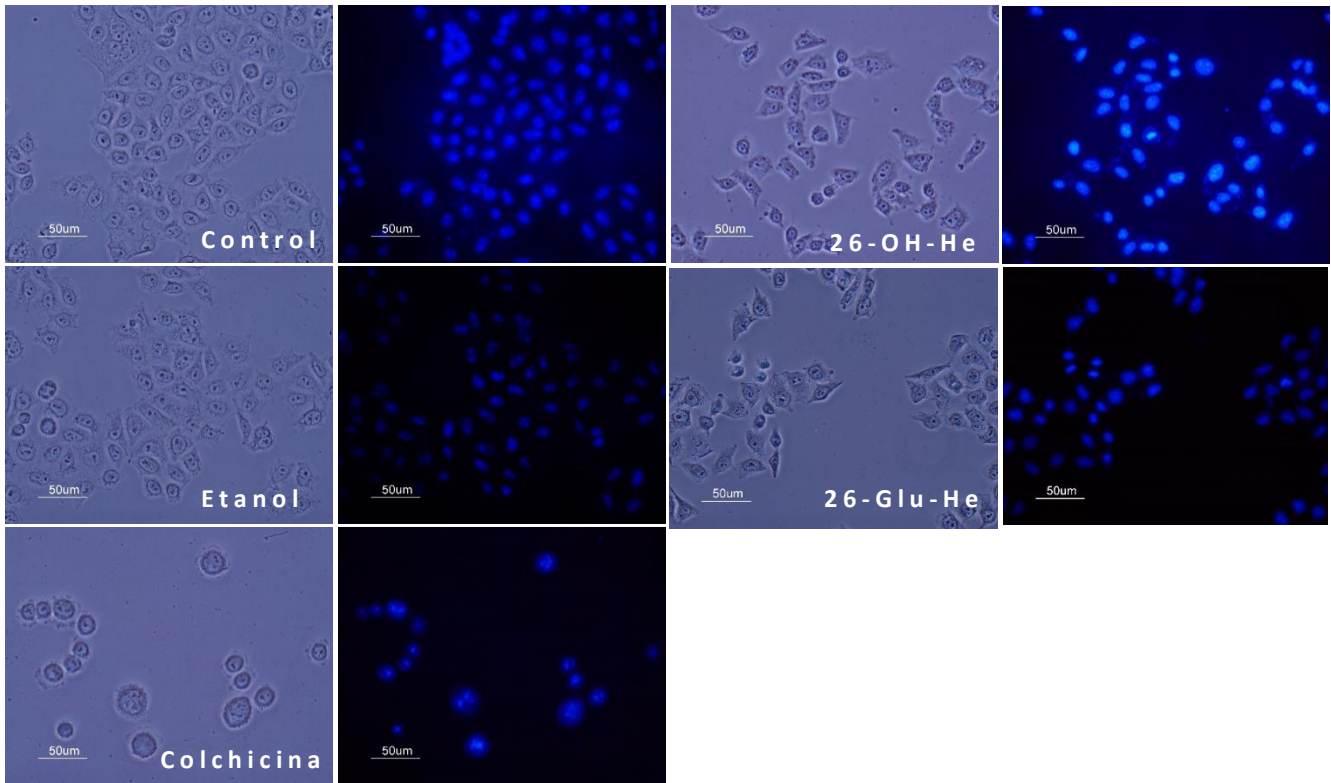


Figura 12. . Micrografías ópticas de células CaSki tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He. Las células fueron tratadas con la IC_{50} por 24 hrs. y teñidas por la técnica de DAPI. Para el control positivo de apoptosis, se utilizó colchicina 10 μ l/ml al 0.5%. En contraste de fases se puede observar la morfología celular. En azul, DAPI se evidencia la distribución y compactación de la cromatina nuclear en los diferentes tratamientos.

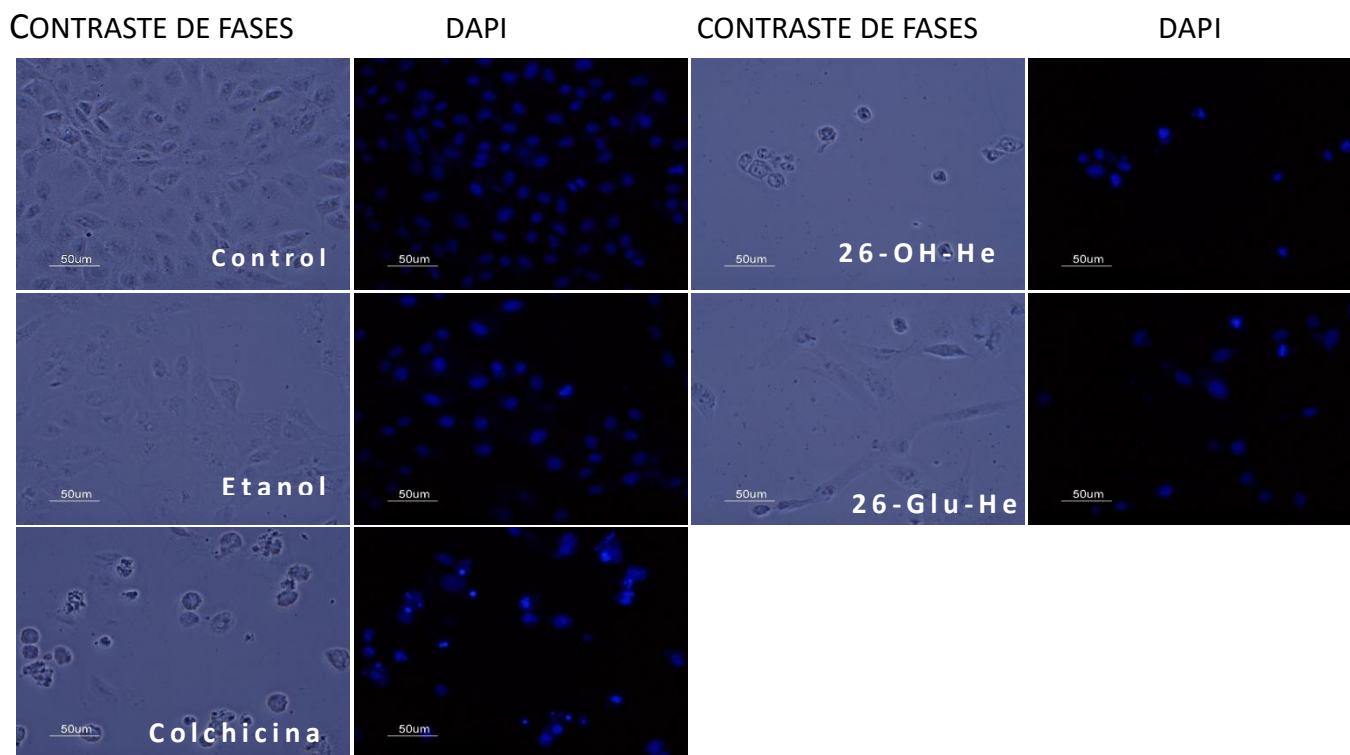


Figura 13. . Micrografías ópticas de células ViBo tratadas con los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He. Las células fueron tratadas con la IC_{50} por 24 hrs. y teñidas por la técnica de DAPI. Para el control positivo de apoptosis, se utilizó colchicina $10 \mu\text{l/ml}$ al 0.5%. En contraste de fases se puede observar la morfología celular. En azul, DAPI se evidencia la distribución y compactación de la cromatina nuclear en los diferentes tratamientos.

En las micrografías del contraste de fases es posible apreciar que las células control presentan, forma poliédrica, buena adherencia, citoplasma extendido, se observan los núcleos redondeados y bien definidos, ocupando una gran parte del citoplasma, condición que se resalta en la tinción con DAPI, donde se observa la cromatina, distribuida en toda el área nuclear (Fig. 11, 12 y 13). En contraposición, en las células expuestas a los compuestos, se hace evidente el cambio en la morfología. Para ambos compuestos y en las 3 líneas, claramente se observa la pérdida en la adherencia intercelular, evidenciada por la carencia o disminución de las proyecciones citoplasmáticas, se aprecian células más pequeñas y esféricas, los núcleos en algunas células ya no se distinguen claramente del citoplasma, debido a la contracción de ambos elementos.

También se distinguen algunas células con protuberancias en la membrana fenómeno conocido como “blebbing”.

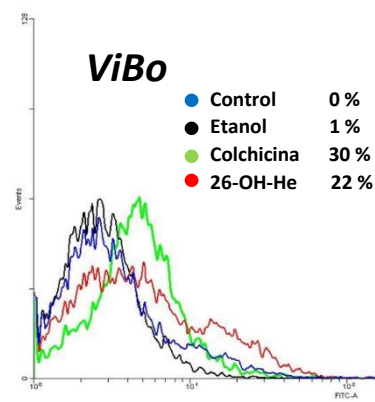
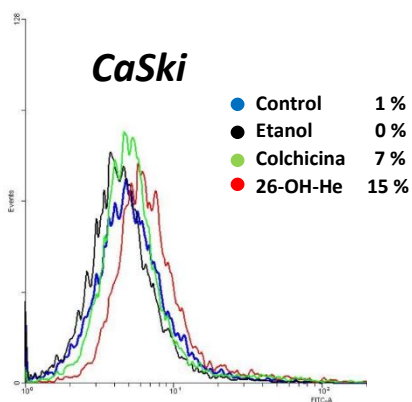
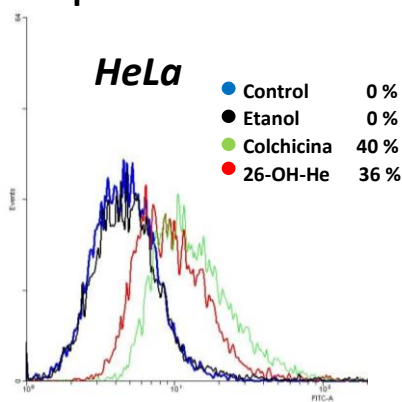
Con la tinción de DAPI, los cambios nucleares son más evidentes: hay una disminución en el tamaño del núcleo, también se pueden apreciar indicios de fragmentación nuclear por condensación de la cromatina (Fig. 11, 12 y 13).

Las características morfológicas de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, al ser expuestas a la IC₅₀ de los compuesto 26-OH-He y 26-Glu-He son similares a las células tratadas con colchicina, el cual se conoce como una molécula inductora de apoptosis, lo que sugiere los compuestos evaluados inducen a las células tumorales a adquirir una morfología característica de apoptosis.

Determinación de la caspasa-3 activa como parámetro de muerte celular apoptótica

Con la finalidad de confirmar si las células están cursando un proceso apoptótico, se realizaron ensayos para determinar la presencia de caspasa-3 en su forma activa, esta es una proteasa ejecutora característica de esta vía de muerte. Para ello, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas a las concentraciones de sus respectivas IC_{50} y la presencia de la caspasa-3 activa fue evaluada por citometría de flujo (Fig. 14).

Compuesto 26-OH-He



Compuesto 26-Glu-He

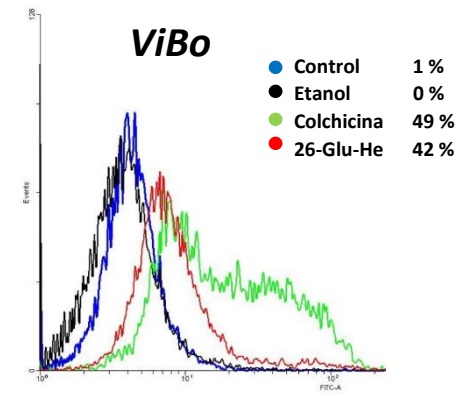
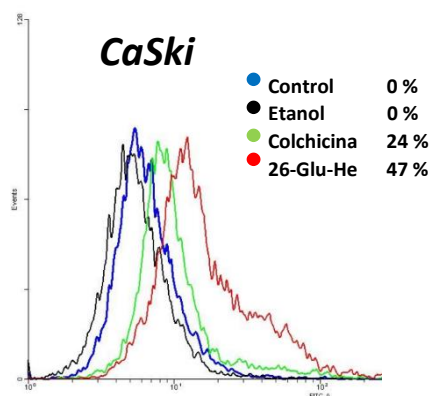
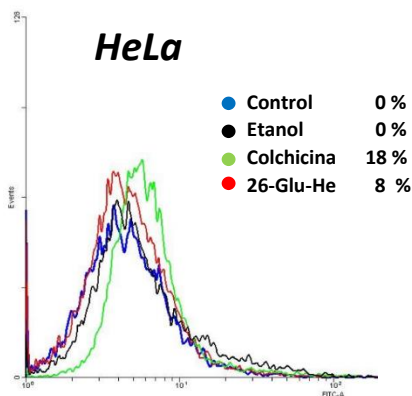


Figura 14. Detección de la caspasa 3 activa en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, tratadas con sus respectivas IC_{50} . Graficas superiores compuesto 26-OH-He vs Líneas tumorales. Graficas inferiores compuesto 26-Glu-He vs Líneas tumorales. Como control positivo se utilizó a la colchicina. Los porcentajes representan la cuantificación de caspasa 3 activa determinada por citometría de flujo. La gráfica muestra uno de tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos demuestran que el compuesto 26-OH-He induce una ligera activación de la caspasa-3 activa en las líneas CaSki y HeLa, siendo en la línea celular HeLa, donde presenta un mayor porcentaje de activación de esta enzima con un 30%. En tanto que el 26-Glu-He, indujo una activación menor de caspasa-3 en las células HeLa y CaSki y con un máximo de expresión en las células CaSki, estos resultados demuestran ambos compuestos promueven la expresión de la caspasa-3 en su forma activa.

Discusión

Los principales efectos secundarios de los fármacos antitumorales son originar una muerte necrótica en las células y baja selectividad contra las células tumorales, condiciones que limitan fuertemente el éxito de la terapia por los efectos colaterales que estas condiciones provocan. En consecuencia, un gran número de investigaciones centran sus esfuerzos en encontrar fármacos más eficientes y con menos efectos secundarios. Dentro de esta búsqueda, los compuestos de origen natural se proyectan como candidatos primordiales para cumplir con este objetivo. En este rubro las saponinas se destacan por su gran diversidad de efectos biológicos, como su acción antiproliferativa. Troullias y colaboradores, demostraron el efecto antiproliferativo de ocho saponinas relacionadas estructuralmente sobre la línea celular de osteosarcoma 1547, a una concentración de 40 μM . El porcentaje más alto de inhibición de proliferación fue de 86 % para la diosgenina y tan solo 38 % para la hecogenina.⁴⁹ De igual manera, el grupo de Masaki determinó la actividad antiproliferativa de la saponina furcreastatina, compuesto derivado de la hecogenina, en diversas líneas celulares y encontró una IC_{50} en un rango de 2.5 a 9.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.⁵⁰, en tanto que el acetato de hecogenina presentó una IC_{50} de 106.1 μM en la línea celular A549 proveniente de cáncer de pulmón⁵¹. Estos fitoesteroides tienen en común, la aglicona esteroidal de la hecogenina con algunas modificaciones estructurales como son azúcares y el grupo acetato. Se sabe que, la diversidad en la actividad antiproliferativa está influida por la naturaleza y tipo de aglicona, así como por los sustituyentes que acompañan a esta estructura tales como, cadenas laterales, dobles enlaces en los anillos de la genina, grupos hidroxilo, azúcares, entre otros.⁵² Xu y colaboradores reportaron que la remoción, cambio en la posición o sustitución de los azúcares reduce la actividad del compuesto OSW⁵³, en tanto que el grupo de Troullias estableció que pequeños cambios puntuales en cuanto a dobles enlaces o la estereoquímica modifican gradualmente los efectos sobre el ciclo celular e inducción de la apoptosis.⁴⁹ En nuestro estudio, las líneas celulares HeLa, CaSki y

ViBo presentaron una disminución en la proliferación dependiente de la concentración, al ser expuestas a los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He, estos compuestos poseen una aglicona de hecogenina, la cual presenta una modificación en el grupo hidroxilo (OH) del carbono 3 (C-3), el cual está acetilado en ambas estructuras, además de una modificación puntual en C-26, el cual presenta un grupo OH para el 26-OH-He y una glucosa para el 26-Glu-He (Fig. 3). Las IC₅₀ calculadas en las diferentes líneas celulares tumorales, presentan un rango de inhibición de concentración entre 14.5 y 52 µg/ml para el compuesto hidroxilado en C-26 y entre 30 y 45 µg/ml para el compuesto glucosilado en ese mismo carbono. Esto indica que el compuesto glicosilado es ligeramente más potente que el hidroxilado, con excepción de la línea celular CaSki que presentó una alta sensibilidad al compuesto 26-OH-He. Comparado al 26-OH-He y al 26-Glu-He con otros compuestos similares ya estudiados, se observa que ambos compuestos presentan una actividad menor a la de la furcreastatina. Sin embargo, la actividad que demostraron ambos compuestos es mayor que la reportada para la hecogenina y el acetato de hecogenina, en los que además nuevamente se observa que la fracción sacárida parece incidir en estos resultados. Es relevante mencionar la sensibilidad observada en las células CaSki al compuesto 26-OH-He, lo que sugiere que la actividad de un compuesto químico no solo depende del tipo de molécula sino también de la línea celular; en este caso la línea celular CaSki es positiva al HPV-16, en tanto que HeLa lo es al HPV-18 y ViBo es negativo para HPV, lo que podría propiciar mecanismos moleculares diferentes y originar su mayor sensibilidad. En cuanto a la selectividad hacia células no tumorales, se logró determinar que solo el compuesto 26-Glu-He presenta bajo efecto de inhibición, en la proliferación de linfocitos de sangre periférica sugiriendo que puede presentar acción selectiva, en tanto que el 26-OH-He inhibe la proliferación hasta en un 90% aproximadamente. Estos resultados nuevamente indican que los restos sacáridos y pueden influir en el efecto biológico de las moléculas.

Considerando que los diversos tratamientos farmacológicos contra las células tumorales, conllevan a una serie de reacciones secundarias generalmente relacionadas con la citotoxicidad, es importante que se valore la promoción de la necrosis, por efecto de los compuestos sugeridos en células tumorales y no tumorales. En este sentido, en el presente trabajo hemos encontrado que el 26-OH-He no promueve la liberación de LDH por lo que no provoca una muerte necrótica, en tanto que el compuesto 26-Glu-He originó liberación de LDH hasta en un 24% sobre las células CaSki y 17% para las células HeLa (sin embargo esto no explica el decremento celular del 50% en esa línea celular). En contraste, ninguno de los compuestos demostró toxicidad, cuando los linfocitos humanos son expuestos a ellos en las concentraciones de IC_{50} , lo que sugiere selectividad.

Las características de todo proceso canceroso son: la desregulación del ciclo celular, nula respuesta a las señales de inhibición de la proliferación, pérdida de adherencia y evasión a las señales de muerte por parte de las células tumorales entre otras, sobre estos puntos diversas investigaciones centran sus esfuerzos, en tratar de encontrar un fármaco que induzca a la célula a revertir estos cambios y conducirla a una muerte preferentemente natural conocida como apoptosis y la desregulación de este evento está fuertemente implicado en la progresión de la enfermedad.

En otras investigaciones se han señalado a las saponinas esteroidales, como moléculas capaces de inducir apoptosis por interacción con sus receptores nucleares en diversos tipos celulares. Una elaborada “red” de señales pro-apotóticas extra e intracelulares culmina con la activación de las caspasas, moléculas encargadas de ejecutar este tipo de muerte.⁵⁴

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran que tanto el compuesto 26-OH-He como el 26-Glu-He, inducen la expresión de la caspasa-3 en su forma activa en las células CaSki, HeLa y ViBo, lo que sugiere que las células están cursando por un proceso apoptótico, evento que además provoca que la célula sufra cambios morfológicos como condensación de la cromatina nuclear y compactación nuclear, disminución del volumen citoplasmático, alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana.

Durante el proceso final ocurre fragmentación del DNA debido a su ruptura internucleosomal, originándose así fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), todas estas características pudieron ser observadas en el presente trabajo, con ambos compuestos en las 3 líneas celulares, lo que sugiere fuertemente la inducción de una muerte apoptótica por parte del 26-OH-He y 26-Glu-He.

Conclusiones.

Se logró demostrar que los compuestos 26-OH-He y 26-Glu-He, disminuyen la proliferación de las líneas celulares de CaCu en con un efecto dependiente de la concentración. El compuesto 26-OH-He impidió la proliferación de linfocitos humanos. En cuanto a citotoxicidad, el compuesto 26-Glu-He generó baja necrosis en la línea celular CaSki. El efecto necrótico sobre linfocitos humanos es nulo en ambos compuestos, lo que les confiere especificidad sobre las líneas celulares tumorales. Finalmente se observa tanto en morfología, como en expresión proteica que ambos compuestos inducen a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a desarrollar características típicas de una muerte apoptótica y producir la expresión de caspasa-3 en su forma activa.

Así ambos compuestos se reportan como sustancias con capacidad de producir apoptosis, baja toxicidad al no producir necrosis y selectividad

Perspectivas:

Se siguiere a los compuestos 26-Glu-He y 26-OH-He como estructuras promisorias para su evaluación *in vivo*, con la intención de valorar su potencial terapéutico como agente contra el cáncer.

Referencias.

1. Borris P. R. (1996) Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol.* 51:29-38
2. Koehn F. E. (2008) High impact technologies for natural products screening. *Progress in Drug Research.* 65:172-210
3. Harvey A. L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 13:894-901
4. Lam S. K. (2007) New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 15:279-288
5. Dewick P. M. (2002) *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach.* 2a. Ed: Wiley. University of Nottingham, UK
6. Hostettmann K., Marston A. (1995) *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products.* Cambridge University Press. New York
7. Waller G. R., Yamasaki K. E., (1996) *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine;* Plenum Press. New York
8. Sparg S.G., Light M.E., Staden J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.* 94:219–243
9. Blunden G., Culling M.C., Jewers K. (1975) Steroidal sapogenins: a review of actual and potential plant sources. *Trop Sci* 17:139–154
10. Guclu U., Stundag O., Mazza G. (2007) Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:231–258
11. Newman J. D., Cragg M. G. (2012) Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 75:311-375

12. Sparg S.G., Light M.E., Staden J. van (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.* 94: 219–243
13. Rao A.V., Gurfinkel D.M. (2000) The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroid glycosides. *Drug Metab Drug Interact.* 17:211–235
14. Lacaille-Dubois M.A., Wagner H. (1996) A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* 2, 363-386
15. Francis G., Kerem Z., Makkar H.P. (2002) The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 88:587–605
16. Liu W.K., Xu S.X., Chec C.T. (2000) Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sciences.* 67:1297-1306
17. Hsu Y.L., Po-Lin K., Weng T.C., Yen M.H., Chiang L.C., Lin C. C. (2004) The Antiproliferative Activity of Saponin-Enriched Fraction from *Bupleurum Kaoi* Is through Fas-Dependent Apoptotic Pathway in Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Biol Pharm Bull.* 27:1112-1115
18. Fernández H.M., López M. H., Hernández V. M., López D. M., Escobar S. M., Sánchez S. L. (2010) Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorg Med Chem* 19:2472-2484
19. Fernández H.M., López M. H., Hernández V. M., Pérez C. E., Escobar S. M., Sánchez S. L. (2010) Synthesis of the steroidal glycoside (25R)-3b,16b-diacetoxy-12, 22-dioxo-5a-cholestan-26-yl b-D-glucopyranoside and its anti-cancer properties on cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells. *Bioorg Med Chem* 45: 4827-4837
20. Corbiere C., Liagre B., Bianchi A., Bordji K., Dauça M., Netter P., (2003) Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 22:899-905

21. Yu L., Yang J.Z., Chen X.G. (2009) Cytotoxic triterpenoid glycosides from the roots of *Gordonia chrysandra*. *J Nat Prod* 72:866–870
22. Yun H., Lijan C., Wenhong Z. (2007) Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines in vitro from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis*. *Chem Nat Compd.* 43(6):672–677
23. Zhang Z, Li S. (2007) Cytotoxic triterpenoid saponins from the fruits of *Aesculus pavia* L. *Phytochemistry* 68:2075–2086
24. Zhang S.Y., Tang H.F., Yi Y.H. (2007) Cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Pseudocolochirus violaceus*. *Fitoterapia* 78:283–287
25. Yokosuka A., Jitsuno M., Yui S., Yamazaki M., Mimaki Y. (2009) Steroidal glycosides from *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *J Nat Prod.* 72:1399-1404
26. Denga L., Wub H., Yua B., Manrong J., Wub J. (2004) Synthesis of OSW-1 analogs with modified side chains and their antitumor activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:2781–2785
27. Lee S., Jamieson D., Fuchs L. P. (2009) Synthesis of C14,15-Dihydro-C22,25-epi North Unit of Cephalostatin 1 via “Red-Ox” Modifications of Hecogenin Acetate. *Org. Lett.*, 11:5–8.
28. Poza, J. J., Rodríguez J., Jiménez C. (2010) Synthesis of a new cytotoxic cephalostatin/ritterazine analogue from hecogenin and 22-epi-hippuristanol. *Bioorg. Med. Chem.* 18:58-63
29. OMS. (2015). La batalla mundial contra el cáncer no se ganará únicamente con tratamiento. Revisado en:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/#>
30. INEGI (2016). Revisado en:
http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

31. Yocota J. (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21:497-503.
32. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. , (2004) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York. p. 1294.
33. Darnell J. y L. Baltimore. 1993. *Molecular Cell Biology*. Second Edition. Scientific American Books. USA. (p. 920).
34. Karp G. 1998. *Biología celular*, 2 ed. Mc Graw Hill, México. (p. 950).
35. UICC ; Union for International Cancer Control, Revisado en: <http://www.uicc.org/programmes/hpv-and-cervical-cancer-curriculum>
36. Pagani A., Castagno E., Rosasco M., Cancela M, Salveraglio C. (1999) Cáncer de cuello uterino con diferenciación neuroendócrina. *Rev Med Uruguay*, 15: 146-150
37. Muñoz N., Castellsagué X., Berrington A., Gissmann L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24: S1-S10
38. Khan M. J., Castle P.E., Lorinncz A. T., Waccolter S., Sherman M., (2005) The elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 and 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *J Nat Can.* 97:1072–1079.
39. Ganguly N., Parihar S. (2009) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.* 34:113-123
40. Zur H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2:342-350
41. Israels E. D., Israels L.G. (2001) The cell cycle. *Stem Cells.* 19:88-91
42. Malumbres M., Barbacid M. Cell cycle, (2009) CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 9:153-164

43. Vermeulen K., Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer *Cell Prolif.* 36, 131–149
44. Pratt W. B., TOFT D. O (1997) Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endo Rev.* 18:306-359
45. Distelhorst C. W. (2002) Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation.*9:6-19
46. Amsterdam A., Tajima K., Sasson R. (2002) Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochemical Pharmacology.* 64:843-850
47. Cox G. (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol.* 9:4719-4725
48. Losel R.M., Wehling M. (2008) Classic versus non-classic receptors for nongenomic mineralocorticoids response: emerging evidence. *Front Neuroendocrinol.* 29:258-267
49. Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J.L., Beneytout J.L. (2005) Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma. *Bioorg Med Chem.* 13:1141-9
50. Itabashi M., Segawa K., Ikeda Y., Kondo S., Naganawa H., Koyano T., Umezawa K.A. (2000) New bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida*. *Carbohydr Res.* 12:57-62
51. Gasparotto J., Somensi N., Kunzler A, Girardi C.S., Bittencourt M.A., Ramos V.M. (2014) Hecogenin Acetate Inhibits Reactive Oxygen Species Production and Induces Cell Cycle Arrest and Senescence in the A549 Human Lung Cancer Cell Line. *Anticancer Agents Med Chem.* 14:1128-35.

52. Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. (2010) Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev.* 3: 425–474
53. Tang P., Mamdani F., Hu X., Liu J.O., Yu B.(2007) Synthesis of OSW saponin analogs with modified sugar residues. *Bioorg Med Chem Lett.* 17:1003-1007
54. Elmore S., (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35:495-516

Apéndice.

- Medio de cultivo

Composición por litro.

10.42 g RPMI-1640 (GIBCO, USA)
2 g carbonato ácido de sodio NaHCO_3 (SIGMA, USA)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml con agua bidestilada. La solución se esteriliza por filtración a vacío en membrana con poro de 22 μm en campana de flujo laminar y se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (SNT) en la concentración requerida (5%).

- Desactivación del suero

La botella de suero de neonato de ternera (SNT) se descongela y posteriormente se calienta en baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Preferentemente se fracciona para su mejor manipulación.

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1000 ml en agua bidestilada.

Composición por litro:

8.00 g de cloruro de sodio (NaCl SIGMA, U.S.A)
0.20 g de cloruro de potasio (KCl SIGMA, U.S.A)
2.16 g de fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4 SIGMA, U.S.A)
0.20 g de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4 SIGMA, U.S.A)

Las sales se disuelven previamente en agua bidestilada. El pH se ajusta a un pH entre 7.2 y 7.4 utilizando HCl 8 N y se ajusta a un volumen final de 1000 ml con agua bidestilada. La solución resultante se esteriliza por filtración a vacío sobre membranas (Millipore) con poro de 22 μm en campana de flujo laminar y se almacena a 4°C hasta su uso. Preferentemente se fracciona para su mejor manipulación.

- Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares.

Composición por litro

3.04 g 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (tris base SIGMA, U.S.A)

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

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

0.04 g ácido etilendiametetraacético (EDTA SIGMA, U.S.A)

Los reactivos se disuelven en agua bidestilada, se ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 Lbs durante 20 min. Preferentemente se fracciona para su mejor manipulación.

- Solución de glutaraldehído.

Se mide un volumen de 1.57 ml de glutaraldehído (70% v/v) y se completa a 100 ml con agua bidestilada. Se mantiene en refrigeración a 4°C.

- Solución de ácido acético (10%)

Para 100 ml se disuelven 10 ml de ácido acético glacial y se completa con agua bidestilada a un volumen final de 100 ml.