



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FES-ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Efecto antitumoral de los derivados Sapogenínicos provenientes de la  
Diosgenina”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR)**

PRESENTA:

**MOISÉS LÓPEZ DÁVILA**

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

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DR. BENNY WEISS STEIDER  
FES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Universidad Nacional  
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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FES-ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Efecto antitumoral de los derivados Sapogenínicos provenientes de la  
Diosgenina”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGIA CELULAR)**

PRESENTA:

**MOISÉS LÓPEZ DÁVILA**

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

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DR. BENNY WEISS STEIDER  
FES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2013

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de octubre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)** del alumno **LÓPEZ DÁVILA MOISÉS** con número de cuenta **404016913** con la tesis titulada **"Efecto antitumoral de los derivados Sapogenínicos provenientes de la Diosgenina"**, realizada bajo la dirección del **M en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Vocal: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO  
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE  
Suplente: DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ  
Suplente: DR. BENNY WEISS STEIDER

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de octubre de 2013.

*María del Coro Arizmendi Arriaga*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

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

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Al posgrado en ciencias biológicas de la UNAM por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. de becario 365573 y a la UNAM proyecto PAPIME 206812 por el financiamiento brindado para la realización de esta tesis.**

**A los miembros del comité tutorial:**

**Dra. REBECA LÓPEZ MARURE.**

**Dr. BENNY WEISS STEIDER.**

**Por sus aportaciones en la realización de esta tesis.**

**Agradezco a:**

**Dra. Isabel María Soto Cruz.  
Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo.  
Dr. Jesús Sandoval Ramírez**

**Por sus aportaciones que enriquecieron este trabajo.**

**A mi tutor:**

**M. en C. Luis Sánchez Sánchez por la dirección de esta tesis.**

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología  
Molecular del Cáncer de la Unidad de Investigación en  
Diferenciación Celular y Cáncer de la UMIEZ, FES Zaragoza UNAM.**



## Dedicatorias

*A mis padres y a mi hermano que me apoyan y amo incondicionalmente.*

*A Camila y a Miranda que las amo tanto.*

*A mis amigos que son como hermanos.*

*A Eli que juntos podemos lograr todo.*

## Índice

	Pág.
Resumen _____	1
Abstract _____	2
Introducción _____	3
Cáncer _____	3
Cáncer cervicouterino (CaCu) _____	5
Tratamientos contra el cáncer _____	8
La cirugía _____	8
Radiación _____	8
Quimioterapia _____	9
Muerte celular selectiva _____	10
Compuestos de origen natural y acción selectiva _____	12
Saponinas y Sapogeninas _____	14
Planteamiento del problema _____	19
Hipótesis _____	19
Objetivos _____	20
Metodología _____	21
Resultados _____	28
Discusión _____	54
Conclusiones _____	60
Bibliografía _____	61
Apéndice _____	67

## Figuras y Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Estructura química de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu. _____	18
Tabla 2. $CI_{50}$ calculadas matemáticamente de cada línea celular. _____	29
Tabla 3. Porcentajes de la proliferación de linfocitos. _____	30
Tabla 4. Efecto necrótico de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu. _____	32
Figura 1. Estructura química de la Dioscina y su genina. _____	15
Figura 2. Efecto de la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu en el potencial proliferativo de células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo. _____	28
Figura 3. Efecto de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en la proliferación de linfocitos humanos. _____	30
Figura 4. Efecto de la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu, sobre el potencial proliferativo de células fibroblastos provenientes de cérvix humano. _____	31
Figura 5. Inducción de necrosis por la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en cultivos de células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo. _____	33
Figura 6. Determinación de la actividad citotóxica en cultivos de células linfocíticas. _____	34
Figura 7. Inmunodetección de la caspasa-3 activa, tratamiento con la Dioscina:	
HeLa. _____	36
CaSki. _____	37
ViBo. _____	38
Figura 8. Inmunodetección de la caspasa-3 activa, tratamiento con la Diosgenina:	
HeLa. _____	39
CaSki. _____	40
ViBo. _____	41
Figura 9. Inmunodetección de la caspasa-3 activa, tratamiento con la Diosgenina-3-glu:	
HeLa. _____	42
CaSki. _____	43
ViBo. _____	44

Figura 10. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL, tratadas con la Dioscina:

HeLa.	45
CaSki.	46
ViBo.	47

Figura 11. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL, tratadas con la Diosgenina:

HeLa.	48
CaSki.	49
ViBo.	50

Figura 12. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL, tratadas con la Diosgenina-3-glu:

HeLa.	51
CaSki.	52
ViBo.	53

## Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En México, el CaCu ocupa el segundo lugar de mortalidad entre los tumores malignos en la población femenina. La ineficacia de las terapias en estados avanzados del cáncer ha propiciado la búsqueda de nuevas alternativas con actividad antitumoral de acción selectiva. Al respecto, compuestos de origen natural como las saponinas y sapogeninas esteroideas han sido reportados con actividad antitumoral *in vitro*, sin embargo, se desconoce su efecto en células provenientes de CaCu así como su posible acción selectiva. Por ello, en el presente trabajo se valoró el efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico de las saponinas Dioscina, Diosgenina-3-glu y la sapogenina Diosgenina en cultivos de líneas tumorales provenientes de CaCu, así como de células no tumorales. Nuestros resultados con la técnica de cristal violeta, mostraron que todos los compuestos afectan el potencial proliferativo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo de manera que son dependientes de la concentración; las concentraciones Inhibitorias del 50 % de la población celular ( $CI_{50}$ ), van de un rango de 1.7 a 24  $\mu\text{g/ml}$ . La nula o baja detección de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales y no tumorales tratados con los compuestos mencionados, sugiere que éstos son de baja citotoxicidad y no inducen necrosis. Además, la detección de la caspasa-3-activa por inmunocitoquímica, así como la detección de la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL en los cultivos de células de CaCu, indican que los tres compuestos inducen a las células tumorales a una muerte apoptótica. Las técnicas de cristal violeta y carboxifluoresceína demostraron el nulo o bajo efecto antiproliferativo de estas saponinas en fibroblastos y linfocitos respectivamente, sugiriendo que estos compuestos ejercen una actividad antiproliferativa con acción selectiva, es decir que las células tumorales son más sensibles a estos compuestos. Las características biológicas de estos compuestos resultan relevantes, ya que los beneficios de un fármaco con actividad inductora de apoptosis, no necrótico, son fuertemente apreciados, puesto que se esperaría que sus efectos colaterales sean leves, sugiriendo que este tipo de compuestos podrían ser dignos candidatos para ser evaluados *in vivo*, con la intención de valorar su potencial terapéutico.

## Abstract

The Cervical Cancer is one of the main causes of death in all the world. The cervical cancer is a major health problem in Mexico, ranging the second place of mortality among malignant tumors in the female population. The ineffectiveness of therapies in advanced stages of cancer has led to the search for compounds with antitumor activity and selective action. In this regard, *in vitro* anti-tumor activity has been reported for steroidal saponins and sapogenins. However, the effect of these compounds in cervical cancer cells as well as its selective action is unknown. In this work we report the evaluation of the antiproliferative, cytotoxic and apoptotic effect of the saponins Dioscin, Diosgenin-3-glu and the sapogenin Diosgenin in tumor cell lines derived from cervical cancer and in non-tumor cells. The crystal violet results showed an affectation on the proliferative activity of the cell lines HeLa, CaSki and ViBo by the Dioscin, Diosgenin and Diosgenin-3-glu in a dose-dependent manner. The IC<sub>50</sub> were between 1.7 µg/ml and 24 µg/ml. The cytotoxicity evaluated by the presence of the lactate dehydrogenase in the culture supernatans from the treated cells, indicated that these compounds had a low or null cytotoxicity in tumor and non-tumor cells. This suggests that these compounds do not induce necrosis. The detection of active caspase-3 and DNA fragmentation in the treated tumor cells, induced by the three compounds, evidenced the apoptotic cell death. The evaluation with crystal violet and carboxyfluorescein in fibroblasts and lymphocytes showed that the compounds had a low or non-antiproliferative effect suggesting that they have a selective effect. The above mentioned hallmarks of these compounds could be considered to the *in vivo* evaluation, to assess their therapeutic potential as anticancer agents.

## **Introducción**

El organismo del ser humano se caracteriza por tener una marcada estabilidad en el medio interno, en donde existe una adecuada regulación en la proliferación de las diferentes poblaciones celulares que tienen lugar en sus tejidos y órganos. Por ejemplo, la sangre posee un ciclo activo de proliferación, donde las células mueren y son sustituidas ininterrumpidamente (salvo en situaciones patológicas), gracias a un amplio sistema de regulación que permite un balance apropiado entre la pérdida, renovación y diferenciación celular. La mayoría de los órganos necesita mantener su tamaño, para desempeñar una función específica. Existe una coordinada maquinaria reguladora, donde interviene un gran número de factores, que mantiene el equilibrio necesario entre los procesos que entrañan la proliferación de las poblaciones celulares, definida como el incremento del número de células, resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte celular<sup>1</sup>.

## **CÁNCER**

Los cánceres son el producto de mutaciones que liberan a las células de los controles habituales de la proliferación y de supervivencia. Una célula del organismo al presentar una serie de mutaciones al azar, podría adquirir la capacidad de proliferar indefinidamente sin los controles normales. Su progenie hereda las mutaciones y da lugar a la formación de un tumor que puede crecer ilimitadamente<sup>2</sup>.

Se sugiere que en la gran mayoría de los cánceres, se manifiestan 6 alteraciones celulares esenciales en su fisiología que colectivamente dictan el crecimiento cancerígeno; 1) la auto suficiencia de señalización de proliferación; 2) la insensibilidad a señales de inhibición de la proliferación; 3) la evasión de la muerte celular programada llamada apoptosis; 4) el potencial de replicación ilimitado; 5) la angiogénesis sostenida y 6) la invasión de tejido y metástasis. Cada uno de estos cambios fisiológicos, son nuevas

capacidades que se van adquiriendo durante el desarrollo del tumor y van representando, con éxito, el avance del proceso carcinogénico<sup>3</sup>.

La adquisición de las 6 alteraciones celulares durante el curso de la progresión tumoral crea un dilema, puesto que la evidencia disponible sugiere que la mayoría se adquieren, directa o indirectamente, a través de cambios en el genoma de células cancerígenas. Las mutaciones de genes es un proceso ineficiente reflejado en el incesante y exigente mantenimiento de la integridad del genoma por un complejo conjunto de enzimas monitoras y reparadoras de ADN. Por otro lado, el equipo de mantenimiento del genoma trata de asegurar que la secuencia del ADN sea inmaculada con vigilantes que verifican los llamados puntos de chequeo, que operan en tiempos críticos en la vida celular, notablemente en el ciclo celular. Juntos estos sistemas aseguran que las mutaciones sean eventos raros<sup>3,4</sup>. Sin embargo, algo sucede en la transformación maligna que escapa de estos sistemas.

Los cánceres se presentan frecuentemente en la población humana, y se argumenta que el genoma de las células tumorales va adquiriendo mutabilidad aumentando el proceso de progresión tumoral, que se completa en el tiempo de varias décadas. El mal funcionamiento de los componentes específicos de estos sistemas, los “vigilantes del genoma”, han sido invocados para explicar este aumento de la mutabilidad. El miembro más importante de estos sistemas es la proteína supresora de tumores p53, que en respuesta al daño del ADN, bien provoca la detención del ciclo celular para permitir la reparación del ADN, o si el daño es excesivo, estimula el proceso a que se tenga lugar la apoptosis. De hecho, es ahora evidente que el funcionamiento de la vía de señalización de la p53 se pierde en la mayoría, si no en todos los cánceres humanos. Además, va creciendo el número de genes dañados que están involucrados en el censo y reparación de ADN, o se han perdido los genes que aseguran el correcto segregamiento cromosomal en diferentes cánceres humanos. Se prevé que la pérdida de la función de la p53 permite



una inestabilidad y variabilidad genómica y la generación consecuente de células mutantes con ventajas selectivas<sup>3,4</sup>.

### **CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu)**

Actualmente el cáncer es considerado uno de los problemas más importantes en el área de la salud y en particular el cáncer de mama y CaCu, ya que representan el primer y segundo lugar a nivel mundial en la población femenina. Éstos son difíciles de tratar debido a las mutaciones sucesivas en oncogenes y genes supresores que generan una desregulación del ciclo celular<sup>5,6</sup>. En México durante 2011, se observó que los principales tumores malignos por los que falleció la población femenina de 20 años o mayores, fueron el de cáncer de mama (13.8%) y el CaCu (10.4%)<sup>7</sup>.

El CaCu consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas en los tejidos del cuello uterino, éste puede ser intraepitelial, pre-invasivo, o invasor. Los carcinomas invasores se pueden originar en el epitelio escamoso del exo-cérvix o en el epitelio glandular del endo-cérvix, y según el lugar de origen son denominados carcinomas escamosos o adenocarcinomas, respectivamente<sup>8</sup>. La etiología del CaCu es compleja, sin embargo, la infección con el virus del papiloma humano (VPH) parece ser el más importante con el 99% de las incidencias. Existen otros factores de riesgo que incluyen; iniciación sexual precoz, los embarazos múltiples, infecciones concomitantes (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, VHS 2 – virus del herpes simple) del tracto genital, SIDA, tratamiento inmunosupresor, el tabaquismo y el bajo nivel socioeconómico. La incidencia del CaCu es particularmente alta en los países en desarrollo, mientras que en los países desarrollados donde la prevención y educación para la salud es alta, es mucho menos probable que se produzca la enfermedad<sup>9</sup>.

El VPH es actualmente una de las más comunes infecciones transmitidas sexualmente en todo el mundo. Muchos de los individuos que tienen una vida sexualmente activa (alrededor del 75%) llegarán a ser infectado con VPH en algún punto de su vida. Para la

gran mayoría esta infección puede ser asintomática por 1 o 2 años, sin embargo, hay un substancial incremento en el riesgo de desarrollar cáncer para las mujeres que tienen una persistente infección con tipos del VPH con alto grado oncogénico<sup>9</sup>.

Dependiendo del riesgo de malignidad, los VPH son agrupados como de bajo riesgo o de alto riesgo. Los de alto riesgo como el VPH-8, -16, -18 y -31 causan una progresión maligna de lesiones como el CaCu o cáncer anal<sup>10</sup>, mientras que los de bajo riesgo, como el VPH -6 y -11, producen verrugas benignas y lesiones que no se desarrollan a malignidad<sup>11</sup>.

Todos los VPH tienen una organización genómica común y codifican 8 proteínas, de las cuales están las de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6, E7 y las de expresión tardía L1 y L2. E1 y E2 son factores de replicación y están también involucrados en el control de transcripción; E4 y E5 regulan las funciones tardías del virus; E6 y E7 son oncoproteínas; y L1 y L2 son proteínas de estructura. Las proteínas E6 y E7 del grupo del VPH de alto riesgo son los que contribuyen a la transformación maligna. Se cree que la combinación de la persistencia de la infección del VPH junto con la inhabilidad del sistema inmune para eliminarlo son los factores centrales que contribuyen a la integración del genoma del VPH al ADN de la célula hospedera, que es un paso crítico para la tumorigénesis<sup>12</sup>.

El ciclo de proliferación del VPH difiere de otras familias de virus: la infección requiere de la habilidad de las células epidérmicas o mucosas epiteliales que tienen la capacidad de proliferar (capa de células basales). En estas células, la expresión de los genes virales es baja. La replicación del ADN viral se mantiene en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extracromosómica, llamados episomas que se estructuran en base a histonas y material genético. Se postula que durante esta etapa se asegura que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune<sup>11, 13</sup>.

El descubrimiento de que ciertas cepas de alto riesgo de virus del VPH causan casi el 100% del CaCu invasivo ha propiciado una revolución en la prevención del cáncer cervical. Ensayos controlados aleatorios han evaluado la eficacia de dos vacunas profilácticas: Gardasil (también conocida como vacuna VPH 4 o cuadrivalente) se dirige a dos de los genotipos de VPH más cancerígenos (VPH 16 y VPH 18), así como dos tipos responsables de más del 90% de los verrugas anogenitales (VPH 6 y VPH 11), y Cervarix (también conocido como VPH 2 o vacuna bivalente), tiene como objetivos solo a los VPH 16 y VPH 18, que demuestran la protección casi completa contra enfermedad cervical causado por los genotipos específicos, en las mujeres no infectadas por hasta 8 años. Se ha comprobado que tanto Gardasil como Cervarix son efectivas solamente si se administran antes de la infección por el VPH, por lo que se recomienda que se apliquen antes de que la persona sea sexualmente activa. La decisión de la Administración de Drogas y Alimento (FDA, por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) al otorgar la licencia incluye información acerca de la edad y el sexo de quienes reciben la vacuna. La FDA aprobó Gardasil para su uso en mujeres y hombres de 9 a 26 años de edad y Cervarix para su uso en mujeres de 9 a 25 años. Es posible que una persona ya infectada por el VPH obtenga todavía un beneficio residual de la vacunación aun cuando ya haya sido infectada con uno o más de los tipos incluidos en las vacunas. Sin embargo, esta posibilidad está siendo estudiada todavía<sup>14</sup>.

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Aunque recientemente se ha introducido los métodos moleculares para detectar el VPH en muestras clínicas, los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el Papanicolaou, que busca cambios en las células de la zona de transformación. El sistema actual de reporte para clasificar la citología cervical es el de Bethesda 2001, la cual es una nomenclatura creada para incorporar los conceptos citológicos y unificar la terminología y cuyo fin principal es comunicar la mayor información posible para ser utilizada en el manejo de la paciente, a través de un informe descriptivo en el que se incluyan todos los aspectos citológicos (a nivel hormonal, morfológico y microbiológico)<sup>15</sup>.

## **TRATAMIENTO CONTRA EL CANCER**

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

### **La cirugía**

La cirugía es la forma más antigua de tratamiento del cáncer, este tratamiento implica una operación quirúrgica para quitar el tumor o los tumores. Sin embargo, si hay metástasis este tratamiento es ineficaz. Además, la biopsia quirúrgica tiene una participación importante en el diagnóstico de la mayor parte de los procesos malignos. El desarrollo de modalidades terapéuticas más modernas, como la quimioterapia y la radioterapia, ha llevado a reducir la indicación de procedimientos quirúrgicos radicales, pero la cirugía continúa siendo el único tratamiento potencialmente curativo para muchos pacientes con cáncer<sup>16</sup>.

### **Radiación**

El tratamiento con radiación utiliza rayos X o partículas de alta energía para destruir células cancerosas o aminorar su crecimiento. La potencia y la precisión de las radiaciones emitidas por los aparatos de alta energía obligan a un rigor extremo en la conducta del tratamiento, por ello es necesario: definir muy bien el área específica que representa la zona enferma que debe irradiarse; elegir las condiciones de irradiación que permiten proporcionar una dosis máxima a nivel del tumor y mínima a nivel de los tejidos sanos de la vecindad; y controlar las constantes físicas del aparato (cantidad y calidad de las radiaciones emitidas). Al irradiar las células con enormes cantidades de partículas de energía, provocan modificaciones profundas, fundamentalmente a nivel del núcleo de la célula. De ello resultan perturbaciones que pueden destruirlas o hacerlas incapaces de reproducirse. Su mecanismo de acción se basa en el daño directo o indirecto del ADN a través de radicales libres<sup>16</sup>, es por ello que las células son más sensibles en la fase S del ciclo celular, así como en la mitosis.

El problema de la radioterapia como tratamiento es que se lesionan todas las células que se encuentren en el haz de radiación, sin distinción entre células normales o malignas<sup>17, 18</sup>.

### **Quimioterapia**

La quimioterapia utiliza fármacos para reducir los tumores y minimizar el riesgo de que el cáncer se extienda a otras partes del organismo, y de que el cáncer vuelva a desarrollarse. De esta manera, la muerte celular ocurre en muchos tipos de células del cáncer cuando se exponen a una variedad de drogas quimioterapéuticas, que incluyen a los antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de deoxinucleótidos, los inhibidores de la topoisomerasa de ADN, agentes que interfieren con los microtúbulos, y agentes alquilantes, entre otros<sup>19</sup>. En cualquier tejido y también en los tumores existe un equilibrio entre las células que se encuentran en fase G1 con las que están en reposo (G0). Las células en G0 son relativamente inactivas con respecto a la síntesis de macromoléculas y en consecuencia, insensibles a muchos de los antineoplásicos, particularmente a los que afectan a esta síntesis. Los agentes quimioterapéuticos que actúan sobre las células en división más que sobre las células en G0 se denominan “específicos del ciclo celular”, mientras que aquellos que actúan también sobre las células en G0 reciben el nombre de “no específicos del ciclo celular”. A su vez, los específicos del ciclo celular pueden ser “fase específicos” si actúan sólo sobre alguna de las fases, o “no fase específicos” si actúan en cualquier fase del ciclo celular<sup>20</sup>.

A pesar de los indudables beneficios que cualquiera de estos tratamientos aportan en la lucha contra el cáncer, sus efectos secundarios son de consideración; caída del pelo, mucositis, disfgia, vómito o náuseas, por lo cual la calidad de vida del paciente se ve disminuida drásticamente. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial terapéutico

## MUERTE CELULAR SELECTIVA

Una de las metas terapéuticas del cáncer es lograr activar la muerte selectiva de las células neoplásicas, que implica lograr que el fármaco se acumule en el tejido tumoral para que ejerza su actividad en células transformadas sin dañar a las células sanas<sup>2, 21</sup>.

La muerte celular es un proceso fisiológico o patológico que conduce a la eliminación celular y que tienen una función esencial en la homeostasis de los tejidos y en los estados patológicos. Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo las más habituales la necrosis y la apoptosis<sup>22</sup>.

La necrosis es vista como una forma de muerte celular accidental provocada por una lesión en la célula por agentes físicos, patógenos o toxinas y se define como una muerte no específica, causada por estrés. Debido a la pérdida de la regulación y de la función celular producido en la célula necrótica, se genera un proceso osmótico desmesurado que conlleva a la pérdida temprana de la integridad de la membrana celular, lo que resulta en la salida del contenido citoplasmático a la matriz extracelular. La necrosis desencadena una reacción inflamatoria que atrae leucocitos y proteínas plasmáticas que hace que en las áreas donde se observa células necróticas sea frecuente encontrar este tipo de células . Es así que el término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin requerimientos de energía<sup>23, 24</sup>.

Por otro lado, la muerte celular por apoptosis es un mecanismo altamente regulado por el cual las células se someten a una muerte programada que permite al organismo tener un control estricto en el número de células y por lo tanto, en el tamaño de un tejido u órgano. Así, las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación, ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto, considerada como una muerte natural fisiológica, que actúa de manera “silenciosa”, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades<sup>24, 25</sup>.

La apoptosis está caracterizada por una serie de cambios morfológicos en la estructura de la célula; así, ocurre una condensación y fragmentación de la cromatina celular, compactación de los organelos, dilatación del retículo endoplasmático, un decremento en el volumen celular, formación de vesículas y su fusión con la membrana plasmática, seguido por la aparición de protuberancias de la membrana plasmática que resulta en la liberación de pequeñas partículas que contienen componentes celulares conocidos como cuerpos apoptóticos, y por último, la alteración de la membrana plasmática donde hay una translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van actuar como señal de reconocimiento para las células vecinas o fagocitos profesionales que eliminan los cuerpos apoptóticos y de esta manera, evitan la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación<sup>26, 27</sup>.

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis depende de una familia de proteasas, llamadas caspasas, las cuales contienen en su sitio activo cisteína y se ancla a su proteína blanco con un ácido aspártico. Las caspasas son sintetizadas en las células como precursores inactivos, o pro-caspasas, que son usualmente activadas por otras caspasas. Una vez activadas, alguna de las caspasas se une a proteínas clave, por ejemplo a la laminina, causando el irreversible desglose de la membrana nuclear, otras se unen a proteínas que normalmente tienen una enzima que degrada el ADN (ADNasa) en forma inactiva, que se libera y corta el ADN dentro del núcleo de la célula; en este camino, la célula se desmantela asimismo rápido y limpiamente<sup>28, 29</sup>.

Las caspasas se clasifican con base al tamaño del pro-dominio. Las caspasas con grandes pro-dominios como las caspasas -2, -8 y -9 funcionan como iniciadoras de señales que se encuentran al principio de la cascada proteolítica, mientras que las que presentan un pro-dominio pequeño, como las caspasas -3, -6 y -7 que funcionan como caspasas efectoras que rompen principalmente sustratos proteicos en núcleo y citoesqueleto. La caspasa-3, es crucial en la apoptosis porque se ancla y rompe o modifica la función de

cientos de sustratos de proteínas y es un importante punto de convergencia de las 2 rutas existentes en la apoptosis; la ruta extrínseca que es el mecanismo por el cual las células del sistema inmune desencadenan la apoptosis en las células a través de la activación mediada por ligando de receptores de superficie celular (receptores de muerte); y la ruta intrínseca que es un mecanismo activado por varios estímulos intracelulares, incluyendo daño en el ADN, la hipoxia, fármacos citotóxicos entre otros. Las señales de estos estímulos diversos convergen en la mitocondria, que producen la permeabilización de la membrana exterior y la liberación de proteínas desde el espacio intermembranal de la mitocondria en el citosol dando así la propagación de la señal apoptótica<sup>28, 29</sup>.

La desregulación de la apoptosis es un proceso de gran alcance que puede conducir a desastrosas consecuencias. La adquisición de mecanismos para evadir la apoptosis es una característica del cáncer que lleva a la pérdida de funciones de la señalización proapoptótica y la ganancia de función de los procesos anti-apoptóticos que contribuyen a la tumorigénesis y al fenotipo del cáncer. Por lo tanto, la modulación de las vías de apoptosis representa una estrategia propicia para inducir la muerte de células del tumor y el aumento de las respuestas a la quimioterapia, radioterapia e incluso terapias dirigidas<sup>30, 21</sup>.

Actualmente existe un interés en probar compuestos de origen vegetal y en particular en esteroides, a los cuales se les han atribuido diferentes actividades biológicas, entre las que se destaca la actividad antiproliferativa e inductoras de apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

### **COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL Y ACCIÓN SELECTIVA**

El progreso significativo en el desarrollo de nuevas drogas y terapias contra el cáncer se debe al descubrimiento de la camptotecina<sup>31</sup> y de los taxoles<sup>32, 33</sup> entre otros. Comúnmente, algunas formas de cáncer han sido exitosamente tratadas, aunque a menudo los pacientes deben tolerar los inconvenientes efectos colaterales<sup>34</sup>.



Durante la última década, se han realizado enormes avances hacia la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al proceso de carcinogénesis, lo que lleva al desarrollo de posibles opciones de prevención del cáncer llamado quimioprevención. El objetivo de la quimioprevención es el uso de agentes no citotóxicos naturales para inhibir o invertir el desarrollo y la progresión de las células pre-cancerosas. Recientemente se ha puesto mucho interés en los productos de origen vegetal, ya que este tipo de compuestos naturales se han utilizado ampliamente en el tratamiento de muchas enfermedades y son de interés para los investigadores, tanto en sus formas naturales, como plantillas para la modificación sintética. Los compuestos naturales exhiben una diversidad química muy amplia, y junto con sus análogos, demuestran la importancia de los compuestos de fuentes naturales en los esfuerzos del descubrimiento de fármacos modernos. Recientemente, se ha encontrado que algunos fitoesteroides, como las saponinas, presentan actividad antiproliferativa e inductora de la apoptosis en diferentes tipos de cáncer, sin embargo, no está claramente establecida su acción selectiva, es decir que no afecte a células no tumorales y sólo a células malignas<sup>34,30</sup>.

A la fecha, la mayoría de los compuestos comúnmente usados en la quimioterapia presentan problemas debido a la carencia de selectividad hacia células tumorales, por lo que provocan efectos secundarios indeseables al afectar también a las células no tumorales. Aunque existe gran cantidad de compuestos descritos con actividad antiproliferativa e inductora de la apoptosis, la mayoría de éstos no han sido probados en células no tumorales, dejando en duda su acción selectiva, por lo tanto, es de interés identificar nuevas moléculas anticancerígenas que sí puedan llegar a tener ese tipo de acción selectiva. Con la finalidad de detectar los posibles efectos indeseables de los compuestos antes de ser empleados como medicamentos, es importante seleccionar modelos experimentales que permitan la evaluación de la actividad tóxica de las moléculas propuestas con fines terapéuticos.<sup>35</sup> Al respecto, en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el Laboratorio de Síntesis de Compuestos Naturales a cargo del Dr. Jesús Sandoval, se han sintetizado análogos y/o derivados de la Diosgenina y la

Hecogenina, los cuales presentan en común una estructura básica (esqueleto colestánico) y pequeños cambios estructurales que podrían influir en la actividad biológica de las moléculas. En especial, el derivado Diosgenínico, Diacetato de (25R)-26-hidroxi-22 - oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo, también llamado 26-OH-DI, resultó tener actividad antiproliferativa en la línea CaCu CaSki provocada por una inducción de muerte celular por apoptosis independiente del ciclo celular. Además, se encontró que este derivado diosgenínico no afecta el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales de cérvix humano, mostrando así tener una característica selectiva. Sin embargo, el compuesto 26-OH-DI es poco soluble en soluciones acuosas lo que dificulta su análisis en concentraciones mayores a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>36</sup>.

### **SAPONINAS Y SAPOGENINAS**

Las saponinas son compuestos naturales caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glicósidos y/o éster entre una genina poco polar y restos glicósídicos, con una estructura esteroidal (C27) o triterpénica (C30), y cuando se hace una remoción de los restos glicósídicos, por ejemplo por hidrólisis ácida dejando solo a la genina es denominada sapogenina<sup>37</sup> (Figura 1).

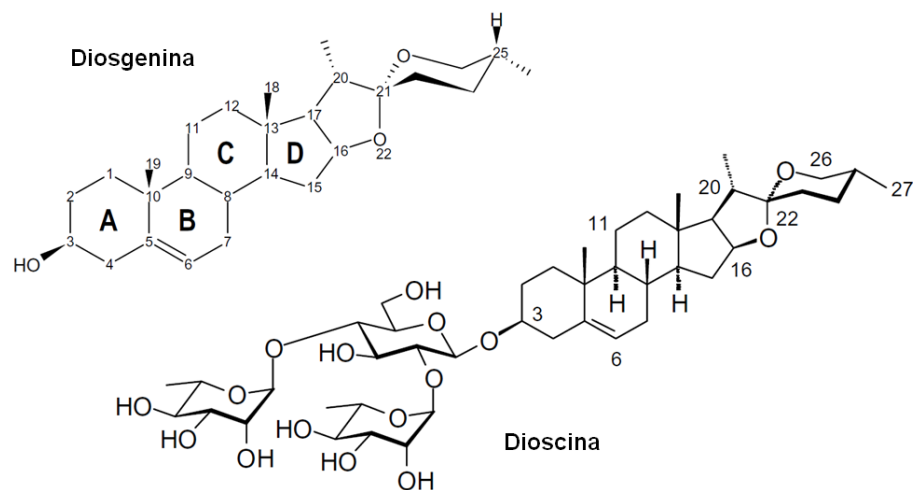


Figura 1. Estructura química de la Dioscina y su genina (Diosgenina). Imágenes tomadas de Trouillas et al., 2005<sup>44</sup>; y de Kaskiew et al., 2008<sup>38</sup>.

Las sapogeninas esteroidales pueden ser un espirostanos (6 anillos) o un furostanos (5 anillos), mientras que en el caso de las sapogeninas triterpenoides, que son estructuralmente mucho más diversas, el sistema de anillo básico se hace a menudo de más de cinco o, más rara vez, de cuatro unidades de anillos. La presencia en las sapogeninas policíclicas, de diferentes sustituyentes, tales como, hidroxilos, carboxilos hidroximetilos y grupos acilo, así como en las diferencias en la composición, la articulación y el número de cadenas de azúcar, generan la diversidad estructural de las saponinas y también su diversa bioactividad<sup>30</sup>.

Las saponinas esteroidales abundan especialmente en las monocotiledóneas: *Dioscoraceae*, *Amarylidaceae*, *Agavaceae* y *Liliaceae*. También existen saponinas esteroidales en algunos equinodermos. Las saponinas comparten algunas propiedades biológicas como la reducción de la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espuma; por esto se han utilizado ampliamente por sus propiedades detergentes; esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares. Las saponinas tienen propiedades hemolíticas especialmente en

eritrocitos, por lo que son tóxicas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas<sup>39</sup>.

La hemólisis de los glóbulos rojos parece resultar de la capacidad para formar complejos de saponina con el colesterol de la membrana celular, que conduce en consecuencia a la formación de poros y a la permeabilización de células, y también los carbohidratos cargados negativamente causan alteraciones en la superficie celular. Debe mencionarse, sin embargo que el mecanismo exacto de la actividad hemolítica de saponinas no se entiende claramente y es el objeto de debates dentro de la comunidad científica<sup>30, 40</sup>.

La actividad responsable de las funciones biológicas, incluyendo la actividad hemolítica, se atribuyen a su naturaleza anfifílica que resulta de la presencia de un resto de azúcar hidrófilo y una genina hidrófoba (llamada sapogenina). Las saponinas pueden poseer una a tres cadenas de azúcar lineal o ramificada, más a menudo compuestas de D-glucosa, L-ramnosa, D-galactosa, D-ácido glucurónico, L-arabinosa, D-xilosa o D-fucosa. La cadena de azúcar puede contener de uno a varios residuos de monosacáridos, y se une generalmente a C-3 de la genina<sup>30, 40</sup>.

Sin duda, la más útil de todas las sapogeninas esteroideas es la Diosgenina (sapogenina de la Dioscina), que se encuentra en diversas especies de *Dioscorea*. Este metabolito está disponible en grandes cantidades (5 a 10%) en los rizomas de estas plantas y es utilizado como materia prima en el proceso industrial de fabricación de cortisona y hormonas sexuales como la progesterona<sup>41, 42</sup>.

Recientemente se ha demostrado que la Diosgenina también presenta una fuerte actividad antiproliferativa e inductora de la apoptosis en diferentes líneas celulares, tales

como la línea de osteosarcoma humano 1547, la línea leucémica K562, la línea de cáncer de mama AU516, la línea de laringocarcinoma HEP-2, la línea de melanoma M4Beu, y la línea de CaCu HeLa, entre otras, ya que estos compuestos presentan un efecto antiproliferativo, puesto que producen una detención en alguna de las fases del ciclo celular y/o producen apoptosis<sup>43- 46</sup>.

Se ha reportado que la actividad biológica de las saponinas está relacionada con la estructura, se ha estudiado el efecto de las saponinas usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas, derivadas sintéticamente. Aunque la aglicona juega el principal papel en la actividad biológica, es bien conocido que el azúcar juega un importante papel en la actividad de los glicósidos esteroidales; por ejemplo: incrementando la solubilidad en el medio fisiológico, ayudando con la permeabilidad celular, influyendo en el tiempo de vida de la molécula y dirigiendo al compuesto a su sitio activo. Después de diversas pruebas biológicas, se ha concluido que ambos, la aglicona y el azúcar unido, son esenciales para la actividad<sup>47, 48</sup>.

Con la intención de evaluar la actividad anticancerígena de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-Glu (Tabla 1), sus actividades antiproliferativas, citotóxicas (necrótica) y apoptóticas fueron probadas en cultivos de líneas celulares provenientes de CaCu. De igual manera, el efecto antiproliferativo y citotóxico de estos compuestos fueron evaluados en cultivos de células no tumorales (cultivos de fibroblastos provenientes del cérvix humano y cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana), con el propósito de determinar si presentan acción selectiva, que de ser así, podrían ser fuertes candidatos para ser evaluados en un modelo *in vivo*.

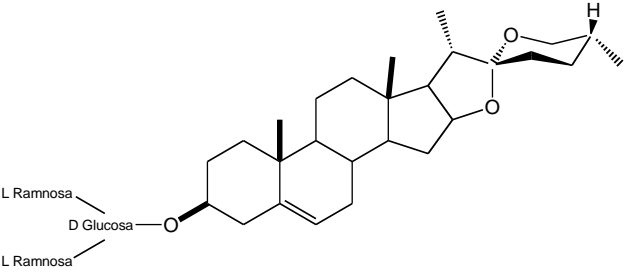
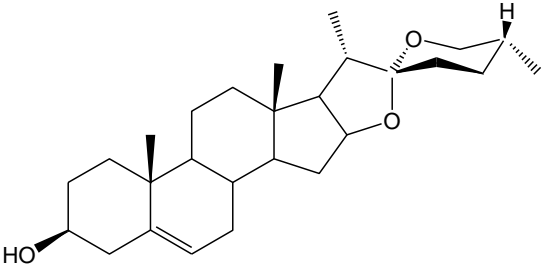
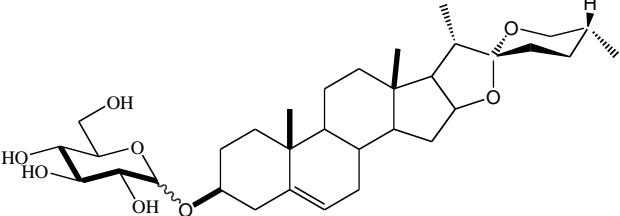
 <p>L Ramnosa D Glucosa L Ramnosa</p>	<p><b>Dioscina.</b></p>
	<p><b>Diosgenina.</b></p>
	<p><b>Diosgenina-3-Glu.</b></p>

Tabla 1. Estructura química de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu.

## **Planteamiento del problema**

El CaCu en la actualidad se encuentra como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, mientras que en México ocupa el 2º lugar de mortalidad entre los tumores malignos de la población femenina. Para combatir esta enfermedad existen diversas alternativas de tratamientos, sin embargo, éstas son muy agresivas y poco selectivas, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. En la actualidad existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal, con actividad antitumoral y con acción selectiva. Dentro de las nuevas alternativas con posibles fines terapéuticos, se encuentran las saponinas, entre ellas la Dioscina y sus derivados, las cuales han demostrado una diversa actividad biológica, como anti-fúngicas, anti-inflamatorias, e inclusive efecto antiproliferativo por inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer humano. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado sobre el CaCu, por lo que resulta de interés determinar la actividad antiproliferativa de los derivados de la sapogenina Diosgenina, en líneas de cáncer cervical, con el fin de aportar información que permita establecer si tienen potencial antitumoral.

## **Hipótesis**

Se ha encontrado que las saponinas presentan diferentes propiedades farmacológicas, entre ellas la actividad antiproliferativa en células tumorales, la Dioscina que es una saponina esteroidea presenta una actividad antiproliferativa por inducción de apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer humano, por lo que se espera que las saponinas Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu presenten una actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo.

## **Objetivos:**

### ➤ General:

Evaluar el efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico de los derivados sapogeninicos Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu en líneas celulares provenientes de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, así como en fibroblastos provenientes de cérvix humano y linfocitos de sangre periférica humana de donadores sanos.

### ➤ Particulares:

- 1.- Obtener y cultivar células no tumorales humanas: fibroblastos y linfocitos provenientes de cérvix humano y sangre periférica, respectivamente.
- 2.- Determinar la concentración requerida de los compuestos Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu para inducir un decremento del 50% de la población celular ( $CI_{50}$ ), expresado como número celular, en las células HeLa, CaSki y ViBo.
- 3.- Evaluar el efecto de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en la proliferación celular de células no tumorales (Fibroblastos y Linfocitos).
- 4.- Evaluar el efecto citotóxico (necrótico) de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en las células HeLa, CaSki y ViBo así como en cultivos de células no tumorales.
- 5.- Evaluar si la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu inducen la activación de caspasa-3-activa, así como la fragmentación del ADN, en las células HeLa, CaSki y ViBo.



## Metodología

### Cultivo celular.

Para los ensayos se utilizaron las líneas celulares de CaCu HeLa, que son células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18; CaSki, establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, positiva a VPH 16; éstas son procedentes de *American Type Culture Collection* (ATCC); y la línea celular ViBo que son células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH, estas últimas fueron establecidas a partir de una biopsia derivada de un tumor cervical removido por cirugía de una paciente mexicana <sup>49</sup>.

Las líneas celulares fueron sembradas en cajas petri de 100 mm (Pirex, USA) con 10 ml de medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640; Microlab, Mex.) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, Mex.), al 5% de suero neonato de ternera previamente desactivado (NCS; Gibco, USA). Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera a saturación de humedad. La proliferación de los cultivos se permitió hasta alrededor de un 70 % de confluencia para realizar los ensayos posteriores <sup>50</sup>.

### Obtención de células no tumorales

#### Linfocitos

Se colectaron 20 ml de sangre periférica a partir de donadores humanos sanos en tubos Vacutainer con EDTA (BD, USA). Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron por medio de centrifugación de gradiente de densidad usando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA). Se colectó cuidadosamente el anillo de CMSP obtenido de la centrifugación por gradiente; posteriormente el paquete celular obtenido fue transferido a un tubo limpio para ser resuspendido con 10 ml de solución buffer de fosfatos (PBS). Nuevamente las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante y fueron resuspendidas en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Hyclone, USA) previamente desactivado. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y se colectó el

sobrenadante (recuperándolo para su posterior análisis), el botón celular fue resuspendido en 5 ml de RPMI-1640 ausente de suero. Posteriormente se determinó el número celular.

### **Células fibroblásticas de cérvix humano**

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCu. Una vez que se obtuvo la pieza quirúrgica, una porción de tejido fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de SFB a 4 °C y fue procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos, ambas partes fueron cortadas por separado en trozos pequeños (1-2 mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05 %. Esto consistió en colocar los trozos de tejido en un matraz Erlen Meyer (Pirex, USA) de 50 ml, con 10 ml de tripsina al 0.05% en Verseno a 37°C en un baño con agitación durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, la mezcla se vertió a través de una malla de nylon, dejando el tejido no disgregado en la malla. La solución de tripsina se colectó en un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía 1 ml de SFB y fue centrifugado a 2000 rpm en una centrifuga clínica. El paquete celular obtenido de la disgregación fue resuspendido en RPMI al 10 % de SFB, de tal manera que las células del paquete fueron sembradas en cajas de cultivo de 100 mm (Corning Inc. USA). Por otro lado, se añadió nuevamente a la muestra de tejido remanente 10 ml de tripsina y se continuó durante 15 minutos más con agitación suave a 37 °C. La mezcla se filtró a través de una malla de nylon que permitió sólo el paso de la tripsina con el material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. Las células obtenidas del disgregado fueron cultivadas en cajas de cultivo de 5 ml y se mantuvieron en incubadora al 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas máximo. Después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio, de tal manera que fueron removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 %. Se obtienen poblaciones fibroblásticas o epiteliales, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo

resiembras, que permitieron mantener poblaciones de un solo tipo celular. La resiembra consistió en separar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentra a un 70 % de saturación, con ayuda de la proteasa tripsina al 0.05 % por 1 a 3 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas con PBS y centrifugadas (2000 rpm) dos veces y posteriormente fueron contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo <sup>51, 52</sup>

### **Preparación de los compuestos**

La Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu, fueron obtenidos del Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

Para los compuestos se preparó una solución stock con 1 mg de compuesto y fue disuelto en 100 µl del vehículo correspondiente:

Dioscina ----- Dimetil sulfoxido (DMSO).

Diosgenina----- Etanol-DMSO 3:1 (EtOH:DMSO).

Diosgenina-3-glu---- Etanol-DMSO 3:1 (EtOH:DMSO).

### **Determinación del número celular a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta**

Se sembraron 7500 células por pozo, ya sea de células de CaCu o células fibroblásticas en cajas de 96 pozos (Corning, USA), con 100 µl de medio RPMI-1640 al 5% de NCS, en las cuales se colocaron concentraciones de hasta 100 µg/ml de cada compuesto a probar. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al* (1989)<sup>53</sup>, para ello, se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pozos, se dejó secar al aire e inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma- Aldrich, USA) por 15 minutos, al cabo de este tiempo, se retiró el fijador y se dejó secar al aire, posteriormente se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 1.1 % (Sigma- Aldrich. USA) por 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada.

Nuevamente, se dejó secar al aire. Por último, el colorante es solubilizado en ácido acético (J.T.Baker, Mex) al 10 % en agitación por 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia del sobrenadante a 590 nm en un lector de ELISA (Image Tecan Spectra, USA). Los resultados de los grupos fueron comparados con el respectivo control.

### **Determinación de la proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CFSE)**

Para el ensayo de carboxifluoresceína fueron utilizados los linfocitos obtenidos a través del proceso antes descrito; después de haber sido contadas las células se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Para marcar con el tinte carboxifluoresceína diacetato succinimidyl ester<sup>54</sup> (CFSE; Sigma-Aldrich, USA), los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10  $\mu$ l de CFSE (12  $\mu$ M por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS al 5 % de SFB, luego se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 ml a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25  $\mu$ l de fitohemaglutinina/ml (PHA; Micro Lab S.A., Mex.) diluida 1:10 en PBS. A continuación, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 ml con el tratamiento a evaluar cuidando de mantener una densidad de  $1 \times 10^6$ /ml de medio total. Las condiciones establecidas fueron las siguientes: sin activar (sin FHG); activados (con FHG); solo vehículo, a los cuales se les agregó la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la concentración  $CI_{50}$  más alta obtenida para células de CaCu; y los diferentes compuestos, Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu, con las concentración  $CI_{50}$  más altas. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200  $\mu$ l e incubadas en condiciones de cultivo por 72 horas. Para la evaluación de proliferación, las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo, y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml. Se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de Verseno frío por 5 minutos. Posteriormente se

centrifugó y retiró el Verseno. Finalmente se resuspendió con 500 µl de PBS y 500 µl de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo FACSAria II y los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

### **Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad de LDH**

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos, 7,500 células por pozo provenientes de CaCu con 100 µl de medio RPMI-1640 al 5 % de NCS, por 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con la concentración de  $CI_{50}$  de cada línea por 24 horas adicionales; dando un total de 48 horas de cultivo. Posteriormente se colectó el medio de cultivo en tubos cónicos de 0.6 µl (Eppendorf, Ger), utilizando un tubo por pozo y fueron centrifugados (Ultracentrifuga; Becton Dickinson, USA) a 1500 rpm para desechar cualquier resto celular. En el caso de los linfocitos, fue utilizado para su evaluación el sobrenadante (medio de cultivo) proveniente de la técnica de proliferación con CSFE, los cuales fueron centrifugados a 1500 rpm para desechar cualquier resto celular. Las condiciones para la evaluación fueron los siguientes controles: control basal (únicamente medio de cultivo); control negativo (células sin tratamiento, con medio de cultivo y suero al 5 %); Control positivo (células lisadas durante 1 hora con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 1 % en medio de cultivo fresco); y vehículo (Disolvente en la concentración utilizada para el tratamiento con el compuesto; Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu); cada uno por triplicado. Para la valoración, 40 µl del sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 pozos (desde un tubo cónico a un pozo de la placa), a cada pozo se le adicionó 40 µl de la mezcla de reacción del kit *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, USA) y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente se midió la absorbancia a 490 nm usando lector de placas (SoftMaxPro, USA). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado, procesando los datos arrojados por el espectrofotómetro en el programa Microsoft® Office Excel 2007.

### **Determinación de la activación de la caspasa-3-activa por inmunocitoquímica**

Para determinar si la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu inducen la activación de la caspasa-3 como parámetros para inducir apoptosis, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1 x 1 cm en un volumen de 300  $\mu$ l de RPMI-1640 al 5 % de NCS en cámara húmeda por 24 horas. El tratamiento consistió en aplicar las  $CI_{50}$  de los compuestos Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu respectivamente y se procedió a realizar la detección de la caspasa-3, por inmunocitoquímica. Brevemente: las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % de PBS durante 15 minutos, al término del tiempo se procedió a lavar cuidadosamente 3 veces con PBS, posteriormente las células se lisaron con tritón X-100 al 0.5% (Gibco, USA) durante 5 minutos a 4 °C; las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS antes de adicionar el anticuerpo primario anti-caspase 3, active antibody produced in Rabbit 1:50 en PBS por 2.5 h ( SIGMA-Aldrich,. USA). Se realizó un bloqueo por una hora con PBS-BSA (Albumina Sérica de Bovina)-tween-20, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS (Neomarker Fremont, USA) en cámara húmeda en oscuridad durante 1.5 h. Posteriormente se lavó la muestra 3 veces con PBS para después aplicar el fluorocromo DAPI (Sigma- Aldrich, USA durante 30 segundos e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS para finalmente proceder a colocar la muestra con medio de montaje Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, USA). Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

## **Evaluación de la fragmentación de DNA por medio de la técnica de TUNEL**

Gavrieli *et al*<sup>55</sup>, desarrollaron la técnica de marcaje *in situ* denominada TUNEL (Transfer Uridin Nick-End Labelling). TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena del ADN por activación de la endonucleasa endógena. Los nucleótidos biotinilados, son incorporados por la enzima TDT al extremo 3'OH del ADN fragmentado. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una fluorescencia roja. Para determinar si el efecto antiproliferativo de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu inducen fragmentación del ADN, como un parámetro que determine la inducción de muerte apoptótica, 50 000 células fueron sembradas en cubreobjetos en las mismas condiciones que se hizo para la determinación de la procaspasa-3. Al término del cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS preparado al momento. La fragmentación del ADN fue determinada mediante el kit Apoptag Red *in situ* apoptosis detection Kit (Chemicals, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Las preparaciones fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, USA), se guardaron en oscuridad a -20 °C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

## **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de los ensayos experimentales fueron sometidos a un análisis estadístico de varianzas (ANDEVA) con una significancia del 0.05% seguida de una prueba de Tukey con el paquete estadístico SPSS 14.0 para Windows, todos los resultados se compararon contra el vehículo.

## Resultados

### Actividad antiproliferativa de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en células de CaCu

Con la intención de establecer si la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu presentan actividad antiproliferativa en líneas celulares provenientes de CaCu, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con diferentes concentraciones y se determinó la concentración que induce un decremento del 50 % en el número celular ( $CI_{50}$ ) (Fig. 2. Tabla 2).

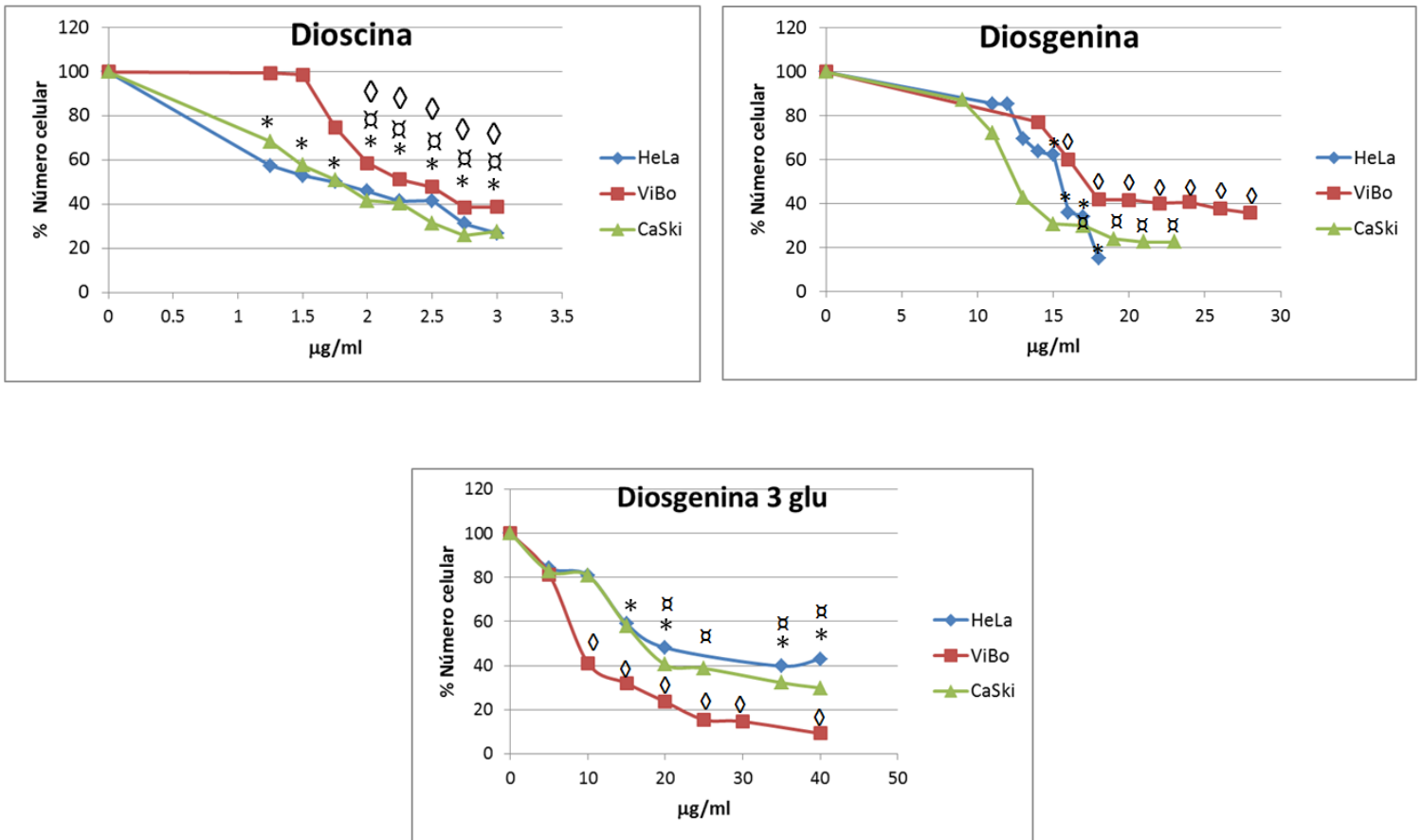


Figura 2. Efecto de la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu en el potencial proliferativo de células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h. para su adherencia y tratadas con diferentes concentraciones de estos esteroides durante otras 24 h. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan por lo menos dos ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. Los símbolos \*<sup>HeLa</sup> <sup>CaSki</sup> y <sup>ViBo</sup> indican diferencia significativa para cada línea celular, \*HeLa <sup>CaSki</sup> y <sup>ViBo</sup> p<0.05 vs vehículo (DMSO para Dioscina; ETOH-DMSO para Diosgenina y Diosgenina-3-Glu).



Compuesto	HeLa $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° de veces	CaSki $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° de veces	ViBo $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° de veces
Dioscina	1.7	1	1.7	1	2.5	1
Diosgenina	15	8.5	13	7.4	17	6.7
Diosgenina-3-glu	24.8	14.5	22.5	13.2	14	5.6

Tabla 2.  $CI_{50}$  calculadas matemáticamente para cada línea celular. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. El N° de veces es la razón geométrica de la  $CI_{50}$  de la Dioscina entre la  $CI_{50}$  de la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu.

Los resultados obtenidos establecen que la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu presentan actividad antiproliferativa en las tres líneas tumorales de manera dependiente de la concentración, es decir conforme se incrementa la concentración del compuesto, el número celular disminuye. No obstante que las moléculas presentes en la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu tienen un efecto dependiente de la concentración, la cantidad de compuesto que se requiere para inducir un decremento del 50 % en el número celular es diferente (tabla 2), indicando que la Dioscina al requerir menor cantidad de compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular, es más potente que la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu.

### **Actividad antiproliferativa de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en células no tumorales**

Una vez obtenidas las concentraciones de  $CI_{50}$  de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en células de CaCu, estas concentraciones se evaluaron en células no tumorales con el propósito de establecer si la actividad antiproliferativa presente en esta saponina y derivados afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana y en fibroblastos provenientes del cérvix humano de donadores sanos.

Con respecto a los linfocitos, cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana fueron tratados con las concentraciones de las  $CI_{50}$  obtenidas para las células tumorales y el potencial proliferativo fue determinado mediante el marcaje de las

células con CFSE y evaluado por citometría de flujo después de 72 horas de tratamiento (Fig. 3).

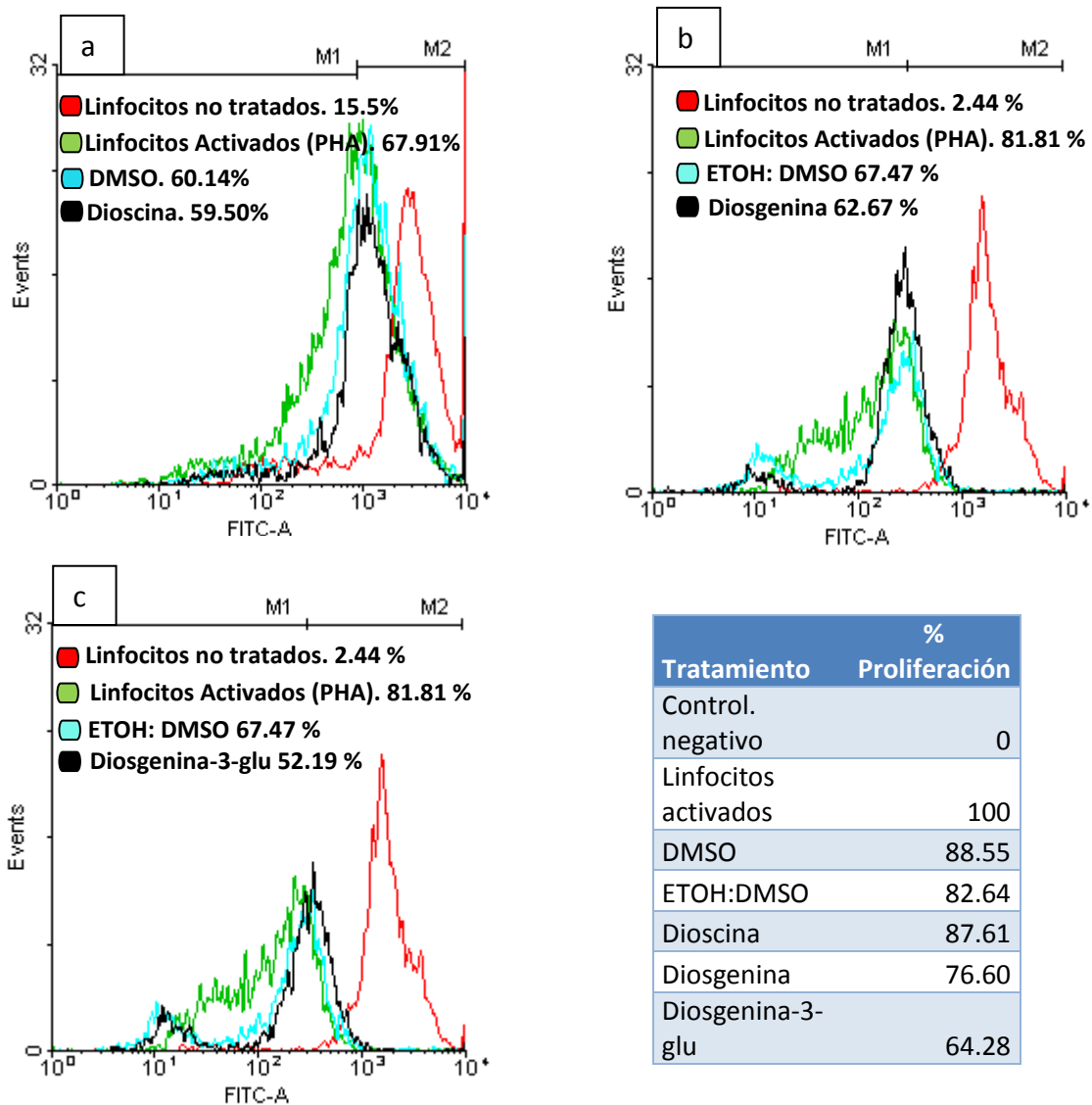


Figura 3 y tabla 3. Efecto de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína y evaluados por citometría de flujo. El potencial proliferativo fue evaluado con linfocitos tratados con la  $Cl_{50}$  de los diferentes compuestos y células sin tratamiento. La disminución de la fluorescencia indica el aumento de la proliferación. a) células tratadas con 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de la Dioscina, b) células tratadas con 16.89  $\mu\text{g/ml}$  de la Diosgenina, c) células tratadas con 24.8  $\mu\text{g/ml}$  de la Diosgenina-3-glu. Linfocitos activados con fitohemaglutinina y marcados con CFSE. Linfocitos no tratados; sin fitohemaglutinina con carboxifluoresceína. La tabla 3 muestra un reajuste de los porcentajes de la proliferación de los linfocitos tomando como 100 % aquella de los linfocitos activados.

Si tomamos a los linfocitos activados como el 100 % de proliferación, obtenemos que el DMSO y el ETOH:DMSO que son los vehículos de la Dioscina y la Diosgenina-3-glu respectivamente, disminuyeron la proliferación a 88.55 y 82.64 %, disminución que varió poco con la Diosgenina (16.89 µg/ml), y la Dioscina (2.5 µg/ml) con 87.61 % y 76.60 %, respectivamente. Sin embargo, la Diosgenina-3-glu presentó un efecto inhibitorio mayor, con un 17.39 % a la concentración de 24.8 µg/ml, con respecto a su vehículo ETOH-DMSO (Figura 3 y Tabla 3). Los resultados muestran que la Dioscina y la Diosgenina no afectan significativamente el potencial proliferativo de las células linfocíticas en comparación con sus vehículos, mientras que la Diosgenina-3-glu si lo hace .

En el caso de los fibroblastos, las células fueron estimuladas con 2.5, 16.89 y 24.8 µg/ml de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu, respectivamente, y el número celular fue determinado por cristal violeta después de 24 horas de tratamiento (Fig. 4).

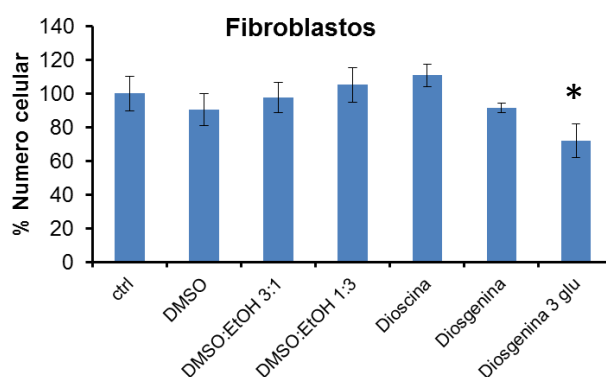


Figura 4. Efecto de la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu, sobre el potencial proliferativo de células no tumorales (fibroblastos provenientes de cérvix humano). Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 h para su adherencia y tratadas 24 h más con las  $Cl_{50}$  más altas obtenidas de células tumorales de estas saponinas. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. El gráfico representa un ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado.\*implica disminución estadísticamente significativa.  $p < 0.05$  vs vehículo (DMSO para Dioscina; ETOH-DMSO para Diosgenina y Diosgenina-3-Glu).

Los resultados indican que ni los vehículos, ni la Dioscina y la Diosgenina afectaron de manera significativa el potencial proliferativo de las células fibroblásticas, sin embargo, la Diosgenina-3-glu lo afectó en un 30 % (Figura 4).

## Inducción de muerte necrótica por Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu en células de CaCu

Simultáneamente a los ensayos de proliferación en células no tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con las  $Cl_{50}$  de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu con la intención de evaluar si las células son inducidas a una muerte por necrosis. Para ello se realizó la cuantificación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de cultivo (sobrenadantes), como un marcador de necrosis, donde las células necróticas se caracterizan por la pérdida de la integridad de su membrana citoplasmática. Los resultados obtenidos muestran que el efecto necrótico no es muy grande y puede estar influenciado por el número y tipo de los restos glicosídicos, ya que la Dioscina que tiene tres azúcares en el carbono 3 (2 Ramnosas y una glucosa) tiene un efecto necrótico en las tres líneas celulares de CaCu, siendo mayor éste en la línea celular CaSki con un 16 % de necrosis, mientras que para HeLa y ViBo es de 6.18 y 4.85 %, respectivamente. Por su parte, la Diosgenina que no tiene azúcares tiene un 10, 11 y de 0 % para CaSki, ViBo y HeLa respectivamente y para Diosgenina-3-glu, que sólo tiene una glucosa en el carbono 3, no produce necrosis en ninguna de las tres líneas celulares (Tabla 4 y Figura 5 ).

compuesto	% de necrosis		
	HeLa	CaSki	ViBo
Dioscina	6.18* ± 2.82	16.89* ± 2.0	4.85* ± 1.8
Diosgenina	0 ± 1	10* ± 3.8	11* ± 5.4
Diosgenina-3-glu	0 ± 1	0 ± 1.6	0 ± 13.1
Triton X-100	100 ± 9.5	100 ± 1.5	100 ± 5.45

Tabla 4. Efecto necrótico de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu. La necrosis fue medida por la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. Datos expresados en porcentaje tomando como 100 % a las células lisadas con tritón x-100. \*  $p < 0.05$  vs vehículo (DMSO para la Dioscina; ETOH-DMSO para la Diosgenina y la Diosgenina-3-Glu).

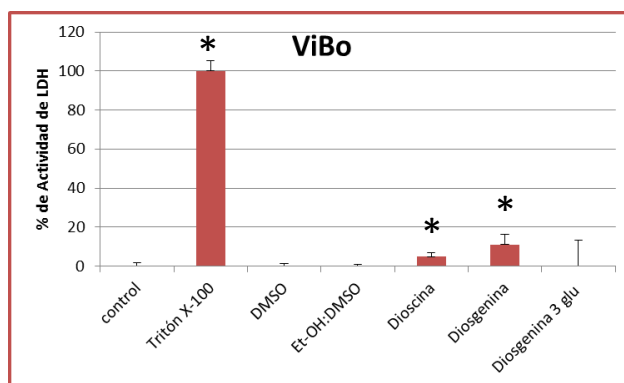
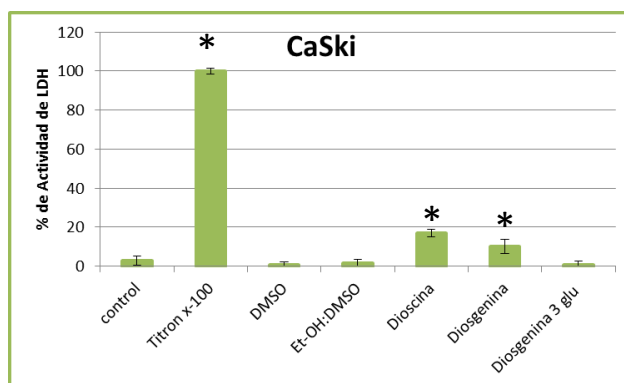
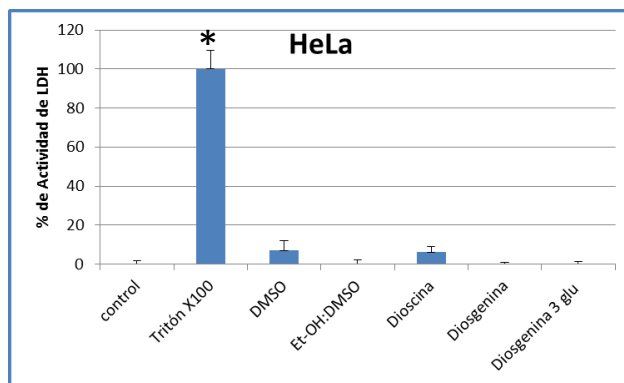


Figura 5. Inducción de necrosis por la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en cultivos de células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo. 7500 células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos. La actividad necrótica fue determinada cuantificando la actividad de la enzima LDH y expresada en porcentaje. control: células sin tratamiento; Tritón: células tratadas con 1% de tritón X-100; EtOH:DMSO; células tratadas con 1 % de una mezcla de 3 partes de etanol y 1 parte de Dimetil sulfóxido; DMSO: células tratadas con 1% de Dimetil sulfóxido; Dioscina: células tratadas con 1.74 µg/ml para HeLa y CaSki y 2.5 para ViBo; Diosgenina: células tratadas con 14.89 µg/ml para HeLa, CaSki 13 µg/ml y 16.89 para ViBo; Diosgenina-3-glu: células tratadas con 17.34 µg/ml para HeLa, CaSki 15.75 µg/ml y 13.24 µg/ml para ViBo. \* p<0.05 vs vehículo (DMSO para Dioscina; ETOH-DMSO para la Diosgenina y la Diosgenina-3-Glu.)

## Inducción de muerte necrótica de la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu en células linfocíticas

Se conocen reportes de que las saponinas, como la Dioscina tienen efecto citotóxico en linfocitos de sangre periférica humana<sup>11</sup>, sin embargo se desconoce si a las concentraciones de  $CI_{50}$  obtenidas para la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu tienen este efecto.

Para ello se realizó la cuantificación de la actividad de la LDH liberada en el medio de cultivo encontrando que en este grupo celular, los compuestos saponinicos no inducen una muerte por necrosis a la concentración de  $CI_{50}$  más alta (Figura 6).

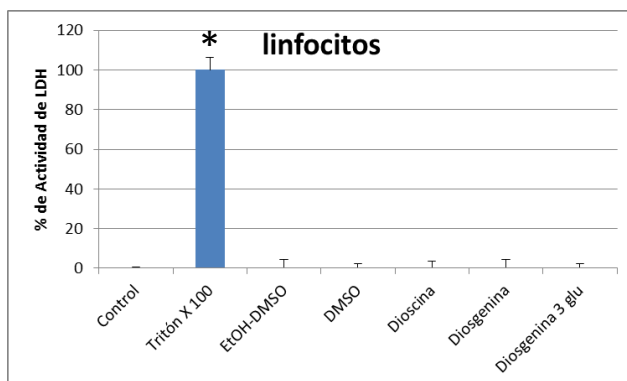


Figura 6. Determinación de la actividad citotóxica en cultivos de células linfocíticas. 200000 células linfocíticas fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos y la actividad de la enzima LDH fue evaluada a las 72 h. control: células sin tratamiento; Tritón: células tratadas con 1% de tritón x-100; DMSO: células tratadas con 1% de Dimetil Sulfóxido; DMSO-Et-OH: células tratadas con 1% de la mezcla 1:3 de Dimetil Sulfóxido- Etanol; Diosgenina: células tratadas con 16.89  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Diosgenina-3-glu: células tratadas con 17.34  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Dioscina: células tratadas con 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La actividad citotóxica fue determinada por la actividad de la enzima LDH y expresada en porcentaje. \*  $p < 0.05$  vs vehículo (DMSO para la Dioscina; ETOH-DMSO para la Diosgenina y la Diosgenina-3-Glu.)

## **Inducción de muerte apoptótica de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en células de CaCu**

Los resultados de muerte celular por citotóxicidad muestran que la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu ejercen un efecto necrótico de un 0 a 16 %, lo cual no explica el decremento celular del 50 % implícito en las  $CI_{50}$  utilizadas, por lo que se procedió a evaluar si los compuestos inducen una muerte por apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.

Para determinar si la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu inducen muerte por apoptosis en las células de CaCu, los cultivos de HeLa, CaSki y ViBo se trataron con las  $CI_{50}$  de los diferentes compuestos y se analizó la morfología celular, así como la inmunodetección de la caspasa-3-activa y la fragmentación del ADN.

En las fotografías se observa que las células tratadas con la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu pierden su forma poligonal, adquiriendo una forma esférica, que implica una disminución en la adherencia celular, así como una reorganización en su citoesqueleto reflejado en la contracción de la célula con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas. Además se aprecia una compactación o fragmentación de la cromatina la cual es también una característica de la muerte por apoptosis (Figuras. 7 a 9). También se encontró positividad para la caspasa-3-activa y para la fragmentación del ADN en las tres líneas tumorales al ser tratadas con la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu (Figuras 10 a 12) ratificando la presencia de un proceso apoptótico.

# CASPASA 3 ACTIVA HeLa

Contraste de  
Fases

Dapi

Caspasa 3  
Activa

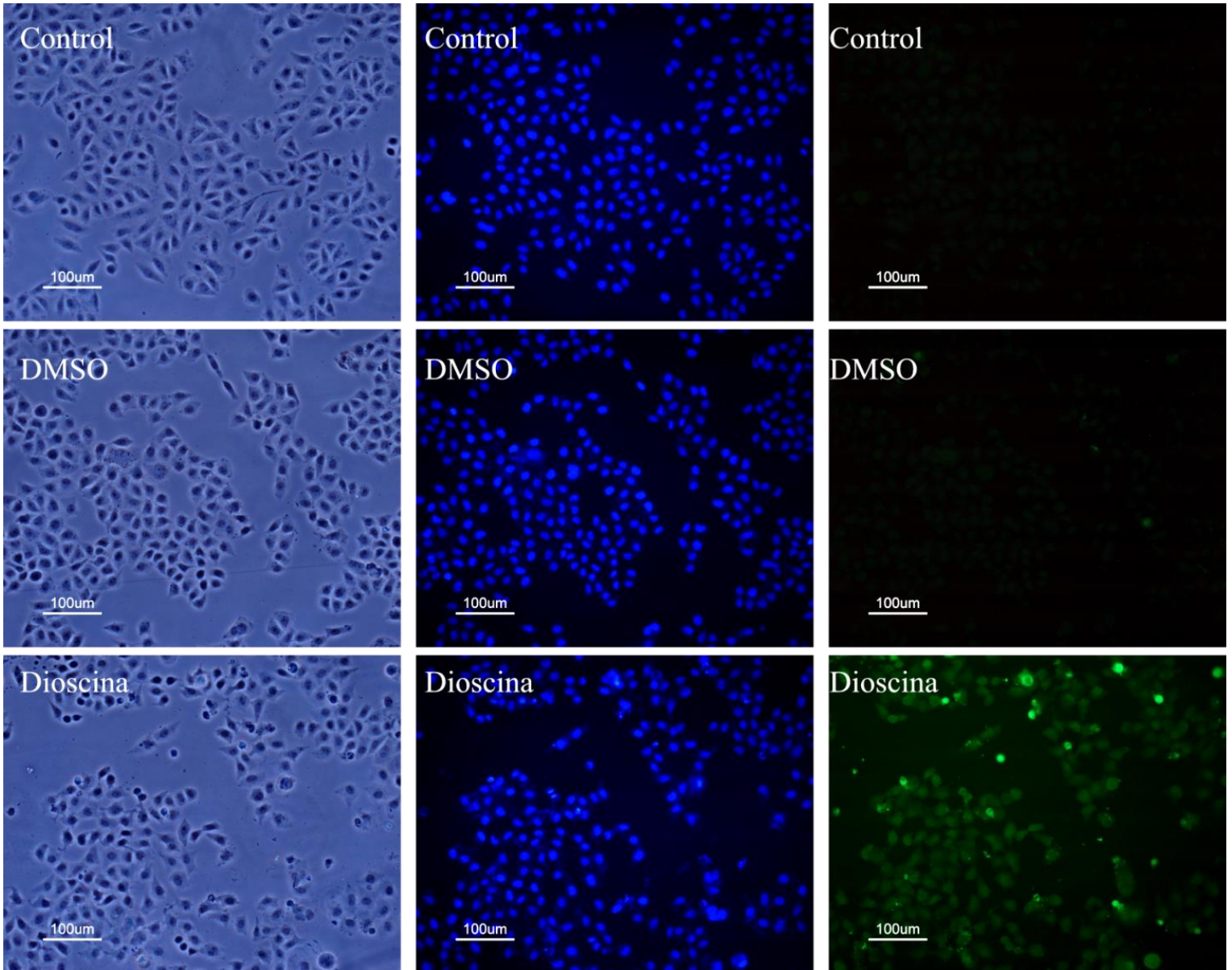


Figura 7a. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células HeLa, después de 24 horas de tratamiento con la Dioscina. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Dioscina en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).



# CASPASA 3 ACTIVA

## CaSki

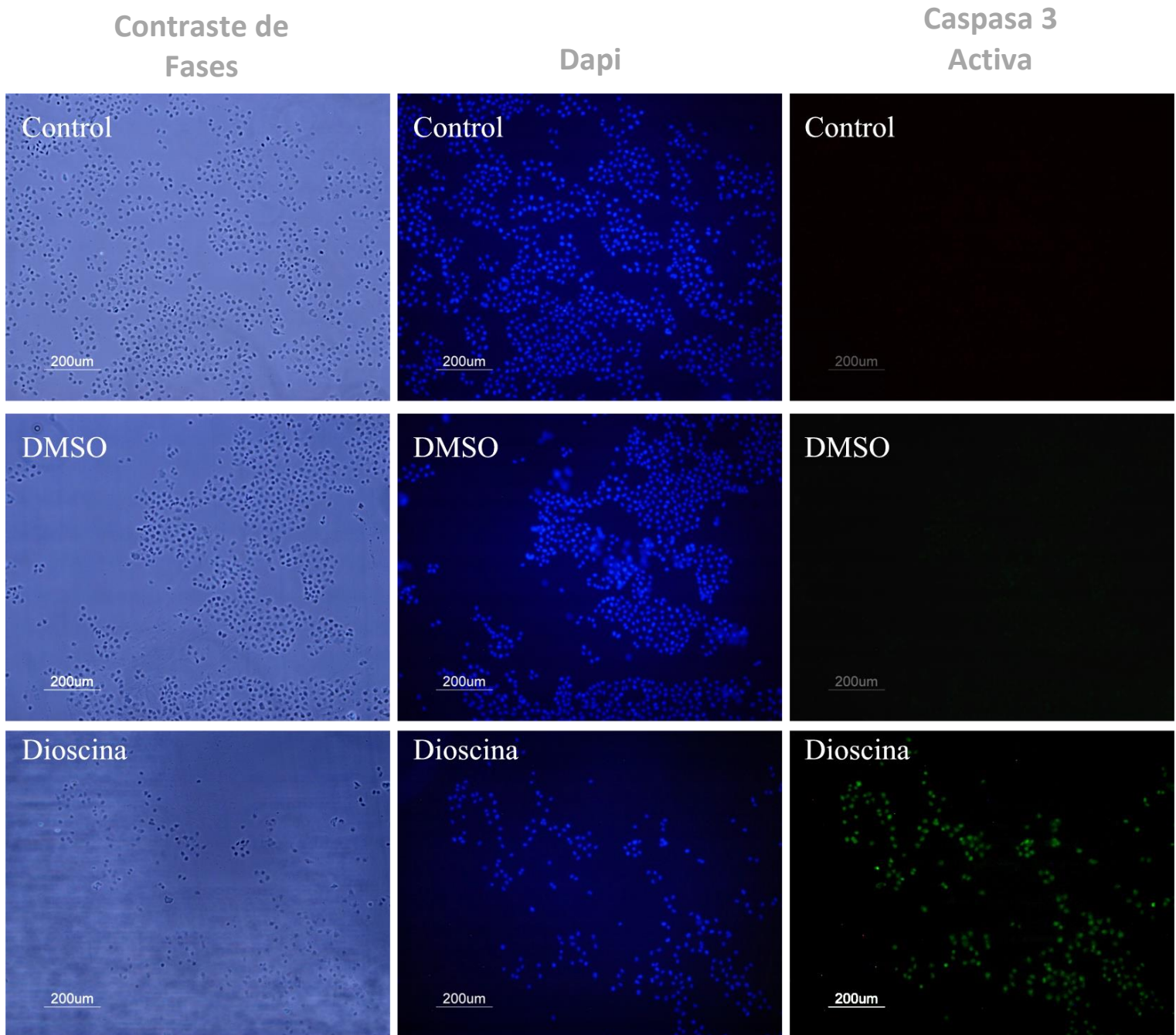


Figura 7b. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células CaSki después de 24 horas de tratamiento con la Dioscina. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Dioscina en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA ViBo

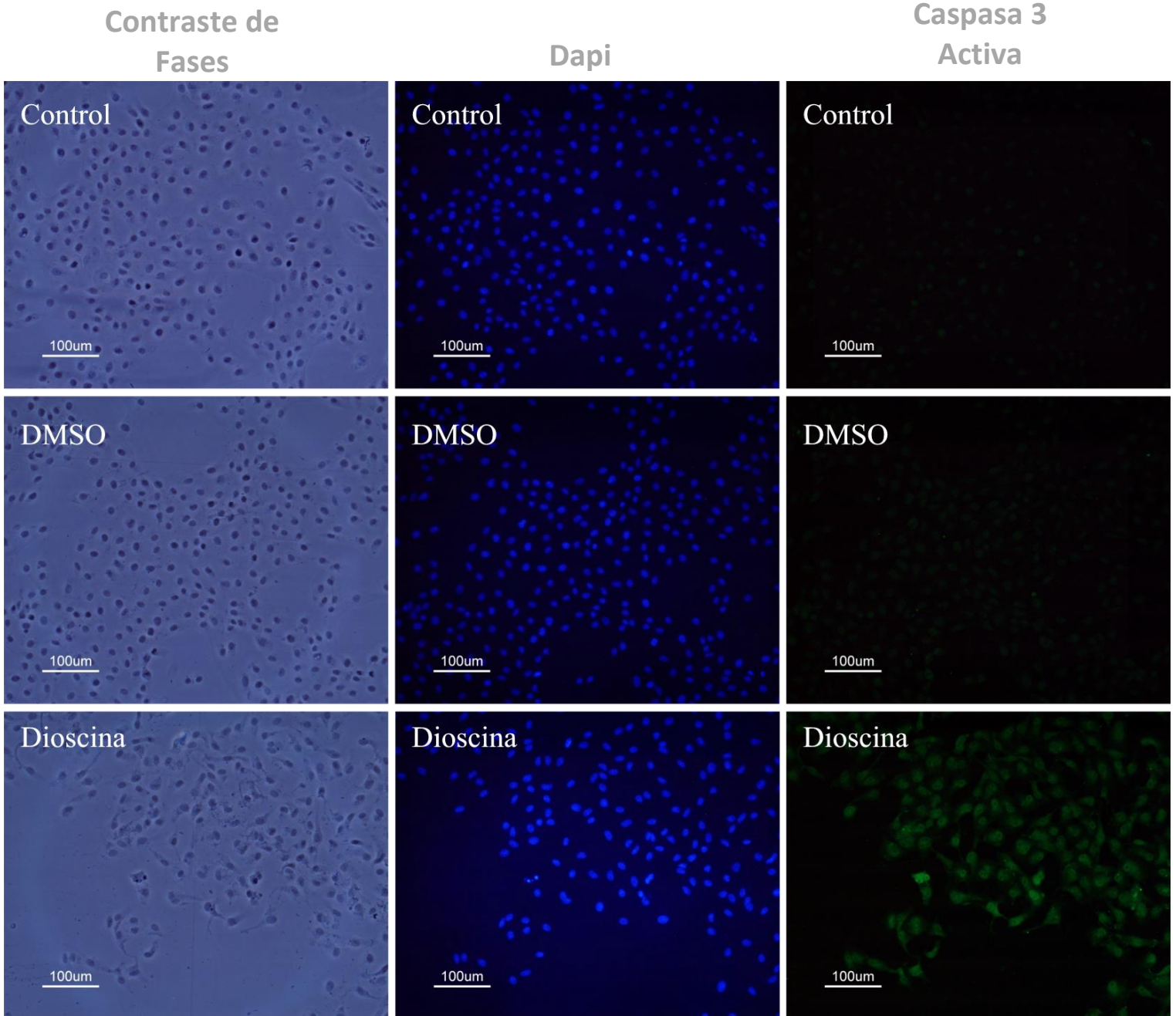


Figura 7c. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células ViBo después de 24 horas de tratamiento con la Dioscine. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Dioscine en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA HeLa

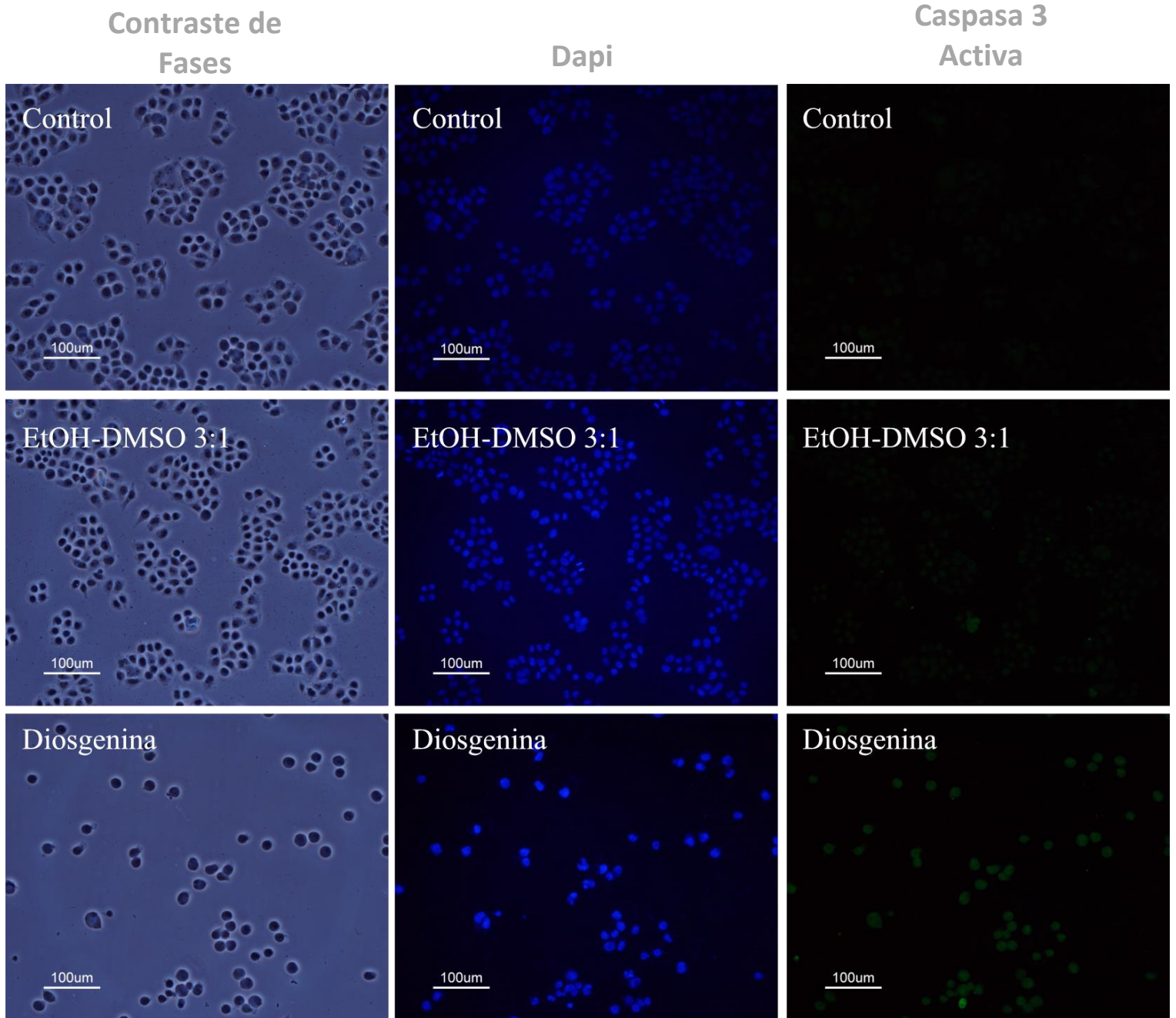


Figura 8a. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células HeLa después de 24 horas de tratamiento con la Diosgenina. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Diosgenina en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA

## CaSki

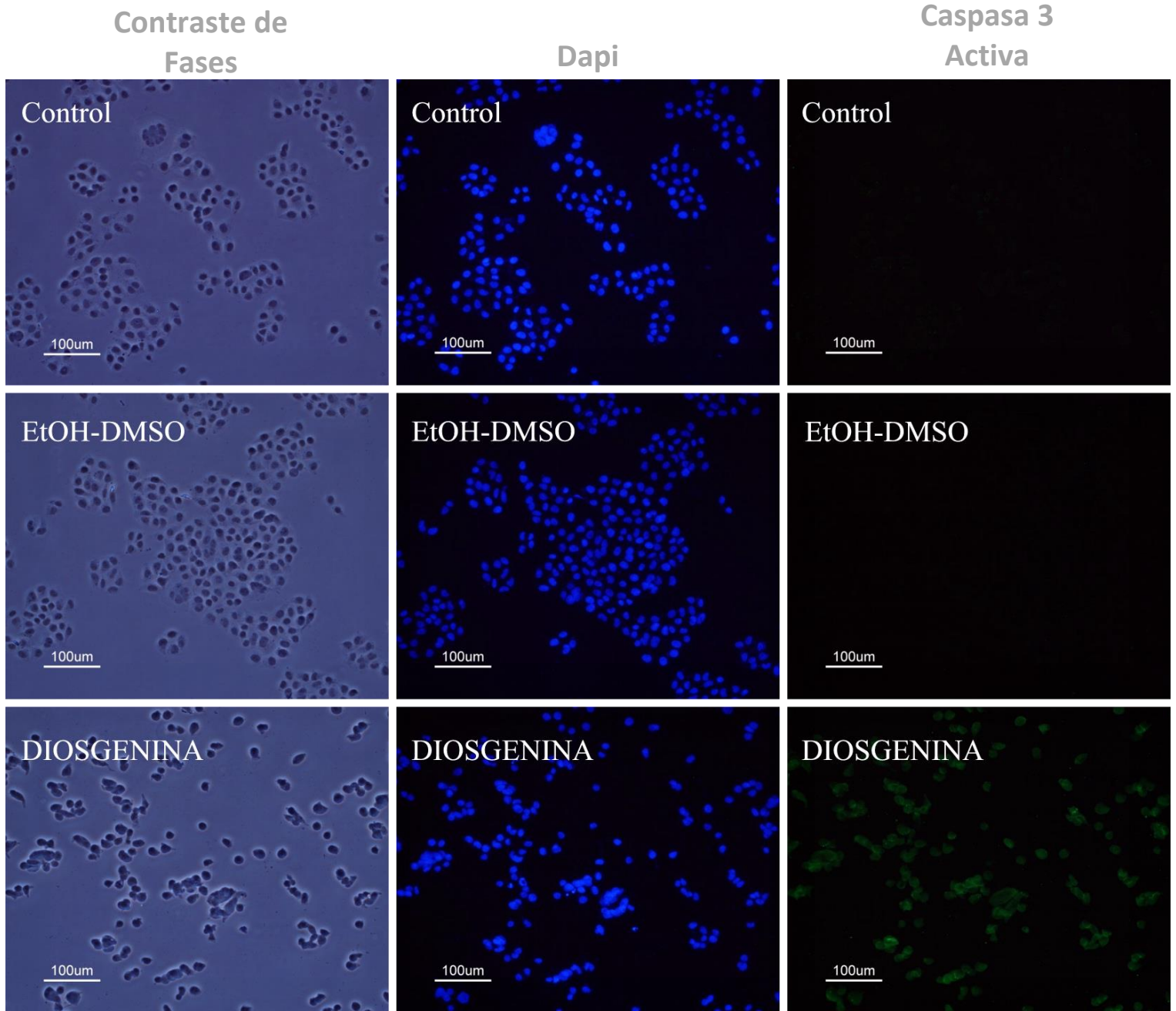


Figura 8b. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células CaSki después de 24 horas de tratamiento con la Diosgenina. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Diosgenina en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA ViBo

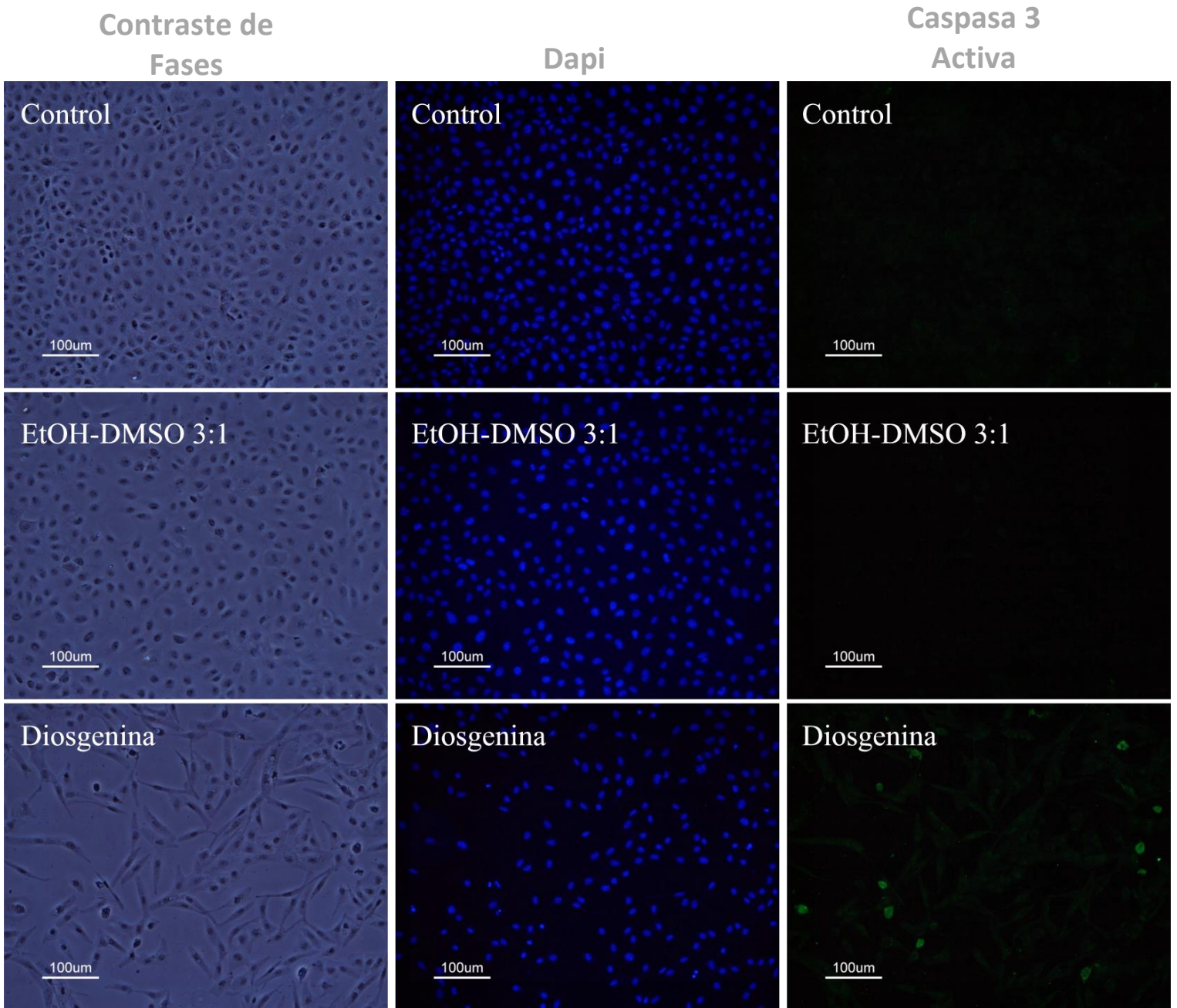


Figura 8c. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células ViBo después de 24 horas de tratamiento con la Diosgenina. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Diosgenina en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA

## HeLa

Contraste de  
Fases

Dapi

Caspasa 3  
Activa

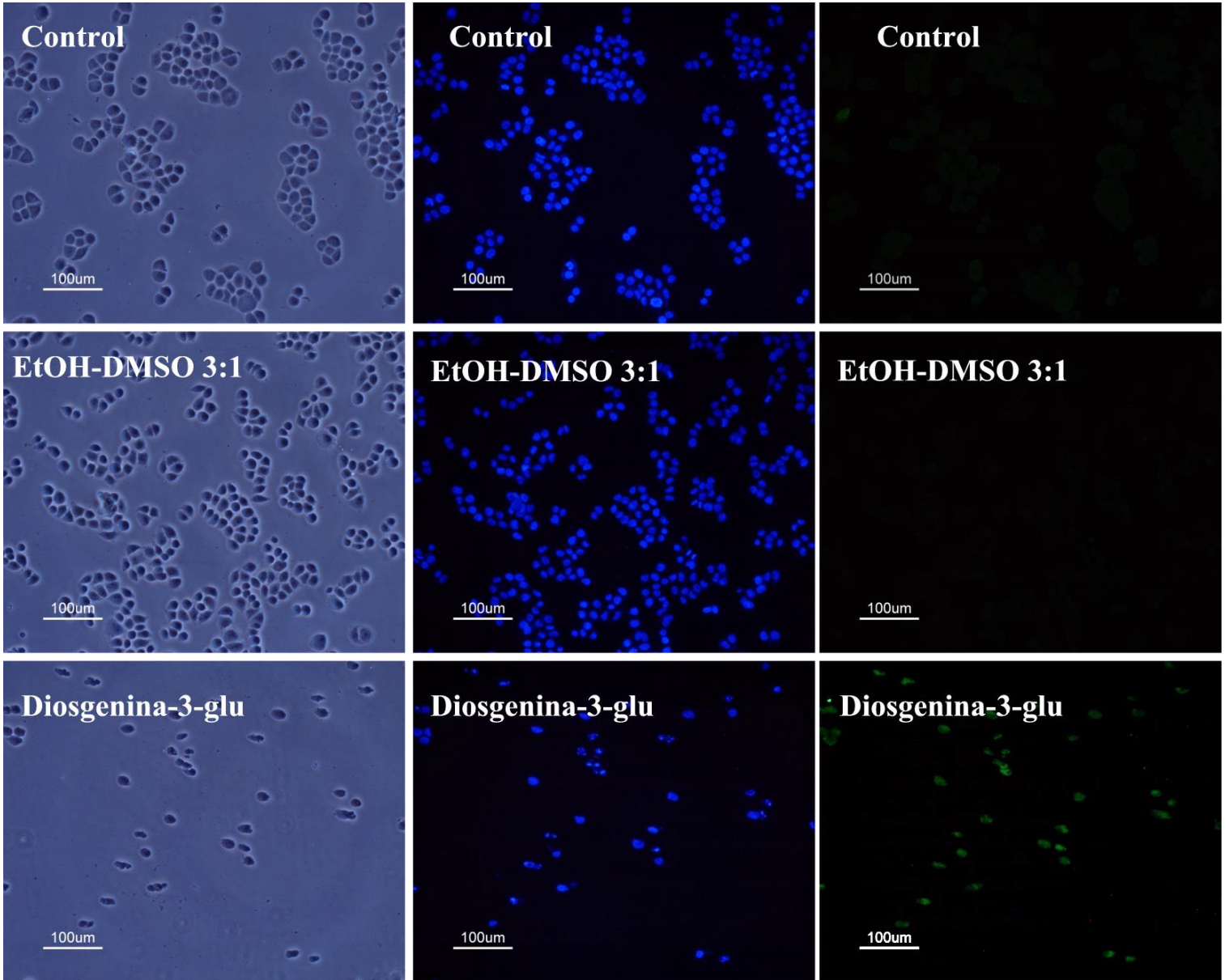


Figura 9a. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células HeLa después de 24 horas de tratamiento con la Diosgenina-3-glu. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Diosgenina-3-glu en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA CaSki

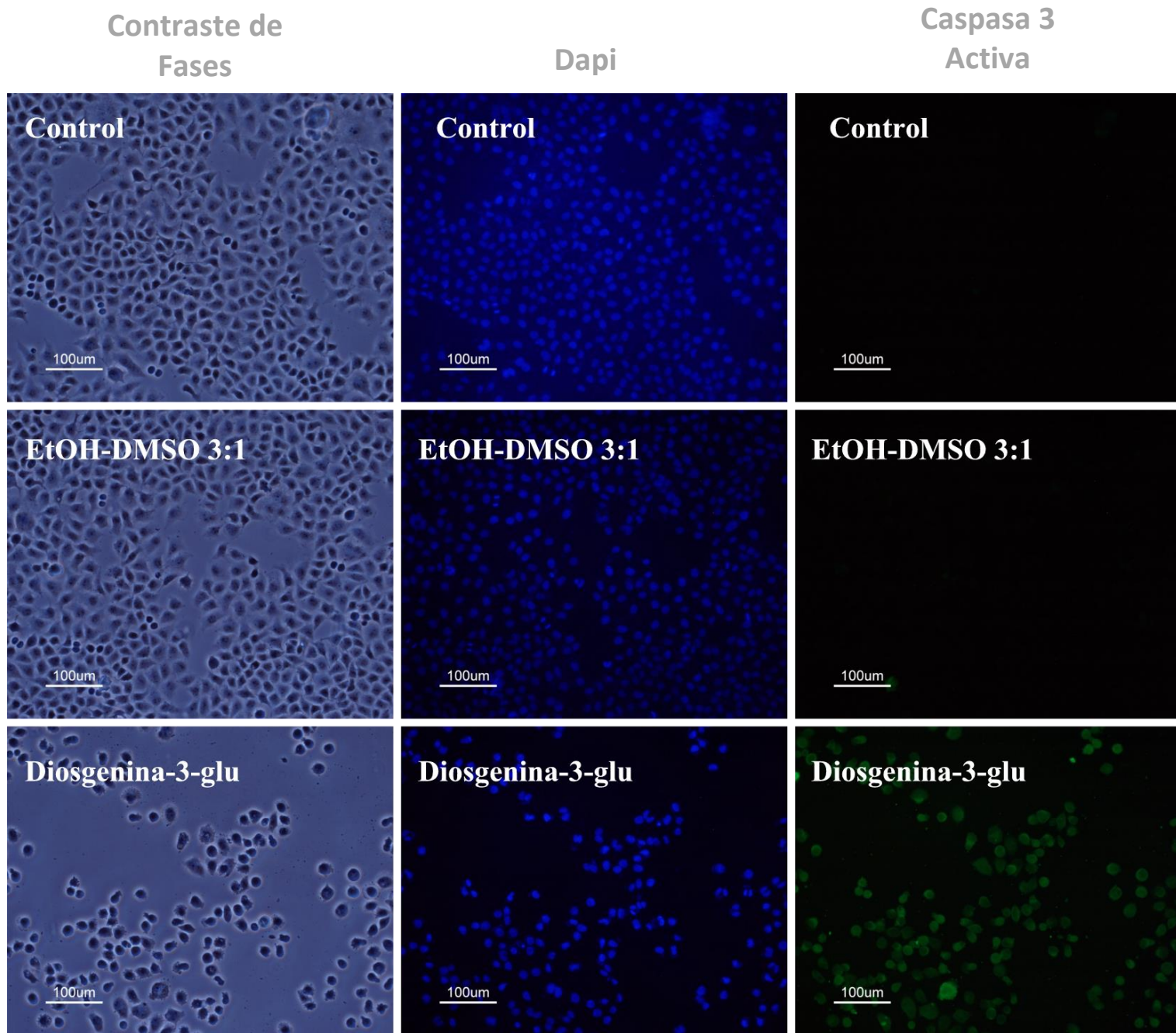


Figura 9b. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células CaSki después de 24 horas de tratamiento con la Diosgenina-3-glu. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Diosgenina-3-glu, en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).

# CASPASA 3 ACTIVA

## ViBo

Contraste de Fases

Dapi

Caspasa 3 Activa

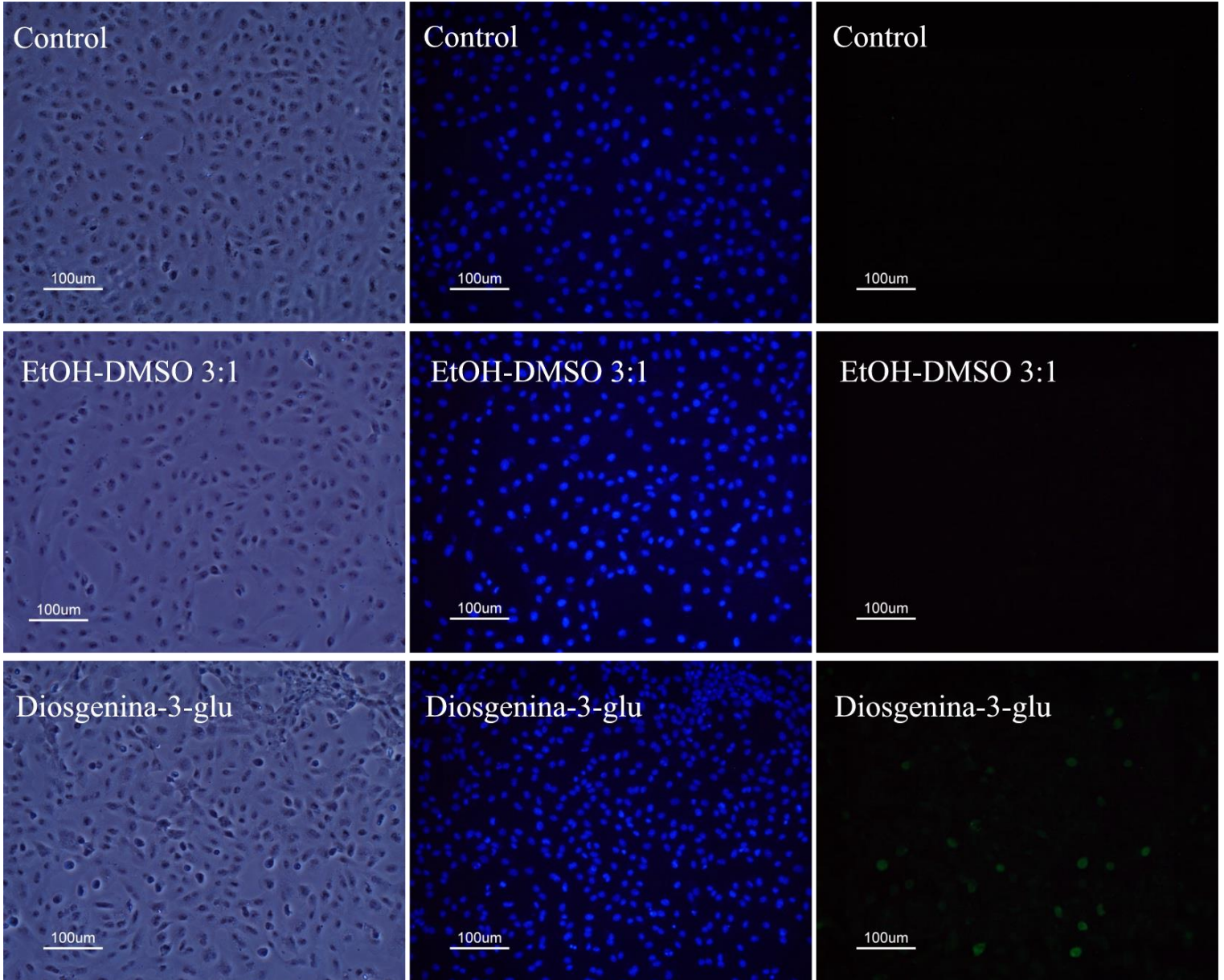


Figura 9c. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células ViBo después de 24 horas de tratamiento con la Diosgenina-3-glu. El contraste de fases permite apreciar los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con la Diosgenina-3-glu en comparación con las células control y del vehículo. Las células redondeadas corresponden a una fuerte compactación de la cromatina como puede observarse con la tinción de DAPI (azul). Las células con características de apoptosis son positivas a la caspasa-3 activa (verde).



# TUNEL HeLa

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

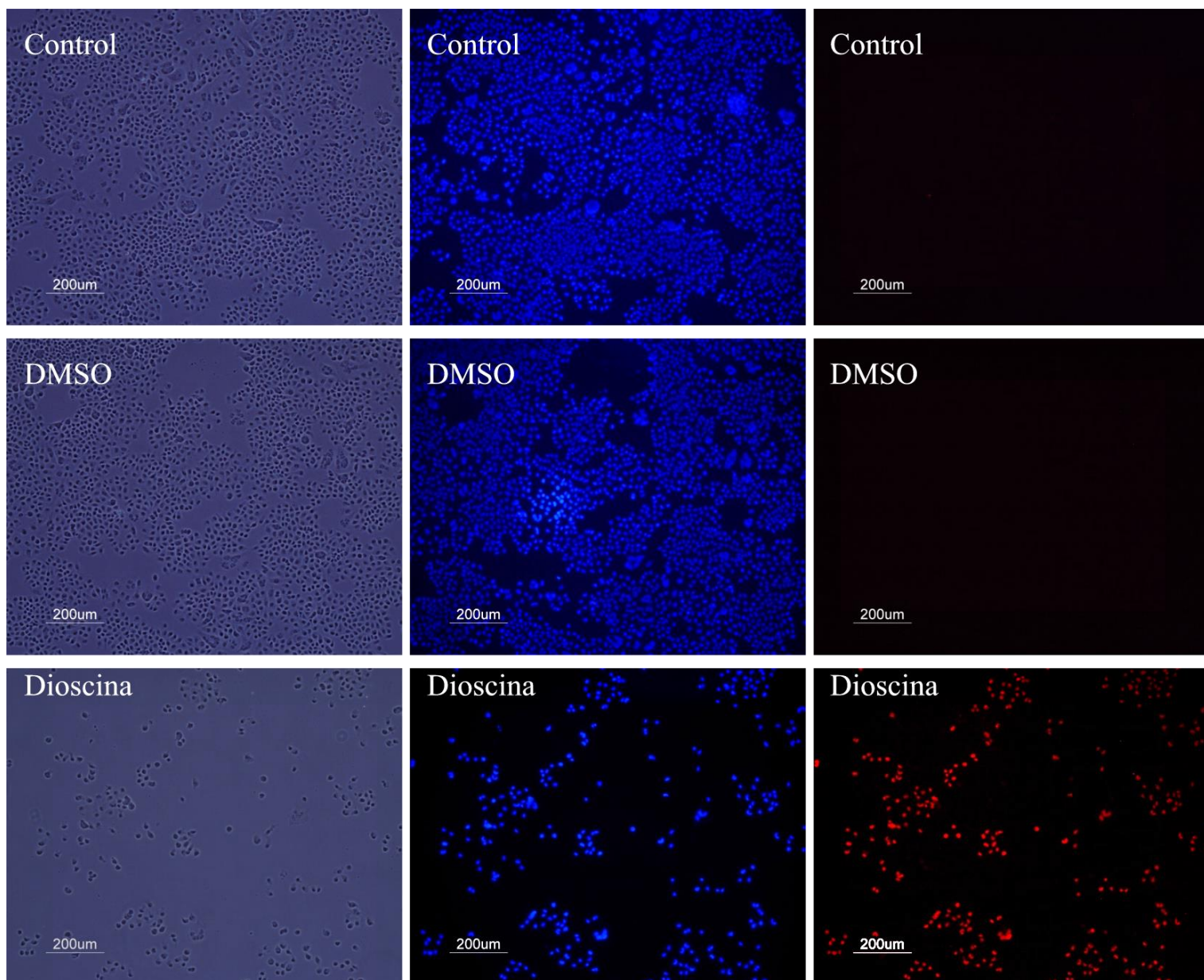


Figura 10 a. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células HeLa. Células tratadas con la Dioscina muestra compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL CaSki

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

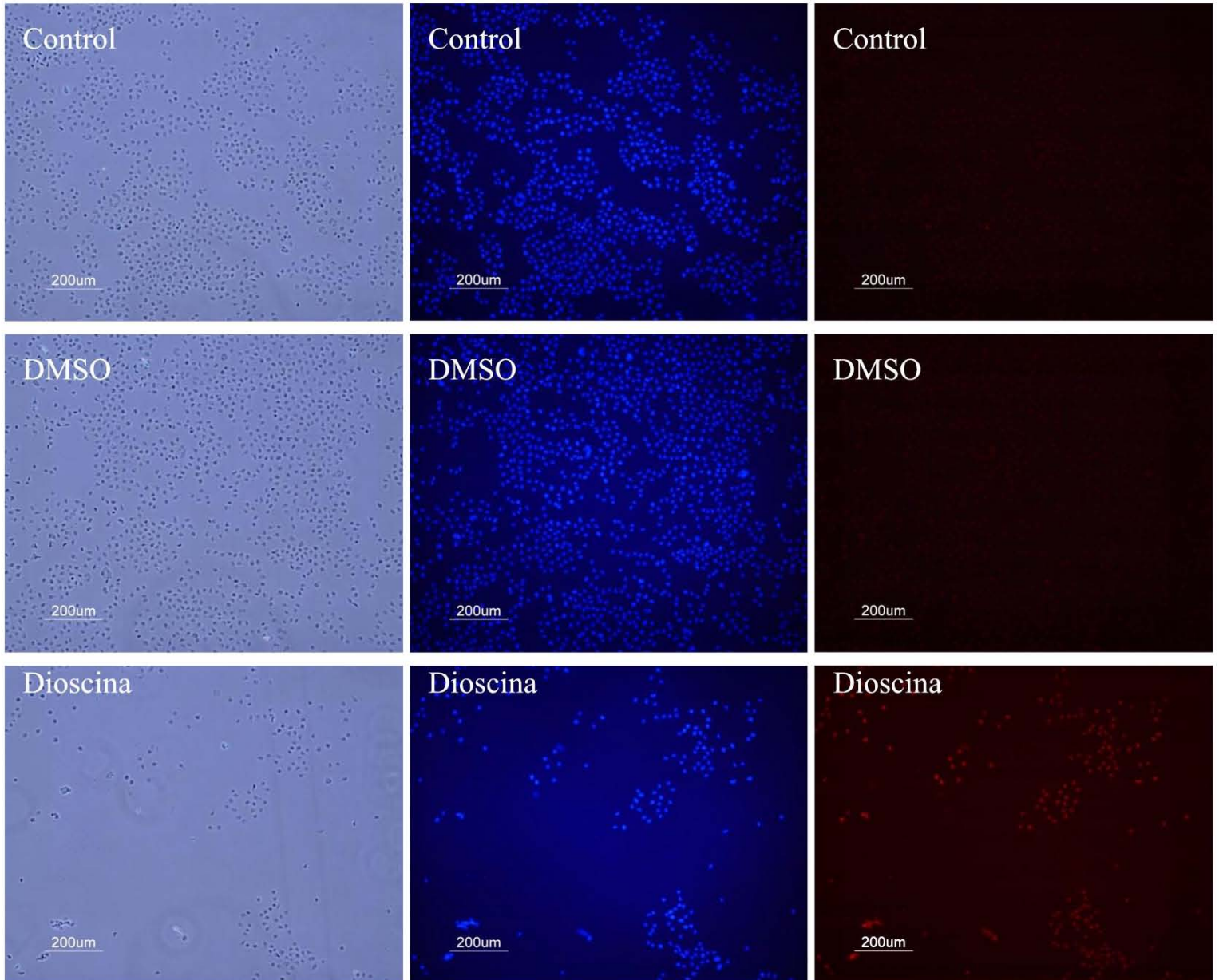


Figura 10 b. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células CaSki. Células tratadas con la Dioscina muestra compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL ViBo

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

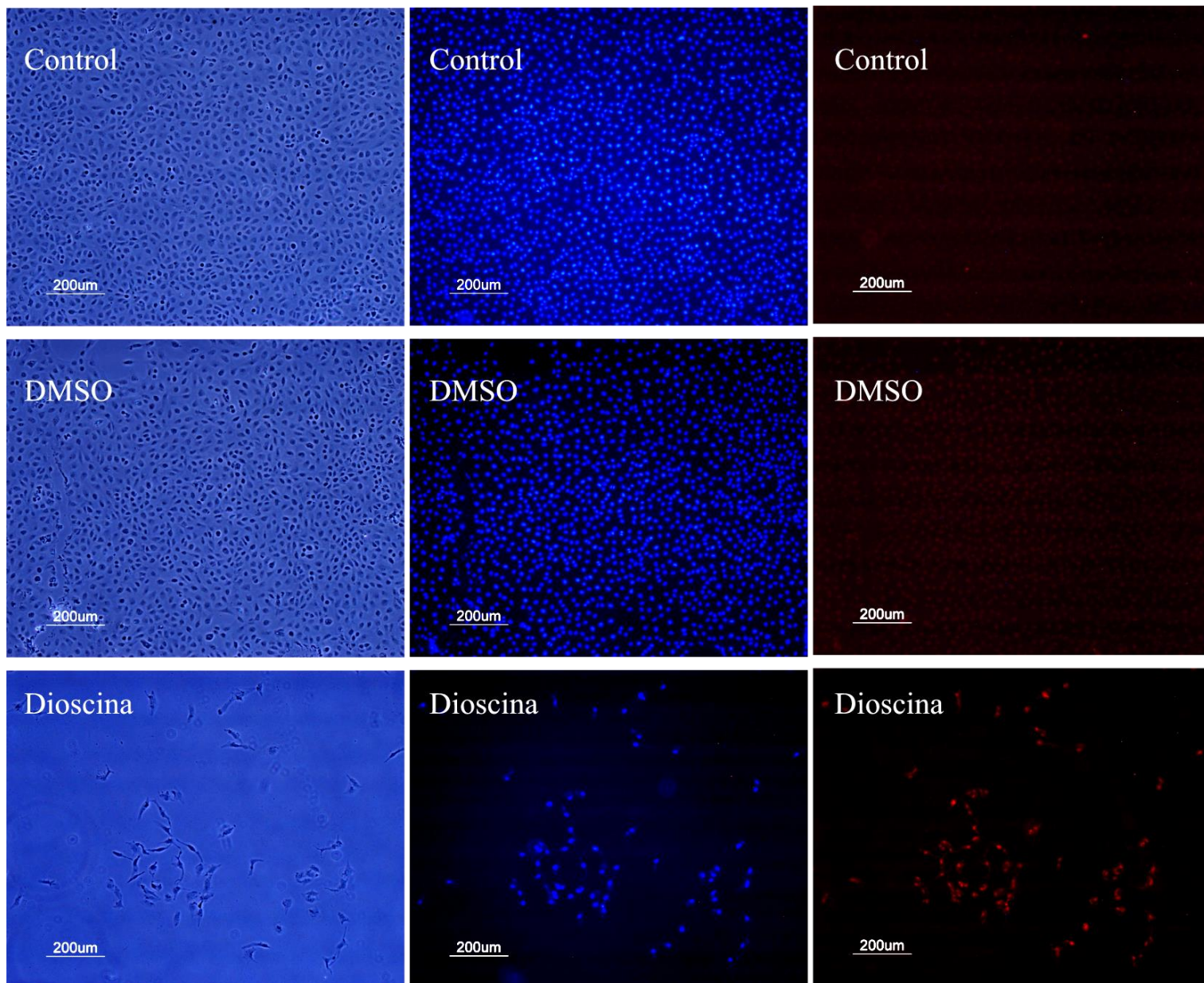


Figura 10 c. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células ViBo. Células tratadas con la Dioscina muestra compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL HeLa

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

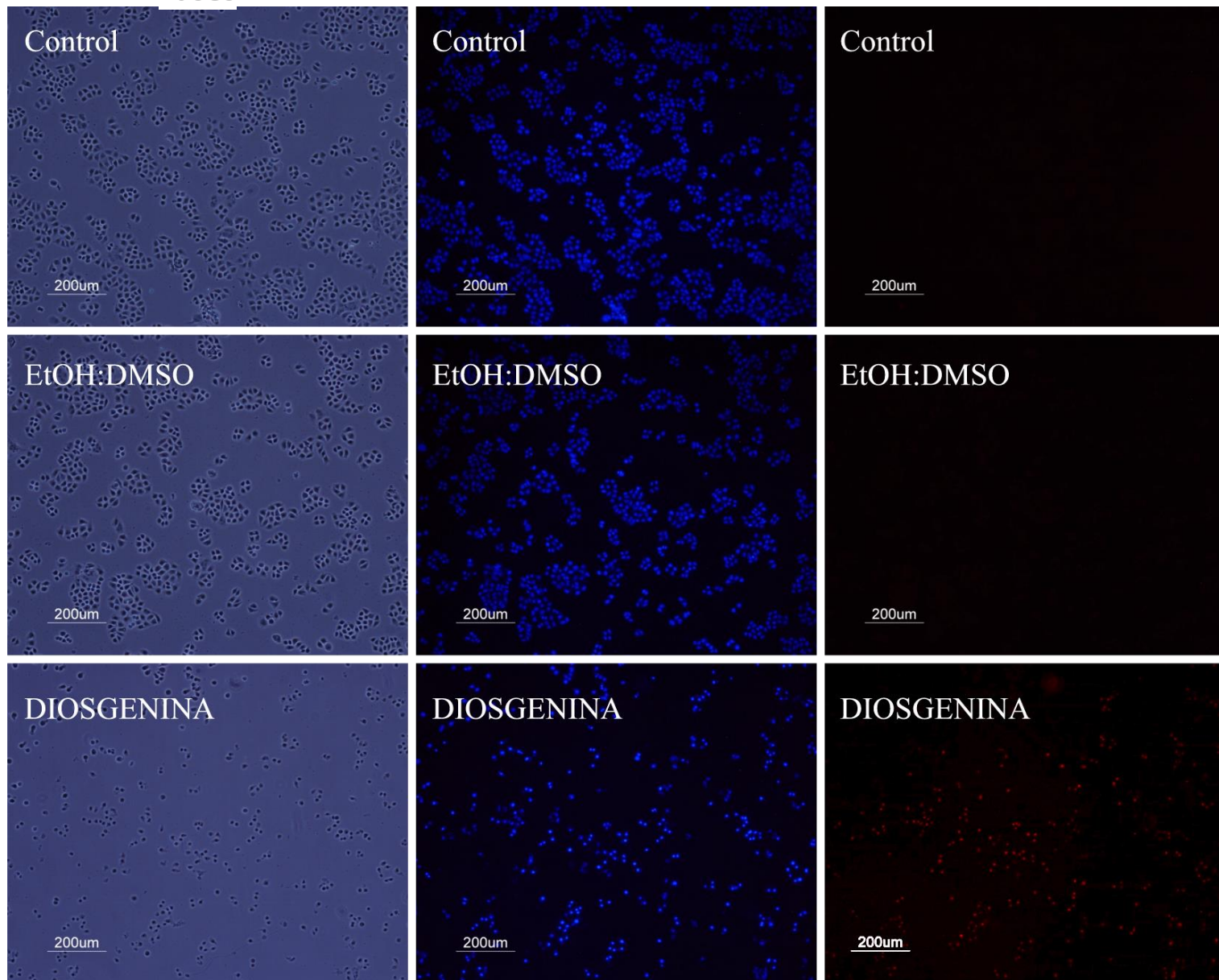


Figura 11a. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células HeLa. Células tratadas con la Diosgenina muestran una compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL CaSki

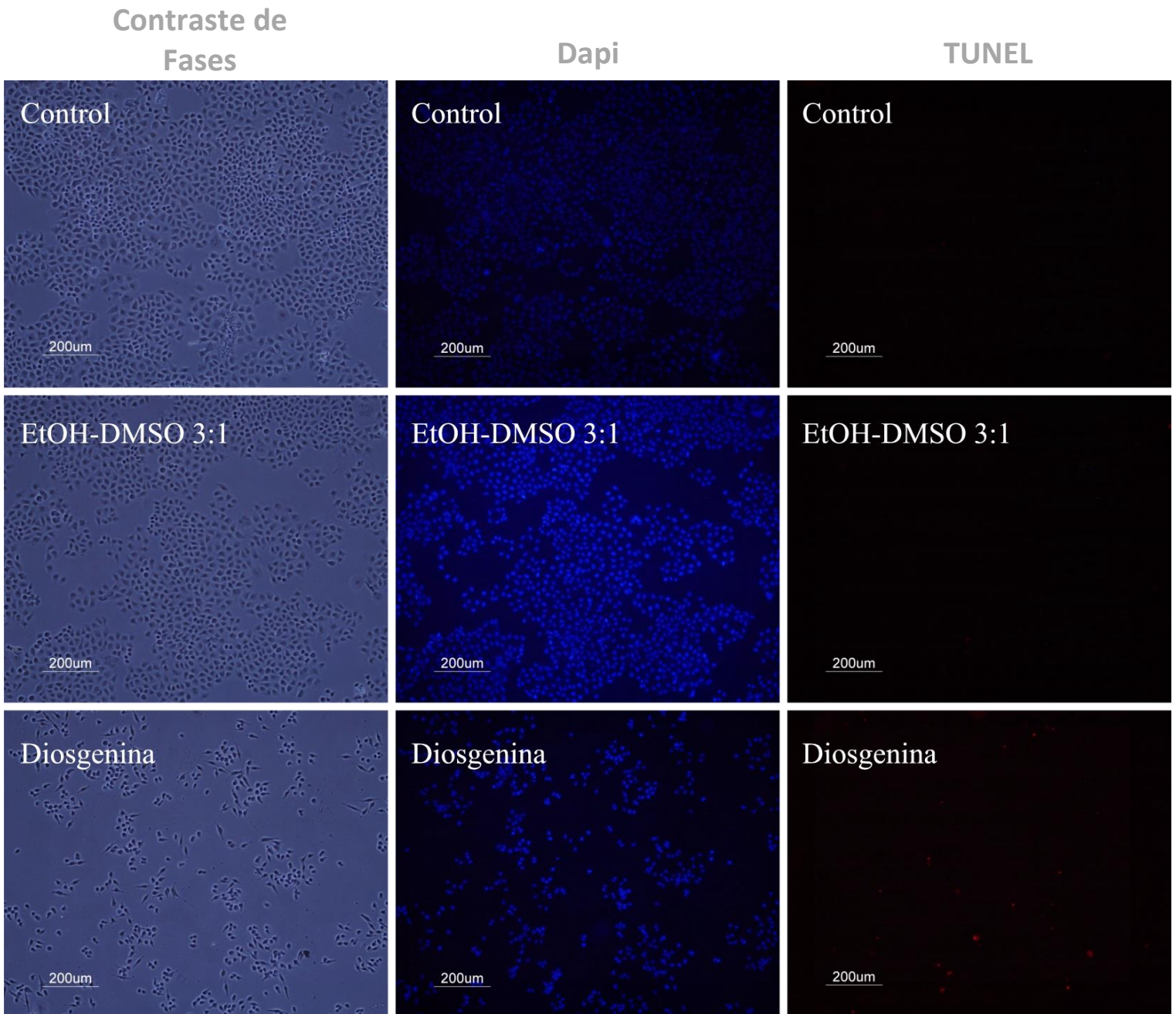


Figura 11b. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células CaSki. Células tratadas con la Diosgenina muestran una compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL ViBo

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

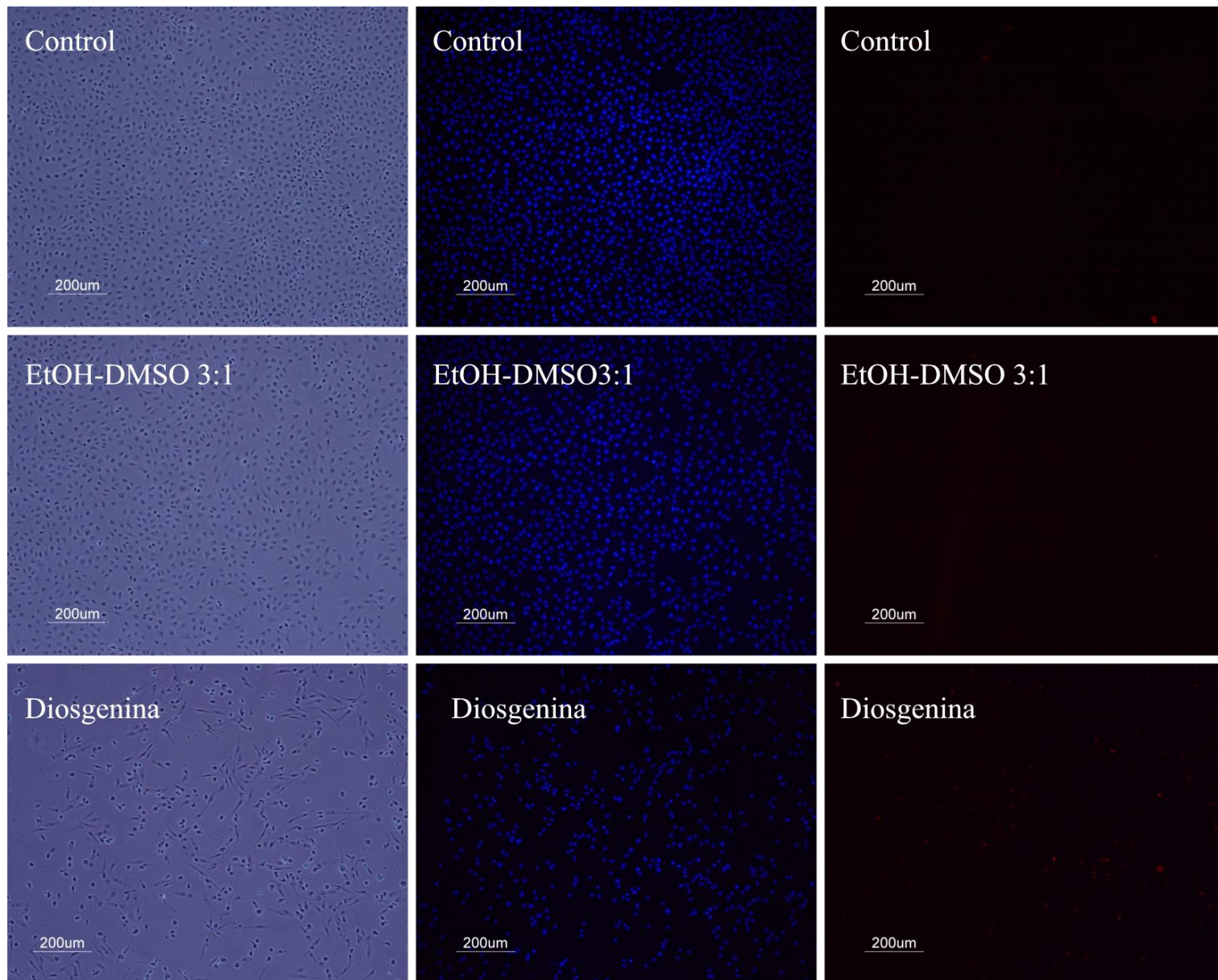


Figura 11c. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células ViBo. Células tratadas con la Diosgenina muestran una compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL HeLa

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

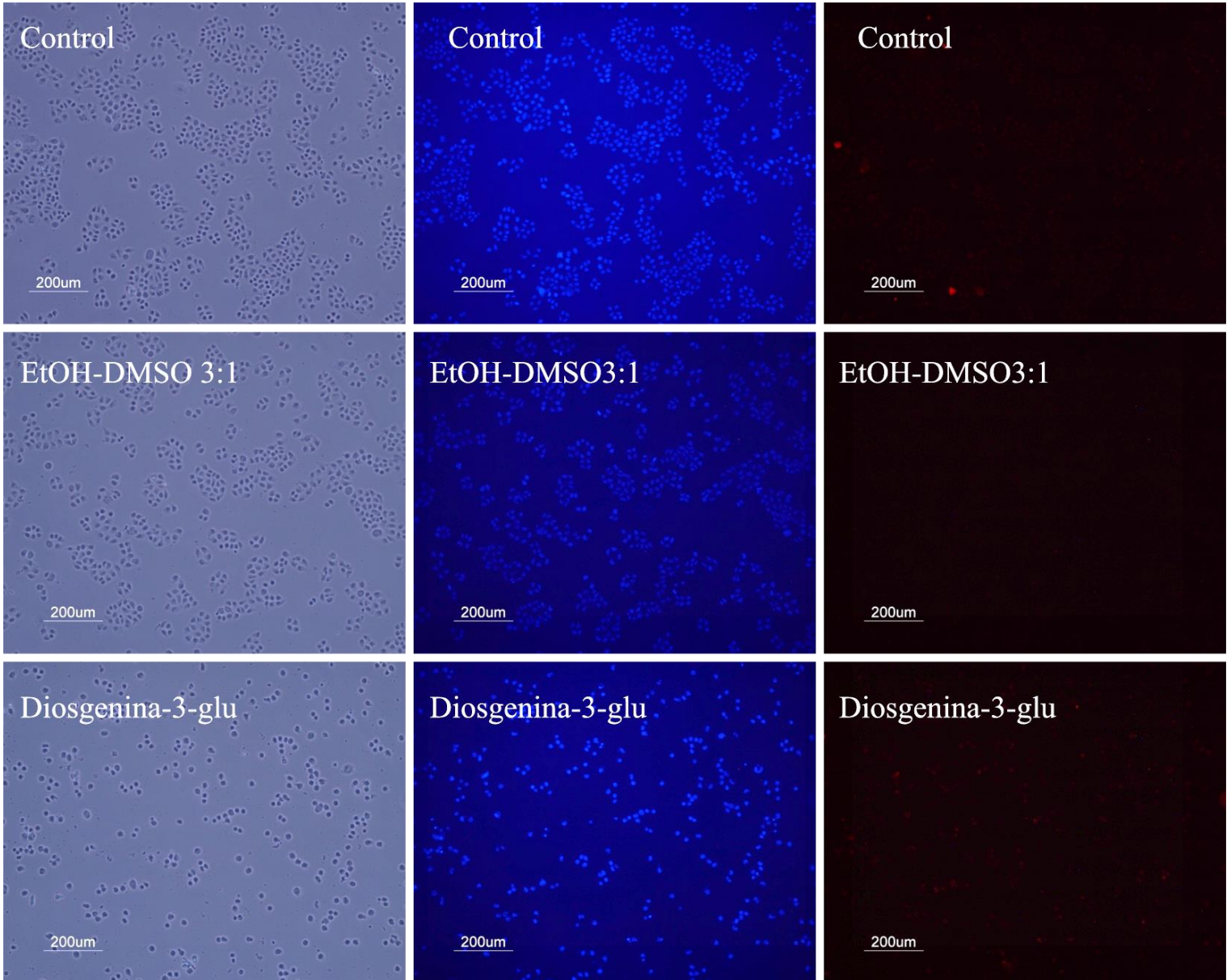


Figura 12a. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células HeLa. Células tratadas con la Diosgenina-3-glu muestran una compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

# TUNEL CaSki

Contraste de  
Fases

Dapi

TUNEL

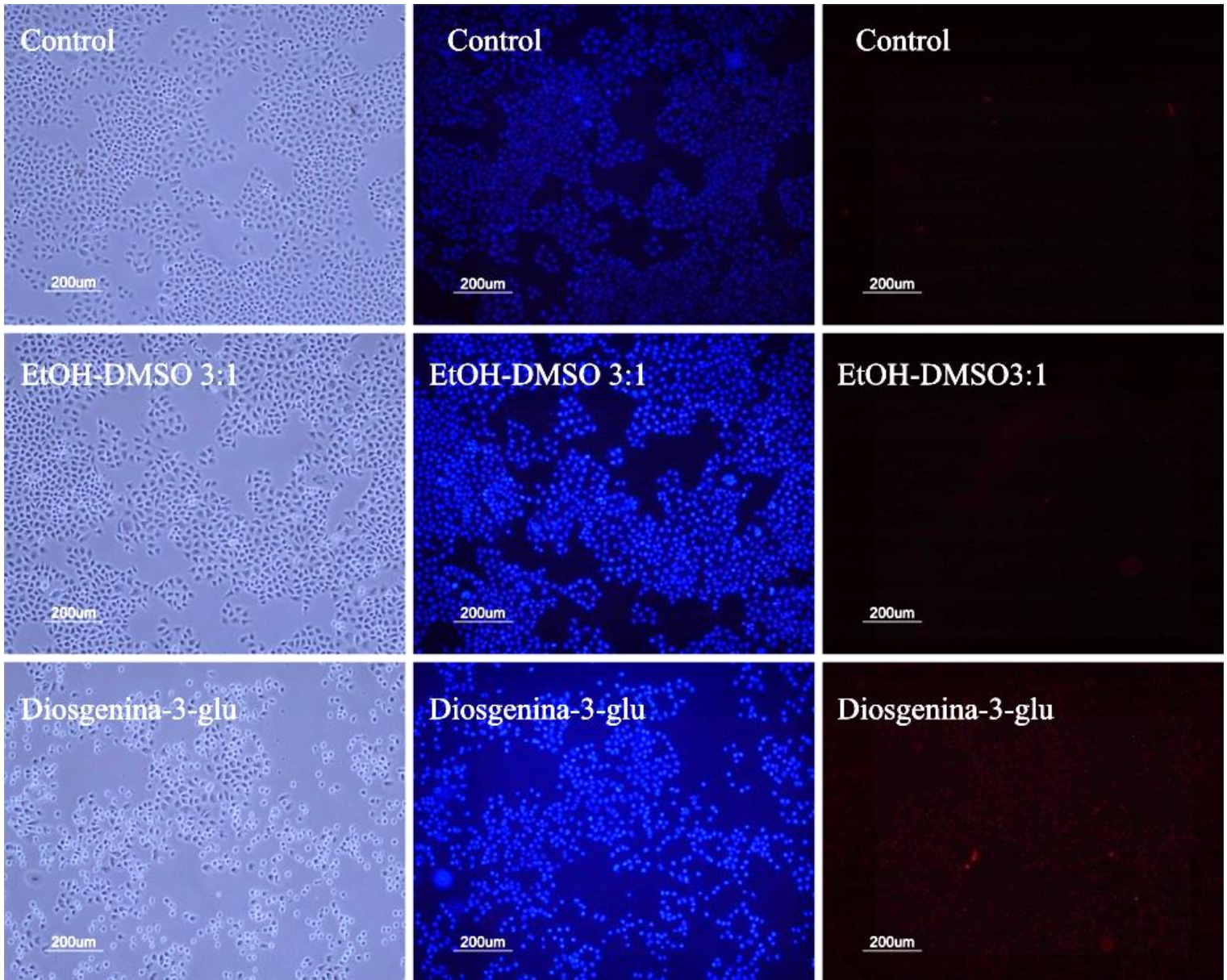


Figura 12b. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células CaSki. Células tratadas con la Diosgenina-3- glu muestran una compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).



# TUNEL ViBo

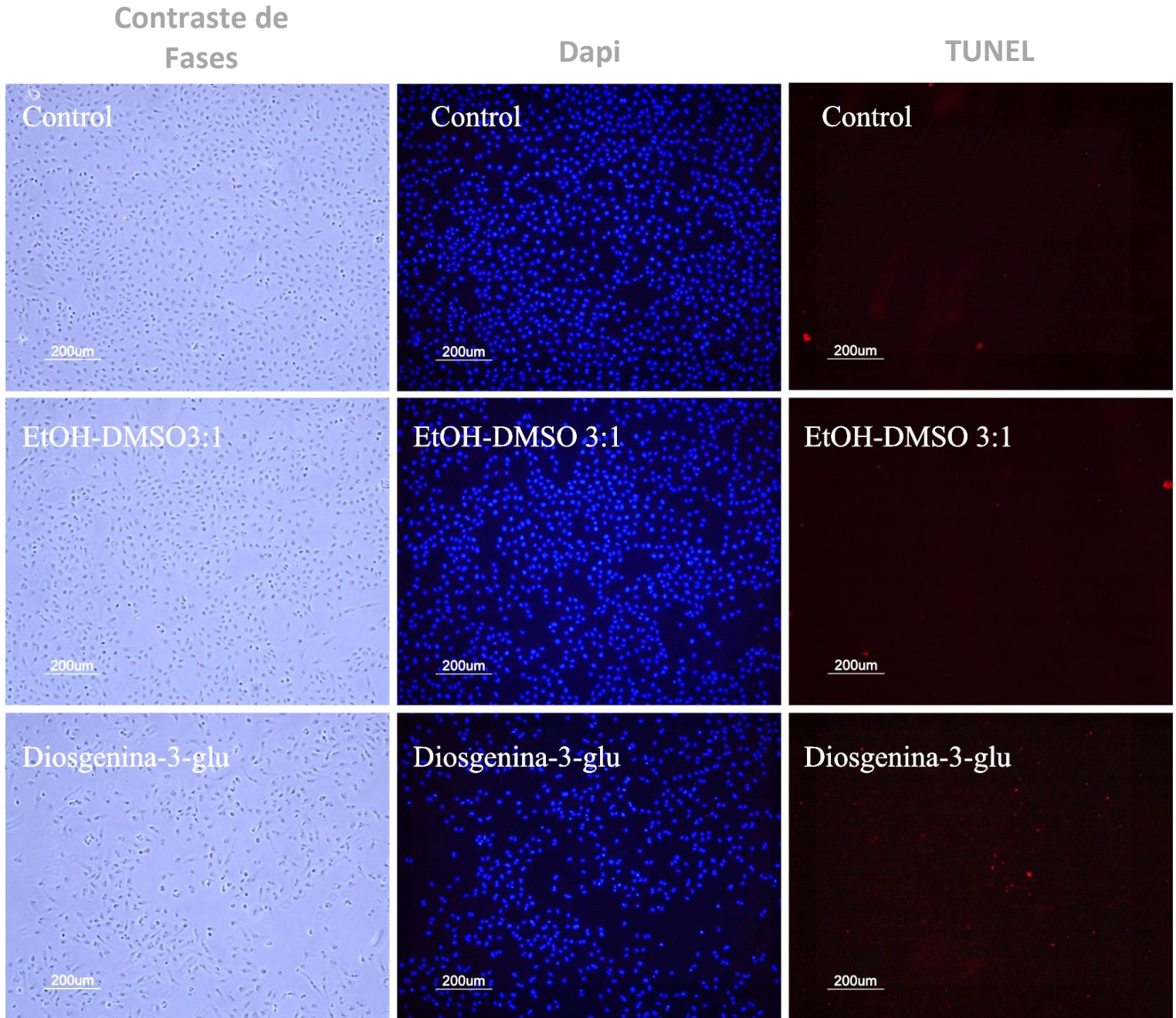


Figura 12c. Fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL en células ViBo. Células tratadas con la Diosgenina-3-glu muestran una compactación de la cromatina (evidenciada con DAPI), así mismo, estas células son positivas a la técnica de TUNEL (rojo).

## Discusión

La búsqueda de nuevos fármacos para combatir el cáncer ha llevado a evaluar compuestos de origen vegetal con la esperanza de ayudar a prevenir y curar esta enfermedad. En ese sentido se han realizado investigaciones en una diversidad de compuestos, entre éstos hay un particular interés en las saponinas esteroidales, a quienes se les ha atribuido una importante actividad biológica, como la acción antiproliferativa en líneas celulares de cáncer humano mediante la detención del ciclo celular y por inducción de muerte celular por apoptosis<sup>56</sup>. Dentro de la familia de las saponinas esteroidales la Dioscina exhibe una actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer humano con un rango de  $CI_{50}$  que va de 0.5 a 10  $\mu\text{M}$ . Por ejemplo, en la línea celular sw1990 de cáncer de páncreas la  $CI_{50}$  es de 0.5  $\mu\text{M}$ , en la línea celular HeLa (cáncer cervical) la  $CI_{50}$  es de 4.4  $\mu\text{M}$ . En la línea celular HL-60 (leucemia humana) se determinó una  $CI_{50}$  de 5  $\mu\text{M}$ , mientras que para la línea celular K562 (leucemia humana) la  $CI_{50}$  está determinada en 10  $\mu\text{M}$ <sup>57, 58</sup>. Sin duda, este fitoesteroide es una de las saponinas con actividad antiproliferativa más potentes evaluadas hasta ahora, hecho que ha despertado la inquietud de establecer qué parte de la molécula es la causante de la actividad antiproliferativa, así como la magnitud de ésta.

La gran complejidad de la estructura de las saponinas surge de la variabilidad de la estructura de la aglicona, la naturaleza de las cadenas laterales y la posición de unión de los azúcares en la región de la aglicona, principalmente las diferencias en la estructura de la saponina que incluyen el tipo, posición, y número de restos de azúcar unidos por un enlace glucosídico en diferentes posiciones de los anillos, los cuales pueden influir en las respuestas biológicas, especialmente para la actividad antitumoral<sup>30</sup>. Por ejemplo, se ha reportado que la pérdida o el cambio de la posición del número de azúcares en las saponinas influyen en su actividad biológica, como es el caso de la saponina OSW-1, en la cual se ha demostrado que el cambio de posición, remoción o cambio del tipo de sacarido reduce la actividad biológica de la OSW 1 hasta 1000 veces<sup>59</sup>. Además, estudios recientes han mostrado que la fuerte actividad antiproliferativa de las saponinas es altamente dependiente de los restos glucosídicos y la pérdida de éstos producen una disminución en

su actividad biológica<sup>60, 61</sup>. En este sentido, se han generado derivados de la saponina Dioscina, por ejemplo, cuando los sacáridos son removidos de esta saponina, se obtiene la Diosgenina (aglicona), de la cual existen varios estudios que han mostrado que también tiene actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer humano, sin embargo, su actividad es menor comparada con la Dioscina, ya que se requiere de mayor concentración de la Diosgenina para obtener el mismo efecto que la Dioscina. En este caso la  $CI_{50}$  de la Diosgenina determinada en la línea celular HeLa es de  $30 \mu M$ <sup>46</sup> (6 veces mayor que la concentración requerida por la Dioscina) y de  $15 \mu M$  para la línea K562<sup>62</sup> (1.5 veces mayor que la requerida por la Dioscina). Es claro que la aglicona mantiene la actividad antiproliferativa y que la ausencia de azúcares pareciera ser clave para regular la magnitud de la actividad antiproliferativa. Sin embargo, este hallazgo abre nuevas interrogantes, ya que la Dioscina presenta tres azúcares, una D-glucosa y dos L-ramnosas, obligando a preguntarnos si el número y/o el tipo de azúcar así como su posición son de igual manera importantes para regular la magnitud de la actividad antiproliferativa. Para aportar información al respecto, en este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, con una  $CI_{50}$  para la Dioscina de  $1.95 \mu M$  ( $1.74 \mu g/ml$ ) en HeLa y CaSki y de  $2.87 \mu M$  ( $2.5 \mu g/ml$ ) en ViBo, mientras que para la Diosgenina las  $CI_{50}$  fueron de  $35$ ,  $31$  y  $40 \mu M$  ( $14.8$ ,  $13$  y  $16.8 \mu g/ml$ ), respectivamente, y para la Diosgenina-3-glu fueron de  $42.5$ ,  $38.6$  y  $24 \mu M$  ( $24.8$ ,  $22.5$  y  $14 \mu g/ml$ ). Es prudente recordar que la Dioscina presenta tres azúcares, la Diosgenina-3-glu un azúcar y la Diosgenina no presenta azúcares y los tres compuestos tienen la misma aglicona. Nuestros resultados establecen que la actividad antiproliferativa de la Dioscina es más potente que la Diosgenina-3-glu y la Diosgenina, ya que se requiere de 14, 13 y 6 veces más de la Diosgenina-3-glu en las células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, para generar la misma actividad que la Dioscina, mientras que para la Diosgenina se requiere de 8.5, 7.5 y 7 veces más respectivamente. Por otra parte, en las células ViBo, aparentemente no hay diferencia significativa entre las  $CI_{50}$  de Diosgenina-3-glu y la Diosgenina, indicando que la línea celular también es importante en la respuesta al compuesto, esto es, la magnitud de la respuesta al compuesto no solo dependerá de la

parte aglicona, o el tipo o número de azúcares unidos a ésta, sino probablemente también al tipo celular y a las condiciones metabólicas específicas de la célula. (Tabla 1). A pesar de que la Diosgenina-3-glu no aumentó la actividad antiproliferativa, existen reportes recientes que soportan la premisa que establece que la actividad biológica de las saponinas depende de los restos glicosídicos. En el estudio realizado por Tong, Q. *et. Al*<sup>63</sup>. en donde se reporta el efecto antiproliferativo de la trillina, la Diosgenina di-glucosidada, la Dioscina y la saponina zingiberensis en diferentes líneas de cáncer humano, se aprecia el aumento del número de azúcares, especialmente el número de glucosas unidas en el carbono tres de la región esteroidea, que es la misma para todos los compuestos muestran que conforme va aumentando el número de azúcares y en especial el número de glucosas, el compuesto se va haciendo más potente en su actividad antiproliferativa, siendo así la saponina zingiberensis que tiene 4 azúcares (tres glucosas y una ramnosa) más potente que la Dioscina que tiene tres azúcares (una glucosa y dos ramnosas) en su estructura<sup>63</sup>. Esto sugiere que el número de azúcares y que en especial la glucosa juega un papel importante en la actividad biológica, despertando el interés para estudios futuros en la relación implicada entre la actividad biológica y la estructura, pero dirigida hacia el número, el tipo y la posición de los sacáridos en la molécula de la Dioscina y la Diosgenina. De manera relevante en nuestro trabajo, la Dioscina y la Diosgenina presentaron un bajo o nulo efecto antiproliferativo en las células no tumorales (fibroblastos de cérvix humano y linfocitos de sangre periférica humana), sugiriendo que estos compuestos pueden presentar actividad antiproliferativa con acción selectiva.

Ahora bien, es necesario recordar que muchos de los compuestos hasta hoy utilizados para el tratamiento contra el cáncer actúan induciendo a las células a una muerte necrótica y durante décadas la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral se enfocó en esta actividad, es decir, entre más citotóxicos eran. mejor. Sin embargo, y a pesar de que este tipo de compuestos tuvieron fuerte éxito cuando se administran en bajas dosis y/o en tumores pequeños, cuando se administra a dosis altas, o con mayor frecuencia, y en tumores de mayores de 1 cm de diámetro, y con más de una masa tumoral (metástasis), se generan efectos colaterales graves; desde una diarrea severa a

una respuesta inflamatoria exacerbada, pasando por inducir deficiencia renal o hepática hasta llevar al paciente a la muerte. Por ello, actualmente el enfoque de compuestos con actividad antitumoral ha cambiado, es decir, se buscan compuestos con actividad antiproliferativa, no citotóxicos y de acción selectiva. No obstante la gran cantidad de compuestos descritos con actividad antitumoral, son citotóxicos y la mayoría no han sido probados en células no tumorales. Con respecto a las saponinas, se ha reportado que tienen la capacidad de interactuar con los esteroides de la membrana celular, en particular con el colesterol, donde se forman complejos entre la aglicona de la saponina con el colesterol, desestabilizando la membrana celular y formando poros, es decir, las saponinas tienen propiedades líticas y pueden producir algún efecto citotóxico como la muerte por necrosis<sup>30, 40</sup>. Con respecto a la Dioscina y la Diosgenina los resultados mostrados en este trabajo, indican que estos compuestos presentan una baja o nula citotoxicidad tanto en células tumorales así como en linfocitos, sugiriendo que sus probables efectos secundarios, si es que se presentan, serán leves; al menos los relacionados con la citotoxicidad.

Por otro lado, la desregulación de la apoptosis es uno de los factores más importantes implicados en la progresión de células tumorales, un número de estudios científicos se han hecho sobre este proceso para determinar si puede ser explotado en el tratamiento del cáncer. La apoptosis es el mecanismo del cuerpo humano que permite la eliminación de células de manera natural, es decir, elimina a células que tengan anomalías tales como daño del ADN, o daños estructurales que generan la disfunción de algún organelo, sin producir tantos efectos colaterales como la necrosis. Sin embargo, las células tumorales tienen la capacidad de suprimir la apoptosis, lo que permite que los tumores crezcan rápidamente y sin control. La apoptosis en células tumorales puede ser inducida por la activación de las proteasas específicas, tales como las caspasas, que conducen a una muerte celular programada<sup>21, 64, 65</sup>.

En relación a las saponinas esteroidales, en diferentes trabajos de investigación se ha indicado que las saponinas inhiben la proliferación de células malignas *in vitro*, el mecanismo por el cual realizan esta actividad antiproliferativa puede ser por diferentes

vías, entre las responsables de esta actividad antiproliferativa se reporta a la muerte celular por apoptosis<sup>41, 44, 46, 57, 48, 62</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo al respecto, indican que la activación de la caspasa-3-activa, así como la inducción de la fragmentación del ADN en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fue inducida por la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu, sugiriendo que estos compuestos inducen muerte por apoptosis, coincidiendo con lo reportado para la Dioscina y Diosgenina que inducen la activación de la caspasa-3-activa y la fragmentación del ADN la línea celular de carcinoma de colon HCT-116<sup>41</sup>. Sin embargo, la mayoría de los trabajos que han evaluado la activación de la caspasa-3-activa así como la fragmentación del ADN inducidas por estas saponinas no han sido concluyentes, ya que su análisis fue basado en pruebas cualitativas más que cuantitativas, limitándose solo a la detección, y por lo tanto no se establece el porcentaje de células que han sido inducidas a este tipo de muerte, por lo que sería adecuado en un futuro cercano, realizar ensayos por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células que sobre-expresan la caspasa-3-activa, así como presentan la fragmentación de ADN, de tal forma que se pueda establecer la magnitud de la inducción de la muerte apoptótica en la población de los cultivos de células tumorales.

Con respecto a la actividad selectiva de la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu es claro que éstas presentan actividad selectiva, sin embargo, la Diosgenina-3-glu fue la que presentó el mayor efecto en el potencial proliferativo (30%), tanto de células fibroblásticas como de células linfocíticas, indicando que la acción selectiva podría depender del tipo y/o número de azúcares presentes en la aglicona. Esta característica del compuesto es primordial para el tratamiento del cáncer. Por otra parte, es conocido que en el tratamiento contra el cáncer, las células del sistema inmunológico son severamente afectadas, incrementando la posibilidad de contraer infecciones oportunistas o requerir de un trasplante de médula ósea<sup>66, 67</sup>. Interesantemente la Dioscina y la Diosgenina no sólo no afectaron el potencial proliferativo de las células linfocíticas, sino que no inducen a éstas a una muerte por necrosis, sugiriendo que el efecto secundario de la Dioscina y la Diosgenina en el sistema inmunológico podría ser insignificante. Es importante mencionar que se ha descrito que las saponinas tienen propiedades inmunoestimuladoras. Aunque

ha habido pocos estudios sobre la actividad inmunoestimulante, adyuvantes basados en saponinas tienen la capacidad única de estimular el sistema inmune mediado por células, aumentando la proliferación de células del sistema inmune, así como también mejorando la producción de anticuerpos, y tienen la ventaja de que sólo una dosis baja es necesaria para la actividad tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>40, 68, 69, 70</sup>

Se ha reportado que compuestos ampliamente usados como el cisplatino, el paclitaxel y los taxoles entre otros usados clínicamente en terapias en cáncer, producen además de una fuerte necrosis una linfopenia (disminución en el número celular de linfocitos). Una linfopenia temprana podría ser un marcador de la sensibilidad de un paciente a la toxicidad hematológica de los agentes quimioterapéuticos, de hecho la quimioterapia induce linfopenia antes de disminuir otras células del sistema inmune<sup>66, 67</sup>, lo cual confiere una ventaja como agentes anticancerígenos a las saponinas utilizadas en este trabajo que parecen carecer, según nuestros resultados, de estos efectos.

Estos resultados sugieren que la Dioscina y la Diosgenina son candidatos idóneos para seguir su evaluación *in vivo*, con la intención de valorar su potencial terapéutico como posibles agentes contra el cáncer con alta capacidad para inducir apoptosis, como poco efecto necrótico y con cierta selectividad hacia células tumorales.

## Conclusiones

- 1.- La Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu tienen un efecto antiproliferativo en células de CaCu HeLa, CaSki y ViBo de manera que es dependiente de la concentración.
- 2.- La Dioscina y la Diosgenina a las concentraciones de  $CI_{50}$  más alta encontrada no tienen efecto antiproliferativo en linfocitos y fibroblastos; sin embargo la Diosgenina-3-glu sí afecta su potencial proliferativo.
- 3.- La Dioscina y la Diosgenina inducen a una cantidad mínima de células a una muerte por necrosis en las líneas HeLa, CaSki y ViBo en las  $IC_{50}$  utilizadas y ninguna por la Diosgenina-3-glu, mientras que ninguna saponina lo hizo en linfocitos de sangre periférica.
- 4.- La Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu inducen muerte por apoptosis por medio de caspasa 3 en HeLa, CaSki y ViBo en las  $IC_{50}$  utilizadas.



## Bibliografía.

- 1.- Sánchez-Socarrás V. 2001. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 20: 266-274.
- 2.- Cancino M. D. A. 2008. Evaluación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas inducidos por un compuesto de cobre (Casiopeina III-ia) en linfocitos humanos *in vitro*. Trabajo de grado, Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- 3.- Hanahan D. & Weinberg R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- 4.- Hanahan D. & Weinberg R. A. 2011. The Hallmarks of Cancer : the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
5. - Thurston D. E. 2007. Chemistry and pharmacology of anticancer drugs. *Br J Cancer* 97: 1713–1713.
- 6.- Avendaño C. & Menéndez J. C. 2008. Medicinal Chemistry and Anticancer Drugs; ed: Elsevier: Amsterdam.
- 7.- INEGI. 2013. Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (Datos Nacionales). Revisado en [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa) .
- 8.- Pagani A. Custogno E. Rosasco M. Cancela M. & Salveraglio C. 1999. Cáncer de cuello uterino con diferenciación neuroendócrina. *Rev Med Uruguay* 15: 146- 150.
- 9.- Tota J.E. Chevarie-Davis M. Richardson L.A. Devries M. & Franco E.L. 2011. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med* 53: suppl 1: S12–S21.
- 10.- Ganguly N. & Parihar S. 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 34: 113-123
- 11.- Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2: 342-350.
- 12.- Garnett T. & Duerksen-Hughes P. 2006. Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. *Arch Virol* 151: 2321-2335.
- 13.- Rivera R. Delgado J. Painel V. Barrero R. & Larraín A. 2006. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* 71: 135-140.

- 14.- Gravitt P.E. 2011. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest* 121:4593-4599.
- 15.- Lacruz C. 2003. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol* 36: 5-10.
- 16.- Cameron R. 1995. Oncología Práctica, Ed Médica Panoamericana. Pág. 5-24.
- 17.- Khoury S. & Dasmin C. 1981. Cáncer: los grandes especialistas responden, librería Hachette. España. Pág. 221-227.
- 18.- Johns H. & Cunningham J. 1981. The Physics of Radiology, 3er ed. Charles c Thomas Publisher. USA. Pág. 695-701.
- 19.- Miyashita T. & Reed J. 1993. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81: 151-157.
- 20.- Burgués J. Pontones J. Vera C. Jiménez J. & Ozonas M. 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol Esp* 29: 846-859.
- 21.- Ziegler D.S. & Kung A.L. 2008. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol* 20:97-103.
- 22.- Raff M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122.
- 23.- Jordan J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22: 100-106.
- 24.- Peter M. E. 2011. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. *Nature* 471:310-312.
- 25.- Hengartner. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- 26.- Favaloro B. Allocati N. Graziano V. Di Ilio C. & De Laurenzi V. 2012. Role of apoptosis in disease. *Aging* 4:330-349.
- 27.- Solary E. Dubrez L. & Eymen B. 1996. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J* 9:1293-305.

- 28.- Ziegler DS. & Kung AL. 2008. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol* 20:97-103.
- 29.- Degtarev A. Boyce M. & Yuan J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-67.
- 30.- Podolak I. Galanty A. & Sobolewska D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev* 9:425-474.
- 31.- Dallavalle S. Giannini G. Alloatti D. Casati A. Marastoni E. Musso L. Merlini L. Morini G. Penco S. Pisano C. Tinelli S. De Cesare M. Beretta G.L. & Zunino F. J. 2006. Synthesis and Cytotoxic Activity of Polyamine Analogues of Camptothecin. *Med Chem* 49: 5177- 86.
- 32.- Safavy A. 2008. Recent developments in taxane Drug Delivery. *Curr Drug Deliv* 5:42-54.
- 33.- Montiel-Smith S. Cervantes-Mejía V. Dubois J. Guénard D. Guéritte F. & Sandoval-Ramírez J. 2002. Synthesis of New Analogs of the C-13 Docetaxel Side Chain By Asymmetric Aminohydroxylation. *Eur J Org Chem* 2002: 2260-2264.
- 34.- Yadav V.R. Prasad S. Sung B. Kannappan R. & Aggarwal B.B. 2010. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins* 2: 2428-2466.
- 35.- Camacho Z. E. 2010. Efecto antitumoral del *S-Metil- pirrolidiltiocarbamato-S-óxido* (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino. Trabajo de grado, Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- 36.- López D. M. 2010. Efecto Antitumoral De los Esteroides Diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (26-OH-DI) y Diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 $\alpha$ -coleston-3 $\beta$ -diilo (26-OH-HE) En La Línea Tumoral De Cérnix CaSki. Trabajo de grado, Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- 37.- Omoruyi F. 2008. Jamaican Bitter Yam Sapogenin: Potential Mechanisms of Action in Diabetes. *Plant Foods Hum Nutr* 63: 135-140.
- 38.- Kaskiw M.J. Tassotto M.L. Th'ng J. & Jiang ZH. 2008. Synthesis and cytotoxic activity of diosgenyl saponin analogues. *Bioorg Med Chem* 16:3209-17.
- 39.- Anaya L. 2003. Ecología Química. UNAM. Plaza y Valdes editores. México. Pág. 53-59.
- 40.- Francis G. Kerem Z. Makkar H.P. & Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* 88:587-605.

- 41.- Raju J. & Bird R. 2007. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 255: 194-204
- 42.-Jan T. Wey S. Kuan C. Liao M. & Wu H. 2007. Diosgenin, a steroidal sapogenin, enhances antigen-specific IgG2a and interferon-gamma expression in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *Planta Med* 73: 421-426.
- 43.- Corbiere C. Liagre B. Bianchi A. Bordji K. Dauca M. Netter P. & 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. *Int J Oncol* 22:899-905.
- 44.- Trouillas P. Corbière C. Liagre B. Duroux J. & Beneytout J. 2005. Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg Med Chem* 13:1141-1149.
- 45.- Son I. Kim J. Sohn H. Son K. Kim J. & Kwon C. 2007. Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Diosgenin, a Steroidal Saponin of Yam (*Dioscorea* spp.), on High-Cholesterol Fed Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:3063-3071.
- 46.-Huo R. Zhou Q. Wang B. Tashiro S. Onodera S. & Ikejima T. 2004. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacol Sin* 25:1077-1082.
- 47.-Tschamber T. Adam S. Matsuya Y. Masuda S. Ohsawa N. Maruyama S. Kamoshita K. Nemoto H. & Eustache J. 2007. OSW-1 analogues: Modification of the carbohydrate moiety. *J Bioorg Med Chem Lett* 17:5101-5106.
- 48.- Tang P. Mamdani F. Hu X. Liu J. & Yu B. 2007. Synthesis of OSW saponin analogs with modified sugar residues and their antiproliferative activities. *Bioorg Med Chem Lett* 17:1003-1007.
- 49.- 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 cérvicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Rev Mex Oncol* 7: 69-76.
- 50.- Morgan S. J. & Darling D. C. 1993. Cultivo de las células animales. Editorial Acriba. España. 159 pp.
- 51.- Freshney R. 1994. Culture of animal cell. A manual of basics technique. Wiley-Liss Inc. New York. USA. Pág. 397.

- 52.- Griffiths B. 1988. Scaling-up of animal cell cultures Ed. Freshney R.I. Animal cell culture: A practical approach IRL. Press England. Pág. 345.
- 53.- Kueng W. Silver E. & Eppenberg V. 1989. Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Anal Biochem* 182:16-19.
- 54.- Lyons A.B. Blake S.J. & Doherty K.V. 2013. Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Curr Protoc Cytom* Chapter 9:Unit9.11.
- 55.- Gavrieli Y. Sherman Y. & Ben-Sasson S. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501.
- 56.- Perez C. E. 2010. Efecto antiproliferativo y apoptótico de la saponina (20S,25R)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxi-12,22-dioxo-5 $\alpha$ -colestano-26-ilo  $\xi$ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu) en células provenientes de cáncer cervicouterino. Trabajo de grado, Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- 57.- Liu M. Wang Z. Ju Y. Zhou J. Wang Y. & Wong R. 2004. The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biol Pharm Bull* 27: 1059-1065.
- 58.- Cai J. Liu M. Wang Z. & Ju Y. 2002. Apoptosis Induced by Dioscin in Hela Cells. *Biol Pharm Bull* 25: 193-196.
- 59.- Xu Q. Peng X. & Tian W. 2003. A new strategy for synthesizing the steroids with side chains from steroidal sapogenins: synthesis of the aglycone of OSW-1 by using the intact skeleton of diosgenin. *Tetrahedron Lett* 44: 9375-9377.
- 60.- Yu W. & Jin Z. 2002. Total Synthesis of An Antitumor Natural Product OSW-1. *J Am Chem Soc* 123:3369-3370.
- 61.- Morzycki J. & Wojtkielewicz A. 2002. Synthesis of a cholestane glycoside OSW-1 with potent cytostatic activity. *Carbohydr Re* 337:1269-1274.
- 62.- Liu M. Yong Z. Wong R. & Wu Q. 2005. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 55:79-90.

- 63.- Tong Q. He Y. Zhao Q. Qing Y. Huang W. & Wu X., 2012. Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright against cancer cells. *Steroids* 77:1219-1227.
- 64.- Klein S. McCormick F. & Levitzki A. 2005. Killing time for cancer cells. *Nat Rev Cancer* 5:573-580.
- 65.- Borner C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 39:615-647.
- 66.- Chul W. C. Hwa J. S. Kyong H. P. So Y. Y. Seok J. K. Sang C. O. Jae H. S. Byung S. K. Sang W. S. Yeul H. K. & Jun S. K. 2003. Early Lymphopenia as a Risk Factor for Chemotherapy-Induced Febrile Neutropenia. *Am J Hematol* 73:263-266.
- 67.- Tolaney S. M. Najita J. Winer E. P. & Burstein H. J. 2008. Lymphopenia Associated with Adjuvant Anthracycline/ Taxane Regimens. *Clin Breast Cancer* 8:352-356.
- 68.- Fleck J.D. Kauffmann C. Spilki F. Lencina C.L. Roehe P.M. & Gosmann G. 2006. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* 24:7129-7134.
- 69.- Sjölander A. Cox J.C. & Barr I.G. 1998. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol* 64:713-723.
- 70.- Cox J.C., Sjölander A. & Barr I.G. 1998. ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 632:247-271.

## Apéndice

- Medio de cultivo

RPMI-1640 (GIBCO, USA) 10.42 g

NaHCO<sub>3</sub> (SIGMA, USA) 2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

- Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de ternera (NCS) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL. para su mejor uso y manipulación.

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de sodio (SIGMA, USA) 8.00 g

Cloruro de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA) 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 µm, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

- Verseno

Ésta solución se empleó para despegar las células tumorales HeLa y ViBo adherentes, y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

EDTA (SIGMA, USA) 0.4 g

NaCl (SIGMA, USA) 8 g

KCl ((SIGMA, USA) 0.4 g

Tris (SIGMA, USA) 3.04 g

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

- Solución Tripsina

Ésta solución se empleó para despegar las células ViBo, es preparada al 0.05% en Verseno.

- Solución cristal violeta (0.1 %)

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar 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 número 2. Se almacena a temperatura ambiente.



NaOH (SIGMA, USA) 3.96 g  
Ácido Fórmico (SIGMA, USA) 4.28 mL  
Cristal violeta (SIGMA, USA) 1 g

- Colorante Cristal Violeta

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

- Glutaraldehído

A 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4 °C.

- Solución de ácido acético (10 %)

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

- Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño María sin que la temperatura rebase los 60 °C. Se almacena a 4 °C.