



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DE  
LOS COMPUESTOS OXIMA DE LA 23-  
ACETILDIOSGENINA Y DIOXIMA DE LA  
DIOSGENIN-3,6-DIONA EN CÉLULAS  
PROVENIENTES 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:  
HUGO DAVID GONZÁLEZ CONCHILLOS

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

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER,  
UMIEZ.

MÉXICO D.F. 2014.





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**"ZARAGOZA"**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **GONZÁLEZ CONCHILLOS HUGO DAVID**, con número de cuenta **305275190**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **27** del mes de **mayo** de 2014 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE DR. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES
- VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
- SECRETARIO M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ
- SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ
- SUPLENTE DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

*[Handwritten signatures of the jury members]*

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de la actividad antiproliferativa y citotóxica de la Oxima de la 23-acetildiosgenina y la Dioxima de la Diosgenin-3,6-diona, en células de cáncer cervicouterino.**

Opción de titulación: Tes s.

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
México, D.F. a 24 de abril de 2014.

**Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**

**ZARAGOZA**  
**DIRECCIÓN**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

*[Handwritten signature]*  
VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

*“Si has construido un castillo en el aire, no has perdido el tiempo, es allí donde debería estar. Ahora debes construir los cimientos debajo de él.”*

*George Bernard Shaw*

Gracias a mi familia, que es lo más preciado que tengo en esta vida.

**A mi mamá**, que siempre tienes una sonrisa y que a pesar de todos mis errores y locuras, me sigues apoyando y dando ánimos para que pueda cumplir mis sueños y metas.

**A mi papá**, por ser como eres, por ser ese ejemplo a seguir que me inspira a nunca darme por vencido y a dar todo por la familia.

**A mi hermano**, por ser esa fuente de inspiración que me impulsa a ser una mejor persona, por todas esas veces que me has dicho que yo puedo llegar a ser alguien y por toda esa confianza que depositas en mí.

A todos mis profesores que en alguno momento de la carrera me compartieron sus conocimientos y me dieron fuerzas para seguir adelante.

A mis compañeros de laboratorio y de carrera Damián, Mayte, Chantal, Viri, May, Fer, Gisela, Javier, Moisés, Israel, Casandra, Betzabé y todos los demás, que hicieron de la universidad una de las experiencias más enriquecedoras e inolvidables de mi vida.

## **Agradecimientos**

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo su apoyo y enseñanzas durante todo este trabajo, por su paciencia y sus palabras que me motivaron a seguir adelante.

Al Dr. Hugo López Muñoz por brindarme parte de sus conocimientos y su tiempo, siempre inspirándome a ser el mejor.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez porque siempre estuvo ahí cuando lo necesité, resolviendo mis dudas y compartiendo sus valiosas experiencias.

Al Dr. José Luis Morán Perales y a la Bióloga Reynalda Roldan Pérez por sus revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis.

Esta tesis fue realizada con apoyo de los programas de apoyos a proyectos de la UNAM PAPIME PE206812 y PAPIIT IN222114-3

## Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Ciclo celular.....	3
Muerte celular.....	5
Apoptosis.....	6
Necrosis.....	8
Cáncer.....	9
Tipos de cáncer.....	9
Causas del cáncer.....	10
Virus tumorales.....	11
Virus del Papiloma Humano (VPH).....	11
Funciones de los genes del VPH.....	12
El cérvix.....	12
Cáncer cervical.....	13
Tratamientos.....	13
Cirugía.....	13
Radioterapia.....	14
Quimioterapia.....	14
Efectos secundarios.....	15
Saponinas y sapogeninas.....	16
Oximas.....	17
Planteamiento del problema.....	19
Justificación.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Particulares.....	20
Material y método.....	21
Resultados.....	25
Discusión de resultados.....	34
Conclusiones.....	36
Referencias.....	37
Apéndice.....	41

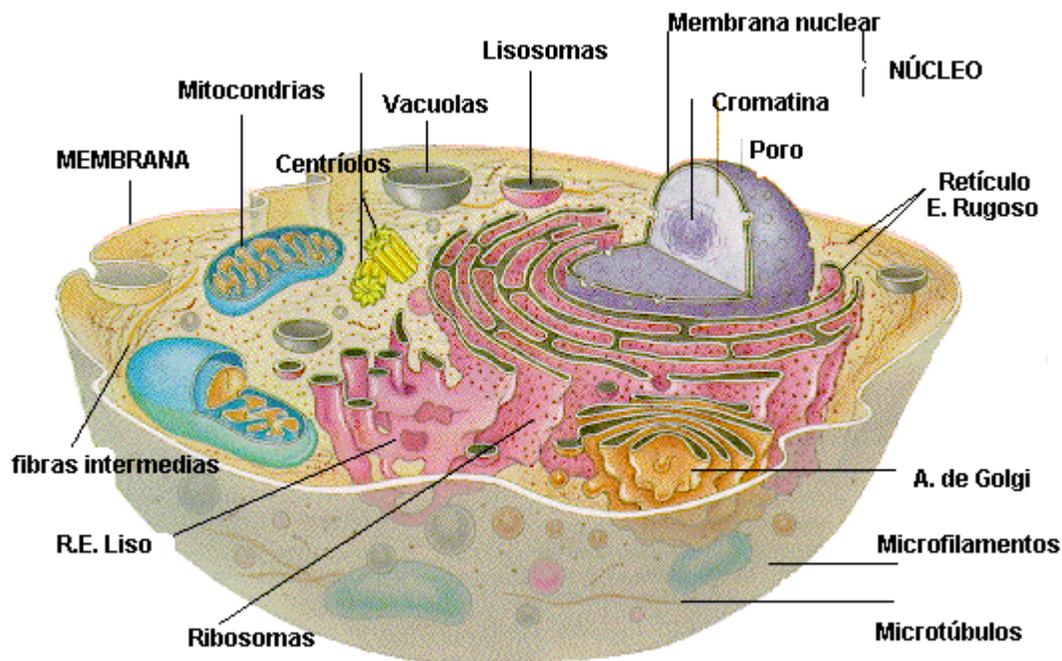
## **Resumen.**

El cáncer cervical es el segundo cáncer femenino más frecuente a escala mundial y el más común de los que afectan a las mujeres en muchos países en vías de desarrollo. En los últimos años, la biología molecular ha establecido una sólida relación causal entre la infección persistente por genotipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo y el cáncer cervical. Existen diferentes tratamientos disponibles para las pacientes, incluyendo la cirugía, quimioterapia y radioterapia. Estos tratamientos son muy efectivos si la enfermedad es detectada y tratada oportunamente, sin embargo, en la mayoría de los casos, esta enfermedad es detectada en estadios avanzados, donde los tratamientos antes mencionados, son poco o nada efectivos y generan efectos secundarios graves, debido a que la quimioterapia y la radioterapia destruyen a las células cancerosas y a las células normales que estén en división, generando la necesidad de implementar nuevas alternativas terapéuticas. Al respecto, actualmente existe un fuerte interés en la búsqueda de fármacos alternativos de acción selectiva y no citotóxicos. En este sentido, recientemente se ha demostrado que algunas saponinas esteroidales tales como la diosgenina presentan actividad antiproliferativa y se cree que las oximas presentes en los compuestos incrementan la actividad de éstos. Por ello, en el presente estudio se evaluó la actividad antitumoral de los compuestos derivados de la Diosgenina, Oxima de la 23-acetildiosgenina y la Dioxima de la diosgenin-3,6-diona en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, obteniendo un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis con unas IC<sub>50</sub> para la Dioxima de 19, 21 y 39 µg/ml en las células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, mientras que para la Oxima fue de 5.5, 5.3 y 13.76 µg/ml. El bajo efecto de las IC<sub>50</sub>s citadas anteriormente en el potencial proliferativo de células linfocíticas indica que la actividad antiproliferativa presente en estos compuestos es de acción selectiva. Por otro lado, la nula o baja detección de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales y no tumorales tratados con la Dioxima y la Oxima, establece que estos esteroides no inducen muerte por necrosis tanto en células tumorales como en células no tumorales. El incremento en la expresión de la caspasa 3 activa en un rango de 4 a 55 % observado en las células HeLa, CaSki y ViBo sugiere que estos compuestos inducen a las células tumorales de CaCU a una muerte por apoptosis. En concreto, nuestros resultados establecen que la Dioxima y Oxima son compuestos con actividad antitumoral no citotóxicos y de acción selectiva, que los hace fuertes candidatos para ser evaluados en modelos in vivo con la intención de proponerlos como fármacos con fuerte potencial terapéutico contra el cáncer.

## Introducción.

La capacidad de crecer y reproducirse es una propiedad fundamental de los organismos vivos. Ya esté el organismo compuesto por una única célula o por trillones, las células deben crecer y dividirse de una manera regulada. Las células son entidades discretas que crecen y se dividen. Para ello, una célula debe tener una serie de elementos: un conjunto de instrucciones y las instalaciones de producción para la fabricación de las moléculas que formarán una nueva célula, un mecanismo que divida una célula en dos, y un límite definido entre ella misma y su ambiente, mediante el cual los nutrientes sean importados y los desechos exportados. Las instrucciones están codificadas en la secuencia de ADN en los cromosomas (Murray y Hunt 1993). El crecimiento celular se lleva a cabo a través de la síntesis de nuevas moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos. Debido a que la acumulación de estas moléculas produce un incremento en el volumen celular, la membrana plasmática crece para evitar que la célula estalle. Pero las células no pueden crecer ilimitadamente; el crecimiento celular lleva asociado un descenso en su relación superficie/volumen y por lo tanto, en su capacidad para realizar un intercambio eficaz con el medio. Así, el crecimiento celular viene acompañado generalmente por la división celular, en la que la célula da lugar a dos células hijas. Como se muestra en la **figura 1**, todas las células muestran ciertas características estructurales.

En los organismos unicelulares, la división celular aumenta el número total de individuos de una población. En los organismos pluricelulares, la división celular aumenta el número de células, que produce el crecimiento del organismo y reemplaza a las células muertas (Becker *et al.* 2007).



**Fig. 1.** Imagen del interior de una célula donde se muestran sus organelos (Obtenida de [http://www.biologia.edu.ar/cel\\_euca/celula1.htm](http://www.biologia.edu.ar/cel_euca/celula1.htm)).

## **Ciclo celular.**

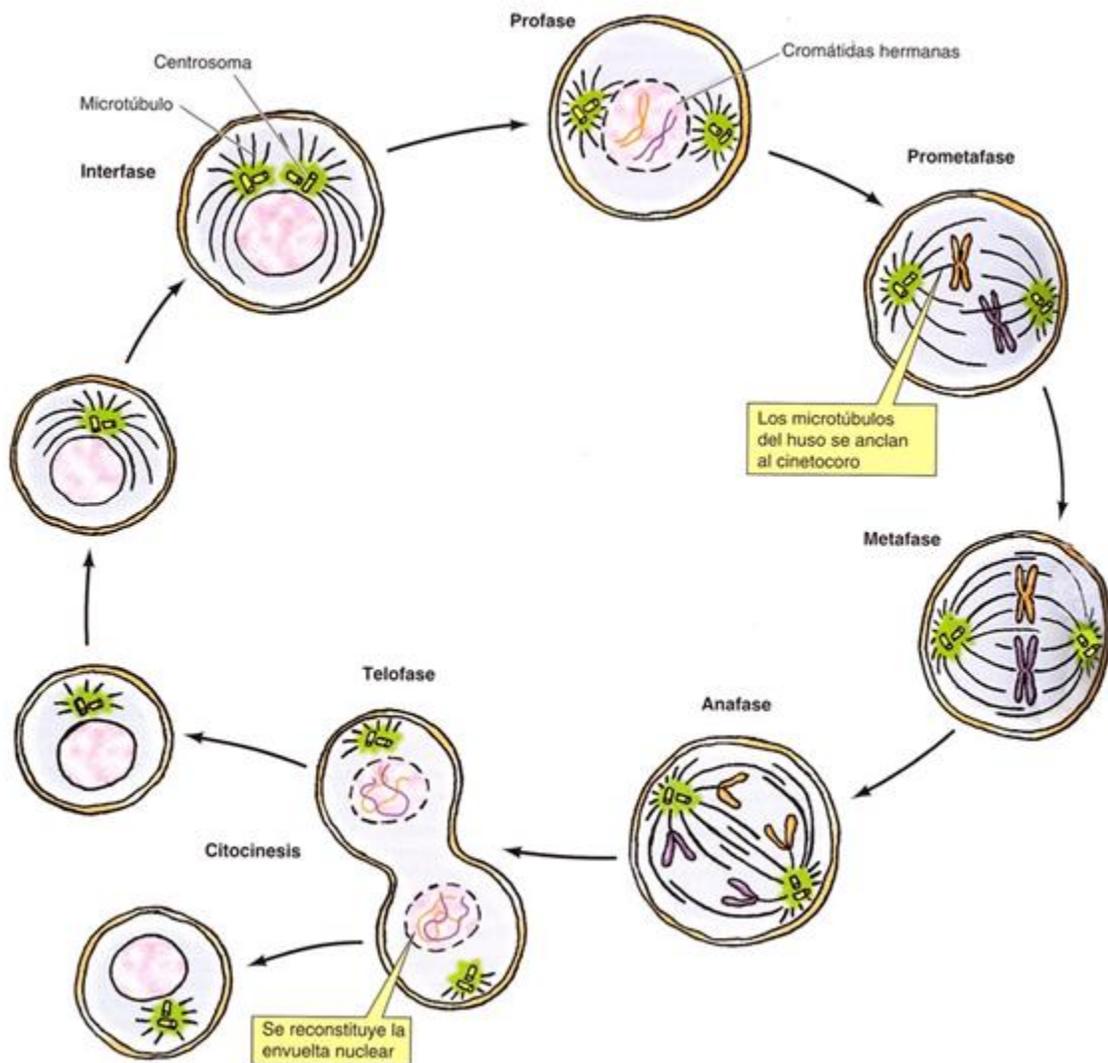
El ciclo celular se define como la suma total de eventos relacionados con la división, que ocurren entre el tiempo en el que una célula completa una división celular y el tiempo en el que completa la siguiente. Todo ciclo celular tiene dos requisitos básicos: Primero, el material genético en el núcleo y organelos deben replicarse completamente, y una copia tanto del material genético, como de los organelos, debe terminar en cada una de las células que serán formadas. Segundo: El citoplasma y las membranas deben organizarse de manera que habrá dos células completas para recibir este ADN. Mecanismos elaborados se aseguran de que estos dos objetivos se cumplan (Savada 1993).

En una población de células en división, cada célula pasa por una serie de etapas definidas que constituyen el ciclo celular. El ciclo celular puede dividirse en dos fases principales con base en las actividades celulares visibles con un microscopio óptico: la fase M y la interfase. La fase M incluye: 1) el proceso de mitosis, durante la cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos y 2) la citocinesis, en la que toda la célula se divide en dos células hijas. La interfase, es el periodo entre las divisiones celulares, es un intervalo donde la célula crece y efectúa diversas actividades metabólicas.

Mientras que la fase M sólo suele durar alrededor de 1 h en las células de mamíferos, la interfase puede extenderse por días, semanas o más tiempo, según el tipo celular y las condiciones imperantes (Karp 2010).

La fase M del ciclo corresponde a la mitosis y se divide en cinco etapas —profase, prometafase, metafase, anafase y telofase— y tienen lugar en un orden secuencial estricto, que se ilustran en la **figura 2** y a la que suele seguir la citocinesis.

1. Profase. La cromatina se condensa lentamente formando cromosomas bien definidos, cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas, cada una con un centrómero y empieza a formarse el huso mitótico.
2. Prometafase. Inicia con la desintegración de la envoltura nuclear, en cada centrómero maduran complejos protéicos llamados cinetocoros que se unen a algunos de los microtúbulos del huso.
3. Metafase. Los microtúbulos alinean los cromosomas en un plano situado a medio camino de los polos del huso.
4. Anafase. Los cinetocoros apareados se separan, permitiendo que cada cromátida (ahora denominada cromosoma) sea arrastrada lentamente hacia un polo del huso.
5. Telofase. Los cromosomas hijos separados llegan a los polos y los microtúbulos desaparecen, se vuelve a formar la envoltura nuclear. La cromatina condensada se expande de nuevo.
6. Citocinesis. Se produce mediante un anillo contráctil de filamentos de actina y miosina que se forma debajo de la membrana plasmática. A medida que los filamentos de actina y miosina se contraen, estos tiran de la membrana plasmática, lo que hace que la célula se estrangule y quede dividida en dos. Se rompe el puente entre las dos células hijas, y la membrana plasmática se vuelve a sellar (Alberts *et al.* 2002).



**Fig. 2.** Etapas de la mitosis (Obtenida de Cooper y Hausman 2007).

Durante la interfase los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que el núcleo presenta un aspecto uniforme. En la **figura 3**, se representan estas fases.

1. La fase  $G_1$  (gap 1), corresponde al intervalo (gap) entre la mitosis y el comienzo de la replicación del ADN. La célula es metabólicamente activa y está creciendo, pero no se replica su ADN.
2. La fase S (síntesis), La célula replica su ADN nuclear, un requisito previo esencial para la división celular.
3. Tras finalizar la síntesis del ADN se produce la fase  $G_2$ , durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan las proteínas necesarias para la mitosis (Albert et al. 2007).

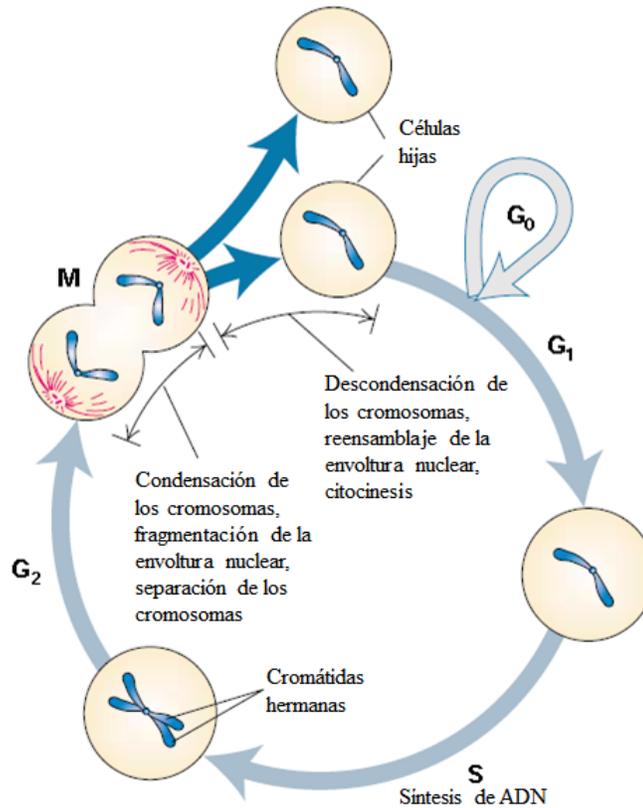


Fig. 3. Fases del ciclo celular (Obtenida y modificada de Lodish *et al.* 2005).

### Muerte celular.

En última instancia, todos los organismos llegan al final de sus vidas mediante uno de dos medios. Uno, llamado necrosis, se considera involuntario y no contribuye en nada a la salud de un organismo. En los animales, la mayoría de las veces la necrosis resulta de lesiones. Dado que las células tienen muy poco control sobre la necrosis, la mayoría de los biólogos celulares se centran en la comprensión de la segunda forma de morir. En casi todos los aspectos, esta forma, llamada apoptosis, es exactamente lo contrario de necrosis (Propper 2013).

La muerte celular en sus diversas formas da forma a la esencia de la vida. Predominantemente, la muerte celular apoptótica es de gran importancia durante el desarrollo del organismo, así como en la regulación del sistema inmune y en la respuesta de defensa a los estímulos de enfermedades (por ejemplo, enfermedades virales). La muerte celular en sí está interconectada con la supervivencia celular y la proliferación celular (Chaabane *et al.* 2013).

La reproducibilidad en tiempo y en espacio con la que se lleva a cabo el proceso de muerte celular durante el desarrollo, ha dado lugar a la denominación de "muerte celular programada". Esta muerte natural de las células está diseñada de tal forma que el contenido intracelular no se vierta al exterior, como ocurre en la muerte accidental de algunas células ante condiciones nocivas extremas (necrosis), causando daño al tejido adyacente, provocando inflamación como se ejemplifica en la **figura 4**. (Jiménez y Merchant 2002).

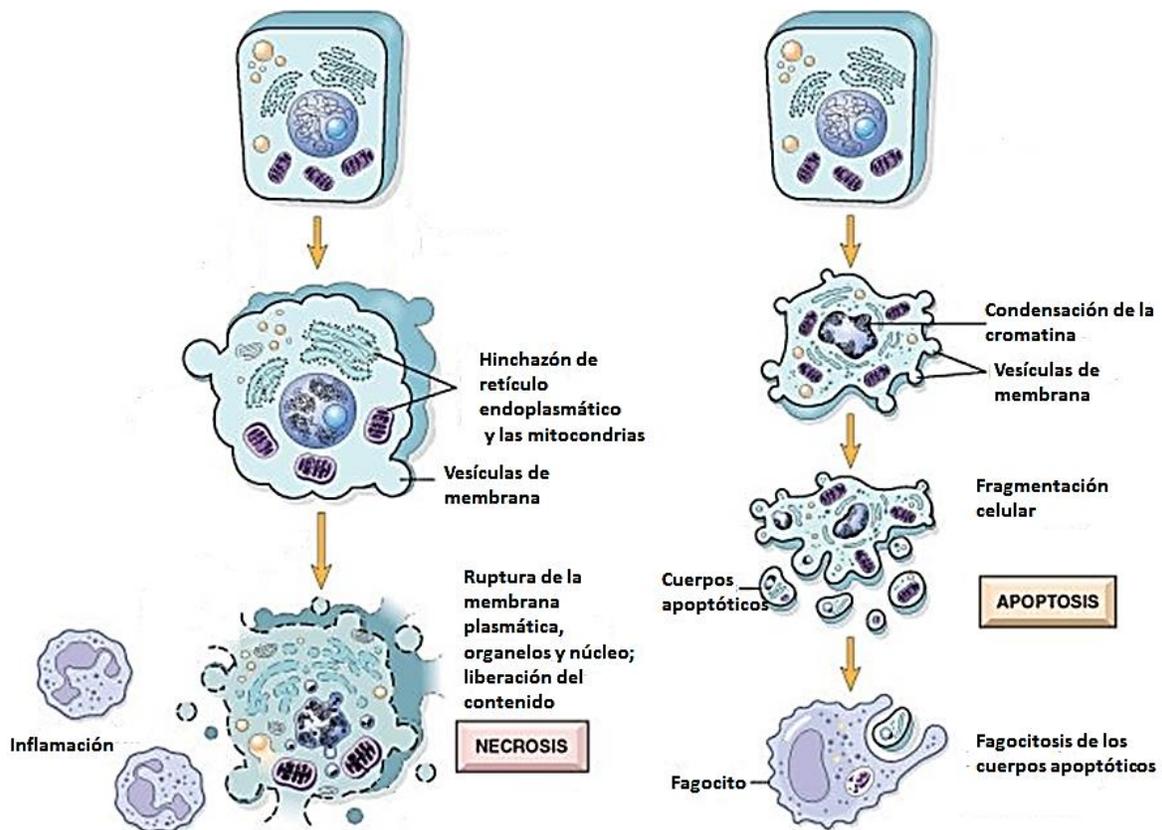


Fig. 4. Fase de la muerte celular por apoptosis y necrosis (Obtenida y modificada de <http://dc359.4shared.com/doc/UkENW-xI/preview.html>).

## Apoptosis.

La apoptosis, un mecanismo de muerte celular, juega un papel importante en una variedad de eventos biológicos, incluyendo morfogénesis, mantenimiento de la homeostasis de diversos tejidos y la remoción de células dañinas. La apoptosis está estrechamente regulada por mecanismos moleculares que parecen ser evolutivamente conservados, y por lo tanto se piensa que es un proceso activo en la eliminación de las células innecesarias (Tsujimoto 1997).

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, el núcleo se condensa y el ADN se fragmenta. Los constituyentes celulares no se liberan al medio extracelular donde podrían traer efectos nocivos a las células circundantes (Lodish *et al.* 2005).

Como se muestra en la **figura. 5**, existen dos vías principales de apoptosis en las células de mamífero, la vía intrínseca y extrínseca, teniendo en común que ambas vías convergen en el nivel de activación de caspasas. Las caspasas, proteasas específicas de aspartato, son el brazo principal de la maquinaria apoptótica. Las caspasas se sintetizan como procaspasas, precursores catalíticamente inactivos (zimógenos), y son proteolíticamente activadas ya sea por otras caspasas y proteasas o por un aumento local de la concentración de la caspasa (Hoffman y Will 2003).

## **Vía extrínseca.**

El término "apoptosis extrínseca" se ha utilizado ampliamente para indicar los casos de muerte celular apoptótica que son inducidos por señales de estrés extracelulares que son detectados y se propagan por los receptores transmembranales específicos. La apoptosis extrínseca puede ser iniciada por la unión de ligandos letales, tales como Fas/CD95 ligando (FASL/CD95L), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) y la superfamilia TNF (ligando), miembro 10 (TNFSF10, mejor conocido como ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, TRAIL), a varios receptores de muerte (por ejemplo, Fas/CD95, receptor de TNF  $\alpha$  1 (TNFR1) y del receptor de TRAIL (TRAILR) 1-2, respectivamente).

Un receptor de muerte bien caracterizado es el llamado Fas (también conocido como Apo1 o CD95), un miembro de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF). Fas es una proteína de membrana de tipo 1 cuyo dominio extracelular consiste en 3 dominios ricos en cisteína. Fas pasa al menos una parte de su tiempo ensamblado como un trímero. El dominio citoplasmático de Fas contiene un dominio de muerte de aproximadamente 80 residuos, que son compartidos por todos los receptores de muerte así llamados (Galluzzi *et al.* 2012).

Cuando Fas une su ligando, FasL, se incorpora FADD (proteína relacionada con Fas con dominio de muerte) y se une a Fas, a lo que le sigue la incorporación de procaspasa 8, una forma inactiva de caspasa 8. La vinculación de FADD y procaspasa 8 ocasiona la segmentación proteolítica de procaspasa 8 hasta su forma activa; en seguida, la caspasa 8 inicia una cascada proteolítica que lleva a la muerte de la célula. La caspasa 8 segmenta procaspasa 3 y produce caspasa 3 activa, que provoca la muerte de la célula. La caspasa 8 también puede segmentar Bid a una forma truncada que puede activar la vía mitocondrial de muerte (Goldsby *et al.* 2006).

## **Vía intrínseca.**

La vía mitocondrial es controlada por proteínas Bcl-2. Cuando se activa, las proteínas proapoptóticas multidominio permeabilizan la membrana mitocondrial externa y desencadenan la liberación de proteínas proapoptóticas, incluyendo al citocromo c, desde el espacio intermembranoso. Muchos estímulos, incluidos hipoxia, especies reactivas de oxígeno (ERO), radiación ultravioleta (UV) o gama, la privación de factores de crecimiento, inhibidores de cinasa como estaurosporina, y muchos compuestos citotóxicos han mostrado activar esta vía (Yin y Dong 2003).

En el citoplasma, el citocromo c se une a la proteína de andamiaje Apaf-1. Esta molécula compleja interactúa con las caspasas a través de un dominio de reclutamiento de N-terminal de la caspasa. Junto a este se encuentra una región que incluye un dominio de trifosfato de adenosina (ATPasa).

Esta región de la molécula parece actuar como un regulador negativo de la función de Apaf-1. La unión de citocromo c y fosfato de desoxiadenosina (dATP) elimina la influencia de regulación negativa de la C-terminal de Apaf-1, permitiendo así la unión y la autoactivación de la procaspasa 9. Este complejo de Apaf-1, citocromo c, caspasa 9 activa (y, posiblemente, otras subunidades) se conoce como el apoptosoma. A continuación la caspasa 9 activa, se unirá a la procaspasa 3 para convertirla en caspasa 3 activa, iniciando la cascada de muerte celular.

Esta cascada se puede amplificar aún más en al menos dos formas. En primer lugar, la caspasa escinde otras caspasas efectoras, amplificando directamente la cascada. Además, las caspasas activas escinden Bid, que luego se une de manera más eficiente a las mitocondrias, liberando de este modo más factores mitocondriales, tales como el citocromo c, mejorando la activación de la caspasa 9 (Pollard y Earnshaw 2002).

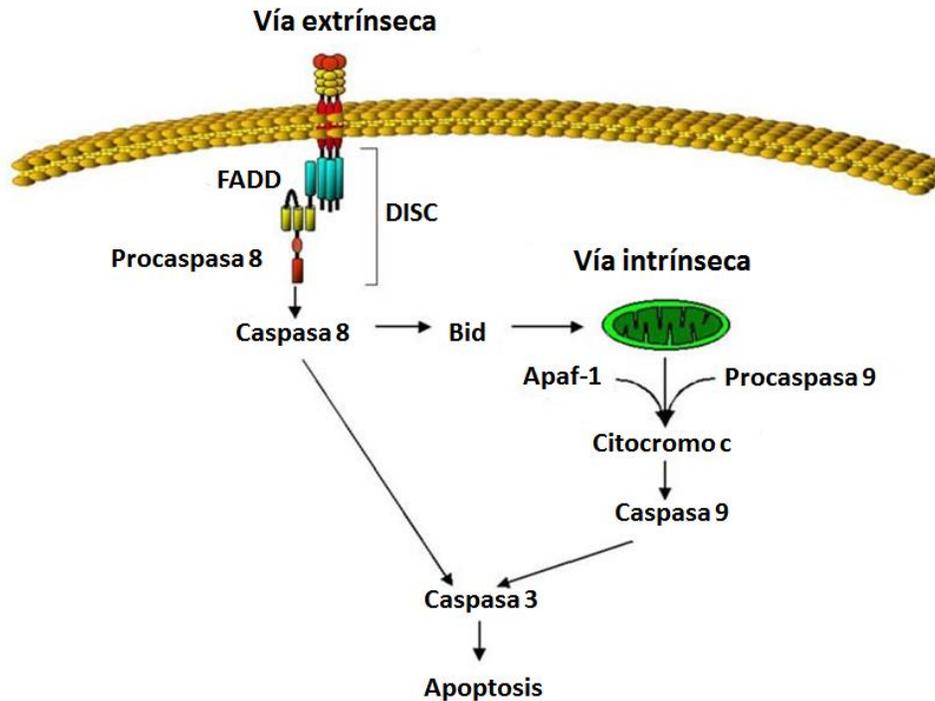


Fig. 5. Vías de muerte celular por apoptosis. Vía extrínseca e intrínseca (Obtenida y modificada de Török y Gores 2004).

### Necrosis.

El término "necrosis" se origina del griego "*nekros*", que se traduce como "cadáver". Durante mucho tiempo se ha considerado como un tipo accidental, un tipo incontrolado de muerte celular. La necrosis se caracteriza morfológicamente por el redondeo de la célula, un aumento en el volumen celular (también conocida como oncosis), hinchazón de los organelos, la falta de la fragmentación del ADN internucleosomal, y la ruptura de la membrana plasmática (Vanlangenakke *et al.* 2012).

Los cambios morfológicos se deben a la pérdida del control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La liberación de calcio intracelular produce la activación de fosfolipasas, que degradan los fosfolípidos de membrana y la liberación desde los compartimientos lisosómicos de hidrolasas, que se ocupan de acelerar la desintegración celular (Rabinovich 2004).

## **Cáncer.**

Las células cancerosas se diferencian de las células normales en muchas características importantes. Estas incluyen la pérdida de la diferenciación, autosuficiencia en las señales de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, el aumento de la invasividad, y disminución de la sensibilidad a los fármacos. Estas diferencias no surgen simplemente de un crecimiento celular incontrolado, sino más bien a partir de una evolución celular. La adquisición progresiva de mutaciones epigenéticas y anormalidades en la expresión de múltiples genes que tienen muy diversas funciones son necesarias para la tumorigénesis. Un grupo importante de estos genes está implicado en los puntos de control del ciclo celular, que son las posiciones de control que aseguran el orden de eventos en el ciclo celular (Park y Lee 2006).

## **Tipos de cáncer.**

Muchos tipos diferentes de células en el cuerpo humano pueden formar tumores, cada uno con su propia apariencia histológica característica y comportamiento biológico. En consecuencia, los cánceres aparecen en más de 100 sitios de tejido diferentes y presentan un amplio espectro de rasgos distintivos (Lewin *et al.* 2007). Los tumores surgen con suma frecuencia, especialmente en animales y humanos de edad avanzada, pero muchos de ellos plantean poco riesgo al organismo ya que están localizados. Estos tumores se denominan benignos; un ejemplo de estos son las verrugas. Los tumores se convierten en una amenaza para la vida si se diseminan por todo el cuerpo. Estos tumores son los denominados malignos y son la causa del cáncer (Darnell *et al.* 1993).

La mayoría de los tumores humanos surgen de los tejidos epiteliales. Los epitelios son de especial interés aquí, porque producen los cánceres humanos más comunes - los carcinomas. Estos tumores son responsables de más del 80% de las muertes por cáncer en el mundo occidental.

El resto de los tumores malignos surgen de los tejidos no epiteliales de todo el cuerpo. La primera clase importante de cáncer no epitelial se deriva de los diversos tejidos conectivos en todo el cuerpo. Estos tumores, los sarcomas, constituyen sólo alrededor del 1% de los tumores encontrados en la oncología clínica. El segundo grupo de cánceres no epiteliales se derivan de los diversos tipos de células que constituyen los tejidos que forman la sangre (hematopoyético), incluyendo las células del sistema inmune.

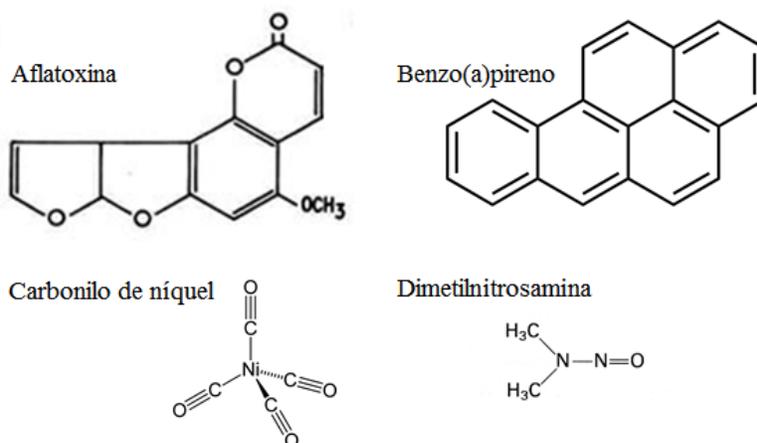
El término leucemia se refiere a células malignas de varios linajes de células hematopoyéticas que se mueven libremente a través de la circulación. Los linfomas son tumores de los linajes linfoides que se agregan para formar masas de tumores sólidos.

En muchos pacientes, múltiples tumores fueron descubiertos en un sitio anatómico bastante distante de donde comenzó su enfermedad, una consecuencia de la tendencia de cáncer para extenderse por todo el cuerpo y para fundar nuevas colonias de células cancerosas. Estos nuevos asentamientos, denominados metástasis, a menudo pueden ser rastreados directamente de vuelta al lugar donde comenzó la enfermedad de cáncer - el tumor primario (Weinberg 2007).

## Causas del cáncer.

Las sustancias cancerígenas son las que inducen tumores (benignos o malignos), aumentan su incidencia o malignidad o acortan el tiempo de aparición del tumor cuando se introducen en el cuerpo a través de la inhalación, la inyección, la aplicación cutánea o ingestión. Los carcinógenos se clasifican como genotóxicos o no genotóxicos en función de sus modos de acción. Los carcinógenos genotóxicos son los que inician la carcinogénesis mediante la interacción directa con el ADN, lo que resulta en daño al ADN o aberraciones cromosómicas. Por otro lado, los carcinógenos no genotóxicos son agentes que interactúan indirectamente con el ADN, causando modificación indirecta a la estructura del ADN, en la cantidad, o en la función que puede resultar en la alteración de la expresión génica o la transducción de señales (Mulware 2013).

La radiación y muchos carcinógenos químicos (**Figura 6**) actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. A estos carcinógenos se les suele denominar agentes iniciadores, puesto que la inducción de mutaciones en determinados genes se considera el proceso inicial que conduce al desarrollo del cáncer. Algunos de los agentes iniciadores que contribuyen a causar cánceres humanos son la radiación ultravioleta del sol (la principal causa de cáncer de piel), los productos químicos carcinógenos en el humo del tabaco, y la aflatoxina (un potente carcinógeno hepático producido por algunos mohos que contaminan reservas de cacahuates y de otros tipos de grano almacenadas de forma inadecuada). Los carcinógenos en el humo de tabaco (incluyendo el benzo(a)pireno, la dimetilnitrosamina, y los compuestos del níquel) son las principales causas identificadas de cáncer en el hombre (Cooper y Hausman 2007).



**Fig. 6.** Estructura de carcinógenos químicos representativos.

Los cánceres humanos comunes causados por un virus incluyen al cáncer de hígado y al cáncer de cérvix, que en conjunto suponen del 10 al 20% de la incidencia mundial del cáncer. Estos virus no son solamente importantes como causas de cáncer en el hombre; los estudios acerca de los virus tumorales han contribuido en la caracterización de los procesos moleculares responsables del desarrollo de los cánceres inducidos por carcinógenos víricos y no víricos.

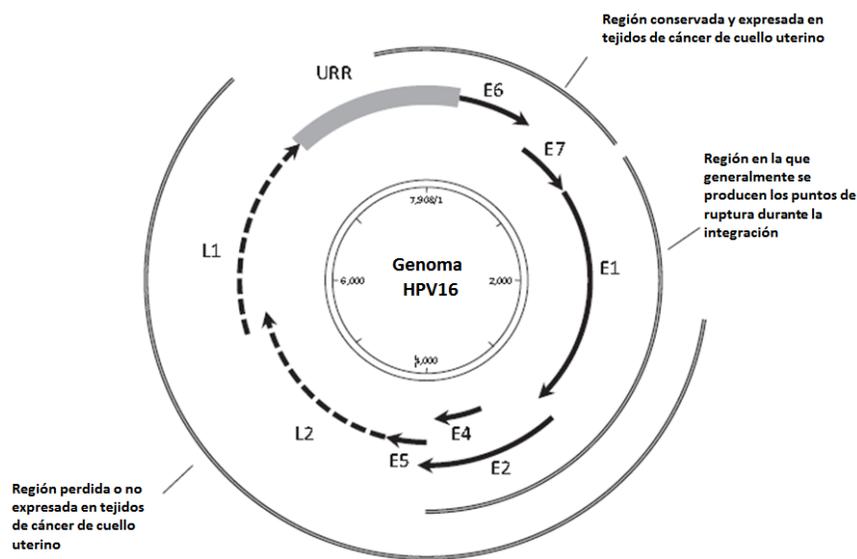
## Virus tumorales.

La carcinogénesis viral es la inducción de tumores asociados con una infección viral. Los virus capaces de inducir el estado neoplásico se denominan colectivamente como “virus tumorales” (Georgakilas *et al.* 2010). Los virus tumorales de humanos pertenecen a un número de familias de virus, incluyendo los virus de ARN de las familias Retroviridae y Flaviviridae y los virus de ADN de las familias Hepadnaviridae, Herpesviridae, y Papillomaviridae (Mclaughlin-Drubin y Munger 2008).

## Virus del Papiloma Humano (VPH).

Los VPH son un grupo heterogéneo de virus con genomas circulares de ADN de doble cadena de alrededor de 8000 nucleótidos de tamaño. La **figura 7** representa la característica organización del genoma del VPH utilizando el VPH-16 como modelo. Todos los genomas del virus del papiloma humano incluyen 3 regiones generales: (1) una región reguladora (URR), que contiene secuencias que controlan la transcripción y replicación viral, (2) una región temprana, que contiene los marcos de lectura abiertos (ORFs; por ejemplo, E1, E2, E4, E5, E6 y E7) que participan en múltiples funciones, incluyendo trans-activación de la transcripción, la transformación, la replicación y la adaptación viral a diferentes ambientes celulares, y (3) una región tardía, que codifica para la proteínas de la cápside L1 y L2 que forman la estructura del virión y facilitan el ensamblaje del ADN viral y la maduración. Todos los PVs descritos hasta la fecha contienen un E1, E2, E4, L1, L2 y algunas funciones E6/E7-like. Los tipos de VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 que se encuentran preferentemente en cáncer cervical y otros anogenitales han sido designados como de alto riesgo o como tipos oncogénicos (carcinogénicos).

Los VPH del tipo 16 y 18 representan aproximadamente el 50% y el 20% de los casos de cáncer de cuello uterino en todo el mundo, respectivamente. VPH-16 es el tipo más frecuentemente implicado en el desarrollo de carcinoma de células escamosas del cuello uterino (más del 50% de estos cánceres son positivos al VPH-16); éstos juegan un papel importante en el desarrollo de los adenocarcinomas de cérvix (Burk *et al.* 2009).



**Fig. 7.** Estructura y organización de un genoma de HPV. (Obtenida y modificada de Burk *et al.* 2009).

## **Funciones de los genes del VPH.**

La observación de que los genes E6 y E7 desactivan a los supresores tumorales p53 y pRb, respectivamente, se ha utilizado tradicionalmente para explicar las diferencias entre el VPH de tipo oncogénico del no oncogénico.

### **Proteína E6 y p53.**

La proteína p53, un gen supresor de tumores, controla la proliferación celular y la apoptosis. Es capaz de mantener la integridad del genoma mediante la inducción de la detención del ciclo celular o apoptosis en respuesta al daño del ADN.

Ahora ha quedado claro que la proteína E6 de HPV se une a p53 y activa su degradación a través de la vía de la ubiquitina. E6 se une en primer lugar a la enzima de ubiquitinación celular E6-AP, y luego forma un complejo con p53, lo que conduce a su degradación proteolítica. Esto se traduce en la pérdida de la detención del crecimiento inducida por p53, la promoción de la proliferación, y la inhibición de la apoptosis (Helt *et al.*, 2002). La continua degradación de p53 por la proteína E6 se piensa que es equivalente a la inactivación de p53 por alteraciones genéticas (Zhang y Tang 2012).

### **Oncoproteína E7 y pRb.**

El papel fundamental de la proteína E7 del VPH en la transformación maligna de las células epiteliales del cuello uterino se atribuye a sus efectos sobre pRb, un miembro de la familia de "proteínas de bolsillo", que también incluye a p107 y p130. Las actividad represora de pRb y de las proteínas de bolsillo relacionadas p107 y p130, están mediadas por miembros de la familia de factores de transcripción E2F. En G0/G1 pRb hipofosforilado está unido a E2F. Después de la fosforilación por una CDK en G1, el complejo pRb/E2F se disocia y E2F actúa como un activador transcripcional, que se traduce en entrada en la fase S.

Sin embargo, la proteína codificada por el virus, E7, se une a pRb hipofosforilada y desplaza al factor de transcripción E2F de pRb. Por lo tanto, la unión de E7 a Rb es esencial para la transformación de células inducida por E7 y en consecuencia, puede conducir a la pérdida del control de punto de control en la transición G1/S y a una proliferación celular incontrolada (Jo y Kim 2005).

## **El cérvix.**

El cérvix, o cuello uterino, es parte del aparato reproductor de la mujer. Está ubicado en la pelvis. El cérvix es la parte inferior, estrecha, del útero (matriz). Es un canal que conecta el útero con la vagina. Durante el período menstrual, la sangre corre desde el útero por el cérvix hacia la vagina. La vagina conduce al exterior del cuerpo y ésta produce mucosidad. Durante la relación sexual, la mucosidad ayuda a los espermatozoides a moverse desde la vagina por el cérvix hacia el interior del útero. Durante el embarazo, el cérvix se encuentra fuertemente cerrado para ayudar a mantener al feto dentro del útero. Durante el parto, se abre para permitir el paso del producto por la vagina.

## **Cáncer cervical.**

El cáncer cervical es el segundo cáncer femenino más frecuente a escala mundial y el más común de los que afectan a las mujeres en muchos países en vías de desarrollo. Las estimaciones globales anuales para el año 2000 fueron de 470 600 nuevos casos y 233 400 fallecimientos. El promedio de edad para el cáncer cervical es de 51.4 años, con un grupo similar de pacientes entre los grupos de edades de 30 a 39 años y de 60 a 69 años. Hay una tendencia a presentar estadios más avanzados a medida que aumenta la edad, lo que sugiere que las pacientes de más edad no se han sometido a tantas revisiones como las más jóvenes.

En los últimos años, la biología molecular ha establecido una sólida relación causal entre la infección persistente por genotipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo y el cáncer cervical. En un estudio de casi 1000 casos de cáncer cervical en todo el mundo, la prevalencia de la infección por el VPH fue del 99.7 %. Esta relación causal ha conducido a un compromiso de prevención del cáncer cervical globalmente, utilizando tanto prevención primaria por vacunación frente al VPH en mujeres jóvenes como prevención secundaria mediante pruebas de detección directa del VPH cancerígeno en mujeres de más edad (Berek y Hacker 2012).

La historia natural del cáncer cervicouterino desde su inicio, circunstancia en la cual es completamente curable, provee de un periodo muy valioso de tiempo para poder identificar la enfermedad y ofrecer a las pacientes curación y tratamiento con una excelente calidad de vida.

El crecimiento lento y paulatino del cáncer cervical presenta varios periodos:

- Primero, desde el carcinoma *in situ* y la evidencia de invasión incipiente de estroma.
- Segundo, de la invasión incipiente del estroma al microcarcinoma
- Tercero, entre el microcarcinoma y el cáncer clínicamente manifiesto.

Cuando la invasión ocurre y el cáncer se manifiesta claramente, todavía hay posibilidades de tratamiento y curación, pero los resultados son inciertos y la calidad de vida es diferente a la que se puede ofrecer si el diagnóstico y el tratamiento de la neoplasia se hacen en los periodos iniciales de la enfermedad (Alonso de Ruiz *et al.* 2000).

## **Tratamientos.**

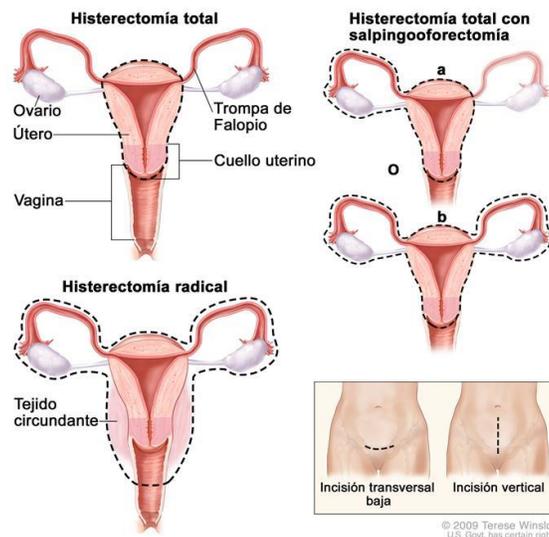
Hay diferentes tipos de tratamiento disponibles para las pacientes de cáncer de cuello uterino. Se usan tres tipos de tratamiento estándar:

### **Cirugía.**

Se pueden utilizar los siguientes procedimientos quirúrgicos (**Figura 8**) (National Cancer Institute 2013).

- Conización: procedimiento para extraer una porción de tejido en forma de cono del cuello y el canal uterino.
- Histerectomía total: cirugía para extirpar el útero, incluso el cuello del útero.
- Histerectomía radical: cirugía para extirpar el útero, el cuello uterino, parte de la vagina y un área amplia de ligamentos y tejidos que rodean estos órganos. También se pueden extirpar los ovarios, las trompas de Falopio o los ganglios linfáticos cercanos.

- Histerectomía radical modificada: cirugía para extirpar el útero, el cuello uterino, la parte superior de la vagina, y los ligamentos y tejidos que rodean estrechamente estos órganos. También se pueden extirpar los ganglios linfáticos cercanos.
- Salpingooforectomía bilateral: cirugía para extirpar ambos ovarios y ambas trompas de Falopio.
- Exenteración pélvica: cirugía para extirpar la parte inferior del colon, el recto y la vejiga. Se pueden extirpar el cuello uterino, la vagina, los ovarios y los ganglios linfáticos cercanos.
- Criocirugía: tratamiento para el que se usa un instrumento para congelar y destruir tejido anormal, como un carcinoma *in situ*.
- Cirugía láser: procedimiento quirúrgico para el que se usa un rayo láser para extirpar una lesión superficial como un tumor.
- Procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa (PEEA): tratamiento para el que se usa una corriente eléctrica que pasa a través de un bucle de alambre delgado, que se utiliza a manera de cuchillo para extirpar tejido anormal o cáncer.



**Fig. 8.** Histerectomía. Se extirpa quirúrgicamente el útero, con otros órganos o tejidos o sin estos (Obtenida de <http://www.cancer.gov/PublishedContent/MediaLinks/727183.html>).

## Radioterapia.

La base de la terapia de radiación es la interacción de la radiación ionizante (rayos X, rayos gamma o electrones) con los tejidos a nivel intracelular. Esta interacción depende de la energía creada por la producción de partículas cargadas secundarias, por lo general electrones, que pueden romper los enlaces químicos e infligir daño molecular (Missailidis 2007).

## Quimioterapia.

La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer para el que se utilizan medicamentos para interrumpir el crecimiento de células cancerosas, mediante su destrucción o evitando su multiplicación. Cuando la quimioterapia se administra oralmente o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y afectan las células cancerosas en todo

el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas en esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administra la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado (National Cancer Institute 2013).

Aunque inicialmente fueron diseñados para el tratamiento de pacientes con cánceres metastáticos, los medicamentos se utilizan ahora en algún momento durante el curso de la enfermedad de la mayoría de los pacientes con cáncer. Los fármacos citotóxicos curan algunos cánceres diseminados y son eficaces en la disminución del volumen del tumor, aliviando los síntomas, e incluso prolongando la vida en muchos otros tipos de cáncer metastático que no son curables (Chabner y Longo 2011).

### **Efectos secundarios.**

Los medicamentos utilizados con más frecuencia para tratar el cáncer de cuello uterino incluyen cisplatino, paclitaxel (Taxol®), topotecán, ifosfamida (Ifex®), y fluorouracilo (5-FU). Los medicamentos utilizados en la quimioterapia destruyen las células cancerosas, pero también dañan algunas células normales, lo que puede resultar en efectos secundarios.

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del tipo y dosis de los medicamentos administrados, así como del período de tiempo durante el cual se administran. Los efectos secundarios temporales de la quimioterapia pudieran incluir:

- Náuseas y vómitos.
- Falta de apetito.
- Caída del cabello.
- Llagas en la boca.

Como la quimioterapia puede dañar las células que producen sangre en la médula ósea, los recuentos de células sanguíneas pueden bajar. Esto puede resultar en:

- Aumento en la probabilidad de infecciones (debido a la escasez de glóbulos blancos).
- Pérdida de sangre o hematomas después de cortaduras o lesiones menores (debido a la escasez de plaquetas).
- Dificultad para respirar (por la disminución de los niveles de glóbulos rojos).

Los efectos secundarios comunes de la radioterapia incluyen cansancio, malestar estomacal o incontinencia intestinal. Algunas personas pueden experimentar náuseas, así como vómitos. Estos efectos secundarios tienden a empeorar cuando la quimioterapia se combina con radiación. La radiación también puede conducir a bajos recuentos sanguíneos, lo que causa anemia (bajos recuentos de glóbulos rojos) y leucopenia (bajos recuentos de glóbulos blancos). Un bajo recuento en el nivel de glóbulos blancos incrementa el riesgo de infecciones. También son comunes los cambios en la piel, pues la piel en el área tratada luce y se siente como si estuviera quemada por el sol.

La radioterapia pélvica puede causar que se forme tejido cicatricial en la vagina. El tejido cicatricial puede causar que la vagina sea más estrecha (estenosis vaginal) o incluso más corta, lo que ocasiona dolor durante la penetración vaginal.

La sequedad vaginal y el dolor durante las relaciones sexuales pueden ser efectos secundarios a largo plazo de la radiación. La radiación pélvica puede afectar a los ovarios, causando menopausia prematura. La radiación puede irritar la vejiga y puede ocasionar problemas para orinar. La radiación a la pelvis también puede debilitar los huesos, lo que causa fracturas. Las fracturas de cadera son las más comunes, y pueden ocurrir 2 a 4 años después de la radiación.

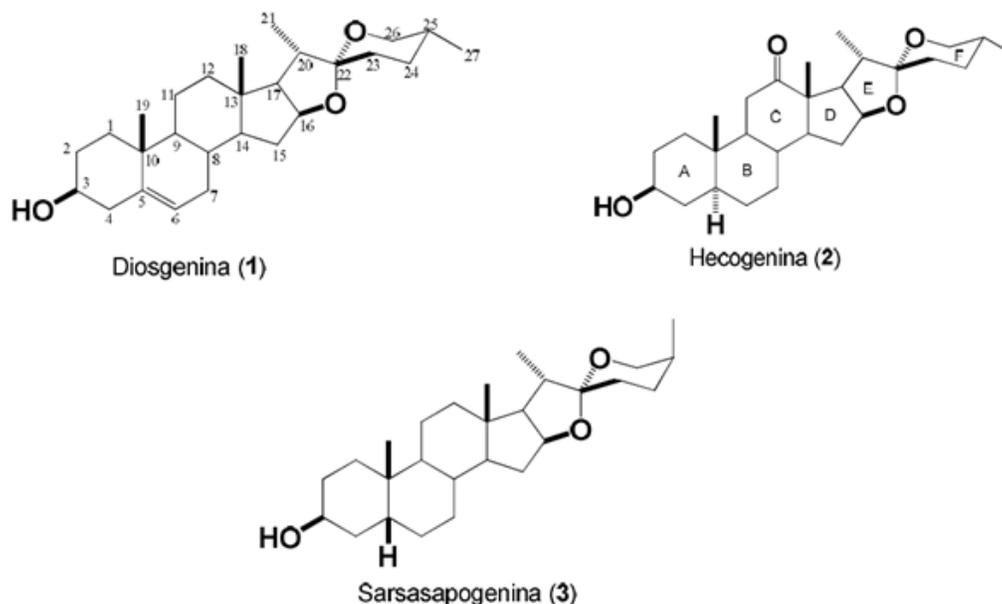
El tratamiento de los ganglios linfáticos con radiación puede derivar en problemas con el drenaje de líquido en las piernas. Esto puede causar inflamación grave en las piernas, una condición llamada linfedema.

Después de años de constante descubrimiento y desarrollo, en la actualidad se cuenta con una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos, que han sido ampliamente utilizados. Sin embargo, estas terapias se caracterizan por ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, costosas y generar efectos secundarios graves, es por esto, que es necesario seguir buscando nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer. Actualmente existe un fuerte interés en la búsqueda de fármacos con actividad antitumoral y especialmente los de origen vegetal o sus derivados sintéticos, ya que se han descrito que presentan actividad citotóxica, antiproliferativa e inductora de apoptosis, generando en ellos un potencial interés para ser evaluados como agentes antitumorales. Al respecto, se han sintetizado nuevos compuestos y también se han aislado productos de origen natural (American Cancer Society 2013), entre los que se encuentran a las saponinas esteroidales.

### **Saponinas y sapogeninas.**

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides se encuentran las saponinas, compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son metabolitos secundarios biosintéticos cuyos precursores son los esteroides, especialmente el colesterol, los cuales constituyen estructuralmente una clase diversa de productos naturales y son uno de los mejores componentes utilizados en la medicina tradicional (Liu *et al.* 2005).

Las sapogeninas por sí solas, son compuestos naturales de gran trascendencia debido a su utilidad en la preparación de diversos productos esteroidales biológicamente activos. En la década de los cuarentas, las sapogeninas (**Figura 9**) adquirieron gran relevancia por su uso en la síntesis de derivados pregnánicos como la diosgenina y la sarsasapogenina que fueron transformadas en progesterona. Por otro lado, la hecogenina se utilizó para la síntesis de corticosteroides como la cortisona y la betametasona.



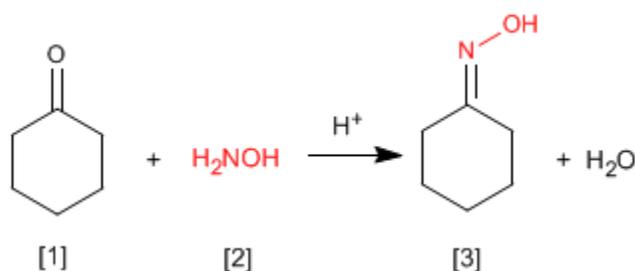
**Fig. 9.** Estructura química de saponinas; (1) Diosgenina, (2) Hecogenina y (3) Sarsasapogenina.

La diosgenina es una saponina esteroideal que fue aislada por primera vez en 1936 por Takeo Tsukamoto, a partir de *Dioscorea tokoro*. En la década de los cuarentas, Russell Marker encontró en México que la *Dioscorea composita*, conocida como barbasco, contiene de 7 a 9% de diosgenina.

Se ha demostrado que la diosgenina ejerce un efecto anticancerígeno contra una amplia variedad de células tumorales, incluyendo cáncer de mama, cáncer colorrectal, osteosarcoma y leucemia. Los efectos antitumorales de la diosgenina están mediados a través de la activación de p53, inmunomodulación, la detención del ciclo celular y la modulación de la actividad de la caspasa-3 (Kim *et al.* 2012). Debido a ello, se abrió un nuevo campo de estudio en el ámbito de las saponinas.

### Oximas.

Las oximas, son compuestos orgánicos que dentro de su estructura poseen átomos de nitrógeno y oxígeno de forma consecutiva (**Figura 10**). Las oximas [3] se obtienen por reacción de aldehídos o cetonas [1] e hidroxilamina [2] en un medio débilmente ácido (Química Orgánica 2008).



**Fig. 10.** Formación de una oxima (Obtenida de <http://www.quimicaorganica.org/aldehidos-y-cetonas/231-formacion-de-oximas.html>).

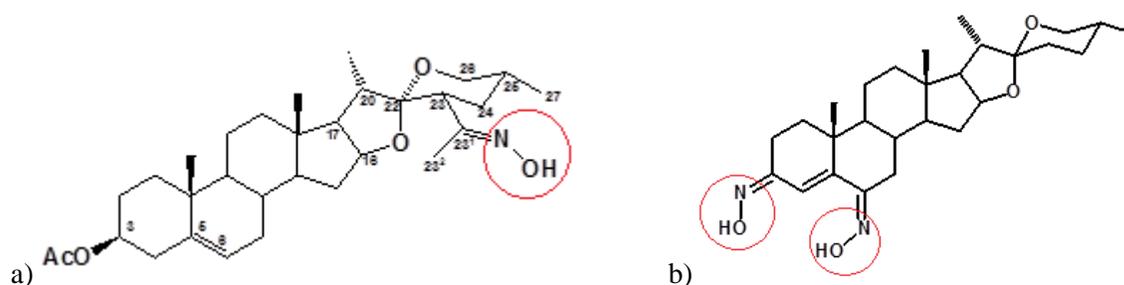
Este tipo de sustancias tienen amplias aplicaciones a nivel químico y biológico. La función oxima es un intermediario sintético importante ya que puede ser transformada en grupos orgánicos como carbonilo, amino, nitro y ciano; además, es utilizada como grupo protector y en la producción de compuestos heterocíclicos. Muchos compuestos que contienen un fragmento oxima exhiben diversas actividades biológicas entre las que se encuentran antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, anticancerígena y antiviral entre otras (Díaz *et al.* 2011).

Los derivados de oximas de quinolinas son ampliamente utilizados como agentes citotóxicos y antitumorales. Recientemente se ha demostrado que las oximas de piridina que contienen silicio tienen una alta citotoxicidad en HT-1080 (fibrosarcoma humano) y MG-22A (hepatoma de ratón) (Abele *et al.* 2003).

Estudios recientes han señalado que los derivados de compuestos naturales que contienen una oxima, muestran una gran actividad citotóxica. Un ejemplo es el radicol, que es un compuesto que carece de actividad antitumoral *in vivo* en modelos animales, pero derivados de oxima de radicol muestran una actividad antitumoral significativa *in vivo* e *in vitro* (Soga *et al.* 1999).

Otro ejemplo es el compuesto QO-1, que es un derivado de la Marcapina, un alcaloide con actividad citotóxica. Se ha demostrado que compuestos como QO-1 causan una inhibición del crecimiento dependiente de la concentración contra 19 de las 20 líneas celulares de cáncer, incluyendo las células HeLa y MCF-7. Por otro lado, QO-1 también fue probado en células no cancerosas, donde se demostró que las células Met-5A son resistentes a QO-1 incluso a altas concentraciones. Además, tanto en células HeLa y MCF-7, la expresión de Bax, conocida como una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, puede ser observada cuando se utilizan estos compuestos. Conjuntamente, se sabe que pueden activar caspasa-3/7 en células HeLa.

Se ha sugerido que la relación estructura-actividad de un compuesto con una oxima, podría desempeñar un papel importante para la actividad de estos (Sato *et al.* 2012). Como se muestra en la **figura 11**, los compuestos utilizados en este trabajo presentan uno o dos fragmentos oxima.



**Fig. 11.** Estructura de los compuestos utilizados para este trabajo, los fragmentos oxima se encuentran encerrados dentro de los círculos rojos. A) Oxima de la 23-acetildiosgenina B) Dioxima de la diosgenin-3,6-diona.

## **Planteamiento del problema.**

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cervical es el segundo cáncer más común en las mujeres, con un estimado de 530 000 nuevos casos cada año (OMS 2013). En México, las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres de 20 y más años en 2011 son por cáncer de mama (13.8%) y cervicouterino (10.4%) (INEGI 2013). No obstante el indiscutible éxito de las terapias convencionales aplicadas al cáncer (quimio y radioterapia), éstas resultan ser ineficientes en pacientes terminales o metastásicos, además de ser costosas y generar efectos colaterales graves debido a su acción citotóxica y baja o nula selectividad. Por ello, la búsqueda de fármacos con actividad antitumoral continua, teniendo especial relevancia en aquellos fármacos cuyo mecanismo de acción no está basado en la citotoxicidad, que son de fácil obtención o síntesis, con rendimientos altos y de bajo costo (Indumathy y Dass 2013). Recientemente se ha encontrado que algunos compuestos esteroidales tales como la Diosgenina inhiben la proliferación e inducen la apoptosis en una amplia variedad de células tumorales (Chen *et al.* 2011). Sin embargo, nuevos derivados de ésta como es el caso de la Oxima y Dioxima de la Diosgenina, aún se desconoce su actividad antitumoral, por lo que este trabajo tiene el propósito de evaluar la actividad antitumoral de estos compuestos.

## **Justificación.**

Los tumores malignos representan aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones.

A nivel mundial, los cinco tipos de cáncer más comunes en la mujer son, por orden de frecuencia, los de mama, pulmón, estómago, colon/recto y cuello del útero. En muchos países en desarrollo, el cáncer cervicouterino es el cáncer más común.

Al analizar los principales tumores malignos para mujeres por grupo de edad, se observa un incremento de las tasas de mortalidad. Para el caso del cáncer cervicouterino, pasa de 10 muertes por cada 100 mil mujeres de 40 a 49 años, a 30 de cada 100 mil de 65 a 74 años, hasta llegar a 55 en las mujeres adultas mayores de 80 años y más (INEGI 2013). Es por ello que se requiere de mayores avances en el estudio de esta enfermedad que permitan prevenir o curar de manera adecuada esta patología.

Actualmente se sabe que las sapogeninas como la diosgenina, presentan propiedades farmacológicas y se utilizan en el tratamiento de la hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, la diabetes y la hiperglucemia. Los informes publicados revelan que la diosgenina inhibe la proliferación e induce la apoptosis en una amplia variedad de células tumorales humanas, haciendo de ésta un campo de estudio con una aplicación terapéutica prometedora contra el cáncer (Das *et al.* 2011).

## **Hipótesis.**

Es conocido que las saponinas esteroideas tales como la diosgenina exhiben actividades anti-proliferativas y proapoptóticas en las células cancerosas *in vitro*, incluyendo el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el osteosarcoma y leucemia. De igual manera, se ha descrito que compuestos que contienen un fragmento oxima exhiben diversas actividades biológicas entre las que se destacan la de mejorar la actividad anticancerígena de dichos compuestos. Por ello, se espera que la Dioxima de la Diosgenina y la Oxima de la Diosgenina (derivados de la Diosgenina), mejoren la actividad antiproliferativa y citotóxica presente en la Diosgenina, evaluadas en líneas tumorales de cáncer cervicouterino.

## **Objetivo General.**

- Evaluar el efecto antiproliferativo y necrótico de las saponinas esteroideas Dioxima de la diosgenin-3,6-diona (Dioxima) y Oxima de la 23-acetildiosgenina (Oxima) en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo así como en células no tumorales.

## **Objetivos Particulares.**

- Desarrollar cultivos de las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo provenientes de CaCU así como cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana y fibroblastos humanos provenientes del cérvix.
- Determinar la actividad antiproliferativa de la Oxima y Dioxima de la Diosgenina, expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% del número celular (IC50), en cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo.
- Determinar la concentración requerida de los compuestos Dioxima y Oxima para inducir un decremento del 50% del número celular (IC50), en cultivos de células no tumorales provenientes de cérvix.
- Determinar la actividad necrótica de la Dioxima y Oxima mediante la incorporación celular de Ioduro de Propidio y a través de la detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales y no tumorales tratados con estos compuestos.
- Evaluar la expresión de la caspasa 3 activa mediante inmunodetección en cultivos de células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo como un indicador de muerte por apoptosis.

## **Material y método.**

### **Preparación del stock del compuesto**

Los compuestos Dioxima de la diosgenin-3,6-diona (Dioxima) y Oxima de la 23-acetildiosgenina (Oxima) fueron sintetizados por la Dra. Ma. Guadalupe Hernández Linares.

Los compuestos se prepararon a una concentración de 1000 µg de Dioxima en 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1000 µg de Oxima en 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO).

El DMSO, 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.

### **Cultivo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo.**

Con las líneas celulares de carcinoma epidermoide de cuello uterino: Hela, CaSki y ViBo, se establecieron cultivos celulares en cajas Petri de 100 mm de diámetro, con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; GIBCO, USA) con rojo fenol, suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) y NSC (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5%, desactivado previamente a 56°C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron incubados a 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se sembraron en cajas de 96 pozos (7500 células/pozo) bajo las mismas condiciones, las células fueron estimuladas a una concentración a la cual se disminuye la densidad celular en un 50%.

### **Cultivo de células no tumorales.**

Para establecer cultivos de células no tumorales, se utilizaron fibroblastos provenientes de cuello uterino; estos cultivos fueron sembrados en cajas Petri de 10 mm de diámetro, con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; GIBCO, USA) con rojo fenol, suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) y FBS (suero fetal bovino; GIBCO, USA) al 5%, desactivado previamente a 56°C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron incubados a 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se sembraron en cajas de 96 pozos (7500 células/pozo) bajo las mismas condiciones, las células fueron estimuladas a una concentración a la cual se disminuye la densidad celular en un 50%.

### **Proliferación de linfocitos humanos con fitohemaglutinina y detección con carboxifluoresceína (CSFE).**

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario y se colocaron (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) (un total de 4 tubos), se cubrió con aluminio y se centrifugó (centrifuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 µl se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente

el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendieron en 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 (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 ml, y se determinó el número celular utilizando la cámara de Neubauer.

Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10  $\mu$ l de carboxifluoresceína (12  $\mu$ M por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó en cada tubo cónico de plástico de 1.6 ml, la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de  $1 \times 10^6$  de células/ml de medio total.

Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de  $1 \times 10^6$  de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25  $\mu$ l/ml de fitohemaglutinina (Micro-Lab S.A., Méx.). Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS dos veces por separado, y 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

#### **Determinación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.**

La técnica para evaluar la proliferación celular consistió en sembrar y estimular a las células en las mismas condiciones del cultivo mencionadas anteriormente, transcurrido el tiempo de estímulo (24 horas), las células se fijaron durante 15 minutos con 50  $\mu$ l por pozo de glutaraldehído al 1.1% (SIGMA-Aldric, USA); posteriormente las placas fueron lavadas y secadas al aire. Se añadieron 50  $\mu$ l/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA-Aldric, USA) pH 6.0 y se mantuvieron durante 15 minutos en agitación constante.

Después de la tinción, las cajas de cultivo fueron lavadas tres veces con agua desionizada o bidestilada de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos.

Posteriormente se añadieron 50  $\mu$ l de ácido acético al 10% y se dejaron en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente, esto para desteñir las células y procurar que el colorante quedara en suspensión de forma homogénea. Finalmente se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 590 nm, y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al control.

Para calcular el porcentaje de proliferación celular, los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2010.

#### **Determinación de citotoxicidad basado en la actividad de LDH.**

En placas de 96 pozos (Corning, USA), se sembraron 7, 500 células por pozo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo con 100  $\mu$ L de medio RPMI al 5% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se agregaron las IC50 correspondientes. Fueron considerados: Control basal (únicamente medio de cultivo), Control negativo (células con medio y suero al 5%), Control positivo (células con medio y Tritón X-100 al 1 %,) y vehículo, utilizando la misma cantidad de DMSO utilizada para la IC50 mas alta, y una muestra por cada una de las IC50. Se efectuó el tratamiento con la IC50 para cada una de las líneas celulares. Una hora antes de cumplir las 24 horas de estímulo, se agregó tritón X-100 al 1 % al control positivo. Cumplidas las 24 horas se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos en tubos cónicos de plástico de 600  $\mu$ l y se centrifugó a 2,000 rpm. El medio se colocó en una placa de 96 pozos, 50  $\mu$ l por pozo, y se le agregaron 50  $\mu$ l de mezcla de reacción del Kit de evaluación de citotoxicidad por LDH (Colorante 11.25 ml más catalizador 250  $\mu$ l Bio-Vision). Se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la obscuridad, y finalmente el ensayo fue evaluado en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 490 nm.

Para calcular el porcentaje de citotoxicidad los datos arrojados por el espectrofotómetro fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2010. Obteniendo gráficos, que mostraron el efecto citotóxico del compuesto sobre la población celular.

#### **Ensayo de citotoxicidad por incorporación celular de yoduro de propidio (IP) en células tumorales.**

Fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células tumorales/pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con la IC50 de Dioxima y Oxima 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 DMSO en una concentración de 10  $\mu$ l/ml de RPMI-1640 a 5 % de NCS 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 3  $\mu$ l de una solución de yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, USA) (200 mg/l) a los tratamientos y las células positivas al IP fueron determinadas por citometría de flujo (marca FACSAria II) previamente calibrado con células negativas al IP y los datos obtenidos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

#### **Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.**

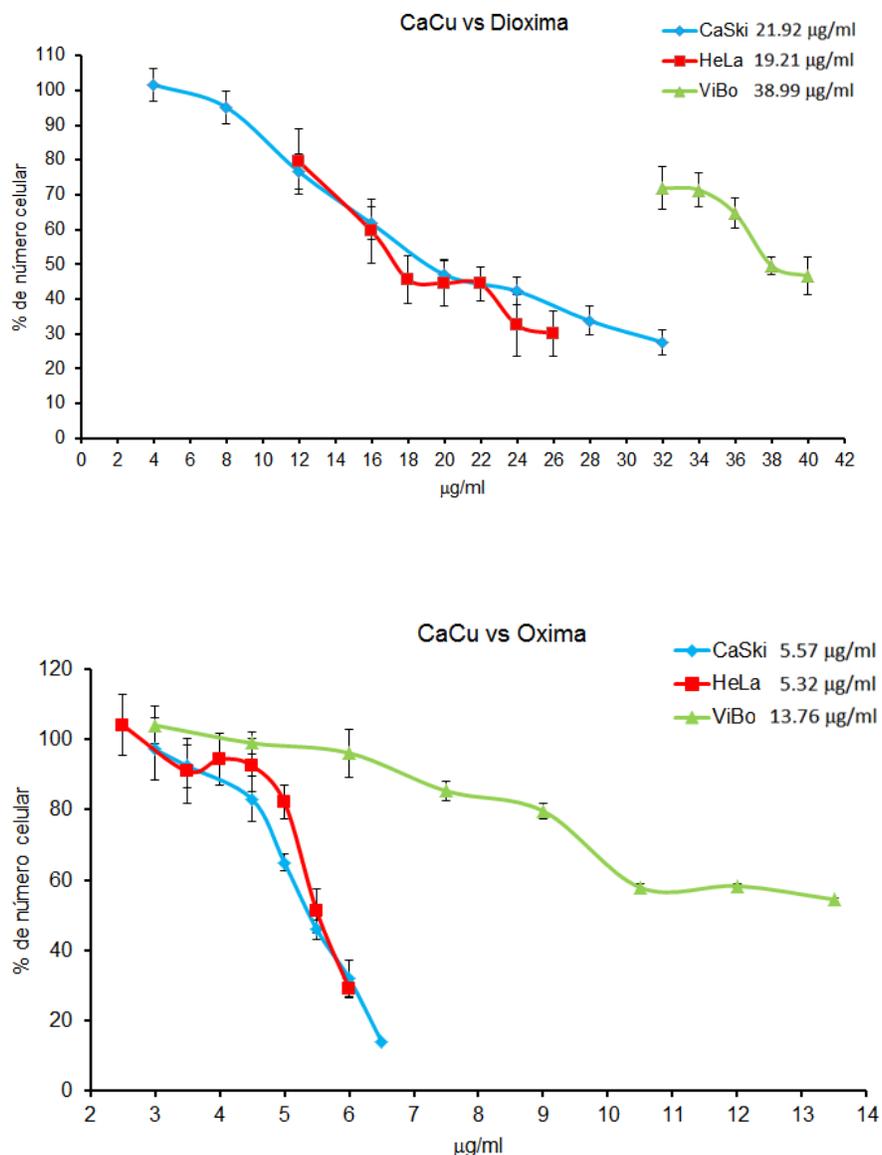
Fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCU, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de NCS. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con la IC50 de Dioxima y Oxima con medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS, durante 24 h y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo, el procedimiento se detalla de la siguiente manera: las células fueron cosechadas y fijadas a las 24 horas de cultivo, con etanol al

70% en agua destilada durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3. Inmediatamente después fue adicionado el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa; anticuerpo producido en conejo (SIGMA) 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), mantenido en oscuridad durante 3 horas, se lavaron las muestras 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

## Resultados.

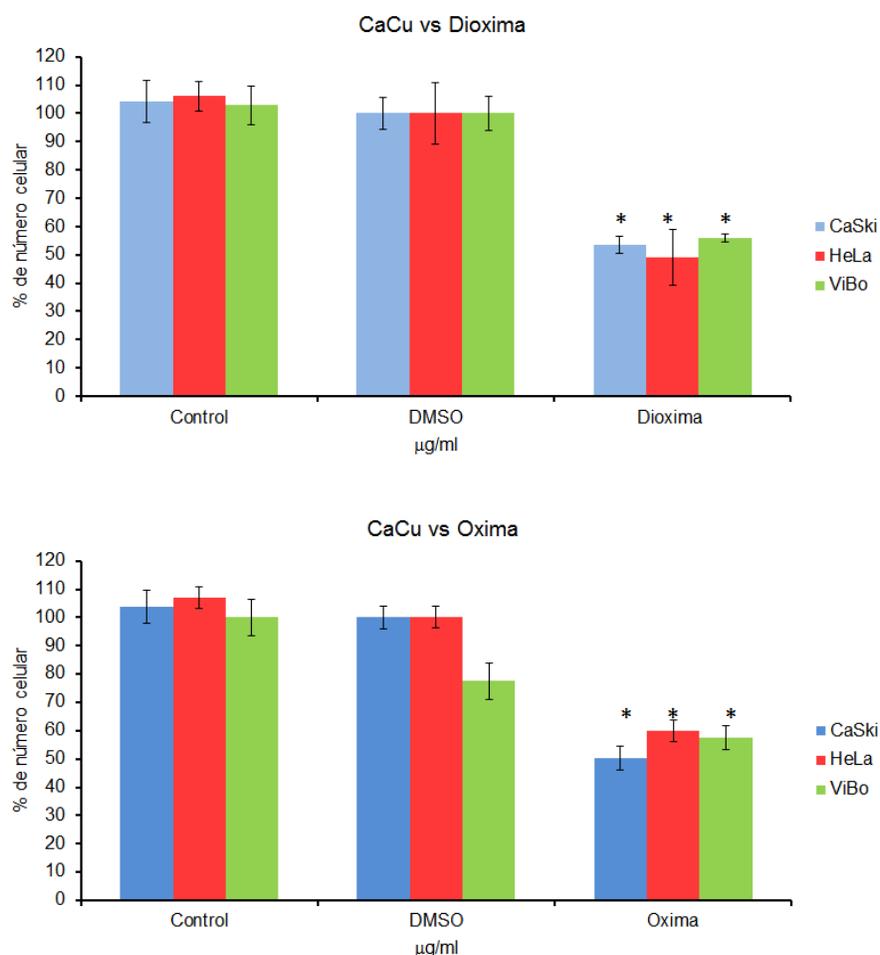
### Actividad antiproliferativa de la dioxima y oxima de la diosgenina en células tumorales

Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de la Dioxima de la diosgenin-3,6-diona (Dioxima) y la Oxima de la 23-acetildiosgenina (Oxima) sobre el potencial proliferativo de las células provenientes de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, cultivos de las tres líneas de CaCu fueron tratadas con diferentes concentraciones de los esteroides y la concentración en la cual decae el número celular en un 50% (IC50) fue calculada (**Fig. 12**).



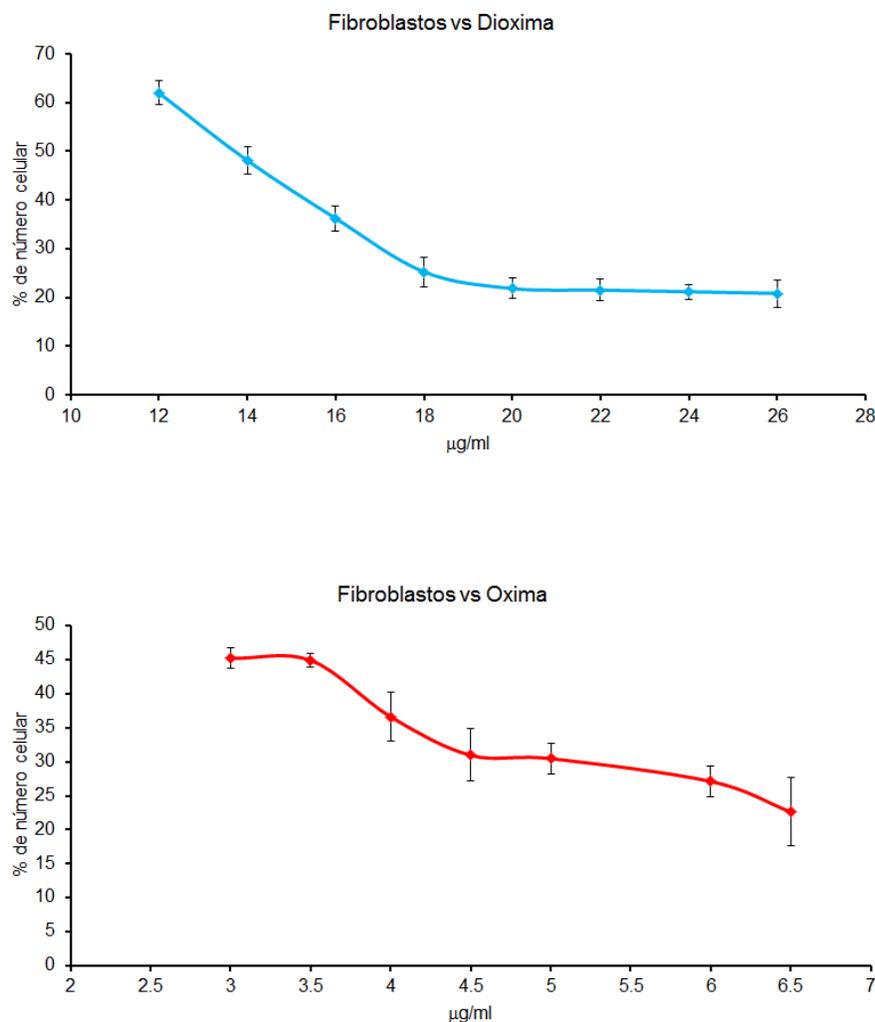
**Fig. 12.** Efecto antiproliferativo de la Dioxima y Oxima en cultivos de células tumorales de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Los resultados obtenidos en la figura 12, establecen que la Dioxima y la Oxima afectan el potencial proliferativo de las células tumorales de una manera dependiente de la dosis, obteniendo una IC50 calculada para la Dioxima de 19, 21 y 39  $\mu\text{g/ml}$  en las células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, mientras que para la Oxima fue de 5.5, 5.3 y 13.75  $\mu\text{g/ml}$  para las células HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. Con la intención de confirmar las IC50 calculadas, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de IC50 obtenidas para la Dioxima y la Oxima y el número celular fue cuantificado por la técnica de cristal violeta (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Confirmación del efecto antiproliferativo de la Dioxima y Oxima en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo tratadas con las IC50's correspondientes para cada línea celular. Los datos mostraron diferencia significativa. \* $p < 0.05$  vs DMSO (ANDEVA).

Como se muestra en la figura 13, las IC50 calculadas para la Dioxima y la Oxima en las líneas tumorales de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo fueron confirmadas, mostrando la reproducibilidad de la respuesta de las células tumorales a la Dioxima y Oxima. No obstante estos resultados, es importante evaluar la actividad antiproliferativa presente en la Dioxima y la Oxima en células no tumorales, por lo que cultivos de células fibroblásticas provenientes del cérvix humano fueron tratadas con diferentes concentraciones de ambos esteroides y el número celular fue cuantificado por la técnica de tinción con el colorante cristal violeta a las 56 h (**Fig.14**).

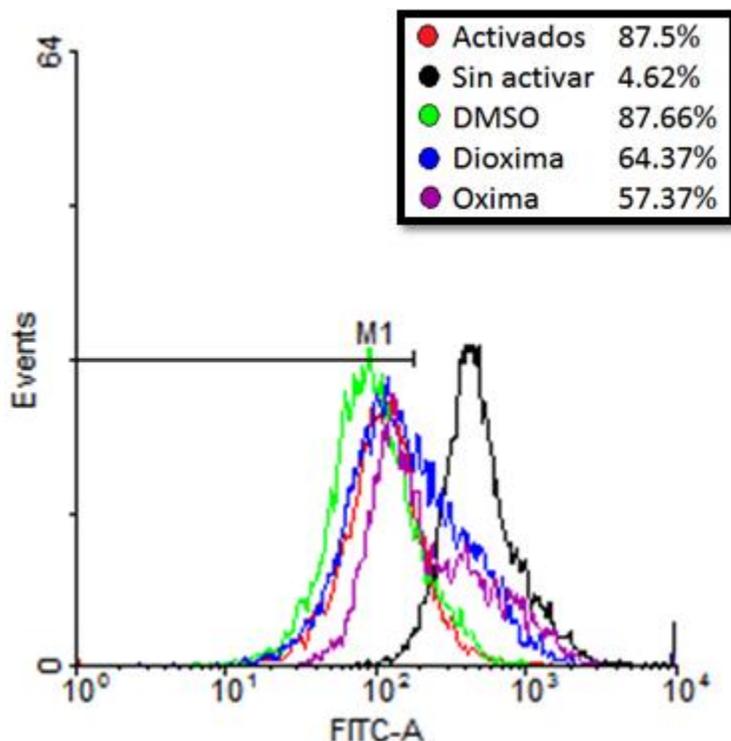


**Fig.14.** Efecto de la Dioxima y Oxima en el potencial proliferativo de células no tumorales.

Los resultados obtenidos en la figura 13 muestran que la Dioxima y la Oxima afectan el potencial proliferativo de las células fibroblásticas de una manera dependiente de la dosis, con una IC50 de 13.8 µg/ml para la Dioxima y de 2.1 µg/ml para la Oxima.

**Actividad antiproliferativa en células linfocíticas humanas no tumorales.**

Con la intención de establecer sí la Dioxima y Oxima afectan el potencial proliferativo de células no tumorales como parámetro comparativo, los cultivos de células linfocíticas humanas fueron marcados con carboxifluoresceína (CSFE) y tratados con las concentraciones más altas obtenidas (39 y 13.5 µg/ml respectivamente) durante 72 h y el porcentaje de proliferación celular fue determinado por citometría de flujo (**Fig. 15**). Los resultados obtenidos indican que los linfocitos tratados con DMSO proliferaron 87.66 %, mientras que las células tratadas con las IC50 de Dioxima y Oxima se encuentran en un 64.37 y 57.37% de proliferación respectivamente.

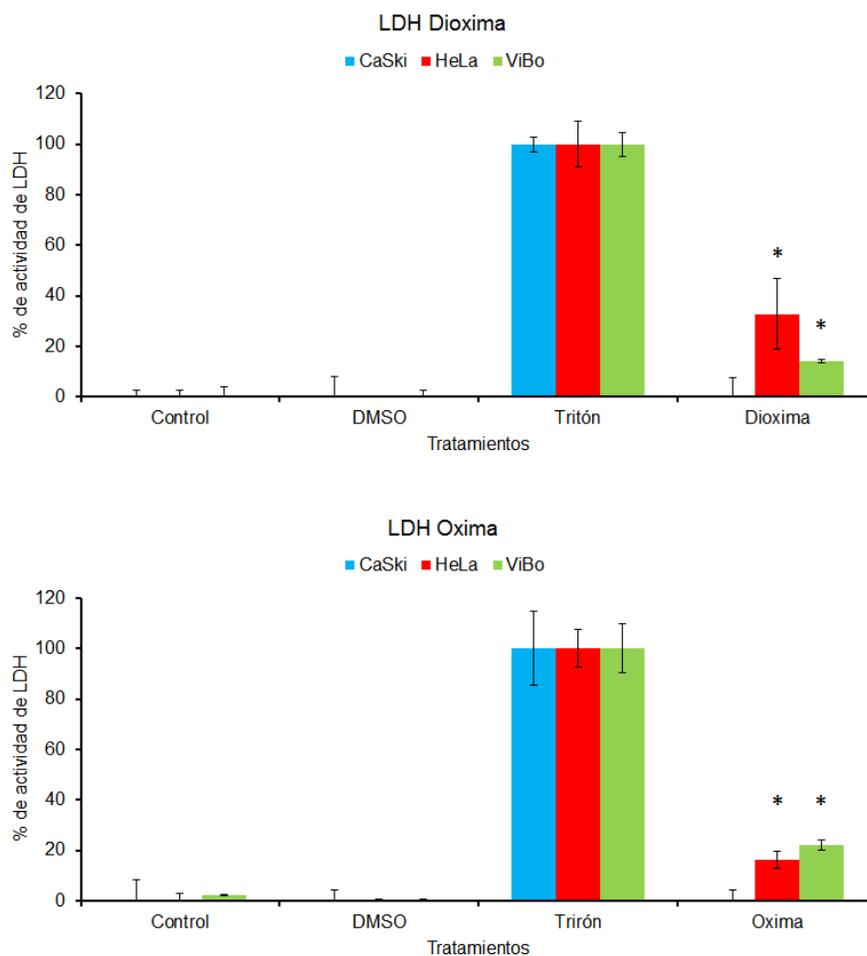


**Fig. 15.** Efecto de la Dioxima y Oxima en el potencial proliferativo de linfocitos humanos no tumorales. Los cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína (CSFE) y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo. La proliferación de linfocitos humanos no tumorales resultó afectada en un 26% para Dioxima, mientras que para Oxima fue de 34%.

### Citotoxicidad en células tumorales (Necrosis)

El decremento en el número celular observado en los cultivos tratados con la Dioxima y la Oxima en las células tumorales, puede ser causado por un efecto citotóxico de ambos esteroides. Con la finalidad de establecer si los esteroides presentan actividad citotóxica en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con el respectivo esteroide a las concentraciones de IC50 obtenidas y la incorporación celular de yoduro de propidio así como la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos fueron evaluados y tomados como dos parámetros de muerte necrótica. (**Fig. 16 y 17**).

Fig. 16



**Fig. 16.** Actividad de LDH en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con la Dioxima y Oxima a sus IC50 correspondientes. Los datos que mostraron una diferencia significativa están indicados con un (\*),  $p < 0.05$  vs DMSO (ANDEVA).

Los resultados obtenidos en la figura 16 establecen que la Dioxima y la Oxima no presentan actividad citotóxica significativa en las células CaSki, mientras que en las células HeLa se presentó una actividad citotóxica de la Dioxima de 32 %, mientras que de la Oxima fue de 16 % y para ViBo la actividad citotóxica de la Dioxima fue de 15%, mientras que con la Oxima fue de 25 %.

## Incorporación de Ioduro de Propidio.

Fig. 17

	Positivo (%)	DMSO (%)	Dioxima (%)
<b>CaSki</b>	93.4	4.9	20.6
<b>HeLa</b>	99	28.6	15.3
<b>ViBo</b>	87.6	2.1	6.7

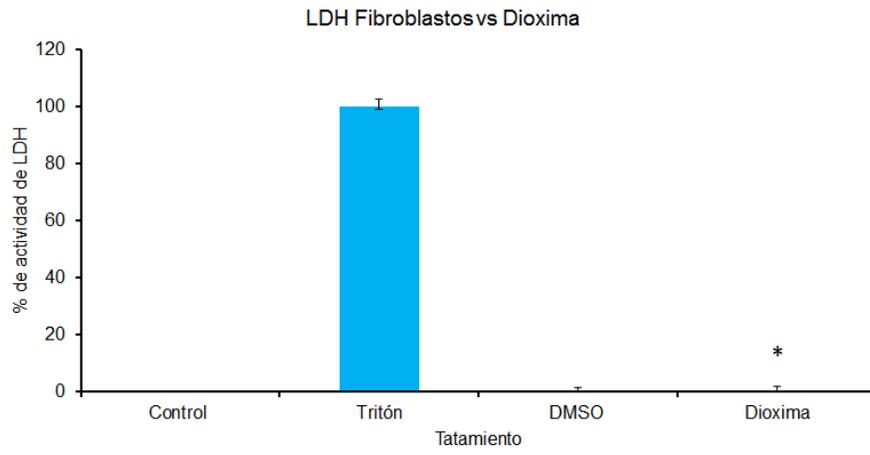
	Positivo (%)	DMSO (%)	Oxima (%)
<b>CaSki</b>	99.60	17.50	12.80
<b>HeLa</b>	99	28.6	26.6
<b>ViBo</b>	87.6	2.1	8.70

**Fig. 17.** Incorporación celular de Ioduro de Propidio (IP) por las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con la Dioxima y Oxima a la concentración de la IC50 correspondiente para cada línea tumoral, el DMSO se utilizó como control mientras que el Etanol se utilizó como control positivo.

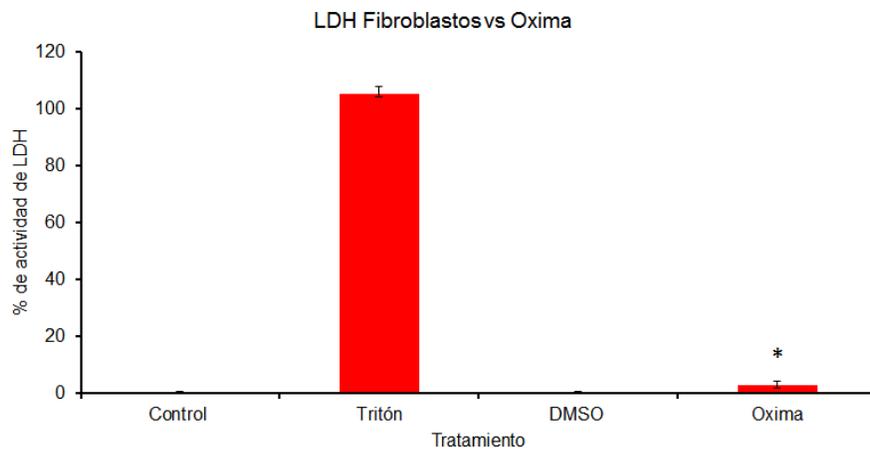
Como se puede observar en las figuras 16 y 17, la actividad citotóxica relativamente es nula o baja (menor del 20%) en los cultivos de células tumorales, sugiriendo que el decremento en el número celular observado puede ser generado por una muerte diferente a la necrosis.

Con la intención de establecer si la Oxima y la Dioxima inducen citotoxicidad (necrosis) en células no tumorales, cultivos de células fibroblásticas y linfocíticas fueron tratadas con diferentes concentraciones de los esteroides y la actividad de la LDH fue determinada a las 56 h para los fibroblastos y a las 72 h para los linfocitos. (**Fig. 18 (a) (b) (c) (d)**).

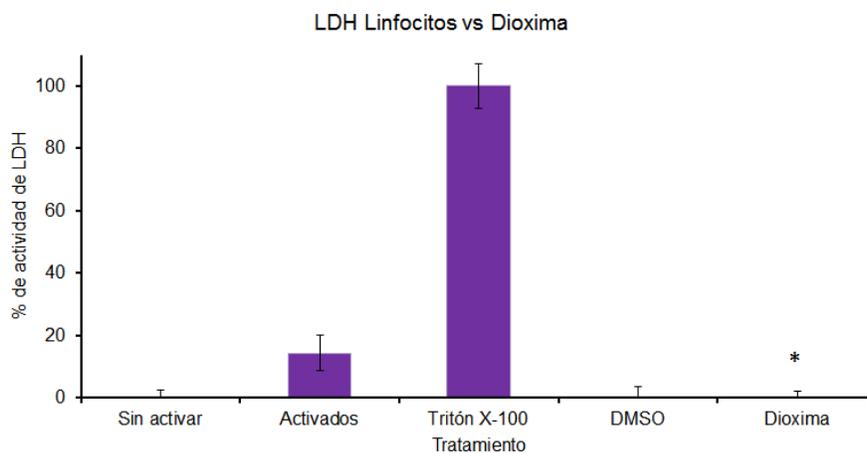
Fig. 18



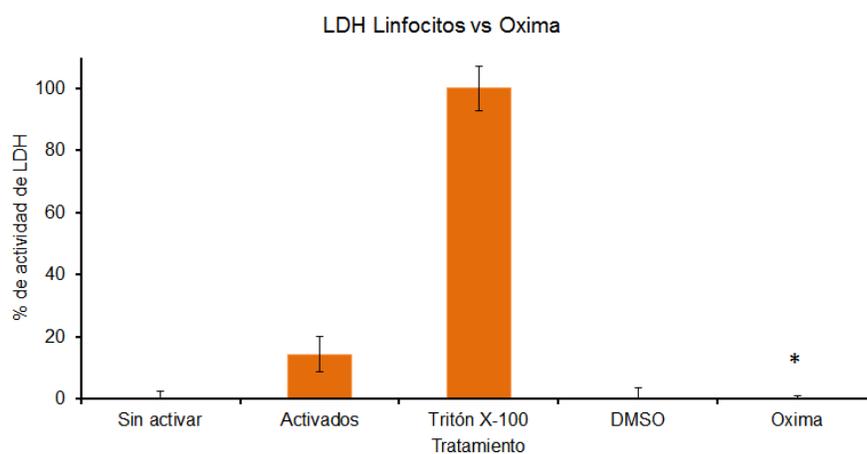
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 18.** Fibroblastos tratados con una IC50 de 13.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la Dioxima (a) y de 3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para la Oxima. (b) Linfocitos tratados con las IC50 más altas obtenidas para las células tumorales, para dioxima 39  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (c) y 5.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para Oxima (d). Los datos mostraron diferencia significativa. \* $p < 0.05$  vs DMSO (ANDEVA).

Los resultados obtenidos en la figuras 17 y 18 establecen que la Dioxima y la Oxima no presentan actividad citotóxica significativa en las células no tumorales.

En base a que los resultados que establecen que tanto la Dioxima como la Oxima no generan un porcentaje de muerte por necrosis muy alto tanto en célula tumorales como en no tumorales, el decremento celular observado en los cultivos tratados con los esteroides puede ser debido a un mecanismo diferente a la necrosis, por ello, se procedió a evaluar si estos compuestos son capaces de inducir a las células tumorales a una muerte por apoptosis. Para ello, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con la Dioxima y Oxima a sus respectivas IC50 y la expresión de la caspasa 3 activa fue evaluada por citometría de flujo (**Fig. 19 a y b**).

	Control (%)	DMSO (%)	Dioxima (%)
<b>CaSki</b>	2.4	9.2	27.8
<b>HeLa</b>	19.6	15.7	55.1
<b>ViBo</b>	1.5	4.1	9

(a)

	Control (%)	DMSO (%)	Oxima (%)
<b>CaSki</b>	2.4	9.2	19.5
<b>HeLa</b>	8.7	21.4	28.5
<b>ViBo</b>	7.6	0.6	4

(b)

**Figura 19.** Detección de caspasa 3 activa correspondientes a las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo estimuladas con la Dioxima (a) y Oxima (b) a sus concentraciones de IC50 respectivas.

Como se puede observar en la figura 19, tanto la Dioxima así como la Oxima inducen a las células HeLa y CaSki a expresar la caspasa 3 activa, sugiriendo que ambos esteroides inducen a estas células a una muerte por apoptosis. Sin embargo, con respecto a las células ViBo, ambos esteroides no inducen a estas células a una muerte apoptótica, sugiriendo que el decremento observado en esta línea celular puede ser debido a un mecanismo diferente a la necrosis y apoptosis.

## Discusión de resultados.

El cáncer es una carga constante y mayor en la población humana. Como la evidencia epidemiológica muestra, el tratamiento actual del cáncer con quimioterapia y cirugía son menos que óptimas, por lo que se requiere más investigación para analizar fármacos alternativos que albergan menos efectos secundarios que los medicamentos actuales utilizados en la quimioterapia (Indumathy y Dass 2013) Por lo tanto, se necesita urgentemente la investigación y desarrollo de nuevos fármacos con resultados terapéuticos prometedores y menores efectos secundarios.

Hoy en día, cada vez más, los investigadores se están centrando en los productos naturales. Algunos productos naturales incluyendo vinorelbina, taxol, camptotecina, vinblastina y vincristina extraído de hierbas medicinales se han utilizado ampliamente para el tratamiento de tumores, y han sido reconocidos en todo el mundo como eficaces agentes anti-cáncer (Lv *et al.* 2013). La diosgenina ha demostrado que ejerce un efecto anticancerígeno contra una amplia variedad de células tumorales, incluyendo el cáncer de mama, cáncer colorrectal, el osteosarcoma y leucemia.

Las oximas, son compuestos orgánicos que dentro de su estructura poseen átomos de nitrógeno y oxígeno de forma consecutiva. Muchos compuestos que contienen un fragmento oxima exhiben diversas actividades biológicas entre las que se encuentran antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, anticancerígena y antiviral entre otras (Díaz *et al.* 2011).

Los derivados de oximas de quinolinas son ampliamente utilizados como agentes citotóxicos y antitumorales. Recientemente se ha demostrado que las oximas de piridina que contienen silicio tienen una alta citotoxicidad en HT-1080 (fibrosarcoma humano) y MG-22A (hepatoma de ratón) (Abele *et al.* 2003). Estudios recientes han señalado que los derivados de compuestos naturales que contienen una oxima, muestran una gran actividad citotóxica (Soga *et al.* 1999).

Estudios recientes reportan que la hecogenina presenta actividad antiproliferativa en células de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo (Fernández *et al.*, 2009), la diosgenina en células CaSki y la dioscina en células HeLa (Matthew *et al.*, 2008), las cuales ejercen su efecto antiproliferativo en un rango de concentraciones que van de 29 a 45  $\mu\text{g/ml}$ . En el presente trabajo, se utilizó la diosgenina, a la cual se le adicionó una oxima en el carbono 23 y dos oximas, una en el carbono 3 y otra en el carbono 6 para generar dos nuevos compuestos. Nuestros resultados muestran que la Dioxima y Oxima son capaces de inhibir la proliferación de células de cáncer cérvico-uterino CaSki, HeLa, y ViBo, con IC<sub>50</sub> de 21.92, 19.21 y 39  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente en el caso de la Dioxima, mientras que para la Oxima las IC<sub>50</sub> son 5.57, 5.32 y 13.76  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Como se puede observar, a excepción de las células ViBo con Dioxima donde la IC<sub>50</sub> fue de 39  $\mu\text{g/ml}$ , los resultados indican que la Dioxima es el doble potente y la Oxima es de 5.2 a 8 veces más potente que la diosgenina. Esta mejoría se puede deber a la presencia de los fragmentos Oxima, que podrían estar potenciando el efectos antiproliferativo de la diosgenina.

Es importante mencionar, que los compuestos utilizados para el tratamiento del cáncer cérvico-uterino en la quimioterapia pueden generar necrosis, y se le atribuye a esta citotoxicidad la generación de efectos secundarios graves en el paciente. Un resultado interesante en nuestro trabajo es que tanto la Dioxima como la Oxima presentaron una actividad citotóxica baja para el caso de las células tumorales, donde el mayor porcentaje observado de actividad necrótica fue de 32 % con las pruebas de LDH y 26.6% en las pruebas de incorporación de Ioduro de Propidio. En contraste, los resultados obtenidos para las células fibroblásticas y linfocíticas no tumorales son más favorables ya que para el caso de los linfocitos, no se presentó actividad citotóxica y para los fibroblastos, el porcentaje más alto observado fue de solo 2.89 %. Esto le confiere a la Dioxima y Oxima una ventaja, la cual puede ser útil ya que además de ser propuesta como un agente antitumoral, éstas generarían efectos secundarios mínimos.

Por otra parte, estudio recientes han demostrado que la diosgenina inhibe la proliferación e induce la apoptosis en células tumorales. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que controla el desarrollo normal y la homeostasis en los organismos. La pérdida de control de apoptosis contribuye a la supervivencia de las células tumorales, por lo tanto, la mejora de la apoptosis en las células del cáncer es un enfoque de control de cáncer por medio de agentes anticancerígenos inductores de apoptosis.

A nivel bioquímico, la apoptosis está mediada por la activación de una clase de proteasas de cisteína llamadas caspasas. En células de mamíferos, la activación de caspasas se produce ya sea a través de la activación del receptor de muerte o permeabilización de la membrana mitocondrial, sin embargo, ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3, que provoca la muerte celular.

En nuestro trabajo, se demostró que tanto la Dioxima y la Oxima indujeron a las células a una muerte por medio de la apoptosis en el caso de las células CaSki y HeLa, resultado que se observó mediante la activación de la caspasa 3, sin embargo, para células ViBo, la activación de la caspasa 3 fue mínima, implicando que podría existir otro tipo de muerte celular u otra forma de regular la proliferación de estas células. Estos resultados son de gran importancia ya que la apoptosis es un tipo de muerte silenciosa, donde las células son eliminadas sin generar un proceso de inflamación como ocurre con la mayoría de los fármacos antitumorales actuales.

El hecho de encontrar que la Dioxima y la Oxima son compuestos con actividad antiproliferativa, no citotóxicos, inductores de apoptosis con acción selectiva, los hace fuertes candidatos para ser evaluados en modelos In Vivo, con la intención de proponerlos como agentes con potencial terapéutico contra el cáncer.

## **Conclusiones.**

Los compuestos Dioxima de la diosgenin-3,6-diona y Oxima de la 23-acetildiosgenina presentan actividad antiproliferativa en cultivos de las líneas de CaCU CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la dosis con unas IC50s de 21.82  $\mu\text{g/ml}$ , 19.21  $\mu\text{g/ml}$  y 39  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente para Dioxima de la diosgenin-3,6-diona, mientras que para la Oxima de la 23-acetildiosgenina, es de 5.32  $\mu\text{g/ml}$  para CaSki y 5.57  $\mu\text{g/ml}$  para HeLa y 13.75  $\mu\text{g/ml}$  ViBo.

La Dioxima de la diosgenin-3,6-diona y la Oxima de la 23-acetildiosgenina presentan baja o nula actividad citotóxica en células CaSki y Hela, mientras que en células ViBo, el porcentaje observado fue de 15% para Dioxima y 25% para Oxima.

La Dioxima de la diosgenin-3,6-diona y la Oxima de la 23-acetildiosgenina inducen la expresión de la caspasa 3 activa de manera significativa.

La Dioxima de la diosgenin-3,6-diona y la Oxima de la 23-acetildiosgenina no presentan actividad citotóxica en células linfocíticas de sangre periférica ni en fibroblastos de cérvix humano.

## Referencias.

1. ABELE, E., ABELE, R., LUKEVICS, E. Pyridine oximes: synthesis, reactions, and biological activity. (review), *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. (2003). 39 (7). p. 825 - 865.
2. ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. The Cell Division Cycle. En: *Essential Cell Biology*. Tercera Edición. Estados Unidos de América: Garland Science Taylor & Francis Group. (2010). p. 611.
3. ALBERTS, B., LEWIS, J.; ROBERTS, K.; BRAY, D.; RAFF, M. WATSON, J. Los mecanismos de la división celular. En: *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Barcelona: Omega. (2002). p. 980-983.
4. ALONSO DE RUIZ, P., LAZCANO, E. C., HERNANDEZ, M., Carcinoma invasor. En: ALONSO DE RUIZ, P. *Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, Prevención y Control*. México: Editorial Médica Panamericana. (2000). p. 83
5. American Cancer Society. Consulta virtual de datos. Tratamientos contra el cáncer de cuello uterino. Fecha de última revisión: 01/17/2013. Consultada el 16 de marzo de 2013. <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-treating-radiation>
6. BECKER, W., KLEINSMITH, L., HARDIN, J. Ciclo celular, replicación del DNA y mitosis. En: BERTONI, G. *El Mundo de la Célula*. Sexta Edición. Madrid: Pearson Educación. (2007). p. 605.
7. BEREK, J. S., HACKER, N. F., Cáncer cervical. En: BEREK, J. S., HACKER, N. F. *Oncología Ginecológica*. Quinta Edición. España: Lippincott Williams & Wilkins. (2012). p. 341.
8. BURK R. D., CHEN Z., VAN DOORSLAER K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics* (2009) 12(5-6). p. 281-290.
9. CHAABANE, W., USER, S. D., EL-GAZZAH, M., JAKSIK, R., SAJJADI, E., RZESZOWSKA-WOLNY, J., ŁOS, M. J. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2013) 61. p. 43-58.
10. CHABNER, B. A., LONGO, D. A., *Basic Principles of Cancer Treatment. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Quinta Edición. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. (2011). p. 5.
11. CHEN, P., SHIH, Y., HUANG, H., CHENG, H. Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. *PLoS One*.(2011) 6 (5).
12. COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. Cancer. En: *The cell: A molecular Approach*. Cuarta Edición. Estados Unidos de América. ASM Press. (2007). p. 723
13. DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D., *Cáncer En: Biología Celular y Molecular*. Segunda Edición. Barcelona: Ediciones Omega. (1993). p. 1028.
14. DAS S., DEY K. K., DEY G., PAL I., MAJUMDER A., MAITICHOUDHURY S., KUNDU S. C., MANDAL M. Antineoplastic and Apoptotic Potential of Traditional

- Medicines Thymoquinone and Diosgenin in Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. (2012) 7(10).
15. DIAZ, J., DURÁN, N, ROBLES, J., LOAIZA, A. Síntesis y evaluación “in vitro” de la actividad antifúngica de oximas, éteres de oxima e isoxazoles. *Univ. Sci.* (2011) 16 (3).
  16. FERNÁNDEZ, M. A., SANDOVAL, R. J., LÓPEZ, M. H., SÁNCHEZ, L. Formation of the steroidal 3 $\beta$ -hydroxy-6-oxo-moiety. Synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin. *General Papers ARKIVOC XIII*, (2009). p. 170-184.
  17. GALLUZZI L., VITALE I., ABRAMS J. M., ALNEMRI E. S., BAEHRECKE E. H., BLAGOSKLONNY M. V. et al. Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* (2012) 19(1). p. 107-120.
  18. GEORGAKILAS, A. G., MOSLEY, W. G., GEORGAKILA, S., ZIECH, D., PANAYIOTIDIS, M. I. Viral-induced Human Carcinogenesis: an Oxidative Stress Perspective. *Mol Biosyst.* (2010) 6(7). p.1162-1172
  19. GOLDSBY, R. A., KINDT, T. J., OSBORNE, B. A., KUBY, J., Maduración, activación y diferenciación de la célula T. En: *Inmunología*. Quinta Edición. México: McGraw-Hill Interamericana. (2006). p. 255.
  20. HELT A., FUNK J. O., GALLOWAY D. A., Inactivation of both the Retinoblastoma Tumor Suppressor and p21 by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Is Necessary To Inhibit Cell Cycle Arrest in Human Epithelial Cells. *J Virol.* (2002) 76(20). p. 10559-10568.
  21. HOFMANN T. G., WILL H. Body Language: The Function of PML Nuclear Bodies in Apoptosis Regulation. *Cell Death Differ.* (2003) 10(12). p. 290-299.
  22. INDUMATHY, S., DASS, C. R. Finding Chemo: the Search for Marine-based Pharmaceutical Drugs Active Against Cancer. *J Pharm Pharmacol.*(2013) 65(9). p. 1280-1301
  23. INEGI. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 1 de abril del 2014. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
  24. JIMÉNEZ L. F., MERCHANT H., Muerte Celular Programada. En: CASTRO, S., COVARRUBIAS, L., *Biología Celular y Molecular*. México: Pearson Educación. (2003). p. 617.
  25. JO H., KIM J. W., Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Ther.* (2005) 3. p. 419-434.
  26. KARP, G., Reproducción Celular. En: *Biología Celular y Molecular: Conceptos y Experimentos*. México: Mc Graw Hill. (2010). p. 560.
  27. KIM, D. S., JEON, B. K., LEE, Y. E., WOO, W. H., MUN, Y. J. Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. *Evid-Based Compl Alt.* (2012). p. 1-8.
  28. LEWIN, B., CASSIMERIS, L., LINGAPPA, V. R., PLOPPER, G. Cancer—Principles and Overview. En: *Cells*. Estados Unidos de América: Jones and Bartlett. (2007). p. 592
  29. LIU, L., NAM, S., TIAN, Y., YANG, F., WU, J., WANG, Y., SCUTO, A., POLYCHRONOPOULOS, P., PROKOPIOS, SKALTSOUNIS, L., JOVE, R. 6-Bromindirubin-3'-oxime Inhibits JAK/STAT3 Signaling and Induces Apoptosis of Human Melanoma Cells. *Cancer Res.* (2011). 71(11). p. 3972–3979.

30. LIU, M. J., WANG, Z., JU, Y., WONG, R. N., WU, Q. Y. Diosgenin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Leukemia K562 Cells with the Disruption of Ca<sup>2+</sup> Homeostasis. *Cancer Chemoth Pharm.* (2005) 55(1). p. 79-90.
31. LODISH, H. BERK, A. MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; LAWRENCE, S.; DARNELL, J. Interacciones celulares en el desarrollo. En: *Biología Celular y Molecular*. Quinta edición. Buenos Aires. Medica Panamericana. (2003). p.1045.
32. LV L., ZHENG L., DONG D., XU L., YIN L., XU Y., QI Y., HAN X. Y PENG J. Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: A potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme. *Food Chem Toxicol.* (2013) 59. p.657-669
33. MAO Z., TANG Q., ZHANG C., QIN Z., PANG B., WEI P., LIU B., CHOU Y. Anti-Proliferation and Anti-Invasion Effects of Diosgenin on Gastric Cancer BGC-823 Cells with HIF-1 $\alpha$  shRNAs. *Int J Mol Sci.* (2012) 13(5). p. 6521-6533.
34. MATTHEW, J. TASSOTTOB, K. M., TH'NGA, J., JIANGA, Z. Synthesis and cytotoxic activity of diosgenyl saponin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* (2008) 6. p. 3209–3217.
35. MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E., MUNGER K. Viruses Associated with Human Cancer. *Biochim Biophys.* (2008) 1782(3). p. 127–150.
36. MISSAILIDIS, S., Tumour Imaging and Therapy. En: PERKINS, A., C. *The Cancer Clock*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd. (2007). p. 150.
37. MULWARE, S. J. Trace Elements and Carcinogenicity: a Subject in Review. *Biotech.* (2013) 3. p.85–96.
38. MURRAY, A., HUNT, T., Cells and the Cell Cycle. En: *The Cell Cycle an Introduction*. Estados Unidos de América. Oxford University Press. (1993). p. 5
39. National Cancer Institute. Aspectos generales de las opciones de tratamiento. Fecha de actualización: 01/03/2013. Consultada el 16 de marzo de 2013. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/Patient/page4#Keypoint17>
40. OMS. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad 2011. Consultada el 1 de abril del 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/#>
41. PARK, M., LEE, S. Cell Cycle and Cancer. *J Biochem Mol Biol.* (2006) 36 (1). p. 60-65.
42. POLLARD, T. D., EARNSHAW, W. C., Programmed Cell Death. En: *Cell Biology*. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders. (2002). p. 780.
43. PROPPER, G., The Birth and Death of Cells. En: *Principles of Cell Biology*. Estados Unidos de América: Jones and Bartlett. (2013). p. 438.
44. RABINOVICH, G. A. Tolerancia Inmunológica y Autoinmunidad. En: *Inmunopatología molecular: Nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica*. Médica Panamericana. (2004). p. 460
45. SATO, H., YAMADA, R., YANAGIHARA, M., OKUZAWA, H., IWATA, H., KUROSAWA, A., ICHINOMIYA, S., SUZUKI, R., OKABE, H., YANO, T., KUMAMOTO, T., SUZUKI, N., ISHIKAWA, T., UENO, K. New 2-Aryl-1,4-naphthoquinone-1-oxime Methyl Ether Compound Induces Microtubule Depolymerization and Subsequent Apoptosis. *J Pharmacol Sci.* (2012) 118(4). p. 467-478.
46. SAVADA, D. E., Cell Cycle. En: *Cell Biology Organelle Structure and Function*. Estados Unidos de América: Jones and Bartlett. (1993). p. 443.

47. SOGA, S., NECKERS, L. M., SCHULTE, T. W., SHIOTSU Y., AKASAKA, K., NARUMI H., AGATSUMA T., IKUINA, Y., MURAKATA, C., TAMAOKI, T., AKINAGA, S. KF25706, A Novel Oxime Derivative of Radicicol, Exhibits *in Vivo* Antitumor Activity via Selective Depletion of Hsp90 Binding Signaling Molecules. *Cancer Res.* 1999 Jun 15;59(12):2931-8
48. TSUJIMOTO, Y. Apoptosis and Necrosis: Intracellular ATP Level as a Determinant for Cell Death Modes. *Cell Death Differ.* (1997) 4. p.429 – 434.
49. VANLANGENAKKER N., VANDEN BERGHE T., VANDENABEELE P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.* (2012) 19(1). p 75-86.
50. WEINBERG, R. A., *The Nature of Cancer En: The Biology of Cancer Estados Unidos de America: Garland Science Taylor & Francis Group.* (2007). p. 27-32
51. YIN, X., DONG, Z. The Mitochondrial Apoptosis Pathway. En: ANTONSSON, B. *Essentials of Apoptosis. A Guide for Basic and Clinical Research.* Totowa, New Jersey: Humana Press. (2003). p. 85.
52. ZHANG E., TANG X., Human Papillomavirus Type 16/18 Oncoproteins: Potential Therapeutic Targets in Non-smoking Associated Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer P.* (2012) 13(11). p. 5363-5369.
53. Química orgánica. Consulta virtual de datos. Formación de oximas. Fecha de última revisión: 07/28/2013. Consultada el 16 de marzo de 2013. <http://www.quimicaorganica.org/aldehidos-y-cetonas/231-formacion-de-oximas.html>

## Apéndice

### 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).

### Composición del RPMI-1640 (Microlab, Méx.)

Los medios nutritivos para cultivo de células animales contienen de manera balanceada los nutrimentos mínimos requeridos para la proliferación celular, tales como los siguientes:

Componente	g/L
<b>Sales Inorgánicas</b>	
Nitrato de Calcio tetrahidratado - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.1
Sulfato de Magnesio Anhídrido - $\text{SO}_4\text{Mg}$	0.4884
Cloruro de Potasio - KCl	0.4
Cloruro de Sodio - NaCl	6
Fosfato de Sodio Dibásico (Anhídrido) - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.8
<b>Aminoácidos</b>	
L-Arginina	0.2
L-Asparagina	0.05
L-Ácido Aspártico	0.02
L-Cisteína *2HCl	0.0652
L-Ácido Glutámico	0.02
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
L-Hidroxiprolina	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 <sub>2</sub> O	0.02883
L-Valina	0.02
<b>Vitaminas</b>	
D-Biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Ácido Fólico	0.001
<i>Myo</i> -Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Ácido p-Aminobenzoico	0.001
Ácido D-Pantetonico (hemicálcica)	0.00025
Piridoxina *HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina *HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
<b>Otros</b>	
D-Glucosa	2
Glutación (reducido)	0.001

Rojo Fenol *Na	0.0053
<b>Adicionado</b>	
L-Glutamina	0.3

### Medio de cultivo

Para 1 L de medio de cultivo, se agrega 10.34 g de medio RPMI-1640 y 2 g de Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA) que es disuelto en 1 L de Agua bidestilada. Con la finalidad de evitar el crecimiento de microorganismos, los medios nutritivos deben ser suplementados con antibióticos; en este caso fue agregado 1mg/ml de antibiótico Pengesod: bencilpenicilina (In vitro, Méx.). El pH es ajustado a 7.2-7.2 con Ácido clorhídrico (HCl; Sigma-Aldrich, USA) 10 Normal o Hidróxido de sodio (NaOH; Sigma-Aldrich, USA) al 1 %. Finalmente es esterilizado por la técnica de filtrado al vacío a través de una membrana (Millipore) con poro de 22  $\mu\text{m}$  y se almacena a 4°C.

### 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 (NaCl)	8.00 g (Sigma-Aldrich, USA)
Cloruro de potasio (KCl)	0.20 g (Sigma-Aldrich, USA)
Fosfato mono ácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	2.16 g (Sigma-Aldrich, USA)
Fosfato di ácido de potasio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.20 g (Sigma-Aldrich, USA)

El cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato mono ácido de sodio y el fosfato di ácido de potasio son disueltos en 100 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 8 Normal y se afora finalmente a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana con diámetro de poro de 22  $\mu\text{m}$ , la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

### Verseno

Esta solución es necesaria para el desprendimiento de las células tumorales adherentes (HeLa y CaSki) y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

Tris base [ $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ]	3.04 g (Sigma-Aldrich, USA)
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 g (Sigma-Aldrich, USA)
Cloruro de potasio (KCl)	0.04 g (Sigma-Aldrich, USA)
Etilendiamino Tetraacético (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )	0.40 g (Sigma-Aldrich, USA)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada; el pH se ajusta a 7.7 con ácido clorhídrico (HCl) 10 Normal y se afora en un volumen de 1000 ml con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

### **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.

### **Colorante Cristal Violeta**

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % (m/v) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM a pH 6.0. Su preparación consiste en agregar 3.96 g de hidróxido de sodio (NaOH; Sigma-Aldrich, USA) 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, USA) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57°C durante 30 minutos. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml para su mejor uso y manipulación.

### **Glutaraldehído (1.1%)**

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada. Finalmente es almacenado 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 (preparado al momento), para disolverlo se calentó la solución a temperatura no mayor a 60°C, si rebasa esta temperatura el paraformaldehído polimeriza y la solución no funciona para fijar.