



Claudia Cecilia Villar Vázquez:



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CARRERA BIOLOGÍA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACION EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ) LAB 2, P.B.

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, CITOTÓXICO Y APOPTÓTICO

**DEL 2-DEOXI-2-ACETAMIDO- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO DE
DIOSGENILO (MF-10) EN CÉLULAS TUMORALES PROVENIENTES DE
CÁNCER CERVICOUTERINO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Villar Vázquez Claudia Cecilia

DIRECTOR DE TESIS

M en C. Luis Sánchez Sánchez



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **VILLAR VÁZQUEZ CLAUDIA CECILIA**, con número de cuenta **306295663**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **25 de octubre de 2016** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. **MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR**

VOCAL M. en C. **LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

SECRETARIO Dr. **HUGO LÓPEZ MUÑOZ**

SUPLENTE M. en C. **JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

SUPLENTE Dr. **EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ**

El título de la tesis que presenta es: **EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, CITOTÓXICO Y APOPTÓTICO DEL 2-DEOXI-2-ACETAMIDO-β-D GLUCOPIRANÓSIDO DE DIOSGENILO (MF-10) EN CÉLULAS TUMORALES PROVENIENTES DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 22 de septiembre de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BU.
M. en C. **ARMANDO CERVANTES SANDOVAL**
JEFE DE CARRERA

Ésta Tesis fue realizada con apoyo del proyecto

PAPIIT IN 220916

PAPIIT IN 222114

CONACyT 255881

CONACyT 253979

*En la vida tenemos que ser fuertes,
superar cada obstáculo para aprender
de él y ser mejores, no dejarse intimidar
por nada ni por nadie; ya que el miedo es un
freno que pone la mente, aunque la mente es
poderosa siempre debemos pensar positivo, los límites los
pones tú y nadie más; todo tiene solución menos la muerte.
Pensar así me ha funcionado y hoy estoy orgullosa de convertirme en Profesionalista.*

*El valor de una idea radica en el uso que se le da.
(Thomas Alva Edison).*

*Es la falta de fe
Lo que hace que la gente
Tema enfrentar su retos, y yo creí en mí.
(Muhammad Ali).*

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES:

A mí madre Lucila Vázquez Salinas por ser mi inspiración de grandeza, por nunca rendirse, por impulsarme en todo momento, por hacer de mi una persona fuerte para afrontar cualquier cosa en esta vida.

Gracias Mamá.

A mí padre José Armando Villar López por ser mi ejemplo a seguir, por apoyarme a cumplir mis metas, por enseñarme que caer no es el final, seguir intentando hasta lograr es tan solo el principio.

Gracias Papá.

A ambos debo agradecer el inmenso amor incondicional, la confianza depositada en mi, las palabras de aliento, los consejos, los abrazos, por ser los mejores confidentes, por nunca rendirse aunque la adversidad fuera enorme, por todo lo que me brindan día a día, por sentirse orgullosos de esta mujer un poco despistada pero que gracias a ustedes hoy se ha formado como Profesionalista.

Este es un logro más para nosotros; el mejor regalo que puedo ofrecer lo tienen hoy en sus manos gracias por enseñarme el camino ahora me toca recompensarlos.

Con amor su hija.

A mi novio y mejor amigo

Oscar Osmar Pineda Corona por brindarme siempre su apoyo, comprensión, cariño y gran amor, por su compañía incondicional, por tenerme paciencia y comprenderme (sé que no es nada fácil), por estar presente en las buenas y no tan buenas, por no dejarme caer, por tomarme siempre de la mano, por todo lo que hemos aprendido juntos, por lo que nos falta y claro por un mejor futuro.

Gracias amor.

A mis tíos

En especial a mí tía Nilsa Villar, a mí tío Arturo Corletts y mí tía Martha Villar por el aprecio y cariño hacía mí familia, por siempre tener tiempo para escucharnos, por estar presentes en este camino, porque también forman parte de esto. Los estimo y quiero demasiado.

Gracias por todo.

A mí Tía Julieta Villar por su apoyo y confianza.

Gracias.

A las personas que elegimos como familia

Javier (Sansi) por apoyarme y responder todas mis dudas por muy tontas que fueran, Alberto por encontrar el lado bueno a las cosas y ser un gran amigo, sabes que te estimo mucho, Alesita (alias ale II) por ser mi hermana de museo y gran amiga te quiero, Ángel por ser un gran amigo, Liliana por ser la mejor hermana que la carrera pudo darme, Iván por hacer amena la convivencia en laboratorio con tantas canciones, Cintia, Andrés, Cupa, Edson, Emmanuel y Mauricio por pasar los mejores años de la carrera (risas, bromas, caídas, etc.), Mónica, Ale, Diana, Arely y Caro porque puedo confiar en ustedes dentro y fuera de un campo; a los que me falta por mencionar, saben que las risas y ocurrencias nunca faltaron.

Gracias.

A las personas que por desgracia ya no tengo en mi vida, pero si existiese una remota posibilidad de un universo paralelo donde se encuentren, sé que se sentirían orgullosos de ver que he cumplido una de tantas metas.

Q·E·P·D

Juan Pedro Vásquez, Salomón Villar, Pedro Vásquez, María Salinas.

Los quiero y extraño.

AGRADECIMIENTOS:

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo por su orientación durante mi estadía en el laboratorio.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por compartir su experiencia y conocimientos.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández, por su enseñanza durante mi formación en el laboratorio, por su paciencia, por compartir su conocimiento, por tomarse el tiempo para responder mis dudas. Sin duda alguna uno de los mejores maestros que pude haber tenido en toda la carrera.

A los miembros del Jurado.

- **Dr. María Elena Ayala Escobar**
- **M. en C. Luis Sánchez Sánchez**
- **Dr. Hugo López Muñoz**
- **M. en C. José Misael Vicente Hernández**
- **Dr. Edgar Ledesma Martínez**

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

ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico.....	ADN
Ácido Ribonucleico.....	ARN
Adenosin Trifosfato.....	ATP
Cáncer Cervicouterino.....	CaCU
Virus del Papiloma Humano.....	VPH
Región Larga de Control.....	LCR
Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	NIC
Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I.....	NIC I
Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II.....	NIC II
Neoplasia Intraepitelial Cervical grado III.....	NIC III
Carcinoma Cervical <i>In Situ</i>	CIS
Células Escamosas Atípicas.....	ASC
Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado.....	LSIL
Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado.....	HSIL
2-Deoxi-2-Acetamido- β -D-Glucopiranosido de Diosgenilo.....	MF-10
Ioduro de Propidio.....	IP
Lactato Deshidrogenasa.....	LDH
Concentración Inhibitoria del 50%.....	CI ₅₀
Diclorato 4-6 Diaminido, 2- Fenilidol.....	DAPI
Carboxifluoresceina.....	CSFE
Etilen-Diamen-Tetra-Acético.....	EDTA
Suero de Neonato de Ternera.....	SNT
Suero Fetal Bovino.....	SFB
Buffer Fosfato Salino.....	PBS
Fitoemato glutinina.....	PHA
Dimetil Sulfoxido.....	DMSO
Factor de Necrosis Tumoral.....	TNF

Dominio de Muerte.....	DD
Dominio Efector de Muerte.....	DED
Dominio de reclutamiento de la caspasa.....	CARD
Revoluciones por minuto.....	RPM
Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.....	INEGI
Instituto Nacional de Cáncer.....	INC
Organización Panamericana de la Salud.....	OPS
México.....	Méx
Japón.....	JAP
Estados Unidos.....	USA

ÍNDICE

Introducción.....	1
Célula.....	1
Ciclo Celular.....	1
Puntos de Control.....	3
Muerte Celular.....	3
Cáncer.....	9
Virus del Papiloma Humano.....	11
Cáncer Cervicouterino.....	11
Tratamientos.....	15
Saponinas Esteroidales.....	17
Planteamiento del Problema.....	21
Justificación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Metodología.....	23
Resultados.....	30
Discusión de Resultados.....	42
Conclusión.....	46
Referencias.....	47
Apéndice.....	56

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en México y actualmente los tratamientos que se tienen contra este afectan la calidad de vida de los pacientes, por lo cual la comunidad científica se ha dado a la tarea de buscar nuevas alternativas que, si bien no abatan al 100% la enfermedad mejoren significativamente la calidad de vida de los pacientes. En la actualidad el estudio de los compuestos de origen vegetal ha abierto un nuevo campo hacia la quimiopreención y/o tratamientos contra este mal, como es el caso de las saponinas esteroidales las cuales ejercen actividad antitumoral in vitro. Sin embargo, existen pocos estudios sobre su actividad biológica en líneas de células de cáncer cervicouterino. Por ello, en el presente trabajo se valoró el efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico del 2-DEOXI-2- ACETAMIDO- β -D-GLUCOPIRANÓSIDO DE DIOSGENILO (MF-10) en cultivos de líneas tumorales provenientes de CaCu CaSki y HeLa, así como en células no tumorales. El efecto antiproliferativo del MF-10 en líneas de CaCu fue llevado a cabo por la técnica de incorporación de cristal violeta, mientras que para las células linfocíticas mediante el marcaje con carboxifluoresceína y evaluados por citometría de flujo. La muerte por necrosis fue determinada mediante dos pruebas, incorporación de Ioduro de Propidio (IP) y la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos tratados con el compuesto. La muerte apoptótica fue determinado mediante la observación microscópica de células teñidas con DAPI y mediante la detección de la Caspas-3 activa. El MF-10 ejerció un efecto antiproliferativo en las células de CaCu con una CI_{50} de 50 μ g/mL para ambas líneas, en células linfocíticas (no tumorales), no afecta su potencial proliferativo. El compuesto no indujo muerte por necrosis ni en células tumorales ni en células linfocíticas; sin embargo, indujo muerte por apoptosis en células tumorales. El compuesto mostro actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células tumorales sin afectar significativamente a células no tumorales, sugiriendo que este compuesto ejerce una acción selectiva que podría ser evaluado como un agente con potencial terapéutico para esta afección.

INTRODUCCIÓN:

LA CÉLULA

Las células son estructuras complejas y variadas, con capacidad de auto-replicarse y de realizar una amplia gama de tareas especializadas. Todas las células provienen de otras células preexistentes, por lo que el material genético ha de ser replicado y transferido del progenitor a la célula hija en cada división celular (Cooper y Hausman; 2007).

La característica principal de las células y de los organismos es la capacidad para reproducirse. El tipo de reproducción más simple implica la división de una célula "progenitora" en dos células "hijas". Esto ocurre como parte del ciclo celular, una serie de acontecimientos que preparan a la célula para dividirse seguido por el proceso real de división, denominado mitosis (Lodish et al.; 2005).

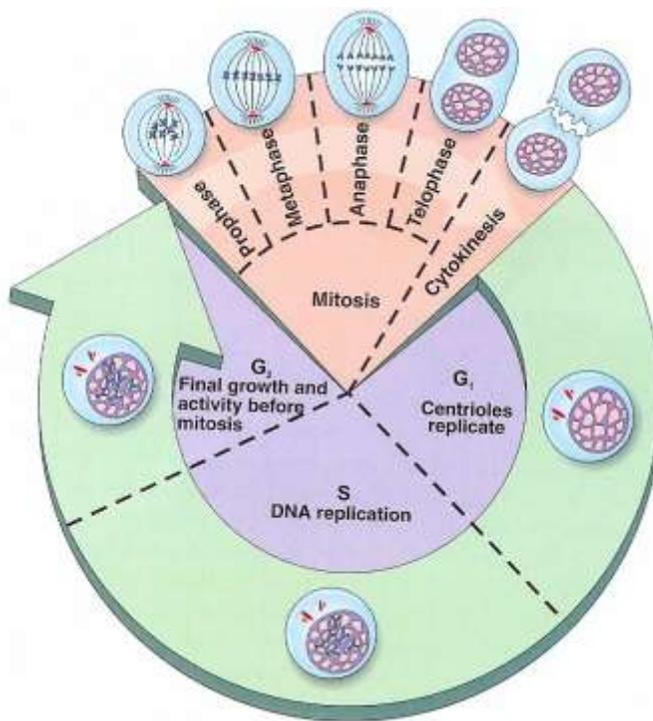


FIGURA 1. ETAPAS DEL CICLO CELULAR (Imagen tomada de <https://sites.google.com/site/elcanerygenes/ciclo-celular-y-cancer>).

CICLO CELULAR

El ciclo celular se representa en cuatro etapas (fig. 1). El cromosoma y el ADN que contiene una célula son copiados durante la fase S (síntesis). El cromosoma replicado se separa durante la fase M (mitosis), en que cada célula hija consigue una copia de cada cromosoma durante la división celular. Las fases M y S están separadas por dos etapas, la G₁ y la G₂, durante la cual los mRNA y las proteínas se sintetizan. Las células tienen un proceso de replicación bien definido conocido

como ciclo celular (Lodish et al.; 2005).

La mitosis (división del núcleo) corresponde a la separación de los cromosomas hijos y termina, generalmente, en la división celular (citocinesis). Sin embargo, la mitosis y la citocinesis duran cerca de una hora por lo que aproximadamente el 95% del ciclo celular transcurre en la interfase (Cooper y Hausman; 2007).

Durante la interfase los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que el núcleo presenta un aspecto uniforme. Sin embargo, a nivel molecular, en la interfase es cuando ocurren el crecimiento celular y la replicación del ADN de manera sucesiva, lo que deja a la célula preparada para la división (Cooper y Hausman; 2007).

La célula crece a un ritmo continuado durante la interfase, y la mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente. En cambio, el ADN sólo se sintetiza durante una parte de la interfase. Así, la duración de la síntesis del ADN divide el ciclo de las células eucariotas en cuatro fases diferenciadas (Cooper y Hausman; 2007).

La G_1 , que corresponde al intervalo entre la mitosis y el inicio de la replicación del ADN. Durante G_1 la célula es metabólicamente activa y crece, pero su ADN no se replica. Seguidamente tiene lugar la fase S (síntesis), durante la que se produce la replicación del ADN. Tras finalizar la síntesis del ADN se produce la G_2 durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis (Cooper y Hausman; 2007).

Por tanto, resulta esencial la replicación exacta del ADN genómico para la vida de todas las células y organismos. Cada vez que una célula se divide su genoma completo debe duplicarse; por lo que se requiere de una compleja maquinaria para copiar las moléculas de ADN que componen los cromosomas. Además las células han desarrollado mecanismos para corregir los fallos que algunas veces se cometen durante la replicación del ADN y para reparar los daños que puedan surgir por la acción de agentes ambientales (como la radiación) (Cooper y Hausman; 2007).

La progresión de las células a través del ciclo de división celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los procesos que tienen lugar durante las fases del ciclo celular (Cooper y Hausman; 2007).

PUNTOS DE CONTROL

En las células normales, la progresión a través del ciclo celular esta estrictamente regulada. Hay al menos tres puntos diferentes del ciclo celular en los que la célula examina su equilibrio interno antes de continuar con el siguiente estadio del ciclo celular. Estos puntos de control se encuentran en G1/S, en G2/M y en M. En el punto de control G1/S, la célula examina su tamaño y determina si su ADN ha sido dañado; si la célula no ha alcanzado su tamaño adecuado, o si su ADN está dañado se detiene su marcha por el ciclo celular hasta que se corrijan estas condiciones. Si tanto el tamaño celular como la integridad del ADN son normales, se supera el punto de control G1/S y la célula entra en fase S. En el segundo punto de control G2/M, la célula examina sus condiciones fisiológicas antes de entrar en mitosis; si no se ha completado la replicación del ADN o la reparación de los daños que pueda tener, el ciclo celular se detiene hasta que se completen estos procesos. En el punto de control M, se examina la formación del sistema de fibras de huso acromático y la unión de estas fibras a los cinetocoros asociados a los centrómeros; si las fibras de huso no se han formado adecuadamente, o la unión de los cinetocoros no es correcta, se detiene la mitosis (Klug et al.; 2006).

MUERTE CELULAR

Cuando la gravedad del daño es tal que la célula no puede repararse, se activan mecanismos que la dirigen al suicidio ya sea necrosis o apoptosis (Elinos et al.; 2003).

APOPTOSIS

También conocido como muerte programada, es el proceso por el cual las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación como se muestra en la figura 2. La apoptosis es considerada como una muerte natural fisiológica, de elimina las células no deseadas, dañadas o desconocidas y desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán; 2003).

Las células que entran en apoptosis muestran disminución del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática. En el núcleo hay compactación del material genético y

segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN en segmentos específicos para finalmente cortarse cada 180 pares de bases. El citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegido por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células aledañas o por fagocitos profesionales, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre las células. (Elinos et al.; 2003).

La apoptosis se caracterizan por:

*Aumento de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, forma vesículas y se fusionan con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida pero selectiva salida de iones intracelulares se encuentra mediada por transportadores iónicos (cotrans-transportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas) (Jordán; 2003).

*Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmático (Jordán; 2003).

*Cambios en la composición de la membrana celular. Translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señales de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación (Jordán; 2003).

*Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto. Como consecuencia aparece una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas. (Jordán; 2003).

*Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular (Jordán; 2003).

*Condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos denominados oligonucleosomas (Jordán; 2003).

APOPTÓISIS

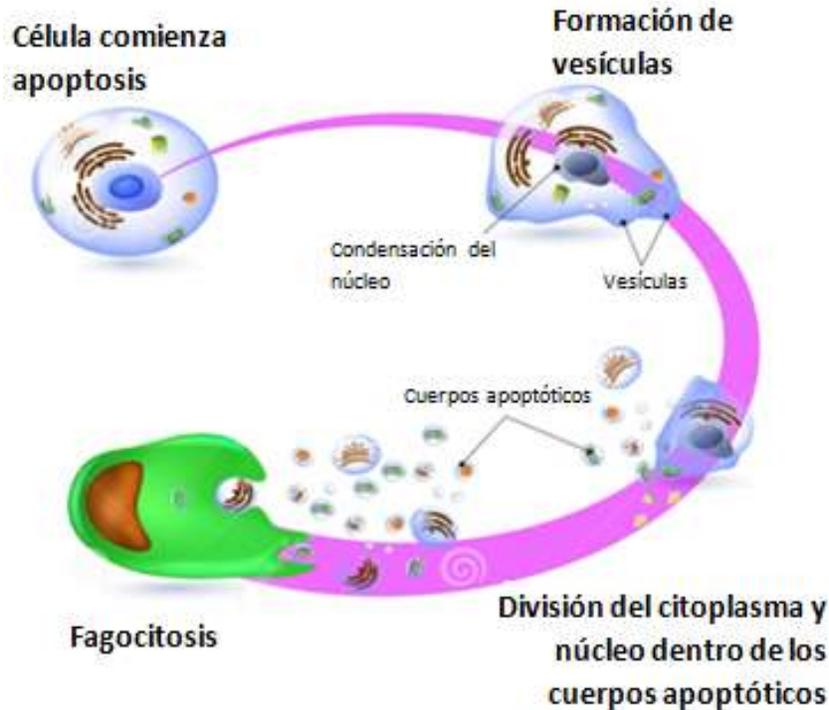


FIGURA 2. Proceso de Apoptosis (Imagen tomada y modificada de <http://thumbs.dreamstime.com/z/apoptosis-45763884.jpg>).

Existen dos vías principales que pueden llevar a la apoptosis: inducción positiva o externa por un ligando unido a los receptores específicos de la membrana plasmática y la inducción negativa o interna que ocurre por pérdida de la actividad supresora de mecanismos intracelulares (Gustavo; 2002).

La inducción positiva involucra ligandos que por una porción intracelular del receptor transducen al interior una señal; esa porción intracelular es llamada dominio de muerte. La inducción negativa se produce por pérdida de la actividad supresora a cargo de una familia de proteínas específicas que se hallan relacionadas con la mitocondria, liberándose desde la misma citocromo C que dispara la actividad de las proteasas, enzimas encargadas de ejecutar la apoptosis (fig. 3) (Gustavo; 2002).

El acontecimiento fundamental en la apoptosis es la activación de las enzimas denominadas *caspasas* (así denominadas porque son proteasas de cisteína que cortan

proteínas por los residuos de aspártico). Las caspasas activadas cortan numerosas dianas, culminando en la activación de nucleasas que degradan el ADN y otras enzimas que presumiblemente destruyen las nucleoproteínas y las proteínas citoesqueléticas.

La activación de las caspasas depende de un equilibrio entre las vías moleculares proapoptóticas y antiapoptóticas. Convergen dos vías distintas en la activación de las caspasas, denominadas *vía mitocondrial* y *vía de los receptores de muerte*. Aunque estas vías pueden interactuar, son inducidas generalmente bajo diferentes condiciones (Gustavo; 2002).

Vía mitocondrial (intrínseca) de la apoptosis.

Se inicia dentro de la célula, los estímulos internos tales como daño genético irreparable, hipoxia, concentraciones elevadas de calcio, estrés oxidativo; pueden generar la activación de la vía mitocondrial. La elección entre la supervivencia y la muerte celular viene determinada por la permeabilidad mitocondrial, controlada por liberación de moléculas pro-apoptóticas como citocromo *c* hacia el citoplasma (Kumar et al.; 2008).

La liberación de citocromo *c* activa a la caspasa 3-activa, por medio de la formación de un complejo conocido como apoptosoma, que está conformado por citocromo *c*, Apaf-1 y caspasa-9. El resultado es la activación de la cascada de caspasas, que en último término lleva a la fragmentación nuclear (Kumar et al.; 2008).

Vía de los receptores de muerte (extrínseca).

Muchas células expresan moléculas de superficie, denominadas receptores de muerte, que desencadenan la apoptosis. La mayoría de éstas son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que contienen en sus regiones citoplásmicas un «dominio de muerte» conservado, así denominado porque media en la interacción con otras proteínas (Kumar et al.; 2008).

Los receptores de muerte, interaccionan a través de su dominio citoplasmático de muerte (DD), con el DD homólogo que se localiza en las proteínas adaptadoras citosólicas. Estas moléculas adaptadoras, comunican, los receptores de muerte, con las caspasas, y con miembros de la familia Bcl-2, a través del dominio de muerte (DD), el dominio efector de muerte (*death effector domain*, DED), y el dominio de reclutamiento de la caspasa (*caspase recruitment domain*, CARD) (Sánchez et al.; 2008).

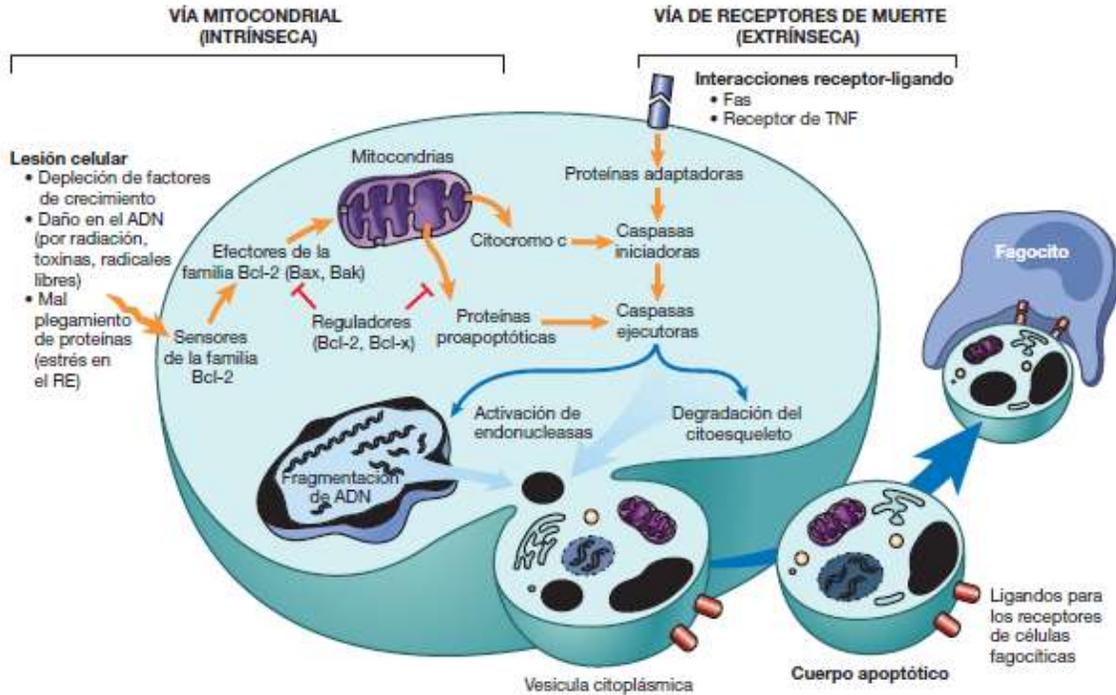


FIGURA 3. Vías Intrínsecas y Extrínseca de la Muerte Por Apoptosis (imagen tomada y modificada de Kumar et al.; 2008).

NECROSIS

El término necrosis conlleva a procesos donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño por la exposición a toxinas. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (Jordán; 2003).

Esto crea cambios que están representados por desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, disolución de la cromatina y

perdida de la continuidad de la membrana citoplasmática (proceso de oncosis). El ADN es partido en fragmentos irregulares al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular (Ross y Wojciech; 2007), el contenido del citoplasma es liberado al espacio extracelular, produciéndose la atracción de células inmunes a esa área, lo que genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitos inmigrantes (fig. 4) (Gustavo; 2002).

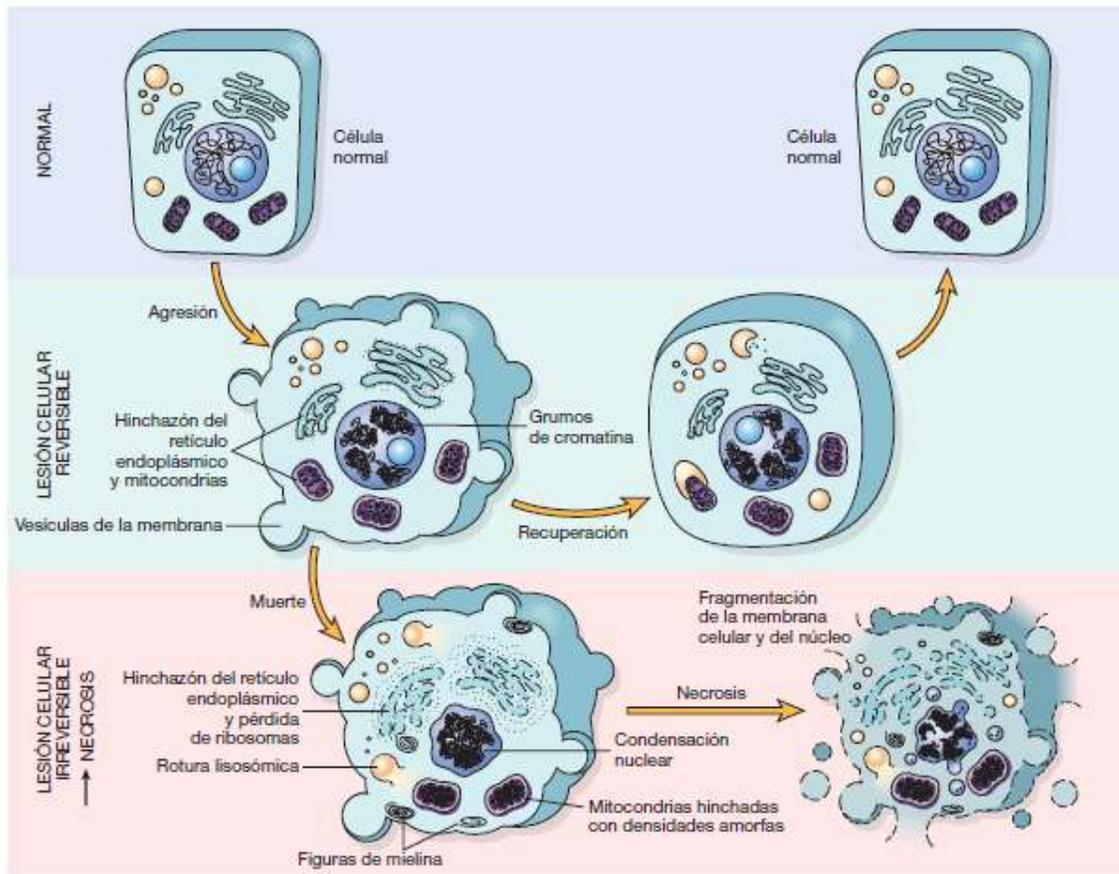


FIGURA 4. Proceso de necrosis (Kumar et al.; 2008).

Las anomalías de estos procesos dan como resultado una replicación y un mantenimiento fallido que puede causar consecuencias desastrosas, como el desarrollo de un cáncer (Cooper y Hausman; 2007).

CÁNCER

La principal alteración que causa el desarrollo de un cáncer es la proliferación continua e incontrolada de las células cancerosas. Las células cancerosas crecen y se dividen de manera incontrolada invadiendo los tejidos y los órganos sanos y finalmente diseminándose por todo el cuerpo. La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células cancerosas es el resultado de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula y se refleja en varios aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de sus equivalentes sanas (Copper y Hausman; 2007).

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública, ya que a pesar de los avances en investigación y de tratamientos, actualmente, fallecen más de siete millones de personas en el mundo (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática 2013 (INEGI)).

El cáncer se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de 100 tipos distintos de cáncer que pueden diferir sustancialmente en su comportamiento y respuesta al tratamiento. La cuestión más importante en la patología del cáncer es distinguir entre tumores benignos y malignos. Un tumor benigno, como las verrugas comunes de la piel, permanece confinado en su localización original, sin invadir el tejido sano adyacente ni propagarse a lugares distantes del cuerpo. Sin embargo, un tumor maligno es capaz de invadir el tejido normal adyacente y de propagarse por el cuerpo mediante los sistemas circulatorio o linfático (metástasis). Solo a los tumores malignos se les denomina propiamente como cánceres, y es su capacidad para invadir y dar lugar a la metástasis lo que convierte al cáncer en algo tan peligroso. Mientras que los tumores benignos pueden eliminarse mediante cirugía, la difusión de los tumores malignos a lugares del cuerpo distantes los suele hacer resistentes a este tratamiento local. Tanto los tumores malignos como los benignos se clasifican de acuerdo al tipo de célula del que proceden (Cooper y Hausman; 2007).

La mayoría de los cánceres se incluyen en uno de tres tipos principales: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfomas. Los carcinomas, que incluyen aproximadamente al 90% de los cánceres humanos, son alteraciones de las células epiteliales. Los sarcomas, que son raros en humanos, son tumores sólidos de tejido conectivo, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso. Las leucemias y los linfomas que contabilizan aproximadamente

el 7% de los casos en humanos, surgen a partir de células hematopoyéticas y de las células del sistema inmune, respectivamente (Alberts et al.; 2008).

A nivel celular, el desarrollo del cáncer se considera un proceso multietapa constituido por la mutación y selección de aquellas células con una capacidad cada vez mayor de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis tal como se muestra en la figura 5 (Cooper y Hausman; 2007).

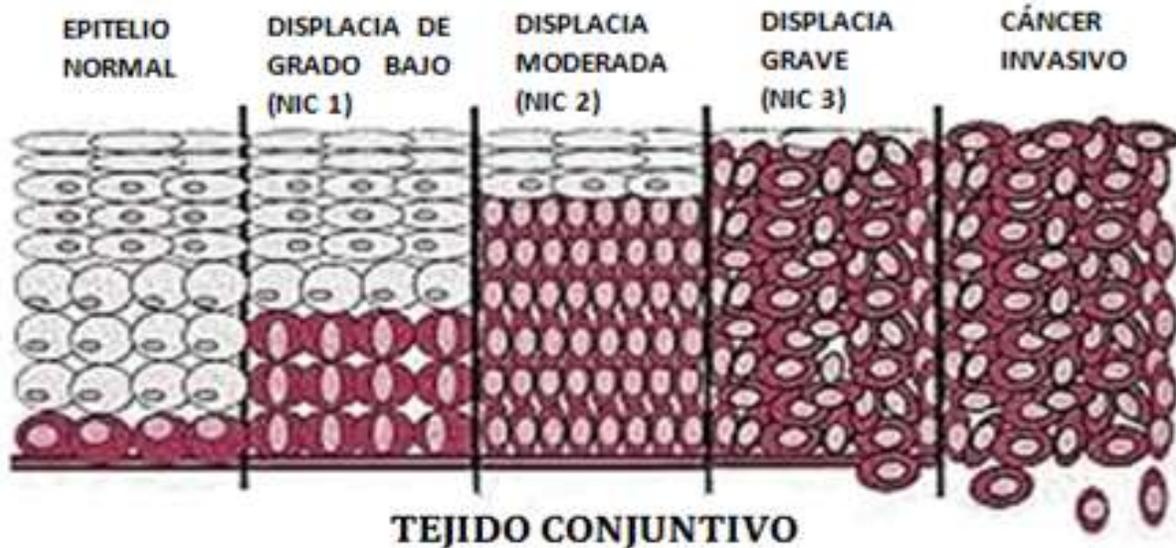


FIGURA 5. Etapas de progresión en el desarrollo de cáncer en el epitelio (imagen tomada y modificada de <https://diariodeunamamifera.files.wordpress.com/2013/08/evolcuic3b3n-cc3a1ncer-de-cc3a9rvix.jpg>).

Los virus que causan cáncer en humanos incluyen los virus de la hepatitis B y C (cáncer hepático), los papilomavirus (cáncer cervical y otras anogenitales), virus de Epstein-Barr (linfoma de Buritt y carcinoma nasofaríngeo), herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi y virus linfotrópico de células T humanas (leucemia de células T adultas) (Cooper y Hausman; 2007).

La infección genital con el virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual viral más frecuente a nivel mundial. Asimismo, es el factor de riesgo más importante para desarrollar lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. No obstante, menos de 5% de las mujeres infectadas con el VPH desarrollarán cáncer cervicouterino (CaCU) (Hidalgo; 2006).

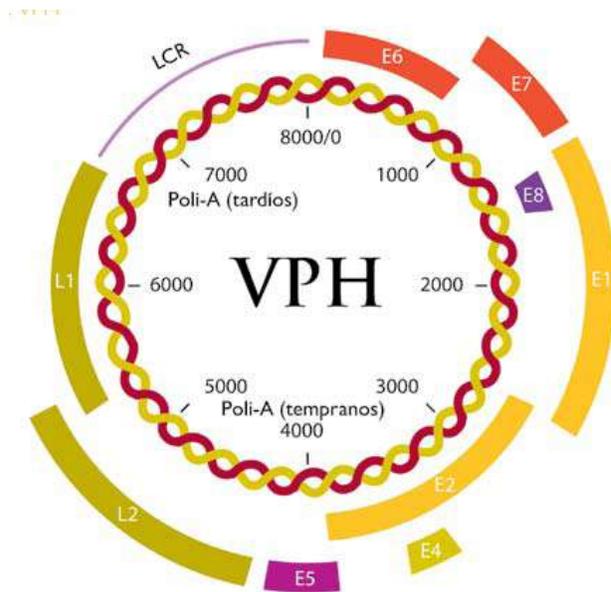


FIGURA 6. Genoma del VPH (Imagen tomada y modificada de López y Lizano; 2006).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) como se muestra en la figura 6 (Hidalgo; 2006).

Los VPH son un género de virus agrupados juntos por su tumorigenicidad y homogeneidad de ADN. Actualmente se conocen más de 70 tipos de VPH, mostrando cada tipo un tropismo particular por sitios anatómicos específicos (Serman; 2002).

CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino es la tercera causa de muerte en la mujer a nivel mundial (cáncer) y es la principal causa de muerte por enfermedades malignas en las mujeres de los países en desarrollo, según las últimas recopilaciones de los datos mundiales cada año se producen en el mundo, alrededor de 83,000 nuevos casos y cerca del 83 % corresponde a los países en desarrollo. Mueren anualmente 36,000 mujeres por esta causa (Martínez et al.; 2010).

El cáncer cervicouterino es una alteración celular que se origina en el epitelio cerca de la unión escamosa del cuello del útero (fig. 7) y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que suceden en etapas de displasia

leve, moderada y severa, que evolucionan a Cáncer in situ, en grado variable cuando esta se circunscribe a la superficie epitelial y luego a Cáncer invasor cuando traspasa la membrana basal (Duarte y Franco; 2004).

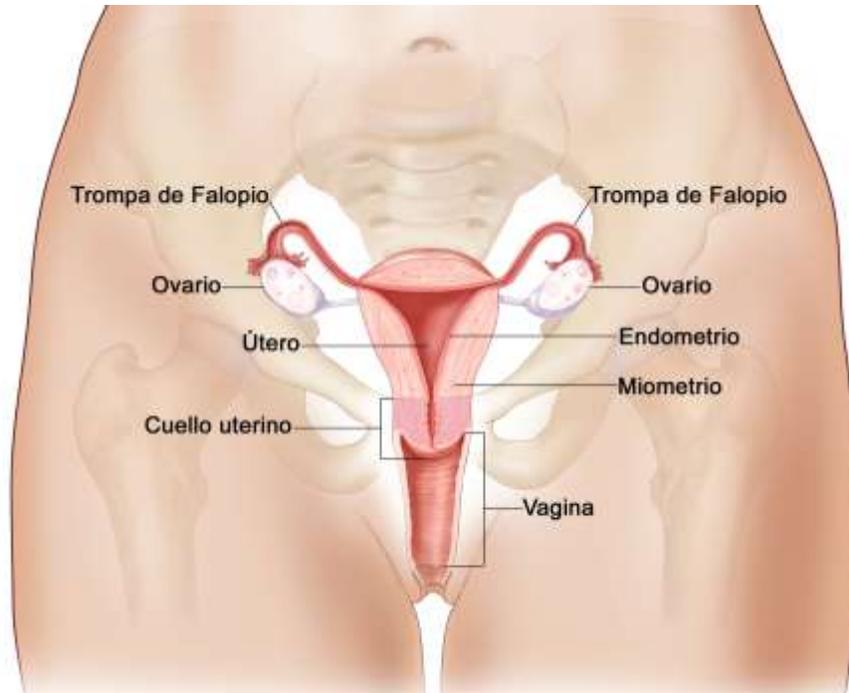


FIGURA 7. Anatomía del útero, el cérvix o cuello uterino y otras partes del sistema reproductor de la mujer. (Imagen tomada y modificada de www.cancer.gov).

Inicialmente este proceso pre-invasivo está limitado al epitelio cervical y se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Este tipo de lesiones cervicales, se clasifican en NIC I, II y III de acuerdo a la cantidad de epitelio que haya sido invadido por una población celular proliferativa e inmadura anormal. Con el tiempo puede extenderse a todo el espesor del epitelio cervical, una condición que se reconoce como carcinoma cervical *in situ* (CIS). Posteriormente, la enfermedad puede llegar a ser invasora (fig. 8) (Duarte y Franco; 2004).

Este proceso puede tardar una década o más. NIC I corresponde a la displasia leve, NIC II a la displasia moderada y NIC III a la displasia grave y al Carcinoma *in situ* CIS según el sistema de clasificación Reagan y Richart. En años recientes el sistema de Bethesda 2001 clasifica las lesiones según las anomalías de las células escamosas en 4 categorías diferentes: ASC células escamosas atípicas; LSIL lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado; HSIL lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y

carcinoma de células escamosas. La lesión precursora del cáncer cervical se le denomina neoplasia intraepitelial cervical que equivale a LSIL mientras que HSIL equivale a NIC II y III (fig. 8).

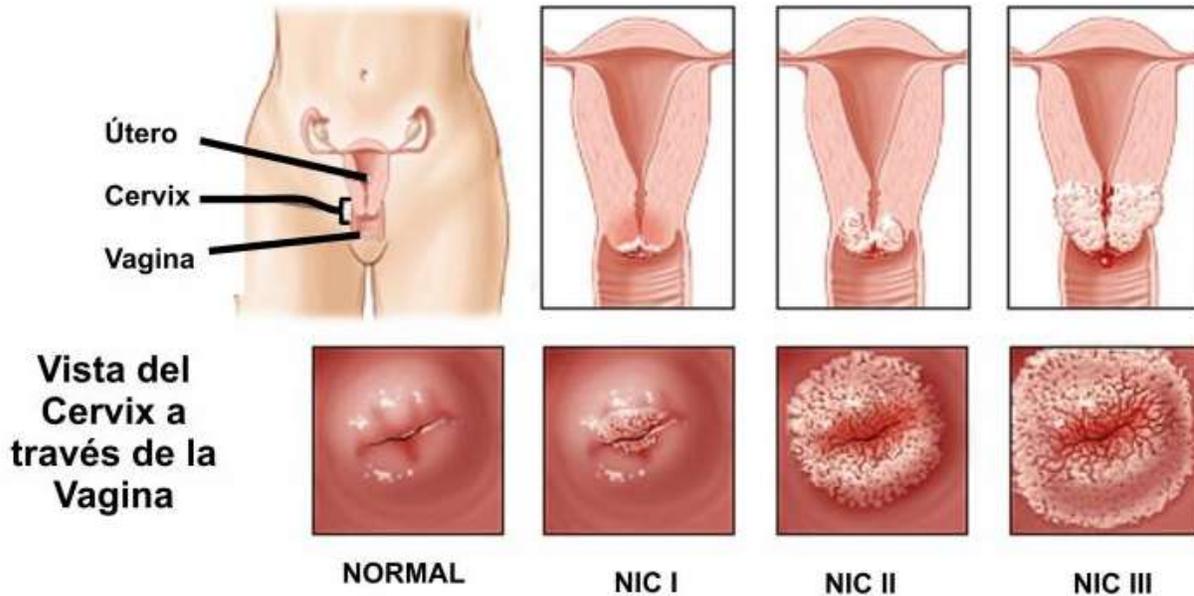


FIGURA 8. Estadios del cáncer cervicouterino (Imagen tomada de <http://www.segundomedico.com/wp-content/uploads/2015/09/tratamiento-cancer-cervicouterino-vph.jpg>).

Se estima que el 15 por ciento de todos los cánceres humanos en todo el mundo puede atribuirse a los virus, lo que representa una porción significativa de la carga global del cáncer. Tanto virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) han demostrado ser capaces de causar cáncer en seres humanos (Liao; 2006).

Actualmente, es reconocido por la Organización Mundial de la Salud que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por VPH, demostrado por primera vez en la década de 1980 por Harold Zur Hausen, virólogo alemán, y que la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más propagada (Bosch et al.; 2002). Se ha demostrado que los genomas de los VPH usualmente se integran al genoma de la célula hospedera. Esta integración se realiza en diversos sitios, algunos de ellos cercanos a oncogenes específicos o sitios frágiles, sugiriendo que este evento puede tener un papel importante en el desarrollo de los tumores cervicales (fig.9) (Vázquez et al.; 2005).

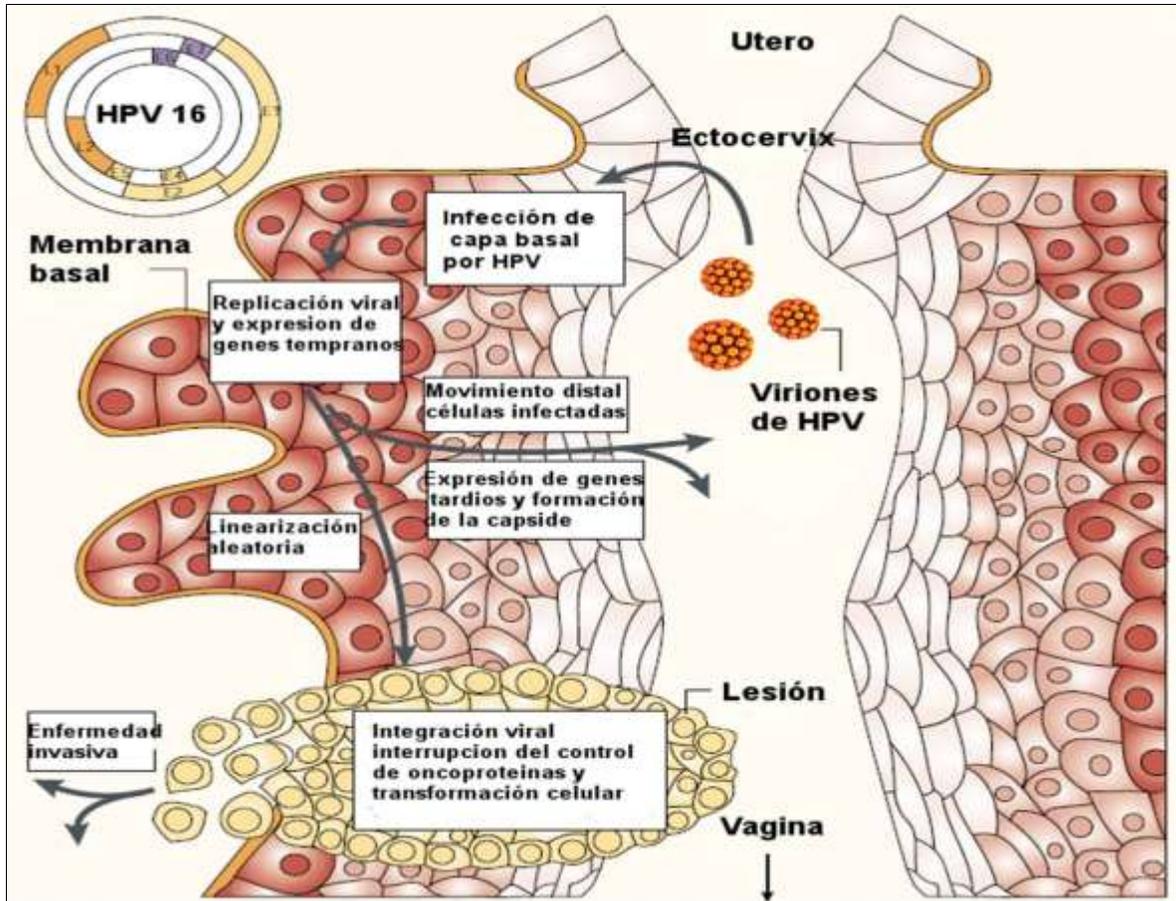


FIGURA 9. Progresión gradual por etapas intraepiteliales (Cáncer Cervicouterino) (Imagen tomada de http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n1/fig_tab/nrc700_F1.html).

Sin embargo, este tipo de cáncer es absolutamente prevenible y su tratamiento es relativamente fácil, cuando el diagnóstico es oportuno. Sabemos que es de etiología infecciosa, pero desde la perspectiva de la salud pública, los programas de control no han funcionado como se esperaba (Hidalgo; 2006).

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer (López y Lizano; 2006).

TRATAMIENTOS

Existen tres tratamientos para el CaCu, cuya selección depende principalmente del tamaño del tumor, de los deseos de tener hijos de la paciente, así como de si el cáncer se ha diseminado.

Cirugía

La cirugía es una opción para las mujeres con estadio I o II de cáncer cervicouterino. Consiste en extirpar el tejido que pueda contener células cancerosas.

- *Cervicectomía uterina radical:* Se extirpa el cérvix, parte de la vagina y los ganglios linfáticos en la pelvis. Esta opción es para pocas mujeres que tienen pequeños tumores y que quieren intentar quedar embarazadas más adelante.
- *Histerectomía total:* Se extirpa el cérvix y el útero.
- *Histerectomía radical:* Se extrae el cérvix, parte del tejido alrededor del cérvix, el útero y parte de la vagina. Ya sea con la histerectomía total o con la radical, el cirujano puede extirpar otros tejidos.
- *Trompas de Falopio y ovarios:* El cirujano puede extirpar tanto las trompas de falopio como los ovarios. (Salpingooforectomía).
- *Cirugía con rayo láser:* consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.

Los efectos secundarios de la cirugía dependen principalmente del tamaño y ubicación del tumor y del tipo de cirugía (Instituto Nacional de Cáncer 2015 (INC)).

Radioterapia

La radioterapia es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma y partículas alfa). Los médicos usan distintos tipos de radioterapia. Algunas personas reciben una combinación de tratamientos.

- *Radioterapia externa:* Radiación gamma dirigida hacia la pelvis u otros tejidos donde se ha diseminado el cáncer.

- *Radioterapia interna:* Dentro de la vagina se coloca un tubo delgado que contiene un material radiactivo. El paciente se queda por lo general en el hospital. Los implantes permanecen en el sitio generalmente por varios días.
- *Radiación sistémica:* La radiación proviene de un líquido o cápsulas que contienen material radioactivo que viaja por el cuerpo. El paciente toma el líquido o las cápsulas o recibe una inyección. Este tipo de radioterapia puede ser usada para tratar el cáncer o para controlar el dolor del cáncer que se ha diseminado a los huesos. Solo unos pocos cánceres se tratan actualmente de esta manera.

Los efectos secundarios de la radioterapia dependen principalmente de la dosis y del tipo de radiación, así como de la parte de su cuerpo que sea tratada. La radiación en el abdomen y pelvis puede causar náuseas, vómitos, diarrea o problemas urinarios. Puede perder el vello del área genital. Además, la piel de la parte tratada puede enrojecerse, researse y hacerse sensible (INC).

Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Los fármacos para el cáncer cervical se suelen aplicar por vía intravenosa. Generalmente se combina con radioterapia para el tratamiento del cáncer cervicouterino. Cuando el cáncer se ha diseminado a otros órganos, se puede usar sólo la quimioterapia.

La quimioterapia se administra generalmente en ciclos. El tratamiento se administra uno o varios días. Luego se tiene un período de recuperación por varios días o semanas antes de la sesión siguiente de tratamiento.

La mayoría de las personas reciben el tratamiento en la parte de consultas externas del hospital, en el consultorio del médico o en casa. Sin embargo, algunas necesitan quedarse en el hospital durante la quimioterapia.

Los efectos secundarios dependen principalmente de los fármacos y de la dosis. Los fármacos afectan las células cancerosas y otras células que se dividen rápidamente:

- **Glóbulos de la sangre:** cuando los fármacos dañan los glóbulos sanguíneos sanos, se tiene más probabilidades de contraer infecciones, de sangrar o magullarse con facilidad y de sentirse muy débil y con mucho cansancio.

- **Células de las raíces del pelo:** la quimioterapia puede causar la caída del pelo. Su pelo volverá a crecer, pero es posible que cambie de color y textura.
- **Células que recubren el tubo digestivo:** la quimioterapia puede causar disminución del apetito, náuseas, vómitos, diarrea, o llagas en la boca y labios (INC).

Los compuestos quimioterapéuticos que se utilizan en el tratamiento del cáncer son poco selectivos debido a que afectan a células que se dividen rápidamente (Schaefer y Mendoza; 2010); la cual tiene el inconveniente de inducir una fuerte reacción inflamatoria, que es directamente proporcional a la cantidad de células dañadas que provocan inflamación local, fiebre y malestar (Sánchez, 2003; Chul et al.; 2003; Tolaney et al.; 2008).

Las células cancerígenas han desarrollado resistencia contra la gran mayoría de los fármacos actualmente utilizados en la terapéutica, en este entorno, los metabolitos secundarios de las plantas pueden representar una fuente potencial para el desarrollo de nuevos fármacos novedosos con un índice terapéutico aceptable y una menor cantidad de efectos secundarios. Se sabe que las Saponinas esteroidales presentan actividad antiproliferativa (Fernández et al.; 2012), por lo cual los hallazgos anteriores despertaron el interés de conocer el efecto antiproliferativo, necrótico e inductor de apoptosis del MF-10.

SAPONINAS ESTEROIDALES

Estructuralmente las saponinas o glucósidos son compuestos orgánicos que contienen uno o varios azúcares. Se clasifican como esteroidales o triterpénicos, dependiendo de la naturaleza de la aglicona. Las saponinas por hidrólisis ácida o enzimática dan origen a una sustancia libre del o los azúcares formando así la sapogenina (Romo; 2006).

Los esteroides difieren entre sí, en el número y la posición de sus dobles enlaces, en el tipo, localización y número de sus grupos funcionales sustituyentes, de los enlaces entre los grupos sustituyentes y la configuración que adoptan los anillos entre sí, ya que el hidrocarburo original posee seis centros de asimetría. Los principales puntos de

sustitución son el carbono 3 del anillo A, el carbono 11 del anillo C y el carbono 17 del anillo D (Nelson y Cox; 2005).

Las saponinas esteroidales se producen en al menos 400 especies de plantas, pero alrededor de 28 se utilizan como alimento, como la soya, garbanzos, cacahuates, espinaca, berenjena. Son poco frecuentes en los animales; están presentes en los pepinos y estrellas de mar; se encuentran rara vez en esponjas y corales (Williams y Gong; 2007).

La química medicinal de las saponinas esteroidales ha generado una gran variedad de estructuras y actividades biológicas. Este grupo de productos naturales ha sido ampliamente estudiado en el desarrollo de nuevos fármacos (Fernández; 2010).

Las saponinas reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espuma, por esto se han utilizado ampliamente por sus propiedades detergentes. Tienen propiedades hemolíticas, son tóxicas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas (Anaya; 2003). Algunas saponinas aisladas han demostrado tener diferentes propiedades biológicas como antiinflamatorias (Tapondjou et al.; 2008), antidiabéticas (Nakashima et al.; 2003; Fernández et al.; 2012), anticancerígenas (Cai et al.; 2002; Chun-Te et al.; 2007; Fernández et al.; 2012); entre otras. Aunque la aglicona juega el papel más importante en la actividad biológica, es bien conocido que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de los glicósidos esteroides; por ejemplo, incrementando la solubilidad de éstos en medio fisiológico, ayudando a la permeabilidad celular, tiempo de acción y dirigiendo la molécula al sitio activo. En general, reportes indican que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado (Fernández et al.; 2009).

La Dioscina (fig. 10 A), es una saponina esteroideal, molécula natural en el género Dioscorea, que se distribuye en América del Norte y muestra capacidad para minimizar los síntomas postmenopáusicos (Mirunalini y Shahira; 2011); actividad antitumoral, antifúngica, antiviral (Li et al.; 2005); así como diferenciación y apoptosis en la línea celular HL-60 de leucemia humana (Wang et al.; 2001); actividad antiproliferativa en células HeLa (Cai et al.; 2002).

Sin duda la más común de todas las saponinas esteroides es la Diosgenina (fig. 10 B), que fue obtenida por primera vez de Dioscorea Tokoro en 1936 por Takeo Tsukamoto

(Romo; 2006); se encuentra en diversas especies de la familia *Dioscoreacea* (Narula et al.; 2007); 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 (Anaya; 2003).

La Diosgenina 3-glu (fig. 10 C) es una saponina esteroidal, sintetizada a partir de la Diosgenina, por la adición de una glucosa en el carbono tres de la estructura esteroidal. La cual posee actividad antiproliferativa en varias líneas celulares tales como HeLa (Hou et al.; 2004); HEL y K562 (eritroleucemia) (Son et al.; 2007); HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular); HCT-116; HT-29 (cáncer de colon) (Lepage et al.; 2011); MCF-7 (cáncer de mama) (Li et al.; 2005).

Se ha reportado que la actividad de las saponinas está relacionada con la estructura, usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas, derivadas sintéticamente (Hong-Ji et al.; 2006). Sin embargo, en la actualidad se pretende encontrar compuestos adecuados con propiedad antitumoral; esto es difícil ya que dicha actividad debe estar basada en el efecto selectivo que debe tener el compuesto entre las células tumorales y las normales. Este es el caso del derivado de glucosamina **2-deoxi-2-acetamido- β -d-glicopiranosido de Diosgenilo (MF-10)** (fig. 10 D) un nuevo compuesto esteroidal sintetizado a partir de la Diosgenina 3-glu.

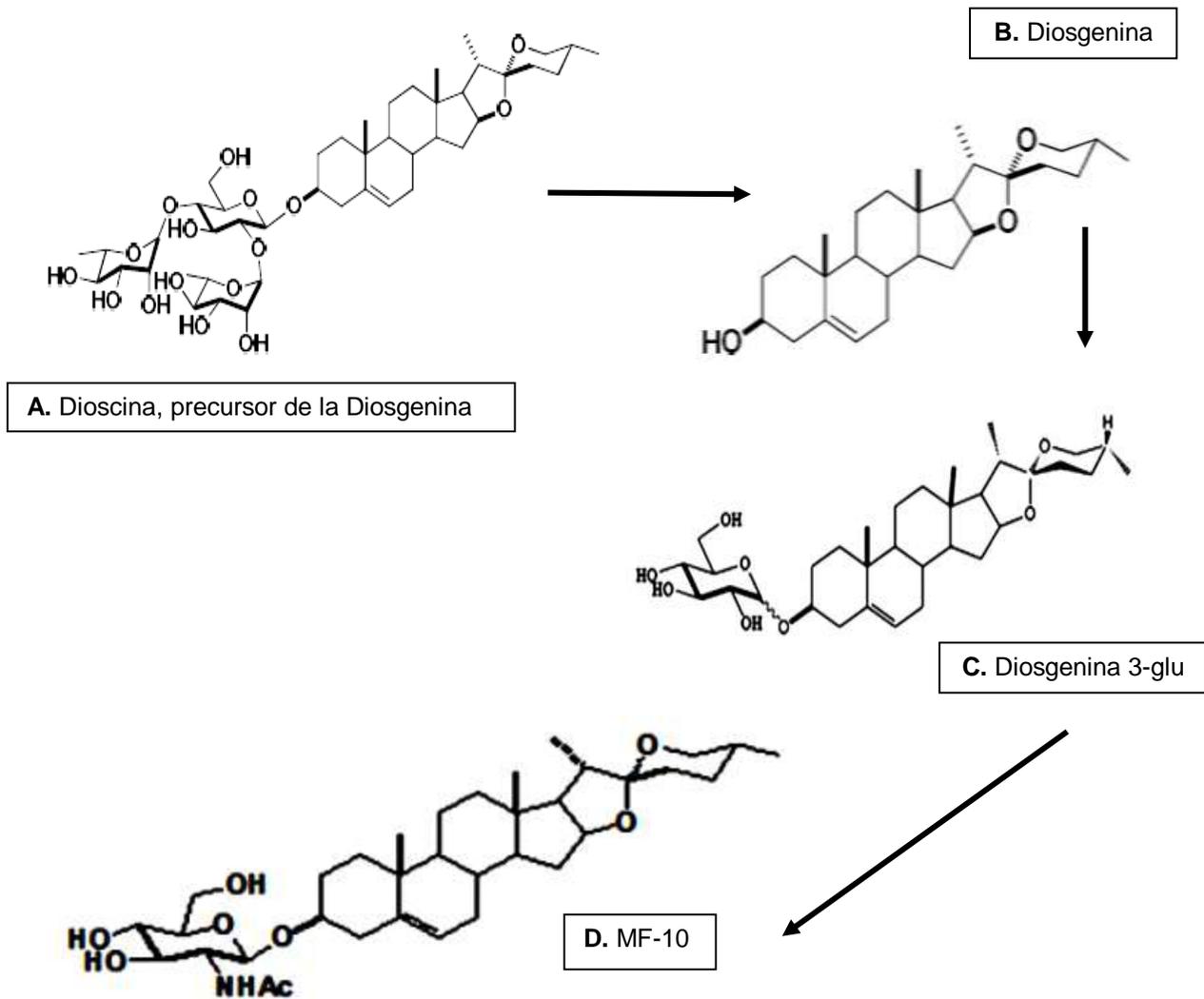


FIGURA 10. Estructura molecular de la Dioscina (A), Diosgenina (B), Diosgenina 3-glu (C) y el MF-10 (D) (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Es natural en el ser humano la búsqueda de una explicación a lo que sucede a su alrededor, y como en el caso de muchas otras ramas de las ciencias naturales, surgió la necesidad de conocer la composición química de las materias primas vegetales. Dicho estudio comprende la caracterización de los compuestos químicos responsables de la actividad biológica que poseen las plantas que a lo largo de la historia han tenido un uso terapéutico (Leyva et al.; 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día las terapias contra el cáncer (radioterapia, quimioterapia y cirugía), presentan efectos secundarios que no son benéficos para los pacientes. Además, el efecto antitumoral de la mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento de esta patología, está basado en su acción citotóxica, con nula o baja acción selectiva (afectan a todas las células en general) estos tratamientos son ineficaces en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que surge la necesidad de generar nuevas alternativas terapéuticas; sobre todo aquellas que están basadas en compuestos de origen vegetal que presenten actividad antiproliferativa y de acción no citotóxica, como las saponinas.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino tiene gran impacto en las vidas de las mujeres en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. Según las últimas estimaciones mundiales, todos los años surgen 83,000 casos nuevos de cáncer cervical, y 36,000 mujeres mueren de la enfermedad anualmente (OPS). Alrededor del 83% de los casos nuevos tienen lugar en los países en desarrollo, donde los programas de detección no están bien establecidos o no son efectivos (INEGI). Por lo que es primordial el desarrollo de nuevas terapias basadas en compuestos que conserven la capacidad antiproliferativa, no citotóxica y apoptótica de las saponinas. Es por ello que este trabajo de investigación tiene el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis del MF-10 en líneas tumorales provenientes de cáncer cervicouterino.

Hipótesis

Actualmente se ha encontrado que las saponinas como la Diosgenina, presentan propiedades farmacológicas tales como antifúngicas, antidiabéticas, actividad antioxidante, anticancerígenas e inductoras de apoptosis. Considerando que el compuesto **2-deoxi-2-acetamido- β -d-glicopiranosido de Diosgenilo (MF-10)** es sintetizado a partir de la diosgenina 3-glu que a su vez fue sintetizado de Diosgenina, se espera que presente un efecto antiproliferativo y citotóxico sobre las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa.

OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico (citotóxico) y apoptótico del compuesto 2-deoxi-2-acetamido- β -d-glicopiranosido de Diosgenilo (MF-10), en las líneas celulares proveniente de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa.

Específicos

- Desarrollar cultivos de las líneas celulares proveniente de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa así como de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica de donadores sanos.
- Determinar la actividad antiproliferativa del MF-10, expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir una disminución del 50% en el número celular (CI_{50}), en cultivos de células CaSki y HeLa.
- Evaluar la actividad necrótica como parámetro de citotoxicidad del compuesto MF-10 en cultivos de células CaSki y HeLa, mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares y a la incorporación celular de IP.
- Evaluar la actividad necrótica (citotóxica) del compuesto MF-10 en cultivos de linfocitos humanos mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Determinar si el MF-10 a la concentración de CI_{50} induce muerte celular apoptótica, mediante la observación al microscopio por contraste de fase y epifluorescencia de características morfológicas apoptóticas a través de la técnica de tinción nuclear con el fluorocromo DAPI, así como la cuantificación de la caspasa-3 activa en cultivos de células CaSki y HeLa.
- Evaluar si la concentración de la CI_{50} del MF-10 afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas.

MÉTODOLOGÍA

Cultivo de células tumorales

Las líneas celulares provenientes cáncer cervicouterino CaSki (positivo al VPH tipo 16) y HeLa (positivo al VPH tipo 18), fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 mL de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/L) y bencilpenicilina (500 000 U/L) (Grünenthal, MEX), al 5 % de suero de neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) que previamente fue desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubadora (NuAire, USA) a 37°C, al 5 % de CO₂ y una atmosfera húmeda a saturación. Se permitió la saturación de los cultivos hasta un 70 % de confluencia para realizar los ensayos (Morgan y Darling, 1993; Cultek, 2015).

Cultivo de linfocitos humanos

Para realizar el cultivo de linfocitos humanos, se colectaron 20 mL de sangre periférica de humano aparentemente sano en tubos con EDTA, posteriormente la sangre fue vertida a tubos cónicos de vidrio de 15ml (Pirex, USA), a los cuales se le adiciono 5 mL de Histopaque™-1077 (Sigma-Aldrich, USA) (un total de 4 tubos), se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y la velocidad se incremento gradualmente 300 rpm más cada 2 minutos hasta llegar a 1500 rpm, se dejaron centrifugar durante 25 minutos más. En seguida se les retiró el plasma sanguíneo y se colectó el anillo de leucocitos, el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendido con 10 mL de buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) por tubo, se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos, se le retiró el sobrenadante para resuspenderse en 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SNT (suero de neonato de ternera; Gibco, USA). Las células que se obtuvieron fueron sembradas en cajas Petri de 100 mm, en 10 mL de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB (Suero Fetal Bovino) y posteriormente se incubaron durante 1h.

Transcurrido el tiempo, se colectaron todas las células en suspensión en un tubo cónico de vidrio. Una vez centrifugada la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se

retiró el sobrenadante para resuspenderse 5 mL de RPMI-1640 sin suero y finalmente fue determinado el número celular mediante una cámara de Neubauer.

Preparación del compuesto

Se preparó una solución stock con 5 mg del compuesto MF-10 disuelto en 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones de trabajo se obtuvieron por medio de diluciones de la solución stock, por ejemplo: 10 µl de solución stock en 100 µl de RPMI-1640 para obtener una concentración final de 10 µg/10 µl.

Evaluación del efecto del MF-10 sobre el potencial proliferativo en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa, mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta

Las células provenientes de cáncer cervicouterino de cada línea fueron sembradas en placas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 µl de RPMI-1640 al 5 % de SFB, por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se le adicionaron los tratamientos correspondientes (controles y concentraciones del compuesto MF-10 (1.56µg/ml a 100 µg/ml); las células con el vehículo fueron incubadas con las concentraciones de DMSO que se utilizan para disolver el compuesto, durante 24 h. El control para el vehículo empleado para solubilizar el MF-10, DMSO, contempla la máxima concentración utilizada en la preparación del MF-10 a 100 µg/ml, 100 µl de dimetilsulfóxido diluido en 1 ml RPMI-1640 al 5% de SNT, al control testigo únicamente se le realizó el cambio de medio por medio de cultivo fresco. Los ensayos se mantuvieron por 24 h más, dando un tiempo total de cultivo de 48 h (24 h sin tratamiento y 24 h con tratamiento). Al término del estímulo se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al*, 1989. Para ello fue retirado el medio de cultivo e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con agua desionizada, a continuación se dejó secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta (Sigma-Chemical Co.) al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se

dejó secar al aire. Por último, el colorante incorporado en el núcleo de las células se solubilizo con ácido acético (J.T. Baker, Méx.) al 10 % en agitación por 20 minutos. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Imagen Tecan Spectra). Los resultados se analizaron por regresión lineal para la obtención de la concentración que abate el 50 % de la población celular (CI_{50}).

Determinación de la muerte por citotoxicidad a través de la liberación de la LDH

En una placa de 96 pozos fueron sembradas 7,500 células de cada una de las líneas provenientes de CaCu, CaSki y HeLa con 100 μ l de RPMI al 5 % de SNT, por 24 h. Los tratamientos se realizaron por triplicado. Posteriormente se les retiro el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le cambia el medio de cultivo, un control positivo al cual se le hace cambio de medio, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la CI_{50} correspondiente y el tratamiento con MF-10 con la concentración CI_{50} correspondiente a cada línea celular. A las 23 h de tratamiento, al cultivo control positivo se le hizo un cambio de medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 y se dejó que el ensayo complete las 24 h de tratamiento.

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos se colectaron de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 mL y centrifugados a 2,000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes fueron traspasados una placa de 96 pozos, 50 μ l por pozo, para su evaluación. La actividad de LDH se determino con el kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA), del cual se agrego 50 μ l de la mezcla de reacción. Se incubaron a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz por 30 min. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de elisa (Image Tecan Spectra). Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100.

Determinación de la integridad de la membrana celular por la incorporación de Ioduro de Propidio (IP) por citometría de flujo.

Se sembraron 30 000 células por pozo provenientes de CaCu en placas de cultivo de plástico de 48 pozos (Corning, USA), con 500 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina (300 mg/l) y bencilpenicilina (500 000 U/l) (Grünenthal, MEX) al 5 % SNT previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda de saturación.

Para determinar la incorporación de Ioduro de Propidio se aplicaron los siguientes controles: positivo, control; en los cuales las células se mantuvieron en condiciones de cultivo; para el vehículo las células se trataron con la mayor concentración de DMSO utilizada en el tratamiento de la CI₅₀ del MF-10; para el tratamiento con MF-10 las células fueron tratadas con la concentración de la CI₅₀. Después de 24 horas de tratamiento, las células fueron cosechadas y colectadas en tubos para citometría. Para control positivo, las células fueron permeadas con 500 µl de etanol al 70 %. Posteriormente se le agregó a cada muestra 1 mL de RPMI-1640 suplementado al 5 % de SFB. Un minuto antes de leer la muestra en citómetro (marca FACSAria II, BD systems USA) se le colocó a cada muestra 3 µl de IP (J.T. Baker, Méx.).

Determinación de cuerpos apoptóticos mediante la tinción de DAPI

Primeramente 1, 500,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm en un volumen de 5 mL de RPMI-1640 al 5 % de SNT en cámara húmeda a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente las células se fijaron con etanol al 70% 15 minutos. Luego fueron lavadas con PBS filtrado a través de un filtro de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 0.22µm 3 veces, se incubaron con diclorato 4,6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) durante 1 minuto y se les realizaron tres lavados. Finalmente, las preparaciones fueron montadas en un portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA), y selladas con resina acrílica; se mantuvieron en oscuridad a -20 °C hasta ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Jap.) (Fernández et al.; 2011).

Determinación de la muerte apoptótica mediante la expresión de caspasa-3-activa por citometría de flujo.

Para determinar si el compuesto MF-10 induce una expresión de la caspasa-3-activa, como parámetro para inducir la apoptosis (Ziegler y Kung; 2008; Klein et. al; 2005; Borner 2003); se sembraron 30 000 células por pozo en placas de cultivo de plástico de 48 pozos procedentes de líneas de CaCu en las condiciones antes descritas. Para el tratamiento con MF-10; las células fueron tratadas con la concentración de la CI_{50} se incubaron por 24 horas. La detección de la caspasa-3 se realizó por citometría de flujo; para esto, las células fueron cosechadas y posteriormente fijadas con etanol al 70% por 5 min en el refrigerador a 4 °C, al término del tiempo las células se lavaron cuidadosamente 2 veces con PBS. Sucesivamente se adicionó el anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3 humana, 1:500 en PBS y se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Posteriormente, a las muestras se les realizaron lavados con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo de cabra anticonejo con FIT-C, 1:250 (J.T. Baker, MEX) en PBS y se dejó incubar en la obscuridad durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y se llevaron a un volumen de 500 µl de PBS por muestra. Finalmente, el botón celular se resuspendió para leer en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Evaluación del efecto del MF-10 sobre la proliferación de linfocitos humanos a través de la técnica de marcaje con carboxifluoresceina (CSFE)

Para marcar las células linfocíticas con carboxifluoresceina (CSFE) (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 mL de PBS con 10 µl de carboxifluoresceina (12 µmoles por mililitro de solución o por millón de células) y se incuban 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se le realizaron lavados con PBS al 5 % de SFB, se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) para resuspenderse en 4 mL de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (PHA; Micro Lab S.A., Méx.), los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 mL a una densidad de 10^6 células/mL de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25µl de PHA/mL (diluida 1:10 de PBS). La preparación de los tratamientos: control solo con medio de cultivo con y sin PHA, control para el vehículo al cual se le agregó la cantidad de DMSO empleada en

la preparación de la concentración CI_{50} más alta para células tumorales de CaCu, y MF-10 en la concentración CI_{50} más alta. 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 μ l y fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación, las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo, y depositado en tubos cónicos de plástico de 0.6 mL. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de verseno frío y se incubó por 5 min a temperatura ambiente; se centrifugó nuevamente y fue retirado el verseno. Sucesivamente se resuspendió con 500 μ l de PBS y se agregó 500 μ l de paraformaldehído al 2%. Las células fueron evaluadas por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSAria II y los datos fueron procesados con el programa FACSDiva versión 6.1.2. Los datos se analizaron haciendo una comparación con respecto al control positivo para proliferación, células tratadas únicamente con PHA.

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH en cultivos de linfocitos humanos.

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colectaron (5 mL) en tubos cónico de vidrio de 15 mL (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se centrifugan (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió con 10 mL de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1mL de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB. El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4mL. Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 mL de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró

el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 mL de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20µl, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer. Los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10^6 células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25µl de PHA/ml (diluida 1:10 de PBS) (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realizó en ese momento: control solo con medio de cultivo con y sin PHA, control positivo al cual se le agregara tritón X-100, control para el vehículo al cual se le agregara la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la concentración CI_{50} más alta obtenida para células tumorales de CaCu, y MF-10 en la concentración CI_{50} más alta. 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 µl y se incubaron en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación, a las 71 h de tratamiento al control positivo se le agregaron 2µl tritón X-100 y se homogenizaron piteando suavemente el medio de cultivo, se incubaron por 1 h más. A las 72 h de cultivo las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo, y colectados en tubos cónicos de plástico de 0.6 mL de manera individual. Se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, y se traspasaron 50 µl de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96® (Promega, USA), del cual se agregaron 50 µl de la mezcla de reacción. Se incubaron a temperatura ambiente protegido de la luz por 30 min. Se evaluaron a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de elisa (Image tecan spectra). Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras son por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente usando un análisis de varianzas (ANDEVA) seguida de una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05% con el paquete estadístico SSP 14.0 para Windows.

RESULTADOS

Actividad antiproliferativa del MF-10 en células de cáncer cervicouterino

Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo del MF-10 en cultivos provenientes de CaCU, cultivos de células CaSki y HeLa fueron estimuladas de manera independiente con diferentes concentraciones del compuesto y la actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto que disminuye la densidad celular en un 50% (Figura 11, Tabla 1).

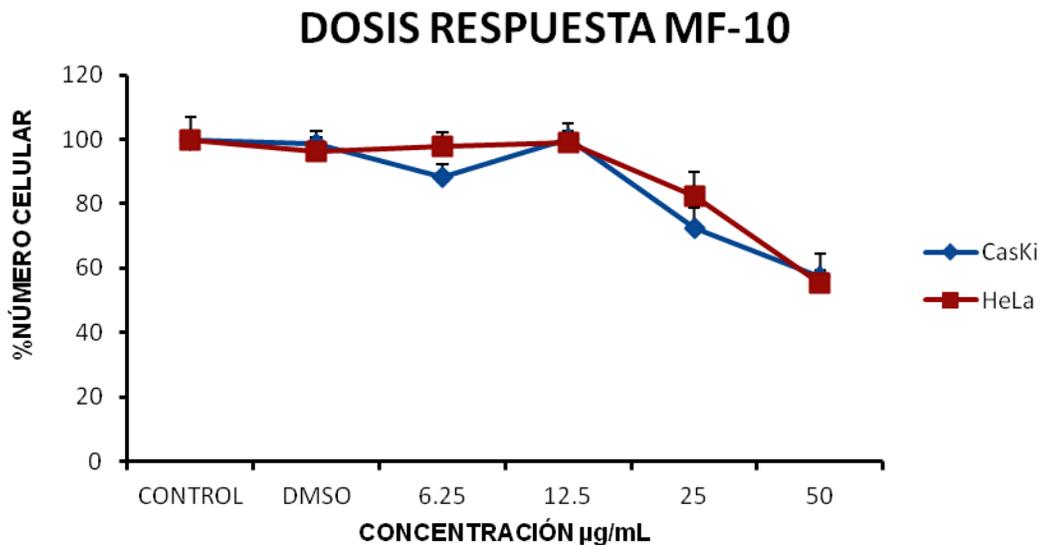


FIGURA 11. Efecto antiproliferativo del MF-10 sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki y HeLa. 7,500 células fueron sembradas en cajas de 96 pozos por 24h y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de MF-10 y el número celular fue cuantificado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes con al menos seis repeticiones.

TABLA 1. Concentración requerida de MF-10 para inducir una disminución del 50% en la densidad de cultivos de CaSki y HeLa.

LÍNEA CELULAR	CI ₅₀ (µg/mL)
CaSki	50
HeLa	50

Los resultados obtenidos indican que el MF-10 afecta el potencial proliferativo de las líneas celulares CaSki y HeLa de una manera dependiente de la dosis con una CI_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Morfología Celular

Con la intención de observar si el compuesto MF-10 afecta la morfología de las células tumorales, cultivos de células CaSki y HeLa tratados con la CI_{50} de MF-10 fueron observados en un microscopio invertido con un objetivo 20x (Aus Jena Sedival, USA) y fotografiados con un acercamiento de 1.5 (figura 12). Las imágenes de los cultivos celulares mostraron que mientras los cultivos control y DMSO, las células presenta una forma poliédrica con citoplasma abundante y con proyecciones citoplasmáticas, las células tratadas mostraron una forma esférica, contraídas, de menor tamaño y con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas, indicando que el MF-10 afecta la morfología de estas células.

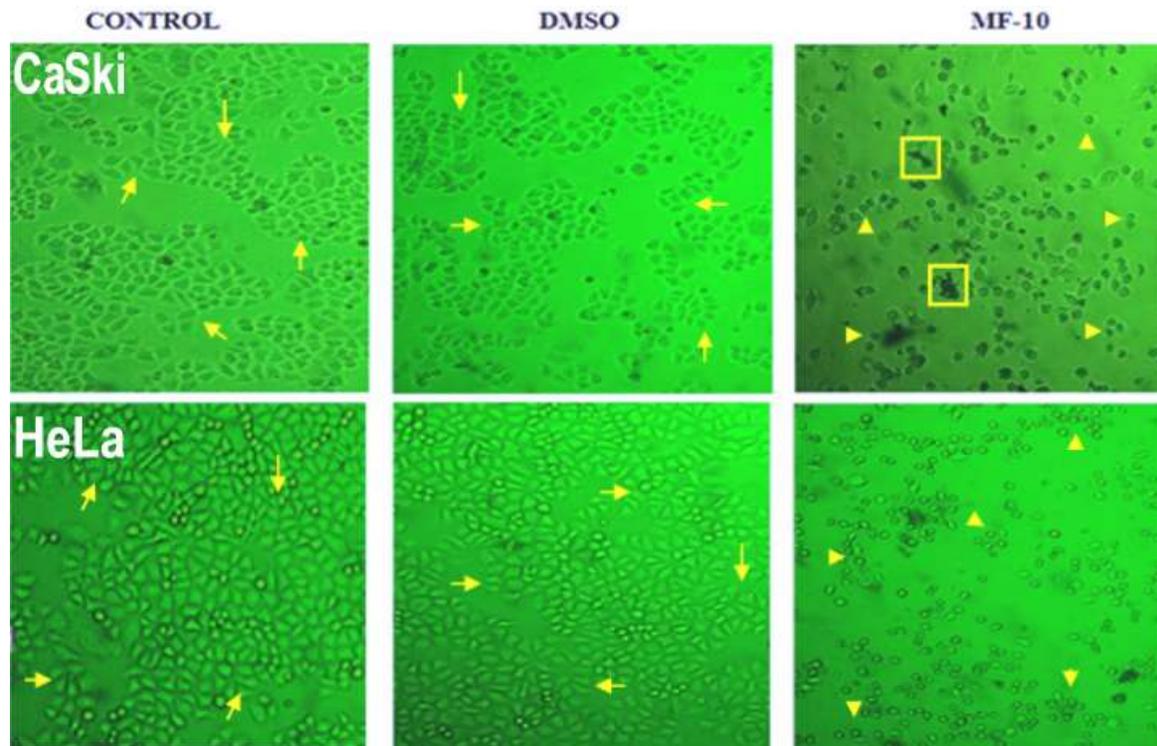


FIGURA 12. Efecto del MF-10 sobre la morfología de las células de CaCu CaSki y HeLa. Cultivos de 7,500 células en un volumen de 100 μl en placas de 96 pozos, fueron estimuladas con la CI_{50} respectiva por 24h. (**Flechas negras:** células poliédricas, **cabezas de flechas:** células esféricas; **cuadrado:** células que perdieron adherencia).

Actividad citotóxica del Mf-10 en células de CaCu.

Para descartar que la disminución del número celular inducido por el Mf-10 sea mediante un efecto citotóxico (necrosis), cultivos de CaCu CaSki y HeLa fueron estimulados con sus respectivas CI_{50} para evaluar la integridad de la membrana plasmática mediante la determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes así como la incorporación celular de Ioduro de Propidio (IP) (fig. 13 y 14).

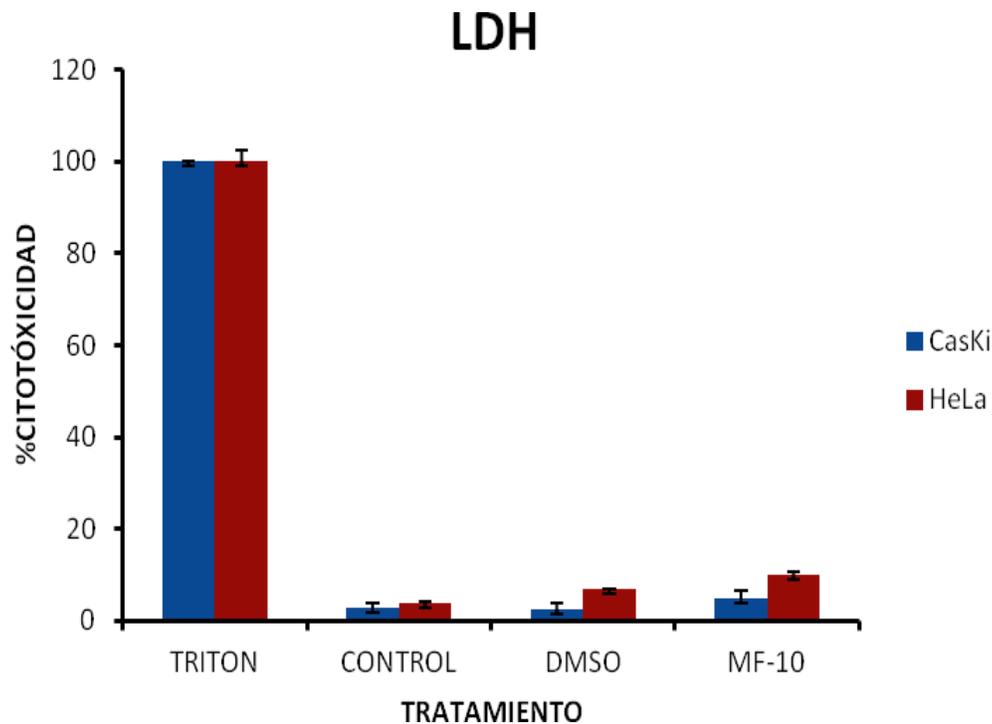
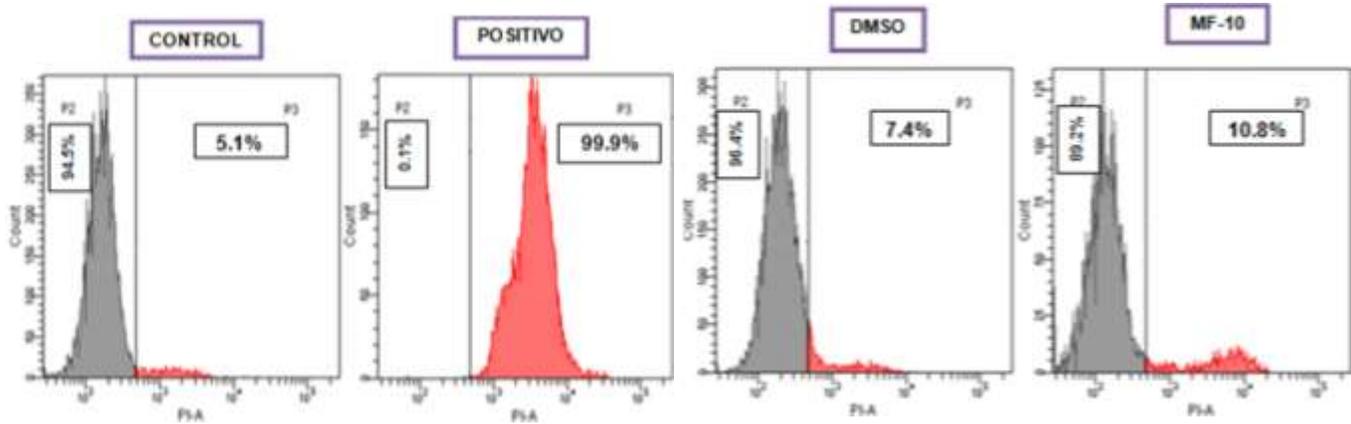


FIGURA 13. La liberación máxima de LDH se determinó con la aplicación de tritónx-100 a las 48 h de cultivo, la actividad de la enzima liberada se tomó como el 100% de la actividad. Se observa el control, cultivo de células de CaCu sin tratamiento en RPMI al 5% de SNT; DMSO, tratados con dimetilsulfoxido al 0.5%, MF-10, cultivos estimulados con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La barra indica la desviación estándar. ANDEVA, seguida de una prueba de Tukey (* $p < 0.05$ vs control). Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes con al menos tres repeticiones.

A) CaSki



B) HeLa

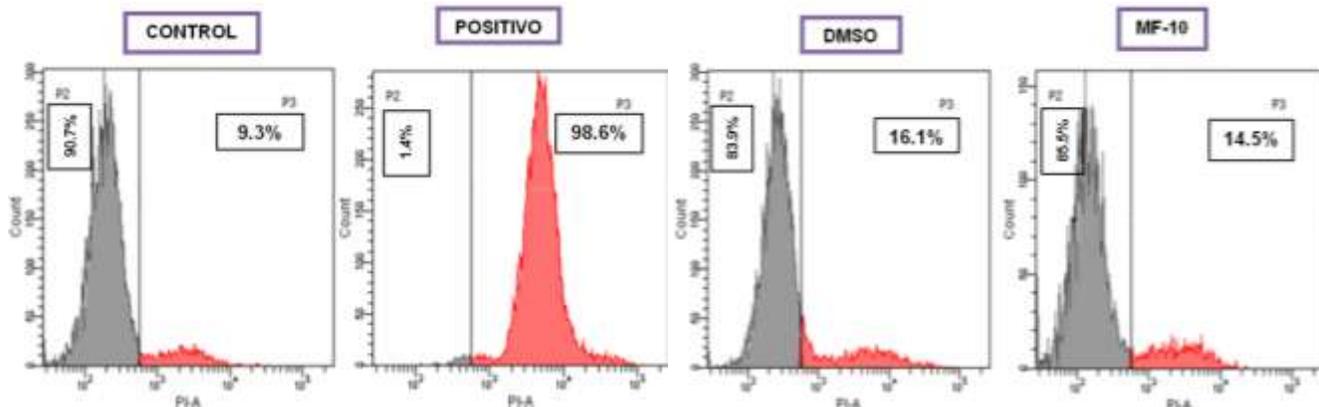


FIGURA 14. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en las líneas celulares CaSki (A) y HeLa (B) tratadas con la CI_{50} respectivas de MF-10, para el control células sin tratamiento en RPMI al 5% de SNT, el DMSO se utilizó a una concentración de 0.5% y para el control positivo se utilizaron células fijadas con etanol al 70%. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes con al menos tres repeticiones.

Los resultados mostrados en las figuras 13-14 indican que el MF-10 no induce una actividad citotóxica en los cultivos de las células CaSki y HeLa; ya que presentan una baja incorporación de IP así como también una baja actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes, sugiriendo que el decremento del número celular observado es debido a un proceso diferente al de muerte necrótica.

Evaluación de de la condensación de la cromatina

Con el fin de establecer si el MF-10 induce muerte apoptótica en las células tumorales cultivos de células CaSki y HeLa fueron estimulados con el MF-10 (50µg/mL) y los cultivos fueron teñidos con el flourocromo DAPI y observados en un microscopio de espifluorescencia para observar las características morfológicas de núcleos apoptóticos (figura 15 y 16).

CONTRASTE DE FASES

DAPI

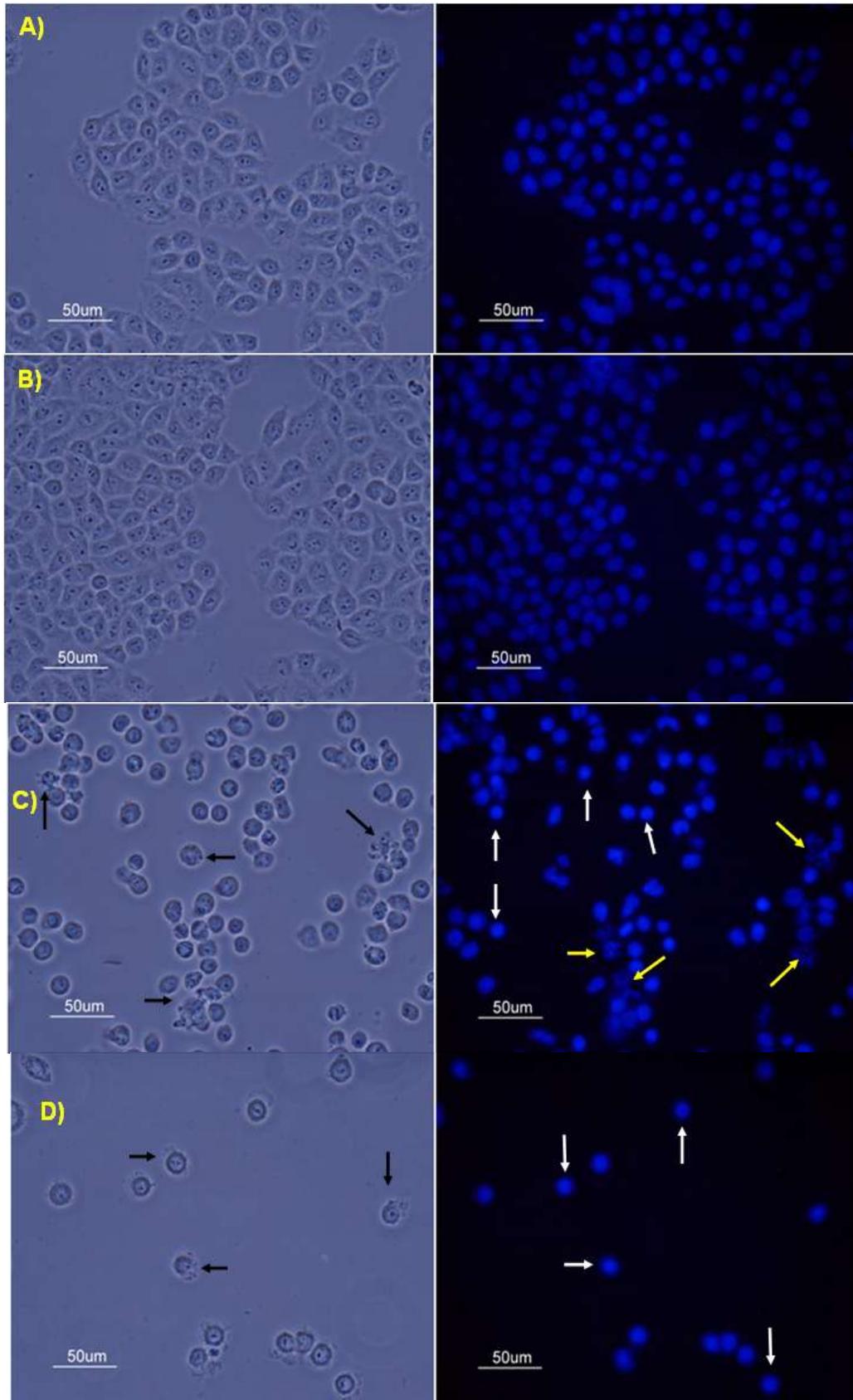


FIGURA 15. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear de células CaSki. A) Control células sin tratamiento con RPMI al 5% de SNT; B) DMSO al 0.5%. (C) MF-10 y (D) Colchicina. Las células fueron observadas en contraste de fases y núcleos teñidos con el fluorocromo DAPI. Flechas blancas: Condensación de Cromatina. Flechas negras: Cuerpos Apoptóticos. Flechas amarillas: Fragmentación Nuclear. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes.

CONTRASTE DE FASES

DAPI

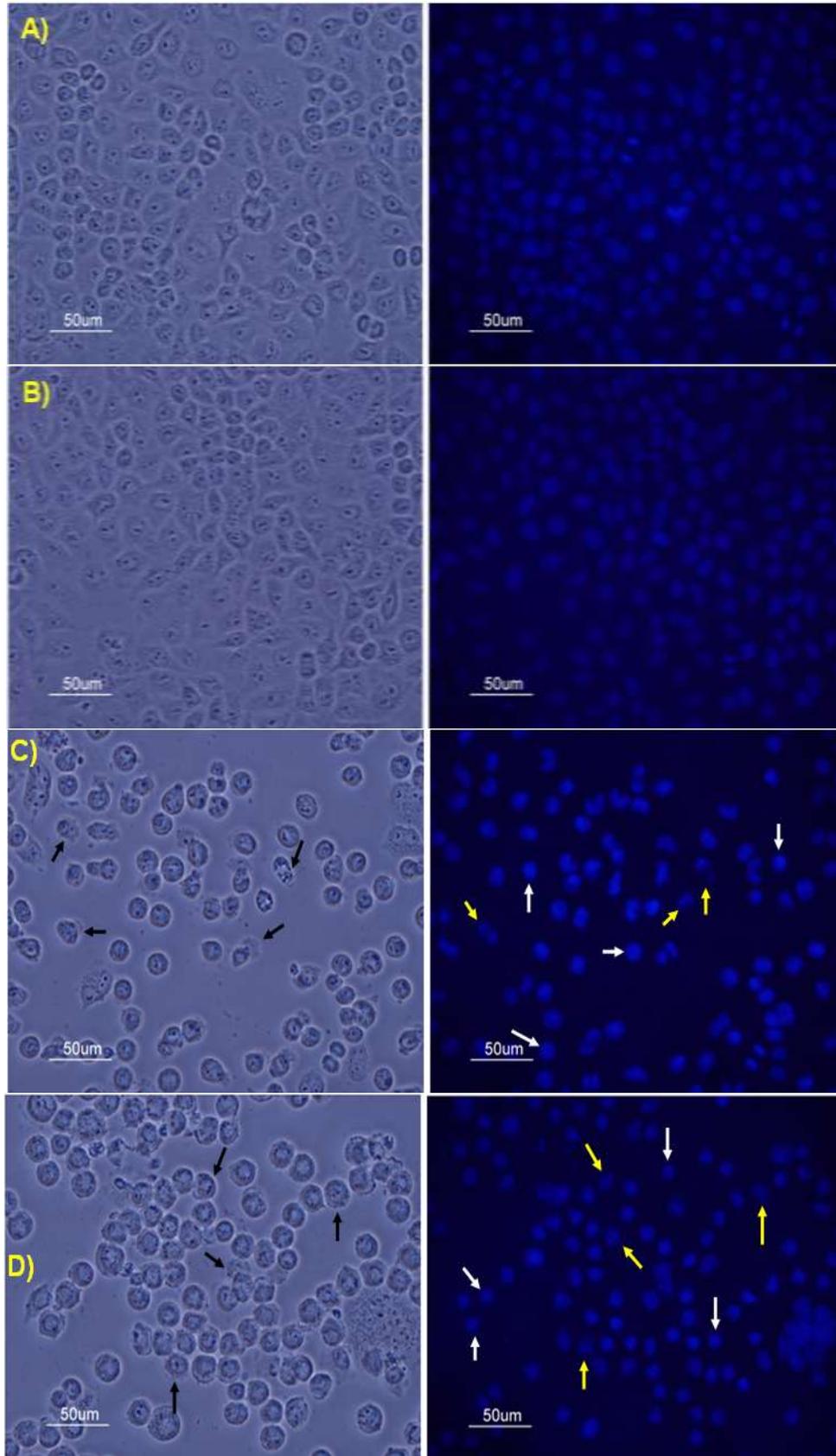


FIGURA 16. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear de células HeLa. A) Control células sin tratamiento con RPMI al 5% de SNT; B) DMSO al 0.5%. (C) MF-10 y (D) Colchicina. Las células fueron observadas en contraste de fases y núcleos teñidos con el fluorocromo DAPI. Flechas blancas: Condensación de Cromatina. Flechas negras: Cuerpos Apoptóticos. Flechas amarillas: Fragmentación Nuclear. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes.

Los resultados obtenidos establecen que los cultivos control y DMSO, observados en contraste de fases, las células presentan una forma poliédrica con citoplasma abundante y con proyecciones citoplasmáticas, mientras que los núcleos observados con DAPI, son de tamaño regular con distribución de la cromatina de manera homogénea. Con respecto a las células tratadas con el MF-10 y la Colchicina, las células tratadas observadas con contraste de fases, mostraron una forma esférica, contraídas, de menor tamaño y con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas, mientras que los núcleos observados con DAPI presentan un tamaño relativamente menor al de los controles, con la cromatina condensada y en algunas células ésta se encuentra fragmentada, indicando que el MF-10 induce una fuerte apoptótica en las células tumorales.

Evaluación de la Caspasa-3 activa

Con el fin de confirmar que la muerte apoptótica inducida por el MF-10 en las células tumorales es llevada a término, cultivos de células CaSki y HeLa fueron estimulados con el MF-10 (50µg/mL) y la caspasa-3 activa fue determinada y tomada como un parámetro de término de la muerte apoptótica (figura 17 y 18).

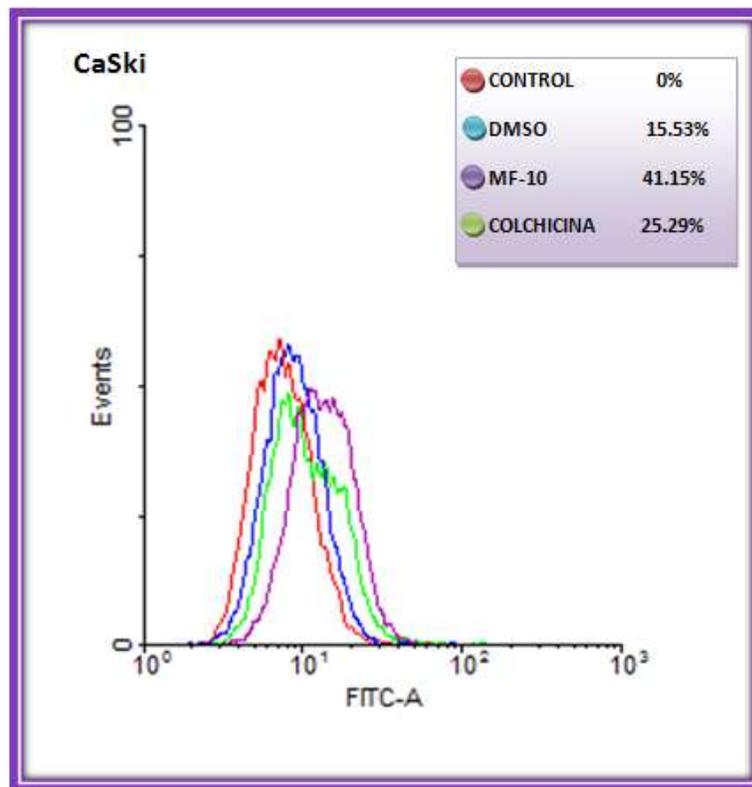


FIGURA 17. Detección de la caspasa-3 activa en la línea de CaCu CaSki tras ser estimuladas con 50 µg/mL de MF-10. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes con al menos tres repeticiones.

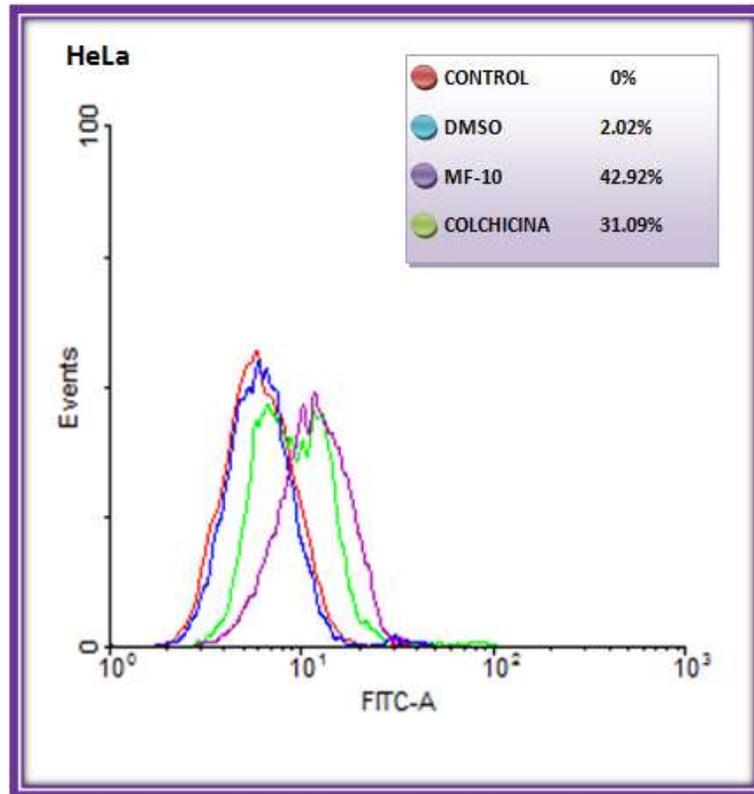


FIGURA 18. Detección de la caspasa-3 activa en la línea de CaCu HeLa tras ser estimulada con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MF-10. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes con al menos tres repeticiones.

Con base en los resultados obtenidos en las figuras 17 y 18 se puede apreciar que los cultivos tratados con MF-10 inducen la expresión de la caspasa-3 activa en un 25.6% en células CaSki, mientras que en células HeLa fue de 40.9% confirmando que el MF-10 induce a las células tumorales una muerte apoptótica.

Evaluación del efecto del MF-10 sobre el potencia proliferativo de células linfocíticas humanas a través de la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CSFE), cuantificada por citometría de flujo.

Con el fin de determinar si el MF-10 afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica humana fueron tratados con 50 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto por 72 h, y el número celular fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, cuantificado por citometría de flujo.

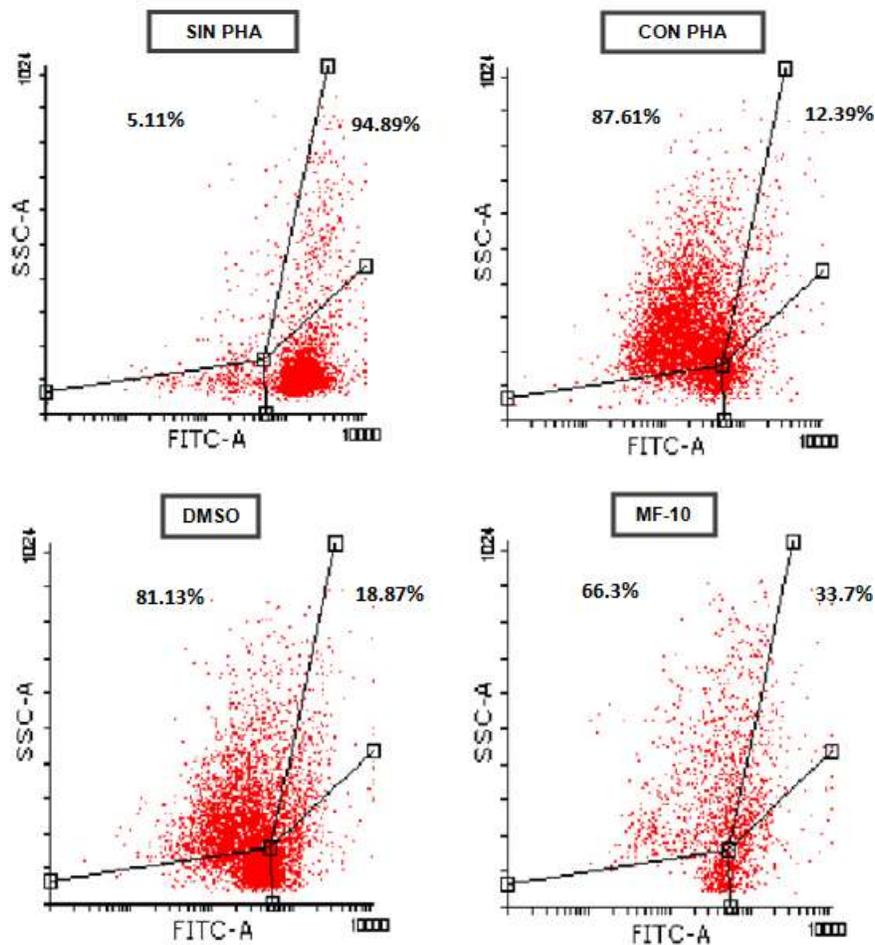


FIGURA 19. Efecto del compuesto MF-10 sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. Los linfocitos fueron marcados con CSFE, activados con PHA y tratados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de MF-10. A las 72h fueron evaluados por citometría de flujo. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes.

Los resultados mostrados en la figura 19, establecen que el MF-10 no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas a 72 h, sugiriendo que esta saponina es de acción selectiva.

Evaluación de la actividad citotóxica del MF-10 a través de la liberación de la enzima LDH en linfocitos humanos de sangre periférica.

Con el fin de establecer si el MF-10 ejerce una actividad citotóxica (necrosis) en las células linfocíticas fueron tratados con el MF-10 (50 µg/mL) y la actividad de la enzima citoplasmática LDH fue determinada en los sobrenadantes de estos cultivos (figura 20).

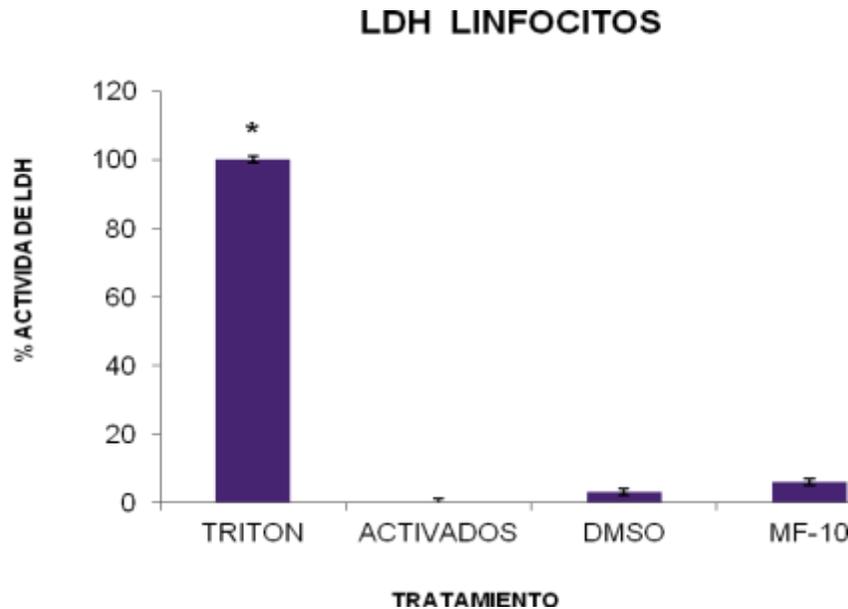


FIGURA 20. Determinación de la actividad citotóxica en cultivos de células linfocíticas (200,000 células por pozo en placas de 96 pozos) estimulados con 50 µg/mL de MF-10 por 72 h, el DMSO se utilizó a una concentración de 5 µL/mL, mientras que el Tritón se utilizó como control positivo con 1% de tritón x-100. La actividad citotóxica fue determinada por la actividad de la enzima LDH recolectado del sobrenadante. La barra indica la DS (desviación estándar) Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes con al menos tres repeticiones.

ANDEVA seguida de una prueba de Tukey (* p<0.05% vs DMSO).

Los resultados mostrados en la figura 20, y al igual que en las células tumorales de CaCu (figura 13), no se detectó LDH en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de células linfocíticas, sugiriendo que el MF-10 no presenta un efecto necrótico en los cultivos de células tumorales ni en células no tumorales.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de de muerte en México y actualmente los tratamientos que se tienen contra este afectan la calidad de vida de los pacientes por lo cual la comunidad científica se ha dado a la tarea de buscar nuevas alternativas que si bien no abatan al 100% la enfermedad mejoren significativamente la calidad de vida de los pacientes. En la actualidad el estudio de los compuestos de origen vegetal ha generado un nuevo campo hacia la quimioprevención y/o tratamientos contra este mal, como es el caso de las saponinas esteroidales.

Las saponinas han generado un fuerte interés científico, debido a su diversidad estructural y a su actividad biológica especialmente como antitumorales. Por lo que, constituyen una importante fuente de productos de origen natural que conducen al desarrollo de novedosos quimioterapéuticos.

Dentro de la familia de las saponinas esteroidales encontramos a la Dioscina (molécula que se encuentra de manera natural en las plantas) (Mirunalini y Shahira; 2011) la cual es una de las saponinas con actividad antiproliferativa más potente evaluados hasta ahora; hecho que ha despertado la inquietud de establecer que parte de la molécula es la causante de la actividad antiproliferativa.

La gran complejidad de las saponinas surge de la variabilidad de la estructura de la aglicona, la posición de unión de los azúcares en la región de la aglicona unidos por un enlace glucosídico, entre otros; pueden influir en la respuesta de la actividad biológica y especialmente en la actividad antitumoral (Podolka et al.; 2010; Trouillas et al.; 2005).

Estudios recientes han mostrado que la fuerte actividad antiproliferativa de las saponinas se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado (Fernández et al.; 2009). Sin embargo, no se deja atrás la posibilidad de que saponinas con similitud estructural a otras que presentan actividad antitumoral también puedan mostrar este efecto (Fernández et al.; 2012).

Con la intención de evaluar la actividad antiproliferativa del MF-10 y ya que existes nula o escasa información sobre éste, fue comparada con la Dioscina (dos ramnosas unidas a una glucosa en el carbono 3); la Diosgenina (aglicona) (sintetizado mediante hidrolisis de la Dioscina) y la Diosgenina-3 glu (sintetizada a partir de la Diosgenina, adición de una glucosa en el carbono 3) (Tabla 2); cuya actividad antiproliferativa ya ha sido estudiada y

presenten la misma aglicona (Cai et al.; 2002; Fernández et al.; 2010; Lepage et al.; 2011; Son et al.; 2007).

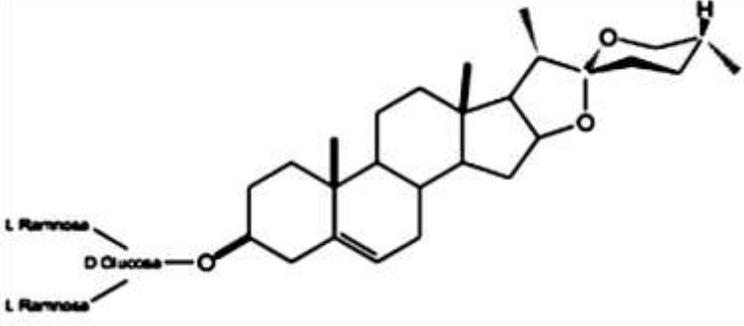
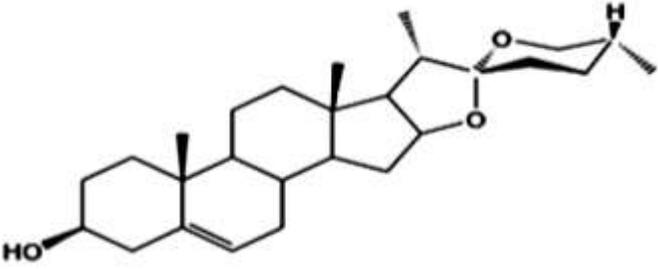
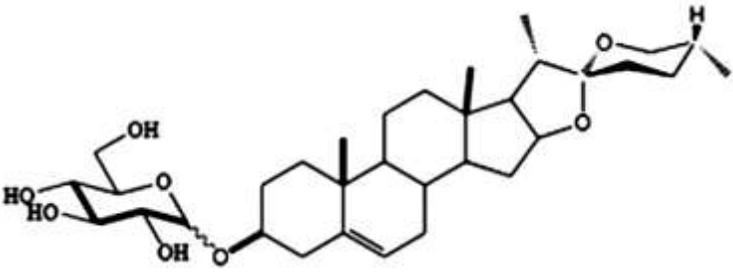
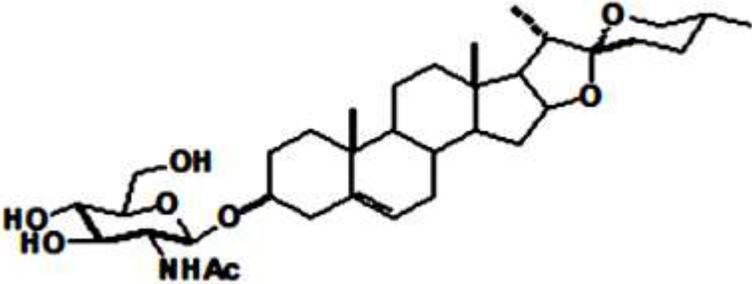
	Dioscina
	Diosgenina
	Diosgenina-3 glu
	MF-10

Tabla 2. Estructura química de la Dioscina, Diosgenina, Diosgenina-3 glu y MF-10 (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Con respecto a la actividad antiproliferativa, nuestros resultados mostraron que el compuesto 2-deoxi-2-acetamido- β -d-glucopiranosido de Diosgenilo (MF-10) presenta actividad antiproliferativa en células HeLa y CaSki de manera dependiente de la dosis, con una CI_{50} de 50 μ g/mL para ambas líneas celulares, indicando que el MF-10 conserva la actividad antiproliferativa de las saponinas. Sin embargo, los resultados muestran que el MF-10 es menos potente que la Dioscina, Diosgenina y la Diosgenina-3 glu (López; 2013) (Tabla 3). Es decir, se requiere mayor cantidad del compuesto MF-10 para realizar la misma actividad antiproliferativa que la Dioscina, la Diosgenina o la Diosgenina-3-glu. Desde el punto de vista estructural; la Dioscina presenta dos ramnosas unidas a la glucosa del carbono 3 de la aglicona con una mayor actividad antiproliferativa en células tumorales en comparación con la Diosgenina, la Diosgenina-3-glu y el MF-10, sugiriendo que éstas son las que incrementan la actividad antiproliferativa. Con respecto a la Diosgenina, ésta no presenta ningún azúcar unido a la aglicona, indicando que este compuesto tiene una actividad antiproliferativa basal y que los azúcares pueden modificar de manera positiva o negativa dicha actividad. En cuanto a la Diosgenina-3 glu, la glucosa en el carbono tres de la aglicona incrementó el potencial proliferativo en aproximadamente 1.7 veces en comparación con la Diosgenina, sugiriendo que la glucosa unida en el carbono 3 de la aglicona es importante para la actividad antiproliferativa presente en la molécula. Con respecto al MF-10, éste presenta la misma estructura que la Diosgenina-3-glu, y la diferencia, es que la glucosa presente en el MF-10 presenta una amina acetilada (NHAc), sustituyendo el grupo hidroxilo de la glucosa presente en la diosgenina-3-glu. Esta diferencia provoca un decremento en la actividad antiproliferativa de 2 veces en la Diosgenina-3-glu, sugiriendo que el grupo funcional NHAc afecta negativamente la actividad antiproliferativa presente en esta molécula.

CONCENTRACION INHIBITORIA DEL 50% EN LÍNEAS DE CaCu			
COMPUESTO	CaSki	HeLa	vs MF-10
Dioscina	1.74 μ g/ml	1.74 μ g/mL	29 veces
Diosgenina	13 μ g/mL	15 μ g/mL	3 a 4 veces
Diosgenina-3 glu	22.56 μ g/mL	24.85 μ g/mL	2 veces
MF-10	50 μg/mL	50 μg/mL	-----

Tabla 3. CI_{50} de Dioscina, Diosgenina, Diosgenina-3 glu en comparación de la CI_{50} obtenida del MF-10.

Con respecto a la actividad citotóxica (necrótica) de estos compuestos, es importante mencionar que nuestros resultados indican que el MF-10 genera una baja toxicidad (menor al 5%) tanto en líneas de CaCu CaSki y HeLa así como en linfocitos de sangre periférica humana (células no tumorales), similar a la toxicidad presente en la Diosgenina-3-glu, sugiriendo que la glucosa con una amina acetilada no afecta la actividad citotóxica del MF-10. Sin embargo, al comparar esta actividad con la actividad citotóxica presente en la Dioscina y la Diosgenina, las cuales presenta una actividad citotóxica en las células HeLa y CaSki de 6 y 17 % para la Dioscina respectivamente y de 0 y 10% para la Diosgenina, sugiere que la glucosa con y sin la amida acetilada induce un pequeño decremento en la actividad citotóxica presente en la Dioscina y la Diosgenina. En cuanto a la actividad inductora de apoptosis, las saponinas en diferentes trabajos de investigación han sido descritas que inhiben la proliferación de células malignas *in vitro*, a través de la muerte celular apoptótica (Raju y Bird; 2007; Huo et al.; 2004; Tang et al.; 2007; Liu et al.; 2004; Liu et al.; 2005). Trouillas et al.; 2005 reportó que la Diosgenina y la Dioscina inducen una muerte apoptótica generando la fragmentación de ADN a las 24 h. Resultados que coinciden con los obtenidos para el MF-10. Este compuesto al igual que la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu inducen a las células CasKi y HeLa a presentar características morfológicas propias de células apoptóticas (Paniagua et al.; 2007); de igual manera el MF-10 induce una sobre expresión de la caspasa-3 activa al igual que la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3 glu, indicando que la actividad apoptótica de estas moléculas es conservada. Sin embargo, cuando comparamos la actividad apoptótica de la diosgenina, tomando como parámetros la formación de cuerpos apoptóticos, la fragmentación del ADN así como la expresión de la caspasa -3 activa, encontramos que la Diosgenina es la que presenta menor cantidad de caspasa-3 activa, escasos cuerpos apoptóticos y nula fragmentación del ADN, mientras que la Diosgenina-3-glu presentan un mayor porcentaje de la caspasa-3 activa con un mayor número de cuerpos apoptóticos y fragmentación de ADN. En cuanto al MF-10, éste fue el de mayor expresión en la caspasa-3 activa, con mayor número de cuerpos apoptóticos y mayor fragmentación de ADN, sugiriendo que la glucosa con la amina acetilada presente en el MF-10 es importante para inducir el proceso apoptótico.

Con respecto a la actividad en células no tumorales, nuestros resultados muestran que el MF-10 así como la Dioscina, la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu presentan baja actividad necrótica (citotóxica) en células linfocíticas humanas así como en las células tumorales de

cáncer cervicouterino, sugiriendo que los efectos colaterales relacionados directamente con la actividad necrótica (citotóxica) podrían ser de menor magnitud que junto con el bajo efecto antiproliferativo que presentan en células linfocíticas (selectividad) establecen que el MF-10 presenta actividad antiproliferativa en células tumorales y no tumorales sin presentar efecto citotóxico (necrosis), induciendo a las células tumorales una muerte apoptótica; lo que sugiere que el MF-10 es un candidato idóneo para seguir su evaluación *in vivo*, con la intención de valorar su potencial terapéutico como posible agente contra el cáncer.

CONCLUSIONES

- ❖ El compuesto MF-10 presenta actividad antiproliferativa en células tumorales CaSki y HeLa con una CI_{50} de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambas líneas.
- ❖ La CI_{50} no presenta un efecto necrótico en las líneas tumorales CaSki y HeLa.
- ❖ El MF-10 induce la expresión de caspas 3 activa en ambas líneas celulares (CaSki y HeLa).
- ❖ El compuesto (MF-10) induce una muerte apoptótica en las líneas celulares CaSki y HeLa a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- ❖ El MF-10 afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas no tumorales en un 16% a las 72h, sin acción citotóxica.
- ❖ Esto sugiere que el compuesto 2-deoxi-2-acetamido- β -d-glicopiranosido de Diosgenilo presenta una acción selectiva, de tal manera este compuesto podría ser evaluado como un agente con potencial terapéutico.

REFERENCIAS

- ❖ ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. (2008). *Biología Molecular de la Célula*. Quinta edición. Barcelona. Omega. pp. 1728.
- ❖ ANAYA L. (2003). *Ecología Química*. Primera Edición; UNAM, Plaza y Valdes editores. México. pp.53-59.
- ❖ ALLIANCE FOR CERVICAL CANCER PREVENTION. (2004). *La prevención del cáncer cervical a nivel mundial*. Population Reference Bureau.
- ❖ BORNER C. (2003). *The Bcl-2 protein family: sensor and checkpoints for life-or-death decisios*. Molecular Immunology. 39: 615-647.
- ❖ BOSCH F.; LORINCZ A.; MUÑOZ N.; MEIJER C.; SHAH K. (2002). *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. Journal of Clinical Pathology. 55 (4): 244-265.
- ❖ CAI J., LIU M., WANG Z., JU Y. (2002). *Apoptosis induced by Dioscin in HeLa cells*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 25 (2): 193-196.
- ❖ CHUN-TE L., TZONG-DER W., SHANG-JIE T., JEN-KUM L. (2007). *Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in her-overexpressing breast cancer cells through modulatingr-akt, m tor and jnk phosphorylation*. Federation of European Biochemical Societies Letters. 581 (30): 5735-5742.
- ❖ 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. Y JUN S.K. (2003). *Early Lymphopenia as a*

Risk Factor for Chemotherapy-Induced Febrile Neutropenia, American Journal Hematology. 73 (4): 263-266.

- ❖ COOPER M.; HAUSMAN R. (2007). The cell: A molecular Approach. Cuarta edición. Editorial Marbán. pp. 41, 591-614, 631-663.
- ❖ CULTEK (2015). Grupo Cultek S.L. Madrid. Consulta Noviembre 2015. http://www.cultek.com/otros/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2002.pdf
- ❖ DUARTE E.; FRANCO E. (2004). Cancer of the Uterine Cervix. BioMed Central Women's Health. 4 (1): 13.
- ❖ ELINOS C. M.; MALDONADO V.; MELÉNDEZ J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Gaceta Médica de México. 139 (5): 493 - 499.
- ❖ FERNANDEZ M. (2010). Síntesis de Derivados Esteroidales con actividad biológica: Anticancerígenos y Promotores del crecimiento Vegetal. Benemérita Universidad de Puebla México. pp.322
- ❖ FERNANDEZ M.; SANDOVAL J.; LÓPEZ H.; SÁNCHEZ L. (2009). Formation of the steroidal 3^β-hydroxy-6-oxo-moiety: Synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin. Arkivoc. 13: 170-184.
- ❖ FERNÁNDEZ M.; MOHAN S.; LÓPEZ H.; HERNÁNDEZ J.; PÉREZ E.; ESCOBAR M.; SÁNCHEZ L.; REGLA L.; PINTO M.; SANDOVAL J. (2010). Synthesis of steroidal glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-12, 22-dioxo-5 α -cholestan-26-yl β -D- glucopyranoside and its anti-cancer properties on cervicouterino HeLa, CaSki and ViBo cells. European Journal of Medicinal Chemistry. 46: 3877-3886.
- ❖ FERNÁNDEZ M., LÓPEZ H.; HERNÁNDEZ J.; LÓPEZ M.; SANKAR M.; ESCOBAR M.; SÁNCHEZ L.; PINTO M.; SANDOVAL J. (2011). Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 β , 16 β -diacetoxy-22-oxocholest-5-en-

26-yl β -d glucopiranosido: A selective anticancer agent in cervicouterino cell lines.

Europal Journal of Medicinal Chemistry. 46 (9): 3877-3886.

- ❖ FERNÁNDEZ M...; LOPEZ H.; HERNÁNDEZ J.; SÁNCHEZ L.; ESCOBAR M.L.; PINTO B.; SANDOVAL J. (2012). Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates. Europal Journal of Medicinal Chemistry. Elsevier. 54: 721-727.
- ❖ GUSTAVO A. (2002). Mecanismo de muerte celular: Apoptosis y Necrosis. Revista Argentina de Anestesiología. 60 (6): 391-401.
- ❖ HIDALGO M. A. (2006). El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. Revista Biomedica.17:81-84.
- ❖ HONG-JI Q., JYUNICHI K., KEN H., XING-RI C., YASUNORI I., SEIICHI K., FUSAO K., Y SETSUO S. (2006). Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with Various Nucleophiles and Pharmacological Activities of the Products. Chemical and Pharmaceutical. Bulletin. 54 (1): 72-79.
- ❖ HUO R., ZHOU Q., WANG B., TASHIRO S., ONODERA S. Y IKEJIMA T. (2004). Diosgenin Induced apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. Acta Pharmacológica. 25 (8): 1077-1082.
- ❖ CONSULTA DE LA PÁGINA INSTITUTO NACIONAL DE CANCER 2016 (INC).
- ❖ INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA 2013 (INEGI). Estadísticas a propósitos del día mundial contra el cáncer.
- ❖ JORDÁN J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. Bioquímica, OFFARM. 22 (6): 100-106.
- ❖ KLEIN S., McCORMICK F. Y LEVITZKI A. (2005). Killing time for cancer cells. Nature review, Cáncer. 5 (7): 573-580.

- ❖ KLUG W.S., CUMMINGS M.R., SPENCER C.A. (2006). Conceptos de Genética. Octava Edición. Prentice Hall. Madrid. pp.920.
- ❖ KUENG W.; SILBER E.; EPPENBERG U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. Analytical Biochemistry. 182 (1): 16-19.
- ❖ KUMAR V.; ABBAS A.; FAUSTO N.; MITCHELL R. (2008). Patología humana. Octava edición, Elsevier. pp. 1-31.
- ❖ LACRUZ P. (2003). Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolaou a Bethesda 2001). Revista Española de Patología. 36 (1): 5-10.
- ❖ LEYVA E.; NAVARRO G.; LOREDO S.J.; SANTOS MA. (2011). Bosintesis y actividad biológica de fitoestrogenos y fitoesteroides. Boletín de la Sociedad Química de México. 5(2,3): 35-43.
- ❖ LEPAGE C., LÉGER D., BERTRAND J., MARTIN F., BENEYTOUT J., LIAGREB. (2011). Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. Cancer Letters. 301 (2): 193-202.
- ❖ LI J., LIU X., GUO M., LIU Y., LIU S., YAO S. (2005). Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of Diosgenin. Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. 21(5): 561-564.
- ❖ LIAO J. (2006). Viruses and Human Cancer. Yale Journal of Biology and Medicine. 79 (3-4):115-122.
- ❖ LIU M., WANG Z., JU Y., ZHOU J., WANG Y. Y WONG R. (2004). The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponin on Human Leukemia Cell Line. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27 (7): 1059-1065.
- ❖ LIU M., YONG Z., WONG R. Y WU Q. (2005). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. Cancer Chemotherapy Pharmacology. 55 (1): 79-90.

- ❖ LODISH H. ; BERK A. ; MATSUDAIRA P. ; KAISER C. A. ; KRIEGER M. ; SCOTT M. P. ; LAWRENCE S. ; DARNELL J. (2005). Molecular Cell Biology. Quinta edición. Buenos Aires. Medica Panamericana. pp. 973.
- ❖ LÓPEZ M. (2013). Efecto antitumoral de los derivados Sapogenínicos provenientes de la Diosgenina. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, FES-ZARAGOZA, México.
- ❖ LOPEZ A.; LIZANO M.; (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La Historia que no termina. Cancerología. 1: 31-55.
- ❖ MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ P.; ORTEGA, D. I.; PÉREZ, C. A.; SÁNCHEZ, V.A.; LÓPEZ, B. J.; DE LA TORRE, A. I. (2010). Análisis de los principales factores de riesgo relacionados con el cáncer cérvico uterino en mujeres menores de 30 años. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. 36(1): 52-65.
- ❖ MIRUNALINI S. Y SHAHIRA. (2011). Novel effects of Diosgenina: a plant derived steroids. Pharmacology online.1:726-736.
- ❖ MONROY G.; RANGEL C.; ROCHA Z.; TREJO B.; RAMÍREZ G.; MARTÍNEZ R.; WEISS B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. Revista Mexicana de Oncología. 7: 69-76.
- ❖ MORGAN S.J.; DARLING D.C. (1993). Cultivo de las células animales. Editorial Acriba. España.
- ❖ NARULA A.; KUMAR S.; SRIVASTA P. (2007). Genetic fidelity of in vitro regeneration, encapsulation of shoot tips and high Diosgenin content in Dioscorea bulbifera L., a potential alternative source of diosgenin. Biotechnology Letters. 29(4): 623-629.

- ❖ NAKASHIMA N., KIMURA I., KIMURA M., MATSURA H. (2003). Isolation of pseudiprototimosaponin AIII from rizomes of Anemarrhena asphodeloides and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice. Journal Natural Products. 56 (3): 345-350.
- ❖ NELSON D. Y COX M. (2005). Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta Edición. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 511.
- ❖ CONSULTA DE LA PÁGINA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2015 (OMS).
- ❖ CONSULTA DE LA PÁGINA ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2012 (OPS).
- ❖ PANIAGUA R., NISTAL M., SESMA P., ALVAREZ P., ANÁDON R., SÁEZ F. (2007). Biología celular. Mc Graw Hill. Tercera Edición. Madrid. pp. 390.
- ❖ PODOLKA I., GALANTY A., Y SOBOLEWSKA D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. Phytochemistry Review. 9 (3): 425-474.
- ❖ RAJU J. Y 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 Letters. 255 (2): 194-204.
- ❖ ROMO A. (2006). Química de la flora Mexicana. Investigaciones en el instituto de Química. UNAM. Primera edición. México. pp. 141- 160.
- ❖ ROSS M., WOJCIECH P. (2007). Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición. Buenos aires. pp.992.
- ❖ SÁNCHEZ L. (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. Revista Técnica Pecuaria en México. 41 (1): 49-62.

- ❖ SÁNCHEZ R.; ARBOLEDA G. (2008). Mitocondria y muerte celular. NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 6: 190-200.
- ❖ SCHAEPFER L., MENDOZA J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 41 (4): 18-27.
- ❖ SERMAN, F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia Natural y rol del virus papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. 67(4): 318-323
- ❖ SON I., KIM J., SOHN H., SON K., KWON C. (2007). Antioxidative and Hypolipidemic effects of Diosgenin, and Steroidal saponins on Yam (Dioscorea ssp.) on High-Cholesterol Fed Rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 71 (12): 3063-3071.
- ❖ TANG P., MAMDANI F., HU X., LIU J. Y YU B. (2007). Synthesis of OSW saponin analogs with modified sugar residues and their antiproliferative activities. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 17 (4): 1003-1007.
- ❖ TAPONDJOU L., PONOU K., TEPONNO R., MBIANTCHA M., DJOUKENG J., NGUELEFACK T., WATCHO P., GOMEZ A., PARK H. (2008). In vivo anti-inflammatory effect of saponins and its derivatives isolated from Dracaena manii. Archives of Pharmacal Research. 31: 653-658.
- ❖ TOLANEY S.M., NAJITA J., WINER E.P. Y BURSTEIN H.J. (2008). Lymphopenia Associated whit Adjuvant Antracycline/Taxane Regimens. Clinical Breast Cancer. 8 (4): 352-356.
- ❖ 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 closer to Diosgenina. Bioorganic and Medical Chemistry. 13 (4): 1141-1149.

- ❖ VÁZQUEZ-ORTÍZ G, PIÑA-SANCHEZ P, HIDALGO A, LAZOS M, MORENO J, ALVARADO I, CRUZ F, HERNÁNDEZ D., PÉREZ-PLASCENCIA C, SALCEDO M. (2005). *Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados*. Revista de Investigación Clínica. 57 (3): 434-441.
- ❖ WANG Z., ZHOU J., ZHANG H., LIU M., LI X. (2001). *Effects of two saponins extracted from the Polygonatum Zalanscinense pampon on the human leukemia (HL-60) cells*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 24(2): 159-162.
- ❖ WAYNE MB, KLEINSMITH LJ, HARDIN J. (2007). *El mundo de la célula*. Sexta edición. Pearson Educación S.A. Madrid. pp. 970.
- ❖ WILLIAMS J., GONG H. (2007). *Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavorinins*. Lipidis. 42 (1): 77-86.
- ❖ ZIEGLER D.S. Y KUNG A.L. (2008). *Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer*. Current Opinion in Oncology. 20 (1): 97-103.

FUENTES ELECTRONICAS

- ❖ ETAPAS DE LA PROGRESION DEL CICLO CELULAR (Imagen tomada de <https://sites.google.com/site/elcanerygenes/ciclo-celular-y-cancer>).
- ❖ PROCESO DE APOPTOSIS (Imagen tomada y modificada de <http://thumbs.dreamstime.com/z/apoptosis-45763884.jpg>).
- ❖ ETAPAS DE PROGRESIÓN EN EL DESARROLLO DE CÁNCER EN EL EPITELIO (imagen tomada y modificada de <https://diariodeunamamifera.files.wordpress.com/2013/08/evolcuic3b3n-cc3a1ncerde-cc3a9rvix.jpg>).
- ❖ ANATOMÍA DEL ÚTERO, EL CÉRVIX O CUELLO UTERINO Y OTRAS PARTES DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA MUJER. ASÍ COMO SU LOCALIZACIÓN (imagen tomada y modificada de www.cancer.gov).
- ❖ ESTADIOS DEL CÁNCER CERVICOUTERINO (Imagen tomada de <http://www.segundomedico.com/wp-content/uploads/2015/09/tratamiento-cancer-cervicouterino-vph.jpg>
- ❖ PROGRESIÓN GRADUAL POR ETAPAS INTRAEPITELIALES (Cáncer Cervicouterino) (Imagen Tomada De http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n1/fig_tab/nrc700_F1.html).

APÉNDICE*Medio de cultivo RPMI-1640*

RPMI-1640 (GIBCO, USA)	10.42g
NaHCO ₂ (SIGMA, USA)	2g

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 (SNT), 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 (SNT) 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 1000mL de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (SIGMA, USA)	8.00g
Cloruro de potasio (SIGMA, USA)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA)	0.20g

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

Verseno

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales CaSki y HeLa adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

EDTA (SIGMA, USA)	0.4g
Cloruro de Sodio (SIGMA, USA)	8.0g
Cloruro de Potasio (SIGMA, USA)	0.4g
Tris base (SIGMA, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800mL de agua bidestilada, se ajusta el 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 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.

Hidróxido de Sodio (SIGMA, USA)	3.96g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA)	4.28MI
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	1g

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 aforado 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 (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.