



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**

CARRERA DE BIÓLOGO

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN
DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER**

**LABORATORIO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER**

*EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, CITOTÓXICO Y APOPTÓTICO
DEL TRIACETATO DE (12S, 20R, 23S, 25R)-12,23-DIHIDROXI-22-
OXO-5 α -COLOSTA-3 β , 16 β , 26-TRIILLO (AG-12), EN CÉLULAS DE
CÁNCER CERVICOUTERINO.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

LUIS ALBERTO EROSA-DE HARO

**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**



**FES
ZARAGOZA**

MÉXICO, D.F. 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno **EROSA DE HARO LUIS ALBERTO**, con número de cuenta **306130450**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20** del mes de **mayo** del 2014 a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. BENNY WEISS STEIDER

VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

SUPLENTE DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ
VÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, CITOTÓXICO Y APOPTÓTICO DEL TRIACETATO DE (12S, 20R, 23S, 25R)-12, 23-DIHIDROXI-22-OXO-5 α -COLOSTA-3 β , 16 β , 26 TRIILO (AG-12), EN CÉLULAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 8 de abril del 2014

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

“¿QUÉ ES LO IMPOSIBLE?...”

YO LO DESCRIBIRÍA COMO «UNA CONCLUSIÓN DEFECTUOSA EXTRAÍDA POR UN OBSERVADOR MAL INFORMADO, CUYA LIMITADA EXPERIENCIA CARECE DE LA INFORMACIÓN BÁSICA PARA COMPRENDER DE MODO EXACTO ALGO QUE SIMPLEMENTE NO ESTÁ DENTRO DE LOS PARÁMETROS ACEPTABLES DE LO QUE ES PARA ÉL LA REALIDAD». (STEVE ALTEN “EL TESTAMENTO MAYA”).

**“HAY DOS FORMAS DE VER LA VIDA:
UNA ES CREER QUE NO EXISTEN
MILAGROS, LA OTRA ES CREER QUE
TODO ES UN MILAGRO.”** (ALBERT
EINSTEIN).

**“BIOLOGÍA ES EL ESTUDIO DE LA VIDA...
PERO UN BIÓLOGO MÁS QUE ESTUDIAR
LA VIDA... ES AMANTE DE LA MISMA.”**
(ALBERT EINSTEIN).

**“ENSEÑAR NO ES UNA FUNCIÓN VITAL, PORQUE NO TIENE EL FIN EN SÍ MISMA; LA FUNCIÓN VITAL ES APRENDER.” “LOS GRANDES CONOCIMIENTOS ENGENDRAN LAS GRANDES DUDAS.”
“LA INTELIGENCIA CONSISTE NO SÓLO EN EL CONOCIMIENTO, SINO TAMBIÉN EN LA DESTREZA DE APLICAR LOS CONOCIMIENTOS EN LA PRÁCTICA.” “LAS CIENCIAS TIENEN LAS RAÍCES AMARGAS, PERO MUY DULCES LOS FRUTOS.”** (ARISTÓTELES).

**“LA CIENCIA SE COMPONE DE
ERRORES, QUE A SU VEZ, SON LOS
PASOS HACIA LA VERDAD.”** (JULIO
VERNE).

**“LA VIDA ES EL ARTE DE SACAR
CONCLUSIONES SUFICIENTES A
PARTIR DE DATOS INSUFICIENTES.”**
(SAMUEL BUTLER).

“LA CIENCIA SON HECHOS; DE LA MISMA MANERA QUE LAS CASAS ESTÁN HECHAS DE PIEDRAS, LA CIENCIA ESTÁ HECHA DE HECHOS; PERO UN MONTÓN DE PIEDRAS NO ES UNA CASA Y UNA COLECCIÓN DE HECHOS NO ES NECESARIAMENTE CIENCIA.” (HENRI POINCARÉ).

**“LA BIOLOGÍA ES LA CIENCIA DE LA
VIDA; PERO,.....LA VIDA,
IMPREDECIBLE E INDEFINIBLE,
ESCAPA COMO AGUA DEL CESTO DE
LA CIENCIA.”** (EMILIO CERVANTES).

**“PARA CADA PROBLEMA COMPLEJO
HAY UNA SOLUCIÓN SIMPLE, FÁCIL
DE ENTENDER Y COMPLETAMENTE
EQUIVOCADA.”** (SABIDURÍA
POPULAR).

Dedicatorias

Al finalizar mi carrera profesional he logrado uno de mis objetivos en la vida y quiero darles las gracias de manera especial a las personas que me apoyaron superando todos los obstáculos para lograrlo, con todo respeto y amor dedico este triunfo:

A mi **FAMILIA**; *Por su apoyo siempre incondicional y sus incontables sacrificios.*

A mis **PADRES**; *Porque gracias a ellos soy lo que soy y mis logros son primero de ellos.*

A mi **PADRE**, *por ser mi primer gran maestro, por tu ejemplo, por tu paciencia y tu labor.*

A mi **MADRE**, *por ser mi amiga, por escucharme, comprenderme, orientarme y consolarme, por su ocupación y desvelo.*

A mi **HERMANA**, *Porque más que mi hermana has sido siempre mi mejor amiga*

A **LUZ**, *por siempre estar a mi lado, dándome todo tu cariño y comprensión, por cada hermoso momento que hemos vivido en este tiempo y darme ánimos cuando más lo necesitaba.*

A mis honorables **AMIGOS**, *que si los nombro necesitaríamos como 3000 hojas, por ello gracias a todos ustedes, por estar presentes en todos aquellos momentos importantes, gracias por su apoyo y su sabiduría, por acompañarme en éste camino y hacerlo divertido.*

Un reconocimiento especial a **CHOPPER**, *por enseñarme que si te quedas todo el día sentado en el patio sin hacer nada, nunca llegarán las croquetas a tu plato, o creo que algo así me quiso decir.*

A AQUELLAS PERSONAS, *que lean este trabajo buscando respuestas a sus preguntas y que pretendan ayudar a la sociedad con sus investigaciones. Espero que les sirva y que tomen un poco de él para seguir realizando estudios de salud pública a nivel local, regional y nacional.*

Agradecimientos

Al **M. en C. Luis Sánchez Sánchez**, por abrirme las puertas del laboratorio permitiéndome formar parte de su equipo de trabajo y por sus enseñanzas que ayudaron a mi formación teórica, práctica y personal.

Al **M. en C. José Misael Vicente Hernández**, por sus enseñanzas durante mi formación en el laboratorio, su paciencia, tiempo, y por compartir su valioso conocimiento conmigo

Al **Dr. Hugo López Muñoz**, por compartirme su experiencia, conocimientos, por siempre tener el tiempo de apoyarme a resolver mis dudas.

A los miembros del jurado:

Dr. Benny Weiss Steider

M. en C. Luis Sánchez Sánchez

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

Dra. María de Lourdes Mora Garcia

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez

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

A la **Dra. Socorro Meza Reyes** y al grupo de investigadores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por sintetizar y otorgar el compuesto para realizar el presente trabajo.

Al **Dr. René García Sánchez**, jefe de enseñanza del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, y al **Dr. Dionisio Parra Roldán**, jefe del departamento de ginecología y perinatología del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, por habernos facilitado las muestras de cuello uterino con las que se realizó éste trabajo.

Ésta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto PAPIME: PE-206812 y del proyecto PAPIIT: IN222114-3

Índice

	Pág.
Resumen	1
I. Introducción	2
II. Marco teórico	5
a) La célula	5
b) Proliferación celular	6
c) Ciclo celular	7
d) Control del ciclo celular	8
e) Muerte celular	10
f) Especies reactivas de oxígeno	13
g) El cáncer	14
h) Cáncer cervicouterino (CaCU)	18
i) Virus de Papiloma Humano	19
j) Terapia del cáncer	21
k) Esteroides	24
III. Planteamiento del problema	30
IV. Justificación	31
V. Objetivos	32
VI. Hipótesis	33
VII. Metodología	34
VIII. Resultados	41
IX. Discusión de resultados	55
X. Conclusiones	61
XI. Perspectivas	62
XII. Bibliografía	63
XIII. Apéndice	76

Resumen

La organización mundial de la salud (OMS) establece al cáncer como una de las principales causas de muerte en todo el mundo; entre los más incidentes se encuentra el cáncer cervicouterino (CaCU), ocupando el segundo lugar en la población femenina, por lo que es considerado un problema de salud grave. Actualmente, se cuenta con diferentes alternativas terapéuticas utilizadas para su tratamiento (cirugía, radio y quimioterapia); sin embargo, son poco selectivas, ineficientes en estados avanzados y provocan efectos secundarios graves, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. En la actualidad se tiene un gran interés en alternativas basadas en compuestos de origen vegetal y especialmente en saponinas esteroides como la Hecogenina y sus derivados, ya que se les han adjudicado actividades biológicas diversas, entre las que se destaca su actividad antitumoral. La Hecogenina, aislada del *Agave sisalana*, es una saponina esteroideal no glicosilada, se le atribuye actividad antitumoral en células de osteosarcoma 1547, inhibe la proliferación en células de CaCU HeLa, además de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células sinoviales de artritis reumatoide humana y no producir efecto tóxico en linfocitos humanos. En éste trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico del derivado hecogenínico: Triacetato de (12S, 20R, 23S, 25R)-12,23-dihidroxi-22-oxo-5 α -colosta-3 β , 16 β , 26-triilo (AG-12) en células de CaCU (HeLa, CaSki y ViBo), así como en células no tumorales. Los resultados obtenidos muestran que el AG-12 afecta el potencial proliferativo en las líneas de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo, con una IC₅₀ de 7, 6.6 y 3.7 μ g/ml respectivamente a 24 horas del tratamiento. Interesantemente al evaluar el efecto antiproliferativo en las células no tumorales el potencial proliferativo se inhibe significativamente en las células linfocíticas (45.7%), mientras que en fibroblastos de cérvix el potencial no se ve afectado, indicando una acción antiproliferativa selectiva. El efecto en la morfología en las líneas celulares fue evidenciado por la reducción del citoplasma y núcleo, sugiriendo características apoptóticas. Por otro lado, la nula detección de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales y no tumorales (linfocitos y células no tumorales de cérvix), así como la nula o baja incorporación del yoduro de propidio (IP) sugiere que esta saponina no induce muerte por necrosis tanto en células tumorales como en no tumorales. Los resultados obtenidos para el AG-12 indican que este compuesto induce muerte por apoptosis. Los niveles detectados de la proteína proapoptótica caspasa-3 activa presenta variación de acuerdo al tipo celular, para HeLa 39.7%, CaSki 37.2% y ViBo 29.3%. La detección de especies reactivas de oxígeno provenientes del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en las células tratadas con el AG-12 mostró que el compuesto no induce la generación de este tipo de especies reactivas en las líneas celulares de CaSki y ViBo, concluyendo que en la muerte celular inducida por el AG-12 no participan especies reactivas provenientes del peróxido de hidrógeno en estas líneas. Mientras que en la línea celular HeLa esta si indujo a las células a generar especies reactivas provenientes del H₂O₂. La cantidad de ERO generada por el compuesto en esta línea celular hace suponer que estos radicales son posiblemente los inductores de la muerte por apoptosis. Estos resultados en conjunto, establecen que el AG-12 es un digno candidato para ser estudiado en modelos in vivo y ser evaluado como un agente con potencial antitumoral, cuya expectativa está basada en la ventaja de acción en el tiempo de administración y cuyos efectos colaterales serían leves o poco significativos.

I. Introducción

El cuerpo está compuesto por billones de células vivas (30×10^{18}) (**Fig. 1**). Las células normales del cuerpo crecen, se dividen en nuevas células y mueren de manera ordenada. Durante los primeros años de vida de una persona, las células normales se dividen más rápidamente para permitir el crecimiento. Una vez que se llega a la edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para reemplazar las células desgastadas o las que están muriendo y para reparar lesiones. El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada (American Cancer Society, 2013).



Fig. 1. Célula Humana.
Tomada De:
imagenescientificasmcrespo.blogia.com

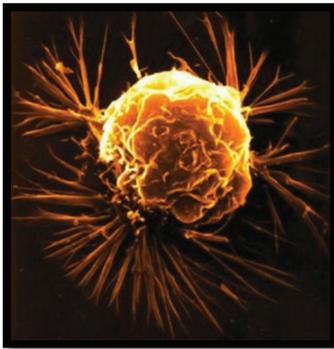


Fig. 2. Célula cancerígena.
Tomada de
Ojocientifico.com

El término “Cáncer” se usa para definir a un grupo de enfermedades que son caracterizadas por un desequilibrio entre la división y la muerte celular, con una proliferación celular incontrolada. Las células cancerígenas (**Fig. 2**) presentan, dentro de su singularidad, algunos sellos de identidad, los cuales son:

1. Activación del crecimiento celular mediante oncogenes.
2. Inactivación de los genes supresores del crecimiento.
3. Supresión e inactivación de la autodestrucción celular programada.
4. Activación de múltiples cascadas de genes que inducen una mayor multiplicación celular.
5. Creación de vasos sanguíneos o angiogénesis que permiten captar oxígeno celular y expandirse.
6. Capacidad de invadir los tejidos adyacentes o migrar a órganos distantes. Este último fenómeno de invasión se conoce como metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

A nivel mundial, el cáncer una de las principales causas de muerte, para el año 2008 se reportaron 12.7 millones de nuevos casos, 7.6 millones fallecieron por esta causa. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, se prevé que las muertes por neoplasias malignas sigan en aumento y que para 2030 se tengan 21.4 millones de nuevos por año, con una cifra de defunción de 13.2 millones (OMS, 2013).

Asimismo, la mortalidad más alta es debida al cáncer de pulmón, seguido por el de estómago, hígado, colón y mama; por sexo las incidencias más frecuentes en los

hombres son por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colón-rectal, esófago y próstata; y para las mujeres el de mama, pulmón, estómago, colón-rectal y cuello uterino (OMS, 2013).

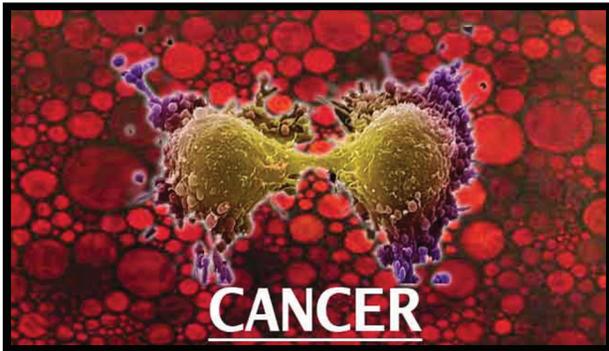


Fig. 3. Cáncer. Problema grave de salud. Tomada de www.topnews.in/health/

En el ámbito nacional, para 2008 el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35 303 defunciones (15.4%), mientras en los hombres fue la cuarta causa con 33 509 muertes, lo que representa 11.8% del total de defunciones entre los varones (**Fig. 3**). Algunos tipos de cáncer se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por factores biológicos o de riesgo,

lo que influye en su prevalencia. En las mujeres los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: el de mama (13.8%), cervicouterino (12.1%) e hígado (7.6%); es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por estos tipos de cáncer en comparación con 2006, se continúan manteniendo en los primeros lugares (INEGI, 2014).

El cáncer cervicouterino (**Fig. 4**) es uno de los carcinomas de mayor incidencia en México y es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas; durante el año 2006 el cáncer cervicouterino ocupó el segundo lugar en defunciones por tumores malignos en mujeres (11.2%) precedido tan solo por el cáncer de mama (13.4%) (INEGI 2014).



Fig. 4. Progresión del Cáncer cervicouterino: en esta enfermedad se presentan cambios en las células que cubren las paredes del cuello uterino. Tomada de National Cancer Institute, 2013.

Los factores de riesgo involucran actividad sexual a edad temprana, tener historial de enfermedades de transmisión sexual, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, tabaquismo y la principal, la presencia del virus del papiloma humano (VPH).

El cáncer cervicouterino, es originado por la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) en un 99%. Ocho tipos de VPH son responsables del 90% de los cánceres cervicales: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35. Los tipos de VPH 16 y 18 son los más comunes (Abarca K. 2007).

El estudio de la biología del cáncer cervicouterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se manifiesta y desarrolla, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatir este cáncer, no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana (Alonso de Ruiz, 2000).

Existen diversas terapias para combatir el cáncer, sin embargo éstas resultan ser poco selectivas, con efectos secundarios de gran consideración, además de que resultan ser ineficaces en estados avanzados del cáncer. Por ello es necesario el desarrollo de nuevas alternativas que permitan una mejor calidad de vida a los pacientes. En los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal, para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre los cuales podemos destacar a las saponinas esteroidales (**Fig. 5**). Éstas son un grupo de compuestos vegetales con propiedades antitumorales, como la diosgenina, hecogenina y sarsasapogenina, a las cuales se les ha atribuido una participación en procesos biológicos tales como: adyuvantes metabólicos, regulación de la proliferación, muerte celular y actividad anticancerígena (Orestes, 2008). Es por ello que el estudio de estas moléculas, sus derivados y análogos ha generado un gran interés.



Fig. 5. La flor de Gordolobo (*Verbascum thapsus*) es rica en compuestos esteroides; principalmente Saponinas. Tomado de www.iqb.es

II. Marco Teórico

La célula

La célula (**Fig. 6**) es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos. De modo que los procesos que asociamos a los organismos tiene su origen en la, o las células que los conforman. Las actividades cotidianas como la protección, ingestión, digestión, absorción de metabolitos, eliminación de desechos, movimiento, reproducción e incluso la muerte, son reflejo de procesos similares que ocurren en cada una de las células que los conforman; de modo que para que un organismo pluricelular crezca y se desarrolle adecuadamente requiere de una meticulosa regulación de las acciones antes mencionadas (Ross *et al*, 2005; Wayne *et al*, 2007).



Fig. 6. Todos los organismos vivos están compuestos por una o más células. Tomada De: www.curtisbiologia.com

La vida de una célula se inicia con su formación a través de la división de una célula madre y termina con la formación de sus células hijas o con su muerte. Las etapas a través de las cuales pasa la célula desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo de la célula.

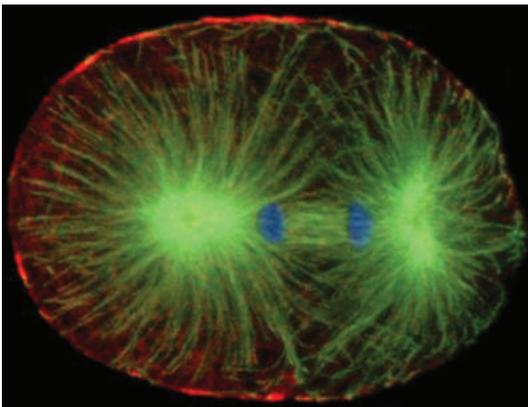


Fig. 7. División Celular. Tomada De: www.affarscoachen.nu

Las células regulan su medio interno, lo que les permite crecer, proliferar, dividirse y morir; los mecanismos de muerte pueden ser: necrosis o apoptosis y el mecanismo que les permite replicarse y dividirse es el ciclo celular; en el cual la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide (**Fig. 7**) (Alberts *et al*, 2002). En la proliferación celular se incrementa el número de células por división celular

(Sánchez, 2001), el control de la proliferación, la división y la muerte celular son esenciales para el correcto funcionamiento del organismo.

Proliferación celular

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular, es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos. Es característica en cada tipo celular por lo que está controlado de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por lo tanto la proliferación de las células. La proliferación celular está sometida en primer término a la presencia de factores externos como son los factores de crecimiento, interacciones con otras células y nutrientes. El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característicos. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. Hay células como las epiteliales o las hematopoyéticas con una alta capacidad proliferativa que están en constante renovación y otras, como las neuronas, que tienen una capacidad proliferativa muy baja. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer, donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas (**Fig. 8**). Por el contrario, una pérdida en la capacidad de división celular es uno de los factores que originan el envejecimiento (Alberts *et al.*, 2002).

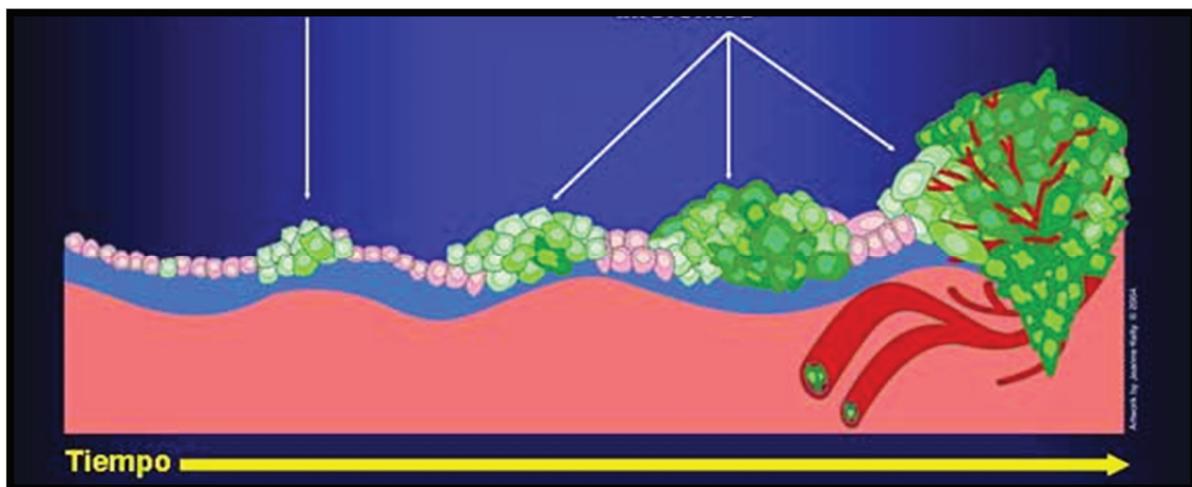


Fig. 8. Las células cancerosas son muy prolíferas, tienen tasas altas de división y crecimiento celular. Tomada De: *Alberts et al., 2002*

Ciclo celular

El ciclo celular comprende un proceso en secuencia ordenada que permite que la célula se divida, el tiempo que transcurre desde que ocurrió una mitosis hasta que vuelve a presentarse, varía mucho de un tipo de célula a otro. La mayoría de las células de un mamífero tienen ciclos celulares que duran 24 horas (Alberts, et al., 2002). La regulación precisa del ciclo celular es esencial para que una célula genere progenie con un genoma intacto y funcional. El crecimiento celular y la replicación del ADN deben estar cuidadosamente coordinados para que el ciclo progrese de manera armoniosa (Álvarez, 2007).

De manera general los eventos que se llevan a cabo durante el ciclo celular son los siguientes, (**Fig. 9**):

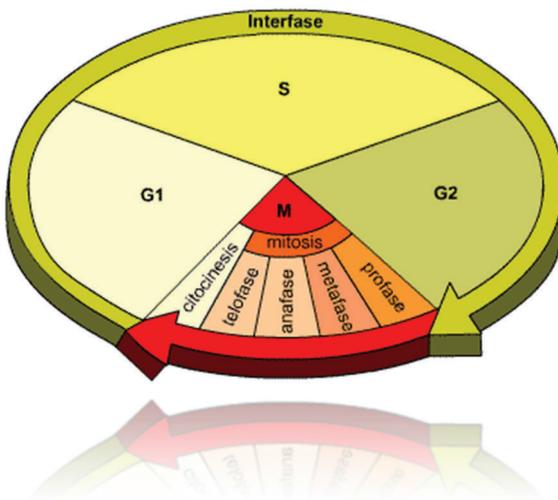


Fig. 9. Las cuatro fases sucesivas del ciclo celular de una célula eucariota típica. (Alberts, et al., 2002).

1. Interfase

- a) G1: Durante este periodo la célula es metabólicamente activa, crece, pero no replica su material genético. La célula recolecta nutrientes y factores de crecimiento a partir del torrente sanguíneo. La duración de esta fase en cultivos de células es altamente variable, va desde 6 horas hasta más de 24 horas, a diferencia de la uniformidad en el tiempo de las otras fases (Alvarado y Mayani, 2007).
- b) S: Durante esta fase el ADN se replica. Al inicio de esta fase se ha superado el punto de restricción (R), ya que la célula detecta que se encuentra en las condiciones

apropiadas de temperatura, nutrientes, factores de crecimiento y tamaño necesarios para iniciar la síntesis de ADN. También, aumentan las enzimas que participan en la replicación del ADN y se desplazan del citoplasma al núcleo para iniciar la replicación del genoma. A cada célula le toma entre 6-8 horas replicar cerca de 40 000 genes agrupados en 23 pares de cromosomas. En esta fase, si hay daño al ADN, la célula detiene la replicación hasta que dicho daño se ha reparado, y si no es posible reparar dicho daño la célula activa mecanismos de muerte celular programada (González, 2009).

c) G2: Puede durar varias horas, probablemente para producir más ARN, enzimas y proteínas necesarias al final de la división en cada célula. En promedio en las células de mamíferos dura aproximadamente 2 horas. Una célula que era diploide ($2n$) en este momento se observa tetraploide ($4n$). La célula debe comprobar que ha replicado su ADN completamente y que lo ha hecho una sola vez. La célula sigue creciendo y se sintetizan proteínas que se necesitan para la división (González, 2009).

2. Mitosis: La mitosis, denominada fase M, tiene una duración menor a una hora y está subdividida en varios estadios. En esta fase, los cromosomas duplicados se condensan, la membrana nuclear se desintegra y los cromosomas se segregan en cantidades equivalentes mediante estructuras de tubulina (huso mitótico). Posteriormente, el huso mitótico se desensambla y se forman dos núcleos con sus respectivos cromosomas. Finalmente, inicia la citocinesis o división celular para formar dos células hijas con la misma información genética (Alison, 2002; Alberts *et al.*, 2002).

Si al término de la fase M la célula no recibe los estímulos adecuados para iniciar el proceso de replicación y seguir a la fase G1, ésta puede pasar a G0, el cual es un lapso en la que la célula es metabólicamente activa. Algunos tipos de células se quedan en G0, como es el caso de las neuronas (Alberts *et al.*, 2002).

Control del ciclo celular

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en los complejos proteicos, entre los que se encuentran las ciclinas y las cinasas dependientes de

ciclinas (CDK) (**Fig. 10**) (Baynes y Dominiczak, 2008). Las cinasas dependientes de ciclinas dirigen la transición de las células, de una fase a la siguiente. Estas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas de serina/treonina y por medio de fosforilaciones activan secuencialmente la maquinaria del ciclo celular. Existen diferentes tipos de CDK (CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 principalmente) aunque las concentraciones cambian a lo largo del ciclo, la actividad cinasa de cada una, se inicia en eventos particulares de cada fase (Ortega *et al.*, 2002).

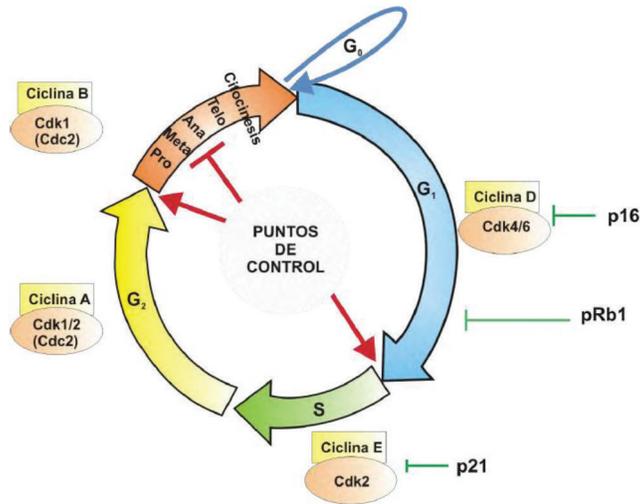


Fig. 10. Regulación del ciclo celular. La activación estimuladora de los factores de crecimiento conlleva la activación dependiente de ciclinas de las fases del ciclo, mediante las CDK y sus inhibidores. CDK= cinasa dependiente de ciclina; Rb= proteína del retinoblastoma, y puntos de control del ciclo celular (tomada y modificada de Alberts *et al.*, 2002; Baynes y Dominiczak, 2008).

En su estado monomérico las CDK son inactivas. Su principal forma de activación es la unión a subunidades reguladoras, llamadas ciclinas (ciclinas D, ciclina E, ciclina A y ciclina B). Las ciclinas D son sintetizadas en la fase G₁. La ciclina E se sintetiza al final de la fase G₁ alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase G₁ a fase S y se degrada durante la fase S. La ciclina A se sintetiza al inicio de la fase S, alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase S a G₂ y se degrada en la fase M (Alberts, *et al.*, 2002).

Puntos de regulación de ciclo celular.

La progresión del ciclo celular está estrictamente regulado para asegurar que el paso (la transición de una fase a otra) sólo se realice si los eventos de la etapa previa han concluido. El sistema de control está regulado por puntos de control que pueden detener el ciclo en puntos específicos. Los puntos de control que detectan el daño del ADN los podemos encontrar en G₁/S, en G₂/M y en M (figura 10). Estos puntos de control facilitan la reparación del ADN y promueven la muerte celular en células sin reparar (Bucher y Britten, 2008).

Muerte celular

Durante el desarrollo y también en el estado adulto, hay numerosas células que degeneran y mueren. La muerte celular es un proceso fisiológico ó patológico que conduce a la eliminación celular y que tiene una función esencial en la homeostasis de los tejidos y en los estados patológicos. Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo las más

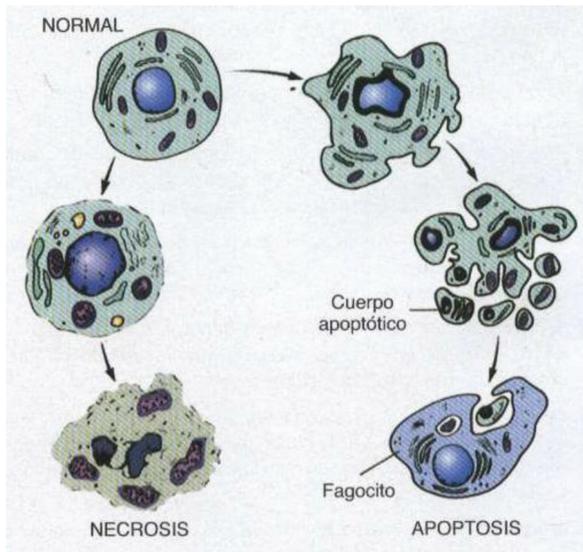


Fig. 11. Cambios estructurales secuenciales que se observa en la necrosis (izquierda) y la apoptosis (derecha) Tomada De: Robbins *et al.*, 1993.

habituales la necrosis y apoptosis (Raff M., 1998). La primera tiene un carácter patológico y se desencadena tras un daño celular extremo (por falta de oxígeno o envenenamiento, por ejemplo), que daña irreversiblemente el funcionamiento de la célula (Paniagua, 2007). En la segunda muerte las células moribundas disminuyen de tamaño, se condensan y luego se fragmentan, liberando pequeños cuerpos apoptóticos limitados por membranas, que generalmente son absorbidos por otras células (**Fig. 11**). El núcleo se condensa y el ADN se fragmenta (Lodish et al., 2005).

Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología, bioquímica e incidencia. Si bien ambos tipos son ordenados, la apoptosis presenta una mayor relevancia por ser un proceso natural a diferencia de la necrosis.

Necrosis

La necrosis, también llamada muerte celular patológica o accidental, ocurre cuando las células son expuestas a una variación extrema de las condiciones fisiológicas (ejemplo hipoxia), lo cual puede resultar en un daño a la membrana plasmática (Majno, 1995). La necrosis comienza con una incapacidad de las células para mantener la homeostasis, dirigiéndolas a una pérdida de la permeabilidad de la membrana y la consiguiente entrada de iones extracelulares y agua. La célula se hincha y se rompe (lisis). Debido a esta lisis, los contenidos citoplasmáticos, incluyendo enzimas liposomales, son liberados a la matriz

extracelular, por lo que la necrosis está asociada a un daño extensivo a tejidos, lo que origina una respuesta inflamatoria extensa (Williams, 1991).

Apoptosis

La muerte celular programada es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis, así como su renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia. Esta muerte es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta (De la Rosa et al., 2000), la regulación de una respuesta inmunológica (Abbas et al., 1997), así como la muerte natural de las células diferenciadas en el final de su vida útil (Lockshin et al., 2001). La apoptosis es un tipo de muerte celular ordenada y programada genéticamente, en la cual la célula responde a ciertas señales iniciando una respuesta normal que conduce a su propia muerte, que se caracteriza por la compactación total de la célula y su núcleo, la disección ordenada de la cromatina en pedazos por la acción de una endonucleasa especial que separa ADN y el rápido engullimiento de la célula por fagocitosis (Karp, 1996). Muchos de los mecanismos moleculares de la apoptosis se han conservado a lo largo de la escala evolutiva desde nematodos hasta mamíferos (Vaux et al., 1992).

Existen diferentes mecanismos de control de muerte por apoptosis como son la vía intrínseca y extrínseca (**Fig.12**). Existe una familia de diversas proteínas que actúan regulando el proceso de apoptosis en seres humanos. Miembros de la familia Bcl-2 contienen distintos dominios estructurales como BH1, BH2, BH3 y BH4 que corresponden a segmentos helicoidales, unos actúan como anti-apoptóticos como Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 y otros funcionan como proapoptóticos los cuales son Bax, Bad, Bak, Blk y Bid (Schinoni et al., 2006). El mecanismo central de la maquinaria de muerte en cualquier célula está constituido por una familia de proteasas, a las que se han denominado caspasas (Alnemri et al., 1996), independientemente de la naturaleza del estímulo inductor de muerte, el proceso siempre resulta en la activación de las caspasas que conduce a la fragmentación del material genético de forma rápida y controlada, sin causar daños en el entorno celular.

Vía extrínseca

La vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores en la membrana celular en respuesta a señales extracelulares (Cuello et al., 2006). En esta vía, los receptores como TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 o DR-5, interactúan con sus respectivos ligandos. Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas. Finalmente, la caspasa 8 puede activar a la caspasa 3, iniciándose así el programa de muerte celular (Shen et al., 2006), o bien puede escindir a Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2. Bid se traslada del citoplasma a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma (Velázquez et al., 2004).

Vía intrínseca

Una señal determinada de muerte, como agentes genotóxicos utilizados en quimioterapia y radiación, determinan una respuesta de estrés celular que induce apoptosis a través de esta vía (Cuello et al., 2006), donde intervienen numerosas proteínas proapoptóticas, tales como citocromo C, AIF y SMAC/DIABLO (Porter et al., 2006). El citocromo c liberado se une a Apaf-1 para formar un complejo multimérico que recluta y activa a la procaspasa 9. La caspasa 9 activa a su vez a las procaspasas 3 y 7 (Velázquez et al., 2004), que son las responsables de la escisión de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Gogvadze et al., 2006).

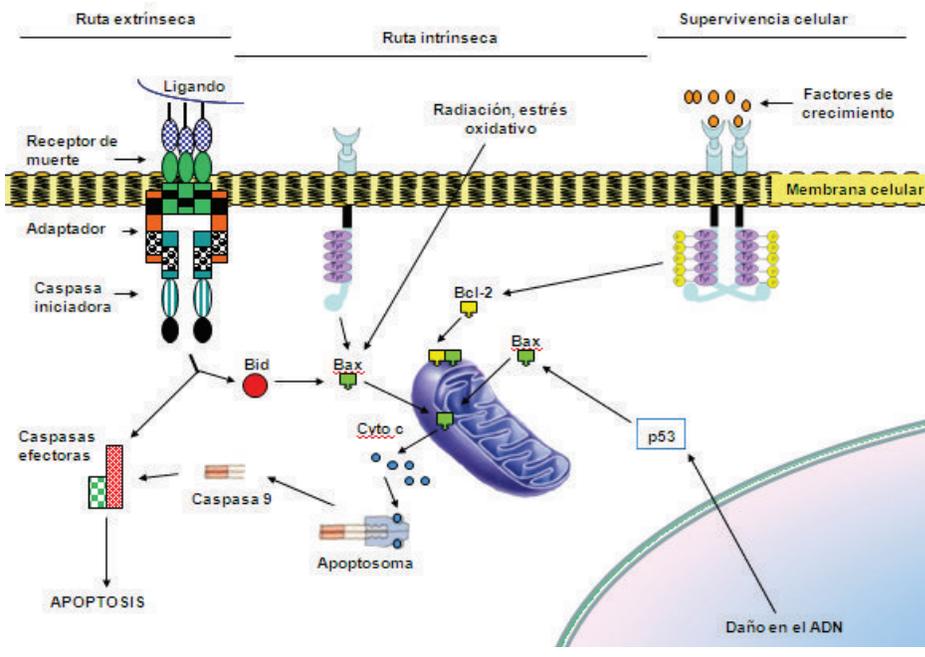


Fig.12. Inducción de apoptosis por señales de muerte celular o por la retirada de factores de supervivencia. (Modificado de: Gupta *et al*, 2006).

Morfológicamente, la diferencia con la necrosis, es que en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular. Bioquímicamente, la característica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energía y de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energía y la síntesis de proteínas se interrumpe (De Toro G, 1996; Burgues *et. al*, 2005).

Así el desarrollo de una apoptosis inapropiada está implicada en muchas enfermedades humanas, como el Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varias formas de cáncer (Burgues *et. al*, 2005).

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son una familia de moléculas altamente reactivas que incluyen el radical hidroxilo (-OH), el anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y radicales de peróxido orgánico. Las ERO se pueden producir *in vivo* por varios sistemas de enzimas, tales como la NADPH oxidasa, lipoxigenasas, ciclooxigenasas, y el citocromo P450. En condiciones fisiológicas, la cadena respiratoria mitocondrial es el sitio principal para la producción de ERO en células (Fleury *et al.*, 2002). Los electrones transportados por la cadena de transporte de electrones pueden ser desviados de la vía a oxígeno, generando anión superóxido. Las ERO son especies extremadamente transitorias debido a su alta reactividad química. Es esta reactividad química responsable de la destrucción del ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos. Sin embargo, en condiciones normales, los antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), la catalasa, y el superóxido dismutasa (SOD) generalmente previenen el daño tisular (Curtin *et al.*, 2002). Cuando las ERO sobrepasan los sistemas de defensa de la célula, hay una alteración de la homeostasis redox, provocando estrés oxidativo (Schreck *et al.*, 1991).

La muerte celular necrótica debido al estrés oxidativo está bien documentada (Halliwell *et al.*, 1989). Este fenómeno implica daño celular masivo, que en su mayoría sería causado por el radical hidroxilo altamente reactivo. Sin embargo, la posibilidad de que las ERO sean las moléculas de señalización en las muertes fisiológicas, como la apoptosis, es una idea más reciente. Existe una creciente evidencia de que estos compuestos pueden jugar un papel central en las vías de transducción de muerte celular. De hecho, hay varias

observaciones que sugieren que las ERO pueden mediar la apoptosis: (1) la adición de las ERO, o el agotamiento de los antioxidantes endógenos puede promover la apoptosis (Lin et al., 2004), (2) la apoptosis a veces puede ser retrasada o inhibida por antioxidantes (Grub et al., 2002; Medan et al., 2005) y (3) muchos estímulos de apoptosis, tales como TNF- α (Sidoti et al., 1998), los glucocorticoides (Oshima et al., 2004), la retirada del factor de crecimiento (Kirkland et al., 2002), y la infección por virus de inmunodeficiencia humana, se ha demostrado que estimulan la producción de ERO (Gil et al., 2003).

El cáncer

El término cáncer, proviene de “cangrejo” en latín, y fue acuñado por Hipócrates en el siglo V a. C. para describir enfermedades en las que los tejidos crecen y se diseminan de manera incontrolada por todo el organismo (Bolsover, et al., 2004). Éstas son producidas por cambios en la conducta de las células provocada por modificaciones en la información genética subyacente en las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales. En tanto el crecimiento del tumor permanezca delimitado, la enfermedad en ordinario se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y del tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar metástasis, es decir, células que se desprenden de la masa original entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo, donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (**Fig. 13**) (Karp, 2011).

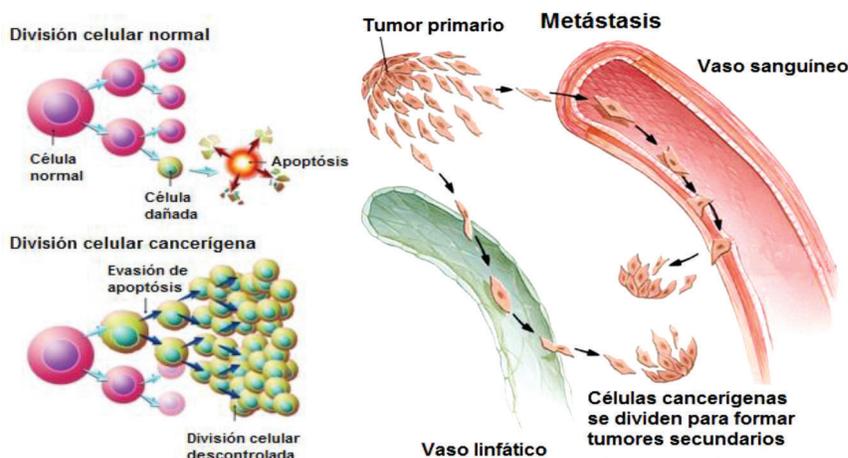


Fig. 13. Comparación en la división celular entre una célula cancerígena y una no cancerígena, y el Proceso de metástasis a partir de un tumor primario. Tomado De <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Met%C3%A1stasis> y <http://www.aurorahealthcare.org/yourhealth/healthgate/getcontent.asp?URLhealthgate=%22103616.html%22>.

Los genes que participan en la carcinogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma cuyos productos proteicos están implicados en actividades celulares como la progresión a través del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN y la adherencia entre las células vecinas (Karp, 2011). Estos genes se dividen en dos grandes categorías: oncogenes y genes supresores de tumores. Un oncogén, es un gen cuya presencia puede desencadenar el desarrollo del cáncer. Algunos oncogenes se introducen en las células por virus que causan cáncer, mientras que otros surgen por la mutación de genes celulares normales. En cualquier caso, los oncogenes codifican proteínas que estimulan la proliferación celular excesiva y/o promueven la supervivencia celular. Los oncogenes surgen por mutación de genes celulares normales denominadas protooncogenes. El término protooncogen se denomina a los genes que intervienen en la regulación positiva de los procesos involucrados en la proliferación celular, y por lo tanto, al presentarse mutaciones dominantes, lo que se provoca en potenciar su función, tales mutaciones pueden bloquear o afectar puntos de inducción de degradación, dominios de regulación negativa. Al contrario que los oncogenes, cuya presencia puede inducir la formación de cáncer, la pérdida o inactivación de los genes supresores de tumores puede también conducir al cáncer. Éstos actúan como frenos en el proceso de la proliferación celular, mientras que los oncogenes funcionan como aceleradores de la proliferación (Wayne, et al., 2007). Douglas Hanahan y Robert Weinberg en 2011 propusieron que las células tumorales presentan las siguientes características (**Fig. 14.**):

- ✓ Autosuficiencia en señales de crecimiento. Las células normalmente no proliferan si no se estimulan apropiadamente por un factor de crecimiento. Las células cancerosas escapan de estos requerimientos a través de la acción de oncogenes que producen cantidades excesivas o versiones mutadas de proteínas implicadas en las rutas estimuladoras del crecimiento.

- ✓ Insensibilidad a las señales anticrecimiento. Los tejidos normales están protegidos de la proliferación celular excesiva por una variedad de mecanismos inhibidores del crecimiento. Las células cancerosas deben evadir tales señales si quieren continuar proliferando. La mayoría de las señales anticrecimiento actúan durante la parte final de G1 y ejercen sus efectos a través de la proteína Rb, cuya fosforilación regula el paso a través del punto de restricción hacia la fase S.

- ✓ Evasión de la apoptosis. La evasión de la apoptosis, que destruiría las células genéticamente dañadas, es crucial para la supervivencia de las células cancerosas. Con frecuencia, esto se lleva a cabo por la existencia de mutaciones con pérdida de función en el gen supresor de tumores p53, que altera la vía principal de reparación o por la que si el ADN resulta dañado se desencadenaría la apoptosis.
- ✓ Potencial replicativo sin límite. El efecto global de los tres rasgos precedentes es desacoplar a las células cancerosas de los mecanismos que normalmente equilibran la proliferación celular con las necesidades de nuevas células del organismo. Sin embargo, esto no aseguraría la proliferación ilimitada en ausencia de un mecanismo de reincorporación de secuencias teloméricas que se han perdido de los extremos de cada cromosoma en cada ciclo de replicación del ADN. El mantenimiento de los telómeros, se consigue activando el gen codificador de la telomerasa, pero unas pocas células cancerosas activan un mecanismo alternativo para mantener los telómeros que implica el intercambio de información de las secuencias entre cromosomas. En cada caso, las células cancerosas, mantienen la longitud de los telómeros por encima de un umbral crítico y retienen de ese modo la capacidad para dividirse indefinidamente.
- ✓ Angiogénesis sostenida. En ausencia de un aporte sanguíneo, los tumores no crecerán más allá de unos pocos centímetros de diámetro. De esta manera, en algún punto del desarrollo temprano del tumor, las células cancerosas deben desencadenar la angiogénesis. Una estrategia común implica la activación de los genes que codifican a estimuladores de la angiogénesis combinada con la inhibición de genes que codifican a inhibidores de la angiogénesis. Por ejemplo: los oncogenes ras desencadenan el aumento en la expresión de los genes que codifican al activador de la angiogénesis VEGF.
- ✓ Invasión del tejido y metástasis. La capacidad para invadir tejidos circundantes y metastatizar en lugares alejados es la característica definida que diferencia un cáncer de un tumor benigno. Las células cancerosas muestran tres propiedades que desempeñan un papel crucial en estos acontecimientos: la adhesión célula a célula disminuida, motilidad aumentada y la producción de proteasas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. La adhesividad disminuida se produce con

frecuencia por cambios en la E-cadherina, que se pierde en la mayoría de los cánceres epiteliales o bien por mutación, expresión génica disminuida o destrucción de la propia E-cadherina (Weinberg y Hanahan, 2011).

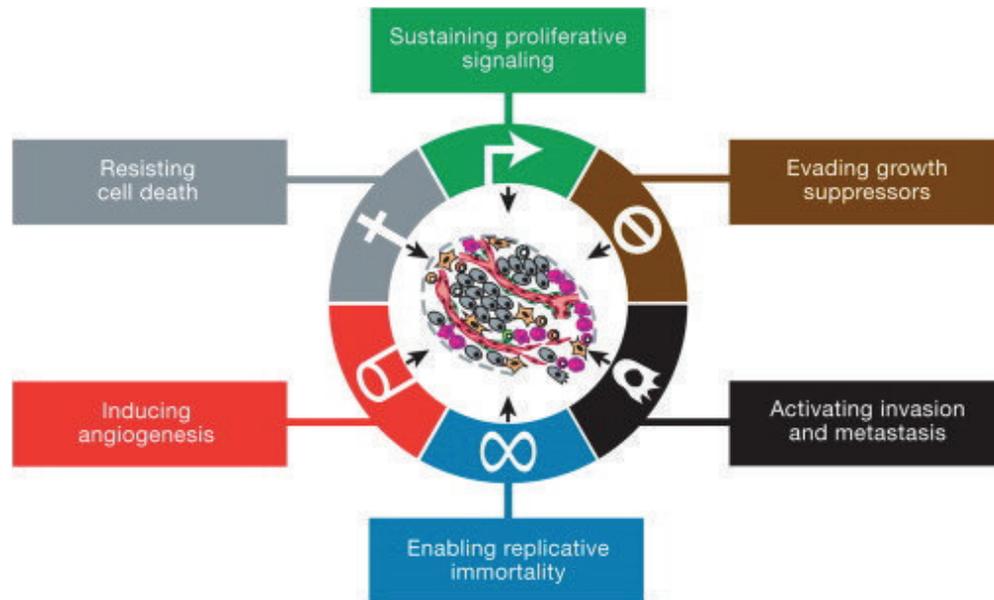


Fig. 14. Las células del cáncer y los tumores formados por ellas, deben adquirir un sistema específico de capacidades. Estas capacidades/características, son llamadas los 'sellos del cáncer' Tomado y modificado de Weinberg y Hanahan, 2011.

Entre otras características se encuentran la inestabilidad genómica, la evasión de la senescencia celular, las alteraciones epigenéticas que modifican los genes relacionados con el cáncer, las alteraciones de la proliferación y diferenciación celular por microARN, las alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa y la glutamina, la participación de las células trocales tumorales en el mantenimiento de la proliferación celular, también de las células estromales en el microambiente tumoral, y las alteraciones en la presentación antigénica e inmunosupresión en el microambiente tumoral (Valdespino y Castillo, 2010). Existen factores biológicos, químicos y físicos que contribuyen al desarrollo del cáncer. Dentro de los biológicos se encuentran los virus, como el virus de papiloma humano que causa cáncer cervicouterino, el virus Epstein-Barr para linfoma de Burkitt, o algunas bacterias como *Helicobacter pylori* para cáncer de estómago (Wayne B., et al., 2007). En los químicos se puede mencionar sustancias cancerígenas como el benceno y dentro de los físicos se encuentra los rayos UV; todos muestran una propiedad común, provocan de

manera directa cambios en el genoma, sin embargo la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen (Alberts, et al., 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2008 que la principal causa de muerte en el mundo es el cáncer (7.6 millones de casos), localizados en su mayoría en pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2008), mientras que en México el INEGI estimó que la mayor cantidad de defunciones en el 2011 a causa de tumores malignos fueron para los hombres pulmón y próstata mientras que en el caso de las mujeres fue en mama y cervicouterino (INEGI, 2013).

Cáncer cervicouterino (CaCU)

De todos los tipos de cáncer, el CaCU presenta una gran relevancia por ser la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial.

El CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer a nivel mundial. Hacia el año 2002, se presentaron 12,512 nuevos casos de CaCU de los cuales 5,777, el 46 % de los casos, fueron decesos; y para el 2007 se presentaron alrededor de 16,000 casos nuevos (López y Lizano, 2007).

En México, en las mujeres, el 13.9% de las defunciones por tumores malignos corresponden al CaCU y 15 % al de mama, mientras que el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó un 9.2 % de las muertes (INEGI 2013).

El CaCU fue la primera causa de muerte en el año 2007, entre las mujeres mexicanas de 40 y 50 años de edad, representando 16.6% con respecto a

otro tipo de cáncer. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas, que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica CaCU.

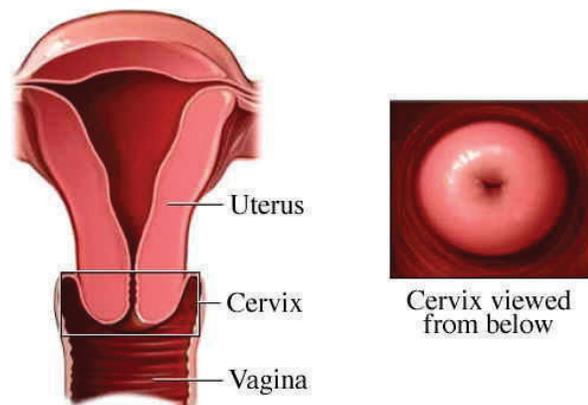


Fig. 15. Esquema del aparato reproductor femenino. Se muestra la localización de cérvix. Tomada de www.health.com.

El CaCU es una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas en los tejidos del cuello uterino (**Fig. 15**). Antes de que se localicen dichas células en el cuello uterino, sus tejidos experimentan cambios y empiezan a generar células anormales proceso conocido como displasia (**Fig.16**).

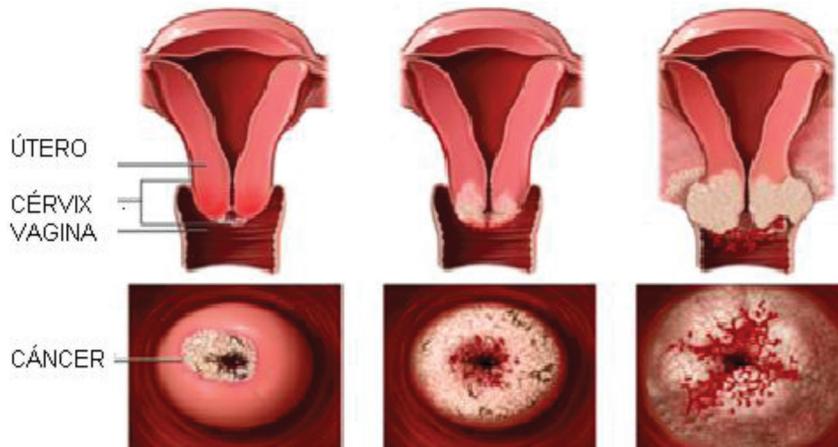


Fig. 16. Desarrollo de cáncer cervical. El cáncer cervical inicialmente progresa en capas de tejido que se encuentran en la superficie del cervix, posteriormente invaden capas más profundas del cervix, del útero, y finalmente se extiende en el área pélvica y otras áreas del cuerpo iniciando el proceso de metástasis. Tomada de www.health.com.

Existen varios factores de riesgo para el CaCU entre los cuales se encuentran presencia del virus del papiloma humano (VPH), múltiples parejas sexuales, actividad sexual a temprana edad, tener historial de otras enfermedades de transmisión sexual, tabaquismo, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, y bajo nivel socioeconómico (Tirado et al, 2005).

El principal agente etiológico del CaCU es el VPH, una infección de transmisión sexual común. El VPH es además causante de carcinomas en otros tejidos: anal, vulvar, y de pene, etc. No obstante, es importante denotar que menos de 5% de las mujeres infectadas por el VPH contraen CaCU, ya que la infección persistente por el VPH tiende a propiciar la displasia de grado alto y al cáncer.

Virus de Papiloma humano

El virus del papiloma, pertenece a la familia Papillomaviridae. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infectan epitelios de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano

tiene una cápside icosaédrica sin envoltura, con un diámetro aproximado de 55 nm que contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (López y Lizano, 2006).

El genoma del VPH se compone de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 kb. Está organizado en tres regiones: la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8), la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) y la región regulatoria superior, la cual no se transcribe. Una vez en el interior celular, el genoma viral es dirigido al núcleo, donde se replica de forma episomal o replicación tipo plásmido; sin embargo cuando ya se ha generado el CaCU, el genoma viral puede encontrarse integrado al genoma celular, preservando siempre los oncogenes E6 y E7 y perdiendo o interrumpiendo uno o más genes virales. Las proteínas tempranas E6 y E7 son responsables de la transformación carcinogénica provocada por los virus de alto riesgo. La proteína E6 impide la translocación de p53 al núcleo y propicia su degradación por ubiquitinización, promueve la sobreexpresión de la telomerasa, e interactúa negativamente con Bax. E7 se une a proteínas supresoras de tumores de la familia de pRb y promueve la duplicación celular. Mientras que E1 y E2 son las proteínas responsables de la replicación viral (Benuto y Berumen, 2009; López y Lizano, 2006; Motoyama *et al*, 2004).

Los VPH se han clasificado en virus de alto o bajo riesgo, de acuerdo a su potencial oncogénico que presentan para el desarrollo de lesiones cancerosas. Dentro de esta clasificación podemos encontrar ejemplos representativos de cada grupo, **tabla 1 (Fig. 17)** (Tjalma, *et al*, 2004).

Riesgo	Tipo de VPH
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Bajo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Tabla 1. Clasificación de los VPH de alto o bajo riesgo, de acuerdo a su potencial oncogénico. Tjalma, *et al*, 2004

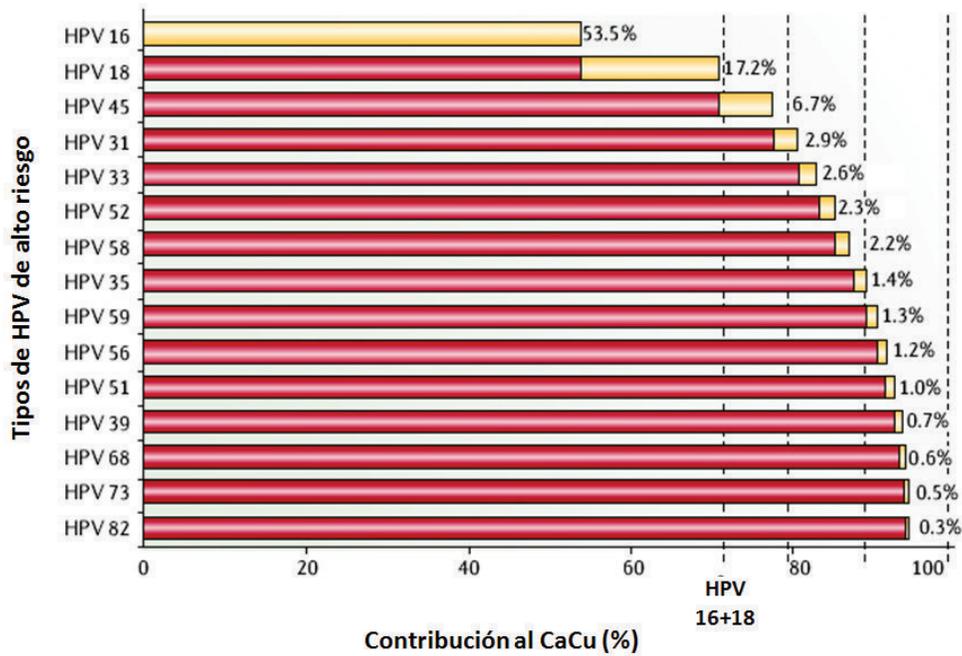


Fig. 17. Proporción de casos de CaCU generados por VPH de alto riesgo. Se muestra el grupo de VPH tipificados como de alto riesgo, dada la alta frecuencia de su presencia en muestras de CaCU. Las barras amarillas representan los porcentajes que cada genotipo viral aporta a la totalidad de casos de CaCU y las barras rojas muestran los porcentajes acumulativos de casos generados por los VPH oncogénicos. Los tipos virales VPH16 y VPH18 son responsables de alrededor del 70% del total de los casos de CaCU. Modificada de (Roden & Wu, 2006).

Las líneas celulares de CaCU que se utilizaron en este trabajo son: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2009), CaSki, células provenientes de CaCU, que fueron establecidas a partir de células de metástasis en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2009) y ViBo células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al.*, 1992).

Terapia y prevención del cáncer

El tratamiento del CaCU varía según el estadio. Hoy en día, existen diferentes tratamientos. Los tratamientos más frecuentemente son: cirugía, radioterapia y quimioterapia (González *et al.*, 2000).

Cirugía

La cirugía fue el primer tipo de tratamiento utilizado para combatir el cáncer y hasta la fecha sigue siendo la opción más utilizada para remover tumores sólidos. Generalmente se utiliza para tratar el cáncer que no ha formado metástasis, pero también se puede aplicar para

eliminar el cáncer que ha pasado a otros tejidos, como nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, para asegurar que todo el tejido afectado ha sido extraído. Las cirugías que se utilizan en el CaCU son: criocirugía, cirugía con láser, biopsia de cono, histerectomía básica y radical.

Radiación

La radiación utiliza ciertas longitudes de onda de alta energía para eliminar las células malignas, como los rayos gamma. Esta técnica se puede utilizar a varios niveles para destruir a las células transformadas o para prevenir que las células normales o malignas proliferen y formen tumores. En este tratamiento se llegan a eliminar a todas las células que se encuentran ciclando, efecto que también afecta a células no tumorales.

Quimioterapia

Los primeros registros de la quimioterapia datan desde principios del siglo XVI, cuando se administraban por vía sistémica metales pesados en el tratamiento del cáncer, aunque la toxicidad era severa y sólo podían curar algunos tipos de cáncer. Desde entonces, se han buscado nuevos agentes antitumorales que logren curar, controlar u ofrecer tratamientos paliativos para el cáncer (Baquiran y Gallagher, 2001).

La quimioterapia es uno de los tratamientos de primera elección para algunos tipos de cáncer y en algunos otros se emplea en combinación con radioterapia, cirugía o inmunoterapia. El objetivo principal de los compuestos usados en la clínica contra el cáncer es inducir muerte a las células neoplásicas, inhibiendo en algunos casos procesos relacionados al ciclo celular. Los compuestos empleados en la quimioterapia pueden inicialmente detener la división celular (citostáticos) y posteriormente inducir la muerte celular (citotóxicos o apoptóticos) (Avendaño y Menéndez, 2008).

Las vacunas

Entre las nuevas opciones de prevención destacan el uso de las vacunas preventivas a VPH, las cuales están basadas en la producción de las partículas tipo virus (virus – likeparticles, VLPs) (Serrano y Pastrana, 2007).

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) ha aprobado dos vacunas para prevenir la infección por VPH: Gardasil

y Cervarix. Ambas vacunas son muy efectivas en la prevención de infecciones por los tipos 16 y 18 de VPH, dos de los VPH de “alto riesgo” que causan la mayoría (70%) de los CaCU y de ano. Gardasil impide también la infección por los tipos 6 y 11 de VPH, los cuales causan 90% de las verrugas genitales (Koutsky, et al., 2002).

A pesar de que los resultados del uso de estas vacunas son muy prometedores, los beneficios clínicos a largo plazo sólo podrán ser evidentes dentro de varias décadas (Demarteau et al., 2010). Debido al costo de estas vacunas, resulta complicada su administración gratuita en países en vías de desarrollo, que es donde hay una mayor prevalencia de CaCU. Aunado a ello, no se debe olvidar que estas vacunas no confieren protección contra todos los tipos de VPH de alto riesgo, y que existe la posibilidad de que haya un desplazamiento viral y aumenten los casos de CaCU generados por los tipos de VPH para los cuales las vacunas no generan protección (Villa, 2010).

Las terapias contra el cáncer (cirugía, radiación y quimioterapia), resultan ser efectivas cuando el tumor está en una fase temprana de desarrollo, sin embargo resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad, además de generar efectos secundarios graves demeritando la calidad de vida de los pacientes. Tal es el caso de los compuestos utilizados en la quimioterapia, cuyo principio de acción de la mayoría de estos compuestos, se basa en el potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con de las células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no cancerosas que crecen y se dividen rápidamente, como lo son las de la sangre.

Una parte de la investigación en el desarrollo de estos fármacos, se enfoca en encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Por otro lado, algunos productos naturales, son metabolitos secundarios de plantas, hongos y organismos marinos cuya función no se conoce con exactitud, aunque se cree que muchos se originaron en estos seres para defenderse de diversos agentes externos. Como consecuencia de ser el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, los productos naturales poseen actividades biológicas muy variadas, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales

específicas y generar nuevos fármacos. Actualmente existe un fuerte interés en moléculas de origen vegetal y en particular de esteroides producidos en distintos tipos de plantas, a los cuales se les atribuye actividad antiproliferativa y antitumoral

Esteroides

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales. La familia de los esteroides incluye una gran variedad de compuestos como son las hormonas, los emulsionantes y muchos componentes de la membrana celular (Wade, 2004). Otros participan en los mecanismos de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos (Castilla et al., 2009). El primer esteroide con actividad hormonal fue aislado de una fuente natural, brassinólido, en 1979 a partir del nabo silvestre *Brassica napus*. Posteriormente se aislaron numerosos compuestos esteroidales de plantas entre los que se encuentran las saponinas, dentro de los cuales podemos encontrar las saponinas con estructura triterpénica (30 carbonos) o esteroideal (27 carbonos).

Las saponinas esteroides son glicósidos esteroides con un núcleo espiroetano que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar espuma abundante al agitar sus soluciones acuosas (Hostettman et al., 1995; Konoshima et al 1996).

Saponinas

Las saponinas (del latín: *sapo* = jabón) son sustancias que tienen en común la propiedad de producir abundante espuma en medio acuoso. Se trata de metabolitos secundarios producidos por diversos organismos vivos, responsables de toxicidad general, pudiendo cumplir un rol defensivo debido a sus propiedades membranotrópicas. Son muy comunes en angiospermas, aunque también están presentes en algunas plantas sin flor, en animales se han encontrado tan solo en equinodermos de las clases Asterozoa y Holoturozoa, en algunas esponjas, alcionarias, algas verdes y en peces del género *Pardachirus* (Meier, 2009; Scott, 1982).

Desde hace siglos a las saponinas se les ha dado diversas aplicaciones, desde a limpieza, la pesca, pero principalmente se les ha dado uso medicinal. Actualmente se les relaciona a un amplio rango de actividades biológicas, tales como su acción antimicótica (Zamilpa, et

al. 2002), antiviral (Aquino *et al.*, 1991), anticancerígena (Sung *et al.*, 1995), hipocolesterolémica (Sauvaire *et al.*, 1991), hipoglicémica (Kato *et al.*, 1995), antitrombótica (Zhang *et al.*, 1999), diurética (Silva *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Da Silva *et al.*, 2002) y molusquicida (Abdel *et al.*, 1999; El-Sayed, 1998). En los últimos años el desarrollo de técnicas espectroscópicas modernas de Resonancia Magnética Nuclear y de Espectrometría de Masas, ha sido de gran ayuda en el trabajo de caracterización molecular y ha permitido un incremento en el número de publicaciones referidas a estos metabolitos (Orestes, 2008).

Las saponinas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicona (**Fig. 18**). La región aglicona puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal, por lo que las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas o saponinas esteroidales respectivamente (Orestes, 2008).

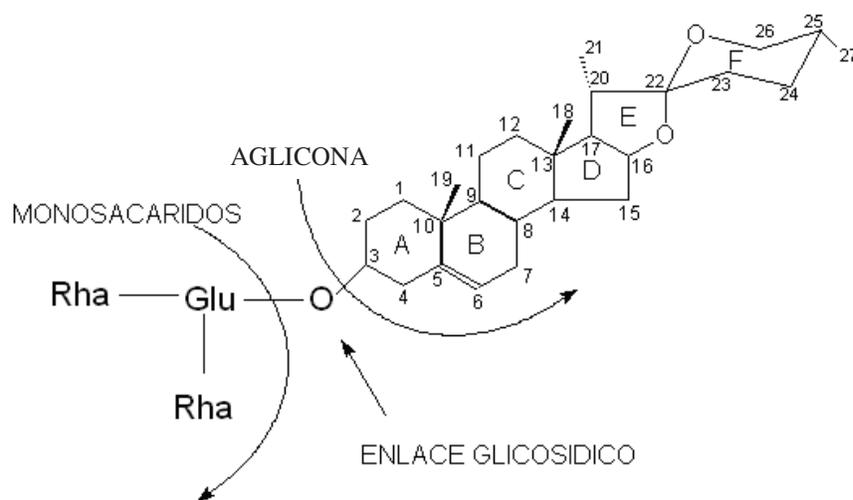


Fig. 18. Ejemplo de saponina esteroidal

Por hidrólisis de las saponinas esteroidales se obtienen las sapogeninas esteroidales, de gran interés para la industria farmacéutica por ser precursores en la síntesis de hormonas y corticoides. En la literatura se encuentra una gran cantidad de trabajos en los que se reportan la extracción de saponinas (Sparg *et al.*, 2004. Pui-Kwong, 2007; Sang *et al.*, 1999; Eskander *et al.*, 2010). En los mismos se aprecia la existencia de un tronco común en las metodologías utilizadas que se puede resumir en los siguientes pasos:

- A) Proceso de desengrase del material vegetal: El mismo tiene como objetivo eliminar los compuestos lipídicos que posee la planta, que pueden afectar operaciones posteriores. El desengrase puede realizarse directamente al material vegetal o a extractos obtenidos de éste.

- B) Obtención del “crudo” de saponinas: Se realiza la extracción del material vegetal empleando solventes polares tales como metanol, etanol y n-butanol o mezclas hidroalcohólicas de cada uno de ellos. El n-butanol es muy utilizado por su especificidad para este tipo de compuestos.

- C) Hidrólisis de las saponinas: Generalmente se realiza por vía química utilizando un ácido mineral como catalizador y su finalidad es liberar las sapogeninas.

- D) Extracción de las sapogeninas liberadas en el proceso de hidrólisis: En este proceso se utilizan solventes de mediana polaridad como acetato de etilo y cloroformo (Orestes, 2008).

Sapogeninas esteroideas

La industria farmacéutica utiliza estos esteroides para la síntesis de hormonas sexuales y otros fármacos. Actualmente la investigación en el combate al cáncer ha enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de terapias que además de afectar a las células tumorales, no representen una seria amenaza a la integridad del resto del cuerpo, como lo hacen el resto de terapias en uso. Afortunadamente, en los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal, para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos del desarrollo del cáncer; entre dichos agentes terapéuticos podemos destacar a las sapogeninas; éstos son un grupo de compuestos vegetales con posibles propiedades antitumorales, como la diosgenina, hecogenina, tigogenina, sarsasapogenina y la smilagenina, a las cuales se les ha atribuido una participación en procesos biológicos tales como: adyuvantes metabólicos regulación de la proliferación, muerte celular y actividad anticancerígena (Heislera *et al*, 2005; Hwa *et al*, 2004; Jae *et al*, 2008; Kaskiw *et al*, 2008; Sang *et al*, 1999; Sparg *et al*, 2004 ; Vincken *et al*, 2007).

Hecogenina

Un ejemplo de saponina esteroide es la hecogenina (**Fig. 19**) que se extrae del “sisal o henequén”, *Agave sisalana* Perr. La hecogenina (3 β -hidroxi-5 α ,25R-espirostan-12-ona) es una molécula con un peso molecular de 430.62 g/mol y fórmula química de C₂₇H₄₂O₄. En algunos estudios se ha relacionado la actividad de estas saponinas con actividades biológicas tales como: antibacteriana (Dong *et al*, 2006), antifúngica (Zhang *et al*, 2006), antiinflamatoria (Quilez *et al*, 2004), actividad inhibidora en células HeLa (Mimaki *et al*,

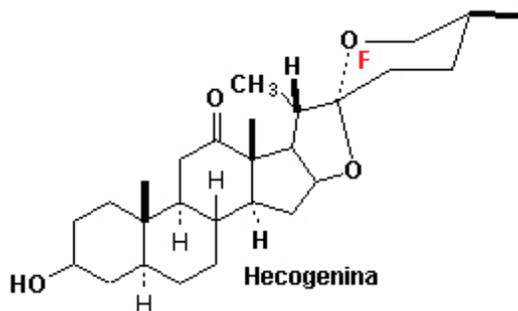


Fig. 19. Estructura química de la Hecogenina. Tomado de www.redetec.org.br

1996; Yokosuka *et al*, 2009), reducción selectiva de la viabilidad ante fibroblastos de ratón con p53 humana mutante transfectada (Itabashi *et al*, 2000) y aumento en la supervivencia celular de miocitos ventriculares de neonato (Sun *et al*, 2008). Como saponina (sin azúcares) la hecogenina ha sido reportada con: actividad antioxidante en neutrófilos (Ma *et al*, 2001), actividad inhibidora en células HeLa (Mimaki *et al*, 1996), actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células de artritis reumatoide (Liagre *et al*, 2007). En la línea celular de osteosarcoma 1542 se le han encontrado actividad antiproliferativa y disminución de la viabilidad, negativo a liberación de LDH, acción independiente del ciclo celular, poca afeción a la morfología celular, fragmentación de ADN, no modifica los niveles de las proteínas p53, p21 y cI2 y causa la sobreexpresión de bax y PARP α (Corbiere *et al*, 2003). Se ha encontrado que Hecogenina es un inhibidor específico de la glucoronidación que lleva a cabo el gen UGT1A4 a través de la proteína UDP-GT (esta proteína es importante para la eliminación de muchos fármacos y toxinas) (Uchaipichat *et al*, 2006; Miners *et al*, 2006). Se ha encontrado que dicha inhibición puede favorecer la formación de aductos de ADN (marcadores de genotoxicidad) en ratones (Al, *et al*. 2006), dado lo anterior numerosas publicaciones se emplea a la Hecogenina como un inhibidor específico de UDP-GT para estudios del metabolismo secundario en microsomas (Rowland *et al*, 2006; Zhu *et al*, 2007; He *et al*, 2010; Ah Seo *et al*, 2010).

En la siguiente tabla se pueden apreciar los diferentes rangos de concentraciones de la Hecogenina y de algunos derivados de ella;

Compuesto	Células	IC ₅₀	Referencia
Hecogenina	Células de osteosarcoma 1547	17.22 µg/ml	Trouillas, et al., 2005
Hecogenina	Línea celular HeLa	15 µg/ml	Mimaki et al., 1996
Hecogenina	Células de artritis reumatoide	40 µg/ml	Liagre et al, 2007
Saponinas derivadas de la Hecogenina	Línea celular HeLa	4.8 a >100 µg/ml	Kongkathip et al., 2005
Saponinas derivadas de la Hecogenina	Línea celular CaSki	100 µg/ml	Fernández et al., 2010
Saponinas derivadas de la Hecogenina	Fibroblastos de ratón con p53 humana mutante y fibroblastos no transfectados	4.0 µg/ml, 9.6 µg/ml	Itabashi et al., 2000
Saponinas derivadas de la Hecogenina	Células de CacU	60 µg/ml	Morales-Delgado, 2011
Saponinas derivadas de la Hecogenina	Línea celular HeLa	54.4 µg/ml	Hernandez-Cortes, 2010

Tabla 2. Algunos antecedentes del compuesto

Por todo lo anteriormente dicho, grupos de investigación han decidido tratar de encontrar la relación entre la estructura molecular y la actividad antitumoral; para ello han desarrollado

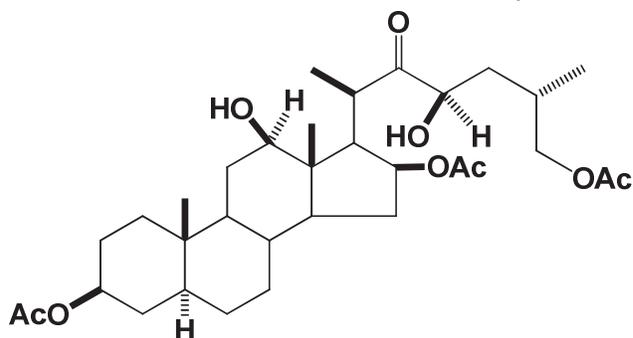


Fig. 20. Estructura química del derivado de la Hecogenina; Triacetato de (12S, 20R, 23S, 25R)-12,23-dihidroxi-22-oxo-5 α -colosta-3 β , 16 β , 26-triilo

moléculas análogas y derivados, modificado de forma puntual la estructura molecular y evaluado su efecto biológico. Se ha visto que algunas modificaciones han permitido incluso mejorar las propiedades que presentaba Hecogenina, hacerla soluble, aumentar su actividad antiproliferativa, dotarla de actividad selectiva y disminuir su actividad necrótica (Camoutsis *et al*, 2005; Boonananwong *et al*, 2008; Poza

et al, 2010; Kongkathip *et al*, 2010).

Algunas investigaciones han permitido entender por ejemplo que las modificaciones en los anillos de carbono A, D, E y F del esteroide son significativos en el aumento a la potencialidad del compuesto derivado, en comparación al de origen (Camoutsis, *et al*. 2005; Boonananwong, *et al*. 2008). En el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto del

compuesto TRIACETATO DE (12S, 20R, 23S, 25R)-12,23-DIHIDROXI-22-OXO-5 α -COLOSTA-3 β , 16 β , 26-TRIILO (AG-12) (**Fig. 20**), el cual es un derivado de la Hecogenina, diseñado por el grupo de trabajo de la Dra. Socorro Meza Reyes en la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Finalmente hay que mencionar que la estructura molecular del AG-12 es la resultante de una serie de modificaciones (**Fig. 21**) de la Hecogenina en la búsqueda de compuestos no necróticos, con actividad antitumoral selectiva y además mejorar la solubilidad del compuesto.

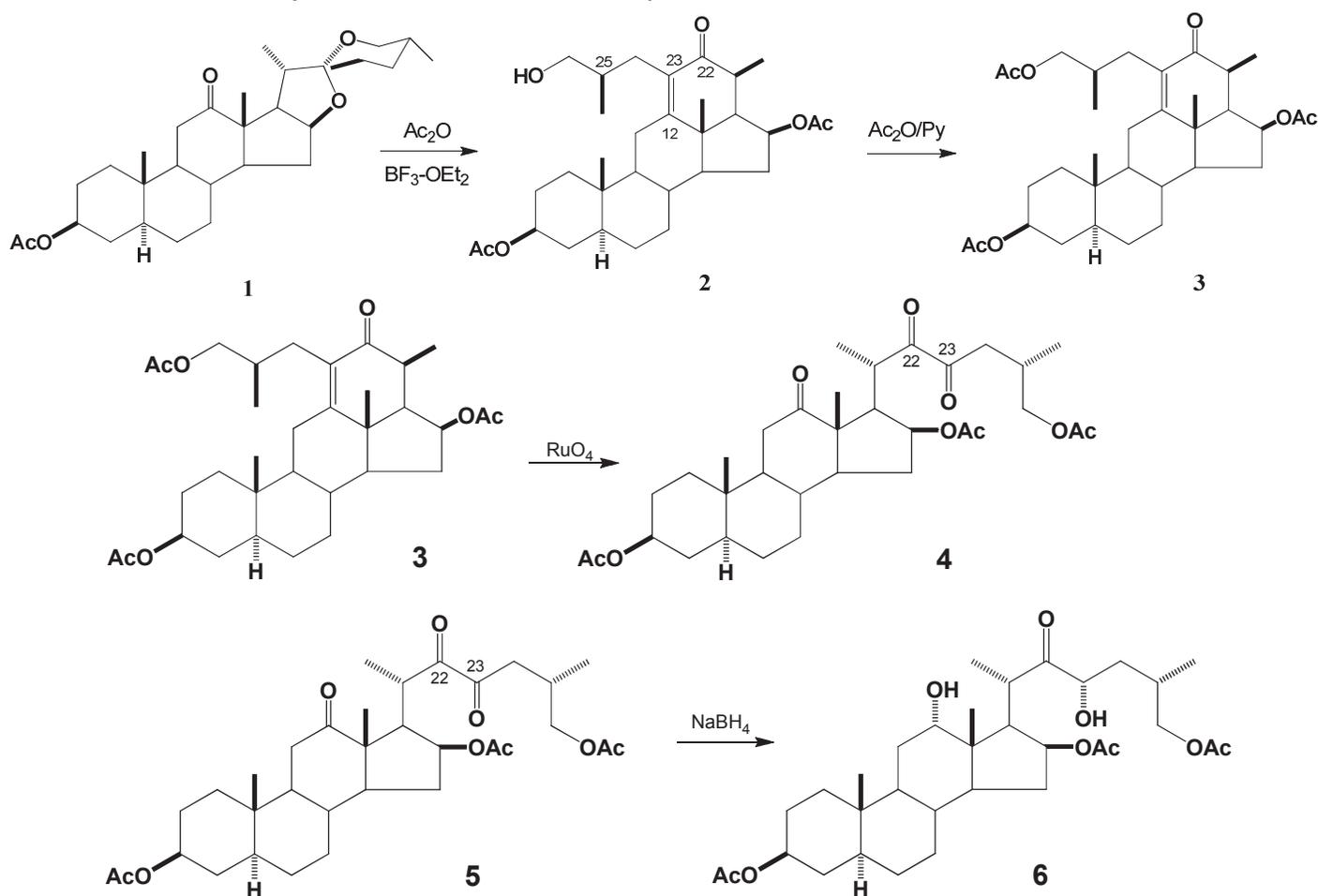


Fig. 21. Ruta de síntesis del Triacetato de (12S, 20R, 23S, 25R)-12,23-dihidroxi-22-oxo-5 α -colesta-3 β , 16 β , 26-triilo.

III. Planteamiento Del Problema

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y los tratamientos existentes son poco eficientes en estadios avanzados, agresivos y de baja selectividad, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de esta enfermedad. Dentro de las nuevas alternativas terapéuticas con fines orientados hacia el tratamiento del cáncer, está el uso de compuestos vegetales, muchos de los cuales han sido reportados con actividad antitumoral. Actualmente existe un fuerte interés en las saponinas y sapogeninas esteroideas como la Hecogenina y sus derivados, cuya actividad biológica es diversa, destacando la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado sobre el CaCU, por lo que resulta importante determinar la actividad antitumoral del derivado de la Hecogenina; AG-12 sobre líneas celulares de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo con el fin de aportar información que permita establecer el potencial terapéutico que este derivado sapogenínico tiene.

IV. Justificación

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Más del 70 % de todas las defunciones por cáncer se producen en los países de ingresos bajos y medios, cuyos recursos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes. En México representa la segunda causa de muerte. De acuerdo con el Informe mundial sobre el cáncer (el análisis mundial de la morbilidad), la incidencia del cáncer podría aumentar en un 50 % hasta el año 2020, en el que habría 15 millones de nuevos casos. En el mundo la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, es neoplasia maligna del cuello uterino, lo cual es un problema de salud grave. En los últimos años se han logrado avances importantes en la prevención del CaCU con el desarrollo de las vacunas contra el VPH, sin embargo, la eficacia de tales inmunizaciones se conocerá hasta dentro de 30-35 años, por lo que es todavía muy relevante continuar con la búsqueda de nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de ésta enfermedad.

V. Objetivos

❖ General

Evaluar el efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico del derivado de Hecogenina; Triacetato de (12R, 20R, 23R, 25R)-12,23-dihidroxi-22-oxo-5 α -colest-3 β , 16 β , 26-triilo (AG-12), en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino y en células no tumorales.

❖ Particulares

Desarrollar cultivos de las líneas tumorales de cérvix humano HeLa, CaSki y ViBo.

Establecer cultivos de células no tumorales: linfocitos de sangre periférica humana y células fibroblásticas de cérvix.

Determinar la actividad antiproliferativa del AG-12, expresada como la concentración de AG-12 requerida para disminuir en un 50% (IC₅₀) la densidad celular de cultivos de las líneas celulares de CaCU; HeLa, CaSki y ViBo.

Determinar si las IC₅₀ obtenidas para las células tumorales afectan el potencial proliferativo de células no tumorales.

Comprobar si el AG-12 induce actividad citotóxica (necrótica) en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, así como de células no tumorales mediante la detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la incorporación de yoduro de propidio (IP).

Establecer si el AG-12 induce la expresión de la caspasa-3 activa, así como la condensación de la cromatina nuclear, evaluadas por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia respectivamente.

Evaluar si el AG-12 induce la generación de radicales libres provenientes del H₂O₂, en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo mediante el marcaje con DCFH-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato).

VI. Hipótesis

Actualmente se ha encontrado que las sapogeninas como la Hecogenina, presentan propiedades farmacológicas tales como antifúngica, hipocolesterolémica, antidiabética, actividad antioxidante, anticancerígena e inductoras de apoptosis, entre otras. En especial, se ha reportado que la Hecogenina presenta actividad antiproliferativa en la línea de osteosarcoma 1547 y la línea de CaCU HeLa. En base a lo anterior y en estudios que establecen que la diferencia entre las estructuras de las sapogeninas, como son la sustitución de grupos funcionales y la apertura de anillos, entre otros cambios, influyen en la respuesta biológica, se espera que el derivado de la Hecogenina; AG-12, el cual presenta una apertura de los anillos E y F, así como dos hidroxilos en los carbonos 12 y 23, presente actividad antiproliferativa y apoptótica en células de CaCU.

VII. Metodología (ver Apéndice)

Cultivo de células tumorales CasKi, HeLa y ViBo

Las células provenientes de CaCU fueron sembradas en cajas petri de 10ml en medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS (Suero de ternera neonato).

Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y a una atmósfera húmeda a saturación en incubadora. Para la realización de los ensayos, se utilizaron cultivos en fase de crecimiento exponencial con una densidad celular no mayor al 60% de saturación.

Obtención de la saponina esteroideal AG-12

El compuesto fue proporcionado por la Dra. Socorro Meza Reyes, responsable del laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Preparación del AG-12

Para evaluar el efecto de la saponina esteroideal se preparó un Stock a una concentración de 1mg del compuesto AG-12 solubilizado en 500 o 1000 µl de ETOH/DMSO (1:1), del cual se tomó la cantidad correspondiente para estimular los cultivos de células.

Determinación de IC₅₀.

Para establecer la IC₅₀ (índice de concentración en la cual se disminuye en un 50 % el número celular, de las líneas tumorales provenientes de CaCU), fueron sembradas 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos, en 100 µl de medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS, durante 24 h. Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo y se adicionó RPMI-1640 al 5 % de NCS con el compuesto AG-12, a concentraciones de 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, y 200µg/ml.

En el ensayo se utilizó como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 1% de ETOH/DMSO (1:1). A las 24 h se evaluó el número celular por la técnica de cristal violeta. Una vez obtenidos los datos de absorbancia, fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2013 y se procedió a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del compuesto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50 % la población celular,

donde “Y” se sustituye por 50 y el valor de X puede ser calculado para dar el valor de IC₅₀ de las líneas tumorales de CaCU.

Evaluación de la proliferación por incorporación del colorante cristal violeta.

El colorante cristal violeta posee características alcalinas que le permiten teñir la cromatina del núcleo celular. El número de núcleos con tinción aumenta o disminuye conforme la proliferación celular se ve estimulada o inhibida (Kueng et al, 1989).

Células HeLa, CaSki y ViBo fueron sembradas (7500 por pozo) en placas de cultivo de 96 pozos, con un volumen por pozo de 100 µl de RPMI-1640 al 5 % de NCS, durante 24 h.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó el compuesto (AG-12) diluido en RPMI-1640 al 5 % de NCS a concentraciones desde 1.56 µg/ml hasta 200 µg/ml y se permitió actuar al compuesto por 24 h.

En el ensayo se incluyó el control-vehículo que contempló la concentración del 1% de ETOH/DMSO (1:1) diluido en RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al término del estímulo con las diferentes concentraciones del compuesto se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng et al, 1989.

Para ello, a los cultivos tratados se les retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma, EUA) por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con agua destilada, a continuación se dejaron secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma, EUA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante se solubilizó en ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de placas tipo ELISA (ChroMate, USA). En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal y se obtuvo la concentración que induce un decremento del 50 % de la población celular (IC₅₀).

Procesamiento y obtención de células de cérvix humano (fibroblastos).

Las células fibroblásticas no tumorales, fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix uterino, proveniente de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a CaCU. Una vez obtenida la pieza quirúrgica, ésta se transportó en medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB (Suero fetal bovino) y fue procesada en

las siguientes dos a tres horas. El proceso consistió en escindir el tejido en trozos pequeños (de 2 a 3 mm), y fueron sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05 %; la cual se llevó a cabo colocando los trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer (Pyrex, USA) de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37 °C en baño maría durante 15 minutos en agitación constante. Una vez concluido el tiempo, la mezcla fue vertida a través de una malla de nylon que permitió sólo el paso del material disgregado, dejando el tejido no disgregado sobre la malla. El filtrado fue centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón celular fue cultivado en cajas petri de 100 mm. El cultivo fue mantenido en una incubadora al 5 % de CO₂ y una atmósfera de humedad a punto de rocío durante dos días máximo; después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio de cultivo removiendo las células no adheridas, adicionando medio fresco suplementado con SFB al 10 % y se continuó así hasta obtener un 70 % de confluencia. En este momento se lograron poblaciones (fibroblásticas o epiteliales), las cuales son utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitan mantener poblaciones de un solo tipo celular.

Proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CSFE).

En tubos vacutainer con EDTA se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y fueron colocados en tubos cónico de vidrio (5ml) (Pyrex, EUA), con 5 ml de histopaque (un total de 4 tubos), se cubrieron y se centrifugaron (centrifuga; Dinac, EUA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos más.

Se retiró el plasma y se colectó el anillo leucocitario en un tubo cónico de vidrio de 15 ml, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendido con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB. El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml.

Se sembraron las células en una caja de petri de 100 mm (Pyrex, EUA), en un volumen total de 10 ml de RPMI suplementado con 20% de SFB, e incubaron durante 1h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI sin suero. Se tomó una

alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para el ensayo de carboxifluoresceína; se agregó en cada tubo conico de 1.6 ml la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1 000 000 de células/ml de medio total.

Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma, EUA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ M por mililitro de solución o por millón de células) y se incubaron por 15 minutos protegiéndolos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS y 5% SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI al 20% de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.5 ml a una densidad de 1 000 000 de células por ml de RPMI suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con AG-12 se trataron las células con la IC₅₀ mayor encontrada. Las células contenidas en cada tubo fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos, a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l e incubadas hasta su evaluación.

Para la evaluación, se retiró el sobrenadante y resuspendió en 1 ml de Verseno frío por 5 min, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el Verseno, posteriormente se resuspendió con 500 μ l de PBS (dos veces) y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo (marca FACSAria II).

Determinación de citotoxicidad (necrosis) por medio de la evaluación de la liberación de LDH en medios de cultivo.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones. Corresponde a la categoría de las oxidorreductasas, dado que cataliza una reacción redox en la que el piruvato es reducido a lactato. La LDH se encuentra en el citoplasma, y se libera al romperse la membrana celular, al ser detectada se comprueba que la célula murió por necrosis (Promega, 2012).

Para el ensayo de necrosis se sembraron 7500 células por pozo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo en placas de 96 pozos, con 100 μ l de medio RPMI-1640 al 5 % de NCS, por 24 h. Pasado este tiempo se retiró el medio y se agregaron los estímulos indicados. Se tomaron en cuenta: Un control positivo, al cual solo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco. Un control basal o negativo al cual sólo se le

cambió el medio de cultivo por medio fresco. Un control que contempló la cantidad ETOH/DMSO (1:1) el cual fue el control que representó la cantidad máxima de solvente utilizada para solubilizar el compuesto AG-12 en cada una de las IC₅₀. Un tratamiento con la IC₅₀ para cada una de las líneas celulares. Una hora antes de cumplir las 24 h de estímulo, se agregó Tritón X-100 al 1% al control positivo. Cumplidas las 24 h se recogió el medio de cultivo de cada uno de los pozos en tubos cónicos de plástico de 600 µl y se centrifugó a 2000 rpm. El medio fue colocado en una placa de 96 pozos, 50µl por pozo, se le agregaron 50µl de mezcla de reacción del Kit de evaluación de citotoxicidad por LDH. Se dejó incubar 20 min a temperatura ambiente en la obscuridad. Finalmente el ensayo se evaluó en un lector de placas de ELISA (Image Tecan Spectra), a 490 nm. Para calcular el porcentaje de citotoxicidad los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2013. Obteniendo gráficos, que muestran el efecto citotóxico del compuesto sobre la población celular. Los resultados se presentan como valores relativos al control positivo (Fernández, et al., 2011).

Determinación de citotoxicidad (necrosis) por medio de la incorporación de yoduro de propidio.

El yoduro de propidio (IP) es una molécula fluorescente y un agente intercalante con una masa molecular de 668.4 Da que se utiliza generalmente para teñir células. El IP es impermeable en la membrana y generalmente excluido de las células viables, el IP se utiliza comúnmente para la identificación de células no viables al intercalarse con el DNA se su núcleo (Martínez M. 2009).

Fueron sembradas 5×10^4 células tumorales/pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 1ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con la IC₅₀ de AG-12 con medio de cultivo RPMI- 1640 al 5 % de NCS, al control solamente se le cambió el medio de cultivo por medio fresco RPMI-1640 a 5 % de NCS, como vehículo se utilizó ETOH/DMSO (1:1) diluido en RPMI al 5 % y se dejaron los tratamientos durante 24 h. Una vez concluido el tiempo, las células fueron cosechadas y mantenidas en medio de cultivo, y el control fue permeado con etanol durante 20 min., posteriormente se añadieron 3µl de una solución de yoduro de propidio (IP) (Sigma, USA) (200 mg/l) a los tratamientos y las células positivas al IP fueron determinadas por citometria de flujo, previamente calibrado con células negativas al IP y los datos obtenidos fueron procesados en el programa FACSDiva version 6.1.2.

Detección de radicales libres en cultivos celulares: ERO.

Las ERO desencadenan un programa de señal apoptótica que conduce a la célula a la muerte, los radicales libres se detectaron mediante la técnica de DCFH-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato). La DCFH se oxida al reaccionar con ERO generando el producto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (Simon, *et al* 2000).

Se sembraron 25×10^3 células/pozo en placas de 48 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 400 μ l de RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con la IC_{50} de AG-12 y un vehículo ETOH/DMSO (1:1) con medio de cultivo RPMI- 1640 al 5 % de NCS, durante de 1 a 5 horas. Si existe una presencia de radicales libres se ampliara a 10 h. Al término del tiempo se realizó la detección de las especies reactivas con la técnica DCFH que se detalla de la siguiente forma: las células fueron cosechadas y se obtuvo el botón celular de ellas en 1ml de PBS con NCS al 5%, para que las células no fueran estresadas, se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 1.5 ml en los que se colocaron aproximadamente el mismo número celular por tubo y se completó el volumen a 1ml, posteriormente se agregó 1ml de DFCH, se incubaron 30 minutos y al final del tiempo se lavaron con 1ml de PBS con NCS al 5% para posteriormente efectuar la lectura, el ensayo contempló dos controles, uno negativo, en el cual las células no tenían tratamiento y sin DCFH, y el control positivo fueron células tratadas con 102 μ l de H_2O_2 que se incubaron 10 minutos para obtener un alto grado de radicales. Una vez lavadas las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo marca FACSAria.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

La caspasa-3 es un miembro de la familia de las caspasas que juega un importante papel como mediador de la apoptosis, o muerte celular programada. Después de su activación, la caspasa-3 corta una gran variedad de proteínas celular, causando cambios morfológicos y funcionales en las células que llevan a cabo la apoptosis (Innoprot, 2008).

Fueron sembradas 5×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con IC_{50} de AG-12 con medio de cultivo RPMI- 1640 al 5 % de NCS, durante 24 h y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo, el procedimiento se detalla de la siguiente manera: las células se cosecharon y fijaron a las 24 horas de cultivo, con etanol 70 % en agua destilada durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario,

anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en conejo (Sigma, EUA) 1:250 en PBS durante 24 h. a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), y se mantuvo en oscuridad durante 3 horas, se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo marca FACSAria.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se les aplicaron un análisis de varianza (ANDEVA) y para comparación entre medias, se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows 7 seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05

VIII. Resultados

Efecto antiproliferativo del esteroide AG-12 en células de CaCU.

Con la finalidad de evaluar el efecto antiproliferativo del AG-12, así como el determinar la concentración requerida del compuesto que induzca un decremento del 50 % en el número celular (IC_{50}), cultivos de células tumorales provenientes de CaCU; HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con diferentes concentraciones del esteroide, El número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta.

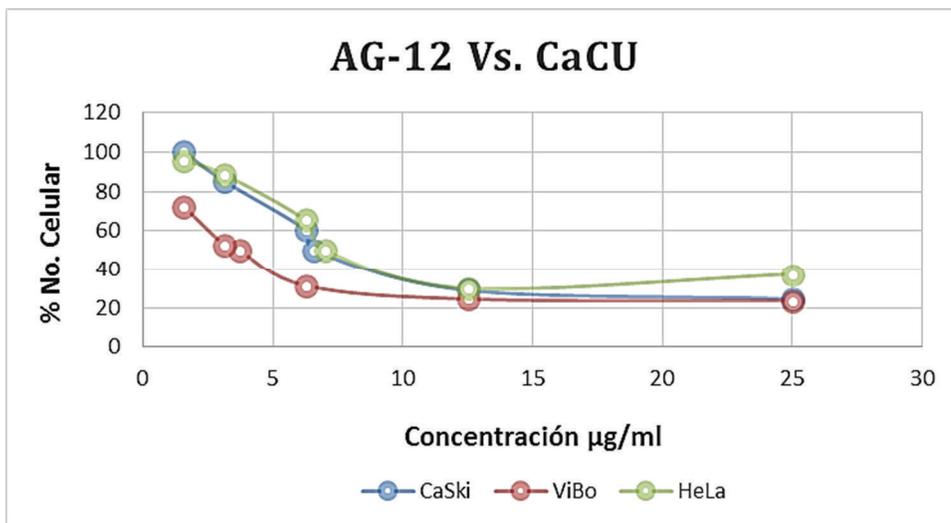


Fig. 22. Efecto antiproliferativo del AG-12 sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. Fueron cultivadas 7500 células en cajas de 96 pozos por 24 h y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto por 24 h.

Los resultados obtenidos (**Fig. 22**), indican que el efecto del AG-12 sobre el potencial proliferativo de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo es dependiente de la concentración, es decir, conforme se incrementa la concentración la densidad celular disminuye. La concentración de AG-12 requerida para disminuir en un 50% el número celular (IC_{50}), para HeLa es de 7 µg/ml, para CaSki 6.6 µg/ml y por último ViBo con 3.7 µg/ml.

Confirmación de las IC_{50} en las líneas celulares de CaCU

Para la confirmación de las IC_{50} , las tres líneas fueron tratadas con las concentraciones de IC_{50} calculadas para cada línea celular.

El DMSO/ETOH, se utilizó en todos los experimentos para comprobar que el efecto obtenido en las diferentes pruebas, es debido al compuesto y no al vehículo en el que el compuesto es disuelto.

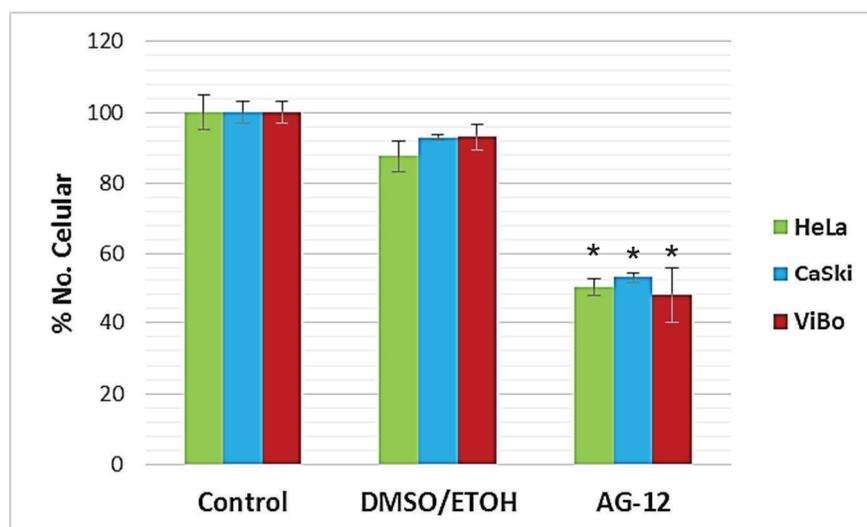


Fig. 23. Efecto de AG-12 sobre en la proliferación de cultivos de las líneas celulares provenientes de CaCU. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7500 células/pozo) por 24 hrs para su adherencia y tratadas con la concentración de IC_{50} de cada línea celular (HeLa con 7 $\mu\text{g/ml}$; CaSki con 6.6 $\mu\text{g/ml}$ y ViBo con 3.7 $\mu\text{g/ml}$). El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan por lo menos tres ensayos independientes. * indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos (**Fig. 23**), confirman las IC_{50} de AG-12 obtenidas en las tres líneas tumorales, indicando que el AG-12 presenta actividad antiproliferativa en estas células.

Efecto del AG-12 en la morfología celular.

Se ha descrito que el efecto de compuestos antitumorales generan un cambio en la morfología de las células (Camacho, 2010; Galicia, 2010; López, 2010; Fernández et al., 2010). Con el fin de establecer el efecto del AG-12 en la morfología de las líneas de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo, las células tumorales fueron tratadas con el AG-12 a la concentración de 7, 6.6 y 3.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y posteriormente los cultivos fueron observados y fotografiados en un microscopio invertido de campo claro.

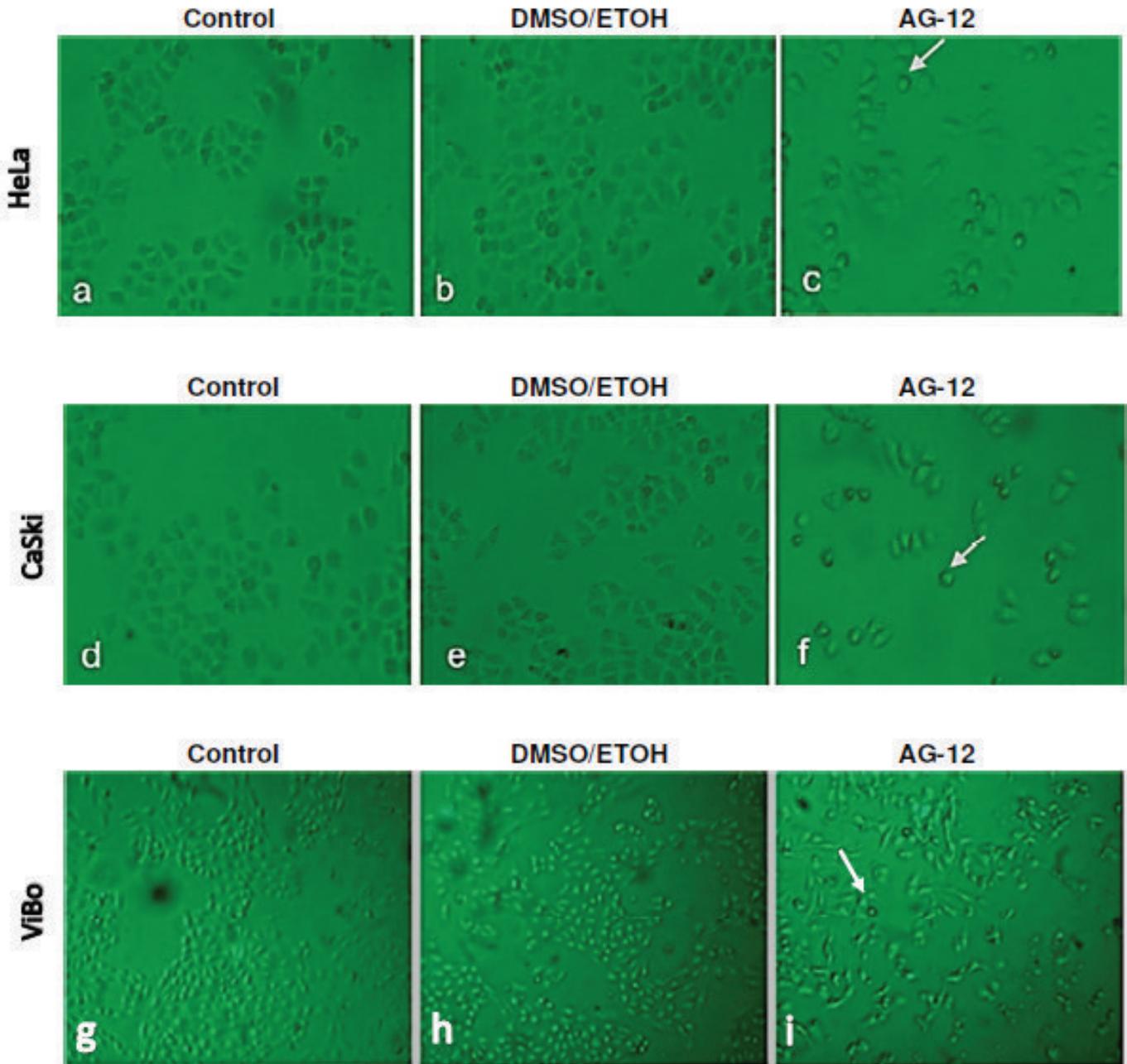


Fig. 24. Efecto del AG-12 en la morfología celular de las líneas de CaCU HeLa, CaSki y ViBo. Las células fueron cultivadas y tratadas con las concentraciones de 7, 6.6 y 3.7 $\mu\text{g/ml}$ del esteroide respectivamente por 24 horas y fotografiadas en un microscopio invertido de campo claro con el objetivo de 20X. Las flechas indican células de menor tamaño, de forma redondeada, citoplasma contraído y sin proyecciones citoplasmáticas. Estas características morfológicas son fuertemente presentadas en células apoptóticas.

Las células control y con DMSO:ETOH presentan una forma poliédrica, con abundante citoplasma y proyecciones citoplasmáticas, mientras que los cultivos tratados con el esteroide presentan células de forma esférica, de menor tamaño con

citoplasma contraído y sin proyecciones citoplasmáticas, sugiriendo una pérdida en la adhesión celular (**Fig. 24**).

Efecto de la IC₅₀ de AG-12 en el potencial proliferativo de células no tumorales.

Con el interés de determinar si el efecto antiproliferativo del AG-12 afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana así como cultivos de células fibroblásticas obtenidas de biopsias de cérvix no tumoral humano, fueron estimuladas con 7 µg/ml del esteroide durante 72 y 56 h respectivamente y la densidad celular fue evaluada a través de la técnica de marcaje celular con carboxifluoresceína para las células linfocíticas y a través de la técnica de cristal violeta para las células fibroblásticas.

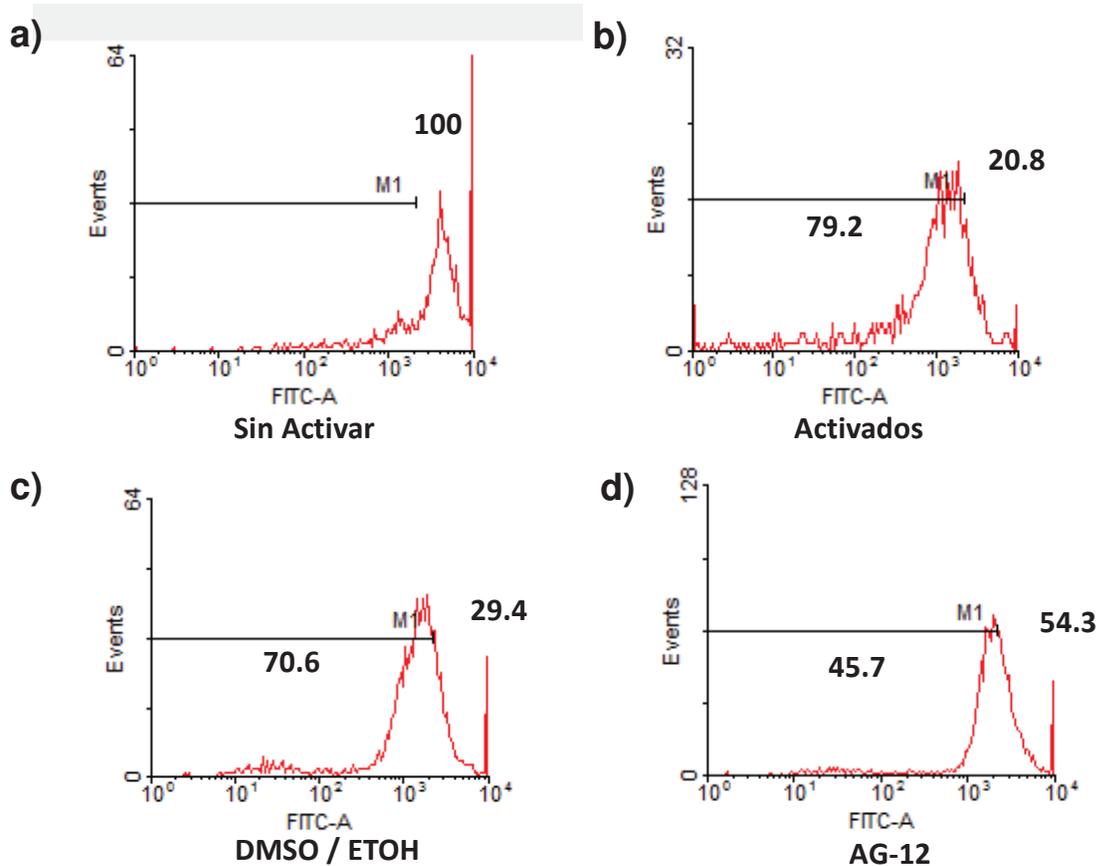


Fig. 25. Efecto de la sapogenina esteroide AG-12 en la proliferación de linfocitos humanos. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (200,000 células/pozo) durante 72 horas; posteriormente fueron cosechadas y fijadas con paraformaldehído al 2 % para ser leídas por citometría de flujo. Cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína, el potencial proliferativo fue evaluado con linfocitos tratados con la IC₅₀ del AG-12 y células sin tratamiento. La proliferación fue medida por marcaje con carboxifluoresceína y evaluada por citometría

de flujo. M1: región de células en proliferación. a) Linfocitos sin activar, b) linfocitos activados con fitohemaglutinina, c) tratados con DMSO / ETOH y d) 7 µg/ml de AG-12. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACS Aria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial. Los datos mostraron diferencia significativa * $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

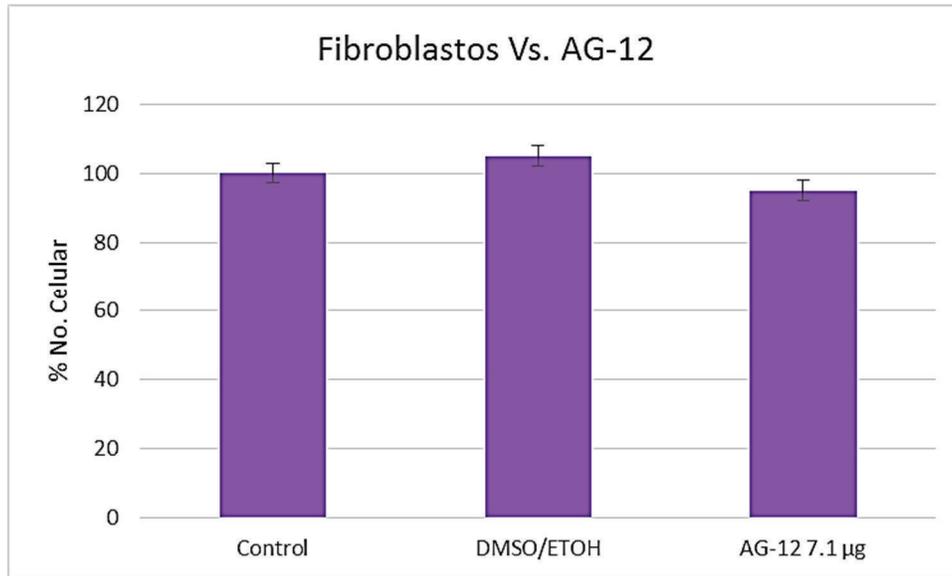


Fig. 26. Efecto de la saponina esteroide AG-12 sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano no tumorales. Fueron sembradas 7500 células de cérvix humano en placas de 96 pozos en RPMI al 10 % de SFB y estimuladas con el compuesto AG-12 (7 µl/ml) por 56 h. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. Los datos no mostraron diferencia significativa * $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados (**Figs. 25, 26**) indican que el AG-12 inhibe significativamente el potencial proliferativo de las células linfocíticas (45.7 %) mientras que en fibroblastos de cérvix el potencial proliferativo no se ve afectado.

Actividad citotóxica del AG-12 en células de CaCU

Es conocido que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción citotóxica, caracterizada principalmente por inducir la pérdida de la integridad de la membrana celular, la cual también es una característica de muerte por necrosis. Con la intención de determinar si el AG-12 presenta una actividad citotóxica (necrótica) sobre las líneas celulares de CaCU y

células normales; cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de su IC₅₀ respectiva. La integridad de la membrana citoplasmática fue evaluada mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos y mediante la incorporación celular de yoduro de propidio (IP)

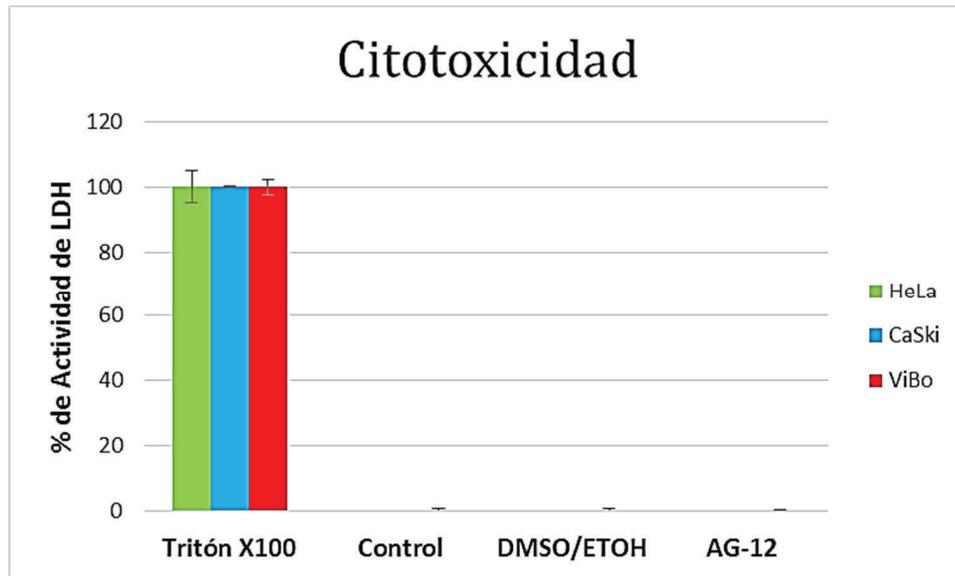


Fig. 27. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes de cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con sus respectivas IC₅₀ de AG-12. 7,500 células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos. El porcentaje de actividad de la enzima LDH fue medido respecto a un control positivo (células tratadas con tritón X100) y un control negativo. Los datos no mostraron diferencia significativa entre los valores obtenidos. $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

En las líneas celulares no existe una diferencia significativa respecto al control (**Fig. 27**), sugiriendo que el decremento observado en el número celular en los cultivos de células tratadas con el AG-12 es causado por una actividad diferente a la vía citotóxica (Necrosis).

Citotoxicidad por IP – HeLa

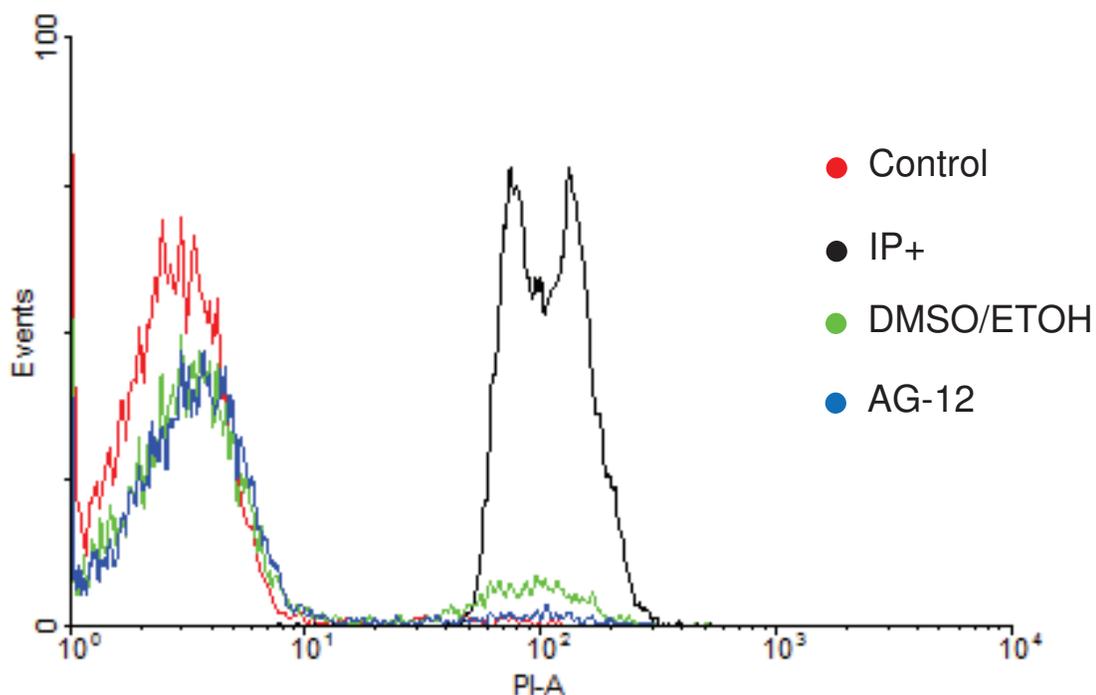


Fig. 28. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en células HeLa. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; a) células sin tratamiento, b) células sin tratamiento permeadas con etanol al 70%, c) células tratadas con DMSO/ETOH, d) células tratadas con AG-12 a la concentración de IC₅₀ (7 µg/ml). Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACS Aria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial. Los datos no mostraron diferencia significativa. *p<0.05 vs DMSO/ETOH (ANDEVA).

Línea Celular	Control	IP +	DMSO/ETOH	AG-12
<i>HeLa</i>	0.3%	99.6%	6.0%	7.2%

Tabla 2. Actividad citotóxica y/o necrótica del AG-12 en la línea celular HeLa. Los valores fueron determinados mediante la técnica de incorporación celular de IP.

La línea celular HeLa presenta una actividad citotóxica y/o necrótica nula o baja con el compuesto AG-12 (**Fig. 28, Tabla 2**).

Citotoxicidad por IP – CaSki

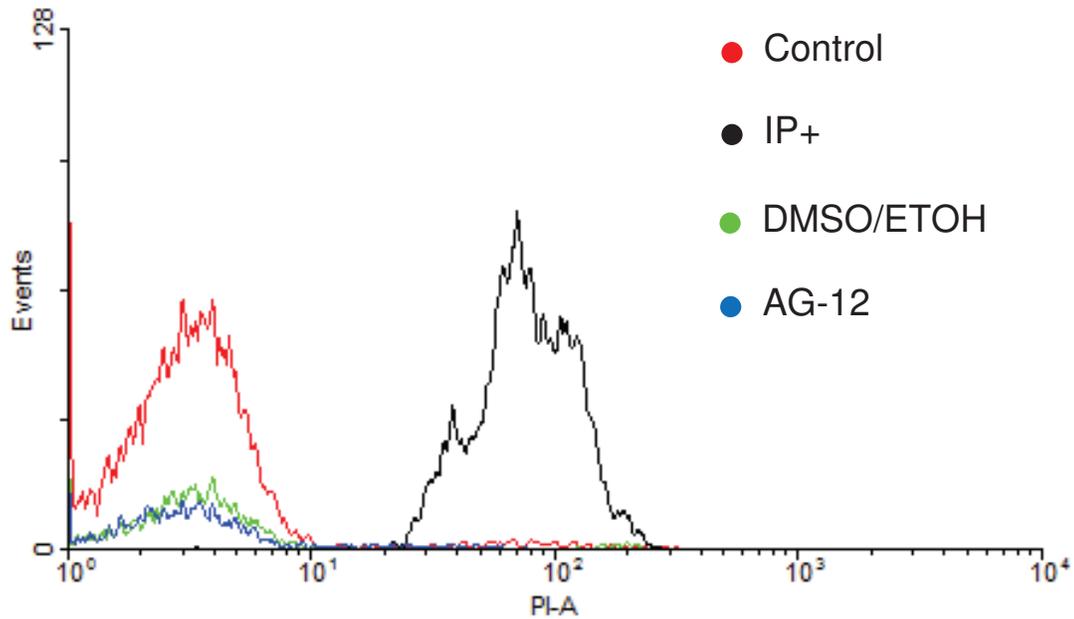


Fig. 29. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en células CaSki. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; a) células sin tratamiento, b) células sin tratamiento permeadas con etanol al 70%, c) células tratadas con DMSO/ETOH, d) células tratadas con AG-12 a la concentración de IC₅₀ (6.6 µg/ml). Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACS Aria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial. Los datos no mostraron diferencia significativa. *p<0.05 vs DMSO/ETOH (ANDEVA).

Línea Celular	Control	IP +	DMSO/ETOH	AG-12
<i>CaSki</i>	0.5%	98.5%	2.5%	0.9%

Tabla 3. Actividad citotóxica y/o necrótica del AG-12 en la línea celular CaSki. Los valores fueron determinados mediante la técnica de incorporación celular de IP.

La línea celular CaSki presenta una actividad citotóxica y/o necrótica nula o baja con el compuesto AG-12 (**Fig. 29, Tabla 3**).

Citotoxicidad por IP – ViBo

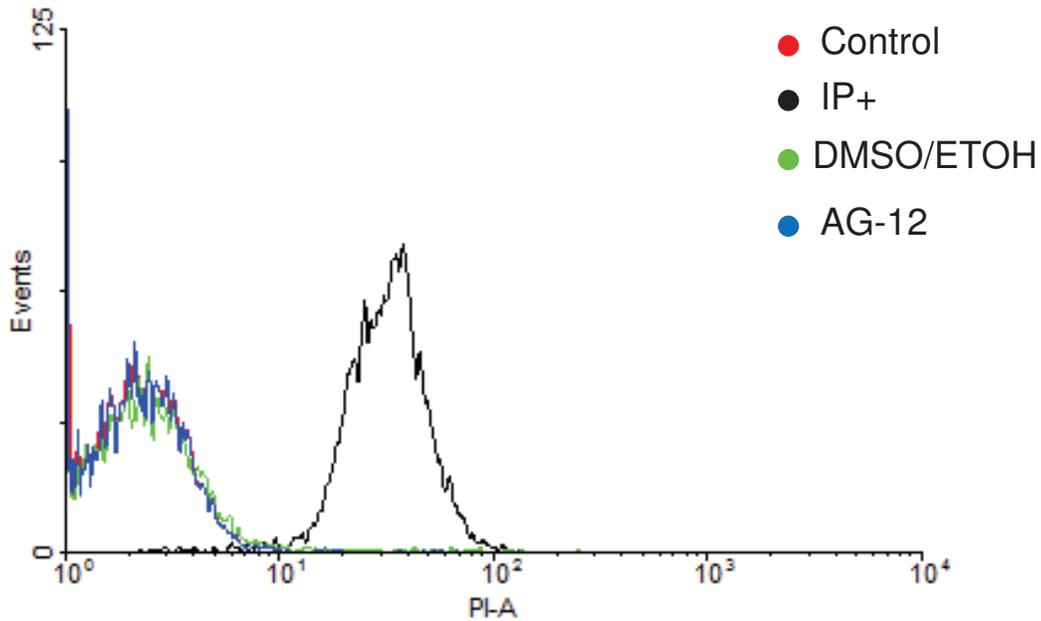


Fig. 30. Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) en células ViBo. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; a) células sin tratamiento, b) células sin tratamiento permeadas con etanol al 70%, c) células tratadas con DMSO/ETOH, d) células tratadas con AG-12 a la concentración de IC₅₀ (3.7 µg/ml). Los histogramas son un ensayo representativo de al menos tres. En el eje Y en los histogramas, es presentado el número de eventos evaluados por el citómetro de flujo FACS Aria II; mientras que el eje X, muestra la cantidad de fluorescencia expresado de forma exponencial. Los datos no mostraron diferencia significativa. *p<0.05 vs DMSO/ETOH (ANDEVA).

Línea Celular	Control	IP +	DMSO/ETOH	AG-12
ViBo	1.0%	99.5%	3.1%	3.4%

Tabla 4. Actividad citotóxica y/o necrótica del AG-12 en la línea celular ViBo. Los valores fueron determinados mediante la técnica de incorporación celular de IP.

La línea celular ViBo presenta una actividad citotóxica y/o necrótica nula o baja con el compuesto AG-12 (**Fig. 30, Tabla 4**).

Los resultados obtenidos (Figs. 28, 29, 30, Tablas 2, 3, 4), muestran una nula actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de células tumorales tratados con el AG-12, así como una nula o baja incorporación celular de IP en las células tratadas con el esteroide, indicando que el AG-12 no induce a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a liberar la enzima LDH al sobrenadante ni a incorporar IP en las células, sugiriendo que este esteroide no induce a las células tumorales a una muerte necrótica y que el decremento observado en el número celular en estos cultivos es causado por una actividad diferente a la vía citotóxica (Necrosis).

Actividad citotóxica del AG-12 en células no tumorales

Con el propósito de establecer el efecto citotóxico del AG-12 en células no tumorales; cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana así como cultivos de células fibroblásticas de cérvix humano, fueron estimulados con 7 $\mu\text{g/ml}$ del esteroide AG-12 y la actividad de la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes de estos cultivos.

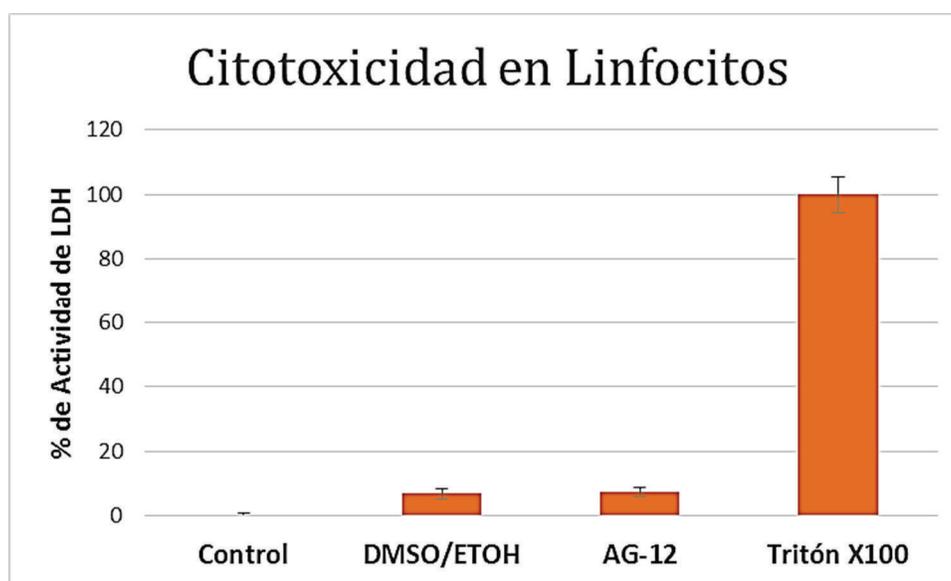


Fig. 31. Porcentaje de actividad de LDH compuesto AG-12, a la concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$, sobre cultivos de linfocitos humanos (PHA). Los datos no mostraron una diferencia significativa entre los valores obtenidos. $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

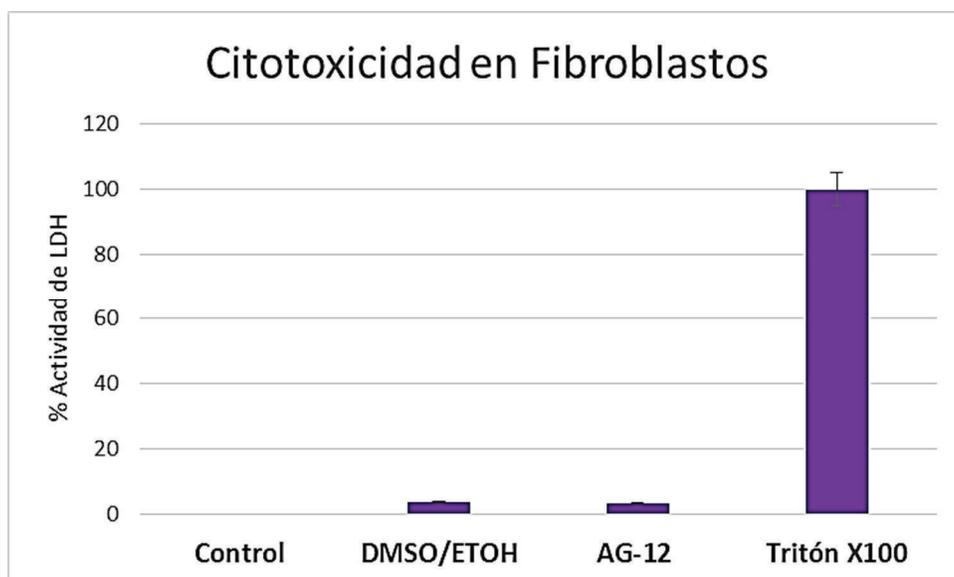


Fig. 32. Actividad de LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos fibroblastos de cérvix tratados con AG-12. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos (7500 células /pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con AG-12 durante 56 h, dando un tiempo total 96 h en cultivo. Control, células sin tratamiento; para el control positivo las células fueron permeadas con Tritón X-100; DMSO/ETOH, AG-12, células tratadas con 7 µg/ml. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. Los datos no mostraron una diferencia significativa entre los valores obtenidos. $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Células	Control	Triton	DMSO/ETOH	AG-12
<i>Linfocitos</i>	0%	100%	7.46%	7.02%
<i>Fibroblastos</i>	0%	100%	3.78%	3.35%

Tabla 5. Porcentaje de actividad de LDH de células no tumorales con los distintos tratamientos.

Los resultados obtenidos indican que el AG-12 no induce la liberación de la enzima LDH a los sobrenadantes de los cultivos de células linfocíticas ni fibroblásticas, indicando que a esta concentración de AG-12, las células linfocíticas y fibroblásticas no son inducidas a una muerte necrótica.

Expresión de la caspasa-3 activa

En vista de que nuestros resultados establecen que el efecto antiproliferativo del AG-12 en células tumorales es debido a causas diferentes a la necrosis (Fig.33, Tabla 6) y en base a que el esteroide induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a presentar una morfología de células apoptóticas, cultivos de las tres líneas tumorales fueron estimuladas a la concentración de IC₅₀ respectiva y la expresión de la caspasa 3 activa fue cuantificada por citometría de flujo.

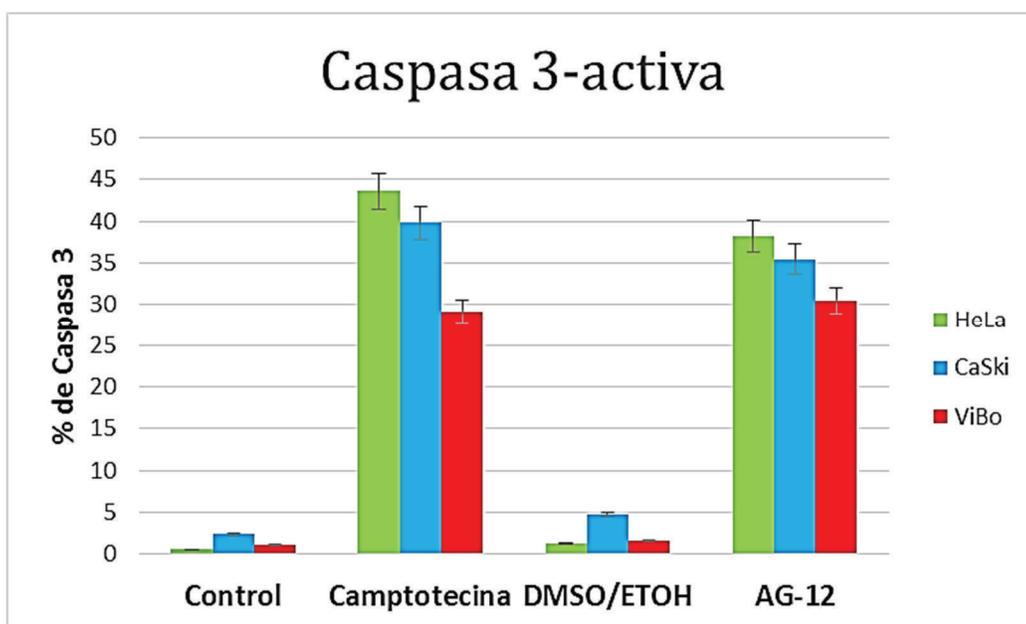


Fig. 33. Efecto del AG-12 en células de CaCU. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas con sus respectivas IC₅₀ por 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; posteriormente fueron cosechadas, fijadas e incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche; después se empleó el anticuerpo con FITC dejando incubar durante tres horas a temperatura ambiente, para finalmente ser leídas en el citómetro de flujo. Valores expresados en porcentaje. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes por cada línea celular.

Línea Celular	Control	Camptotecina	DMSO/ETOH	AG-12
<i>HeLa</i>	0.6%	43.6%	1.3%	39.7%
<i>CaSki</i>	2.4%	39.8%	4.8%	37.2%
<i>ViBo</i>	1.2%	29.1%	1.6%	29.3%

Tabla 6. Valores correspondientes a la activación de la caspasa-3 con diferentes tratamientos en células de CaCU.

Los resultados obtenidos (**Fig.33, Tabla 6**) muestran que el AG-12 induce a las células tumorales a expresar caspasa-3 activa: HeLa (38.2%), CaSki (35.5%) y ViBo

(30.5%), sugiriendo que el AG-12 induce la expresión de esta caspasa como parte de su mecanismo para inducir muerte apoptótica.

Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Es conocido que las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden generar tanto la necrosis como la apoptosis. Con el propósito de determinar si la muerte celular generada por el AG-12 induce un estrés oxidativo en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, éstas fueron sembradas y tratadas con las IC₅₀ obtenidas para cada línea y la generación de ERO provenientes de H₂O₂ fueron cuantificadas por citometría de flujo.

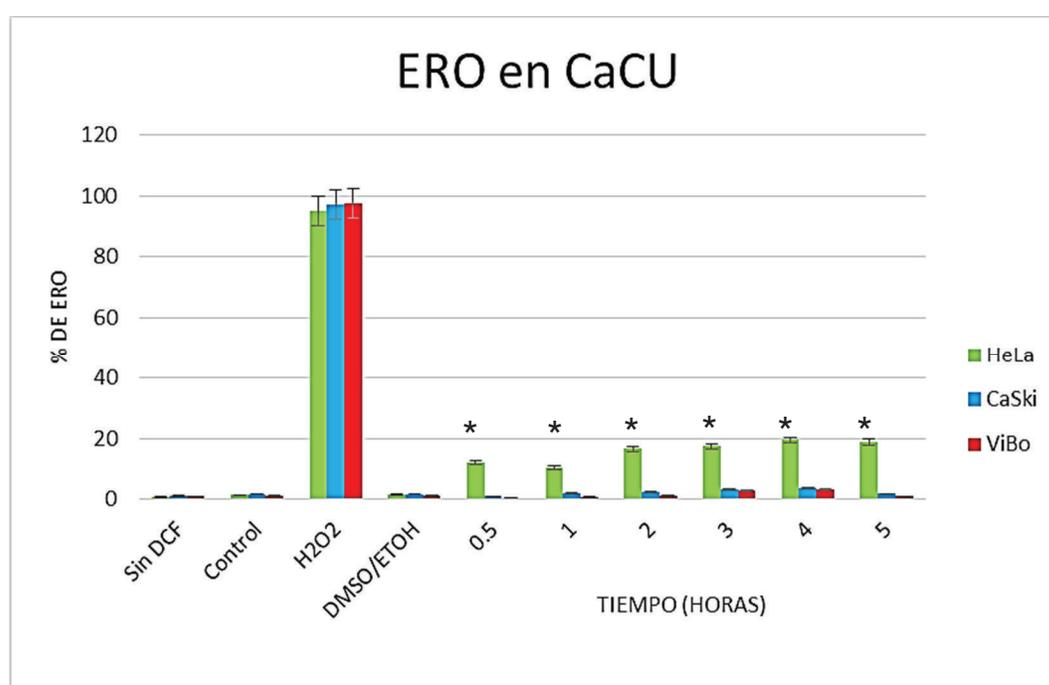


Fig. 36. Inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el AG-12. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos (30,000 células/pozo) por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron tratadas 24 h adicionales, dando un tiempo total de cultivo de 48 h; posteriormente fueron cosechadas e incubadas con DCF-DA durante 30 min. Sin marca (DFC), células sin tratamiento y sin DCF-DA; Control, células sin tratamiento con DCF-DA; H₂O₂, células sin tratamiento, con DCF-DA y con H₂O₂ incubado 10 min adicionales como control positivo; DMSO/ETOH, con DCF-DA; AG-12, células tratadas con la concentración de IC₅₀ correspondiente para cada línea celular del compuesto durante ½, 1, 2, 3, 4 y 5 horas. Gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes por cada línea celular. * indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. p<0.05 vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Como se puede apreciar, la generación de ERO en las células tumorales CaSki y ViBo tratadas con el AG-12 no fue significativa (**Fig. 36**), indicando que la inducción de muerte observada en estas células tumorales es debida a un evento diferente a la generación de ERO. Sin embargo en la línea celular HeLa se observa una presencia en aumento de radicales en las primeras 5 horas por lo que se evaluó el efecto a 10 h.

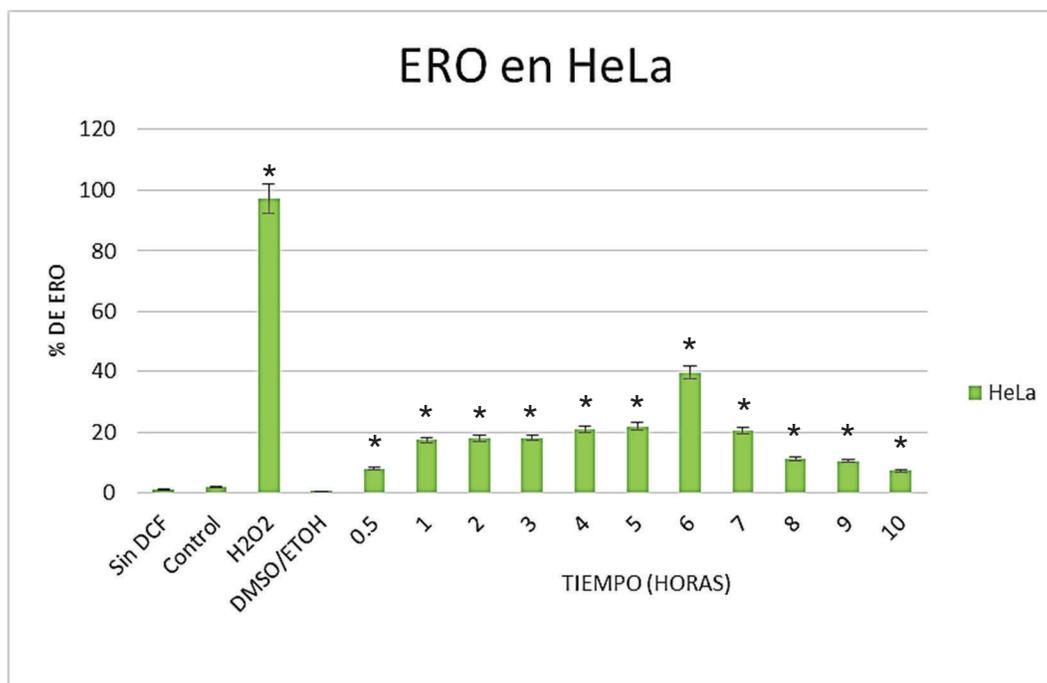


Fig. 37. Generación de ERO en la línea celular HeLa tratada con AG-12. Cultivos de células HeLa fueron tratados con su IC₅₀ durante 10h y se cuantificó las ERO mediante la técnica DCFH por citometría de flujo. Sin DCF; células sin tratamiento y sin DCFH, Control; células sin tratamiento y con DCFH, H₂O₂; control positivo con H₂O₂, DMSO/ETOH, y AG-12 a su respectiva IC₅₀. Se muestra que el AG-12 genera ERO y se observa que se incrementan conforme transcurre el tiempo hasta llegar a la hora 6 comienza la disminución de los radicales. * indica que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. $p < 0.05$ vs DMSO/ETOH (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados (**Fig. 37**), establecen que la línea tumoral HeLa genera especies reactivas de oxígeno provenientes del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al ser estimuladas con el AG-12, con un pico máximo a las 6 h. Estos resultados sugieren que la generación de radicales libres inducidos por el AG-12 en las células HeLa en las primeras 6 horas podrían ser la causa de la inducción de muerte apoptótica en estas células.

IX. Discusión de resultados

A pesar de los importantes avances en el descubrimiento, prevención y tratamiento del cáncer, éste sigue siendo considerado uno de los principales causantes de muerte, junto con otras enfermedades. En México y el resto del mundo el CaCU ocupa los primeros lugares en causas de muerte en mujeres. No obstante el innegable éxito de los tratamientos actuales para esta enfermedad, éstos resultan ser ineficientes en pacientes terminales, agresivos, de alto costo y poco selectivos. Por ello es necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, que permitan combatir al cáncer de manera selectiva y sin generar fuertes efectos colaterales. Al respecto, actualmente existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos antitumorales de origen vegetal, ya que se ha descrito en la literatura que éstos presentan una alta diversidad de actividades biológicas, entre las que se destaca la actividad anticancerígena. En ese sentido, se han realizado investigaciones en compuestos como las saponinas a quienes se les han atribuido una importante actividad antiproliferativa y apoptótica (Konoshima et al., 1998; Podolak et al., 1998; Rao, 2000; Mimaki et al., 2001; Kuroda et al., 2001). Por ejemplo, la exploración de la hecogenina entre otras saponinas, sugiere que su efecto antitumoral y el de sus análogos y derivados, pueden ser la base de nuevos terapéuticos, ya que se ha encontrado que disminuyen la proliferación en diversas líneas celulares de cáncer. Sin embargo, dichos estudios no presentan de manera amplia y rigurosa la evaluación del efecto biológico; se centran principalmente en aspectos de síntesis y caracterización química; carecen de la comparación del efecto antiproliferativo en células tumorales con respecto a células no tumorales y en muchos casos no disciernen entre el efecto antiproliferativo con actividad citotóxica, sin corroborar si se trata de inducción de muerte y si ésta se trata de apoptosis o necrosis (Boonananwong, et al. 2008; Poza, et al. 2010; Kongkathip, et al. 2010).

Con respecto a la actividad antiproliferativa de las saponinas y en particular con las saponinas esteroideas, éstas han mostrado actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares provenientes de diversos tipos de tumor, incluyendo al de mama, leucemias y cáncer cervicouterino, entre muchas otras. Su estructura ha sido estudiada con respecto a su función, encontrando que la base esteroidea de las saponinas son las que presentan la actividad antiproliferativa, mientras que la parte glicosídica podría potenciar esta actividad (Mimaki, et al. 1996, Sang, et al. 1999; Sparg, et al. 2004). La mayoría ha sido reportada con actividad antiproliferativa o citotóxica en un rango de concentraciones de 4 a 100 µg/ml.

Con respecto al compuesto AG-12, derivado de la hecogenina, se encontró que presenta actividad antiproliferativa en las líneas celulares provenientes de CaCU HeLa, CaSki y ViBo, con unas IC₅₀ de 7, 6.6 y 3.7 µg/ml respectivamente, concentraciones que en comparación con otros derivados de la hecogenina (Kongkathip et al., 2010), resultan ser bajas, indicando que se requiere de menor cantidad de AG-12 para inducir la misma actividad que otros derivados, sugiriendo que los cambios estructurales presentes en este compuesto con respecto a la hecogenina, potenciaron su actividad antiproliferativa.

No obstante la gran cantidad de sapogeninas descritas con actividad antiproliferativa, la mayoría de los trabajos carecen de pruebas en células no tumorales, dejando inconcluso su papel en estas células. Sin embargo, el estudio realizado por Camoutsis y colaboradores (2005), indica que ninguno de los análogos de la hecogenina sintetizados en dicho trabajo mostró actividad genotóxica ni inhibidora de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana. Itabashi y colaboradores (2000) hacen ver que hecogenina puede ser una molécula con acción selectiva; ellos encontraron que el tratamiento con la saponina Furcreastatina afectaba la viabilidad de fibroblastos de ratón con p53 humana mutante a una dosis mucho menor que la necesaria para afectar a los fibroblastos no transfectados con una IC₅₀ de 4.0 µg/ml, de 9.6 µg/ml respectivamente. Al respecto, nuestros resultados sugieren que el AG-12 presenta un nulo o bajo efecto antiproliferativo en fibroblastos de cérvix humano mientras que en linfocitos humanos de sangre periférica inhibe significativamente el potencial proliferativo (46 %) a una concentración de 7 µg/ml, sugiriendo que la actividad antiproliferativa de este compuesto es de acción selectiva, lo cual resulta fuertemente relevante. Cabe destacar que los linfocitos y fibroblastos humanos no tumorales son un buen parámetro de selectividad, ya que resultan células muy sensibles tanto a la administración de fármacos, como a la quimioterapia y radioterapia, en las que es característica la fibrosis (muerte y queratinización de fibroblastos) (Montero, et al. 2005; Di Giorgio, et al. 2001), así como la muerte de un número importante de células del sistema inmune (linfocitos) del paciente.

Cabe mencionar, que en el presente trabajo se utilizaron dos diferentes técnicas para evaluar la proliferación de las células; la evaluación de la proliferación por incorporación de cristal violeta (células tumorales y fibroblastos de cérvix) y la técnica de proliferación por carboxifluoresceína (CSFE) (linfocitos). La diferencia en el uso de estas técnicas se debe principalmente a que la técnica de cristal violeta se fundamenta en células adheridas, mientras que en la técnica de CFE, se realiza en células en suspensión.

Con respecto a la actividad citotóxica y/o necrótica de las sapogeninas, éstas han sido descritas como compuestos citotóxicos. Diversos grupos de trabajo han generado derivados de la hecogenina como productos citotóxicos (Boonananwong, et al. 2008; Poza, et al. 2010; Kongkathip, et al. 2010), ya que aún se piensa que la actividad citotóxica de un agente antitumoral debe ser alta para considerarlo bueno o adecuado. Esta idea ha cambiado recientemente, ya que al relacionar la actividad citotóxica de los quimioterapéuticos aplicados contra el cáncer con los efectos colaterales que éstos provocan en los pacientes, hoy se comienza a establecer que es más conveniente el empleo de un compuesto no citotóxico que uno citotóxico, ya que se espera que el compuesto no citotóxico no genere efectos colaterales relacionados con la citotoxicidad. A este respecto, nuestros resultados establecen que el esteroide AG-12 no es citotóxico en células tumorales, ni en células no tumorales a una concentración de 7 µg/ml, implicando que sus efectos colaterales relacionados con la citotoxicidad serían nulos o poco significativos.

Por lo cual, tal y como en el presente trabajo, se sugiere explorar dichos aspectos de cada uno de los compuestos antes de sugerirlos como potenciales terapéuticos.

Una característica que diferencia el fenotipo de la muerte apoptótica del fenotipo necrótico es la conservación de la integridad de la membrana celular. En la presente investigación pudimos comprobar que la actividad del compuesto AG-12 no provoca pérdida de la integridad de la membrana celular, tanto en líneas celulares como en cultivos de células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana y fibroblastos de cérvix) a una concentración de 7 µg/ml. Esta propiedad es de suma importancia, ya que en un organismo animal la reacción resultante de la liberación del contenido celular al medio circundante genera una respuesta inflamatoria que es directamente proporcional a la cantidad de células dañadas, pudiendo ir desde una inflamación local, fiebre y malestar hasta la anafilaxia.

Se encontró que el AG-12 afecta la morfología de las células tumorales, ya que después del tratamiento las células se observaron de menor tamaño y de forma redondeada, mientras que las no tratadas conservaron su forma poliédrica y con citoplasma extendido, como se aprecia en las células HeLa y CaSki. Estas características morfológicas son fuertemente presentadas en células apoptóticas. Estos cambios morfológicos son característicos de la apoptosis (Strasser, 2000), un tipo de muerte celular programada en la que debido a que las células no liberan su contenido celular a los tejidos intersticiales de los alrededores y a que son rápidamente fagocitadas por macrófagos o células adyacentes normales, esencialmente no hay reacción inflamatoria (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003).

Por otro lado, actualmente el principio de acción de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula tumoral en comparación con el de la células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no tumorales que crecen y se dividen rápidamente como lo son las de la sangre (linfocitos) (Schlaepfer y Mendoza, 2010). Además de presentar una alta actividad necrótica (citotoxicidad), generando los múltiples efectos secundarios como fatiga, náuseas, vómitos, caída del pelo, lesiones en la boca, y dolor (National Cancer Institute, 2013), de tal manera que en pacientes con cáncer avanzado o metastásico, no solo los tratamientos quimioterapéuticos resultan ser ineficientes, sino que además, los efectos colaterales resultan ser tan significativos, que afectan la calidad de vida del paciente, al grado de llevarlo a la muerte. Por ello, la búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa de nula o baja citotoxicidad es necesaria.

Para hacer una correcta evaluación del tipo de muerte celular, es necesario tomar varios parámetros para su análisis, entre ellos los aspectos moleculares (Galluzzi et al., 2011), la expresión de caspasas y la generación de especies reactivas de oxígeno.

Con respecto a la actividad inductora de apoptosis, se ha reportado que compuestos de origen vegetal como el aceite de ricino del *Ricinus communis*, el p-Hydroxymetosibenzobijuglone aislado de *Juglans mandshurica* y el ácido 3,4,5-trihydroxil-benzoico presentes en diversas plantas, inducen muerte por apoptosis en células de CaCU HeLa (Lakshmana et al., 2005; You et al., 2010). El emodín (1,3,8-trihidroxi-6-methilntraquinona) aislado de *Polygonum cuspidatum* induce muerte por apoptosis en células HeLa y CaSki (Srinivas et al., 2003). En el caso específico de la hecogenina, en células de osteosarcoma 1547 no induce muerte por apoptosis a las 24 hrs a una concentración de 40 μ M (Trouillas, et al., 2005), mientras que en células sinoviales de artritis reumatoide produce activación de la caspasa 3 activa y fragmentación de ADN (Liagre et al., 2007).

Los resultados obtenidos para el AG-12 indican que este compuesto induce muerte por apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 activa, en las líneas HeLa (38.2%), CaSki (35.5%) y ViBo (30.5%), Este hecho resulta de gran trascendencia, ya que la apoptosis es un tipo de muerte silenciosa, donde las células son eliminadas sin generar un proceso de inflamación ó respuesta inmune exacerbada, como ocurre con los fármacos antitumorales como el cis-platino (Kaufmann y Earnshaw, 2000). No obstante estos resultados, la inducción de apoptosis junto con la inducción de necrosis, no explican el decremento del 50% en la densidad celular observada en los cultivos de líneas celulares tratadas con el compuesto, sugiriendo la existencia de otro tipo de muerte diferente a la apoptosis y necrosis.

Cabe mencionar que hace falta caracterizar de forma precisa la vía de señalización que lleva a la activación de la apoptosis. Para ello sería conveniente la evaluación de la activación de la caspasa 9, la expresión de Bax, Bcl-2 u otras proteínas proapoptóticas o antiapoptóticas, fragmentación de ADN, el efecto en el potencial de la membrana mitocondrial en células tumorales, también si es dependiente del ciclo celular tanto en células tumorales y no tumorales, y evaluar su efecto genotóxico.

En cuanto a la cantidad de ERO generada por el AG-12 en líneas celulares CaSki y ViBo, no indujo a las células a generar especies reactivas provenientes del H₂O₂, indicando que la muerte celular inducida por el compuesto en estas células tumorales no es debida a la generación de ERO.

Sin embargo en cuanto a la cantidad de ERO generada por el AG-12 en la línea celular HeLa, ésta si indujo a las células a generar especies reactivas provenientes del H₂O₂. Esta expresión de radicales cambió con respecto al tiempo, ya que la generación máxima corresponde a las primeras seis horas después del tratamiento, disminuyendo paulatinamente hasta llegar a niveles basales a las diez horas. Lo cual concuerda con los estudios de Sidoti-de Fraisse y cols. (1998) los cuales encontraron que en la línea celular HeLa la inducción de apoptosis se lleva a cabo a través de la producción de ERO en estados tempranos y que esta generación de radicales está involucrada a través de TNF- α de la vía extrínseca de la apoptosis. Una producción temprana de ERO en la mitocondria implica la aceleración de la muerte celular (Sidoti-de Fraisse et al., 1998).

La cantidad de ERO generada por el compuesto en la línea celular Hela hace suponer que estos radicales son posiblemente los inductores de la muerte por apoptosis, que observamos en las células tumorales tratadas con el esteroide, ya que como se ha descrito en la literatura las ERO cumplen funciones muy importantes, como participar en rutas de señalización, pero también pueden generar estados patológicos o conducir a la muerte celular. Las fallas en la funcionalidad mitocondrial conllevan a que las células produzcan y liberen ERO que desencadenan la muerte celular por apoptosis (Tarazona M., et al., 2010).

Estos resultados en conjunto, establecen que el AG-12 presenta actividad antiproliferativa en células tumorales y no tumorales sin causar muerte necrótica, induciendo a las células tumorales a una muerte apoptótica posiblemente a través de la generación de radicales libres provenientes del peróxido de hidrógeno (HeLa), haciendo de este compuesto un digno candidato para ser estudiado en modelos in vivo y ser evaluado como un agente con potencial antitumoral, cuya expectativa está

basada en la ventaja de acción en el tiempo de administración y cuyos efectos colaterales serían leves o poco significativos.

X. Conclusiones

- ❖ El AG-12 afecta el potencial proliferativo de manera dosis dependiente en las tres líneas de CaCU.
- ❖ La concentración de AG-12 en que se abate el 50% del número celular (IC_{50}) en cultivos de células tumorales fue de 7, 6.6 y 3.7 $\mu\text{g/ml}$ para HeLa, CaSki y ViBo respectivamente
- ❖ El compuesto AG-12 afecta la morfología de células HeLa, CaSki y ViBo en su respectiva IC_{50} . Las células tratadas con la AG-12 tienen una forma redondeada y el citoplasma reducido, observando células de menor tamaño.
- ❖ El ensayo de proliferación con carboxifluoresceína en linfocitos sugiere que existe un efecto antiproliferativo significativo en este tipo de células.
- ❖ El AG-12 no afecta el potencial proliferativo en células no tumorales de cérvix
- ❖ El AG-12 no induce muerte necrótica en células CaCU: HeLa, CaSki y ViBo, ni en células no tumorales.
- ❖ El AG-12, induce la activación de la caspasa-3 en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo con valores de 39.7%, 37.2% y 29.3% respectivamente.
- ❖ El compuesto AG-12 a la concentración de IC_{50} no induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en líneas celulares CaSki y ViBo, sin embargo en HeLa si se induce la generación de ERO en las primeras 6 horas después de tratamiento con valores máximos del 39.5 % y se produce un decremento en las siguientes horas.

XI. Perspectivas

Evaluar el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis del compuesto AG-12 en más líneas celulares tumorales, tanto de CaCU como otros tipos de cáncer para tener una mayor perspectiva del comportamiento biológico de este compuesto.

Evaluar el efecto del compuesto AG-12 sobre una gama de células no tumorales como en células epiteliales del cérvix, en hepatocitos, células renales, entre otras, para poder determinar si este compuesto tiene un efecto selectivo entre células tumorales y no tumorales.

Evaluar el mecanismo de acción que permita identificar las moléculas participantes, con el fin de entender la manera en que estas moléculas inhiben la proliferación celular, así como la inducción de muerte por apoptosis en células tumorales sin afectar a células no tumorales, mediante la detección de proteínas ó la expresión de genes participantes en las distintas rutas de la muerte por apoptosis.

La actividad antiproliferativa, no citotóxica e inductora de apoptosis presente en la AG-12 hace de este compuesto un digno candidato para ser estudiado en modelos in vivo con la intención de evaluar su potencial terapéutico.

XII. Bibliografía

1. Abarca K. (2007) *Infección por virus papiloma humano y cáncer cervicouterino: ¿en las puertas de la prevención?* Boletín escuela de medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile, Vol. 32 N°1
2. Abdel-Gawada MM, El-Sayed M.M., Abdel-Hameeda E.S. (1999). *Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of Agave decipiens*. *Fitoterapia*, 70, 371-381.
3. Ah Seo K, Bae SK, Choi YK, Choi CS, Liu KH, Shin JG. *The metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP-glucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7*. *DMD Fast Forward*. 10:1-23.
4. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2002). *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. España, 505 pp.
5. Alcalá-Sánchez S. 2008. *Identificación funcional de moléculas inductoras de muerte celular: Implicación del transportador mitocondrial de fosfato en apoptosis*. Tesis doctoral; Universidad de Salamanca.
6. Alison M. R. (2002). *The cancer handbook vol. 2, 2a edición*. Editorial Nature, Estados Unidos de América, 1723 pp.
7. Alonso de Ruiz P., Lazcano E. 2000 *Cáncer cervicouterino/ Cervical cancer: Diagnóstico, Prevención y control/ Diagnosis, Prevention and control*. Ed. Médica Panamericana
8. Alvarado M. J. A., Mayani V. H. (2007). *El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas*. *Gaceta Médica Mexicana*, 143(2):149-161.
9. Álvarez D. C. (2007). *Mecanismo de acción antitumoral de la cumarina A/AA en una línea celular de cáncer cérvico-uterino (HeLa)*. Tesis, UNAM. DF. México, 75 pp.
10. Al-Zoughool M, Succop P, Desai P, Vietas J, Talaska G. 2006. *Effect of N-glucuronidation on urinary bladder genotoxicity of 4-aminobiphenyl in male and female mice*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 22:153–159.
11. Ameisen, JC. 2002. *On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years*. *Cell Death and Differentiation*; 9:367-393

12. American Cancer Society, 2013. www.cancer.org
13. Anaya L. A. (2003). *Ecología Química*, Editorial Plaza y Valdés, España, 55 pp.
14. Aquino R, Conti C, DeSimone F, Orsi N, Pizza C, Stein ML. 1991. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. *J. Chemother*; 3:305-309.
15. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. 2002. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death and Differentiation*; 9:65-81.
16. Avendaño C. y Menéndez J. C. (2008). *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. Elsevier, Oxford, Reino Unido, 53 pp.
17. Baquiran D. y Gallagher J. (2001). *Lippincott's cancer chemotherapy handbook*. 2a edición. Editorial Lippincott Williams y Wilkins Philadelphia, Estados Unidos de América, 129 pp.
18. Baynes J. M. y Dominiczak M. H. (2008). *Bioquímica médica*. 2a edición. Editorial Elsevier. España, 703 pp.
19. Becker W., Kleinsmit L. y Hardin J., 2006. *El mundo de la célula*. 6ª ed., Pearson Educación, S.A., Madrid. Pág. 834.
20. Benuto Aguilar RE, Berumen Campos J. 2009. Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología Rev Mex*; 53:234-42.
21. Bolsover R., Hyams J.S., Shephard E.A., White H. A., Widemann C.G. (2004). *Cell Biology: A Short Course*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New York. P. 552.
22. Boonananwong S, Kongkathip B, Kongkathip N. 2008. First synthesis of 3,16,20-polyoxygenated cholestanes, new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. *Steroids*; 73:123–1127.
23. Bucher N. y Britten C. D. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *British Journal of Cancer*, 98:523–528.
24. Burgués J., Pontones J., Vera C., Jiménez J., y Ozonas M.; 2005; *Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga*; *Actas Urología*, 29, 846-859.

25. Camacho Z. (2010). *Efecto antitumoral del S-Metilpirrolidiltiocarbamato- S-óxido (MePTC-SO) en células de cáncer cervicouterino. Tesis, UNAM. DF México, 54 pp.*
26. Camoutsis C., Trafalis D., Pairas G. y Papageorgiou T. (2005). *On the formation of 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity. Il Farmaco, 60: 826–829.*
27. Castillaa V., Ramírez P., Coto C. (2009). *Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. Revista Química Viva, Vol. 1, 56-67 pp.*
28. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. 2003. *VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. Science; 301:513-517*
29. Corbiere C., Liagre B., Bianchi A., Bordji K., Dauca M., Netter P y Beneytout J. L. (2003). *Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. Intrernationa Journal of Oncology, 22:899.*
30. Curtin J; Donovan M. y Cotter T; (2002). *Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. J. Immunol. Methods, 265 (1-2): 49-72.*
31. Da Silva BP, De Sousa AC, Silva GM, Mendes TP, Parente JP. 2002. *A new bioactive steroidal saponin from Agave attenuata. J. Biosci. 57, 423-428.*
32. De Toro Gonzalo. 2006. *Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. Actas del 8° CVHAP.*
33. Di Giorgio, Taja M, Durán MR, Bonomi M, Menéndez M, Pogany PR, Abbet C, Zaderajko M, Roth M. 2001 *¿Es posible predecir la radiosensibilidad individual en pacientes con cáncer de cuello uterino mediante el test de micronúcleos?. Presentado en el 2o Congreso Iberoamericano y del Caribe de Física Médica, Venezuela 16-19 octubre 2001.*
34. Djerassi, C., Ringold, H. y Rosenkranz G. (1951). *Steroidal Sapogenins. XV. Experiments in the hecogenin series (part 3). Conversion to cortisone. Journal of the American Chemical Society, 73: 5513 - 5514.*
35. Dong LP, W. Ni, Jy Dong, JZ Li, CX Chen, HY Liu. 2006. *A New Neolignan Glycoside from the Leaves of Acer truncatum. Molecules; 11:1009-1014.*

36. Dosne P. C. (2007). *Investigación en cáncer y citogenética*. Editorial Eudeba, Argentina, 59 pp.
37. El-Sayed MM. 1998. Molluscicidal steroidal saponins from *Agave ferox*. *J Pharm Sci.*; 7: 73-79.
38. Eskander Jacqueline, Lavaud Catherine, Harakat Dominique. 2010. Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells *Fitoterapia*; 81:371–374
39. Evan G y Vousden K., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 411: 342-348.
40. Fernández AM. 2000. Apoptosis en protozoarios y en la célula huésped inducida por protozoarios. *Revista Mexicana de Patología Clínica*; 47:84-93
41. Fernández H., López M., Hernández V., López D., Escobar S., Sánchez S., Pinto B., Sandoval R. (2010). Synthesis of 26-hydroxy-22 oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:2474–2484.
42. Fleury C; Mignotte B. y Vayssiere J; (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *J. Biochimie*, (84): 131–141
43. Galicia O. (2010). Efecto del compuesto S-metil-N, Ndiethyltiocarbamato- S-óxido (MeDDTC-SO), sobre el potencial proliferativo, muerte y ciclo celular de las líneas tumorales HeLa y CaSki provenientes de cáncer cervicouterino. Tesis, UNAM. DF México. 51 pp.
44. Galluzzi A; Vitale I; Abrams J; Alnemri E; Baehrecke E; Blagosklonny M; Dawson T; Dawson V; Deiry W; Fulda S; Gottlieb E; Green D; Hengartner M; Kepp O; Knight R; Kumar S; Lipton S; Lu X; Madeo F; Malomi W; Mehlen P; Nuñez G; Peter M; Piacentini M; Rubinsztein S; Shi Y; Simon H; Vandenabeele P; White E; Yuan J; Zhivotovsky B; Melino G. y Kroemer G; (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *J. Cell death and differentiation*. Pp. 1-14.
45. Gil L; Martinez G; Gonzalez I; Tarinas A; Alvarez A; Giuliani A; Molina R; Tapanes R; Perez J. y Leon O; (2003). Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol. Res.*, (47): 217–224.
46. Gómez EO, A. Zentella A. 1998. Apoptosis y muerte celular programada. *Boletín de educación bioquímica de México*; 17:105-114.
47. González M. J., González B. E., Biete S. A., Casanova D. L. y Mestres E. J. (2000). *Ginecología*

oncológica. 2a edición, Editorial Elsevier, España. 634 pp.

48. González S. I. (2009). *Mecanismo de muerte celular por un nuevo derivado tiazolo [5,4b] quinolina D3CLP en la línea celular humana K-562. Tesis UNAM. México. 88 pp.*
49. Grub S; Trommer W. y Wolf A; (2002). *Role of antioxidants in the O-hydroxyethyl-D-(Ser)8-cyclosporine A (SDZ IMM125)-induced apoptosis in rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol., (64): 1725-1736*
50. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. 2006. *A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. Immun Ageing;3:1-8*
51. Halliwell B., y Gutteridge J., (1989). *Free radicals in biology and medicine (2ª ed.) Reino Unido: Clarendon Press Oxford Pp. 316.*
52. Hanahan D. y Coussens L; (2012). *Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell, (21): 309-322.*
53. Hanahan D. y Weinberg R. A. (2000). *The hallmarks of cancer. Cell, 100:57-70.*
54. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011). *"Hallmarks of Cancer: The Next Generation". Cell 144 (5): 646–674*
55. He YQ, Liu Y, Zhang BF, Liu HX, Lu YL, Yang L, Xiong A, Xu LL, Wang CH, Yang L, Wang ZT. 2010. *Identification of the UDP-Glucuronosyltransferase Isozyme Involved in Senecionine Glucuronidation in Human Liver Microsomes. Drug metabolism and disposition; 38:626-634.*
56. Heisler I, Sutherland M, Bachrana C, Hebestreit P, Schnitger A, Melzig MF, Fuchs H. 2005. *Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells. Journal of Controlled Release; 106:123–137.*
57. Hostettman K., Marston A. (1995), *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products. 1a edición, Editorial Copyrighted Material, New York, 548 pp.*
58. Hwa-Young K, Rina Y, Jeong-Sang K, Young-Kyoon K, Mi-Kyung S. 2004. *Antiproliferative crude soy saponin extract modulates the expression of IκBα, protein kinase C, and cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. Cancer Letters; 210:1–6*
59. INEGI. *Consulta Interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. www.inegi.com*
60. Itabashi M, Segawa K, Ikeda Y, Kondo S, Naganawa H, Koyano T, Umezawa K. 2000. *A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant Furcraea foetida. Carbohydrate Research; 323:57–62*

61. Jae-Yong K, Kyoung-Wuk P, Kwang-Deog M, Mi-Kyung L, Jina C, Sung-Tae Y, Ki-Hwan S, Kwon-Il S. 2008. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by crude saponin from *Platycodi Radix*. *Food and Chemical Toxicology*; 46:3753–3758
62. Jones D; Podolsky S. y Greene J; (2012). *The Burden of Disease and the Changing Task of Medicine*. *N Engl. J. Med*; 366 (25): 2333-2338.
63. Jordán J. 2003 *Apoptosis: muerte celular programada*. *Offarm*; 22:6-35
64. Jun-Dong Z., Yong-Bing C., Zheng X., Hui-Hua S., Mao-Mao A., Lan Y., Hai-Sheng C., Ping-Hui G., Yan W., Xin-Ming J y Yuan-Ying J. (2005). *In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from Tribulus terrestris l. with potent activity against fluconazole-resistant fungal*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(12): 78-85.
65. Karp G. (2011). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*, Editorial Mc. Graw-Hills, 6ta Ed. México. P. 899.
66. Karp Gerald., 2006. *Biología Celular y Molecular. 4ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana*. México. Pág. 899.
67. Kaskiw MJ, Tassotto ML, Mok M, Tokar SL, Pycko R, Th'ng J, Jiang ZH. 2008. *Synthesis and cytotoxic activity of diosgenyl saponin analogues*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 16:3209–3217.
68. Kato A, Miura T, Fukunaga T. 1995. *Effects of steroidal glycosides on blood glucose in normal and diabetic mice*. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 167-168.
69. Kaufmann H., Earnshaw W.(2000). *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy*. *Experimental Cell Research*, Vol. 256:42–49.
70. Kinnally KW, Antonsson B. 2007. *A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis*. *Apoptosis*; 12:857-868
71. Kirkland R; Windelborn J; Kasprzak J. y Franklin J; (2002). *A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death*. *J. Neuroscience*, 22 (15): 6480–6490.
72. Kit de Determinación de Actividad Caspasa-3
http://www.innoprot.com/es_productos.asp?idp=164&id=13
73. Kongkathip B, Hasakunpaisarn A, Boonananwong S, Kongkathip N. 2010. *Synthesis of cytotoxic novel 9,11-secosterol analogs: Structure/activity studies*. *Steroids*; 75:834–847.

74. Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H., Nishino H., Duc N. M., Kasai R. y Yamasaki K. (1998). Anti-tumor-promoting activity of majonoside-R2 from vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Haet Grushv. (I). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21:834–838.
75. Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H., Nishino H., Duc N. M., Kasai R. y Yamasaki K. (1998). Anti-tumor-promoting activity of majonoside-R2 from vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Haet Grushv. (I). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21:834–838.
76. Konoshima T., Waller G., Yamazaki K. (1996), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum Press, Vol. 404, 87-100.
77. Koutsky L., Ault K., Wheeler C. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *New England Journal of Medicine*. 347: 1645–1651.
78. Kueng W., Silber E., Eppenberger U. 1989 Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*. 182(1):16-9.
79. Kuroda M., Mimaki Y., Hasegawa F., Yokosuka A., Sashida Y. y Sakagami H. (2001). Steroidal glycosides from the bulbs of *Camassia leichtlinii* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49:726–731.
80. Kurosaka, K. et al. 2003. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *The Journal of Immunology*. 171:4672-4679.
81. Lakshmana R., Jayaraj R., Bhaskar A. S. B., Kumar O., Bhattacharya R., Saxena P., Dash P. K. y Vijayaraghavan R. (2005). Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 69:855–865.
82. Liagre B., Vergne-Salle P., Leger D. y Beneytout J. (2007). Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. *International Journal of Molecular Medicine*, 20: 451-460.
83. Lin H; Wang X; Shaffer K. y Sasaki C; (2004). Characterization of H₂O₂-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. *FEBS Letters*, 570 (1-3): 102- 106.
84. Lodish H., Berk A., Zipursky S.; 2003; *Biología celular y molecular*; Ediciones Panamericana
85. López D. (2010). Efecto antitumoral de los esteroides diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-

en-3 β ,16 α -diilo (26-OH-Di) y diacetato de (25R)-26-hidroxi-12,22-dioxo-5 α -coleston-3 β -diilo (26-OH-He) en la línea tumoral de cérvix CaSki. Tesis. UNAM. México. 63 pp.

86. López, A. y L. Lizano. 2006. *Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no Termina. Cancerología. 1:31-55.*
87. Ma D, Zhang J, Sugahara K, Sagara Y, Kodama H. 2001. *Effect of sarsasapogenin and its derivatives on the stimulus coupled responses of human neutrophils. Clinica Chimica Acta; 314:107-112.*
88. Maier Marta S. 2009. *Metabolitos secundarios bioactivos de organismos marinos pertenecientes al phylum Echinodermata. Revista Industria y Química; 255:4-8*
89. Majno G. y Joris I. (1995). *Apoptosis, oncosis, necrosis an overview of cell death. American Journal of Pathology. 146:3-16.*
90. Martínez M. (2009) *Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en la biotecnología de la salud. Rev. Colombiana. Vol. IX Num. 2. Pp. 152-166*
91. Medan D; Wang L; Toledo D; Lu B; Stehlik C; Jiang B; Shi X. y Rojanasakul Y; (2005). *Regulation of Fas (CD95)-induced apoptotic and necrotic cell death by reactive oxygen species in macrophages. J. Cell. Physiol., 203 (1): 78-84*
92. Mimaki Y., Kanmoto T., Sashida Y., Nishino A., Satoni Y. y Nishino H. (1996). *Steroidal saponins from the underground parts of Chlorophytum comosum and their inhibitory activity on tumor-promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells. Phytochemistry, 41:1405-1410.*
93. Mimaki Y., Yokosuka A., Kuroda M. y Sashida Y. (2001). *Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 24:1286-1289.*
94. Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI. 2006. *In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: Pitfalls and promises. Biochemical pharmacology; 71:1531-1539.*
95. Monroy G. A., Rangel C. R., Rocha Z. L., Trejo B. C., Ramírez G. J., Martínez R. D., y Weiss-Steider B. (1992). *Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. Revista Mexicana de Oncología, 7: 69-76.*
96. Montero A, Hervás A, Morera R, Sancho S, Córdoba S, Corona JA, Rodríguez I, Chajón E, Ramos A. 2005. *Cuidados continuos en oncología radioterápica. Oncología; 28:147-156*
97. Motoyama S, Ladines-Llave C, Villanueva SL, Maruo T. 2004. *The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis Kobe J. Med. Sci; 50:9-19*

98. Muñoz Nubia, Bosch F, De-Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah K, Snijders P, Meijer C. 2003. *Epidemiologic classification of human Papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med*, 348: 518-27.
99. National Cancer Institute (2013), National Institutes of Health. U.S.A., Disponible en: <http://www.cancer.gov/>.
100. Orestes Guerra de León José. 2008. *Las saponinas y sapogeninas esteroidales. monografias.com*. Disponible en: *Monografias.com* <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas.shtml>. Consultado: 21 de Mayo 2010. y *RevistaCiencias.com*.
101. Organización Mundial de la Salud. 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
102. Oshima Y; Kuroda Y; Kunishige M; Matsumoto T. y Mitsui T; (2004) *Oxidative stress associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. Muscle Nerve*, 30 (1): 49-54.
103. Paniagua. G. R, Nistal M.; 2007; *Biología celular; McGraw-Hill Interamericana México*.
104. Podolak I., Elas M. y Cieszka K. (1998). *In vitro antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from Lysimachia vulgaris L. Phytotherapy Research*, 12: 570–573.
105. Poza JJ, Rodríguez J, Jiménez C. 2010. *Synthesis of a new cytotoxic cephalostatin/ritterazine analogue from hecogenin and 22-epi-hippuristanol, Bioorganic et Medicinal Chemistry*; 18:58-63.
106. Pui-Kwong Chan. 2007. *Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. Biochemical pharmacology*; 73:341–350.
107. Quilez AM, Garcia MD, Saenz MT, Martinez-Dominguez ME, R. de la Puerta. 2000. *Anti-inflammatory activity of Agave intermixta Trel. and Cissus sicyoides L., species used in the Caribbean traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology*; 71:395–400.
108. Raff, M.; 1998; *Cell suicide for beginners; Nature*; 396, 119-122
109. Rao A. V. y Gurfinkel D. M. (2000). *The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17:211–35.
110. Rao A. V. y Gurfinkel D. M. (2000). *The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17:211–35.

111. Robbins S., Kumar V. y Cotran R.; 1993; *Patología Humana*; Editorial Mc Graw Hill, México.
112. Roden, R. & Wu, T.C. 2006. *How will HPV vaccines affect cervical cancer?* *Nat Rev Cancer* 6:753-763.
113. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. 2005. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*, Cuarta edición, Editorial Panamericana. 3-60.
114. Rowland A, Elliot DJ, Williams JA, Mackenzie PI, Dickinson RG, Miners JO. 2006. *In vitro characterization of lamotrigine n2-lucuronidation and the lamotrigine-valproic acid interaction.* *Drug metabolism and disposition*; 34:1055-1062.
115. Sánchez S. V. (2001). *Mecanismos Reguladores de la muerte celular no necrótica.* *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 20(4):266-74.
116. Sang-Jun L, Jong-Hwan S, Sang-Joo L, Chang-Kiu M, Byung-Hoon L. 1999. *Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin.* *Cancer Letters*; 144:39-43
117. Sauvaire, Y.; Ribes, G.; Baccou, J. C.; Loubatier'es-Mariani, M. M. 1991. *Implication of steroid saponins and saponins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek.* *Lipids*; 26, 191-197.
118. Savill, J. y V. Fadok. 2000. *Corpse Clearance Defines the Meaning of Cell Death.* *Nature*. 407:784-788.
119. Schlaepfer L., Mendoza J. (2010). *Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico.* *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41: 18-27.
120. Schmitt C. A., Fridman J. S., Yang M., Baranow E., Hoffman R. M. & Lowe S. W; 2002; *Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo.* *Cancer Cell*; 1,289-91.
121. Schreck R; Rieber P. y Baeuerle P; (1991). *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV- 1.* *EMBO J.*, 10 (8): 2247-2258.
122. Scott Gentry Howard. 1982. *Agaves of Continental North America.* University of Arizona Press. 20-24, 193.
123. Serrano M., Pastrana F. (2007). *Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH).* *Oncología*. 30: 42-59.
124. Sidoti-de Fraisse C; Rincheval V; Risler Y; Mignotte B. y Vayssiere J; (1998). *TNF-alpha activates at*

least two apoptotic signaling cascades. Oncogene, 17 (13): 1639-1651

125. Sidoti-de Fraisse, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B., Vayssiere, J.L., 1998. *TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. Oncogene 17 (13), 1639-1651.*
126. Silva G. M., De Souza A. M., Lara L. S., Mendes T. P., Da Silva B. P., Lopes A. G., Caruso-Neves C., Parente J. P. 2005. *A new steroidal saponin from Agave brittoniana and its biphasic effect on the Na⁺-ATPase activity. Z. Naturforsch. C, 60, 121-127.*
127. Simon H., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. (2000). *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Volume 5, Issue 5, pp 415-418*
128. Sparg S. G., Light M. E., y Staden J. (2004). *Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology, 94:219-43.*
129. Sparg SG, Light ME, Van Staden J. 2004. *Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology; 94:219-243*
130. Srinivas G., Antov R. J., Srinivas P., Vidhyalakshmi S., Senan V. P., Karunagaran D. (2003). *Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. European Journal of Pharmacology, 473:117-125.*
131. Strasser, A. et al. 2000. *Apoptosis Signaling. Annual Review of Biochemistry. 69:217-45*
132. Sun Wei, Li H, Yang SJ. 2008. *A triterpene saponin from Tribulus terrestris attenuates apoptosis in cardiocyte via activating PKC signalling transduction pathway. Journal of Asian Natural Products Research; 10:39-48.*
133. Sung, M. K.; Kendall, C. W. C.; Rao, A. V. 1995. *Effect of saponins and Gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. Food Chem. Toxicol. 33, 357-366.*
134. Tarazona M., Olivera A., Lenis Y. (2010). *Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro. Archivos Medicine Veterinary. 42: 125 133.*
135. Technical Bulletin; CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay
<http://www.promega.es//media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CytoTox%20NonRadioactive%20Cytotoxicity%20Assay%20Protocol.pdf>
136. Tirado-Gómez L. L., Mohar-Betancourt A., López-Cervantes M., García-Carrancá A., Franco-Marina F. y Borges G., 2005. *Factores de riesgo de cáncer cèrvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. Salud Publica Mex. 47: 342-350.*

137. Tjalma W., Arbyn M., Paavonen J., Van W. y Bogers J. J. (2004). Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 14:751-761.
138. 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.
139. Uchaipichat V, Mackenzie PI, Elliot DJ, Miners JO. 2006. Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin, phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfinpyrazone) “probes” for human udp glucuronosyltransferases. *Drug metabolism and disposition*; 34:449-456.
140. Valdespino V., Castillo C., (2010). Alteraciones celulares y moleculares no clásicas en el desarrollo del cáncer. *Gaceta Médica Mexicana Vol. 146 No. 3*, p 185-198.
141. Vincken JP, Heng L, De Groot A, Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*; 68:275-297
142. Wade G. (2004), *Química Organica, 5ª ed.*, Editorial Pearson Prentice Hall, Madrid, 1171 pp.
143. Wayne M. B., Lewis J. K.; 2007; *El mundo de la célula*; Pearson; Educación. Madrid.
144. Williams G. T. (1991). Programed cell death apoptosis and oncogénesis. *Cell*, 65:1097-1098.
145. Yokosuka A and Mimaki Y. 2000. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*; 70:807–815.
146. Zamilpa, A, Tortoriello J, Navarro V, Delgado G, Alvarez L. 2002. Five New Steroidal Saponins from *Solanum chrysotrichum* Leaves and Their Antimycotic Activity. *J. Nat. Prod*, 65, 1815-1819
147. Zhang, J.; Meng, Z.; Zhang, M.; Ma, D.; Xu, S.; Kodama, H. 1999. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae* rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin. Chim. Acta*. 289, 79-88.
148. Zhang, J.; Meng, Z.; Zhang, M.; Ma, D.; Xu, S.; Kodama, H. 1999. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae* rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin. Chim. Acta*. 289, 79-88.
149. Zhu B, Bush D, Doss GA, Vincent S, Franklin RB, Xu S. 2007. Characterization of 1-Hydroxymidazolam Glucuronidation in Human Liver Microsomes. *Drug metabolism and disposition*; 36:331-338.

150. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*; 15:1481-1486.

Fuentes electrónicas

- ❖ imagenescientificasmcrespo.blogia.com
- ❖ images.wellcome.ac.uk
- ❖ Ojocientifico.com
- ❖ sintomasdecancerdemamas.com
- ❖ www.adam.com/
- ❖ www.affarscoachen.nu
- ❖ www.cancer.gov
- ❖ www.health.com
- ❖ www.iarc.fr/
- ❖ www.iqb.es
- ❖ www.redetec.org.br
- ❖ www.topnews.in/health/

XIII. Apéndice

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

Sales inorgánicas	Cantidad (g/l)
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0.8
Aminoácidos	
L-Arginina	0.2
L-asparagina (anhidro)	0.05
L-ácido aspártico	0.02
L-Cistina • 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-leucina	0.05
L-Lisina • HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-serina	0.03
L-treonina	0.02
L-triptófano	0.005
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.02883
L-valina	0.02
Vitaminas	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
myo-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
ácido p-aminobenzoico	0.001
D-ácido pantoténico (hemicalcium)	0.00025
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Otros	
Glutación (reducido)	0.001
Rojo de fenol • Na	0.0053
Adicionar	
Bicarbonato de sodio	2

Líneas celulares de cáncer cérvico uterino (CaCU)

Las líneas celulares de CaCU que utilizadas en este trabajo son: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2013); CaSki, células provenientes de carcinoma cérvico uterino, establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2013); y ViBo, células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy et al., 1992).

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que atrae iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

Tris base 3.04 g (Sigma, U.S.A)
Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma, U.S.A)
Cloruro de potasio 0.04 g (Sigma, U.S.A)
Etilen- diamen- tetra- acético (EDTA) 0.40 g (Sigma, U.S.A)

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

Tripsina

La solución es utilizada para la disgregación del tejido y el desprendimiento de las células tumorales ViBo. Para su preparación es pesado 100 mg de tripsina (Sigma-Aldrich, USA) y es disuelto en 200 ml de Verseno en condiciones estériles.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma, U.S.A)
Cloruro de potasio 0.20 g (Sigma, U.S.A)
Fosfato mono-ácido de sodio 2.16 g (Sigma, U.S.A)
Fosfato di-ácido de potasio 0.20 g (Sigma, USA)

El cloruro de sodio se disuelve, el cloruro de potasio, el fosfato mono-ácido desodio y el fosfato di-ácido de potasio se disuelven en 900 ml de H₂O bi-destilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con

diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

Colorante cristal violeta

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

Desactivación del suero

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone,U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 40 ml. para su mejor uso y manipulación.

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, Se almacene a 4 °C.

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2 %)

Paraformaldehído al 2 % de PBS (Buffer de fosfato salino) (preparado al momento, para disolverlo se calentó la solución a temperatura no mayor a 60 °C, sí rebasa esta temperatura el paraformaldehído polimeriza y la solución no sirve para fijar)

