



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

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.

**Efecto antitumoral de los compuestos 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-
diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona en las líneas celulares
provenientes de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

PRESENTA:

MARTHA GUADALUPE ROSAS VILICAÑA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ
VÁZQUEZ

CD DE MÉXICO

AGOSTO 2017



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 ROSAS VILICAÑA MARTHA GUADALUPE, con número de cuenta 099001746, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día 23 de agosto de 2017 a las 11:00 hrs., para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

VOCAL M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE BIOL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

SUPLENTE Dr. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto antitumoral de los compuestos 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona en las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y VIBo.**

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 26 de junio de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VÍBO
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Dedicatorias

A mis padres por ser los pilares y formadores de mi vida.

A mi hermana Elene por ser el ángel que me acompaña siempre.

A Rosy y Ely por ese gran amor de hermanas y sus apoyo incondicional.

A mis hermanos Luis y Ray por su apoyo y ejemplo de superación.

A Carlos por enseñarme que la vida puede ser un breve instante.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por todo el conocimiento brindado, apoyo y el tiempo dedicado. Por ser un excelente profesor y una persona con valores de humanidad extraordinarios. Muchas gracias.

A la Dr. María Luisa Escobar Sánchez y al Dr. Hugo López Muñoz por sus conocimientos compartidos y su apoyo técnico y experimental, invitando constantemente a la superación profesional. Muchas gracias.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por su paciencia y tiempo dedicado en este trabajo, siempre con una gran vocación como profesor siendo una fuente de inspiración académica. Muchas gracias

Al M. en C. Eduardo Pavel Hernández Cortés por el comprensión, tiempo y esfuerzo, además de la confianza y el empuje que has sembrado en mí para seguir adelante, por ser un guía, un gran compañero y estupendo amigo a lo largo de este viaje académico y por haber transformado mi vida en todo sentido. Te amo. Muchas gracias

A los miembros del jurado:

M. en C. Reynalda Roldan Pérez

Dr. Luis Sánchez Sánchez,

Dr. Hugo López Muñoz,

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez,

Dr. Edgar Ledesma Martínez,

por sus comentarios y aportaciones valiosas en este trabajo.

A mis amigos: Vero, Yery, Pavel, Carlos por las bellas y divertidas aventuras. Muchas Gracias.

Este proyecto fue realiza con el apoyo de CONACYT (proyecto No. 255881) y (proyecto No.253979), y con el apoyo de PAPIME (proyecto No. IN220916)

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Abreviaturas	2
Marco teórico	4
Cáncer	4
Cáncer Cérvico-Uterino	6
Virus del Papiloma Humano	9
Diagnóstico	12
Tratamientos	13
Esteroides	15
Ciclo celular	16
Muerte celular.....	18
Apoptosis	19
Planteamiento del problema	21
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares.....	23
Método	24
Resultados	35
Discusión	52
Conclusiones	56
Referencias	57

RESUMEN

Cáncer Cérvico-Uterino representa un problema de salud a nivel nacional ya que ocupa el segundo lugar en causa de muertes en mujeres mexicanas[8]. Los fármacos utilizados en el tratamiento de este padecimiento no son eficaces en estadios avanzados de este cáncer, además conllevan efectos secundarios que merman la calidad de vida de las pacientes, por lo que urge la investigación de nuevos compuestos que generen una actividad antitumoral, con el menor efecto secundario. En el presente estudio se muestra la actividad antitumoral de los compuestos 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona sobre las líneas celulares provenientes de Cáncer Cérvico-Uterino: CaSki, HeLa y ViBo. Se determinó que las concentraciones para abatir el 50 % del número celular en cultivo de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo son de 20 y 25 $\mu\text{g/ml}$ para 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona y de 50 y 175 $\mu\text{g/ml}$ para (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona.

Al analizar el ciclo celular de las células CaSki, HeLa y ViBo, se determinó que únicamente 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona induce una disminución de células presentes en la fase G1. Los cambios morfológicos observados en cultivo dieron el indicio de la presencia de muerte celular apoptótica, lo cual fue corroborado al observar la presencia de cuerpos apoptóticos, condensación y fragmentación nuclear, la presencia de caspasa 3 activa y la fragmentación del ADN. También se identificó muerte celular necrótica únicamente en las células ViBo tratadas con 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona y en células HeLa tratadas con (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona. Se determinó que 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ afecta la proliferación de células linfocíticas humanas, al igual que (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona a una concentración de 170 $\mu\text{g/ml}$, siendo positivas a muerte necrótica hasta en un 7%; los cultivos de células fibroblásticas provenientes de cérvix se ven afectados cuando son tratadas con (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona, sin embargo proliferan de manera normal cuando son tratadas con 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona. Los resultados obtenidos indican que estos compuestos son candidatos a seguir su valoración tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar su mecanismo de acción y su actividad antitumoral respectivamente.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2n	Células diploides
4n	Células tetraploides
16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona	Epoxipregnenodiona
(25R)-espirost-4-eno-3,6-diona	Espirostenodiana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
Bad	Proteína miembro de la familia Bcl-2, con actividad proapoptótica
Bax	Proteína miembro de la familia Bcl-2, con actividad proapoptótica
CFSE	Carboxifluoresceína
CaCu	Cáncer cervicouterino
CaSki	Línea celular de CaCu con secuencias integradas de HPV-16
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
EDTA	El ácido etilendiaminotetraacético
FH	Fitohemaglutinina
HeLa	Línea celular de CaCu con secuencias integradas de HPV-18
IC50	Inhibición del 50% de la población celular
LDH	Enzima Deshidrogenasa de Lactato
NIC I	Neoplasia Intraepitelial cervical grado I
NIC II	Neoplasia Intraepitelial cervical grado II
NIC III	Neoplasia Intraepitelial cervical grado III
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAP	Papanicolaou
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPMI	Medio de cultivo RPMI-1640
SFB	Suero fetal bovino

Sida	Síndrome de inmunodeficiencia humana
SNT	Suero de ternera neonato
ViBo	Línea celular de CaCu negativa a HPV
VHB	Hepatitis B
VHC	Hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus de Papiloma Humano
Δ 4-en-3,6-diona	Sistema de las dos cetonas conjugadas

MARCO TEÓRICO

Cáncer

El cáncer es producido por cambios genéticos que alteran varias propiedades fundamentales de la célula, como el de evadir los controles de crecimiento normal, adquiriendo un impulso para proliferar sin la necesidad de una señal inductora externa, además no logra recibir las señales que restringen la división celular y continua dividiéndose cuando debería morir y a menudo cambian sus propiedades de adhesión a las células circundantes o a la matriz extracelular para dividirse más rápidamente, alterando así la homeostasis propia del organismo.

Una célula cancerosa necesita acumular más mutaciones de las que se generan a la velocidad de una mutación normal, e incluso estas células pueden hasta cierto punto, asemejarse a un tipo particular de célula normal de división rápida, pero ella y su progenie exhiben una inmortalidad inapropiada, lo cual puede llegar a formar tumores, mediante la señalización que induce el crecimiento de vasos sanguíneos se alcanza la irrigación adecuada (angiogénesis) para que dicho tumor y posteriormente un cáncer tenga suficientes nutrientes[1].

Esta enfermedad de origen multifactorial, degenerativa es invasiva y mortal, la cual representa la expresión clónica de una célula en la que se ha producido un cambio en su ADN transformando una célula normal a maligna originando una neoplasia constituida por una masa anormal de células cuyo crecimiento se lleva a cabo sin la coordinación morfológica respecto a las células normales[2] (figura 1).

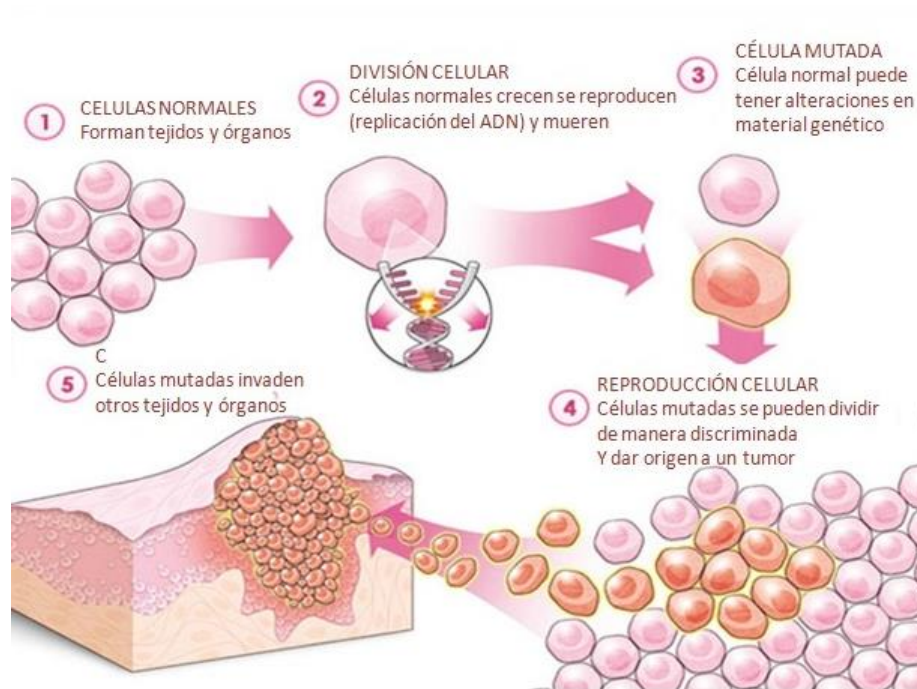


Figura 1: Comportamiento de células normales hasta la formación del cáncer. [3]

La célula debe ser genéticamente inestable antes de que se puedan acumular las mutaciones suficientes para causar cáncer. Esta acumulación de alteraciones genéticas son inducidas por factores intra, extra e intermoleculares (físicos, químicos o biológicos)[4] perdiendo así la homeostasis propia de la célula. Generando una población heterogénea con características genotípicas y fenotípicas distintas a las células de origen. La inestabilidad genética surge como frecuencia a partir de mutaciones que alteran la capacidad de la ruta p53 para desencadenar la destrucción de células genéticamente dañadas[5].

Dependiendo de la génesis de estas mutaciones, es decir, del tipo de celular del tejido y donde se originan, dependerá el tipo y la frecuencia del cáncer. Entre las neoplasias más frecuentes se encuentran los carcinomas (células de origen epitelial) reportándose en la literatura que cerca del 90% de los cánceres humanos son de esta naturaleza, quizás por ser la zona de mayor proliferación celular, o porque se exponen con mayor frecuencia a las variables formas de daño físico, químico o biológico que favorecen el desarrollo de un cáncer, por ejemplo, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma de tejidos como cervix, mama, pene, etc[6].

La OMS identifica a los cánceres que más muertes causan en la población adulta son de pulmón, estómago, hígado, colon, mama y Cérvico-Uterino; además de los cánceres originados por agentes virales hepatitis B (VHB) y C (VHC) o virus del papiloma humano (VPH), que causan aproximadamente 20 % de las muertes en el mundo[7].

Entre las mujeres jóvenes (de 20 a 29 años), la tasa de morbilidad hospitalaria por tumores más alta corresponde al cáncer de órganos genitales femeninos (10.76); para las mujeres de 30 a 74 años, al cáncer de mama, el cual se va incrementando con la edad [8].

Cáncer Cérvico-Uterino

Según el registro histopatológico de neoplasias de México, el Cáncer Cérvico-Uterino corresponde al 15.5 % de las neoplasias y ocupa el segundo lugar en frecuencia en la población femenina, lo que representa un gran problema de salud pública[9].

La evidencia científica acumulada a partir de estudios virológicos, moleculares clínicos y epidemiológicos han permitido demostrar que el Cáncer Cérvico-Uterino es, en realidad, una secuela a largo plazo de una infección persistente por ciertos genotipos del VPH, un virus de transmisión primordialmente sexual. De esta manera, se puede afirmar que el Cáncer Cérvico-Uterino es el resultado final de una larga evolución de cambios en el epitelio cervical ocasionado por una enfermedad venérea no resuelta[10, 11].

Esta larga evolución de cambios en el epitelio cervical (displasia) empieza con una lesión inicial de neoplasia intraepitelial y para que evolucione a carcinoma invasor pueden transcurrir hasta 15 años y el paso de un estadio a otro es de 4 años aproximadamente, lo cual ofrece un periodo de tiempo muy valioso para poder identificar la enfermedad siendo en un inicio completamente curable. Lamentablemente, en la mayoría de los casos cuando se ha detectado un carcinoma, éste ya invadió otros tejidos e incluso ha llegado a órganos distantes, es decir ya hizo metástasis[12].

Esta enfermedad se encuentra dividida en diferentes eventos tisulares: inicia como neoplasia intraepitelial cervical de primer grado(NIC I), evoluciona a NIC II y NIC III, sustituyendo células normales del estrato basal y parabasal, progresando hacia los estratos medios y finalmente cubriendo el último tercio superior del epitelio estratificado. Una vez que estas células de proliferación descontrolada han sustituido a las células normales y diferenciadas del epitelio, en todos los estratos del tejido, pero sin rebasar las barreras propias de éste, se tiene un carcinoma *in situ*[9] (figura 2).

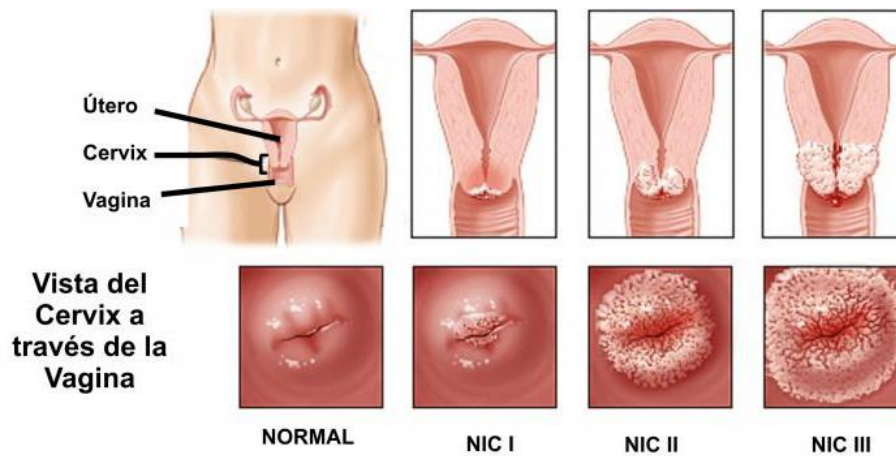


Figura 2. Evolución de neoplasia epitelial hasta culminar en cáncer invasor [13].

El Cáncer Cérvico-Uterino se desarrolla en el cérvix, en la región inferior y estrecha del útero. El cuello uterino está tapizado de dos epitelios de origen mesodérmico, el ectocervical formado de células plano pavimentosas, las cuales constan de múltiples capas intraepiteliales escamosas estratificadas; esta zona corresponde a un microambiente no estéril, el cual tolera en abundancia diversos microorganismos vaginales y antígenos seminales[14].

Por otro lado, el epitelio endocervical, formado de una monocapa de células epiteliales cilíndrico mucosecretoras en una zona estéril, la cual presenta una mayor actividad inmune a la invasión de patógenos. El sitio anatómico de la unión de estos dos epitelios se denomina zona de unión escamocolumnar y es un área dinámica, sujeta a cambios

constantes relacionados con la acción de las hormonas ováricas, como los estrógenos[9], que a la vez se relacionan con la edad (figura 3).



Figura 3. Se muestra la posición que ocupa el cérvix dentro del aparato reproductor femenino [15].

Como ya se mencionó, en la génesis, la progresión y diseminación de un cáncer, interviene una gran variedad de respuestas y factores intra, extra e intermoleculares, alterando genéticamente las propiedades fundamentales de las células, perdiendo la homeostasis en el crecimiento y muerte celular. Sin embargo, es importante señalar que esta enfermedad es multifactorial existiendo una relación estrecha con algunos factores que han sido asociados a este carcinoma.

Entre los factores que favorecen el desarrollo de Cáncer Cérvico-Uterino destacan: inicio de vida sexual activa antes de los 15 años, condiciones socioeconómicas bajas, enfermedades de transmisión sexual previas, estados de inmunosupresión, consumo de tabaco, alcohol, multiparidad, infecciones del cérvix persistentes y prolongadas, historial de SIDA, uso de anticonceptivos hormonales, edad mayor a 40 años, no haberse realizado exámenes de Papanicolaou (PAP) y ser portadora del virus VPH siendo esta última la responsable y la principal causa del desarrollo del Cáncer Cérvico-Uterino[11].

Virus del Papiloma Humano (VPH)

Es en 1976, cuando HaraldzurHausen planteó su hipótesis en la cual propone al virus del papiloma humano (VPH) como el agente sexualmente transmitido responsable de la transformación neoplásica en el cuello uterino. Posteriormente esta hipótesis ha sido validada, por estudios epidemiológicos como por la evidencia molecular de que el ADN del virus del papiloma está integrado en las células neoplásicas en más de 90% de los carcinomas cervicales con lo que se puede asegurar el papel causal que el virus del papiloma humano tiene en el desarrollo del cáncer genital[9].

El VPH es un virus de ADN de la familia Papillomaviridae, cuyo genoma codifica 7 genes tempranos y 2 genes tardíos. Los genes tempranos 6 y 7 interfieren con las funciones celulares que normalmente impiden el crecimiento excesivo, ya que inactivan proteínas supresoras del crecimiento celular [5]. Gracias a la biología molecular cerca de 200 tipos de VPH se han identificado y alrededor de 40 de éstos afectan la región anogenital, infectando tanto el epitelio escamoso de la piel y mucosas [16](figura 4).

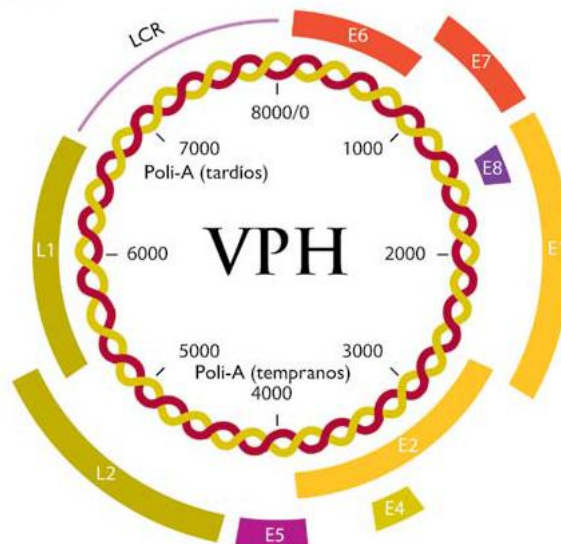


Figura 4. Esquema del virus del VPH [10].

El genoma viral cuenta con genes de expresión temprana (E) implicada con la replicación y transcripción del virión, así como la desregulación de los controles de proliferación celular; también se cuenta con genes de expresión tardía (L) cuyas proteínas formarán la cápside del virus.

A nivel mundial, los genotipos 16 y 18 del VPH son los más prevalentes, seguidos por los genotipos 45, 31 y 33. En población de América Latina, los genotipos 16, 18, 31, 33, 51 y 52 han sido identificados con mayor frecuencia [17]. Las partículas virales maduras están provistas de una cápside proteica icosaédrica. Son virus pequeños, de unos 55 nanómetros de diámetro, constituidos por una doble hebra circular de ADN y compuestos por unos 7900 nucleótidos.

La infección del cérvix por VPH se inicia en células con mayor capacidad de división mitótica, es decir en las células basales del epitelio escamoso. Una vez que una infección se produce, el virus puede permanecer sin replicarse dando lugar a una infección latente sin cambios morfológicos, por otra parte, el virus puede sufrir una replicación intranuclear en forma episómica, es decir, extra cromosómico, dando lugar a la expresión de los genes virales tardíos con síntesis de proteínas estructurales y ensamblaje de las partículas virales en las células superficiales, más maduras, del epitelio escamoso. La presencia de estas partículas virales en las células escamosas producen un efecto citopático en éstas, dando lugar a unos cambios morfológicos característicos reconocidos en los frotis que consisten en: alteración en la queratinización, vacuolización y degeneración nuclear [18].

En ciertas circunstancias el genoma viral puede integrarse en el genoma de la célula huésped. La integración rompe el genoma viral en los genes E1 y E2 que son los encargados de regular el crecimiento viral. Como resultado el ciclo viral se paraliza y no es posible la producción de nuevas partículas virales. La integración del virus en el huésped se asocia a una transformación maligna [19]. Esta infección se realiza a través de microabrasiones, por lo que el virus alcanza la zona basal y dependiendo del genotipo, se desencadena una serie de cambios como la hiperplasia tanto en el epitelio como del estroma (figura5).

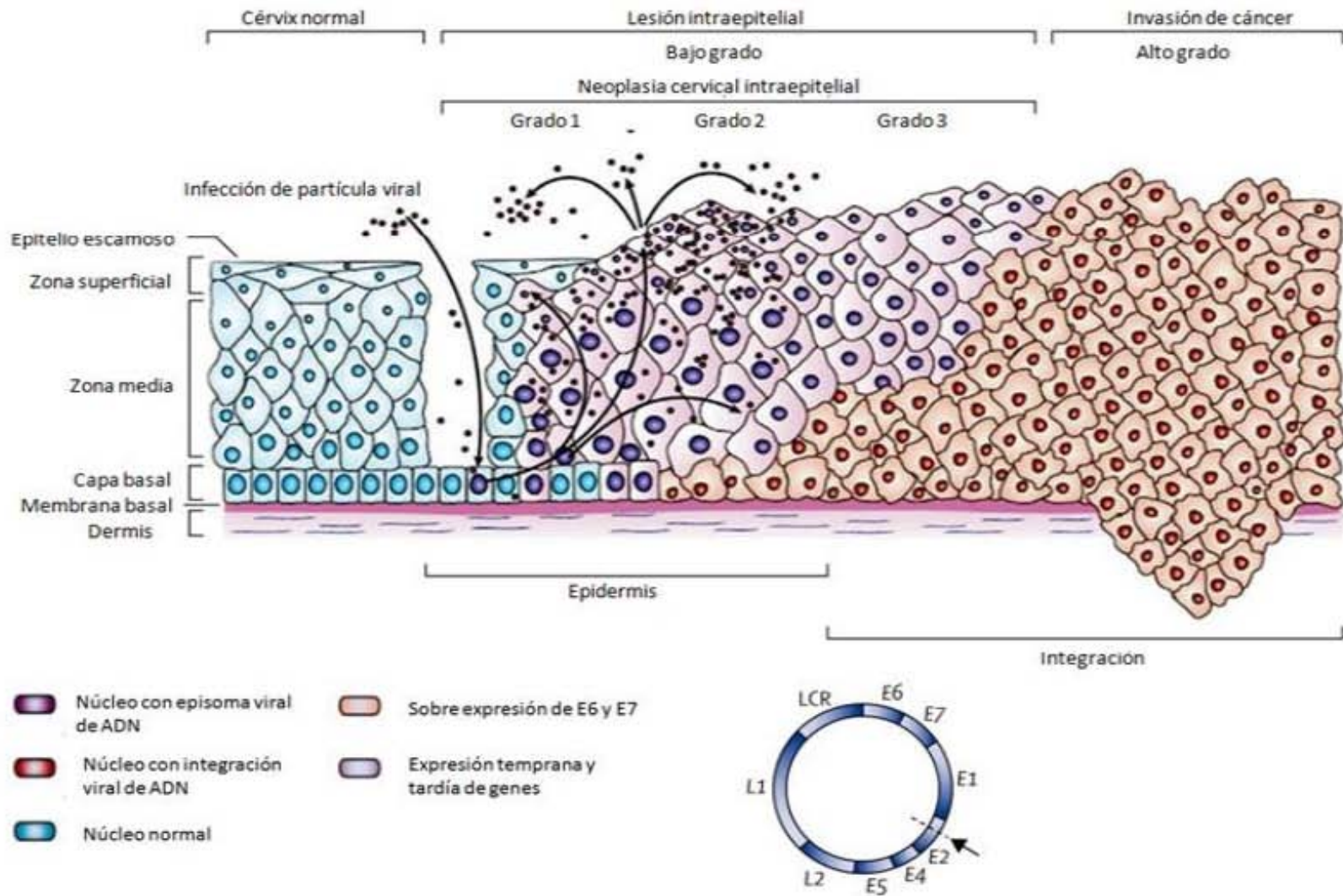


Figura 5. Expresión de los genes virales en elCáncer Cérvico-Uterino[20].

La expresión de los genes virales se correlaciona con la posición que la célula infectada ocupa dentro del epitelio estratificado. La expresión de los genes E6 y E7 están implicados en la desregulación de la proliferación, E4 y E5 con la duplicación del genoma viral y, L1 y L2 con la formación de las partículas virales[10, 20].

La infección puede no manifestarse inmediatamente al haber un periodo de latencia que puede estar mediado por varios factores, tanto del propio virus como del huésped, y puede ser de semanas, meses o años, al cabo de los cuales las lesiones se presentarán bajo tres modalidades principales: infección clínica, subclínica y latente [21].

En la infección clínica se produce síntomas y puede verse a simple vista en forma de verrugas y condilomas además de haber invadido sitios cercanos [22], por otro lado en la infección subclínica la cual consiste en tomar una biopsia utilizando un procedimiento de colposcopia o microscopia, mientras la infección latente que no hay cambios macro ni microscópicos en el epitelio escamoso infectado [9], solo se identifica por medio de investigaciones virológicas, como la detección y tipificación por medio de una técnica de PCR, y la detección de la proteína E6, ya que ésta actúa como marcador proteico, que pueden ser detectada por medio de anticuerpos, si existe producción del virus, ya que en las displasias severas y carcinoma *in situ*, son altos los niveles en la proteína E6 y E7, en donde finalmente ocurre la integración del genoma viral a la célula[5].

Diagnóstico

La lenta evolución de esta enfermedad hace que la variable tiempo sea clave para el tratamiento, ya que de éste depende el tipo de cáncer y la etapa en la que se encuentra[26].. En las etapas del desarrollo del cáncer se hace referencia a la presencia de verrugas y condilomas además de cuanto ha crecido y si el tumor si se ha diseminado desde su ubicación original, esto determinado por un diagnóstico previo. Una vez que las células anormales se vuelven cancerosas e invaden tejido cercano se presentan síntomas comunes, como es el sangrado anormal que puede incluir: sangrado entre periodos menstruales regulares o bien sangrado menstrual más abundante [22].

Los métodos comunes para diagnosticar son la citología y la histopatología, aplicados a los métodos clínicos como el Papanicolaou, colposcopia y biopsia. El Papanicolaou es una técnica de tinción muy útil, de bajo costo, fácil realización y amplia difusión, no obstante, tiene poca reproducibilidad y una sensibilidad y especificidad variable dependiente de la experiencia del personal que la realiza. Como consecuencia, se estima que aproximadamente el 50 % de las infecciones positivas a VPH pasan desapercibida por Papanicolau (PAP).

Mientras que en la colposcopia se examina la vagina y el cérvix utilizando un instrumento llamado colposcopia con esta prueba se indica si el examen del papanicolaou sugiere displasia (tejido precanceroso) o cáncer. Confirmando el diagnóstico con una biopsia la cual se realiza en cualquier área sospechosa y se examina para detectar la presencia de células cancerígenas. Una vez determinado el diagnóstico se procede a un tratamiento [23, 24].

Tratamientos

El tratamiento depende directamente del diagnóstico. Según la extensión el cáncer, y éste puede consistir en una o más terapias. Los tratamientos son técnicas específicas para erradicar y limitar el crecimiento tumoral. Estos tratamientos son: cirugía, radioterapia y quimioterapia; aplicándose de manera separada o combinada dependiendo del diagnóstico. Siendo la cirugía un procedimiento radical, una técnica eficiente en tumores benignos o localizados, perdiendo su eficacia en pacientes con metástasis.

En comparación con la radiación, la cual se vale de la utilización de rayos ionizantes de alta energía, como los rayos X o gamma, estas enormes cantidades de partículas de energía, provocan modificaciones profundas, fundamentalmente a nivel del núcleo de la célula. De ello resultan perturbaciones que pueden destruir estas células o hacerlas incapaces de proliferar. Las células que se encuentran en división mueren, este tratamiento llega ser bastante agresivo ya que no diferencia de células anormales y normales. Su mecanismo de

acción se basa en el daño directo e indirecto del ADN a través de radicales libres[25], es por ello que se tiene que las células son más sensibles en la fase S del ciclo celular, así como en la mitosis. Por otro lado, la quimioterapia utiliza medicamentos para reducir el volumen del tumor y minimizar el riesgo de que éste se extienda o disemine a otras partes del organismo, por otra parte, disminuye el riesgo de que el cáncer vuelva a desarrollarse. Muchos tipos de células cancerígenas cuando son expuestas a una variedad de drogas quimioterapéuticas, que incluyen a los antimetabolitos, los inhibidores de la síntesis de desoxirribonucleótidos, los inhibidores de la topoisomerasa de ADN, agentes que interfieren con los microtúbulos, y agentes alquilantes entre otros, estas células detienen su proliferación y finalmente mueren[26].

Las células tumorales son susceptibles a la quimioterapia debido a su alta tasa de proliferación, pero existen células normales de proliferación constante que también se ven perjudicadas y que también mueren por efecto de este tipo de terapia. Si bien es cierto que los beneficios de estos tratamientos son eficientes, tanto independientes como en conjunto, los efectos colaterales muchas veces llegan a ser más agresivos y perjudiciales que el mismo cáncer, entre los efectos secundarios se considera: caída del pelo, mucositis, disfagia, vómito o náuseas, por lo cual la calidad de vida del paciente se ve disminuida drásticamente. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevos compuestos con potencial terapéutico[27].

Gran parte de la investigación clínica se centra en el problema de cómo matar selectivamente las células cancerosas. Sólo existen algunas pequeñas diferencias bioquímicas entre las células tumorales y las normales de proliferación rápida. Los niveles de enzimas y las velocidades de reacción difieren ligeramente entre las malignas y las normales, son estas pequeñas diferencias cualitativas, las que se aprovechan por lo métodos de tratamientos actuales[28].

En la actualidad existen numerosos fármacos anticancerígenos, tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo dado los efectos secundarios adversos, no son del todo satisfactorios, ya que una aplicación sistémica repercute principalmente en las células de

origen hematopoyético, bajando sensiblemente el conteo de este tipo celular, por lo que se buscan nuevas moléculas de origen esteroideo que presenten una actividad anticancerígena selectiva[29].

Esteroides

Los esteroides son compuestos que se encuentran en prácticamente todos los seres vivos, contienen un núcleo formado de cuatro anillos saturados, se han aislado para generar innumerables compuestos diversamente funcionales que han mostrado actividad biológica importante. En la actualidad muchos de estos compuestos son también obtenidos por síntesis o semisíntesis; por ejemplo la dexametasona es un derivado esteroideal sintético el cual es un corticosteroide con rápida y potente acción antiinflamatoria, antialérgica y reumática, además, la oxandrolona es un medicamento anabólico usado en terapia coadyuvante para promover la ganancia de peso de pacientes con SIDA[30].

Otros derivados esteroideales han mostrado actividad biológica importante son los esteroides que contienen el sistema Δ^4 -en-3,6-diona (sistema de las dos cetonas conjugadas y variando solo la cadena lateral) [31], presentando actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de cáncer [32].

El sistema Δ^4 -3,6-dicetónico se ha aislado a partir de algunas esponjas marinas como la *Anthoarcuata graceae*[33] y *Phorbas amaranthus*[34] en la cual exhibió actividad citotóxica en células HCT-116. Por otra parte los derivados esteroideales extraídos de dos diferentes tipos de algas marinas *Turbinaria conoides*[35] y *Galaxauramarginata*[36] manteniendo constante el sistema conjugado 4-en-3,6-diona, no pierde su actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas A-549, HT-29, KB, y P-388, por lo que parece que el sistema dicetónico es el responsable del efecto biológico [32]. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de un compuesto aislado a partir de *Tribulusterrestres*, el cual conserva este sistema dicetónico, dando un derivado espiroestánico (25R)-espirostan-4-eno-3,6,12-triona, también conocido como sapogenina esteroideal hecogenona presentando actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer SK-MEL, KB, BT-549 y SK-OV-3 [37].

Actualmente existen numerosos fármacos anticancerígenos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, dado los efectos secundarios adversos, por lo que se buscan nuevas alternativas, entre ellas, moléculas de origen esteroideo que presenten una actividad anticancerígena selectiva. Se ha llegado a proponer que las propiedades de un compuesto con perspectiva terapéutica debe cumplir con ciertas características, como afectar negativamente la proliferación ya sea deteniéndola por tiempos cortos, como en un efecto citostático, o detener la proliferación para inducir un proceso de muerte celular. La muerte celular inducida debe ser preferentemente un proceso programado dependiente de energía y no un proceso abrupto y descontrolado que pueda desencadenar una reacción inflamatoria severa[28].

Los compuestos con actividad citostática afectan el ciclo de proliferación celular en una de sus fases, induciendo una detención que evita que las fases progresivas continúen, tal afectación puede ser reversible, pero si persiste la presencia del compuesto o si se suministra conjuntamente un factor que cause daño celular, se puede desencadenar una inducción a muerte celular[28].

Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de pasos ordenados que una célula en proliferación debe cumplir de manera correcta, es la base de la producción de los organismos y necesaria para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o muerte celular. Un ciclo celular típico se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M (figura 6), durante la fase G1, la célula que ha recibido un estímulo mitogénico, activa rutas de señalización que activan la expresión de genes relacionados con la proliferación, potenciando la señal recibida, revisando la integridad del ADN nuclear y acumulando las proteínas necesarias para cumplir con la duplicación del ADN. Durante la fase S el ADN nuclear se duplica pasando de una cantidad de $2n$ a una de $4n$. Una vez terminada la duplicación se presenta la fase G2, donde la célula revisa la integridad de su ADN, y acumula las proteínas necesarias para segregar un juego cromosómico $2n$ hacia las células hijas. En la fase M la célula se divide

en dos con un paquete cromosómico equitativo para cada célula hija. Si en el ambiente extracelular persiste el estímulo mitogénico, las células hijas habrán de entrar nuevamente a la fase G1, pero si el estímulo ya no está presente, la proliferación cesa, y la célula permanece en un estado de reposo conocido como G0, en este estado la célula es metabólicamente activa y cumple con sus funciones fisiológicas[38].

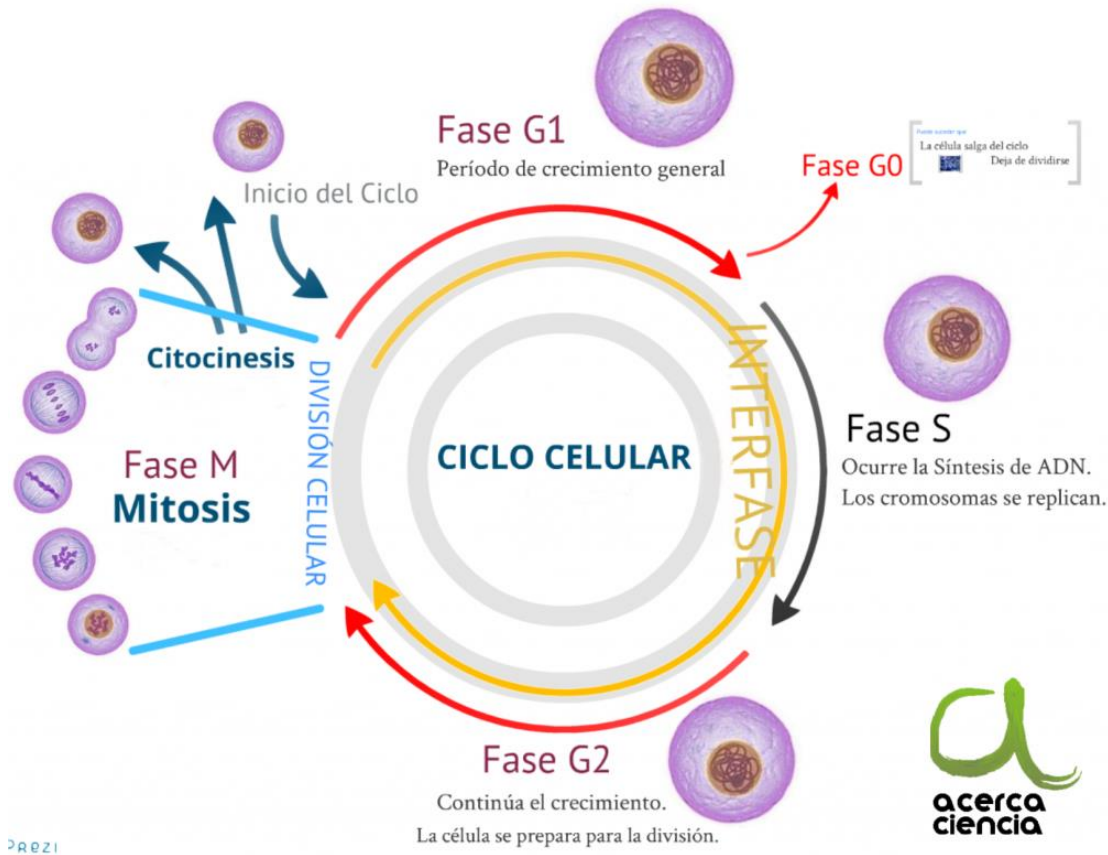


Figura 6: Transición de Ciclo Celular y replicación del ADN[39].

Como todo proceso orgánico, el ciclo celular está sujeto a una autorregulación, por lo que es necesario que la célula coordine un conjunto de procesos citoplasmáticos en puntos específicos llamados “puntos de control” o de “chequeo”, estos eventos moleculares tienen la capacidad de poder frenar el ciclo o permitir a la célula proseguir con la replicación de material genético, crecimiento o división celular, según sea el caso. Esta regulación está realizada a lo largo del ciclo por proteínas específicas conocidas como ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, así como de los inhibidores de estas cinasas. Estas proteínas son

activadas por diferentes estímulos tales como; daño de ADN, citocinas, pérdida de matriz extracelular, entre otras. Cuando el daño en la célula que ha provocado la detención del ciclo celular no puede ser reparado se induce una muerte celular programada, evitándose así la proliferación de una célula que puede presentar alteraciones en su genoma o daño estructural en sus cromosomas, tales afectaciones repercuten en la funcionalidad del tejido, órgano o del organismo del cual forma parte[38].

Muerte celular

La muerte de un organismo puede ser un evento causado por agentes externos como: depredadores, toxinas, daño mecánico, exposición a ondas de alta intensidad de energía, etc. o bien por causas intrínsecas: envejecimiento o alguna enfermedad. Este es un fenómeno que, puede ser el resultado de mecanismos que se dan cuando una célula presenta un daño severo, y ya no puede mantener sus funciones vitales, o bien, cuando el organismo requiere para su desarrollo la muerte específica de ciertas células para mantener la homeostasis y la integridad[40].

Ya que la mayoría de las células requieren señales para mantenerse vivas, en ausencia de estas señales de supervivencia o cuando el medio no es propicio, las células activan un programa de muerte denominado apoptosis. Este programa produce la muerte de la célula de manera controlada. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte por necrosis, en lugar de hincharse, reventar y derramar su contenido intracelular, hacia su exterior, las células en proceso de apoptosis y sus núcleos se encogen, y con frecuencia se fragmentan formando vesículas pequeñas que contienen el material citoplasmático. De esta manera, pueden ser eficientemente fagocitadas y, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente[41, 42].

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular genéticamente definida y programada que ocurre de manera fisiológica durante la embriogénesis, la renovación tisular, la regulación del sistema inmunológico y la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas, induciéndose así, muerte celular en respuesta a determinados estímulos. En condiciones normales la apoptosis constituye un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo[43].

La apoptosis tiene dos motivos, fundamentalmente como parte del desarrollo de la estructura corporal, o bien, para eliminar células que supongan una amenaza para la integridad del organismo. Las células que presentan un proceso de muerte apoptótica se caracterizan por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrhexis), desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células [43].

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, entre los cuales destacan las caspasas. Las caspasas son proteínas pertenecientes a las cisteín-proteasas y median la ruptura de otras proteínas, son las mediadoras esenciales de los procesos apoptóticos, las cuales provocan una degradación proteica de forma directa, además de inducir la fragmentación del ADN indirectamente, llegando así a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son iniciadoras y otras efectoras dentro del proceso de muerte celular, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La activación de las caspasas, las cuales existen en calidad de procaspasas inactivas, se produce a través de dos vías de señalización, ya sea de manera intrínseca o extrínseca[40].

En la vía extrínseca participan receptores de muerte que reciben señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas, la célula recibe la señal externa de muerte celular, ésta se adhiere a la proteína receptora produciendo su agregación y acoplamiento a una proteína adaptadora y a una procaspasa iniciadora, procaspasa 8. La activación de la

caspasa 8 inicia la activación de la caspasa ejecutora, procaspasa 3, una vez activada la caspasa 3 degrada una amplia gama de sustratos proteicos y activa la degradación de ADN[43].

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial o intrínseca. Esta vía apoptótica se da cuando son activadas las proteínas proapoptóticas, debido a un daño en el ADN o por la ausencia de un factor trófico. Las proteínas proapoptóticas (Bax y Bad) se pueden insertar en la membrana externa mitocondrial y desencadena apoptosis liberando citocromo C al citosol. El citocromo C propiciará la activación una procaspasa iniciadora (procaspasa-9) asociada a la mitocondria por medio de una proteína adaptadora citosólica (Apaf1) que se une a la procaspasa-9 en un complejo llamado apoptosoma, éste promueve la producción de caspasa-9 activa, la cual habrá de activar a la caspasa ejecutora, caspasa-3. Cualquiera que sea la vía de activación, la caspasa-3 es el punto de convergencia de estas dos vías del proceso de apoptosis [43].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Cáncer Cérvico-Uterino es un problema de salud a nivel nacional, representa la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas por cáncer ginecológico y pese a las terapias aplicadas en el tratamiento de éste, no se ha podido revertir la alta mortalidad. Los agentes quimioterapéuticos administrados en el tratamiento del Cáncer Cérvico-Uterino no son eficaces en estados avanzados de esta enfermedad, además los efectos colaterales causados por éstos, afectan la calidad de vida de las pacientes, llegando al deterioro de la salud de manera peligrosa. Tomando en cuenta que los quimioterapéuticos usados actualmente en su mayoría son de origen natural o derivados de éstos, se ha considerado explorar la actividad de compuestos de origen natural con estructuras esteroideas, encontrándose dentro de este grupo de compuestos, aquellos que presentan el sistema Δ^4 -3,6-dicetónico que han mostrado tener efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales, sin embargo, dada la falta de información sobre el efecto de estos compuestos en líneas celulares tumorales provenientes de Cáncer Cérvico-Uterino se plantea evaluar el efecto antitumoral de los compuestos 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona en líneas tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es una de las principales causa de muerte en mujeres mexicanas ocupando una de las principales causas de mortalidad[8].La organización mundial ha reportado que el 99% de todos los casos de carcinomas de cérvix es originado por la infección del virus del papiloma humano y que en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70% de estos casos y sólo un (1%) es negativo al VPH[17].

A pesar de los avances en investigación, los fármacos empleados en los tratamientos para el cáncer cérvico-uterino repercuten de manera severa en la calidad de vida de las pacientes y resultan ser ineficientes en estadios avanzados, por lo que se tiene la necesidad de generar información sobre la actividad antitumoral de compuestos que puedan ser propuestos como tratamientos con actividad selectiva y con menores efectos colaterales.

HIPÓTESIS

Se ha demostrado que esteroides que contienen el sistema Δ^4 -3,6-dicetónico ejercen un efecto antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de pulmón, colon, melanoma, mama así como de carcinoma oral epidermoide. Es por esta razón que se espera que los derivados esteroides 16-epoxi-pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona presenten efecto antitumoral al ser evaluados en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto antitumoral de los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona en líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos particulares

1. Establecer cultivos de las líneas celulares tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino: HeLa, CaSki y ViBo.
2. Determinar la concentración requerida de los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona, a la cual la densidad de cultivos celulares de las líneas HeLa, CaSki y ViBo decrecen en un 50 % (IC50).
3. Determinar si los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona afectan alguna fase del ciclo celular de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
4. Determinar si los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona inducen una muerte celular por necrosis.
5. Determinar si los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona inducen la expresión de caspasa 3, así como la fragmentación de ADN.
6. Determinar si las concentraciones establecidas para las IC50 de los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona afecta el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano, así como de linfocitos humanos.
7. Determinar la citotoxicidad de los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona por medio de la detección de la LDH en cultivos de linfocitos humanos.

MÉTODO

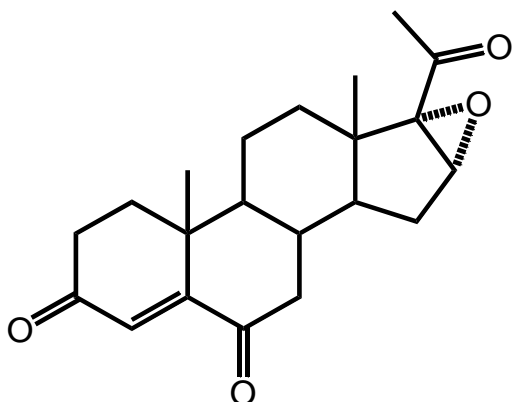
Cultivo de células tumorales HeLa, CasKi y ViBo

Células provenientes de cáncer Cérvico-Uterino HeLa, CaSki y ViBo fueron sembradas en cajas petri de 100 mm con 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco BRL, EUA.) con rojo fenol suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina, al 5% de suero de neonato de ternera (SNT), (Gibco EUA) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair AutoFlow EUA). Para la realización de los ensayos, se utilizaron cultivos de células tumorales a un 70% de confluencia.

Para cada evaluación los tratamientos en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, así como de linfocitos y fibroblastos, se utilizaron dos controles de referencia y comparación: un control con células en RPMI-1640 con 5% de STN, y un control vehículo, células en RPMI-1640 con 5 % de STN y la más alta concentración de acetato de etilo utilizada para cada ensayo

Preparación de los compuestos

Los compuestos 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona y (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona los cuales en el presente trabajo serán identificados como Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona respectivamente, fueron sintetizados y donados por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a cargo del M. en C. Víctor Gómez Calvario tomando como base molecular a la pregnenolona y el colesterol, presentando ambos compuestos un sistema dicetónico, pero con diferentes radicales. De esta síntesis se obtuvieron las siguientes estructuras:

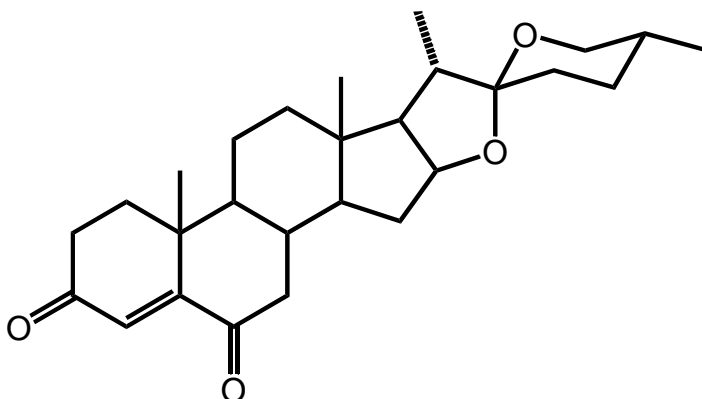


EPOXIPREGNENODIONA

$C_{21}H_{26}O_4$
Mol. Wt.: 342.43
C, 73.66; H, 7.65; O, 18.69

Punto de fusión 205-207°

Figura 7. Molécula de Epoxipregnenodiona



ESPIROSTENODIONA

$C_{27}H_{38}O_4$
Mol. Wt.: 426.59
C, 76.02; H, 8.98; O, 15.00

Punto de fusión 180-183°

Figura 8. Molécula de Espirostenodiona

Se pesó 1 mg de cada uno de los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona, en tubos cónicos tipo eppendorfs nuevos y previamente etiquetados, posteriormente, en condiciones estériles y sobre hielo, cada uno de los compuestos fueron solubilizados en 50 μ l de acetato de etilo, obteniendo así una concentración de 1000 μ g/50 μ l.

Determinación de la IC₅₀ de los compuestos

Epoxipregnenodiona yEspirosenodiona

Con el propósito de determinar la concentración a la cual se obtiene un abatimiento del 50% (IC₅₀) de la población de cultivos celulares, se realiza un gradiente de concentración para ambos compuestos, Epoxipregnenodiona y Espirosenodiona, considerando el rango desde 3.125 hasta 200 µg/ml.

El procedimiento consistió en establecer cultivos celulares a un máximo del 70% de confluencia, de los cuales se cosecharon las células[44] utilizando una solución de verseno para los cultivos de HeLa y CaSki y de tripsina (0.05% en verseno) para cultivos de ViBo. Posteriormente se sembraron 7500 células/pozo en cajas de cultivo de 96 pozos (CorningInc) con 100 µl/pozo de medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) con rojo de fenol 5% de STN. Cada uno de los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora. Posteriormente este medio fue remplazado a las 24horas con RPMI fresco, al 5% de STN, con las diferentes concentraciones las cuales fueron desde 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200µl/ml de cada compuesto (Epoxipregnenodiona y Espirosenodiona). Además se consideró un control sin estímulo al cual solamente se le hizo cambio de medio de cultivo por RPMI al 5 % de STN; y un control de acetato de etilo, solvente en el cual se solubilizó la máxima concentración de ambos compuestos. Posteriormente los tratamientos se dejaron actuar por 24 horas más, dando un tiempo total de cultivo de 48 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se determinó el número celular por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta; para ello, se retiró el medio de cultivo y se dejó secar. Inmediatamente se fijaron las células con glutaraldehído al 1.1%, por 15 minutos, se retiró el fijador, con lavados de agua desionizada y se dejó secar, posteriormente se tiñeron las células con el colorante cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico por 20 minutos, posteriormente se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada. Nuevamente, se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el colorante fue

solubilizado en ácido acético al 10% en agitación por 20 minutos, finalmente se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro.

Los valores de absorbancia de los controles fueron comparados con los de los tratamientos de las diferentes concentraciones para cada uno de los compuestos a probar. Los valores de porcentajes relativos se estandarizan con los valores de absorbancia del control sin tratamiento.

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

Se ha determinado que agentes quimioterapéuticos pueden ejercer su actividad de manera directa en o sobre una fase del ciclo celular, induciendo ya sea una detención en alguna de las fases del ciclo celular o una muerte celular que puede ser detectada de manera selectiva en alguna de estas fases. Determinar si se afecta la progresión del ciclo celular es importante en la caracterización de la actividad biológica de nuevos compuesto.

Para evaluar ciclo celular se siembran 10^5 células/ml de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo en cajas de cultivo de 60 mm en 5.0 ml de RPMI al 5% de STN, durante 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas en las siguientes condiciones: un control únicamente con RPMI al 5 % de STN, un vehículo, con la concentración de acetato de etilo empleada para la preparación de la IC50 con RPMI al 5 % de STN y los tratamientos con la IC50 de Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona respectivamente para cada línea celular, contenida en RPMI al 5% de STN, además a un control se realizaron 5 lavados con PBS y se agregó RPMI-1640 sin STN. Después de 24 horas de tratamiento se evaluó por citometría de flujo.

Las células fueron cosechadas de las cajas de cultivo con verseno para HeLa y CaSki y con tripsina (0.05 % preparada en verseno) para ViBo. Posteriormente se recolectaron en tubos cónicos de plástico de 15 ml y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Los botones celulares fueron lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, pH=7.2), y posteriormente fijadas en 1ml de metanol al 50 % en PBS por 20 minutos, posteriormente

se resuspendió el botón celular con 500 µl de una solución de ARNasa (2.5 µg/ml) y se deja incubar a 37 °C por 30 minutos. La ARNasa es una enzima que degrada al ARN y lo corta para que éste no intervenga en el evaluación de contenido de ADN; terminada la incubación se lava tres veces con PBS y se resuspende el botón celular en un volumen final de 0.5 ml de PBS. Se adicionó 10 µl de una solución de yoduro de propidio (0.2 µg/ml) al momento de la evaluación en el citómetro de flujo. El yoduro de propidio es un colorante que se intercala en los surcos del ADN permitiendo determinar la cantidad de ADN presente por célula, pudiendo así, determinar la distribución de la población celular en las fases G1 (2N), S (2n<X<4n) y G2/M (4N).

Determinación de citotoxicidad por LDH

El abatimiento de la proliferación puede estar relacionada a la presencia de muerte celular, y muchos de los compuestos de estructuras esteroideas pueden provocar una muerte celular por necrosis, este tipo de muerte no es deseable ya que puede desencadenar una respuesta inflamatoria crónica, lo cual contribuye a la disminución de la calidad de vida de las pacientes, por lo que determinar el porcentaje de participación de este tipo de muerte es de gran relevancia. Para evaluar muerte necrótica se determina la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes de cultivos de células tratadas con los diferentes condiciones, ésta es una enzima intracelular que si se encuentra en el exterior, se debe a ruptura de la membrana celular, característica primordial de la muerte por necrosis.

En una caja de 96 pozos (Corning, Inc.) se sembraron 7500 células/pozo de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo en 100µl de medio RPMI-1640 al 5% de STN por 24h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó la IC50 de los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona en RPMI-1640 fresco al 5% de STN. Se considera un control sin estímulo al cual solamente se le hace cambio de medio de cultivo fresco (RPMI al 5 % de STN), a otro control se le realiza el mismo procedimiento, éste será lisado una hora antes del término del ensayo, además se considera un control para el acetato de

etilo, solvente en el cual se solubiliza la máxima concentración de ambos compuestos. Mantener el ensayo por 24 horas más dando un tiempo total de cultivo de 48 horas. Cumplidas las 23 horas de tratamiento al control considerado para una lisis celular, se le sustituye el medio de cultivo por medio de cultivo fresco al 0.5 % de tritón X-100 y se deja incubar una hora más para obtener una lisis total del cultivo.

Una vez completadas las 24 horas de tratamiento, se retiró únicamente 50 µl de tres pozos por cada condición de tratamiento y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min (Para eliminar residuos celulares). Se recuperó el sobrenadante y se colocó en una caja nueva de 96 pozos para así agrega 50 µl de la mezcla de reacción para determinación de actividad enzimática de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (250 ml de catalizador y 11.25 ml de solución colorante, Kit BioVisionK-311 400), la mezcla se incubó por 30 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 490nm en un espectrofotómetro.

Los valores de absorbancia de los controles fueron comparados con los de los tratamientos de Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona para cada una de las células respectivamente. Los valores relativos fueron estandarizados de acuerdo a la absorbancia del control positivo, tritón X-100.

Evaluación de caspasa 3

Un mecanismo de acción de los compuestos quimioterapéuticos es inducir muerte celular por un mecanismo controlado, apoptosis. La activación de muerte por apoptosis puede darse por dos rutas, una intrínseca o extrínseca, en ambas casos se activan caspasas iniciadoras como caspasas 9 y 8 respectivamente, que activan a la caspasa 3 efectora, ambas rutas confluyen en la activación de caspasa 3, un evento tardío dentro del proceso de muerte y un punto de no retorno donde este proceso es irreversible.

Para realizar esta evaluación se sembraron 10^5 células HeLa, CaSki y ViBo en cajas petri de vidrio de 60mm con 5 cubreobjetos de 1x1cm, en un volumen de 3ml de RPMI al 5 % de STN por 24 horas para su adherencia. Al término del tiempo, se procede a tratar con cada

una de las IC50 de Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona para cada línea celular por 24 horas, además se contempló un tratamiento control al cual sólo se le realizó un cambio de medio de cultivo fresco y un tratamiento de acetato de etilo. A continuación, realizar la detección de la procaspasa 3 por inmunocitoquímica, esto es; retirar el medio de cultivo con los tratamientos respectivos, y las células fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS, preparado al momento, durante 20 minutos, al término del tiempo se lava cuidadosamente 3 veces con PBS, posteriormente se permea con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 minutos a 4°C, nuevamente las muestras son lavadas 3 veces con PBS, después se adiciona el anticuerpo primario (anticaspasa 3 CPP32 Ab4, RabbitpolyclonalantibodyLab Visión 1:100 en PBS) durante un periodo de 24 horas en cámara húmeda, al término del tiempo, las muestras se lavan con PBS y se aplica el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS) en cámara húmeda en oscuridad durante 1.5 horas, posteriormente se lavan las muestras 3 veces con PBS, después se aplica colorante DAPI durante 1min. Nuevamente se lavan las muestras con PBS. Finalmente se montan las muestras en porta objetos con medio de montaje antifolding y selladas. Una vez realizadas las preparaciones, se procede a analizar las muestras en un microscopio de epifluorescencia de alta definición (NIKON).

Detección específica de ADN fragmentado a través de la técnica de TUNEL

Desarrollando la técnica de marcaje *in situ* denominada TUNEL (Transfer Uridin Nick-EndLabelling), la cual consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con rodamina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una coloración rojiza-café

Para llevar a cabo la técnica, se siembran 50 000 células CaSki, HeLa y ViBo en cajas Petri con 5 cubreobjetos de 1 x 1 cm con RPMI al 5% en la incubadora (Nuair US Autoflow) por 24 horas para adherencia de las células, posteriormente se trataron con la IC50 de los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona en las concentraciones respectivas de cada línea. Posteriormente, las células son fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS por

20 minutos. Después las células son lavadas con PBS y permeadas con Tritón X-100 al 0.5% en PBS, durante 5 minutos a 4°C. Se lavan las preparaciones con PBS, y se adiciona inmediatamente el buffer de equilibrio (Chemicon International, Millipore Corporation Billerica U.S.A.) (20-30µl) en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se escurren las preparaciones en un papel absorbente sin dejarlas secar. Se incuban por 1 hora con enzima Tdt (33µl de enzima más 77µl de buffer de reacción) (Chemicon International, Millipore Corporation Billerica U.S.A.), en cámara húmeda. Al término del tiempo se detiene la reacción con buffer de paro (1ml de buffer de paro en 34 ml de agua desionizada), por 10 minutos en agitación suave, en cámara húmeda. Las preparaciones se lavan con PBS y se incuban con anti-dig, durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente (68µl de solución bloqueo más 62µl de rodamina de anti-dig). Se realizan los respectivos lavados con PBS en cámara húmeda. Se incuban con el colorante DAPI por 1 min. A continuación, se lavan las muestras con PBS en cámara húmeda. Las preparaciones son montadas en un portaobjetos con medio de montaje “antifolding”, se etiquetan y guardan en oscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia.

Determinar el efecto antiproliferativo en células de fibroblastos

Dado que las células HeLa, CaSki y ViBo son células tumorales las cuales se encuentra alterada la información genética es necesario la evaluación del efecto de los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona en células normales de la misma zona por lo que las células fibroblásticas resultan ser excelentes modelos para evaluar el comportamiento y susceptibilidad de dichos compuestos a probar.

Las células fibroblásticas no tumorales son obtenidas de una muestra de tejido del cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cérvico-uterino. Una vez obtenida la pieza quirúrgica fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20% de suero fetal bovino (SFB) a 4°C y procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consiste en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos, ambas partes son cortadas por separado en

trozos pequeños (1-2 mm.), y sometidas a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05%. Ésto consiste en colocar los cortes de tejido en un matraz de Erlenmeyer de 50 ml, con 10 ml de tripsina al 0.05 % en PBS y se incuba a 37°C en un baño con agitación durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo, se filtra a través de una malla de nylon estéril, el filtrado se colectó en un tubo cónico de plástico de 15ml que contenía un ml de SFB y se centrifugó a 2000 rpm en una centrífuga. El paquete celular obtenido de la disgregación se resuspendió en RPMI al 10 % de SFB, las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 5ml (CORNING), con una densidad celular de 5×10^5 células por caja. Por otro lado, se añade nuevamente a la muestra de tejido remanente 10 ml de tripsina y se incuba durante 15 minutos más con agitación suave a 37 °C. El tejido disgregado es filtrado con una malla de nylon estéril, se recoge el filtrado en un tubo cónico de plástico con un ml de SFB, dejando el tejido no disgregado en la malla. Las células obtenidas del disgregado son cultivadas en cajas de cultivo de 5 ml y se mantienen en una incubadora a 37°C, al 5% de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío, durante 24 horas máximo, después de este tiempo de incubación, se realiza un cambio completo de medio, de tal manera que sean removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10% y se continua el cultivo hasta un 70% de saturación. En este momento se obtienen cocultivos de poblaciones de células fibroblásticas y epiteliales, las resiembras subsecuentes permiten mantener únicamente poblaciones de fibroblastos. La resiembra consiste en cosechar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentran máximo a un 70% de saturación, agregando tripsina al 0.05 % en PBS, 1-3 minutos. Las células son despegadas por pipeteo suave y colectadas en tubo cónico de plástico de 15 ml con 1 ml de SFB y se centrifuga a 2000 rpm por 5min.

Para determinar la influencia de las IC₅₀ obtenidas de los compuestos para cada una de las líneas celulares, las células fibroblásticas provenientes de cultivos de la tercera a quinta resiembras y de un máximo de confluencia del 70 %, son sembradas en placas de cultivo de 96 pozos. La siembra se deja en reposo por 1-2 días para permitir la adaptación de las células al cultivo. Los tratamientos son realizados por un tiempo de 24 horas. Una vez cumplido este tiempo los cultivos son evaluados para determinar el número celular por la técnica de incorporación de cristal violeta.

Cultivo de linfocitos humanos con Carboxifluoresceína (CSFE)

Otro modelo ideal de células no tumorales son los linfocitos humanos ya que por la susceptibilidad que presentan son adecuados para medir el efecto que tienen los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona sobre estas células.

Por medio de tubos vacutainer con EDTA, se colecta 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano, posteriormente se coloca (5ml) en tubos cónico de vidrio (Pirex, USA), con 5ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se obtiene una relación de 1:1, cuidando de no mezclar, la sangre queda en la fase superior, posteriormente se centrifugó (centrifuga; Dinac, USA) inicialmente a una velocidad de 300rpm, la velocidad se incrementó gradualmente de (300rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500rpm. Posteriormente se dejó centrifugar por 25 minutos más. 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 resuspendido con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante para resuspenderse en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB (El total de células queda contenido en un solo tubo con un volumen total de 4ml). Se siembran las células en una caja petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, son incubadas durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se cosechan todas las células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Una vez centrifugada la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular en 5ml de RPMI-1640 sin suero. Posteriormente se toma una alícuota de 20 μ l, y determinará el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer. Se separan 2×10^6 de células, las cuales no serán marcadas con carboxifluoresceína (CFSE) (Zigma-Aldrich, USA); el resto de las células serán marcadas agregando 10 μ l de CFSE (200 μ M) por ml de suspensión de células; para este caso 50 μ l en los 5ml de suspensión de células. El marcaje de la fracción enriquecida de linfocitos se realizó agregando la CFSE e incubando por 15min protegido de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó dos veces con PBS 5% SFB, centrifugando a 1500rpm y resuspendiendo en 5ml de RPMI al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (FH), los linfocitos se transfieren a tubos cónicos tipo

ependorfd 1.6 ml a una densidad de 1 000 000 de células por ml de RPMI suplementado con 20% de SFB y 20µl de fitohemaglutinina (1µg/ml) (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento las células fueron tratadas con la IC50 de cada uno de los compuestos por separado, (25µg/ml de Epoxipregnenodiona y 175 µg/ml de Espirostenodiona). Las células contenidas en cada tubo se siembran en la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200µl, incubándose por 72 horas. Para la evaluación, se colectaron los cultivos y se centrifugó a 1500rpm para obtener el paquete celular, se retiró el sobrenadante y se resuspendió suavemente en 1 ml de verseno frío por 5 min, posteriormente se centrifugó y retiró el verseno, resuspendiendo el botón celular en 500 µl de PBS, y 500 µl de paraformaldehído al 2%. La evaluación se realizó en citómetro de flujo (FACS Aria II, DBIS) y los datos fueron analizados con el programa FacsDiva.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza ANDEVA, con una significancia del 0.05, seguida de una prueba de Tukey, realizado en el paquete SPSS 10.0 para Windows.

RESULTADOS

A algunos esteroides de origen vegetal que se encuentran en algunas plantas se les han atribuido propiedades antitumorales y citotóxicas, reportándose en la literatura que ciertas modificaciones en la estructura molecular especialmente la presencia de anillos dicetónicos puede mejorar la actividad biológica de estos compuestos. Por lo que el M. en C. Victor García de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se dio a la tarea de sintetizar moléculas derivadas de la diosgenina y hecogenina, formando así los compuestos a evaluar, epóxipregnenodiona y espirostenodiona respectivamente, los cuales presentan estructuralmente el mismo anillo dicetónico Δ^4 -3,6-dicetónico pero con diferente radical.

Ahora bien con el propósito de evaluar el efecto que ejercen estas moléculas en las líneas células provenientes de Cáncer Cérvico-Uterino HeLa, CaSki y ViBo, así como la concentración para abatir el 50% de la proliferación (IC50), se establecieron cultivos para cada una de estas líneas celulares. Los cultivos fueron tratados con las concentraciones de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de Epoxipregnenodiona y de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona. Ambos compuestos inducen una disminución del número celular a las 24 horas de tratamiento, tal efecto fue dependiente de la concentración, el aumento de la concentración se correlacionó con la disminución del número celular en cultivo. En los rangos de concentración mostrados (fig. 9 y 10) se aprecia que las concentraciones que disminuyen el número celular en un 50% son similares para Epoxipregnenodiona en las tres líneas celulares, sin embargo en el caso de la Espirostenodiona los cultivos de las células HeLa y CaSki fueron menos sensibles que ViBo.

A algunos esteroides de origen vegetal que se encuentran en algunas plantas se les han atribuido propiedades antitumorales y citotóxicas, reportándose en la literatura que ciertas modificaciones en la estructura molecular especialmente la presencia de anillos dicetónicos puede mejorar la actividad biológica de estos compuestos. Por lo que el M. en C. Victor García de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se dio a la tarea de sintetizar moléculas derivadas de la diosgenina y hecogenina, formando así los compuestos a evaluar,

Epóxipregnenodiona y Espirostenodiona respectivamente, los cuales presentan estructuralmente el mismo anillo dicetónico Δ^4 -3,6-dicetónico pero con diferente radical.

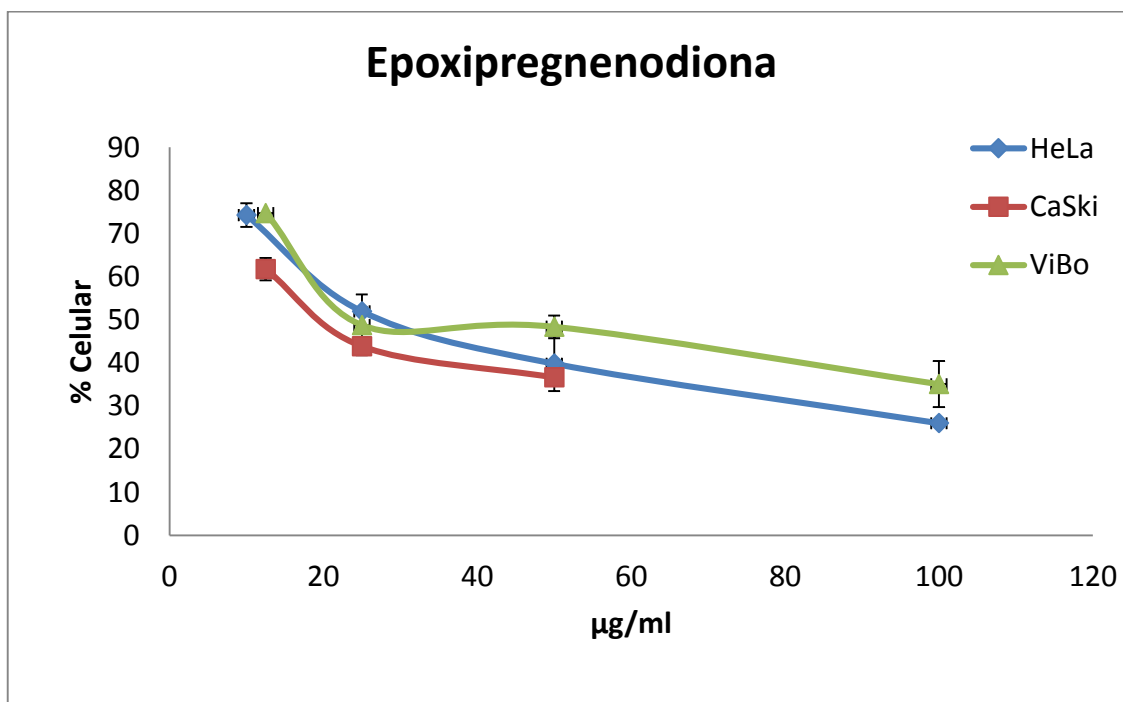


Figura 9. Efecto dosis-respuesta del compuesto Epoxipregnenodiona sobre el potencial proliferativo en células HeLa CaSki y ViBo. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). Ac-Et: Acetato de Etilo

En la figura 9 se muestra el efecto dependiente de la concentración del compuesto Epoxipregnenodiona, obteniendo la concentración del abatimiento del 50% (IC_{50}) de 20 µg/ml y 25 µg/ml 20 µg/ml por las células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente.

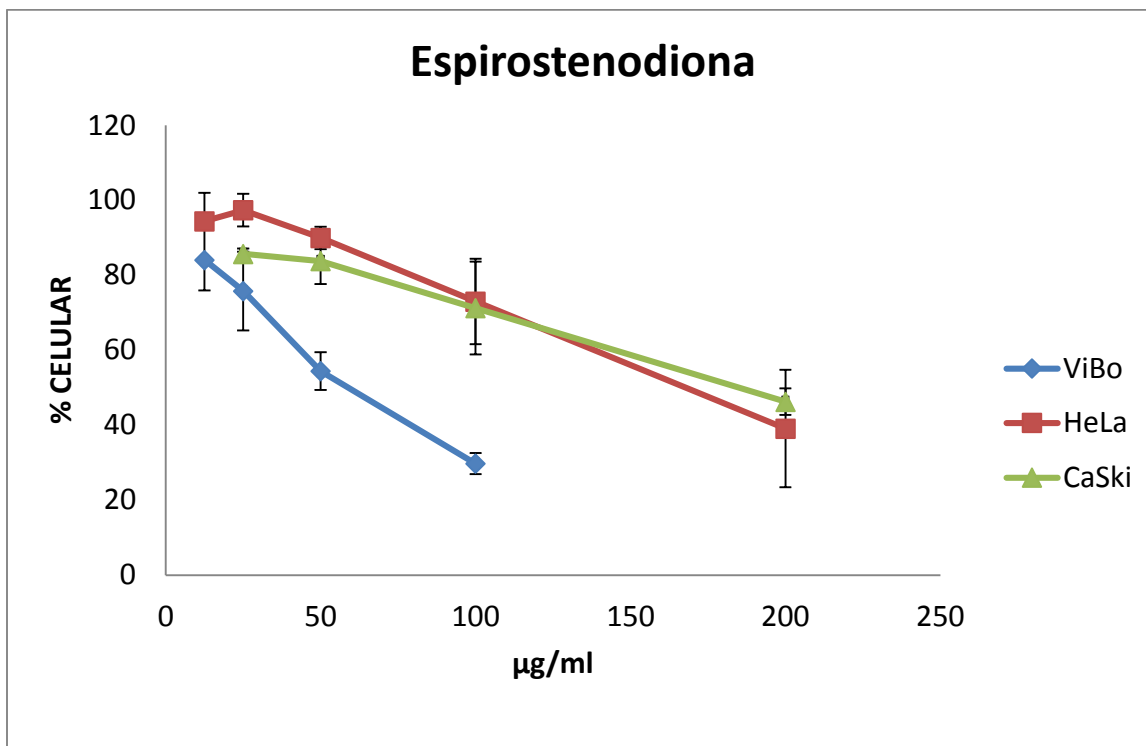


Figura 10. Efecto dosis-respuesta del compuesto Espirostenodiona sobre el potencia proliferativo en células HeLa CaSki y ViBo. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA). Ac-Et: Acetato de Etilo

En la figura 10 se muestra el efecto dependiente de la concentración del compuesto Espirostenodiona, obteniendo la concentración del abatimiento del 50% (IC_{50}) de fue de 170 $\mu\text{g/ml}$, 175 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ para las líneas celular HeLa, CaSki y ViBo respectivamente.

En la tabla 1 podemos ver un comparativo de las IC_{50} de Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona

	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$	
	Epoxipregnenodiona	Espirostenodiona
HeLa	20 $\mu\text{g/ml}$	170 $\mu\text{g/ml}$
CaSki	20 $\mu\text{g/ml}$	175 $\mu\text{g/ml}$
ViBo	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 1. Comparativa de IC_{50} de los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona

Como se puede observar el efecto biológico los dos compuestos, Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona son dependientes de la dosis suministrada, esto es, a mayor concentración disminuye el número celular, sin embargo, la sensibilidad de las células HeLa y CaSki para alcanzar la IC50 es mayor con Epoxipregnenodiona con una dosis aproximadamente 8 veces menor con respecto a Espirostenodiona, mientras que para ViBo el comportamiento se repite pero en un rango menor, con soloun tercio de la concentración en Espirostenodiona.

Simultáneamente cada uno de estos cultivos fueron fotografiados para un análisis por microscopia óptica, con la intención de evaluar y comparar el efecto morfológico que sufren las células al tratarlas a dichas concentraciones ya que este detrimento puede ser el reflejo de la detención en alguna fase del ciclo celular, algún tipo de muerte celular como necrosis o muerte programada (apoptosis) o una combinación de estos procesos.

Para las tres líneas celulares los cultivos control fueron tomados como testigo de comparación mientras que el Ac de Etilo fue considerado para descartar que este vehículo provocara algún efecto en la proliferación y morfología propia de cada línea celular a evaluar (figura 11).

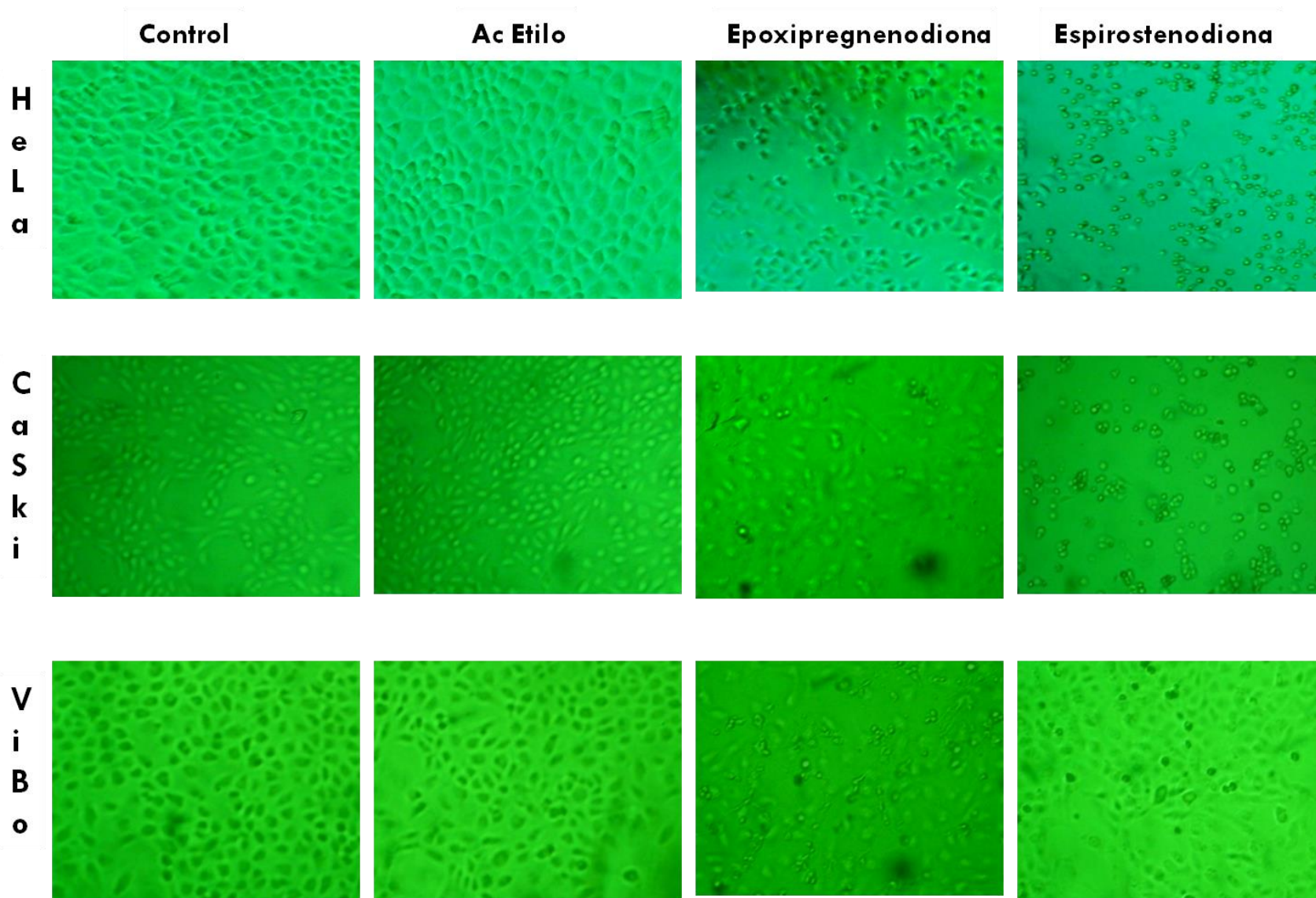


Figura 11. Efecto a las 24 horas de tratamiento con la IC_{50} de los compuesto Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona para las líneas células HeLa, CaSki y ViBo. Observadas y fotografiadas a 400 aumentos en un microscopio óptico invertido (Sedival).

Para las tres líneas celulares el análisis de microscopia óptica no presenta cambios entre el control y vehículo mostrando una confluencia del 90% aproximadamente además de una morfología y adherencia propia de cada línea celular. Mientras que los cultivos tratados con ambos compuestos son evidentemente alterados, como es la disminución del número celular, la pérdida de adherencia y cambios morfológicos, sin embargo se observan diferencias importantes en el efecto de cada compuesto entre cada línea celular.

HeLa: en las células tratadas con Epoxipregnenodiona su adherencia es mayor con respecto a Espirostenodiona además que esta última presenta una mayor condensación del citoplasma, pudiendo sugerir una muerte apoptótica.

CaSki: en las células tratadas con Epoxipregnenodiona se encuentran más hinchadas, y brillantes, aparentemente teniendo un proceso necrótico, en cuando a Espirostenodiona son más condensadas, redondas y flotantes, lo que indica un posiblemente proceso apoptótico.

ViBo, en los cultivos tratados con Espirostenodiona se observan una mayor cantidad de células con condensación de citoplasma, mientras que los cultivos tratados con Epoxipregnenodiona estas células presentan mayor cantidad de volumen y mayor brillantez.

Una vez determinando que se está llevando un decremento en el número celular y que se han observado cambios en la morfología celular, es importante saber si estos esteroides afectan alguna fase del ciclo celular, es por esto que cada uno de los cultivos celulares fueron tratados con la IC50 respectiva por 24 horas. La evaluación de la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular por medio de una citometría de flujo, arrojó los siguientes resultados (Fig.12).

Ciclo celular

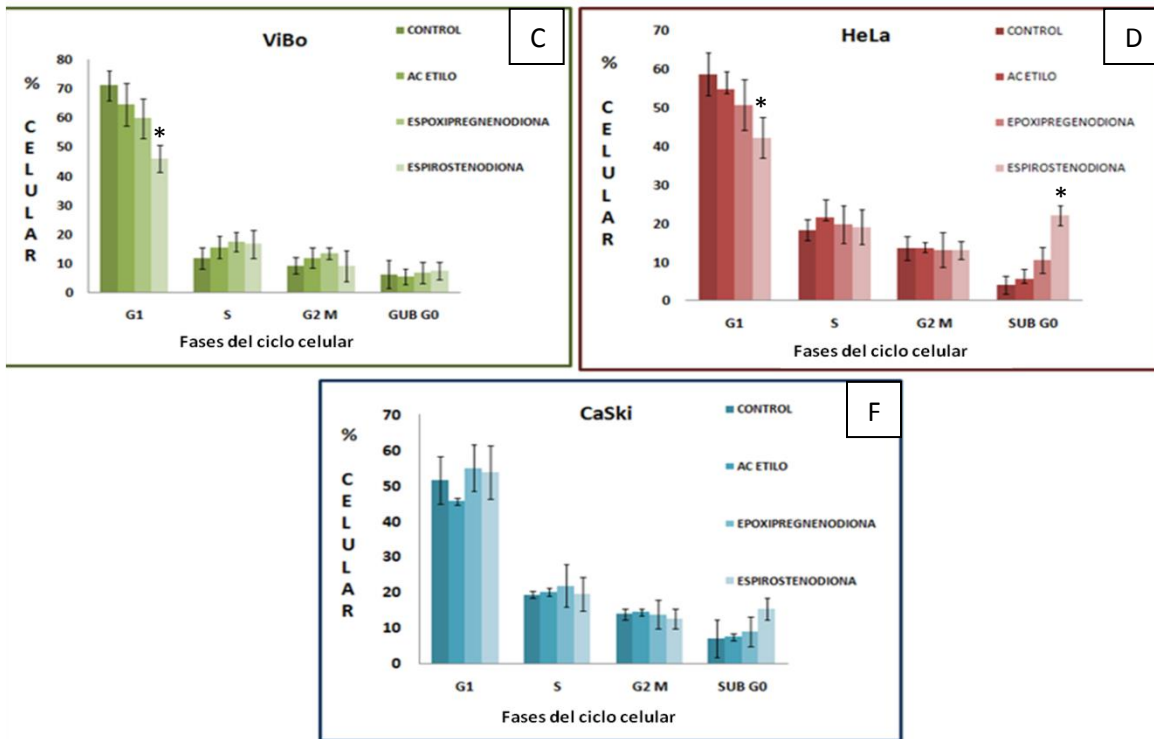


Figura 12. Evaluación de la distribución de ADN en cada fase del ciclo celular con la técnica de citometría de flujo para los cultivos celulares HeLa, CaSki y ViBo con las concentraciones de: 6C) 20 $\mu\text{g/ml}$ de Epoxipregnenodiona y 170 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona, 6D) 20 $\mu\text{g/ml}$ Epoxipregnenodiona y 175 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona. 6F) 25 $\mu\text{g/ml}$ Epoxipregnenodiona y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona. * $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA)

Para las tres líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo que fueron tratadas con epoxipregnenodiona por 24 h, no se observó ningún efecto significativo sobre las fases del ciclo celular, mientras que con espirostenodiona fue diferente en la fase G1 en la línea celular HeLa, observándose una disminución de la población de células presentes en esta fase G1 y un aumento en la región subG0 con respecto a las células control.

En CaSki se puede apreciar un ligero aumento en la región subG0, lo que sugiere un aumento en la población de células con menor cantidad de ADN, pudiendo tratarse de

muerte celular; mientras que para ViBo, en la fase G1 presenta un decremento, lo cual nos indica que el compuesto induce a la célula a salir del ciclo. Por otro lado en el caso de las células HeLa se pudo apreciar el efecto de estos dos eventos anteriores, por un lado el ligero decremento en G1 y el aumento en subG0.

Una vez determinado que el efecto de la IC50 de Epoxipregnenodiona no es dependiente del ciclo celular y que Espirostenodiona afecta a las células HeLa y ViBo en la fase G1, es necesario establecer si en el decremento del número celular se presenta una muerte silenciosa y programada (apoptosis) o bien, una muerte abrupta (necrosis).

Para saber si las células que se encuentran adheridas se encuentran en proceso de muerte por apoptosis se evaluó la presencia de la caspasa 3 además de la fragmentación de ADN.

Se puede observar que las células HeLa (Fig. 13) tratadas con Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona hay presencia de muerte apoptótica. En las micrografías de contraste de fases se aprecia la condensación citoplásmica, así como la fragmentación de cuerpos apoptóticos, en las micrografías de epifluorescencia que muestra la tinción de núcleos con el fluorocromo DAPI se observa la condensación de cromatina por efecto del compuesto Epoxipregnenodiona, sin embargo con el compuesto Espirostenodiona los núcleos aumentaron de tamaño no apreciándose fragmentación nuclear, además, tanto la Epoxipregnenodiona como la Espirostenodiona indujeron la activación de caspasa 3 así como la fragmentación de ADN. En la línea celular CaSki (Fig. 14) se observa compactación de la cromatina, así como la activación de caspasa 3 y la fragmentación de ADN. La línea celular ViBo (Fig. 15) presenta condensación de citoplasma y cromatina por efecto de Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona, sin embargo solo Espirostenodiona indujo una mínima cantidad de activación de caspasa 3 y fragmentación de ADN.

HELA

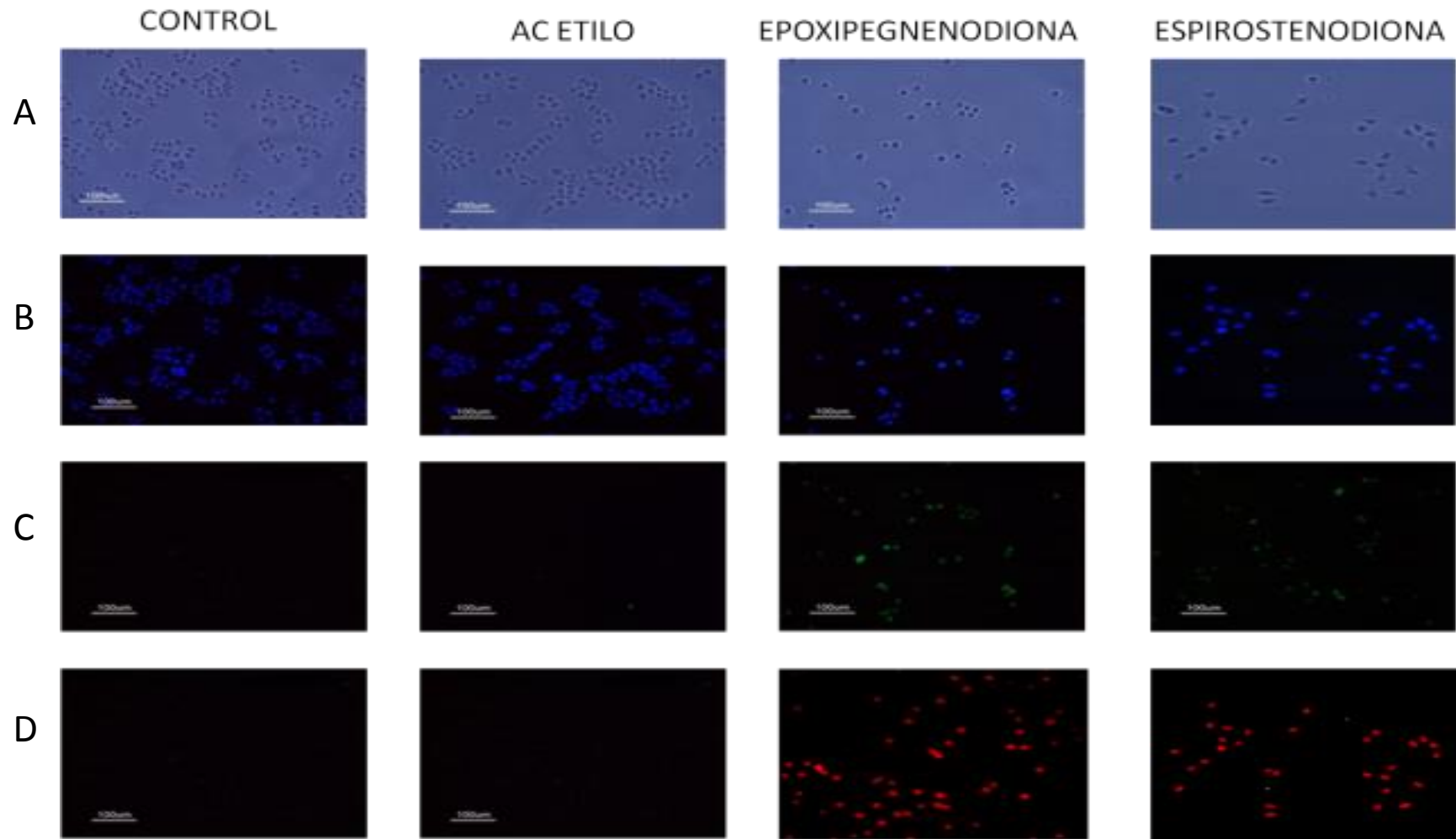


Figura 13. Células HeLa tratadas con 20 µg/ml de Epoxipregnenodiona y 170 µg/ml de Espirostenodiona por 24 horas, en la línea A contraste de fases, B marcaje de la cromatina con el fluorocromo DAPI, C expresión de la caspasa, determinada por inmunocitoquímica, D. evaluación de la fragmentación de ADN, a través de la técnica de TUNEL observando fluorescencia en rojo del fluorocromo rodamina determinada por inmunocitoquímica.

CaSki

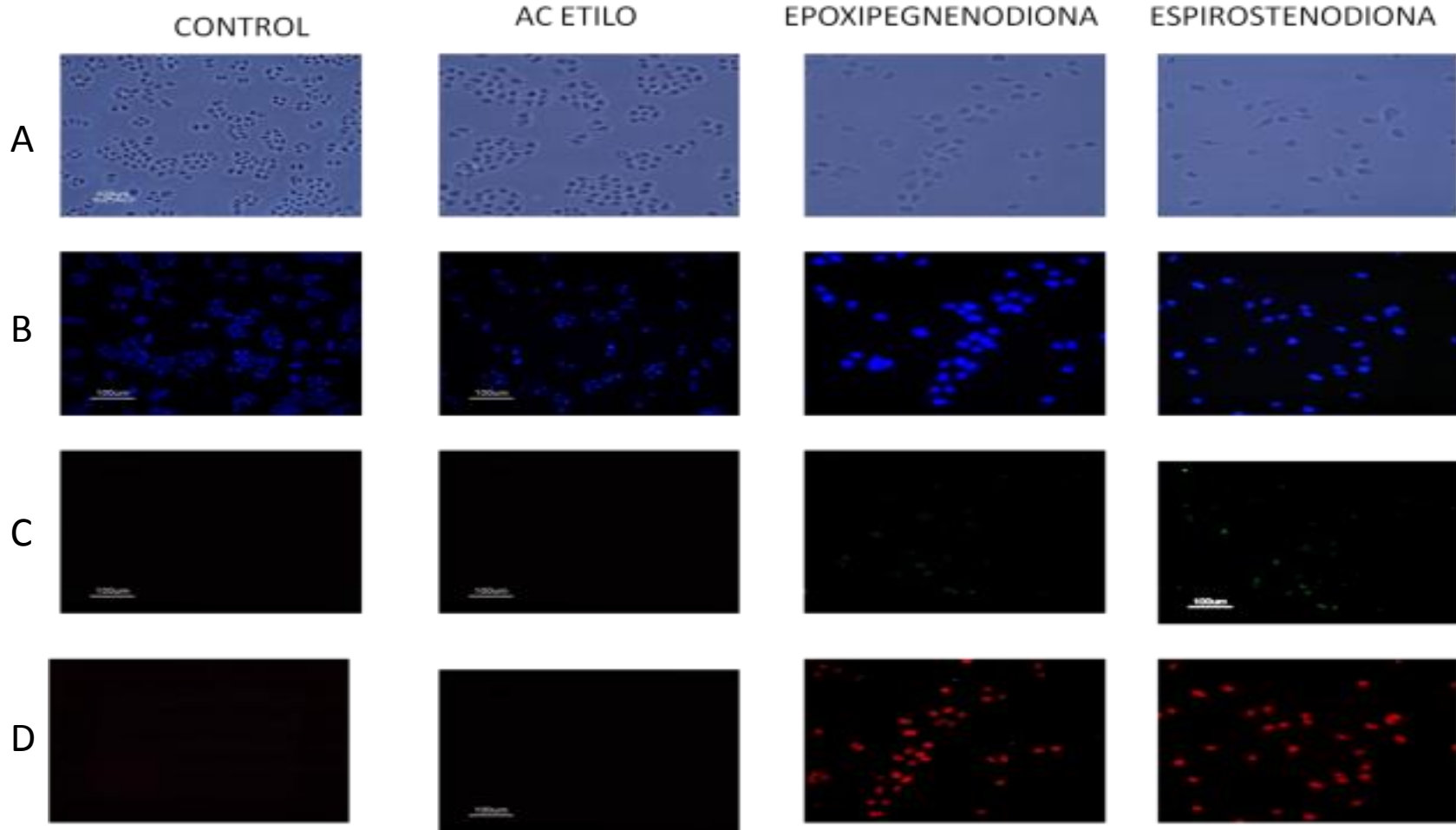


Figura 14. Células CaSki tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de Epoxipregnenodiona y 175 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona por 24 horas, en la línea A contraste de fases, B marcaje de la cromatina con el fluorocromo DAPI, C expresión de la caspasa, determinada por inmunocitoquímica, D evaluación de la fragmentación de ADN, a través de la técnica de TUNEL observando fluorescencia en rojo del fluorocromo rodamina determinada por Inmunocitoquímica

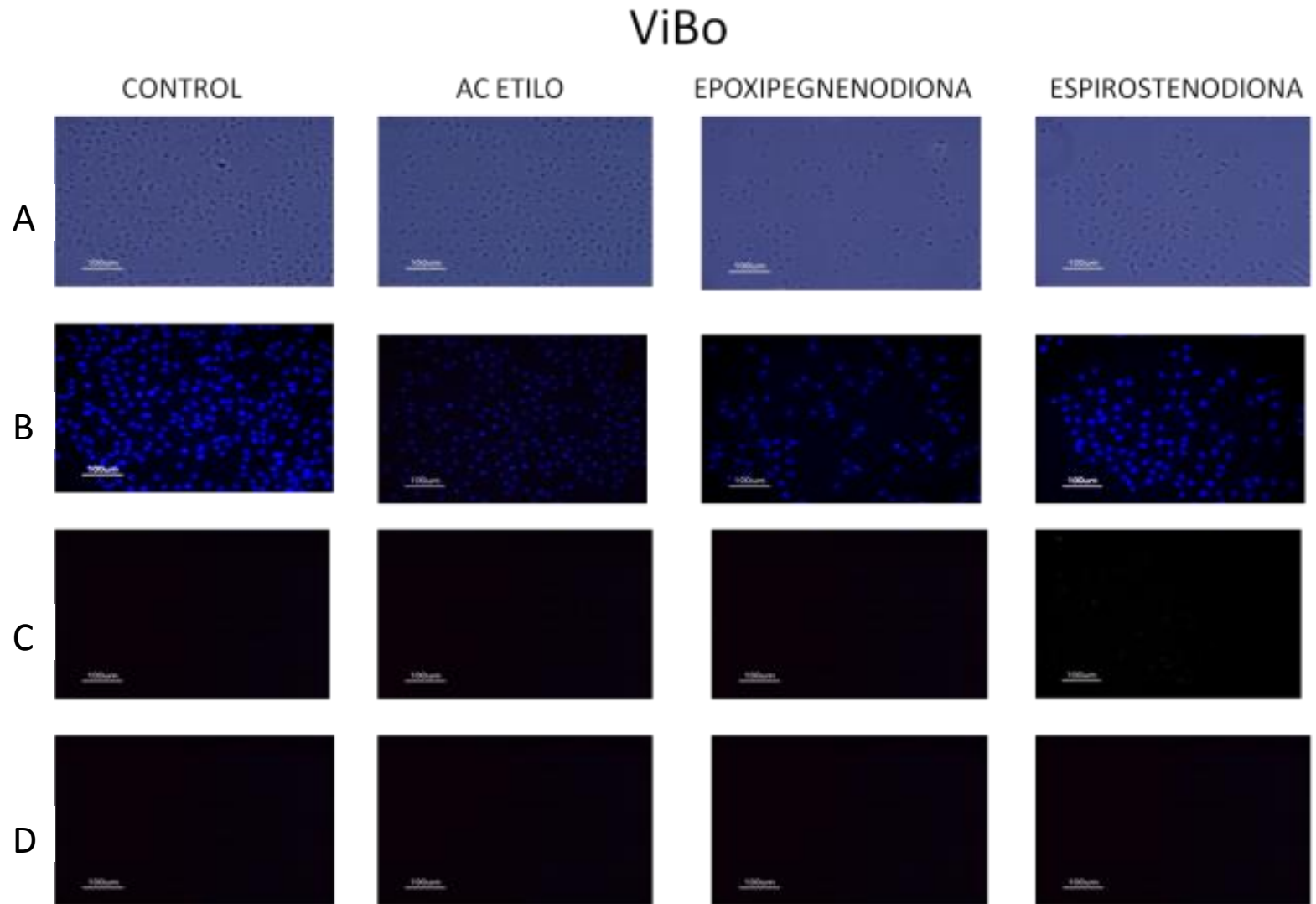


Figura 15. Celulas ViBo tratadas con 25 $\mu\text{g/ml}$ de Epoxipregnenodiona y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona por 24 horas, en la línea A contraste de fases, B marcaje de la cromatina con el fluorocromo DAPI, C expresión de la caspasa, determinada por inmunocitoquímica, D evaluación de la fragmentación de ADN, a través de la técnica de TUNEL observando fluorescencia en rojo del fluorocromo rodamina determinada por inmunocitoquímica

Después de haber determinado por microscopia de epifluorescencia que ambos compuestos están induciendo muerte celular por apoptosis, se determinó la presencia de muerte celular necrótica, por lo que se prosiguió a determinar si la enzima LDH se presenta en los sobrenadantes de cultivos de las tres líneas celulares, HeLa, CaSki y ViBo, tratados con los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona (figura 16).

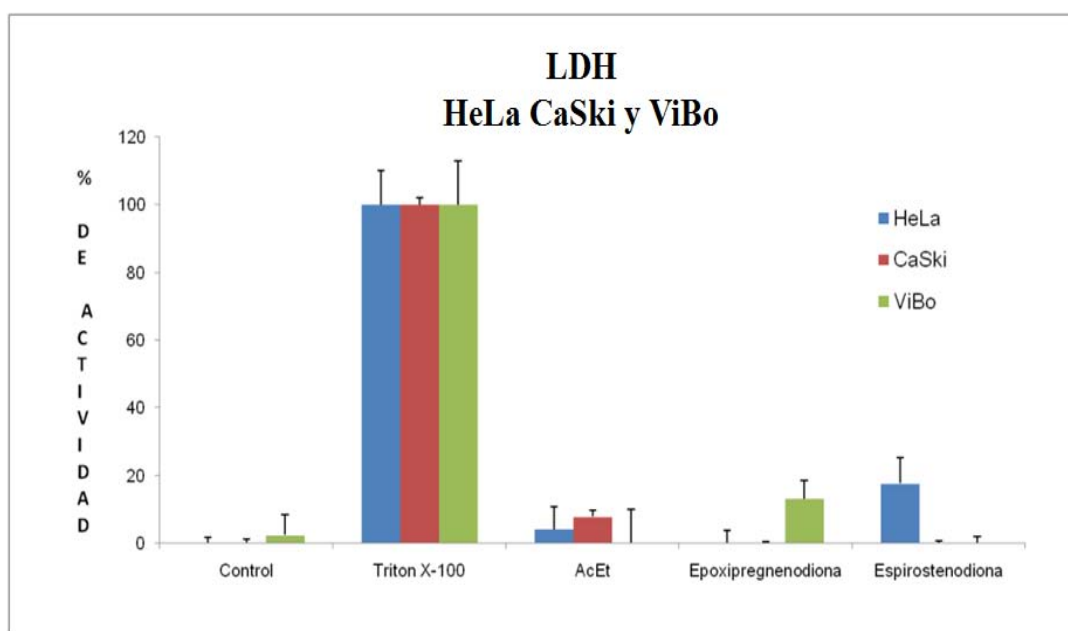


Figura 16. Evaluación de LDH presente en los sobrenadantes de cultivo de células HeLa, CaSki y ViBo, tratadas con: 20, 20 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de Epoxipregnenodiona respectivamente y 170, 175 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona respectivamente. $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA)

A pesar de presentarse un incremento en la cantidad de LDH para ViBo con epoxipregnenodiona y para HeLa con espirostenodiona, esta no es diferente de manera significativa siendo en alrededor de un 20% menos de células en ambos casos.

Una vez determinado que los compuestos epoxipregnenodiona y espirostenodiona afectan el potencial proliferativo de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo induciendo muerte celular por apoptosis, se procedió a explorar el efecto de estos compuestos en cultivos de

células linfocíticas humanas. Al estimular cultivos de células linfocíticas con 25 $\mu\text{g/ml}$ de epoxipregnenodiona, la concentración correspondiente a la IC50 de las células ViBo, se afectó el potencial proliferativos a las 72 h de tratamiento, disminuyendo un 56% la cantidad de células presentes en cultivo, comparado con cultivos de linfocitos activados sin ningún tratamiento. Con respecto a la espirostenodiona se usaron las concentraciones de 175 y 50 $\mu\text{g/ml}$ que corresponden a la IC50 más alta de las células CaSki y la IC50 más baja de las células ViBo respectivamente, determinándose que la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ no presenta un efecto negativo sobre la proliferación de células linfocíticas, sin embargo en la concentración de 175 $\mu\text{g/ml}$ la capacidad proliferativa disminuye 58%.

Los compuestos esteroideos con estructuras semejantes a sapogeninas, pueden inducir necrosis en células sanguíneas y dado que los compuestos epoxipregnenodiona y espirostenodiona guardan esta similitud, además de presentar un efecto antiproliferativo sobre cultivos de células linfocíticas, surge la necesidad de evaluar la presencia de la enzima LDH en los cultivos de éstas células. En la figura 17 se muestra que los cultivos de células linfocíticas, tratados con las IC50 más altas obtenidas para epoxipregnenodiona y espirostenodiona no presentaron LDH de manera significativa.

Proliferación de Linfocitos

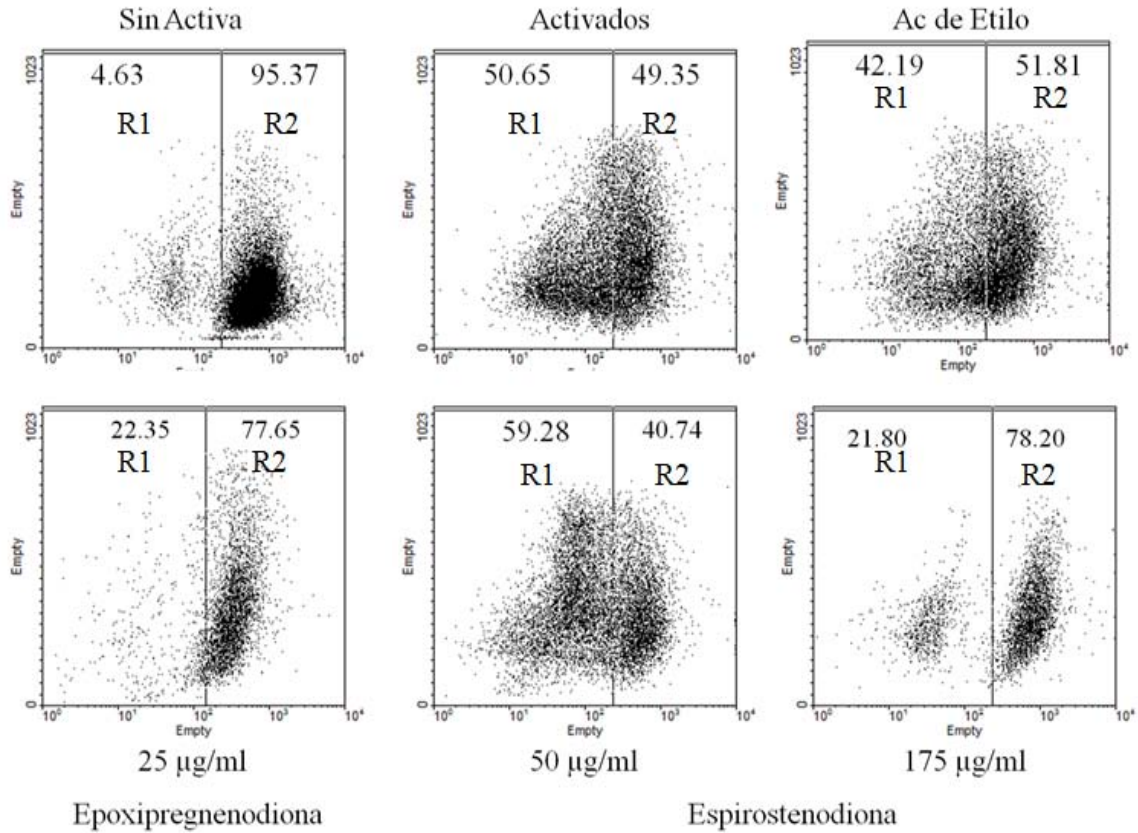


Figura 17. Linfocitos humanos de sangre periférica activados con FH, marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y tratados con 25 µg/ml de Epoxipregnenodiona, 50 y 170 µg/ml Espirostenodiona, se incubó por 72 horas y se evaluó por citometría de flujo. En la ventana R1 se muestra la población de linfocitos en proliferación, la ventana R2 corresponde a la población de linfocitos sin proliferar. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software FACSDiva 2.0.

LDH Linfocitos

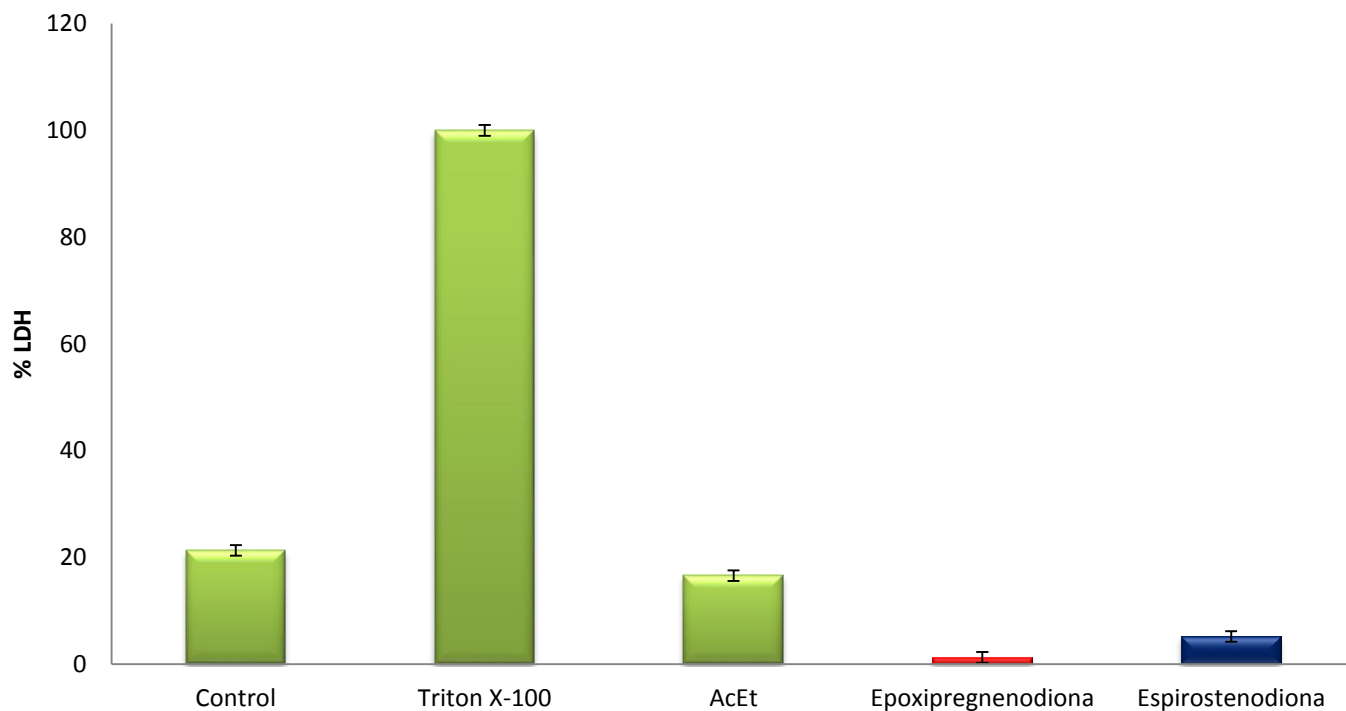


Figura 18. Evaluación de muerte por necrosis en cultivos de células linfocíticas. Determinación de la enzima LDH en sobrenadantes de cultivos tratados con los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona a las concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$ y 175 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. $p < 0.05$ vs Ac-Et (ANDEVA).

Una vez determinado que los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona afectan negativamente cultivos de linfocitos humanos se procedió a evaluar el efecto de estos compuestos en cultivos de células fibroblásticas provenientes de cérvix humano; se encontró que cultivos tratados con 25 $\mu\text{g/ml}$ epoxipregnenodiona no afecta la capacidad de proliferación, sin embargo 175 $\mu\text{g/ml}$ de Espirostenodiona disminuye un 40% la densidad celular de estos cultivos (fig. 19).

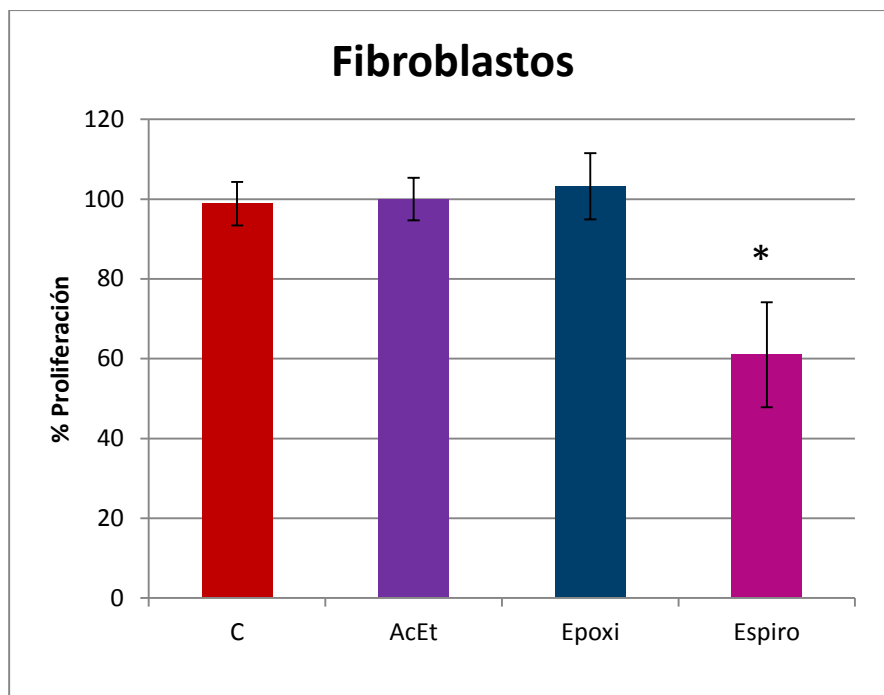


Figura 19. Células fibroblásticas de cérvix humano cultivadas en placas de 96 pozos, tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de epoxipregnenodiona y 175 $\mu\text{g/ml}$ de espirostenodiona respectivamente por 24 h y evaluadas por la técnica de cristal violeta. $p < 0.05$ vs Ac-Et. (ANDEVA).

Los cultivos tratados con los compuestos Epoxipregnenodiona y Espirostenodiona afectan la morfología celular, ya que induce retracción de células sin afectar el número celular en el caso de Epoxipregnenodiona, y de pérdida de adherencia en el caso de Epoxipregnenodiona afectando significativamente el número celular (fig. 20).

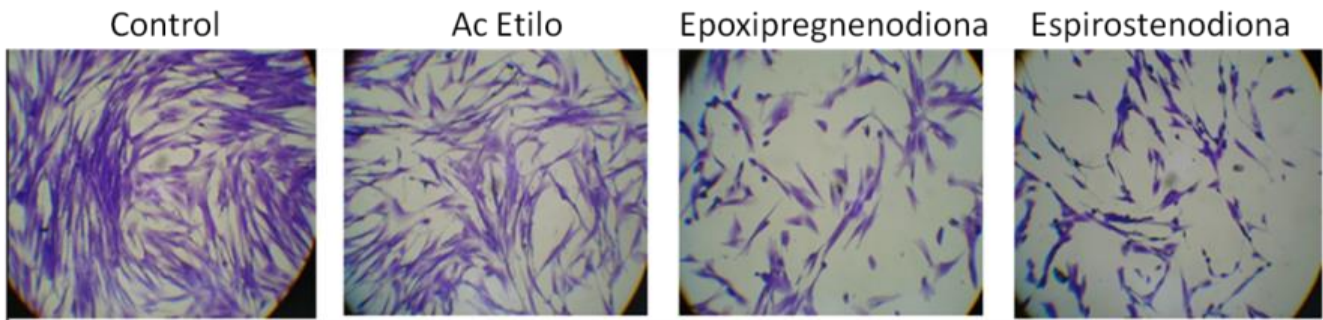


Figura 20. Efecto de Epoxipregnenodiona 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y Espirostenodiona 175 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales provenientes de cérvix humano. Las células fueron teñidas con el colorante cristal violeta y observadas en microscopio invertido 20X.

DISCUSIÓN

Para la síntesis de los compuestos con el sistema dicetonico se partió de distintos esteroides como materia prima. En el caso del 16-epoxi-Pregn-4-eno-3,6-diona se partió de colesterol para obtener como producto intermedio el 16-epoxi-Pregn-5-eno-3-ol, en el caso del (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona se partió de pregnenolona para obtener como producto intermedio diosgenina; ambos compuestos finales comparten entre si el grupo dicetonico que se muestra en la figura 21 en la cual se muestran también los grupos derivados de este esqueleto.

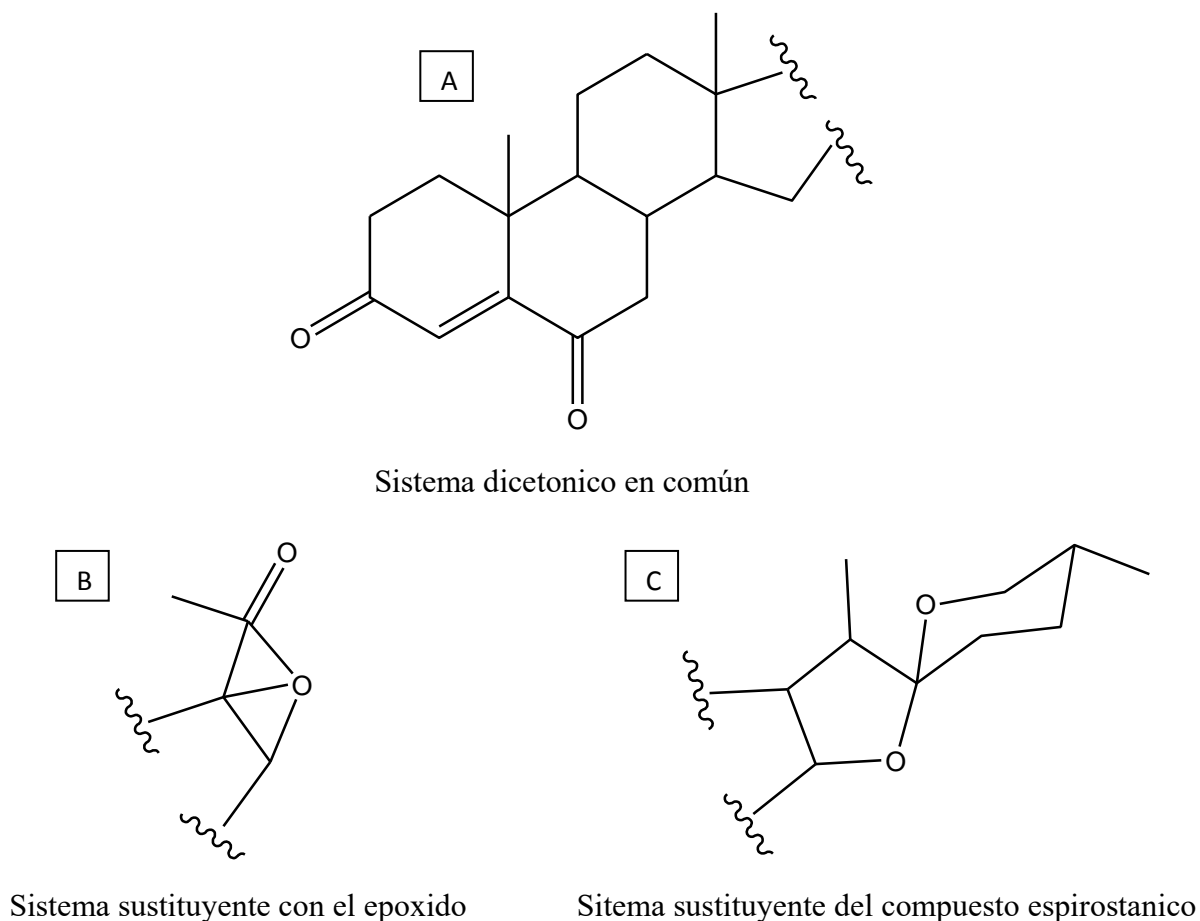


Figura 21. Estructura (A) del sistema dicetonico comun y de los sistemas sustituyentes (B) de Epoxipregnenodiona y (C) Espirostenodiona

Este sistema dicetónico se constituye de perhidrofenantreno (3 ciclohexanos unidos consecutivamente) con una instauración en el carbono 4 (anillo A) y con dos grupos cetónicos en los carbonos 3 y 6 a lo cual se abrevia como 4-eno-3,6-diona; a esta estructura se le relaciona en la literatura en primer lugar a actividad antifúngica y en segundo lugar a actividad citotóxica, por lo cual, al analizar la relación entre la actividad anticancerígena reportada en este trabajo y la actividad de compuestos similares reportada en otros trabajos, encontramos una gran cantidad de compuestos que tienen en común un doble enlace en el carbono 5 (anillo B) en lugar del doble enlace en el carbono 4 (anillo A) del sistema dicetónico, donde tenemos en general, derivados de la diosgenina y la hecogenina que no tienen dobles en ninguno de los anillos del perhidrofenantreno; ambos esteroides tienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 (anillo A).

La diosgenina y algunos de sus derivados presentan evidencias de actividad inhibitoria en células de leucemia y de cáncer de páncreas [45]) de inducir apoptosis en células diversas líneas celulares de cáncer; de leucemia [46, 47] en células de cáncer de mama⁴⁵, en células de cáncer de colon [48], osteosarcoma[49] y en células CasKi, HeLa y ViBo [50-52]. La hecogenina y algunos de sus derivados también tienen reportada actividad similar; inducir apoptosis en células diversas líneas celulares de cáncer; osteosarcoma[48]; leucemia, cáncer de mama [53] y en células CasKi, HeLa y ViBo [50, 51, 54].

El compuesto con el grupo epóxido presentó mayor solubilidad que el compuesto con el derivado espiroetano debido a la presencia del grupo epoxi, pero particularmente del grupo cetónico que le acompaña, siendo sitios de alta electronegatividad, lo cual le confiere polaridad a la molécula.

Es posible que la alta polaridad del compuesto epoxipregnenodiona sea una de las razones principales por las que la IC₅₀ se alcanza con una dosis mucho menor que las obtenidas para la espirostenodiona. En el caso del compuesto epoxipregnenodiona IC₅₀ de la línea celular ViBo es de 25 µg/ml, mayor que para las líneas celulares HeLa y CaSki 20 µg/ml, sin embargo para la IC₅₀ de la espirostenodiona es similar para las células HeLa y CaSki (170 y 175 µg/ml) y en las células ViBo es más baja, casi una tercera parte de las anteriores

(50 µg/ml); la diferencia de concentraciones entre epoxipregnenodiona y espirostenodiona es de casi 7.5 veces para las células HeLa y CaSki, y de una vez para las células ViBo.

Estas diferencias entre la actividad del compuesto y la línea celular se presentaron también en la determinación de efecto sobre la progresión del ciclo celular, una disminución de eventos cuantificados en la fase G1 de las células ViBo y un incremento en el número de fragmentos nucleares (M4 o SubG1) de las líneas HeLa y CaSki tratadas con la Espirostenodiona. Estos fragmentos nucleares hallados no parecen estar asociados a una fase particular del ciclo celular; pero de ello podemos inferir que tenemos eventos de muerte y que debido a los resultados de liberación de LDH, túnel y caspasa se trata de apoptosis en el caso de CaSki, de apoptosis y necrosis en el caso de HeLa. El hecho de que la actividad de la Espirostenodiona tenga una interferencia en la fase G1 del ciclo celular sugiere que este compuesto actúa sobre células que se encuentran en esta fase del ciclo celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos en LDH, Túnel y Caspasa para los tratamientos con Epoxipregnenodiona en las células HeLa, CaSki y ViBo, se presenta muerte celular por apoptosis, dada las características morfológicas de estas células, condensación citoplasmática, condensación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, así como la presencia de caspasa 3 activa y la fragmentación de ADN.

Es muy importante que los tratamientos para combatir el cáncer sean selectivos ya que este es un rasgo negativo que ha tenido la quimioterapia desde sus orígenes, afectando en muchas ocasiones y en gran medida a células del sistema inmunitario, como son los linfocitos, también células epiteliales, tejido muscular e incluso conectivo y células altamente diferenciadas. Sin embargo al tratar a cultivos de leucocitos humanos con la dosis IC50 más altas reportadas en este trabajo 25 µg/ml de Epoxipregnenodiona y 175 µg/ml de Espirostenodiona no causaron muerte por necrosis, incluso las concentraciones de LDH liberado al medio fueron significativamente menores que las que se presentaron en el control y el vehículo; además de afectaron de forma diferencial la proliferación de estas células. En este mismo sentido la Epoxipregnenodiona no afectó la proliferación de cultivos

de fibroblastos no tumorales de cérvix humano, sin embargo la Espirostenodiona si afecto significativamente su proliferación; por lo cual aunque ambos compuestos resultan interesantes en su papel selectivo la Epoxipregnenodiona es un candidato mucho mejor para continuar trabajando con él; posiblemente en modelos *in vivo*, además de tener una mayor potencia que la Espirostenodiona y ser inductor de apoptosis en las células positivas a VPH que fueron evaluadas.

De lo anterior podemos ver que a pesar de tener diferencias estructurales en actividad de estos compuestos a pesar de la diversidad de grupos sustituyentes que varían tanto principalmente en el carbono y en otras regiones del perhidrofenantreno[55], así como en la región sustituyente, se conserva actividad apoptótica sobre diversas líneas celulares de cáncer, en algunos casos pudiéndose comprobar baja toxicidad y cierta selectividad, es interesante la propuesta de Hamid y colaboradores en 2014 [56]; en la que nos presentan la afinidad estructural que estos compuestos tiene sobre regiones activadoras de caspasas ejecutoras; esto afirma y promueve la idea de que estos compuestos son interesantes como base molecular para la generación de más compuestos antitumorales de baja toxicidad y alta selectividad. Por otra parte parecen tener una mayor actividad los compuestos con grupos sustituyente hidroxilo, grupos cetónicos y acetilados que aquellos que carecen de estos sustituyentes o bien que tienen azúcares, o grupos sustituyentes más complejos, posiblemente debido a la actividad antioxidante de los grupos hidróxilo per se y de la actividad antioxidante que pueden tener los grupos cetónicos al transformarse en hidróxilo en medios reductores como un medio de cultivo en condiciones de poco estrés oxidativo; sin embargo estos fármacos cetónicos o acetilados podrían no tener esta misma actividad antioxidante en situaciones altamente oxidantes como las que se presentan en el medio extra e intra celular de los tejidos de organismos que han desarrollado algunos tipos de cáncer principalmente los asociados a envejecimiento y daño por ROS [57-59].

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones necesarias para inhibir la densidad poblacional en cultivo de células Hela y Caski y ViBo del compuesto 16-epoxi-pregn-4eno-3,6-diona son de 20 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y para el compuesto (25R)-espirost-4-eno-3,6-diona son de 170 $\mu\text{g/ml}$, 175 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
2. Epoxipregnenodiona actúan de forma independiente al ciclo celular. Espirostenodiona actúa preferencialmente en la fase G1 del ciclo celular.
3. Ambos compuestos inducen a una muerte por apoptosis en las células HeLa y CaSki.
4. No se presentan evidencia de muerte necrótica para ambos compuestos con ninguna de las tres líneas celulares empleadas.
5. El potencial proliferativo de células linfocíticas es afectado.
6. No se presenta disminución de fibroblastos en Epoxipregnenodiona, mientras que para Espirostenodiona solo existe esta disminución a altas concentraciones.

REFERENCIAS

- [1] Fidler IJ, Schackert G Fau - Zhang RD, Zhang Rd Fau - Radinsky R, Radinsky R Fau - Fujimaki T, Fujimaki T (1999) The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev***18(3)**, 387-400.
- [2] Fidler IJ (1997) Invasion and Metastasis In *Cancer Principles & practice of oncology*, Publishers L-R, ed., Philadelphia, p. 1035.
- [3] ohashinaturalmente.com, Infografía de una célula cancerígena, <http://www.ohashinaturalmente.com.mx/index.html>,
- [4] Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler MW, Friess H (2003) Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer***2**, 14-14.
- [5] López-Saavedra L-S (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología***1**, 31-55.
- [6] Vogelstein BKWK (2002) *The Genetic Basis of Human Cancer*, McGraw-Hill Professional.
- [7] OMS, Datos y cifras sobre el cáncer, <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>,
- [8] INEGI, Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)” datos nacionales, http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf,
- [9] Patricia Alonso MH, Eduardo Lazcano (2000) *Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. 2ª Edición 2000. pag: 81-99
- [10] Davies WPaP (2004) *Human papillomavirus and cervical cancer.*, Taylor & Francis Group.
- [11] Rabelo-Santos S, Zeferino L, Villa L, Sobrinho J, Amaral R, Magalhães A (2003) Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***98**, 181-184.
- [12] Morales MRC (2003) Cáncer cervicouterino y el VPH Opciones de detección. *Rev Fac Med UNAM***46**, 63-66.
- [13] Alexa María Machado Díaz NNRR, Conoce al virus del papiloma humano, http://cancer-cervix-honduras.webatu.com/web_images/estados_de_cervix.jpg,

- [14] Cardinal LH (2008) Anatomía e histología normal del cuello uterino, la vagina y la vulva In *Colposcopia y Patologías del tracto genital inferior - En la era de la vacunación*, Tatti S, ed. Editorial Médica Panamericana Buenos Aires, pp. 2-29.
- [15] fairview.org, Los resultados de la prueba de Papanicolaou (Pap), <https://www.fairview.org/fv/groups/public/documents/images/207423.jpg>,
- [16] Sergio Domínguez Arrevillaga RASG, Gerardo Becerra Victorio, Leticia del C Flores Alfaro, Ángel Lugo Trampe, Luis M Canseco Ávila, Karina del C Trujillo Murillo, Eleazar Serrano Guzmán, Marisol Espinoza Ruiz. (2011) Frecuencia genotípica del virus del papiloma humano en población general de la frontera sur de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* **31**, 6-10.
- [17] Munoz N, Bosch Fx Fau - de Sanjose S, de Sanjose S Fau - Herrero R, Herrero R Fau - Castellsague X, Castellsague X Fau - Shah KV, Shah Kv Fau - Snijders PJF, Snijders Pj Fau - Meijer CJLM, Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. pag: 518-527
- [18] Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50.
- [19] Moral JMVRGd (1995) *Laboratorio y atlas de citología (ciclo formativo grado superior sanidad)*, S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA.
- [20] Woodman CBJ, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* **7**, 11-22.
- [21] Lowy DR, Schiller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. *Journal of Clinical Investigation* **116**, 1167-1173.
- [22] Hazzard RW (2005) *Principles of geriatric medicine and gerontology*, Mc.Graw Hill.
- [23] Jonathan S. Berek NFH (2005) *Ginecología oncológica práctica*, Mc Graw Hill, México.
- [24] Austin RM, Chantziantoniou N (2014) George Nicholas Papanicolaou: the unlikely story of an intellectual immigrant; one driven to contribute on a large stage; one who finally succeeded by scientifically inspiring numerous cooperating individuals and organizations. *Journal of the American Society of Cytopathology* **3**, 331-334.

- [25] Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P (2013) Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology***25**, 578-585.
- [26] Hu Q, Sun W, Wang C, Gu Z (2016) Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews***98**, 19-34.
- [27] Oronsky B, Carter C, Scicinska A, Oronsky A, Oronsky N, Lybeck M, Scicinski J (2016) Medical Machiavellianism: the tradeoff between benefit and harm with targeted chemotherapy. *Oncotarget***7**, 9041-9045.
- [28] Pavet V, Portal Mm Fau - Moulin JC, Moulin Jc Fau - Herbrecht R, Herbrecht R Fau - Gronemeyer H, Gronemeyer H (2011) Towards novel paradigms for cancer therapy *Oncogene*. 2011 Jan 6;30(1):1-20. doi: 10.1038/onc.2010.460. Epub 2010 Oct 11..
- [29] Gupta A, Sathish Kumar B, Negi AS (2013) Current status on development of steroids as anticancer agents. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology***137**, 242-270.
- [30] Economides MP, Mahale P, Kyvernitakis A, Turturro F, Kantarjian H, Naing A, Hosry J, Shigle TL, Kaseb A, Torres HA (2016) Concomitant use of direct-acting antivirals and chemotherapy in hepatitis C virus-infected patients with cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Dec;44(11-12):1235-1241. doi: 10.1111/apt.13825. Epub 2016 Oct 11.
- [31] Santalova EA, Denisenko VA, Chernyshev AV, Gavagnin M, Sanamyan KE (2007) Ketosteroids from the far-east marine prosobranch mollusk *Onchidiopsis variegata*. *Chemistry of Natural Compounds***43**, 86-89.
- [32] Sarma NS, Krishna MS, Pasha SG, Rao TS, Venkateswarlu Y, Parameswaran PS (2009) Marine metabolites: the sterols of soft coral. *Chem Rev***109**, 2803-2828.
- [33] Tischler M, Ayer SW, Andersen RJ, Mitchell JF, Clardy J (1988) Anthosterones A and B, ring A contracted steroids from the sponge *Anthoracuata graceae*. *Canadian Journal of Chemistry***66**, 1173-1178.
- [34] Masuno MN, Pawlik Jr Fau - Molinski TF, Molinski TF (2004) Phorbasterones A-D, cytotoxic nor-ring A steroids from the sponge *Phorbac amaranthus*.

- [35] Sheu JH, Huang SY, Wang GH, Duh CY (1997) Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. *J Nat Prod***60**, 900-903.
- [36] Sheu JH, Wang Gh Fau - Sung PJ, Sung Pj Fau - Duh CY, Duh CY (1999) New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. *J Nat Prod*. 1999 Feb;**62**(2):224-7.
- [37] Bedir E, Khan Ia Fau - Walker LA, Walker LA (2002) Biologically active steroidal glycosides from *Tribulus terrestris*. *Pharmazie*. 2002 Jul;**57**(7):491-3.
- [38] Burgués Gasió JP, Pontones Moreno JL, Vera Donoso CD, Jiménez Cruz JF, Ozonas Moragues M (2005) Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas***29**, 846-859.
- [39] Biology, 6ta ed. Raven, P.H., Johnson, G.B. Times Mirrr/Mosby college Publishing
- [40] Gerald K (2007) *Biología celular y molecular* MCGRAW-HILL INTERAMERICANA.
- [41] Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science.
- [42] James D. Watson TB, Stephen Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick (2016) *Biología Molecular del Gen*, Editorial Médica Panamericana.
- [43] Wayne M.B. KLJ, Hardin J. (2007) *El mundo de la célula*, Pearson Educación S.A., Madrid.
- [44] D.C. MSJyD (1993) *Cultivo de las células animales*, Editorial Acriba, España.
- [45] Guo C, Fuchs PL (1998) The first synthesis of the aglycone of the potent anti-tumor steroidal saponin OSW-1. *Tetrahedron Letters***39**, 1099-1102.
- [46] Liu M-J, Wang Z, Ju Y, Zhou J-b, Wang Y, Wong RN-S (2004) The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin***27**, 1059-1065.
- [47] Jiang S, Fan J, Wang Q, Ju D, Feng M, Li J, Guan Z-b, An D, Wang X, Ye L (2016) Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells. *Phytomedicine***23**, 243-252.

- [48] Chiang C-T, Way T-D, Tsai S-J, Lin J-K (2007) Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Letters***581**, 5735-5742.
- [49] Corbière C, Battu S, Liagre B, Cardot PJP, Beneytout JL (2004) SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. *Journal of Chromatography B***808**, 255-262.
- [50] Fernández-Herrera MA, López-Muñoz H, Hernández-Vázquez JMV, López-Dávila M, Escobar-Sánchez ML, Sánchez-Sánchez L, Pinto BM, Sandoval-Ramírez J (2010) Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry***18**, 2474-2484.
- [51] Fernández-Herrera MA, Mohan S, López-Muñoz H, Hernández-Vázquez JMV, Pérez-Cervantes E, Escobar-Sánchez ML, Sánchez-Sánchez L, Regla I, Pinto BM, Sandoval-Ramírez J (2010) Synthesis of the 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 cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells. *European Journal of Medicinal Chemistry***45**, 4827-4837.
- [52] Fernández-Herrera MA, López-Muñoz H, Hernández-Vázquez JMV, López-Dávila M, Mohan S, Escobar-Sánchez ML, Sánchez-Sánchez L, Pinto BM, Sandoval-Ramírez J (2011) Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-22-oxocholest-5-en-26-yl β -d-glucopyranoside: A selective anticancer agent in cervicouterine cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry***46**, 3877-3886.
- [53] Pérez-Díaz JOH, Rárová L, Muñoz Ocampo JP, Magaña-Vergara NE, Farfán N, Strnad M, Santillan R (2012) Synthesis and biological activity of 23-ethylidene-26-hydroxy-22-oxocholestane derivatives from spirostanic sapogenins. *European Journal of Medicinal Chemistry***51**, 67-78.
- [54] Fernández-Herrera MA, Sandoval-Ramírez J, Sánchez-Sánchez L, López-Muñoz H, Escobar-Sánchez ML (2014) Probing the selective antitumor activity of 22-oxo-26-

- selenocynocholestane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry***74**, 451-460.
- [55] Saha P, Debnath C, Bérubé G (2013) Steroid-linked nitrogen mustards as potential anticancer therapeutics: A review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology***137**, 271-300.
- [56] Hamid AA, Hasanain M, Singh A, Bhukya B, Omprakash, Vasudev PG, Sarkar J, Chanda D, Khan F, Aiyelaagbe OO, Negi AS (2014) Synthesis of novel anticancer agents through opening of spiroacetal ring of diosgenin. *Steroids***87**, 108-118.
- [57] Dröge W (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews***82**, 47.
- [58] Łuczaj W, Gęgotek A, Skrzydlewska E Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*.
- [59] Pisoschi AM, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry***97**, 55-74.