



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO ANTITUMORAL DE SAPONINAS GLICOSILADAS DERIVADAS DE LA
DIOSGENINA EN LÍNEAS TUMORALES DE CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SERGIO IVÁN MARTÍNEZ MATA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO ANTITUMORAL DE SAPONINAS GLICOSILADAS DERIVADAS DE LA
DIOSGENINA EN LÍNEAS TUMORALES DE CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SERGIO IVÁN MARTÍNEZ MATA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al programa de becas para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con número de becario: 255881 y de CVU: 707976.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo en los proyectos IN222114 e IN220916.

También muchas gracias por la asesoría del director de tesis:
Dr. Luis Sánchez Sánchez

Y a los miembros del comité tutorial:
Dra. María Isabel Soto Cruz
Dra. María Luisa Escobar Sánchez

A mis hermanos Mario, Diana y Verónica
A Elena amiga y compañera

A la memoria de mi madre

Índice

Resumen	9
Abstract	10
Marco teórico	11
Necrosis	11
Apoptosis	12
Caspasa-3	14
Cáncer cervicouterino	16
Tratamiento del cáncer cérvicouterino	16
Saponinas	19
Justificación	23
Planteamiento del problema	24
Hipótesis	25
Objetivo general	26
Objetivos particulares	27
Material y método	28
Resultados	31
Discusión	44
Conclusión	47
Referencias	48
Apéndice	52

Resumen

El cáncer es una enfermedad causada por el descontrol de los mecanismos que regulan la proliferación celular y que tiene como consecuencia una sobrevivencia inapropiada de células dañadas, que eventualmente conllevan a la formación de un tumor (Wang *et al*, 2015). En particular, el cáncer cérvico-uterino (CaCU) es la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres en México (INEGI, 2017). Es por ello que la investigación básica se ha orientado hacia la búsqueda de terapias alternativas, las cuales se han enfocado principalmente al estudio de compuestos de origen vegetal. Las saponinas esteroides como la diosgenina y sus derivados glicosilados han generado un gran interés debido a sus diversas actividades biológicas entre las que destaca su actividad antitumoral. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la actividad biológica de las saponinas sobre líneas de CaCU. En el presente trabajo se determinó el efecto antiproliferativo de la diosgenina y tres de sus derivados (Diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11) en líneas de CaCU (CaSki, HeLa y ViBo). El efecto sobre la proliferación en células tumorales se determinó por medio de la técnica de tinción con cristal violeta, mientras que para las células no tumorales (linfocitos de sangre periférica de donantes sanos) la proliferación se determinó por marcaje con carboxifluoresceína, evaluadas por citometría de flujo. La muerte por necrosis fue determinada mediante la evaluación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos tratados con los fitoesteroides. Las características morfológicas de la muerte apoptótica se describieron mediante la observación en microscopios de campo claro, y sus características bioquímicas por microscopia de fluorescencia, por la presencia de la proteína proapoptótica caspasa-3 activa. Los resultados obtenidos muestran que la diosgenina y sus derivados glicosilados tienen un efecto antiproliferativo de manera dosis-dependiente en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a las 24 h de tratamiento con valores de IC_{50} que van de los 5.7 a 24.7 μ M, mientras que, en células no tumorales, estas mismas concentraciones afectaron en menor grado la proliferación de las células linfocíticas en un tiempo de 72 h (20%). Con respecto a la actividad necrótica de la diosgenina y sus derivados glicosilados, los fitoesteroides no indujeron necrosis en células tumorales ni en células linfocíticas, sin embargo, indujeron la muerte por apoptosis en células tumorales. Los fitoesteroides diosgenina y sus derivados presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células tumorales sin afectar significativamente a células no tumorales, sugiriendo que estos presentan una acción selectiva por lo que estos compuestos podrían ser evaluados para su uso terapéutico.

Abstract

Cancer is a disease caused by uncontrolled cell proliferation and an inappropriate survival of damaged cells, which eventually lead to tumor formation (Wang *et al*, 2015). In particular, cervical cancer (CaCU) is the third leading cause of cancer death in women in Mexico (INEGI, 2017). That is why basic research has been directed towards the search for alternative therapies, which have focused mainly on the study of compounds of plant origin. Steroid saponins such as Diosgenin and its glycosylated derivatives have generated a strong interest due to its diverse biological activities, among which its antitumor activity stands out. However, there are few studies on the biological activity of saponins on CaCU lines. In the present study, the antiproliferative effect of Diosgenin and three of its derivatives (Diosgenin-3-glu, MF-10 and MF-11) on CaCU lines (CaSki, HeLa and ViBo) were determined. The effect on proliferation in tumor cells was determined by the violet crystal assay, whereas for non-tumor cells (peripheral blood lymphocytes of healthy donors) the effect on proliferation was determined by carboxyfluorescein labeling, and assessed by flow cytometry. Necrosis death was determined by assessing the activity of the cytoplasmic enzyme Lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatants of phytosteroid treated cultures. Apoptotic death was described by its morphological characteristics through the observation in field and fluorescence microscopes and by its biochemical characteristics, by the presence of the proapoptotic Caspase-3 protein. The results obtained establish that Diosgenin and its glycosylated derivatives had a dose-dependent antiproliferative effect on HeLa, CaSki and ViBo tumor cells at 24 h of treatment with IC_{50} values ranging from 5.7 to 24.7 μ M, while that, in non-tumor cells, the same concentrations affected the lymphocyte cell proliferation to a lesser extent in 20% at 72 h time. With respect to the necrotic activity of Diosgenin and its glycosylated derivatives, phytosteroids did not induce necrosis in tumor cells or lymphocyte cells, however, they induced death by apoptosis in tumor cells. Phytosteroids Diosgenin and its derivatives have antiproliferative and apoptosis inducing activity in tumor cells without significantly affecting non-tumor cells, suggesting that they have a selective action so that these compounds could be evaluated for therapeutic use.

Marco teórico

El cáncer es una enfermedad causada por el descontrol de la proliferación celular y una sobrevivencia inapropiada de células dañadas, que eventualmente conllevan a la formación de un tumor (Wang *et al*, 2015). Las células acumulan mutaciones que provocan una proliferación no regulada por evasión de las señales de muerte apoptótica. Estas alteraciones, en conjunto, confieren a las células tumorales no sólo ventajas proliferativas, sino también una mayor susceptibilidad a la acumulación de alteraciones genéticas adicionales que contribuyen a la progresión del tumor y la adquisición de un fenotipo más agresivo (Malumbres y Barbacid, 2009). Normalmente la muerte de las células no tumorales puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados como la apoptosis, o por mecanismos no programados como la necrosis (Iracheta, 2007). Sin embargo, en las células tumorales la acumulación de mutaciones genera que las células ya no lleven a cabo los procesos de muerte programada, conduciendo a la aparición del cáncer.

Necrosis

De acuerdo a Jordán (2003) la necrosis es un evento causado por eventos físicos catastróficos violentos espontáneos. No requiere de energía para llevarse a cabo. Se caracteriza por la lisis celular, liberando el contenido intracelular al medio (Figura 1). Este tipo de muerte celular induce una reacción en cadena atrayendo a las células inflamatorias, generando más necrosis en el tejido

El término necrosis fue utilizado para muerte celular accidental, muerte celular no programada de células o tejidos, con un descontrol del contenido intracelular que resulta en inflamación. La necrosis es un término utilizado por patólogos para designar la suma de cambios que ocurren en la célula y tejidos después de la muerte. Morfológicamente, la necrosis se caracteriza por la hinchazón celular, incluyendo una dilatación del retículo endoplásmico, lisis celular y una subsecuente inflamación. Los eventos centrales de la necrosis son bioenergéticamente bajos y la integridad de la membrana celular se pierde rápidamente. Los cambios bioquímicos durante la necrosis incluyen un incremento en las especies reactivas de oxígeno mitocondriales, aumento de calcio mediado por canales, activación de proteasas no apoptóticas, hinchamiento de la mitocondria, agrupamiento perinuclear de orgánulos y destrucción enzimática de cofactores requeridos para la producción de ATP, lisis celular e inflamación (Vázquez *et al*, 2011).

Apoptosis

La **apoptosis** o muerte celular programada es un proceso en el que las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos (Figura 1). La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de

eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades. Algunos de los procesos fisiológicos y morfológicos de la apoptosis son:

- Aumento brusco de la densidad intracelular y un incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre en el citoplasma.
- Cambios en la composición de la membrana celular y alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto.
- Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.
- Condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos denominados oligonucleosomas (Jordán, 2003).

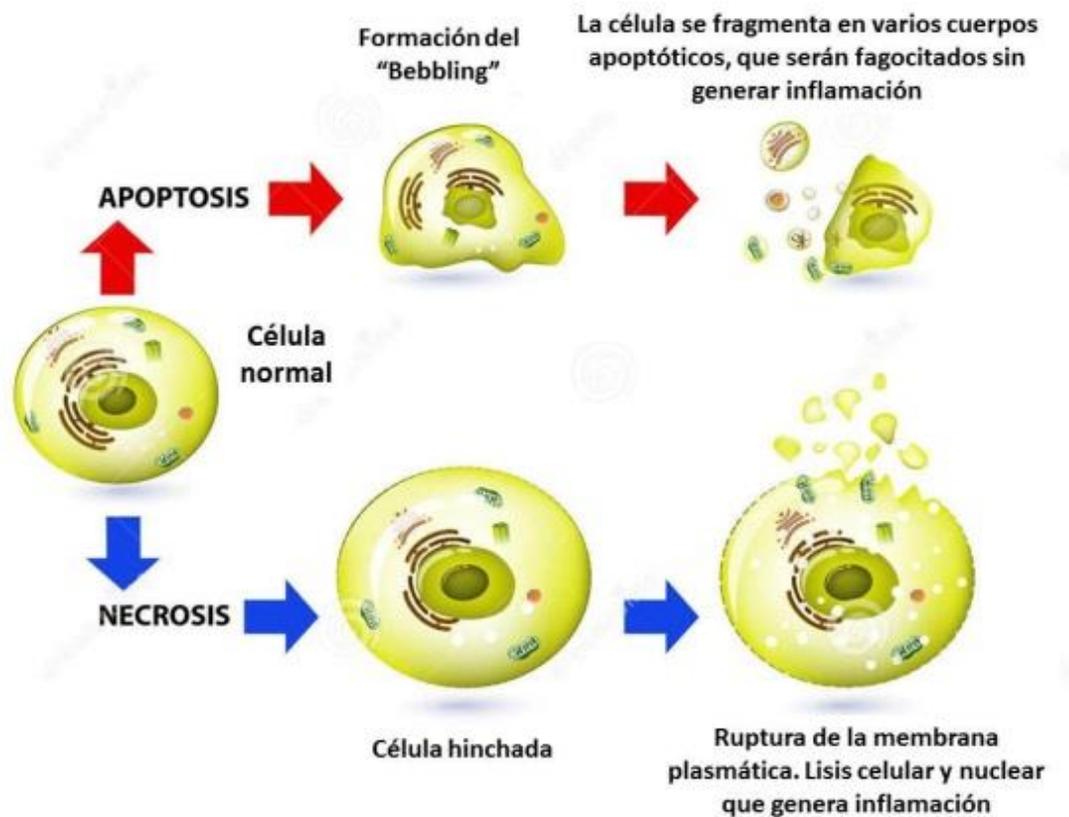


Figura 1.- Principales características morfológicas de una célula en procesos de apoptosis o necrosis (Tomado de <http://es.dreamstime.com/stock-de-ilustracin-apoptosis-y-necrosis-diferencia-image47670498>).

La apoptosis es considerada un proceso dependiente de energía altamente regulado, caracterizado por una morfología y procesos bioquímicos específicas, en las que la activación de Caspasas desempeña un papel central. Aunque muchas de las proteínas apoptóticas clave que se activan o inactivan en las vías de apoptosis ya han sido identificadas, los mecanismos moleculares de acción o

activación de estas proteínas no se entienden completamente y aún son el foco de investigación (Elmore, 2007).

La muerte celular apoptótica puede activarse a través de la vía intrínseca o de la vía extrínseca, dependiendo del origen del estímulo de muerte. La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores, como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Los ligandos de muerte son constitutivamente homotriméricos; la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo homotrimérico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y Caspasa-8, formando el complejo DISC (ver más adelante). La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras tales como Caspasa-8, la cual posteriormente rompe y activa a la caspasa efectora, Caspasa-3. La función de DISC en la activación de Caspasa-8 se piensa que es análoga a la activación de Caspasa-9 por el apoptosoma, aunque se desconocen los detalles del mecanismo molecular. Ambas vías pueden entrecruzarse a través de la degradación de Bid mediada por Caspasa-8, el cual conduce entonces a la activación de la vía mitocondrial. Otro grupo de receptores de muerte se ha caracterizado y muestran diferentes ligandos conocidos como Apo2L, y los TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF). Las células cancerígenas, pueden mostrar una sensibilidad relativa hacia la apoptosis mediada por TRAIL. La formación del complejo DISC y la degradación de Bid es similar a la vía Fas (Rojas *et al.*, 2009). En el cáncer ocurren mutaciones que conllevan a una transformación e inmortalización de las células, generando una proliferación descontrolada. Pero el cáncer no sólo se define por su alta tasa de proliferación no regulada, sino también por su capacidad metastásica.

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN. Esta vía es mediada por la mitocondria en respuesta a estímulos apoptóticos de diversas proteínas que son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de éstas proteínas están bien caracterizadas e incluyen: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 (proteína A2 requerida para las altas temperaturas). El citocromo C, se une y activa al factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de la Caspasa-9, y ésta a su vez activa a la principal caspasa efectora, la Caspasa-3 (Figura 2).

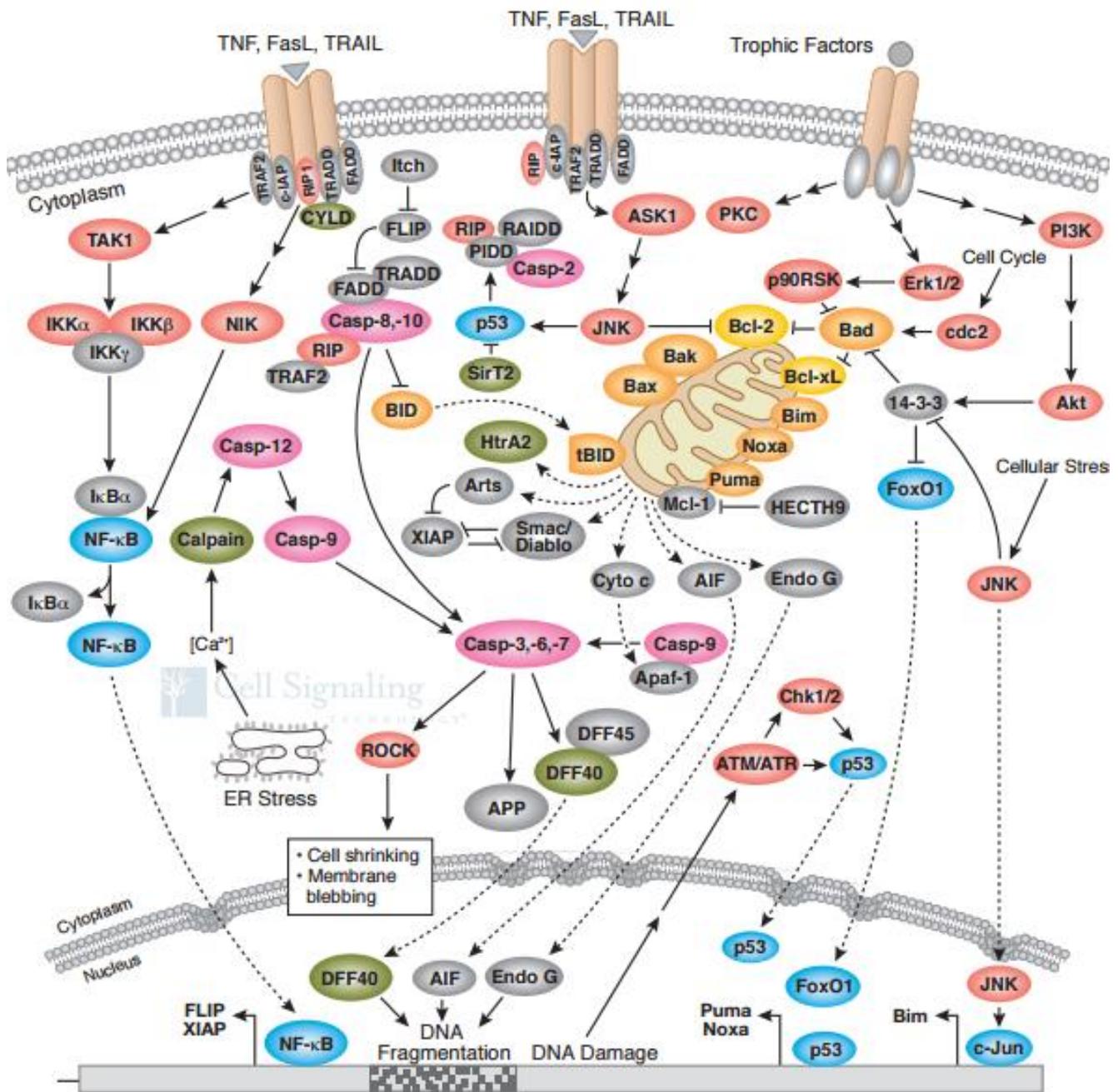


Figura 2. Cascada bioquímica de la apoptosis (tomado de Cell Signaling).

Caspasa-3

La Caspasa-3 es una cisteín-proteasa intracelular, que se activa como parte de la respuesta apoptótica a una lesión celular. Es una proteína de 277 aminoácidos, que se sintetiza como zimógeno, ésta cisteína-proteasa corta residuos de aspartato y está involucrada en el proceso de apoptosis. Existen tres grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras (-2,-8,-9,-10), efectoras (-3,-6,-7) e inflamatorias (-1, -4, -5, -12, -13, -14). Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas

efectoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción (Elinos, 2001).

La procaspasa-3 es un zimógeno de 32 kDa que se escinde en dos subunidades 17 kDa y 12 kDa. La subunidad grande (p17) comprende del residuo 29 al residuo 175 con un peso molecular calculado en 16,615 Da y contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACRG (Figura 3). La subunidad p12, abarca del residuo 176 al residuo 277 con un peso molecular calculado en 11,896 Da. Los residuos 64, 122, 161, 168, 204-209, 213 y 214 forman una hendidura para la unión del sustrato. Los residuos 121 y 163 conforman el sitio activo, la nitrosilación del residuo 163 (S-nitrosocisteína) inhibe la actividad de la proteína (Pubmed).

La activación de las caspasas involucra el procesamiento proteolítico, seguido por la asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. La estructura cristalina de dos de las caspasas activas (Caspasa-1 y -3) muestra que, en ambos casos, dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero, con dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente (Scott *et al*, 2003).

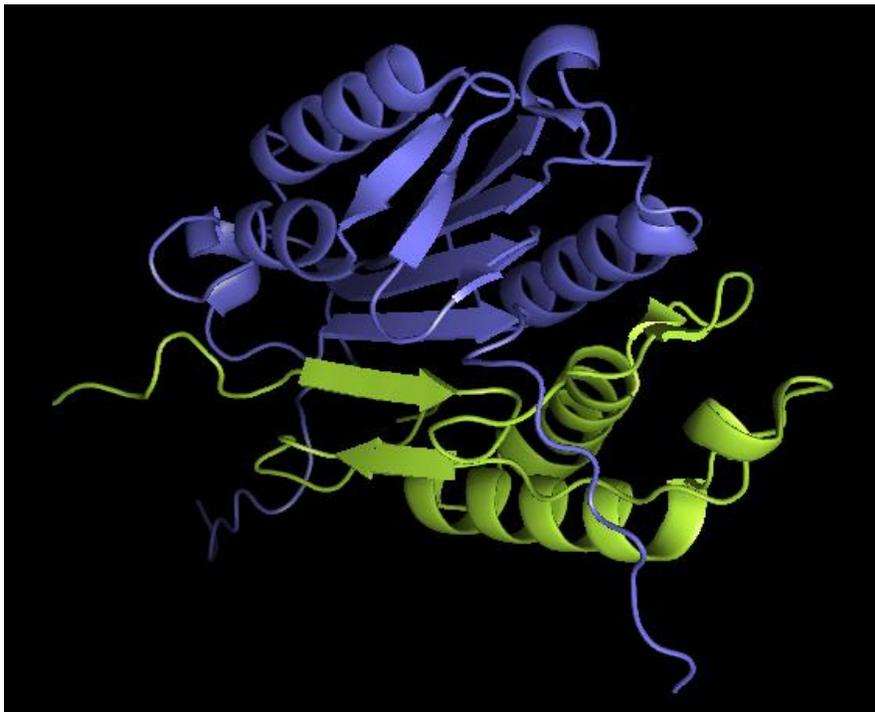


Figura 3. Estructura terciaria de la Caspasa-3. En azul la subunidad p17 y en verde la subunidad p12 (Secuencia de la Caspasa-3 de Homo sapiens obtenida del Protein Data Bank y la estructura fue modelada en PyMOL software).

Cáncer cervicouterino

En México en 2013, del total de defunciones de la población de 20 años y más, 13.6% se debieron a algún tumor y de éstas, 93.6% a los tumores malignos. Por sexo, del total de defunciones por cáncer, 48.8% ocurren en varones y 51.2%, en mujeres. Entre las mujeres el cáncer cervicouterino aparece como tercer lugar de mortalidad por cáncer en órganos genitales con 12.93 defunciones por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2016).

El cáncer de cuello uterino, vagina, vulva y área anogenital, además de verrugas genitales están asociadas con el Virus del Papiloma Humano (VPH). Los Virus del papiloma humano 16 y 18 se asocian con aproximadamente el 70% de los casos (Dorton *et al*, 2015).

Tratamiento del cáncer cervicouterino

La histerectomía es una cirugía que se realiza para extirpar el útero (tanto el cuerpo del útero como el cuello uterino), pero no las estructuras próximas al útero. Ni la vagina ni los ganglios linfáticos de la pelvis se extirpan. Los ovarios y las trompas de Falopio usualmente se dejan en su lugar a menos que haya otra razón para extirparlos. Por otro lado, la histerectomía radical es una operación en la que el cirujano extirpa el útero junto con los tejidos contiguos al útero, así como la parte superior de la vagina adyacente al cuello uterino. Los ovarios y las trompas de Falopio no se extirpan a no ser que haya otra razón médica para hacerlo. Esta cirugía usualmente se hace a través de una incisión abdominal. A menudo, también se extirpan algunos ganglios linfáticos pélvicos (American Cancer Society, 2017).

Como parte del tratamiento principal para algunas etapas del CaCU, se prefiere la radiación y la quimioterapia administradas en conjunto (quimiorradiación concurrente), además de la cirugía (Parcial, radical). La quimioterapia ayuda a que la radiación sea más eficaz, sensibilizando a las células tumorales. Las opciones de quimiorradiación concurrente incluyen: Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel (Taxol), Topotecán y Gemcitabina (Gemzar). A menudo se utilizan combinaciones de estos medicamentos. También se pueden usar algunos otros medicamentos, tales como Docetaxel (Taxotere), Ifosfamida (Ifex), y 5-fluorouracilo (5-FU), Irinotecán (Camptosar, CPT-11) y Mitomicina

El cisplatino, se administra semanalmente durante la radiación. Este medicamento se administra vía intravenosa. Como monoterapia la dosis sugerida es de 60 - 100 mg/m² cada 3 a 4 semanas. Cuando se usa en combinación con otros antineoplásicos en cáncer de testículo y ovario la dosis recomendada es de 20 mg/m²/día durante 5 días cada 3 semanas. La unión de complejos de cisplatino (cisdiaminodicloroplatino) al ADN induce ruptura y estiramiento de la doble hélice. Tiene propiedades similares a las de los agentes alquilantes bifuncionales. Experimentalmente se han observado propiedades inmunosupresoras que involucran a los linfocitos T y B. El 5-fluorouracilo se administra de 300 – 750 mg/kg durante 5 días pudiendo repetirse en ciclos mensuales siempre y cuando no se observen efectos tóxicos. Las dosis deben ser ajustadas a las respuestas obtenidas. El 5-fluorouracilo

es una pirimidina fluorinada. Su mecanismo de acción está dado principalmente por la inhibición competitiva de la timidilato-sintetasa, enzima que cataliza la metilación del ácido deoxiuridílico a ácido timidílico. Consecuentemente la deficiencia de timidina produce inhibición de la síntesis del ADN y la muerte celular (Zanetta *et al.* 1998).

Los medicamentos utilizados en la quimioterapia destruyen las células cancerosas, pero también dañan algunas células normales, lo que puede resultar en ciertos efectos secundarios. Los efectos secundarios dependen del tipo y dosis de los medicamentos administrados, así como del período durante el cual se administran. Algunos efectos secundarios comunes de la quimioterapia pueden incluir: náuseas y vómitos, pérdida del apetito, caída del cabello, úlceras en la boca, cansancio (fatiga). Como la quimioterapia también puede dañar las células de la médula ósea, los recuentos de células sanguíneas pueden bajar. Esto puede producir un aumento en la probabilidad de infecciones (debido a la escasez de glóbulos blancos). Pérdida de sangre o hematomas después de cortaduras o lesiones menores (debido a la escasez de plaquetas) (American Cancer Society, 2017).

Debido a los fuertes efectos secundarios se han descrito un sin número de compuestos con actividad antitumoral, sin embargo, la mayoría presenta actividad citotóxica, baja selectividad y los reportes carecen de controles con células no tumorales. Dichos compuestos son en su mayoría extraídos de plantas y modificados para evaluar su actividad antiproliferativa en distintos tipos de cáncer (Firemping *et al.* 2016)

En los últimos años ha crecido el interés en la química de los glicoconjugados, que resultan del enlace covalente de un azúcar llamado glicano con una proteína (glicoproteína) o un lípido (glicolípido). Las glicoproteínas de superficie celular, los glicolípidos, y otros proteoglicanos complejos de importancia inmunológica están implicados en una serie de procesos biológicos. Las partes oligosacáridas de los glicolípidos, glicoproteínas y lipopolisacáridos bacterianos han recibido mucha atención y han adquirido una importancia tan grande como la de las proteínas y los ácidos nucleicos.

En los seres vivos, los glúcidos cumplen funciones muy variadas tales como fuente y reserva de energía, estructura (celulosa, quitina, mucopolisacáridos) y reconocimiento, por mencionar algunas. La presencia de complejos de glúcidos con proteínas o lípidos en las membranas celulares confieren a éstas, propiedades que se manifiestan como fenómenos de reconocimiento celular. Los tipos de sangre del grupo ABO, se diferencian entre sí por la presencia de glúcidos diferentes en la superficie de los glóbulos rojos. En la relación hospedero-parásito la especificidad, está determinada por receptores en la superficie de las células del hospedero que son complementarios con moléculas en la superficie de los parásitos, por ejemplo, el virus que infecta a la planta de tabaco, no infecta a los humanos. Aun en el caso de animales de la misma especie, se presenta especificidad de los parásitos por algunos sujetos con alguna característica, como sucede con la bacteria *Helicobacter pylori* que infecta en mayor proporción a las personas con tipo de sangre O. En el caso de patógenos muy resistentes a antibióticos, para tratar de eliminarlos de las personas que infectan, se les ha inyectado algunos glúcidos específicos de los receptores donde se unen los patógenos, de esta manera estos

receptores quedan bloqueados y los patógenos ya no se pueden unir y por tanto ya no infectan al hospedero (Karp *et al.*, 2014).

En los aminoazúcares, uno de los grupos OH es sustituido por un NH₂. Como el grupo amino es más básico, en solución adquiere carga positiva y se hidrata, por ello encontramos aminoazúcares en los mucopolisacáridos. Aunque la sustitución se puede efectuar en cualquier átomo, lo más común es que sea en el carbono 2 de ahí que el nombre de aminoazúcares se reserve para los compuestos que tienen el amino en 2, cuando la sustitución es en cualquier otra posición, se debe indicar el número. Los aminoazúcares más abundantes son la glucosamina y la galactosamina. Son glúcidos de suma importancia biológica, esta importancia deriva principalmente de la aparición natural de los numerosos glicósidos de N-acetilglucosamina que están ampliamente distribuidos en organismos vivos donde constituyen bloques de construcción de glicoconjugados tales como peptidoglicanos, mucopolisacáridos (ácidos hialurónicos, sulfatos de queratano y regiones centrales internas y externas de glicoproteínas). También se encuentran en la leche humana, en sustancias de grupos sanguíneos, en antígenos lipopolisacáridos bacterianos donde forman parte de los epítomos, y en plantas (Banoub *et al.*, 1992).

La glicosilación tipo O-GlcNAcilación (O-GlcNAc), se describe como un proceso más similar a la fosforilación que se lleva a cabo después de la traducción, que a otras glicosilaciones. En la O-GlcNAcilación se une N-acetilglucosamina a los grupos hidroxilo de Serina y/o Treonina de las proteínas diana (Butkinaree *et al.*, 2010). Es una modificación dinámica postraducciona más análoga a la fosforilación que a la O-glicosilación. Un gran número de proteínas nucleares y citosólicas son modificados por O-GlcNAc. Las proteínas modificadas por O-GlcNAc incluyen factores de transcripción, componentes de señalización y enzimas metabólicas. Mientras que la modificación se conoce desde hace casi 20 años, las funciones para la modificación monosacárido apenas están surgiendo (Wells y Hart, 2003). La O-GlcNAc fue descubierta en la década de 1980 en estudios de membranas plasmáticas de linfocitos. Originalmente, se pensaba que la O-GlcNAcilación era una modificación de la superficie celular similar a otras modificaciones, sin embargo, se le ha visto implicada en muchas funciones intracelulares.

Proteínas O-GlcNAciladas pueden encontrarse en casi todos los compartimentos intracelulares. Aproximadamente una cuarta parte de las proteínas O-GlcNAciladas identificadas están involucradas en la transcripción o traducción como es el caso de la ARN polimerasa II y factores basales o específicos de la transcripción. La O-GlcNAcilación es abundante en proteínas implicadas en las respuestas al estrés y el metabolismo energético. Muchas proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto son O-GlcNAciladas, particularmente las implicadas en la reducción de la actina y las que regulan el ensamblaje de microtúbulos. Incluso la tubulina en sí es O-GlcNAcilada (Hart *et al.* 2007). Proteínas de filamentos intermedios tales como citoqueratinas y neurofilamentos son ampliamente modificadas por O-GlcNAciladas. Muchos de los sitios conocidos de O-GlcNAcilación tienen secuencias 'PEST' (Pro-Glu-Ser-Thr), una secuencia que está asociada con la degradación rápida lo que sugiere que O-GlcNAcilación en estos sitios podría retardar o prevenir la degradación (Hart *et al.* 2007). La glucosamina es un aminoazúcar que ha generado un fuerte interés debido a que se ha

descrito que se encuentra involucrada en diversos procesos dentro de la célula, en funciones de regulación sobre muchas moléculas de una amplia gama de vías de señalización. Por otro lado, las plantas medicinales se han utilizado para el tratamiento de enfermedades humanas debido a que producen una gran variedad de metabolitos secundarios tales como alcaloides, flavonoides, triterpenoides y glucósidos esteroideos. Los Saponinas esteroideas son importantes en las plantas medicinales y se les han atribuido una amplia gama de actividades biológicas, como anticancerígenos, anti-inflamatorio, inhibidores de la agregación de plaquetas, antihipertensivo, antifúngico y antiviral (Firemping *et al.* 2016).

Saponinas

Las saponinas son glucósidos de alto peso molecular, están constituidas por una fracción de azúcar unida a una aglicona. La definición típica de las saponinas está basada en sus características generales, muchas saponinas tienen propiedades detergentes, forman espumas estables en agua, presentan actividad hemolítica, tienen un sabor amargo y son tóxicas para los peces. Sin embargo, debido a las numerosas excepciones, las saponinas son ahora mejor definidas en base a su estructura molecular, llamándolas glucósidos triterpenoides o esteroideos. La porción aglicona (sin sacáridos) de la saponina es llamada genina o sapogenina (Hostettmann y Marston, 2005).

Las saponinas se producen en al menos 400 especies de plantas pertenecientes a 60 familias diferentes, alrededor de 28 se utilizan como alimento, como la soya, los garbanzos, los cacahuates, la espinaca y berenjena. Las saponinas esteroideas son poco frecuentes en animales. En el reino animal están presentes en estrellas y pepinos de mar, sólo se encuentra rara vez en los corales y esponjas (Williams y Gong, 2007). Basándose en las estructuras de los esqueletos de aglicona, las saponinas pueden usualmente dividirse en dos grupos principales, saponinas esteroideas y saponinas triterpénicas. Las saponinas esteroideas comprenden cuatro tipos representativos de esqueletos que son Espirostano (hexacíclico), Furostano (pentacíclico) y Colestano (tetracíclico) (Figura 4).

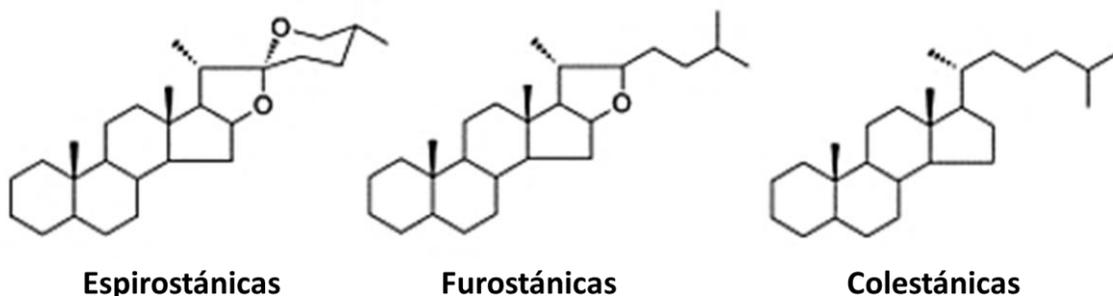


Figura 4. Estructura de los esqueletos de las saponinas. Espirostánicas (Seis anillos), Forostánicas (Cinco anillos) y Colestánicas (Cuatro anillos).

Por otro lado, el número de cadenas de sacáridos unidas al núcleo de la aglicona puede variar desde una, dos y tres, dando lugar a otra nomenclatura, donde se clasifican como monodesmosídicas, bidesmosídicas y tridesmosídicas, respectivamente. Los residuos de azúcar más comunes unidas son D-Glucosa (D-Glc), L-Ramnososa (L-Rha), D-ácido glucurónico (D-GlcA), D-Xylosa (D-Xyl), L-Arabinosa (L-Ara, en formas piranosa y furanosa), y D-Galactosa (D-Gal), mientras que los residuos de azúcar relativamente raros incluyen N-acetil-D-glucosamina (D-GlcNAc), D-Fucosa (D-Fuc), D-Quinovosa (D-Qui), D-Digitoxosa (D-Dig) y D-Apiosa (D-Api) (Figura 5).

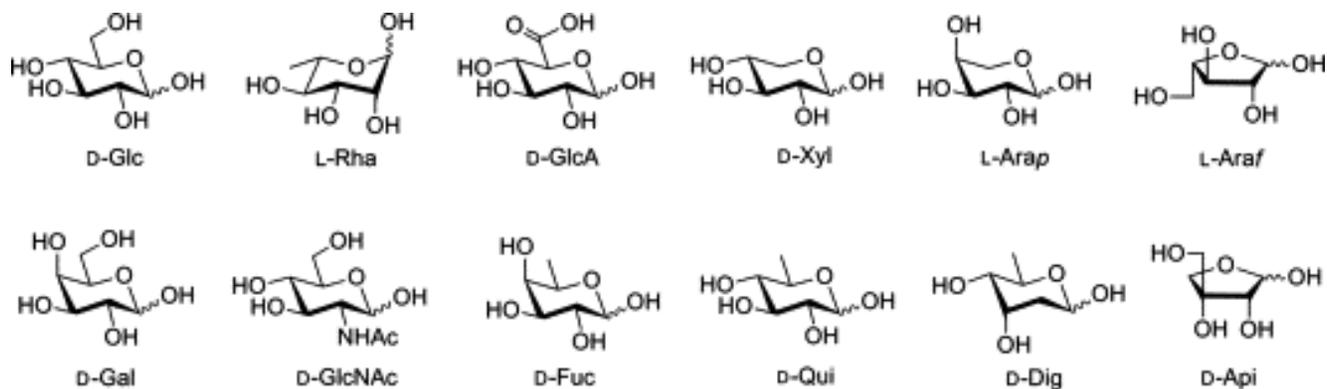


Figura 5. Estructura de carbohidratos comunmente encontrados en saponinas.

Hasta la fecha, se han reportado una amplia gama de estructuras químicas y actividades biológicas de saponinas; sin embargo, las relaciones estructura-actividad y los mecanismos de acción de éstas son aún poco conocidas. Las plantas ricas en saponinas, como *Panax ginseng* o *Glycyrrhiza glabra*, se han utilizado con fines medicinales desde la antigüedad (Fiore *et al.*, 2005) y hasta la fecha siguen desempeñando un papel importante no sólo en la medicina, sino también en la industria alimentaria y cosmética, donde se utilizan como emulsionantes o edulcorantes (Güçlü-Üstündağ y Mazza, 2007).

La síntesis industrial de las hormonas esteroideas comenzó a partir de compuestos de origen animal como el colesterol y ácidos biliares hasta que, a mediados de la década de 1940, Russell Marker desarrolló un proceso para la síntesis de progesterona, estrona y testosterona a partir de la diosgenina, un compuesto aislado especialmente de la raíz de la familia Dioscoreáceas (Lehmann *et al.*, 1973).

Las saponinas suelen atraer la atención de los investigadores a causa de sus actividades farmacológicas. Muchos informes han descrito la estructura química de saponinas y sus bio-actividades como analgésica, antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante y estimulante del sistema inmune (Kiasalari *et al.*, 2017; Kohara *et al.*, 2005).

Las saponinas esteroideas, parecen ser candidatos prometedores en el tratamiento contra el cáncer ya que se les atribuyen actividades biológicas importantes como su actividad antiproliferativa, antiinflamatoria y antitumoral. Muchas plantas sintetizan metabolitos secundarios antimicrobianos

como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, a menudo la acumulación de ellos en los tejidos puede proteger contra el ataque microbiano. Estos incluyen saponinas, productos naturales que son explotados por el hombre para una variedad de propósitos, incluyendo el uso como fármacos (Hostettmann & Marston, 1995). Las saponinas son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, ampliamente distribuidos en animales, plantas y hongos. La química medicinal de las saponinas esteroideas ha generado una gran variedad de estructuras y actividades biológicas. Este grupo de productos naturales ha sido ampliamente estudiado en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones, diabetes y cáncer, entre otros (Fernández *et al*, 2012). Éstas incrementan la permeabilidad de las membranas celulares; tienen propiedades hemolíticas, son tóxicas si se inyectan, sin embargo, por vía oral son prácticamente inactivas (Anaya, 2003). Una saponina que ha sido ampliamente estudiada es la diosgenina, se ha utilizado como material de partida para la obtención de diversos compuestos esteroideos. Diosgenina ha ganado importancia en la industria farmacéutica como el principal precursor en la fabricación de esteroideos sintéticos (Anil y Durga, 1981) y recientemente, se encontró que la diosgenina posee actividad antiproliferativa en varias líneas celulares; como HeLa (Huo *et al*, 2004), HEL y K562 (eritroleucemia) (Bertrand *et al*, 2008); osteosarcoma 1547 (Trouillas *et al*, 2004), HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular) (Li *et al*, 2010), MCF-7 (cáncer de mama) (Li *et al*, 2005). Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo (Raju *et al*, 2009).

Aunque la aglicona desempeña el papel principal en la actividad biológica, es bien sabido que los residuos de azúcares tienen un papel muy importante en la actividad de los glucósidos esteroideos, por ejemplo, aumentando la solubilidad en medios fisiológicos y ayudando con la permeabilidad celular y la vida útil, así como en la dirección de la molécula al sitio activo. Tras diversas pruebas biológicas, se concluyó que ambos, aglicona y residuos de azúcar son esenciales para la actividad (Tschamber *et al*, 2007). En general se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado (Fernández *et al.*, 2009). No obstante, la mayoría de las saponinas esteroideas han sido evaluadas como sapogeninas (sin la parte glicosídica), dejando de lado las propiedades biológicas que el azúcar pueda contribuir a la función de la saponina. Además, en el caso de la actividad antitumoral, generalmente la parte glicosídica está relacionada con la actividad antiproliferativa, sin evaluar su papel en la actividad citotóxica o actividad inductora de muerte celular programada. Al respecto se desconoce si nuevas saponinas o sapogeninas presentan actividad antitumoral, también se desconoce el tipo de azúcar y la posición de ésta en la aglicona que le permita a la molécula incrementar o disminuir su actividad biológica, específicamente su actividad antiproliferativa y apoptótica, por ello, en el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de derivados glicosilados de diosgenina en líneas celulares de cáncer cervicouterino, con el objetivo de establecer su potencial antitumoral *in vitro* así como analizar la relación estructura-actividad entre los azúcares y el esteroide, tomando como modelo a la diosgenina y sus glicósidos Diosgenina-3-glu, 2-deoxi-2-acetamido-beta-D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-10) y clorhidrato de 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) (Figura 6).

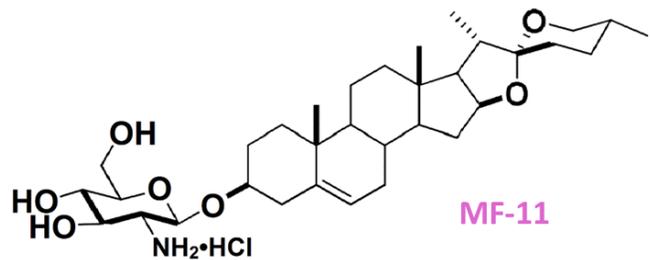
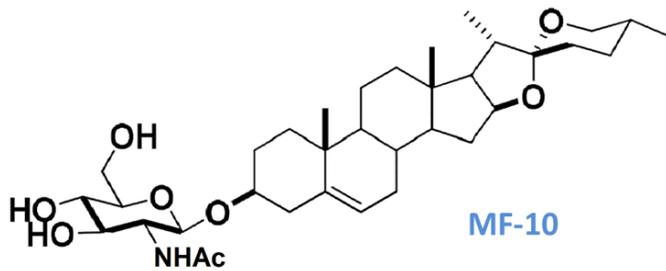
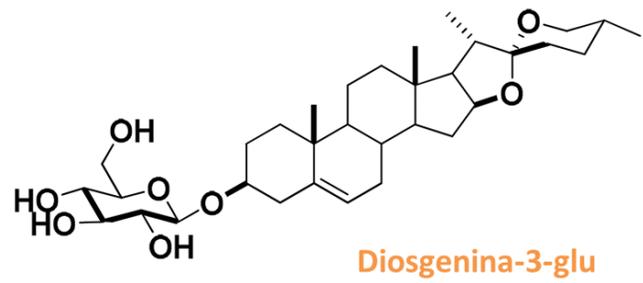
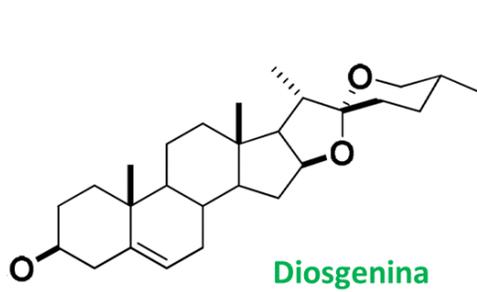


Figura 6. Estructura de las moléculas diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 (Cortesía del Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Justificación

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 20 años a nivel nacional precedido por el cáncer de mama (INEGI, 2016). Los medicamentos utilizados en quimioterapia afectan a las células cancerígenas, pero también dañan a células no tumorales, lo que genera efectos secundarios. Los efectos secundarios dependen del tipo y dosis de los medicamentos administrados, así como del tiempo durante el cual se administran (American Cancer Society). Se han descrito diversos compuestos con actividad antitumoral, sin embargo, la mayoría presenta actividad necrótica, baja selectividad y los reportes carecen de controles con células no tumorales. Dichos compuestos son en su mayoría extraídos de plantas y modificados para evaluar su actividad antiproliferativa en distintos tipos de cáncer. Además, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos compuestos sobre el CaCU, por lo que es necesario generar información acerca de la actividad de las saponinas esteroides como un posible agente terapéutico contra el cáncer.

Planteamiento del problema

Los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento contra el cáncer resultan ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, poco selectivos, citotóxicos y con efectos secundarios graves, los cuales están directamente relacionados con su actividad citotóxica. Por ello, es necesario buscar o sintetizar nuevos compuestos con actividad antiproliferativa, selectivos y de nula o baja citotoxicidad en células no tumorales. Al respecto, se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos, dentro de los cuales las saponinas esteroideas han generado un gran interés debido a su diversa actividad biológica, entre las que se destaca su actividad antitumoral.

Hipótesis

En la actividad biológica de las saponinas se ha descrito que la estructura esteroideal así como sus glucósidos son de gran importancia, sugiriendo que una modificación puntual en cualquiera de ambas estructuras modificara la actividad biológica de éstas. Con base a ello, se genera la posibilidad de que los derivados de la diosgenina (Diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11) afecten la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la diosgenina de una manera positiva o negativa en cultivos de células de cáncer cervicouterino.

Objetivo general

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico (citotóxico) y apoptótico de la diosgenina y sus derivados glicosilados: Diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11, en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, provenientes de cáncer cervicouterino, así como en cultivos de células no tumorales.

Objetivos particulares

- Establecer cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, provenientes de CaCU.
- Determinar si la diosgenina y sus derivados diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11, presentan actividad antiproliferativa en las líneas tumorales, expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir el decremento del 50% de la densidad celular (IC_{50}).
- Evaluar el efecto citotóxico (necrótico) de los compuestos sobre líneas celulares tumorales, así como en células no tumorales (linfocitos humanos).
- Determinar si la diosgenina y sus derivados glicosilados, inducen en las células tumorales las características morfológicas apoptóticas (contracción celular, condensación de la cromatina, cuerpos apoptóticos, fragmentación nuclear) así como, la presencia de la Caspasa-3 activa.
- Evaluar si las IC_{50} obtenidas para las células tumorales afectan el potencial proliferativo de células no tumorales (linfocitos humanos).

Material y método

Cultivo de células tumorales

Las células CaSki, HeLa y ViBo provenientes de CaCU, fueron sembradas en cajas de Petri, con 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco BRL, EUA) suplementado con L-glutamina y rojo de fenol, con 5 % de Suero Fetal Bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación (Nuair, USA). Para realizar los ensayos, los cultivos se desarrollaron hasta un 60-70% de saturación de la densidad celular.

Preparación de los compuestos

Los compuestos fueron extraídos, sintetizados y proporcionados en sólido por el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Para su uso se disolvió 1 mg de cada uno de los compuestos en 100 µl DMSO (MF-10 y MF-11) o una mezcla de Etanol-DMSO 3:1 (Diosgenina y diosgenina-3-glu). No se observaron cristales en de las soluciones de los compuestos al ser mezclados con el medio de cultivo y ser observados al microscopio con un objetivo de 20X y un ocular de 10X (200 aumentos). A partir de los stocks se tomó la cantidad necesaria de compuesto para realizar las curvas dosis-respuesta y posteriormente preparar las concentraciones de IC₅₀.

Cuantificación del número celular por tinción con cristal violeta

Se realizaron cultivos de las líneas de CaCU CaSki, HeLa y ViBo en placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (7,500 células/pozo), con medio de cultivo RPMI 1640 al 5% SFB por 24 h, transcurridas 24 h de adhesión, se trataron los cultivos retirando el medio y colocando medio con las condiciones que a continuación se describen: Control testigo, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco; Control del vehículo, células tratadas con la máxima cantidad de volumen del disolvente para el compuesto; Tratamientos, una curva con distintas concentraciones de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11. En todos los casos el volumen final de cada pozo fue de 100 µl. Transcurridas las 24 h de tratamiento, se evaluó el número celular utilizando la técnica de incorporación de cristal violeta, se retira el medio de cultivo y se fijan las células con glutaraldehído al 1.1% durante 15 min. Cumplido el tiempo se retiró el fijador y se enjuagó con agua desionizada dejando secar al aire, en seguida se adicionó el colorante cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico, se incubó por 15 min más, se lavó el exceso de colorante exhaustivamente y se dejó secar al aire para después adicionar ácido acético al 10% por 15 min. Posteriormente se determinó la absorbancia de la solución de ácido acético a 590 nm por

espectrofotometría en un lector de placas (Chromate Manager) (Kueng *et al.*, 1989). Los datos obtenidos se analizaron en hoja de cálculo de Excel calculando una IC₅₀.

Efecto en la morfología celular

Para determinar el efecto de los compuestos en la morfología de las células, éstas fueron cultivadas sobre cubreobjetos (22 mm²) en cajas de 24 pozos (45,000 células/pozo), en un volumen de 1 ml de RPMI 1640 con 5 % de SFB. Transcurridas las 24 h de adhesión las células fueron tratadas con los compuestos a las concentraciones de IC₅₀ correspondientes durante 24 h. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 min, al término del tiempo fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS (pH 7.3), 3 min cada lavado en agitación suave. Se recuperaron las células y se pasaron a una placa limpia para realizar la reacción. Las células fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 al 0.5 % en PBS durante 5 min a 4 °C, posteriormente se lavó nuevamente 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave. Se incubó con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol Cl₂) durante 30 segundos a temperatura ambiente e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave, finalmente, se montaron las muestras utilizando un medio de montaje para fluorescencia (Vectashield), las muestras fueron selladas con resina a base de nitrocelulosa. Las preparaciones se observaron en campo claro con iluminación de contraste de fases y por microscopia de epifluorescencia.

Actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos celulares

El efecto necrótico se determinó mediante la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) utilizando el kit CytoTox 96 (Promega Corporation, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante: Cumplidas las 24 h de tratamiento, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 2,000 rpm/5 min, se colocaron 40 µl del sobrenadante centrifugado con 40µl de la mezcla de reacción del kit y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La LDH oxida el lactato a piruvato, los protones movilizados reaccionan con la sal de tetrazolio 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) reduciéndola a formazán. El aumento en la cantidad de formazán producida en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con el aumento en el número de células lisadas. El colorante formazán es soluble en agua y puede ser detectado por espectrofotometría a 490 nm de absorbancia.

Inmunodetección de Caspasa-3 activa

Las células fueron cultivadas en cajas de 24 pozos (45,000 células/pozo), en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5% de SFB. Los cultivos fueron tratados con las concentraciones de IC₅₀ correspondientes de cada compuesto. Transcurrido el tiempo de tratamiento (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 o 24 h), se recuperaron tanto células adheridas como células en suspensión y se fijaron con Metanol al 50 % en PBS durante 60 min a 4 °C, al término del tiempo fueron lavadas 2 veces cuidadosamente por centrifugación (1800 rpm), y se re-suspendieron en 500 µl de PBS (pH 7.3). Inmediatamente se colocó el anticuerpo primario, anti-Caspasa-3 activa (1:1000 en PBS) y se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las células fueron lavadas 2 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (1:1000 en PBS) durante 2 h protegidas de la luz; transcurrido este tiempo las células se lavaron 2 veces más con PBS y se evaluaron en un citómetro de flujo (FACS Aria III).

Obtención de linfocitos humanos

Los cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos se realizaron a partir de 15 ml de sangre obtenida con una jeringa heparinizada (Heparina 5000 UI/mL, PiSA, México). En un tubo de fondo cónico de vidrio, se depositaron 5 ml de Ficoll-Hypaque (densidad de 1.077, +/- 0.001, Sigma, E.U.). Inmediatamente se agregó lentamente por la pared del tubo la sangre, de tal forma que la proporción ficoll-sangre fue de 1:1. Se centrifugó el tubo a 750 rpm durante 5 min. Al término del tiempo se aumentó la velocidad a 1500 rpm durante 25 min más. De esta manera, las células mononucleares se separaron al centrifugarlas por gradiente de densidad. Se colectó el anillo de linfocitos con una pipeta de 5 ml (evitando extraer la fase Ficoll) se depositó en un tubo cónico de vidrio y se lavó con 10 ml de RPMI-1640. Se centrifugó a 1500 rpm/5 min, se retiró el líquido por decantación y se volvió a lavar con RPMI-1640 y centrifugó a 1500 rpm/5 min. El botón celular se resuspendió con RPMI-1640 20% (v/v) de suero fetal de bovino (SFB), se vertió a una caja Petri y las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y humedad a punto de rocío por 1 h (con esto se adhieren al fondo de la caja los monocitos, permaneciendo en suspensión los linfocitos). Al término de este tiempo se colectó el medio, el cual contenía los linfocitos que se ocuparon para los ensayos biológicos.

Determinación de la proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CSFE)

Para realizar este ensayo se utilizaron los linfocitos extraídos como se mencionó anteriormente. Se contaron las células y se llevaron a una concentración de 1×10^6 células por ml. Se tiñeron con carboxifluoresceína (CSFE) (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 12 µM, incubando por 15 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5% SFB, centrifugando a 1,500 rpm y finalmente se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 20% SFB.

Para activar a los linfocitos se les adicionaron 25 μ l de una solución de fitohemaglutinina (Micro Lab S. A., Méx) 1:10 en PBS. A continuación, los linfocitos se transfirieron al medio con tratamiento, 1×10^6 células por ml. Las condiciones establecidas fueron: Sin fitohemaglutinina (Sin activar), Con fitohemaglutinina (Activados), Vehículos (DMSO o etanol/DMSO 3:1), sólo se agregó el volumen de disolvente utilizado para disolver la IC_{50} de los compuestos, diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 200,000 células por pozo en 200 μ l de RPMI-1640 10% SFB 37 °C con 5% de CO_2 y humedad a punto de rocío por 72 h. Al término de este tiempo se cosecharon las células y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 min, se resuspendió el botón celular en 1 ml de verseno a 4 °C por 5 min, se retiró el verseno y se re-suspendieron las células en 1 ml de paraformaldehído 1% en PBS para ser evaluadas por citometría de flujo (FACSAria II), los datos fueron procesados en el programa FACDiva versión 6.1.2.

Análisis estadístico

La media y la desviación estándar, se calcularon utilizando Excel (Microsoft Office, versión 2013). El análisis de las diferencias estadísticas se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de 0.05% seguido de una prueba de Tukey, en el programa SPSS 14.0 para Windows.

Resultados

Actividad antiproliferativa de los compuestos en células tumorales de CaCU

Con el propósito de conocer el efecto antiproliferativo de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 en las células tumorales, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratados con diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos durante 24 h y la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% en la densidad celular (IC_{50}) fue calculada. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (Figura 7, tabla 1).

Los resultados obtenidos, muestran que los compuestos afectan el potencial proliferativo de las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la concentración, observando que a medida que aumenta la concentración de los compuestos se puede observar que hay una disminución del número celular. Se linealizaron los datos de estas curvas dosis-respuesta en el programa Excel (Microsoft Office, versión 2013) y se calculó la IC_{50} para cada uno de los compuestos, en las tres líneas celulares de cáncer cervicouterino (Tabla 1).

	Diosgenina μ M (μ g/ml)	Diosgenina-3-glu μ M (μ g/ml)	MF-10 μ M (μ g/ml)	MF-11 μ M (μ g/ml)
CaSki	5.7 (13.6)	12.4 (20.92)	30.6 (47.63)	18.1 (27.0)
HeLa	6.3 (15.19)	16.7 (28.18)	30.7 (47.82)	24.6 (36.6)
ViBo	7.9 (19.06)	8.4 (14.19)	-	24.7 (36.7)

Tabla 1. IC_{50} calculadas para cada uno de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11. Las IC_{50} se muestran en concentración μ M y entre paréntesis en μ g/ml. No se reporta la IC_{50} del compuesto MF-10 en la línea celular ViBo, ya que se formaron precipitados en el medio de cultivo a concentraciones mayores a 50 μ g/ml, por lo que no se pudo determinar la IC_{50} . Valores de IC_{50} μ M y μ g/ml: \pm 0.1.

Cabe mencionar que el compuesto MF-10 a concentraciones mayores a los 50 μ g/ml tiende a formar agregados, impidiendo la biodisponibilidad de éste para las células. Para el caso de la línea celular ViBo no se pudo corroborar la IC_{50} calculada, ya que al colocar la concentración necesaria el compuesto tiende a precipitarse, a concentraciones menores a los 50 μ g/ml, las células no presentan efecto alguno.

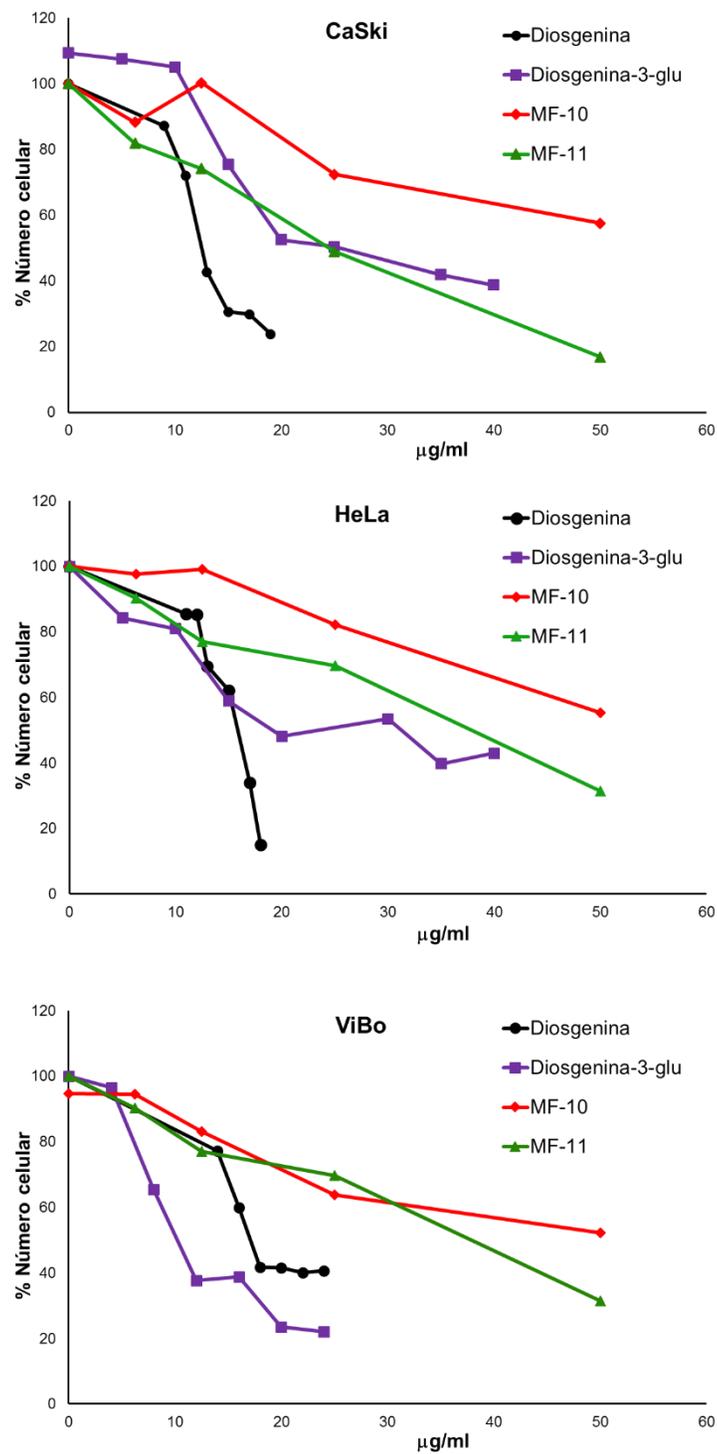


Figura 7. Actividad antiproliferativa de los compuestos diosgenina, diogenina-3-glu, MF-10 y MF-11 sobre cultivos de líneas celulares de CaCU. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas por 24 h a distintas concentraciones del compuesto. El número celular se determinó por medio de la técnica de cristal violeta. El ensayo es representativo de 3 experimentos independientes con seis repeticiones por condición.

Actividad necrótica de la diosgenina y sus derivados glicosilados en células tumorales de CaCU

Una vez que detectamos que los compuestos presentan actividad antiproliferativa en células tumorales de CaCU, el siguiente paso fue dilucidar la causa de la disminución del número celular. Es conocido que cualquier compuesto puede ser tóxico, induciendo a las células a una muerte necrótica. Con la intención de establecer si la diosgenina y sus derivados glicosilados inducen a las células tumorales de CaCU a una muerte necrótica, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con sus respectivas IC_{50} por 24 h y la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) fue determinada en los sobrenadantes de los medios de cultivos mediante el kit Cyto Tox 96 (PROMEGA, USA) (ver material y métodos) (Figura 8).

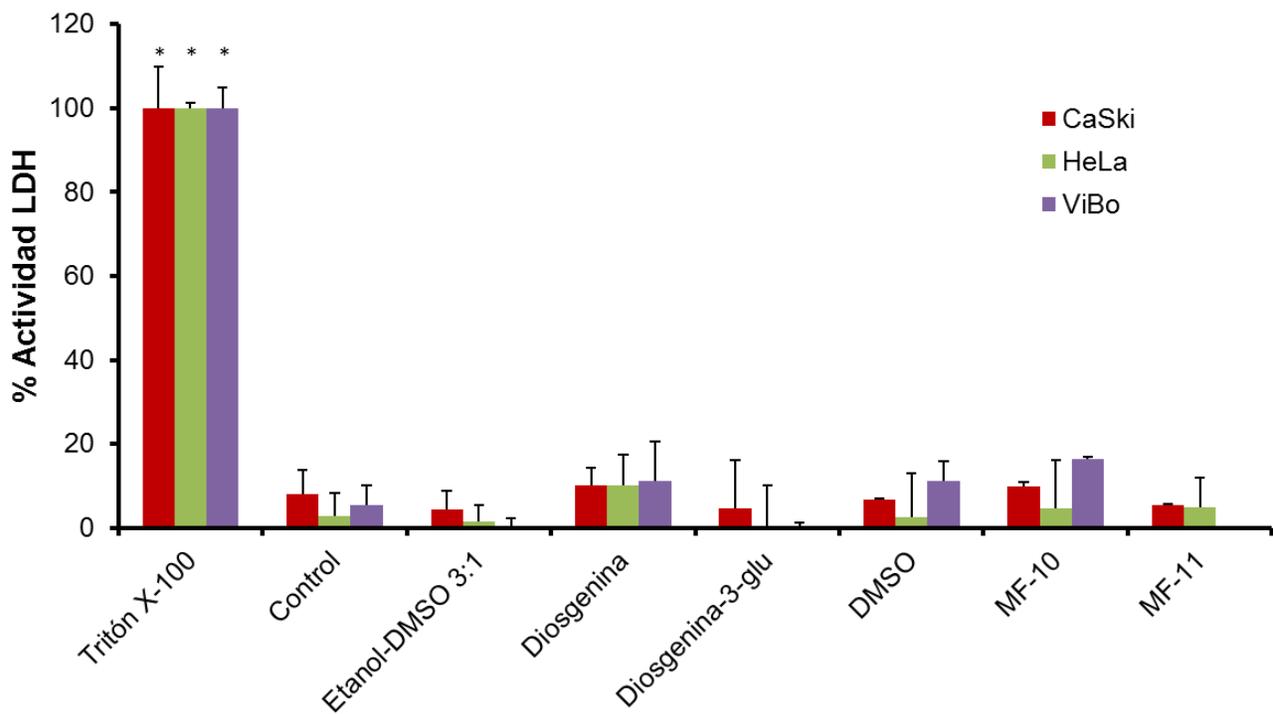


Figura 8.- Efecto citotóxico de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11, sobre cultivos de líneas celulares de CaCU. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas por 24 h con las concentraciones de las IC_{50} calculadas. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la actividad de la enzima LDH. ANOVA $p < 0.05\%$ seguido de una prueba de Tukey.

Los resultados de la figura 8 muestran que en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales tratadas con los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11, presentan una baja o nula actividad de la enzima LDH, lo cual sugiere que dichos compuestos son de baja o nula actividad necrótica (citotóxica) en las líneas de CaCU, indicando que el decremento en el número celular observado se debe a un evento diferente a la muerte celular necrótica.

Actividad apoptótica de la diosgenina y sus derivados glicosilados en células tumorales de CaCU

Otro tipo de muerte celular que ha sido descrita en la literatura es la muerte celular programada, específicamente la muerte celular apoptótica. Este tipo de muerte celular puede ser evaluada mediante la observación microscópica de cambios celulares morfológicos y por la detección de marcadores bioquímicos específicos de este tipo de muerte.

Efecto de la diosgenina y sus derivados glicosídicos en la morfología celular de células tumorales de CaCU

Con el propósito de evaluar si la diosgenina y sus derivados glicosilados inducen a las células tumorales a presentar características morfológicas propias de células apoptóticas, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con sus respectivas IC_{50} de los diferentes compuestos por 24 h. Posteriormente, los cultivos fueron teñidos con el fluorocromo 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) y observados en un microscopio Nikon Eclipse E600 y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Digital DXM1 200F (Figuras 7, 8 y 9).

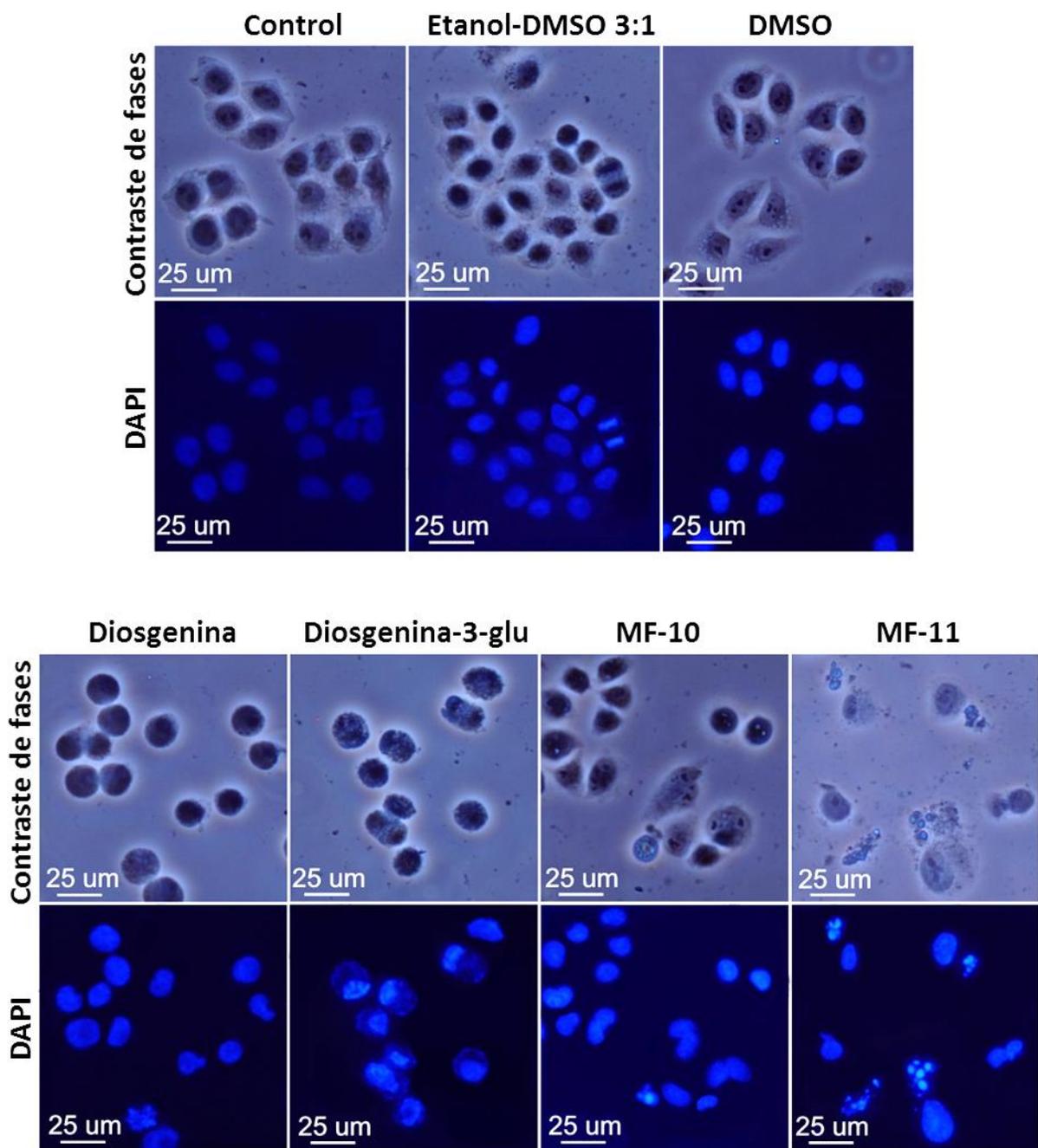


Figura 9.- Efecto de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 sobre la morfología de la línea celular de CaCU HeLa. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (30,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas durante 24 h con la concentración de IC₅₀ calculada correspondiente.

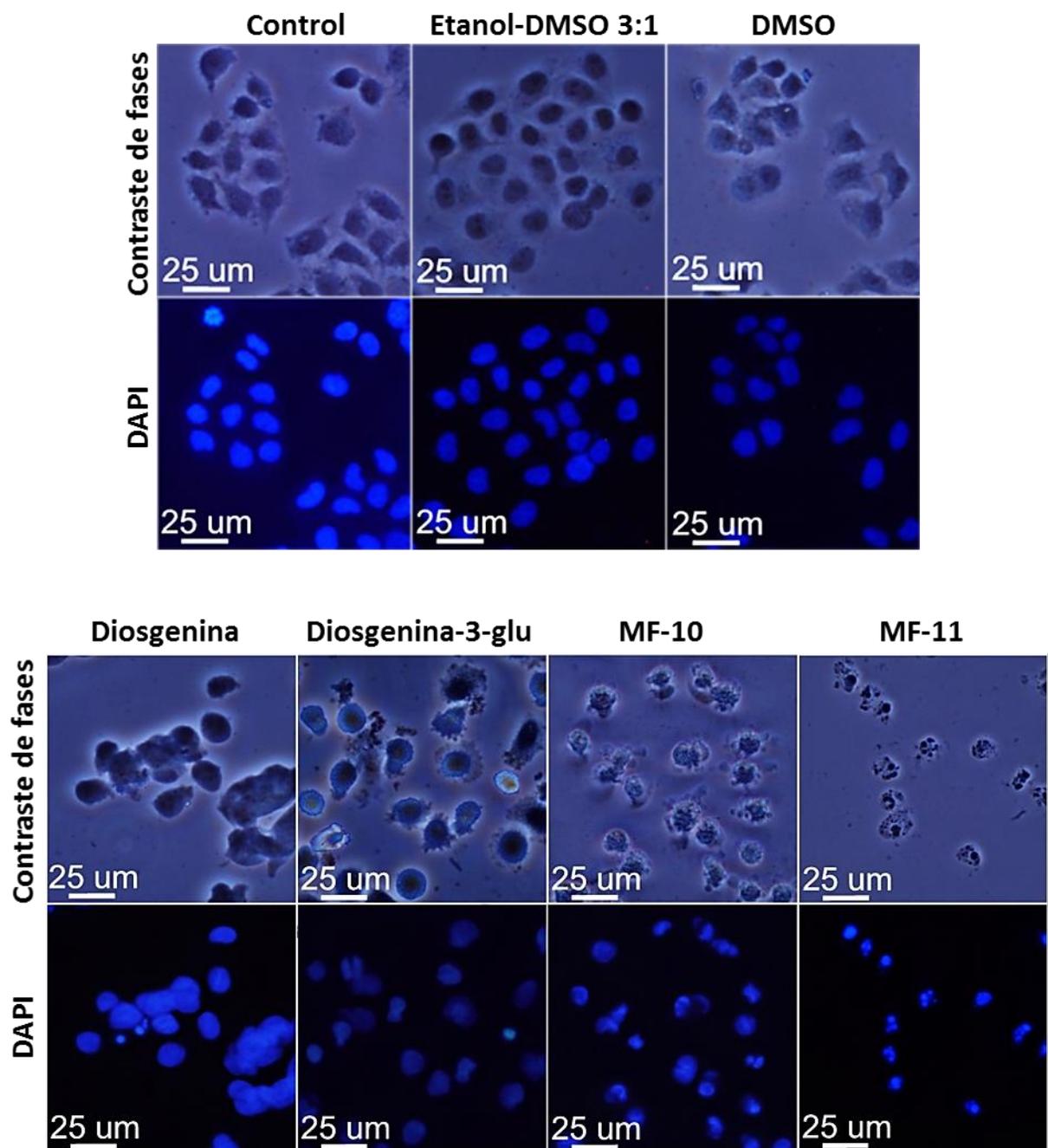


Figura 10.- Efecto de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 sobre la morfología de la línea celular de CaCU CaSki. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (30,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas durante 24 h con la concentración de IC₅₀ calculada correspondiente.

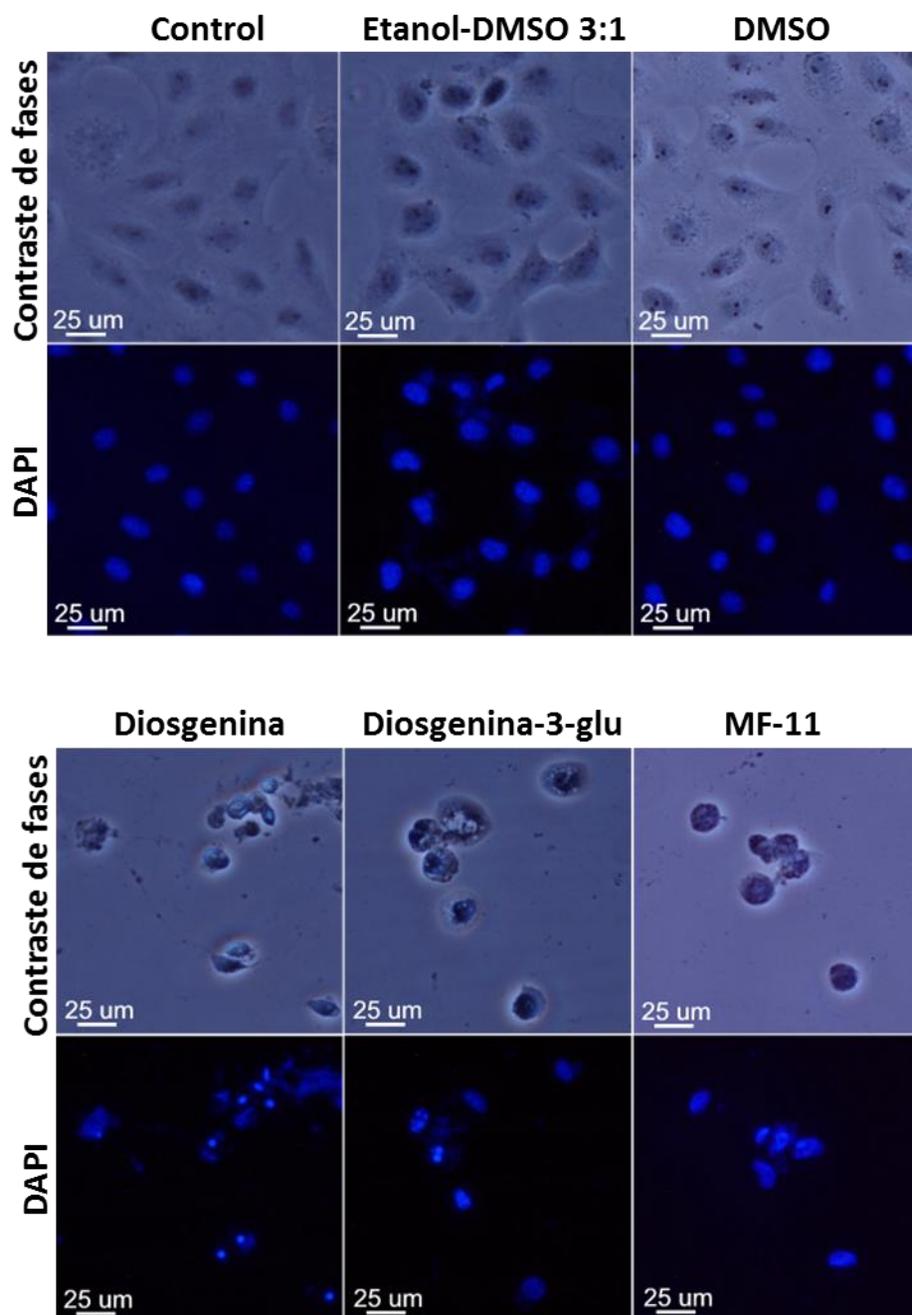


Figura 11.- Efecto de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 sobre la morfología de la línea celular de CaCU ViBo. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (30,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas durante 24 h con la concentración de IC₅₀ calculada correspondiente.

Las figuras 9, 10 y 11 muestran que los cultivos tratados con los compuestos afectan la morfología de las células tumorales. Como se observa, en la condición del control del cultivo, las células adherentes crecen en pequeñas colonias de números variables, la forma de las células es poliédrica cuando se encuentran bien adheridas (Control, Etanol-DMSO 3:1 y DMSO), se observa algunas células redondeadas y en pares debido a que éstas se encuentran en división. Como se observa en las fotos correspondientes a los vehículos de los compuestos (Etanol-DMSO 3:1 y DMSO), la presencia de estos disolventes utilizados para solubilizar los compuestos no altera la morfología de los cultivos, las

células conservan su capacidad de adherencia y su citoplasma no presenta alteración alguna detectable al microscopio. En las fotografías correspondientes a las células tratadas con los compuestos (diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11) se observa que el tratamiento con los compuestos a la concentración de IC_{50} genera una alteración en la morfología típica, se observa que las células pierden el contacto entre ellas y con la placa de cultivo, esto se deduce por un cambio de una morfología poliédrica a una morfología redondeada. Por otro lado, se observa que hay una disminución del tamaño de las células debido a una contracción del citoplasma, éste disminuye de tamaño y en los bordes celulares se pueden apreciar la formación de yemas del citoplasma (*blebbing*) en la membrana (Figura 7, 8 y 9; contraste de fases). El marcaje del DNA con DAPI, nos permite observar los núcleos, los cuales en las células control o con los vehículos tienen una fluorescencia homogénea evidenciando cromatina compacta y laxa ampliamente distribuidas en el nucleoplasma, las regiones en las que se observa una fluorescencia más intensa corresponden a cromatina con mayor condensación. En las células tratadas con los compuestos se observa un proceso compactación de la cromatina y nuclear, además de una fragmentación de ambos. Es importante notar que las células que presentan una condensación y formación de yemas del citoplasma, al ser observadas por microscopia de epifluorescencia, también presentan una condensación y fragmentación nuclear y por lo tanto de la cromatina.

La condensación celular, nuclear y de la cromatina, fragmentación nuclear, así como la formación de *blebbing* y cuerpos apoptóticos, son características morfológicas que se han descrito para la muerte celular por apoptosis, lo cual sugiere que las células podrían estar en este proceso. Sin embargo, es necesario realizar más pruebas bioquímicas que puedan corroborar esta sugerencia.

Inmunodetección de Caspasa-3 activa

Con el fin de confirmar que la diosgenina y sus derivados glicosilados inducen a las células tumorales de CaCU a una muerte apoptótica, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con los diferentes compuestos a concentraciones de sus respectivas IC_{50} y la Caspasa-3 activa fue inmunodetectada y cuantificada por citometría de flujo (Figuras 12, 13 y 14).

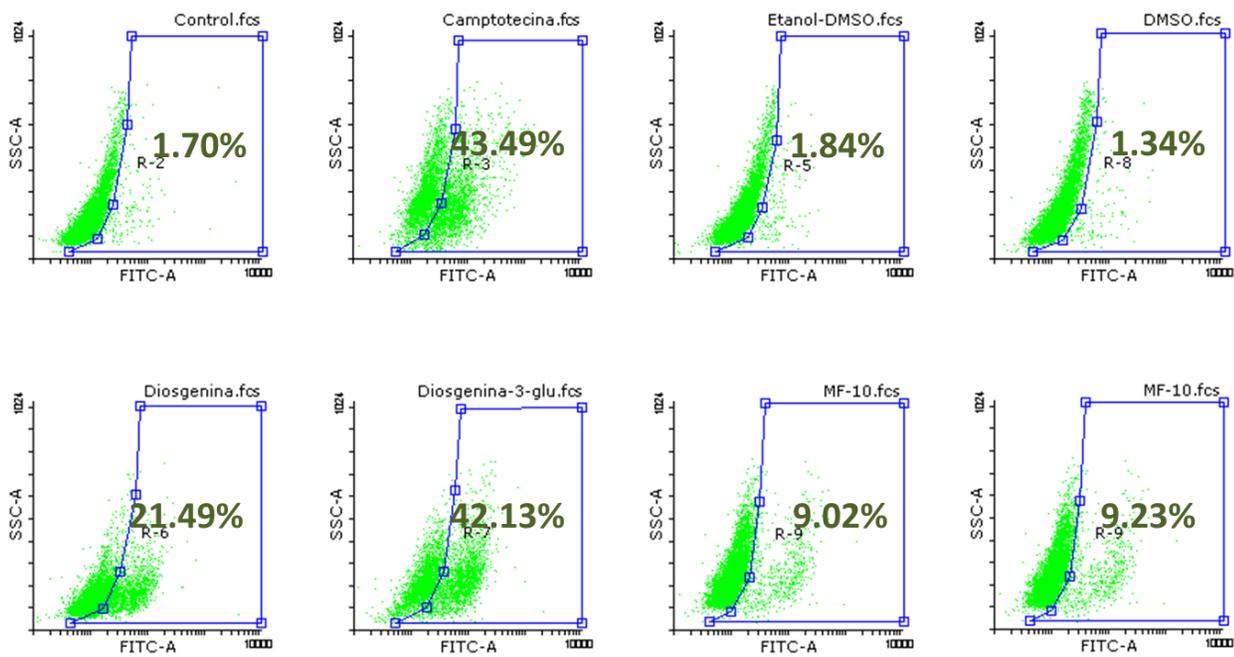


Figura 12.- Activación de la Caspasa-3. Inmunodetección de la Caspasa-3 activa en cultivos de células tumorales HeLa, tratadas por 24 h con diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11. Las células fueron cultivadas en placas de 48 pozos (25,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas durante 24 h con la concentración de IC₅₀ calculada.

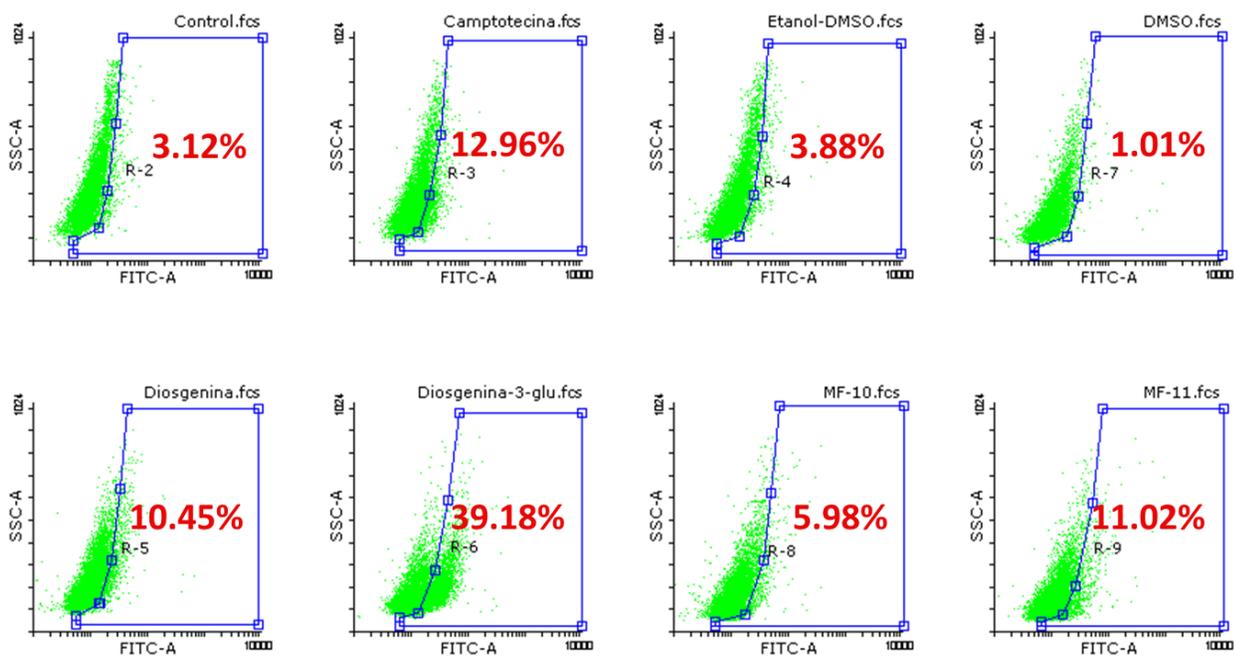


Figura 13.- Activación de la Caspasa-3. Inmunodetección de la Caspasa-3 activa en cultivos de células tumorales CaSki, tratadas por 24 h con los diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11. Las células fueron cultivadas en placas de 48 pozos (25,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas durante 24 h con la concentración de IC₅₀ calculada.

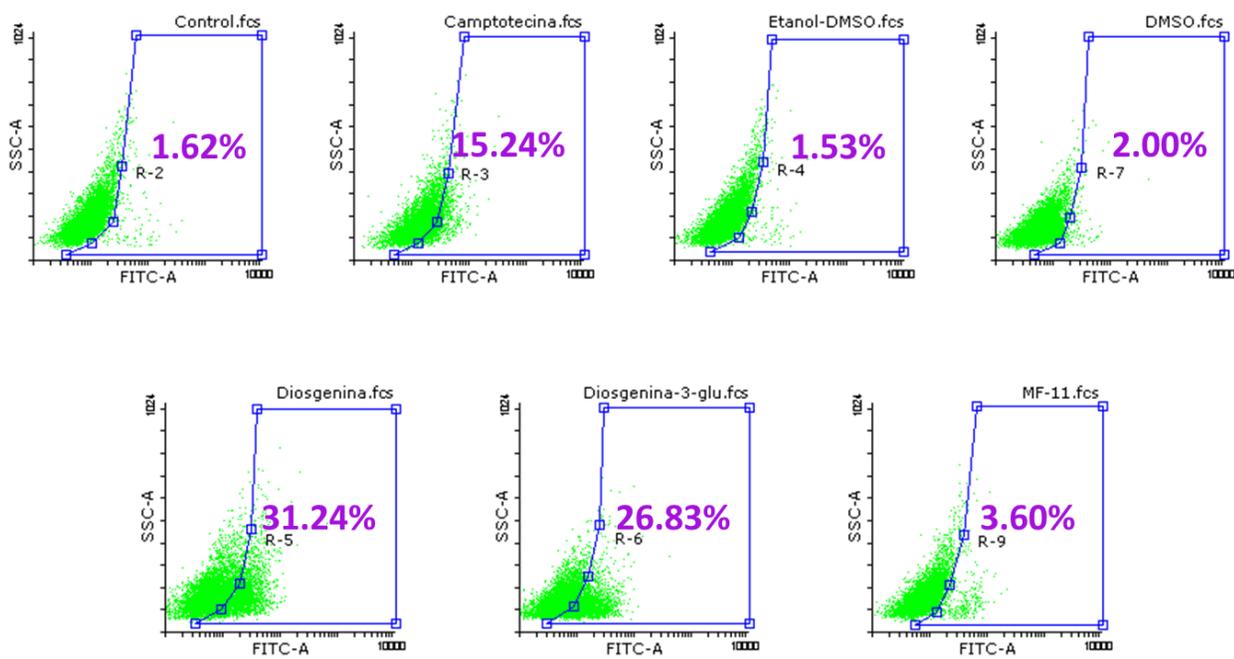


Figura 14.- Activación de la Caspasa-3. Inmunodetección de la Caspasa-3 activa en cultivos de células tumorales ViBo, tratadas por 24 h con diosgenina, diosgenina-3-glu y MF-11. Las células fueron cultivadas en placas de 48 pozos (25,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas durante 24 h con la concentración de IC₅₀ calculada.

En las figuras 12, 13 y 14 se muestran los resultados y se observa que la diosgenina y sus derivados glicosídicos inducen la activación de la Caspasa-3 en células tumorales. Con el fin de establecer si la presencia de la Caspasa-3 activa es inducida de manera diferente en el tiempo por la diosgenina y sus derivados glicosídicos, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con los compuestos a sus respectivas IC₅₀ y la activación de la Caspasa-3 activa fue determinada a las 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 h (Figura 15).

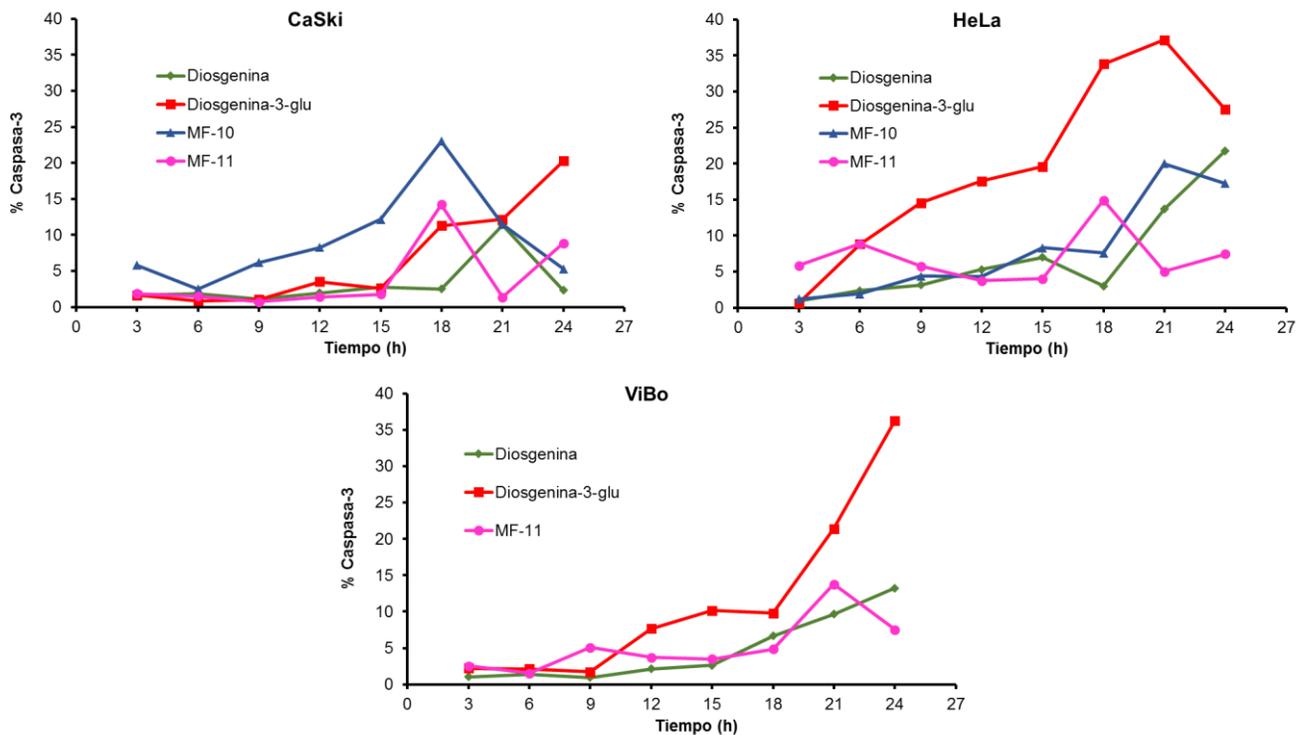


Figura 15.- Evaluación de la activación de la Caspasa-3 activa en cultivos de células tumorales CaSki, HeLa y ViBo. Las células fueron tratadas por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 h con los compuestos: Diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11. Las células fueron cultivadas en placas de 48 pozos (25,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas con la concentración de IC₅₀ calculada

Como se aprecia en la figura 15 para la línea celular HeLa, a las 3 h de tratamiento las células no tienen más del 3% de Caspasa-3 activa. A partir de las 6 horas la diosgenina-3-glu induce un aumento sostenido en el porcentaje de células positivas a Caspasa-3 activa el cual presenta su máximo punto a las 21 h con 37% y disminuye después de este tiempo. La diosgenina y el MF-10 inducen una ligera activación de la Caspasa-3 activa a partir de las 15 h, con un pico máximo a las 24 h con 21% y a las 21 h con 20%. Mientras que el MF-11 presenta un pico que comienza desde las 9 hasta las 21 h donde ya hay niveles muy bajos de Caspasa-3 activa.

En la línea celular CaSki, los compuestos no inducen un incremento de la Caspasa-3 activa hasta las 15 h de tratamiento. La diosgenina-3-glu induce un incremento sostenido con un pico máximo a las 24 h con un 21%. Los compuestos MF-10 y MF-11 presentan un pico a las 18 horas con 12 y 14% respectivamente, el cual decrece a las 21 h y vuelve a aumentar a las 24 h con valores de 9 y 11% respectivamente. La diosgenina induce una activación de la Caspasa-3 de 11% a las 21h.

En la línea celular ViBo, se observa que la diosgenina induce una activación moderada pero sostenida de la Caspasa-3 activa a partir de las 18 horas alcanzando un máximo de activación de 14% a las 24 horas. La diosgenina-3-glu induce un incremento de la Caspasa-3 activa desde las 12 h, el cual se mantiene en aumento considerable y alcanza un máximo de 37% a las 24 horas. Por otro lado, el MF-11 presenta un pico de Caspasa-3 activa de 14% a las 21 horas el cual disminuye por debajo del 10% a las 24 horas

Los resultados muestran que los niveles de Caspasa-3 activa no son constantes durante el proceso de apoptosis, se observa que puede haber diferentes picos de activación de esta caspasa en distintos tiempos de tratamiento.

Efecto de los compuestos en cultivos de linfocitos

La gran mayoría de los reportes sobre el efecto de saponinas en células tumorales se limitan a describir la síntesis y a evaluar el efecto sobre la proliferación, algunos están encaminados a determinar el tipo de muerte que se está induciendo, mediante la detección de moléculas involucradas en distintas vías celulares que puedan llevar a una muerte; también se han probado *in vivo*. Sin embargo, son pocos los trabajos en los que se reporta el efecto de las saponinas en células no tumorales. Con la finalidad de determinar si los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 afectan el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas humanas de sangre periférica de donadores sanos fueron marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y tratados durante 72 h con las concentraciones de IC₅₀ obtenidas para los cuatro compuestos y el porcentaje de proliferación celular fue determinado por citometría de flujo (Figura 16).

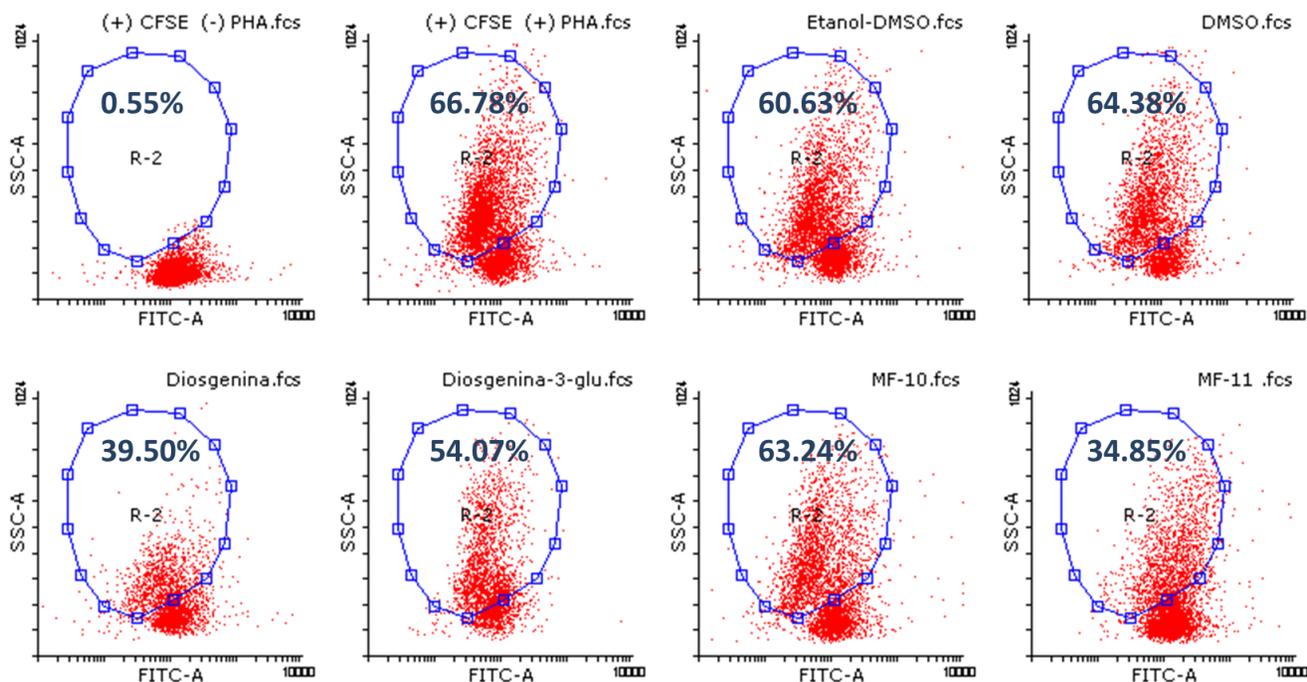


Figura 16. Efecto de los compuestos diosgenina y sus derivados diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 en el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana de donadores sanos. Los linfocitos fueron marcados con CFSE (+, -), marcados y activados con fitohematoglutina (+, +). Los linfocitos fueron evaluados a las 72 horas de tratamiento. La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos, se observa que la diosgenina y la diosgenina-3-glu inhibieron el potencial proliferativo de las células linfocíticas en un 35 y 16% respectivamente al ser comparados con los valores registrados para el Etanol-DMSO 3:1. Mientras que el MF-10 no los afectó y el MF-11 afectó el potencial proliferativo de los linfocitos en un 36%.

Actividad necrótica de la diosgenina y sus derivados glicosilados en células linfocíticas

Con la finalidad de establecer si la diosgenina y sus derivados glicosilados inducen muerte por necrosis en células no tumorales, cultivos de células linfocíticas fueron tratados con las respectivas IC_{50} determinadas para las células tumorales por 72 h y posteriormente se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos y se procedió a evaluar la actividad de la LDH utilizando el kit Cyto Tox 96 (PROMEGA, USA) (Figura 17), de la misma forma que se procedió con las células tumorales.

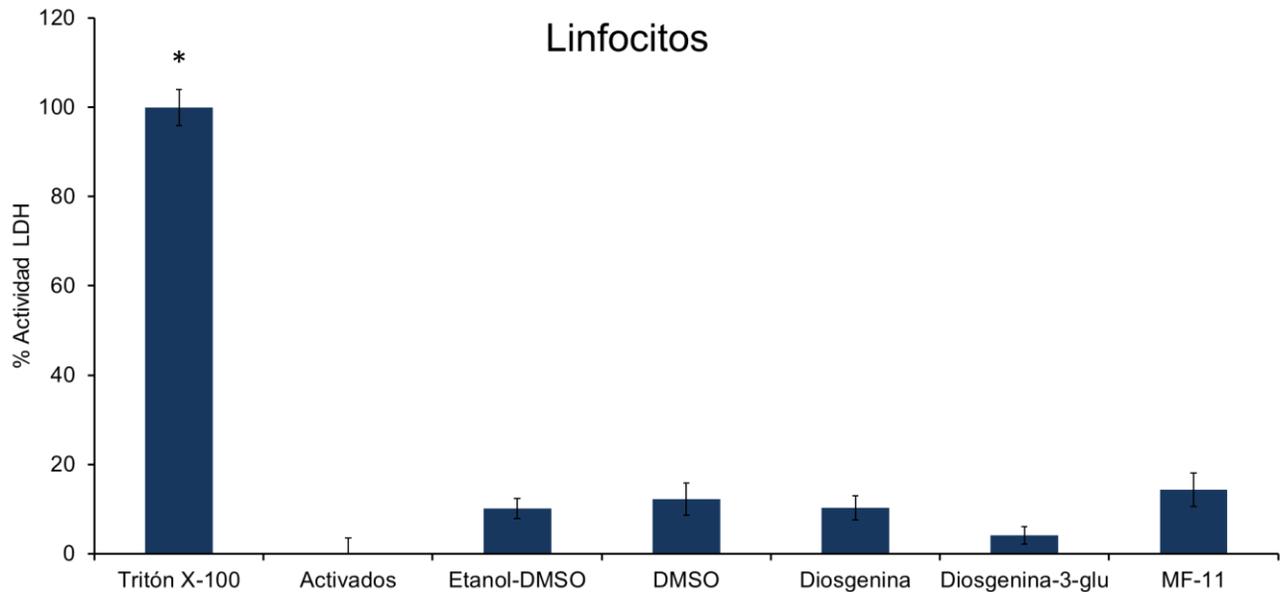


Figura 17.- Actividad de la LDH en los sobrenadantes de linfocitos de sangre periférica humana de donadores sanos. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de linfocitos periféricos de sangre humana tratados con las respectivas IC_{50} de los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11. ANOVA $p < 0.05\%$ seguido de una prueba de Tukey.

Los resultados mostrados en la Figura 17, indican que la diosgenina y sus derivados glicosilados no inducen a las células linfocíticas a liberar la enzima citoplasmática LDH, lo que indican que estos compuestos no inducen una muerte necrótica y que la disminución en la proliferación observado en estas células es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

Discusión

Actualmente, los fármacos utilizados en el tratamiento contra el cáncer resultan ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, poco selectivos, citotóxicos y con efectos secundarios graves, los cuales están directamente relacionados con su actividad citotóxica. Por ello, es necesario buscar o sintetizar nuevos compuestos con actividad antiproliferativa, de acción selectiva y de nula o baja citotoxicidad (necrosis). Al respecto, se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos, dentro de los cuales las saponinas esteroideas han generado un gran interés debido a su diversa actividad biológica, entre las que destaca su actividad antitumoral. La diosgenina es una saponina esteroidea, la cual ha sido descrita con actividad antiproliferativa, inductora de muerte apoptótica y una baja actividad necrótica en distintas líneas de cáncer. La diosgenina tiene un efecto antiproliferativo y puede inducir la detención del ciclo celular e inducir apoptosis. Los valores de IC_{50} reportados para la diosgenina van de 0.8 a 34 μ M (Mimaki *et al*, 2001; Raju *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2010; Firempong *et al*, 2016). En el presente trabajo, los resultados de las IC_{50} s obtenidas para la diosgenina en las líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCU), se encuentran dentro de los valores reportados en la literatura, indicando que este fitoesteroide conserva su actividad antiproliferativa en estas líneas celulares y también confirma que la diosgenina (aglicona) por sí misma presenta una actividad antiproliferativa basal. Existen reportes que indican que la presencia de azúcares en la posición del carbono 3 de la aglicona es un requisito estructural esencial para que las saponinas presenten una potente actividad citotóxica. En general se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado. La presencia de azúcares añadidos a la parte aglicona afecta la actividad antiproliferativa (Tschamber *et al*, 2007). Al respecto, en nuestro trabajo, cuando se le adicionó una glucosa a la diosgenina en el carbono 3 (Diosgenina-3-glu), se observó que la actividad antiproliferativa de la diosgenina se mantuvo, sin embargo, ésta actividad disminuyó, requiriendo 2.2 veces más de diosgenina-3-glu para realizar la misma actividad antiproliferativa, indicando que la glucosa afecta negativamente la actividad antiproliferativa de la diosgenina en las líneas celulares de CaCU. Se ha reportado que el tipo y número de azúcares modifica la actividad citotóxica de las saponinas, es decir, sugiere que los azúcares también influyen sobre los niveles de toxicidad de las agliconas (Trouillas *et al.* 2005), sin embargo, en este trabajo, se observa que la diosgenina no presenta un efecto necrótico, y cuando se le adiciona una glucosa en posición del carbono 3 (diosgenina-3-glu), la actividad necrótica no se modificó significativamente, indicando que la glucosa unida al carbono 3 de la diosgenina no afecta esta actividad. No obstante, en lo que respecta a la actividad apoptótica, la diosgenina indujo en menor medida a las células tumorales de CaCU a una muerte apoptótica, en comparación con la diosgenina-3-glu, estableciendo que la glucosa unida al carbono-3 de la diosgenina favorece esta actividad, sugiriendo que la glucosa regula de manera positiva la actividad apoptótica. Este hecho, nos permite pensar que la glucosa tiene un papel importante en la regulación de la actividad biológica de las saponinas y deja ver que la modificación de este azúcar podría afectar negativa o positivamente la actividad antiproliferativa, necrótica y/o apoptótica de la diosgenina. Al respecto, y tomando en consideración la importancia biológica de la glucosamina, en este trabajo, la glucosa añadida a la

diosgenina (Diosgenina-3-glu) fue modificada, obteniendo una 2-deoxi-2-acetamido-beta-D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11), con el propósito de evaluar si estas modificaciones afectan la actividad biológica de la diosgenina-3-glu. Nuestros resultados mostraron que el MF-10 y el MF-11 afectaron de manera negativa la actividad antiproliferativa presente en la diosgenina-3-glu, observando que con el MF-10 en las células HeLa, CaSki y ViBo se requirieron 2.5, 1.4 y 5.4 veces más de compuesto MF-10 respectivamente que diosgenina-3-glu. Mientras que con el MF-11 se requirieron para las células HeLa, CaSki y ViBo 1.4, 1.5 y 3 veces más de compuesto MF-11 respectivamente. Estos resultados indican que la acetilación o cloración de la glucosa en los compuestos 2-deoxi-2-acetamido-beta-D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) reducen aún más la actividad antiproliferativa de la diosgenina-3-glu, sugiriendo que estos grupos funcionales regulan de manera negativa dicha actividad. Por otro lado, otra de las propiedades biológicas de las saponinas es la inducción de lisis celular o necrosis. Esta propiedad está estrechamente relacionada con su actividad hemolítica, resultado de la capacidad de las saponinas para formar complejos con el colesterol de la membrana celular. Esta asociación de las saponinas con el colesterol conduce en consecuencia a la formación de poros y a la permeabilización celular (Abe *et al.*, 1981; Melzig *et al.*, 2001). Al igual que la diosgenina y la diosgenina-3-glu, la actividad necrótica no fue alterada de manera significativa, indicando que estos grupos funcionales no afectan la actividad necrótica presente en la diosgenina-3-glu. Sin embargo, el hecho de que la actividad de la caspasa-3 activa presente en la diosgenina-3-glu evaluada en el tiempo mostrara un valor significativamente menos que la diosgenina-3-glu, sugiere que estos grupos funcionales presente en la glucosa unida al carbono-3 de la diosgenina-3-glu (acetamido y el clorhidrato), regulan de manera negativa la actividad apoptótica presente en la diosgenina-3-glu. Estos resultados dejan ver la relevancia de estos compuestos. Si los comparamos con los compuestos quimioterapéuticos aplicados en el tratamiento contra el cáncer, cuyo éxito en el tratamiento de tumores se basa principalmente en una detección temprana del desarrollo de esta enfermedad o tumores únicos y accesibles (operables). Sin embargo, en fases tardías o terminales, resultan ser ineficientes además de generar efectos colaterales graves, asociados a su actividad necrótica y baja selectividad. En este sentido, las saponinas, entre ellas la diosgenina, presentan actividad antiproliferativa de una manera similar a los quimioterapéuticos, sin embargo, su actividad citotóxica (necrótica) es baja o nula a concentraciones que dependen de la línea celular o en ensayos in vivo, donde se han administrado hasta un gramo diario por kilogramo de peso (Cita), dejando ver que este tipo de compuestos podrían ser muy tolerables en pacientes y que los efectos colaterales relacionados directamente con su actividad citotóxica (necrótica) se esperarían fueran mínimos ya que estos compuestos son de baja actividad necrótica. Además, el hecho de inducir a las células tumorales hacia una muerte apoptótica, en la cual no se lleva a cabo una respuesta inflamatoria, refuerza aún más su tolerancia y sus pobres efectos colaterales. La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos que se utilizan en el tratamiento contra el cáncer, inducen muerte a las células tumorales mediante la inhibición de algunos de los mecanismos implicados en la división celular. En consecuencia, la mayoría de los compuestos antitumorales son citostáticos o citotóxicos. La química ha jugado un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de fármacos contra el

cáncer. La química sintética se ha utilizado ampliamente para modificar medicamentos, especialmente los de origen natural. El fundamento para el uso de los fármacos antitumorales citotóxicos convencionales se basa en la teoría de que las células tumorales proliferan y se dividen rápidamente, por lo tanto, son más sensibles a estos compuestos que las células no tumorales (Fernández *et al.*, 2010). Sin embargo, en el organismo existen células normales con una alta tasa de proliferación similar a la de las células tumorales, como lo son las células epiteliales del tracto digestivo o células del sistema inmunológico como los linfocitos, que también se ven afectadas por este tipo de compuestos.

No obstante, la relevancia mencionada anteriormente de los compuestos estudiados, es necesario e importante establecer el efecto de estos compuestos en células no tumorales, sobre todo, en aquellas células que tienen una tasa de división celular similar a las de las células tumorales. Acorde a ésto, en este trabajo se evaluó el efecto de la diosgenina y sus derivados glicosilados en cultivos de células linfocíticas humanas, provenientes de la sangre periférica de donadores sanos. Los datos obtenidos indican que la diosgenina y sus derivados glicosilados afectan en menor grado la proliferación de las células linfocíticas que las células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo. Además, la diosgenina, la diosgenina-3-glu así como el MF-10 y el MF-11 no generaron actividad necrótica en las células linfocíticas, confiriendo a estos compuestos una ventaja selectiva y estableciendo una segunda ventaja sobre los fármacos utilizados actualmente en clínica. Estos resultados son congruentes con lo descrito por Camoutsis y colaboradores en 2005, quienes demostraron que los análogos sintetizados a partir de una saponina, no mostraron actividad necrótica ni inhibidora de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana. Ventaja que también podría darse en el sistema inmunológico, ya que es conocido que, en el tratamiento convencional contra el cáncer, el sistema inmunológico es ampliamente afectado. Tanto la radioterapia como la quimioterapia causan un efecto inmunosupresor, e incluso se ha observado que el número de linfocitos en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento puede disminuir hasta en un 50% (Dillman *et al.*, 1984). Es probable que la tolerancia a las saponinas esteroideas no cause un daño inmunosupresor significativo, dejando a la respuesta inmune del paciente, a ser activada en caso necesario, ya que se ha descrito que, en los pacientes con cáncer, el tratamiento podría tener un fuerte poder inmunosupresor que provoca que organismos oportunistas proliferen y generen fuertes infecciones, agravando la salud y recuperación de los pacientes. Es importante resaltar que el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis de la diosgenina y sus derivados diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11, sin presentar un efecto antiproliferativo, ni un efecto necrótico en células no tumorales, sugiere que estas saponinas podrían ser consideradas como candidatas idóneas para ser evaluadas en modelos *in vivo*, con la intención de establecer su potencial terapéutico como agentes con actividad antitumoral.

Conclusiones

Los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 presentan actividad antiproliferativa en las líneas tumorales de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo, con valores de IC₅₀ en el rango de 13 a 58 µg/ml sin inducir muerte celular necrótica en estas líneas tumorales de CaCU.

Los cambios en la morfología celular de cultivos tratados con los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11, aunado con la activación de la Caspasa-3, indican que los compuestos inducen una muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo.

Los compuestos diosgenina y diosgenina-3-glu afectan el potencial proliferativo de células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana) en un 35 % y 15 % respectivamente, mientras que el MF-10 y MF-11 afectan el potencial proliferativo de estas células en un máximo del 10 %.

Los compuestos diosgenina, diosgenina-3-glu, MF-10 y MF-11 no inducen a las células linfocíticas humanas a una muerte necrótica.

La diosgenina presenta una actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica basal.

La adición de una glucosa en el carbono 3 de la diosgenina afecta negativamente la actividad antiproliferativa presente en la diosgenina.

La adición de una glucosa en el carbono 3 de la diosgenina incrementa la actividad apoptótica presente en la diosgenina.

La adición de una glucosa en el carbono 3 de la diosgenina no afecta la actividad citotóxica (necrótica) presente en la diosgenina.

La adición de un grupo acetamido así como de un clorato aminado en la glucosa unida al carbono 3 de la diosgenina, afecta negativamente la actividad apoptótica presente en la diosgenina-3-glu.

Referencias

1. Abe H, Konishi H, Komiya H (1981), Effects of saikosaponins on biological membranes. *Planta Med.* 42:356–363.
2. American Cancer Society. Consultada 21 Mayo 2017. Disponible en:
(a) <http://www.cancer.org/cancer/cervicalcancer/detailedguide/cervical-cancer-treating-general-information>).
(b) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/tratamiento/quimioterapia.html>
3. Anaya L (2003), *Ecología Química*, Editorial Plaza y Valdés, Segunda edición, México, pp 343.
4. Anil K y Durga N (1981), Partial synthesis of diosgenin to obtain various steroidal compounds, *Bull. Soc. Chim. Belges*, 90:981-985.
5. Bachran C, Bachran S, Sutherland M (2008), Saponins in tumor therapy. *Mini Rev. Med. Chem.*, 8:575–584.
6. Banoub J, Boullanger P y Lafont H (1992), Synthesis of oligosaccharides of 2-amino-2-deoxy sugars, *Chem. Rev.*, 92:1167-1195.
7. Bertrand J, Liagre B, Bégaud-Grimaud G, Jauberteau M, Cardot P, Beneytout J y Battu S (2008), Study of diosgenin-induced apoptosis kinetics in K562 cells by Sedimentation Field Flow Fractionation, *J. Chromatogr. B*, 869:75-83.
8. Blunden G, Culling M, Jewers K (1975), Steroidal sapogenins: a review of actual and potential plant sources, *Trop Sci*, 17:139–154.
9. Butkinaree C, Parque K y Hart G (2010), O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress, *Biochim. Biophys. Acta*, 1800(2):96-106.
10. Bruneton J (1998), *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*, 4ème Ed. Éditions Technique & Documentation, Paris, p 1120.
11. Cai J, Liu M, Wang Z y Ju Y (2002), Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biol. Pharm. Bull.* 25(2):193-196.
12. Cell signaling. Regulación de la Apoptosis. Consultado: 28 Jul 2017. Disponible en: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-apoptosis/regulation-of-apoptosis-interactive-pathway/pathways-apoptosis-regulation>.
13. Chwalek M, Lalun N, Bobichon H, *et al.* (2006) Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochim Biophys Acta*, 1760:1418–1427.
14. Clarke P y Tyler K (2009), Apoptosis in animal models of virus-induced disease, *Nature Reviews Microbiology*, 7:144-155.
15. Djerassi C, Rosenkranz G, Pataki J y Kaufmann S (1952), Synthesis of allopregnane-3,11 β ,17,20, 21-pentol from cortisone and diosgenin, *J Biol Chem*, 194(1):115-118.

16. Dorton B, Vitonis A y Feldman S (2015), Comparing Cervical Cytology and Histology Among Human Papillomavirus-Vaccinated and -Unvaccinated Women in an Academic Colposcopy Clinic., *Obstetric and Gynecology*, 126(4):785-791.
17. Enger E, Ross F, y Bailey D (2007), *Concepts in biology*.
18. Elmore S (2007), Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicology Pathology*, 35(4):495-516.
19. Elinos C., Maldonado V., Meléndez J. (2003), Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis, *Gac Méd Méx* 139(5):493-499.
20. Fernández M, Sandoval J, López H y Sánchez L (2009), Formation of the steroidal 3 β -hydroxy-6-oxo-moiety: Synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin, *Arkivoc*, 13:170-184.
21. Fernández M, López H, Hernández J, López M, Escobar M y Sánchez L (2010), Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells, *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 18(7):2474–2484.
22. Fernández M, López H, Hernández J, Escobar M, Sánchez L, Pinto M y Sandoval R (2012). Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54:721-727.
23. Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E (2005). A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. *J Ethnopharmacol*, 99:317–324.
24. Firempong C, Zhang H, Wang Y, Chen J, Cao X, Deng W, Zhou J, Wang Q, Tong S, Yu J y Xu X (2016), Segetoside I, a plant-derived bisdesmosidic saponin, induces apoptosis in human hepatoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Pharmacol*, 110:101-110.
25. Güçlü-Üstündağ Ö y Mazza G (2007), Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47:231–258.
26. Hart G, Housley M y Slawson C (2007), Cycling of O-linked bold beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins, *Nature*, 446:1017-1022.
27. Hostettmann K y Marston A (1995), *Saponins*, Cambridge University Press, 564 pp.
28. Huo R, Zhou Q, Wang B, Tashiro S, Onodera S y Ikejima T (2004), Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway, *Acta Pharmacol Sinica*, 25:1077-1082.
29. Hsu Y-L, Kuo P-L, Weng T-C, *et al.* (2004), The antiproliferative activity of saponin-enriched fraction from *Bupleurum Kaoi* is through Fas-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 Cells. *Biol Pharm Bull*, 27:1112–1115.
30. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero), consultado el 06 Junio 2017, disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
31. Iracheta M (2007), El suicidio y la muerte celular, *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101(2):1- 33.
32. Jia L, Patwari Y, Srinivasula S, Newland A, Fernandes T, Alnemri E y Kelsey S (2001), Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*, 20: 4817-4826.

33. Jordán J (2003), Apoptosis: muerte celular programada, *OFFARM Bioquímica*, 22(6):100-106.
34. Karp G (2014), *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, McGraw Hill, 6ta edición, 840 pp.
35. Kiasalari Z, Rahmani T, Mahmoudi N, Baluchnejadmojarad T y Roghani M (2017), Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation, *Biomed Pharmacother*, 86:654-661.
36. Kim K, Pyee Y, Chung H, Park J, Hong J, Son H y Lee S (2016), Antitumor Activity of Spicatoside A by Modulation of Autophagy and Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells, *J Nat Prod*, 79:1097–1104.
37. Kohara A, Nakajima C, Hashimoto K, Ikenaga T, Tanaka H, Shoyama Y, Yoshida S y Muranaka T (2005), A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculea tissimum*, *Plant Molecular Biology*, 57(2):225-239.
38. Kueng W, Silber E y Eppenberger U (1989), Quantification of cells cultured on 96-well plates, *Anales of Biochemistry*, 182(1):16-19.
39. Lehmann P, Bolivar A, Marker R, (1973), Pioneer of the mexican steroid industry, *Journal Chemical Education*, 50(3):195-199.
40. Li F, Fernández P, Rajendran P, Hui K y Sethi G (2010), Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells, *Cancer Letters*, 292:197- 207.
41. Li J, Liu X, Guo M, Liu Y, Liu S y Yao S (2005), Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of diosgenin, *Analytical sciences*, 21:561-564.
42. Malumbres M y Barbacid M (2009), Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nature Review Cancer*, 9(3):153-166.
43. Melzig MF, Hebestreit P, Gaidi G (2005), Structure-activity relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin. *Planta Med*, 71:1088–1090.
44. Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, Sashida Y (2001) Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins, *Biol Pharm Bull*, 24(11):1286-1289.
45. Park M, Kang J, Choi J, Kang C, Kim T, Bae S, Kang S, Kim S, Choi W, Cho C, Chung H, Lee Y y Lee S (2003), Phytosphingosine induces apoptotic cell death via caspase 8 activation and Bax translocation in human cancer cells, *Clin Cancer Res*, 9(2):878-85.
46. Podolak I, Galanty A y Sobolewska D (2010), Saponins as cytotoxic agents: a review, *Phytochem Rev*, 9(3): 425–474.
47. Poza J, Rodríguez J y Jiménez C (2010), Synthesis of a new cytotoxic cephalostatin/ritterazine analogue from hecogenin and 22-epi-hippuristanol, *Bioorganic et Medicinal Chemistry*, 18:58-63.
48. Principales características morfológicas de una célula en procesos de apoptosis o necrosis [Figura 1]. Tomado y modificado de: <http://es.dreamstime.com/stock-de-ilustracin-apoptosis-y-necrosis-diferencia-image47670498>).
49. Pubmed. Caspase-3 protein. Consultado: 28 Julio 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC88866.1>.

50. Qiu Y, Dou D, Cai L (2009), Dammarane-type saponins from *Panax quinquefolium* and their inhibition activity on human breast cancer MCF-7 cells. *Fitoterapia*, 80:219–222.
51. Raju J, Patlolla J, Swamy M y Rao C (2004), Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells, *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev*, 13(8):1392–1398.
52. Raju J y Mehta R (2009), Actividad antiproliferativa de la diosgenina frente a varias líneas celulares, *Cáncer*, 61:27-35.
53. Rojas M, Salmen S y Berrueta L (2009), Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación, *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*, 4(3):92-106.
54. Tschamber T, Adam S, Matsuya Y, Masuda S, Ohsawa N, Maruyama S, Kamoshita K, Nemoto H y Eustache J (2007), OSW-1 analogues: Modification of the carbohydrate moiety, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17:5101–5106.
55. Trouillas P, Corbière C, Liagre B, Duroux J y Beneytout J (2005), Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 1141-1149.
56. Scott C., Sobotka-Briner C., Wilkins D., Jacobs R., Folmer J., Frazee W., Bhat R., Ghanekar S., y Aharony D. (2003), Novel Small Molecule Inhibitors of Caspase-3 Block Cellular and Biochemical Features of Apoptosis., *Journal of Pharmacology and Exp Ther.*, 304(1):433-40.
57. Sun Y, Cai T-T y Zhou X (2009), Saikosaponin a inhibits the proliferation and activation of T cells through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Int. Immunopharmacol.*, 9:978–983.
58. Vázquez G, Escobar M, De Felici M, Echeverría O y Klinger F (2011), *Cell death in mammalian ovary*, Edit Springer, 235 pp.
59. Wang J, Wang G y Khan F (2015), Disorder of G2-M check point control in aniline-induced cell proliferation in rat spleen, *Plos one*, 10(7):1-14.
60. Williams J y Gong H, (2007), Biological activities and syntheses of steroidal saponins: The shark-repelling pavoninins, *Lipids*, 42(1):77-86.
61. Zanetta G, Lissoni A, Pellegrino A, Sessa C, Colombo N, Gueli D y Mangioni C (1998), Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, ifosfamide and paclitaxel for locally advanced squamous-cell cervical cancer, *Ann. Oncol.*, 9(9):977-80.
62. Zhang L, Yu J, Park B, Kinzler K y Vogelstein B (2000), Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents, *Science*, 290:989-992.

Apéndice

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Gibco BRL, EUA.)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma Chem. EUA.)	2 g

Los reactivos se disuelven en 950 ml de agua bidestilada. Ajustar pH a 7.3 y se aforar a 1 l. La solución se esteriliza por medio de filtrado con una membrana (0.22 µm). Almacenar a 4 °C. El medio de cultivo se complementa con Suero Fetal Bovino al 5 o 20%.

Verseno

EDTA (Sigma Chem. EUA.)	0.40 g
NaCl (Sigma Chem. EUA.)	8.00 g
KCl (Sigma Chem. EUA.)	0.40 g
Tris (Sigma Chem. EUA.)	3.04 g

Disolver los reactivos en 950 ml de agua bidestilada. Ajustar pH a 7.7 y aforar a 1 l. La solución se esteriliza por calor húmedo a 121 °C ±1 durante 15 min. Se almacena a 4 °C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

MgCl ₂ (Sigma Chem. EUA.)	0.10 g
CaCl ₂ (Sigma Chem. EUA.)	0.10 g
NaCl (Sigma Chem. EUA.)	8.00 g
KCl (Sigma Chem. EUA.)	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma Chem. EUA.)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma Chem. EUA.)	0.20 g

El MgCl₂ y CaCl₂ se disuelve en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1 N y se afora a 1000 ml. Se esteriliza usando filtro (Millipore) de poro de 0.22 µm y se almacena a 4 °C.

Glutaraldehído 1.1%

Tomar 0.157 ml de glutaraldehído (70 % v/v) y disolver en 99.843 ml de agua bidestilada. Almacenar a 4 °C.

Solución cristal violeta (0.1 %)

Hidróxido de sodio	(Sigma Chem. EUA.)	3.96 g
Ácido fórmico	(Sigma Chem. EUA.)	4.28 ml
Cristal violeta	(Sigma Chem. EUA.)	1.00 g

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH: 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se disuelve muy bien y por último se filtra usando papel Whatman núm. 2. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución de ácido acético (10 %).

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

Desactivación de suero fetal bovino (SFB)

El SFB es descongelado hasta temperatura ambiente, en seguida se coloca en un baño de agua a 56° C durante 30 min. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico.