



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

**Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina-3-
glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino:
HeLa, CaSki y ViBo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

BIOLÓGO

P R E S E N T A:

Martínez Mata Sergio Iván

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2013

A mi madre:

Porque este logro también le pertenece, recompensa de todos los sacrificios, el esfuerzo y todo el amor

A mis hermanos,

Diana y Vero, compañeras de vida y mis mejores amigas,

Mario por el apoyo y amor que nos brinda

A mis amigas (os):

Elena qpc, Mireya, Ana, Sarahi, Leti, Angeles, Lirio, Vero, Claudia, Jorge, Viry, Mauricio, Moy, gracias por los momentos inolvidables, las aventuras y todas las risas que recordare por siempre...

A la Familia Villalbazo Esquivel:

Angel, que ha sido un gran amigo y a quien aprecio como a un padre, Zulma y a toda la familia que me han brindado apoyo, cariño y confianza

A todas aquellas personas que en algún momento de mi vida influyeron para alcanzar este logro: Carlos Rodríguez Rivera, Vicente Godínez Bautista...

Índice

Resumen.....	5
Marco teórico.....	6
Ciclo celular.....	7
Muerte celular.....	10
Necrosis.....	10
Apoptosis.....	11
Cáncer.....	16
Cáncer Cervicouterino.....	17
Tratamientos.....	19
Saponinas.....	20
Planteamiento del Problema.....	24
Justificación.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Método.....	28
Resultados.....	33
Discusión.....	48
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52
Apéndice.....	56

Resumen

El cáncer se caracteriza por la autosuficiencia de factores de crecimiento, insensibilidad a las señales muerte, evasión de la muerte celular por apoptosis, potencial de replicación ilimitado, la invasión de tejidos y metástasis. Con cada uno de estos cambios fisiológicos la célula adquiere nuevas capacidades durante el desarrollo del tumor lo cual propicia el desarrollo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). En particular, el Cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y en México. En el mundo, se producen 529,000 nuevos casos de cáncer invasor cada año. El 86 % de estos casos y el 88 % de las muertes ocurren en países en desarrollo (OMS 2013). Es por ello que las investigaciones básicas orientadas hacia la búsqueda de terapias alternativas, se han enfocado principalmente al estudio de compuestos de origen vegetal. Tal es el caso de las saponinas esteroideas como la Diosgenina y Dioscina, para las cuales ya se tienen reportados efectos citotóxicos, antiproliferativos e inductores de apoptosis en diferentes líneas de cáncer. Sin embargo existen pocos estudios sobre la actividad biológica de las saponinas sobre líneas de CaCu. El efecto antiproliferativo de la Diosgenina-3-glu (β -D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo) en las líneas de CaCu: CaSki, HeLa y ViBo fue llevado a cabo por la técnica de tinción con cristal violeta, mientras que para las células linfocíticas, su proliferación fue evaluada mediante el marcaje con carboxifluoresceína cuantificada por citometría de flujo. La muerte por necrosis fue determinada mediante dos pruebas, incorporación de Yoduro de propidio (IP) y la prueba de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadante de cultivos tratados con el esteroide. La muerte apoptótica fue evaluada mediante la detección de la fragmentación del DNA determinada por la técnica de TUNEL y la inmunolocalización de la caspasa 3 activa. La Diosgenina-3-glu presentó un efecto antiproliferativo de manera dosis-dependiente en las células tumorales de CaCu: HeLa CaSki y ViBo con una IC₅₀ de 22.56, 24.85 y 14.19 μ g/ml respectivamente, no obstante en células linfocíticas (no tumorales), su efecto fue mucho menor, inhibiendo la proliferación de estas en un 20 %. El esteroide no indujo necrosis ni en células tumorales ni en células linfocíticas, sin embargo indujo la muerte por apoptosis en células tumorales. El fitoesteroide Diosgenina-3-glu presenta actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células tumorales sin afectar significativamente a células no tumorales, sugiriendo que este esteroide presenta una acción selectiva y que podría ser evaluado como un agente con potencial terapéutico.

Marco teórico

Por definición la célula es la unidad más pequeña capaz de manifestar las propiedades del ser vivo. Sintetiza la mayoría de sus constituyentes, utilizando elementos del medio extracelular, crece y se multiplica. Está limitada por la membrana plasmática, que encierra un cierto número de orgánulos. La célula eucariota, contiene un núcleo, orgánulo limitado por una envoltura que encierra el material genético. Las células eucariotas poseen además del núcleo, varios orgánulos característicos y específicos: Retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias, endosomas, lisosomas, peroxisomas, citoesqueleto y centrosoma (Figura 1) (Maillet, 2003).

La región de la célula que se extiende entre la membrana plasmática y el núcleo es el citoplasma, que está compuesto del citosol (fase acuosa) y los organelos. Los eucariotas comprenden todos los miembros de los reinos animal y vegetal, incluidos los hongos, los cuales existen tanto en formas multicelulares, como en formas unicelulares, y protozoos. Las células eucariotas miden unos 10-100 μm (Lodish *et al.*, 2005). Las células regulan su proliferación, mediante una serie de eventos que en conjunto son denominados: Ciclo celular.

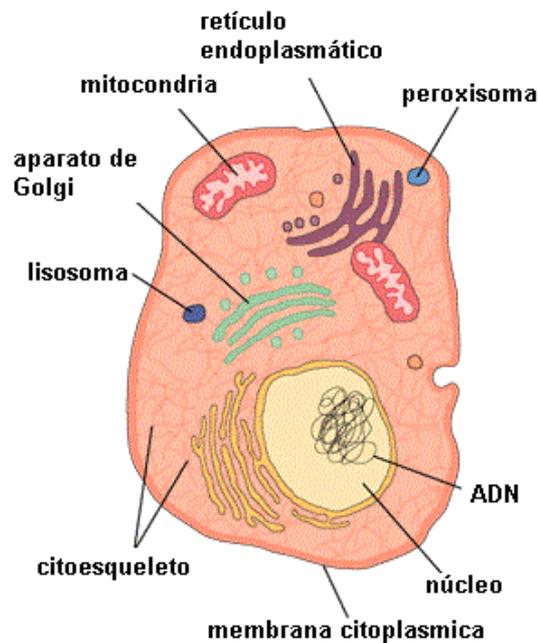


Figura 1.-Características principales de células eucariotas (Tomado y modificado de: <http://neetescuela.com/wp-content/uploads/2011/01/Diferencias-entre-las-celulas-eucariotas-y-procariotas-300x169.gif>; Consultada: 02 Dic 2012).

Ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de eventos que van desde el nacimiento y el crecimiento hasta la división de una célula cualquiera (López y Lizano, 2006). Las células duplican y transmiten la información contenida en su material genético (ADN) generación tras generación a través del ciclo celular (Figura 2) (Alberts *et al.*, 2006). El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto (Burgués *et al.*, 2005).

Las células de un organismo pluricelular deben ser controladas de forma que se dividan solo cuando el organismo necesita otras células, ya sea para permitir el crecimiento de los tejidos o reponer las células perdidas. En consecuencia para que una célula animal se divida o crezca no es suficiente la presencia de nutrientes, sino también las señales químicas provenientes de otras células, generalmente las células vecinas. La mayoría de las moléculas de señalización extracelular que afectan la división, el crecimiento y la supervivencia celulares son proteínas solubles secretadas por otras células o proteínas unidas a la superficie de otras células o a la matriz extracelular. Aunque la mayoría de ellas actúa positivamente para estimular uno o más de estos procesos celulares (Alberts *et al.*, 2006).

En el pasado, utilizando únicamente el microscopio óptico, los científicos dividieron el ciclo celular en dos periodos. Uno, de elevada actividad de reorganización y movimiento de los componentes subcelulares, denominado: Mitosis, en el que los cromosomas se condensan haciéndose visibles al microscopio óptico y que finaliza con los procesos de segregación y división celular. Además un segundo que comprende la mayor parte del ciclo celular, denominado: Interfase, por transcurrir entre dos mitosis y en el que al microscopio óptico no se observa proceso activo alguno salvo el incremento en el tamaño celular. Hoy sabemos que la interfase no es un periodo de reposo sino que por el contrario es un periodo de gran actividad, durante el que se llevan a cabo en una secuencia ordenada complicados y elaborados preparativos para la división celular (Calzada *et al.*, 2000).

Aunque podría parecer que ciclo y división celular son términos intercambiables, en sentido estricto no lo son. Definido en forma sencilla, el ciclo celular es el conjunto de procesos que ocurren ordenadamente y por medio de los cuales una célula crece y se divide, dando lugar a dos células hijas. Durante la división celular, o mitosis, una célula genera dos células hijas, en una acción que, no obstante su grandiosa espectacularidad, tan sólo es una de las cuatro partes del ciclo celular, la llamada fase M. Se dice que una célula eucarionte que no está en mitosis se encuentra en interfase. Observada al microscopio, una célula en interfase parecería estar inactiva, pues muestra el núcleo y el citoplasma bien definidos y el aspecto estable característico de su estirpe celular. En general, una célula eucariota pasa la mayor parte de su tiempo en este estado de aparente inactividad. Sin embargo, tal apariencia es totalmente engañosa, pues es justo durante la interfase cuando las células están preparándose para la mitosis (López, 2002).

El ciclo celular se encuentra dividido en cuatro fases morfológicamente no muy bien diferenciadas pero molecularmente bien delimitadas y en el siguiente orden secuencial: G1, S, G2 y M. Las fases G1y G2 (gap o intervalo) implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte la fase S (Síntesis) consiste en la replicación del ADN para heredar a cada célula hija la misma carga genética. Y la fase M (Mitosis) o de división celular como su nombre lo indica es la división de todo el material celular para originar dos células hijas, dependiendo de su estirpe celular o de las condiciones de su ambiente, puede iniciar los preparativos para una nueva división o bien quedarse en un estado de quiescencia que suele denominarse fase G0. Coloquialmente se dice que las células en fase G0 se "han salido" del ciclo celular, pues aunque permanecen viables y funcionales, han dejado de dividirse. Ejemplos de células en estado G0 son los hepatocitos y las neuronas del adulto, o bien las levaduras (hongos unicelulares) cuando crecen en medios carentes de los nutrimentos suficientes para llevar a cabo la división (Figura 2) (López, 2002; Alberts *et al.*, 2006).

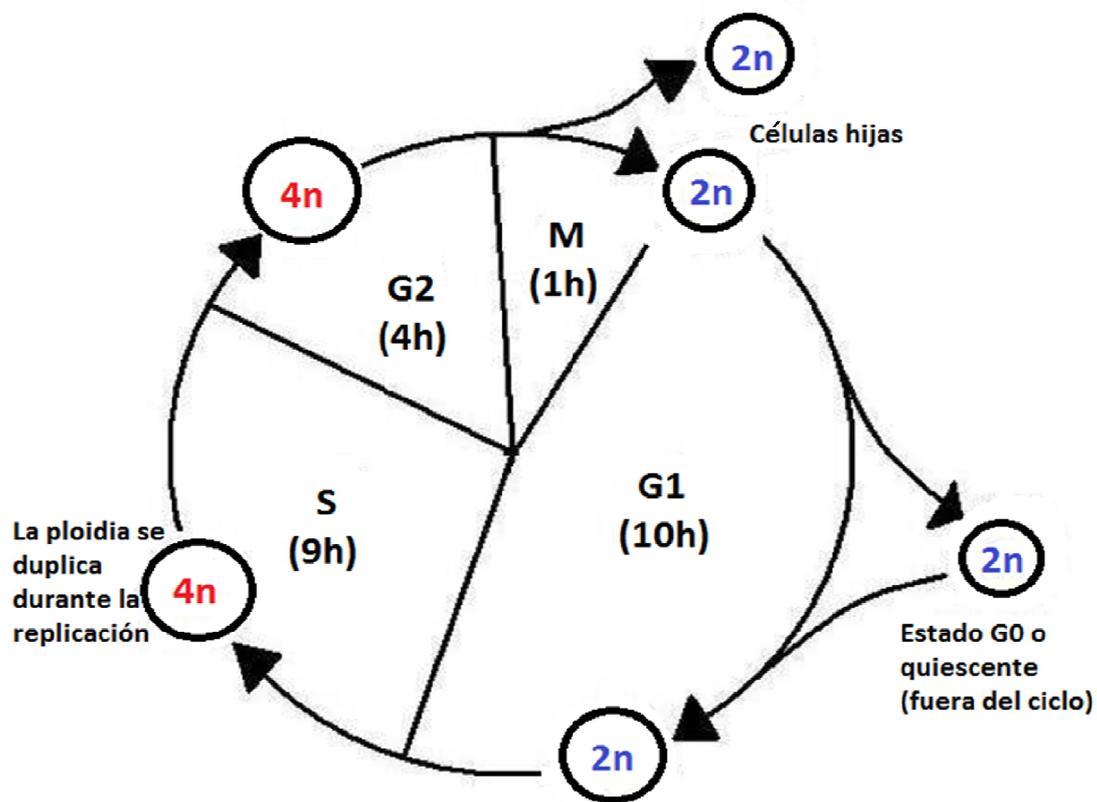


Figura 2.- Ciclo celular en 24 h (Tomado y modificado de Quezada, 2007).

El tránsito por estas cuatro fases del ciclo celular está dirigido por una red de interacción de proteínas altamente compleja y finamente regulada. De entre estas proteínas se destacan las Cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las ciclinas (Kim y Zhao, 2005), otras cinasas (CDK7, Wee1, Myt1), fosfatasa (cdc25A, B y C), y proteínas inhibitoras (CKI) (Quezada, 2007).

Existe un punto de restricción que se encuentra casi al final de G1, se conoce así puesto que si la célula lo pasa se encuentra “comprometida” irreversiblemente a entrar al ciclo celular, independientemente de lo que suceda en el exterior. Es muy importante entender, que este punto está principalmente controlado por el medio y depende de su capacidad de inducción, para que la célula se comprometa a completar el ciclo celular (Figura 3) (Alberts *et al.*, 2006).

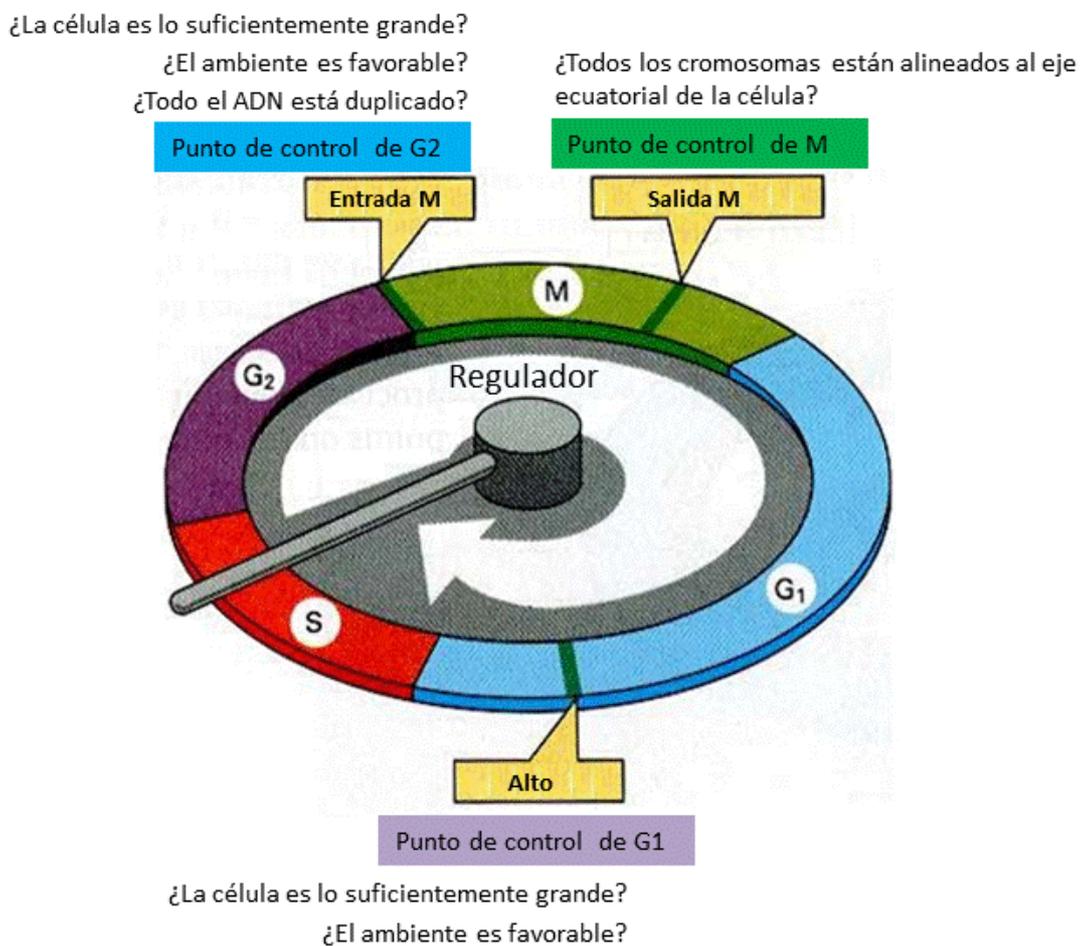


Figura 3.- El primer punto de control, se encuentra aún en G1. En general podríamos decir que el primer control se encarga de: Revisar las condiciones del medio, buscando factores externos que induzcan el progreso del ciclo celular, Revisar que la célula haya crecido lo suficiente y que el material genético esté intacto. El segundo punto de control se encuentra al final de G2 se encarga de revisar que el material genético se haya duplicado completamente, que el material genético no tenga errores y que el medio extracelular sea adecuado. Este último punto de control se encuentra en la fase M, entre la metafase y la anafase. Se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico (Tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2006).

Como ocurre en muchos otros procesos celulares para que el ciclo celular se ponga en marcha es necesaria la presencia de un estímulo que la célula sea capaz de interpretar a través de sus receptores para así poder encender la maquinaria molecular del ciclo. A este proceso se le conoce como transducción de señales y es mediado por complejos proteicos de funciones específicas denominados transducisomas. Aquellas proteínas que constituyen el estímulo o señal extracelular que le indica a una célula que entre en proliferación, son conocidas como factores de crecimiento. Estos factores (llamadas por algunos autores "citocinas") son producidos naturalmente por el organismo y en ocasiones su actividad no solo se limita a inducir la proliferación sino también la diferenciación celular (Quezada, 2007).

Existen además otros actores importantes para el control del ciclo celular y que también requieren ser regulados. Los inhibidores de CDK (CKI), son proteínas supresoras de tumor que bloquean la actividad de los complejos CDK/ciclinas detienen a la célula en fases específicas del ciclo celular dependiendo donde se encuentre el complejo cinasa inhibido. Algunos CKI son estimulados por senescencia celular, inhibición por contacto o diferenciación terminal (Burdon *et al.*, 2002).

Muerte celular

Las células de un organismo pluricelular son miembros de una comunidad muy organizada. La cantidad de células que componen esta comunidad está regulada, en forma estricta no solo por el control de la velocidad de división celular, sino también por el control de muerte celular. Las células que ya no son necesarias son eliminadas mediante la activación de un programa de muerte intracelular. En consecuencia este proceso se denomina muerte celular programada, aunque con mayor frecuencia también se le designa con el nombre de apoptosis. En otros casos las células mueren cuando las estructuras que han constituido dejan de ser necesarias. Las células que mueren como resultado de una lesión aguda, en general aumentan de volumen y estallan, lo cual implica que su contenido se derrama sobre las células vecinas, este proceso se conoce como necrosis celular (Alberts *et al.*, 2006). La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo, por lo que su estudio es primordial (De Toro, 2006).

Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular, diferente de la apoptosis, se considera como muerte sin signos de apoptosis o autofagia, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Entre los cambios morfológicos que desencadena figura el abultamiento de los organelos y la ruptura de la membrana celular, que conduce a la pérdida de osmoregulación y a la rotura de la célula. Es un proceso peor regulado que lleva al derrame del contenido proteico, lo que puede desembocar en una fuerte respuesta inmunitaria. En esto contrasta con la silenciosa eliminación celular por apoptosis, que normalmente desencadena una respuesta inmunitaria mínima. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a

toxinas. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado. (Berek y Hacker, 2010). Los cambios tempranos incluyen aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células en la vecindad. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar (Figura 4) (Sánchez y Diosdado, 2003).

Apoptosis

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Sánchez y Diosdado, 2003). A diferencia de la necrosis, las células que mueren por apoptosis no provocan daños a células adyacentes. Una célula en vía de apoptosis se retrae y se condensa, el citoesqueleto se colapsa, la membrana celular se desensambla y el ADN nuclear se fragmenta. Más importante aún, el proceso de apoptosis altera la superficie celular de tal forma que inmediatamente atrae células fagocíticas, por lo general fagocitos especializados denominados macrófagos. Estas células engloban a la célula apoptótica antes de que pueda derramar su contenido (Figura 4). La eliminación rápida de la célula moribunda evita las secuelas de la necrosis celular y permite que el fagocito recicle los componentes de la célula apoptótica (Alberts *et al.*, 2006).

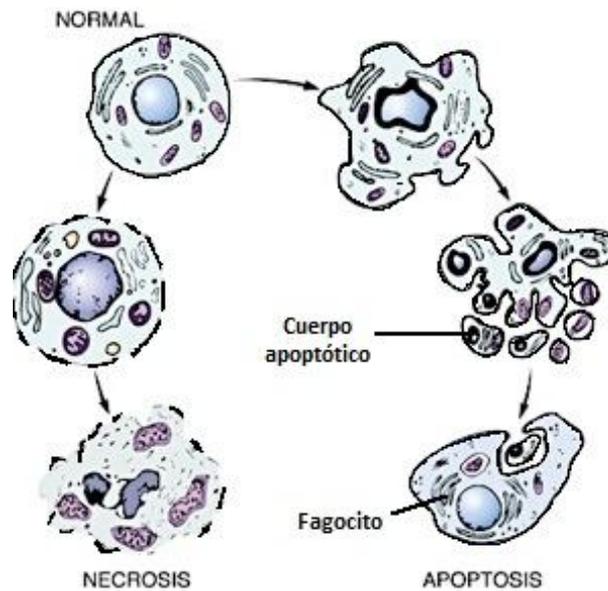


Figura 4.- Esquema de apoptosis y necrosis (Tomado y modificado de: "http://www.contrerasrobledo.com/docencia/UNIDAD_DOCENTE_DE_PATOLOGIA/Tema_5.html"; Consultada: 02 Dic 2012).

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos y bioquímicos como:

- Aumento brusco de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas, las cuales se fusionan con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva, salida de fluidos e iones intracelulares está mediada por transportadores iónicos (cotransportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas).
- Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración citoplasmática de calcio libre, diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico.
- Cambios en la composición de la membrana celular. Translocación de grupos lipídicos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación.
- Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto. Como consecuencia aparece una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas.
- Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.
- Condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos inicialmente de 50 a 300 kilobases (kb) y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb) y múltiplos de ellos, denominados "oligonucleosomas" (Jordán, 2003).

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: La primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos o células adyacentes (Sánchez y Diosdado, 2003).

Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis están mediados por "efectores de muerte celular" como las caspasas (proteasas cisteínicas). Pero para que estos efectores actúen es necesario que el balance vida-muerte se rompa por las interacciones de los "activadores de muerte celular", extracelulares o intracelulares. Algunos de los activadores extracelulares de muerte celular son: Integrinas, factores de crecimiento y citocinas de muerte celular. Por otro lado los activadores intracelulares de muerte, son las proteínas Bcl-2, involucradas en el control de la apoptosis. Algunos miembros de la familia son antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-xL) y otros son proapoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) (Burgués *et al.*, 2005).

Las señales apoptóticas, tanto intra como extracelulares, convergen para activar a las caspasas. La condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la ruptura de la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos son consecuencias directas de la actividad de las caspasas. Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por ruptura proteolítica (Burgués *et al.*, 2005). Las caspasas se engloban en tres grupos: caspasas implicadas en la producción de citocinas (caspasas 1, 4, 5 y 13), caspasas de señalización o de activación de otras caspasas (caspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras de muerte o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) las cuales hidrolizan sustratos selectivos (Jordán, 2003).

Se han descrito de manera general dos cascadas o vías de inducción de apoptosis, las cuales pueden unirse en un componente común, la caspasa 3 (Sánchez y Diosdado, 2003).

Vía extrínseca o del receptor de muerte celular:

Los receptores de muerte pertenecen a la familia génica de receptores del TNF (TNFR). Los mejor caracterizados son el receptor Fas, también conocido como CD95 (cluster of differentiation 95) o APO-1 (apoptosis-1 protein), y el TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral). Tienen en común una secuencia homóloga denominada "dominio de muerte" (death domain o DD), capaz de iniciar la cascada de eventos que llevan a la apoptosis. Los ligandos para estos receptores pertenecen a la familia del TNF, y son el ligando Fas y el TNF. Estos ligandos, que normalmente existen en forma trimérica, se unen a sus receptores induciendo también su trimerización y así activándolos. El receptor Fas activado recluta moléculas adaptadoras como el FADD / MORT-1 (Fas-associated death domain/mediator of receptor-induced toxicity-1), que contiene también un "dominio de muerte" (DD) que se une al análogo del receptor Fas y un "dominio efector de muerte" (DED) que se une a un dominio análogo de la procaspasa 8. Esta enzima, también conocida como FLICE (FADD like IL-1 β -converting enzyme), sufre activación autocatalítica al unirse al FADD convirtiéndose en la caspasa 8 activa (Figura 5) (Burgués *et al.*, 2005).

Vía intrínseca o mitocondrial:

Se trata de una vía independiente de los receptores de muerte y es la que inducen algunos agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas de estrés (especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno). Las mitocondrias son orgánulos con dos compartimentos: la matriz, rodeada por la membrana interna, y el espacio intermembranal, entre la membrana interna y membrana externa. En la MI está la ATP sintetasa y la cadena respiratoria y en el espacio intermembrana está el citocromo C, que si se libera al exterior de la mitocondria induce la apoptosis. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan esta liberación: los miembros antiapoptóticos de esta familia (Bcl-2 y Bcl-xL) bloquean la liberación del citocromo c, mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) la inducen. La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés, y otras señales que provocan la traslocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos de la Familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo C al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la procaspasa 9, la cual puede a su vez activar a las procaspasas 3, 6 y 7, que provocan la ruptura de diversos sustratos y la apoptosis. La proteína Bid puede ser traslocada al interior de la mitocondria por la caspasa 8 (activada por el ligando Fas o el TNF), amplificándose así la apoptosis iniciada por la vía del receptor de muerte (Figura 5) (Burgués *et al.*, 2005).

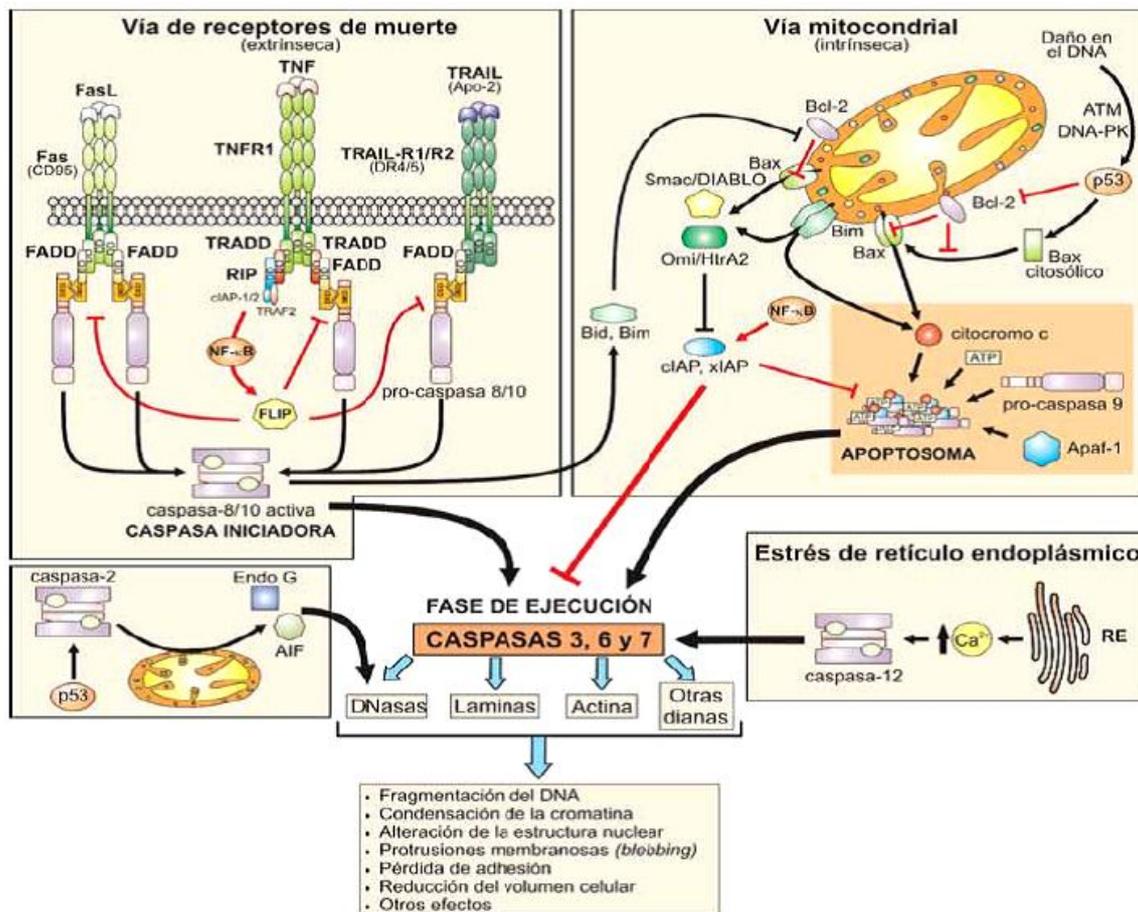


Figura 5.- Vías apoptóticas de muerte celular: Vía del receptor de muerte y vía mitocondrial (Tomado y modificado de: Iracheta, 2007)

Ahora bien, la división y muerte celular son procesos fundamentales para la vida de los cuales nos percatamos solo cuando algo sale mal. Y es que cuando se salen de control, las cosas se pueden poner funestas: la división celular incontrolada es una característica fundamental del cáncer. Por ejemplo, errores en los mecanismos que controlan la segregación del material genético durante la división celular pueden ocasionar inestabilidades cromosómicas que favorecen el desarrollo de este mal. El entendimiento de los mecanismos que regulan estos procesos, tanto en su forma normal como en la patológica, sin duda servirá para el desarrollo de terapias racionales y efectivas contra el cáncer (López, 2002).

Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7.6 millones de defunciones (aproximadamente un 13 % del total) (OMS, 2013).

En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de oncogenes (codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de genes supresores (codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se decanta hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la línea celular. Pero un cáncer se define no sólo por la inmortalización de las células sino también por la capacidad invasora local y a distancia (metástasis), para lo cual son necesarias mutaciones adicionales (Burgués *et al.*, 2005).

El cáncer es una enfermedad compleja, que surge ante las alteraciones genéticas que interfieren con las funciones celulares encargadas de regular la proliferación, apoptosis y envejecimiento. El daño subyacente al desarrollo del cáncer tiene la vía común de la perturbación en los mecanismos reparadores del ADN que permiten la acumulación de mutaciones, fomentando el desarrollo al interior del tejido huésped de un clon genéticamente distinto, con capacidad de crecimiento indefinido, independencia a los factores de crecimiento, ausencia en la inhibición dependiente de celularidad y cambios en la organización del citoesqueleto (Grillo *et al.*, 2008).

El cáncer se clasifica de acuerdo con el tejido y con el tipo de célula a partir del cual se originan (Alberts *et al.*, 2006).

En un primer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

El segundo grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.

El tercer grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas, los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas; los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes (Pardo, 1998).

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la mujer, y prácticamente todos los casos están relacionados con la infección genital por virus del papiloma humano (VPH). Cerca de un 80% de los casos y una proporción aún mayor de las muertes por esta causa se registran hoy en países de bajos ingresos, donde prácticamente no hay acceso a la detección y tratamiento de esta enfermedad (OMS 2013). El CaCU es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente por lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que se pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada y severa. Evolucionan a cáncer *in situ* (circunscrito a la superficie epitelial) y/o a cáncer invasor, en que el compromiso traspasa la membrana basal (López y Lizano, 2006). El útero es un órgano genital femenino en forma de pera invertida, localizado en la pelvis. Su función es albergar al feto durante la gestación. El cuello uterino es una abertura que conecta el útero con la vagina (Camargo *et al.*, 2004).

Existen más de 80 tipos distintos de VPH, de los cuales, al menos 25 afectan al tracto genital femenino y, de acuerdo a su asociación con lesiones preinvasivas y cáncer, se agrupan en: alto (tipos 16, 18, 45, 56), moderado (tipos 31, 33, 35, 51, 52) y bajo riesgo (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44), siendo el VPH 16 el responsable hasta en el 50% de todos los cáncer cervicales (Grillo *et al.*, 2008).

El epitelio cervical exhibe una organización estratificada, en donde las células de la capa basal conservan la capacidad mitótica. Como resultado de la división celular, se da origen a dos células idénticas; una de ellas migra al estrato inmediatamente superior para completar su diferenciación terminal y la segunda permanece en el estrato basal como célula de ciclado lento y de recambio. Al ocurrir la infección por VPH, el genoma viral es sintetizado en las células basales a partir de copias episomales, afectando a la progenie, en donde una célula perpetuará la infección, y aquella destinada al cambio de estrato epitelial, presentará la expresión de genes tardíos, dando inicio a la fase vegetativa del ciclo de vida del VPH 18, finalmente, el ADN viral es empaquetado en la cápside y los viriones son liberados para reiniciar un nuevo ciclo de vida (Grillo *et al.*, 2008).

A nivel mundial el CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. La relación entre el CaCU y el Virus del Papiloma Humano (VPH), continúa siendo hoy explorada por diversos estudios. El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCU sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente: práctica sexual con múltiples parejas, actividad sexual a temprana edad, tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente, verrugas genitales, pruebas de Papanicolaou con resultados anormales, pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene, edad, persistencia viral, uso prolongado de anticonceptivos orales, coinfección con otros virus, como el del herpes simple tipo 2, citomegalovirus, herpesvirus humano tipos 6 y 7, detectados todos en el cérvix, carga viral (correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad), predisposición genética (representa el 27 % del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor), entre otras. La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El CaCU es más común después de los 35

años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta hacia el cáncer (López y Lizano, 2006).

El VPH, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los Polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV). Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Figura 6). Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (López y Lizano, 2006).

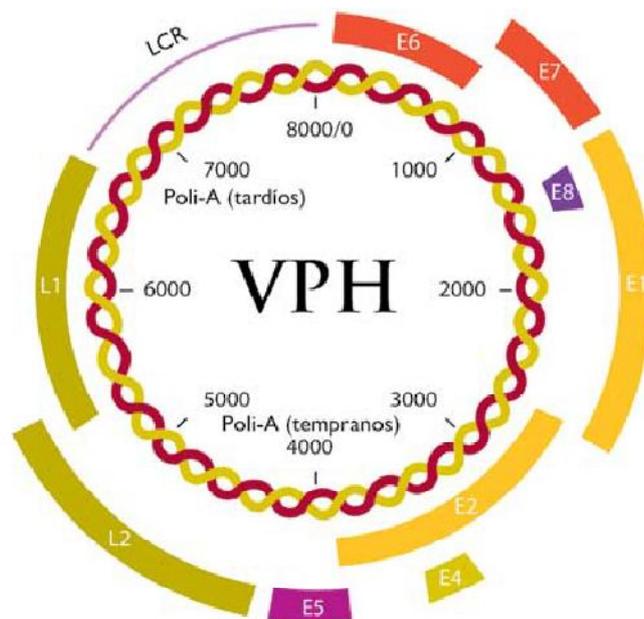


Figura 6.- Organización del genoma del VPH (Tomado de López y Lizano, 2006).

La Ciclina B se incrementa en casos positivos a los VPH 16 o 18, los cuales son la principal causa de cáncer de cérvix en mujeres. Además estos HPV de alto riesgo codifican en su genoma oncoproteínas que también juegan un papel en la carcinogénesis, como es el caso de la oncoproteína E7, que al igual que el complejo ciclina D/CDK puede bloquear la función de Rb y así promover el ciclo celular (Kim y Zhao, 2005) o la oncoproteína E6 que bloquea las funciones de p53 al unirse a este factor de transcripción (Gariglio, 1995).

Tratamiento

El tratamiento contra el cáncer está determinado por su localización y el grado de avance en el que se ha diagnosticado. Para el diagnóstico precoz del CaCU se utilizan pruebas de citología de cuello uterino, colposcopia y biopsia. La selección del tratamiento depende de la etapa en la que se encuentre la enfermedad, del estado de salud general de la paciente y de si la mujer está satisfecha con su deseo de procreación. De manera general se utiliza tres tratamientos: Cirugía, radioterapia y quimioterapia. La Cirugía es la técnica más antigua para tratar el cáncer, consiste en la extirpación del tumor o del tejido afectado y puede ser:

Conservadora: En caso de lesiones premalignas de cuello uterino, las pacientes se pueden tratar por vía vaginal empleando criocirugía, cirugía con rayo láser, conización (extracción de una muestra de tejido en forma de cono) y la electrocirugía. En la mayoría de los casos se emplea anestesia regional o local y son procedimientos que no implican hospitalización.

Mayor: Se utiliza cuando hay lesiones precancerosas y no hay interés de fertilidad, o porque hay cáncer invasor de cuello uterino pero está en sus fases iniciales. Según el caso se recurre a la histerectomía (extracción del útero solo o con tejidos vecinos) por vía abdominal o vaginal. Este tipo de cirugía requiere hospitalización y anestesia general (Cameron, 1995).

La Radioterapia es la aplicación de radiaciones ionizantes sobre el campo donde se encuentra el tumor con el fin de erradicarlo. Se utiliza en casos iniciales que no se pueden operar y en estados avanzados. Consiste en radioterapia externa (teleterapia), aplicada en varias sesiones, combinada con radioterapia interna (braquiterapia) directamente sobre el tumor. En caso de necesitar radiación interna, la paciente tendrá que hospitalizarse, pues el médico debe realizar el procedimiento bajo anestesia general o local. El mecanismo de acción de la radioterapia, se basa en el daño directo e indirecto del ADN a través de radicales libres (Cameron, 1995), es por ello que se tiene que las células son más sensibles en la fase S del ciclo celular, así como en la mitosis.

La Quimioterapia utiliza medicamentos para reducir los tumores y minimizar el riesgo de que el cáncer se extienda a otras partes del organismo y el riesgo de que el cáncer vuelva a desarrollarse. De esta manera la apoptosis ocurre en muchos tipos de células del cáncer cuando se expone a una variedad de drogas quimioterapéuticas, que incluyen a los antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de deoxinucleótidos, los inhibidores de la topoisomerasa de ADN, agentes que interfieren con los microtúbulos, y agentes alquilantes entre otros (Miyashita y Reed, 1993).

Este tratamiento ha tenido poca efectividad en el caso del CaCU y recientemente se ha venido combinando con radioterapia. El pronóstico de las pacientes dependerá del estadio de la enfermedad, de la oportunidad del tratamiento y de la sensibilidad del tumor a la terapia (Camargo *et al.*, 2004). La ineficiencia de las terapias en estados avanzados o terminales de la enfermedad así como su alta toxicidad ha generado la necesidad de buscar terapias alternativas. Al respecto, existe un fuerte interés en compuestos de origen vegetal y actualmente se han descrito innumerables compuestos con actividades biológicas diversas, entre las que se destaca a la

actividad antitumoral. Entre estos compuesto están las saponinas esteroides, ampliamente distribuidos en animales, plantas y hongos.

Saponinas

Las saponinas son glucósidos de alto peso molecular, están compuestas de un resto de azúcar unido por medio de un enlace a una parte triterpenoide o esteroide. La definición típica de las saponinas está basada en sus características generales, muchas saponinas tienen propiedades detergentes, forman espumas estables en agua, presentan actividad hemolítica, tienen un sabor amargo y son tóxicas para los peces. Tales atributos no son comunes para todas las saponinas, frecuentemente han sido utilizadas estas características para clasificar los productos naturales. Sin embargo debido a las numerosas excepciones, las saponinas son ahora mejor definidas en base a su estructura molecular, llamándolas glucósidos triterpenoides o esteroides. La porción aglicona o sin sacáridos de la saponina es llamada genina o sapogenina (Hostettmann y Marston, 2005).

Dependiendo del tipo de sapogenina presente en la molécula, las saponinas pueden ser divididas en tres principales clases:

- Glucósidos triterpenoides.
- Glucósidos esteroides.
- Glucósidos alcaloides esteroidales.

Todas las saponinas tienen en común la unión a una o más cadenas de azúcar a la parte del fitoesterol. Las saponinas que tienen una sola cadena de azúcar se llaman saponinas Monodesmosídicas, normalmente unido al carbono 3 (C-3); las saponinas que tienen dos cadenas de azúcar se llaman saponinas Bidesmosídicas, comúnmente una unida en posición C-3 por un enlace éter y otra unida en posición C-28 (saponinas triterpenoides) por un enlace éster (ácil glucósido) o unidas en posición C-26 (saponinas furostanol) por un enlace éter. Las saponinas Tridesmosídicas tienen tres cadenas de azúcares pero son poco comunes. Saponinas bidesmosídicas se transforman fácilmente en saponinas monodesmosídicas mediante, la hidrólisis del azúcar esterificado en C-28 en saponinas triterpenoides, que carecen de muchas de las propiedades y actividades características de saponinas monodesmosídicas (Hostettmann y Marston, 2005).

Las saponinas se producen en al menos 400 especies de plantas pertenecientes a 60 familias diferentes, pero sólo alrededor de 28 se utilizan como alimento, como la soya, los garbanzos, los cacahuets, la espinaca, berenjena, ñame y el sisal utilizado en la alimentación animal. Las saponinas esteroides son poco frecuentes en los animales, están presentes en las estrellas y pepinos de mar y sólo se encuentra rara vez en los corales, esponjas y en algunos peces que sirven como repelentes de ataque de tiburón (Williams y Gong, 2007).

En el pasado, la síntesis industrial de las hormonas esteroideas comenzó a partir de compuestos de origen animal como, por ejemplo, colesterol y ácidos biliares hasta que, a mediados de la década de 1940, el científico norteamericano Dr. Russell Marker desarrolló un proceso para la síntesis de progesterona, estrona y testosterona a partir de la Diosgenina, un compuesto aislado especialmente de la raíz del ñame mexicano, hermano de los ñames (familia Dioscoreáceas). Las industrias se han adaptado tanto a este proceso de extracción que la demanda de Diosgenina ha crecido en los últimos años. Sin embargo, el ñame silvestre es difícil de cultivar fuera de México, y en las regiones donde su cultivo se ha realizado correctamente, este no tiene el mismo rendimiento de Diosgenina en comparación con el que se encuentra en el lugar de origen (Lehmann *et al.*, 1973).

Algunas de las saponinas esteroideas recientemente aisladas han demostrado tener propiedades antidiabéticas (Nakashima *et al.*, 2003), inhibidora de la agregación plaquetaria (Niwa *et al.*, 1998), antifúngicas (Yang *et al.*, 2006), antiinflamatorias (Tapondjou *et al.*, 2008) y anticancerígenas (Cai *et al.*, 2002). Aunque la parte aglicona juega el papel más importante en la actividad biológica, es bien conocido que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de los glicósidos esteroideos; por ejemplo, incrementando la solubilidad de éstos en medio fisiológico, ayudando a la permeabilidad celular, tiempo de acción y dirigiendo a la molécula al sitio activo. En general se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado (Fernández *et al.*, 2009).

La Dioscina (Figura 7), es una saponina esteroide, molécula natural en el género Dioscorea, que se distribuye en América del Norte, y muestra capacidad para minimizar los síntomas postmenopáusicos (Mirunalini y Shahira, 2011).

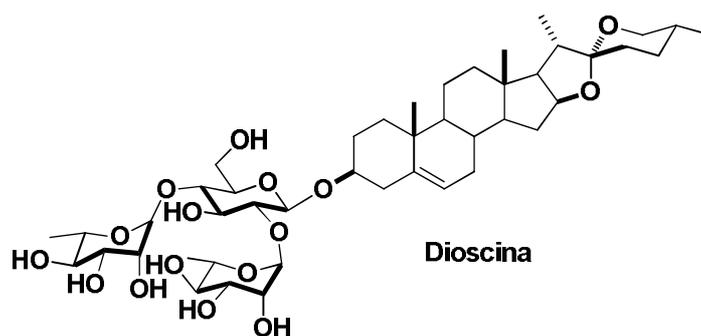


Figura 7.- Estructura de la Dioscina, precursor de la Diosgenina (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

La Diosgenina (Figura 8) es una saponina esteroide, que se ha usado en la medicina tradicional china para el tratamiento de infecciones uretrales y renales. La Diosgenina, se obtiene mediante hidrólisis de la parte glicona de la Dioscina, se puede encontrar en muchas especies de plantas y

en particular en las raíces de ñame silvestre (*Dioscorea villosa*, *Dioscorea mexicana*, que pertenecen a la familia Dioscoreáceas), tubérculo conocido en Brasil como el ñame. Estas plantas se caracterizan por tener tubérculos que acumulan una cantidad considerable de almidón y son utilizadas para consumo humano. El ñame silvestre se distribuye en varios países tropicales, siendo muy abundante en México, donde a partir de 1950 hasta finales de los años 70 esta planta fue la única fuente de materia prima para la producción de las píldoras anticonceptivas. La Diosgenina se utiliza más comúnmente como un ingrediente activo en la preparación de muchos fármacos esteroides, hormonas sexuales y píldoras anticonceptivas orales que proporcionan alrededor del 50 % de la materia prima para la producción de cortisona, progesterona y otras hormonas esteroides (Narula *et al.*, 2007).

Una característica importante de Diosgenina es su amplia aplicación en diferentes áreas terapéuticas. Los alimentos naturales que contienen Diosgenina fueron dados a conocer en algunos países como eficaces en el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis y la tensión premenstrual en las mujeres (Noguchi *et al.*, 2006). El consumo de Diosgenina ha demostrado propiedades hipoglucémicas en ratas diabéticas, mediante la alteración de la morfología intestinal baja los niveles de glucosa en la sangre y el perfil lipídico de estas ratas. Se ha reportado que la Diosgenina reduce la progresión de la osteoporosis, y presenta efectos antiinflamatorios en ratas (McAnuff *et al.*, 2006). Por otra parte, en la línea celular de osteosarcoma 1547, se comprobó que la Diosgenina detiene el ciclo celular e induce apoptosis principalmente por el aumento de la expresión de la oncoproteína supresora de tumor p53 (Moalic *et al.*, 2001; Corbiere *et al.*, 2004; Trouillas *et al.*, 2005; Begaud, 2006) y en la línea K562 de leucemia humana (Ming, 2005). También inhibe la proliferación en células de cáncer de mama MCF-7 (Li *et al.*, 2005) e induce apoptosis en células humanas de tipo eritroleucemia (Léger *et al.*, 2004), inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en la línea celular de cáncer de colon humano (Raju *et al.*, 2004).

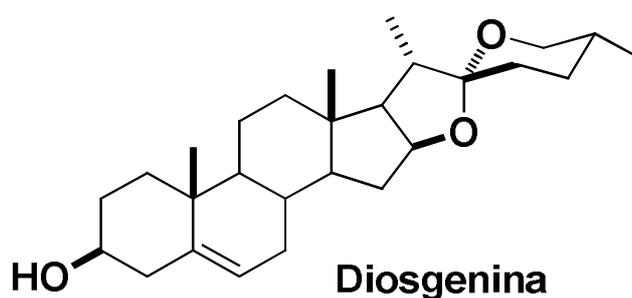


Figura 8.- Estructura de la Diosgenina (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

La Diosgenina-3-glu (β -D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo) (Figura 9) es una saponina esteroide monodesmosídica, sintetizada a partir de la Diosgenina, por la adición de una glucosa en

el carbono tres de la estructura esteroide. Por ser una saponina de reciente síntesis, aún no existe información en la literatura a cerca de su actividad biológica sobre el cáncer, es por ello que el presente trabajo se centrara en evaluar el efecto antitumoral de este compuesto en líneas celulares de CaCU.

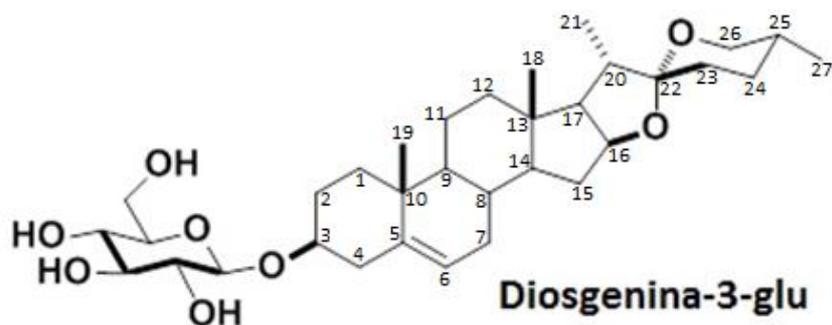


Figura 9.- Estructura de la Diosgenina-3-glu (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Planteamiento del problema

El CaCU es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la población femenina, afecta principalmente a las mujeres de 40 a 49 (27 % mujeres de 20 y más años). Estos padecimientos son preocupantes, no solo porque las mujeres que los presentan se encuentran en la plenitud de la edad adulta, económicamente activas, sino porque debe pasar por un proceso difícil y enfrentarse a una enfermedad que las puede llenar de incertidumbre, cuando estas neoplasias son prevenibles con atención oportuna (INEGI, 2013).

Justificación

Los tratamientos actuales contra el cáncer son agresivos y de baja selectividad además de poco eficientes en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de ésta enfermedad. Actualmente existe un fuerte interés en las saponinas y sapogeninas esteroides como la Dioscina y sus derivados, cuya actividad biológica es diversa, destacando la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado de estos compuestos sobre el cáncer cervicouterino. Se sabe que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de las saponinas esteroides; por ejemplo, incrementando la solubilidad de éstos en medio fisiológico, ayudando a la permeabilidad celular, tiempo de acción y dirigiendo a la molécula al sitio activo. En general se ha encontrado que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado por lo que resulta importante determinar la actividad antitumoral de la Diosgenina-3-glu obtenida por la adición de una glucosa en el carbono 3 de la Diosgenina, con el fin de aportar información que permita establecer el potencial terapéutico que éste derivado saponínico tiene.

Hipótesis

Se ha descrito que la Diosgenina induce apoptosis y detención del ciclo celular, además se ha reportado que tanto el número así como la posición de los azúcares de las saponinas influyen en su actividad biológica, por lo que se espera que la Diosgenina-3-glu obtenida por modificaciones químicas a partir de la Diosgenina, presente una actividad antiproliferativa, así como una inducción de muerte por apoptosis en las líneas de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica de la Diosgenina-3-glu en cultivos de líneas celulares de CaCU así como evaluar el efecto selectivo en cultivos de células no tumorales.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad antiproliferativa de la Diosgenina-3-glu, expresada como la concentración requerida de compuesto para inducir un decremento del 50 % en el número celular (IC_{50}), en cultivos de células de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo, utilizando la técnica de cristal violeta
- Evaluar el efecto citotóxico de la Diosgenina-3-glu en las líneas celulares de CaCU, mediante la detección de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) y la incorporación de Yoduro de propidio (IP).
- Evaluar el efecto antiproliferativo de la Diosgenina-3-glu en cultivos de linfocitos de sangre periférica, mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína.
- Evaluar el efecto citotóxico de la Diosgenina-3-glu en cultivos de linfocitos de sangre periférica mediante la detección de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH).
- Determinar el efecto apoptótico de la Diosgenina-3-glu, mediante la detección de expresión de la caspasa 3 activa, así como de la inducción de la fragmentación del ADN en cultivos tratados con el esteroide.

Método

Cultivo de células tumorales

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Las células provenientes de CaCU son sembradas en cajas de Petri de cristal de 100x10 mm, en 10 ml de medio RPMI 1640 (Gibco BRL, USA.) suplementado con L-glutamina y rojo de fenol, al 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB). Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuaire, USA). Para la realización de los ensayos, los cultivos se desarrollaron hasta un 60-70 % de saturación de la caja de cultivo. Las líneas celulares de CaCU que se utilizaron en éste trabajo son: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (ATCC, 2012). CaSki, células provenientes de carcinoma cervicouterino, que fueron establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2012) y ViBo, células de carcinoma estadio II-B, negativas a VPH (Monroy *et al.*, 1992).

Preparación del compuesto

El compuesto fue suministrado en sólido por el Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Para su uso se solubilizó 1 mg de Diosgenina-3-glu en 100 µl de una mezcla de Etanol-DMSO 1:3 (J. T. Baker, USA). La solución se prepara antes de utilizarse y es estable a temperatura ambiente. Se realizaron una serie de diluciones en Medio de cultivo RPMI 1640 al 5 % SFB, inicialmente de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 µg/ml y posteriormente se cambiaron a intervalos de 5 en 5 en función de la localización del efecto de IC-50 (concentración requerida del fitoesteroide que induce un decremento del 50 % la densidad celular).

Cuantificación del número celular por tinción con cristal violeta

Se realizaron cultivos de las líneas de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo en placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (7,500 células/pozo), con medio de cultivo RPMI 1640 al 5 % SFB por 24 h, después de las 24 h de adhesión, se trataron los cultivos contando con seis repeticiones de cada una de las siguientes condiciones: Control testigo (células sin tratamiento, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), Control (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de Etanol-DMSO 1:3 utilizada en la IC-50 según la línea celular), y una curva a las concentraciones del compuesto Diosgenina-3-glu arriba mencionadas, en todos los casos el volumen final de cada pozo fue de 100 µl. Transcurridas las 24 h de tratamiento, se evaluó el número celular utilizando la

técnica de incorporación de cristal violeta, la cual brevemente consiste en fijar las células con glutaraldehído al 1.1 % durante 15 min, cumplido el tiempo se retiró el fijador y se enjuagó con agua desionizada dejando secar al aire, en seguida se adicionó el colorante cristal violeta al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico, dejando por 15 min, se lavó el exceso de colorante exhaustivamente y se dejó secar al aire para después adicionar ácido acético al 10 % por 15 min. Posteriormente se procedió a determinar la absorbancia a 570 nm por espectrofotometría en un lector de placas (Image Tecan Spectra, Austria) (Kueng *et al.*, 1989).

Actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos celulares

El efecto citotóxico se determinó mediante la técnica de cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) con un kit (CytoTox 96, USA). Para este ensayo se contó con las siguientes condiciones: Control testigo (células sin tratamiento, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), Control (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de la mezcla Etanol-DMSO 1:3) además para esta prueba, en la placa de cultivo se contó con dos controles internos. Un control basal, es decir, medio de cultivo utilizado en los estímulos, el cual se incubó bajo las mismas condiciones, pero con la particularidad de que en dichos pozos no había células, esto para utilizarlo como un blanco en la reacción colorimétrica. El segundo, un control positivo, células con 24 h de adhesión y 24 h de proliferación, estas células fueron lisadas por 1 h con 100 µl de una solución al 0.1 % de Tritón X-100 en RPMI 1640 al 5 % SFB. Cumplidas las 24 h de tratamiento con el compuesto, se recuperó el medio de cultivo sobrenadante de cada una de las condiciones y se centrifugó a 2,000 rpm/5 min, se colocaron 40 µl del medio centrifugado, con 40 µl de la mezcla del sustrato reconstituido del kit y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La LDH oxida el lactato a piruvato, los protones movilizados reaccionan con la sal de tetrazolio 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) reduciéndola a formazán. El aumento en la concentración de formazán producida en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con el aumento en el número de células lisadas. El colorante formazán es soluble en agua y puede ser detectado por espectrofotometría a 490 nm de absorbancia.

Incorporación de Yoduro de propidio (IP)

Esta prueba se utilizó para determinar el daño en la membrana plasmática de células generado por la Disgenina-3-glu. Fueron sembradas 50,000 células/pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 1 ml de RPMI 1640 al 5 % de SFB. Transcurridas las 24 h de adhesión las células fueron tratadas. Para este ensayo se contó con las siguientes condiciones: Control testigo (células sin tratamiento, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), Control (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de la mezcla Etanol-DMSO 1:3), Control positivo (células con 24 h de adhesión y 24 h de proliferación, sin tratamiento las cuales después de ser despegadas de la placa

de cultivo fueron permeadas con una solución de Etanol al 70 % en Agua bidestilada por 20 min), Tratamiento (con la concentración de IC-50 de Diosgenina-3-glu correspondiente a la línea celular). Cumplidas las 24 h de tratamiento se cosechan las células y se adicionan 3 μ l de una solución de IP (200 mg/l) (Sigma-Aldrich, USA). El IP es un fluorocromo de alta afinidad por el ADN que se intercala en el surco mayor. El IP se incorpora al ADN, por lo tanto las células que emiten una alta fluorescencia, son células que presentaron un daño en la membrana plasmática. La determinación de la fluorescencia se determinó por citometría de flujo (BD FACSAria II, USA), los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Detección de la caspasa 3 activa

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos en cajas de 24 pozos (45,000 células/pozo), en un volumen de 1 ml de RPMI 1640 al 5 % de SFB. Transcurridas las 24 h de adhesión las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: Control testigo (células sin tratamiento, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), Control (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de la mezcla Etanol-DMSO 1:3), Tratamiento (con la IC-50 de Diosgenina-3-glu correspondiente), Transcurridas las 24 h de tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % por 20 min, al término del tiempo fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS (pH 7.3), 3 min cada lavado en agitación suave. Se recuperaron los cristales y se pasaron a una placa limpia para realizar la reacción. Se prosiguió a permear las células con una solución de tritón X-100 al 0.2 % en PBS durante 5 min a 4 °C, posteriormente las preparaciones se lavaron nuevamente 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave. Se adicionó el bloqueador PBS-BSA-Tween 20, durante 1 h, a temperatura ambiente en cámara húmeda, transcurrido este tiempo se retiró el bloqueador. Inmediatamente se colocó el anticuerpo primario: anticaspasa 3 activa (1:100 en PBS) (LabVision, USA), durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda, las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario: antilgG acoplada a FITC (1:500 en PBS) (Invitrogen, USA), en cámara húmeda bajo condiciones de oscuridad durante 2 h, se lavaron 3 veces las muestras con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave, para después aplicar el DAPI (Sigma-Aldrich, USA) durante 30 s, y lavar 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave, a las muestra se les colocó medio de montaje (Vectashield, USA), y fueron selladas con barniz a base de nitrocelulosa. Las preparaciones se revelaron por microscopia de epifluorescencia (Nikon, Japón).

Detección de fragmentos de ADN por la técnica de TUNEL

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos en cajas de 24 pozos (45,000 células/pozo), en un volumen de 1 ml de RPMI 1640 al 5 % de SFB. Transcurridas las 24 h de adhesión las células fueron tratadas. Para este ensayo se contó con las siguientes condiciones: Control testigo (células sin tratamiento, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), Control (células tratadas

con la máxima cantidad de volumen de la mezcla Etanol-DMSO 1:3), Tratamiento (con la IC-50 de Diosgenina-3-glu correspondiente), Transcurridas las 24 h de tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % por 20 min, al término del tiempo fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS (pH 7.3), 3 min cada lavado en agitación suave. Se recuperaron los cristales y se pasaron a una placa limpia para realizar la reacción. Se prosiguió a permear las células con una solución de tritón X-100 al 0.5 % en PBS durante 5 min a 4 °C, posteriormente se adicionó el buffer de equilibrio durante 15 min a temperatura ambiente. Se incubó inmediatamente por 1 h con la enzima Tdt (33 µl de enzima Tdt más 77 µl de buffer de reacción), en cámara húmeda. La reacción fue detenida con buffer de paro (Chemicon international, USA) (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua bidestilada), en agitación suave por 10 min. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave. Se incubó en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente por 30 min con antidigoxigenina acoplada a rodamina (Chemicon international, USA) (68 µl de solución bloqueó más 62 µl de antidigoxigenina-rodamina). Se lavó 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave. Se incubó con DAPI (Sigma-Aldrich, USA) durante 30 s, e inmediatamente se lavaron 3 veces con PBS, 3 min cada lavado en agitación suave, a las muestra se les colocó medio de montaje (Vectashield, USA), y fueron selladas con barniz a base de nitrocelulosa. Las preparaciones se revelaron por microscopia de epifluorescencia (Nikon, Japón).

La detección de la fragmentación del ADN implica el marcaje del extremo 3' generado durante la fragmentación de la molécula, la reacción de la enzima Tdt agrega dNTP marcados con digoxigenina, los cuales son acoplados con antidigoxigenina marcada con rodamina.

Obtención de linfocitos humanos

Se realizaron cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana a partir de 15 ml de sangre obtenida con una jeringa heparinizada (Heparina 5000 UI/ml, PISA, México). En un tubo de fondo cónico de vidrio, se depositaron 5 ml de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, USA). Inmediatamente se agregaron lentamente 5 ml de sangre por la pared del tubo. Inicialmente se centrifugaron a una velocidad de 300 rpm y se fue aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 min) hasta llegar a 1,500 rpm dejando por 25 min más en esta última. Se colectó el anillo de linfocitos con una pipeta de 5 ml (evitando extraer la fase Ficoll) se depositó en un tubo cónico de vidrio y se lavó con 10 ml PBS. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, decantando el sobrenadante y volviendo a lavar con PBS centrifugando a 1500 rpm durante 5 min. El botón celular se resuspendió en 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, para vertir a una caja de Petri, incubando a 37 °C con 5 % de CO₂ en una atmosfera húmeda por 1 h. Al término de este tiempo se colectó el medio, el cual contenía los linfocitos que se ocuparon para los ensayos biológicos.

Proliferación de linfocitos por carboxifluoresceína

Para la técnica de carboxifluoresceína, los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS y marcados con 10 μ l de una solución de carboxifluoresceína (2 μ M/ml/millón de células) (Sigma-Aldrich, USA) e incubados durante 15 min protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavados dos veces con PBS al 5 % SFB, centrifugando a 1500 rpm/5 min y resuspendiendo en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % SFB. Después de este tratamiento los linfocitos fueron sembrados en una placa de 96 pozos de fondo plano (200,000 células/pozo/200 μ l RPMI-1640 20 % de SFB). Los controles fueron activados con fitohemaglutinina (10 μ M/ml/millón de células) (Micro-Lab, Méx.), el volumen final de cada pozo fue de 200 μ l. Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos a las 72 h de tratamiento con el fitoesteroide y fueron centrifugados a 1500 rpm/5 min retirando el sobrenadante mientras que el botón fue resuspendido en 1 ml de verseno frío por 5 min, se lavó dos veces, centrifugando a 1500 rpm/5 min y resuspendiendo en 500 μ l de PBS y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %. Las muestras fueron leídas por citometría de flujo (BD FACSAria II, USA) y los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Prueba de LDH en linfocitos

A los medios sobrenadantes provenientes de cultivos de linfocitos tratados por 72 h con Diosgenina-3-glu, también se les determinó la actividad de la enzima LDH con el kit CytoTox 96, de la misma forma que en células tumorales.

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows. Seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Actividad antiproliferativa en células tumorales de CaCU

Con el propósito de establecer el efecto antiproliferativo de la Diosgenina-3-glu en las células tumorales, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron estimulados con diferentes concentraciones del compuesto y la concentración requerida del fitoesteroide que induce un decremento del 50 % en la densidad celular (IC_{50}) fue determinada. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (Figura. 10)

El Etanol-DMSO 1:3, 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.

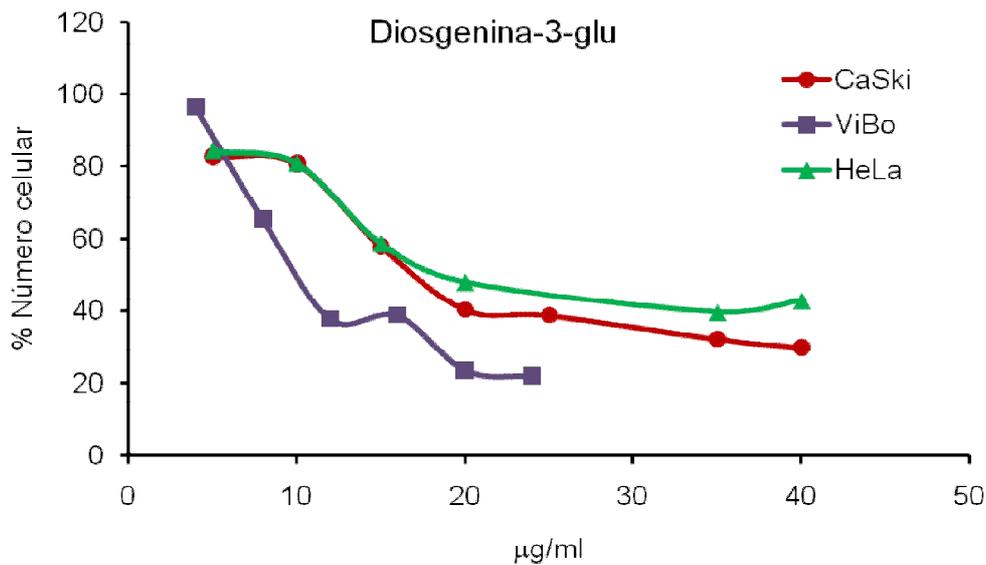


Figura 10.- Actividad antiproliferativa de la Diosgenina-3-glu sobre cultivos de líneas celulares de CaCU. El número celular se determinó por medio de la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos (Figura 10), muestran que el potencial proliferativo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con la Diosgenina-3-glu es afectado de manera dependiente de la concentración, con una IC_{50} de 24.85 µg/ml (60 µM), 22.56 µg/ml (54 µM) y 14.19 µg/ml (34 µM) respectivamente.

Determinación del efecto citotóxico (Necrótico)

Con la intención de establecer si el decremento del número celular se debe a un efecto citotóxico del esteroide, cultivos de las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con Diosgenina-3-glu a la concentración de 24.85, 22.56 y 14.19 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente por 24 h, y la incorporación celular de Yoduro de propidio (IP) así como la determinación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) fue evaluada como dos parámetros de pérdida de la integridad de la membrana plasmática, considerada como una característica primordial de una actividad citotóxica y/o de muerte necrótica (Figuras 11 y 12).

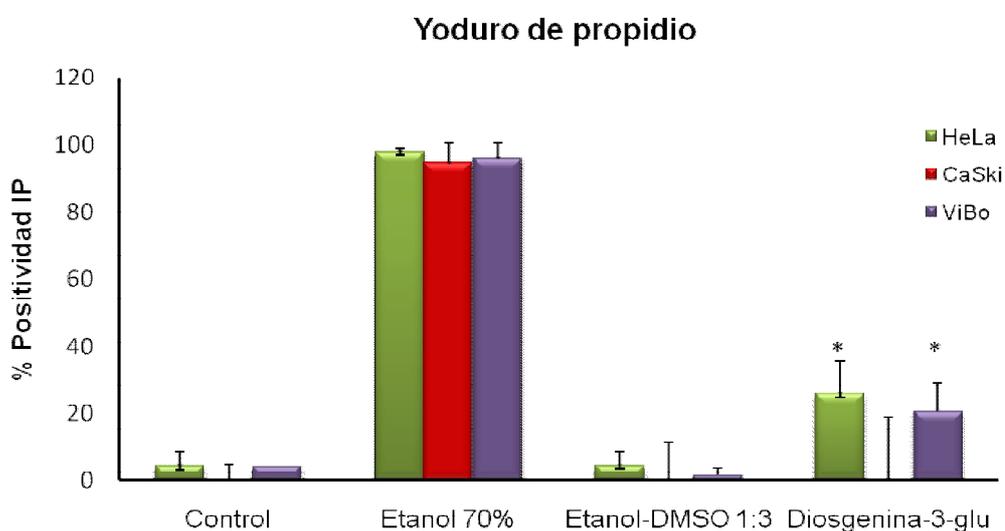


Figura 11- Efecto citotóxico y/o necrótico de la Diosgenina-3-glu sobre cultivos de líneas celulares de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo. El efecto citotóxico y/o necrótico en las muestras fue evaluada por citometría de flujo, (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey $p > 0.05$).

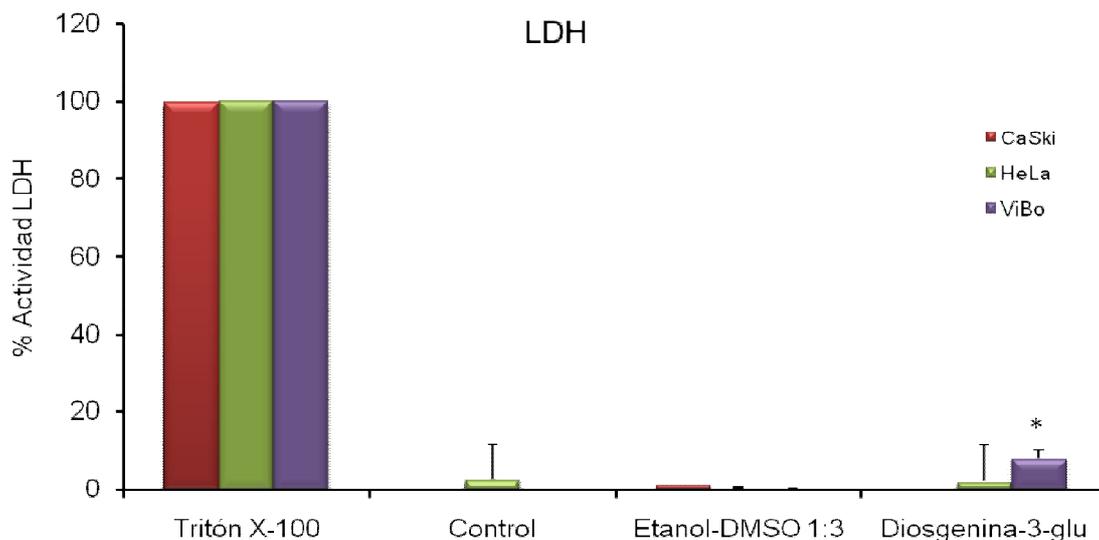


Figura 12.- Efecto citotóxico de la Diosgenina-3-glu sobre cultivos de líneas celulares de CaCU. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,500 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas por 24 h con la concentración de las IC_{50} calculadas. Se recuperó el medio sobrenadante y se cuantificó la actividad de la enzima LDH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey $p > 0.05$).

Los resultados mostrados en las Figuras 11 y 12 muestran que las células tumorales tratadas con la Diosgenina-3-glu presentan una baja incorporación de IP, así como una baja o nula actividad de la enzima LDH en los sobrenadante de los cultivos, indicando que la saponina no presenta una actividad citotóxica o necrótica en las líneas de CaCU y que el decremento en el número celular observado se debe a un evento diferente a la muerte celular necrótica.

Actividad Apoptótica de la Diosgenina-3-glu en células tumorales

Efecto en la morfología celular y nuclear

Es conocido que las células cuando son inducidas a una muerte apoptótica, presentan cambios en su morfología, la cromatina nuclear se condensa y/o fragmenta, se generan cuerpos apoptóticos y se induce la expresión de caspasas efectoras como la caspasa 3 activa, entre otras características. Con la intención de establecer si la Diosgenina-3-glu induce apoptosis en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el fitoesteroide a las concentraciones de IC_{50} respectivas para cada línea celular y la morfología celular así como la condensación y/o fragmentación de la cromatina nuclear fue determinada mediante microscopia de contraste de fases y tinción con el compuesto fluorescente DAPI respectivamente (Figuras 13, 14 y 15).

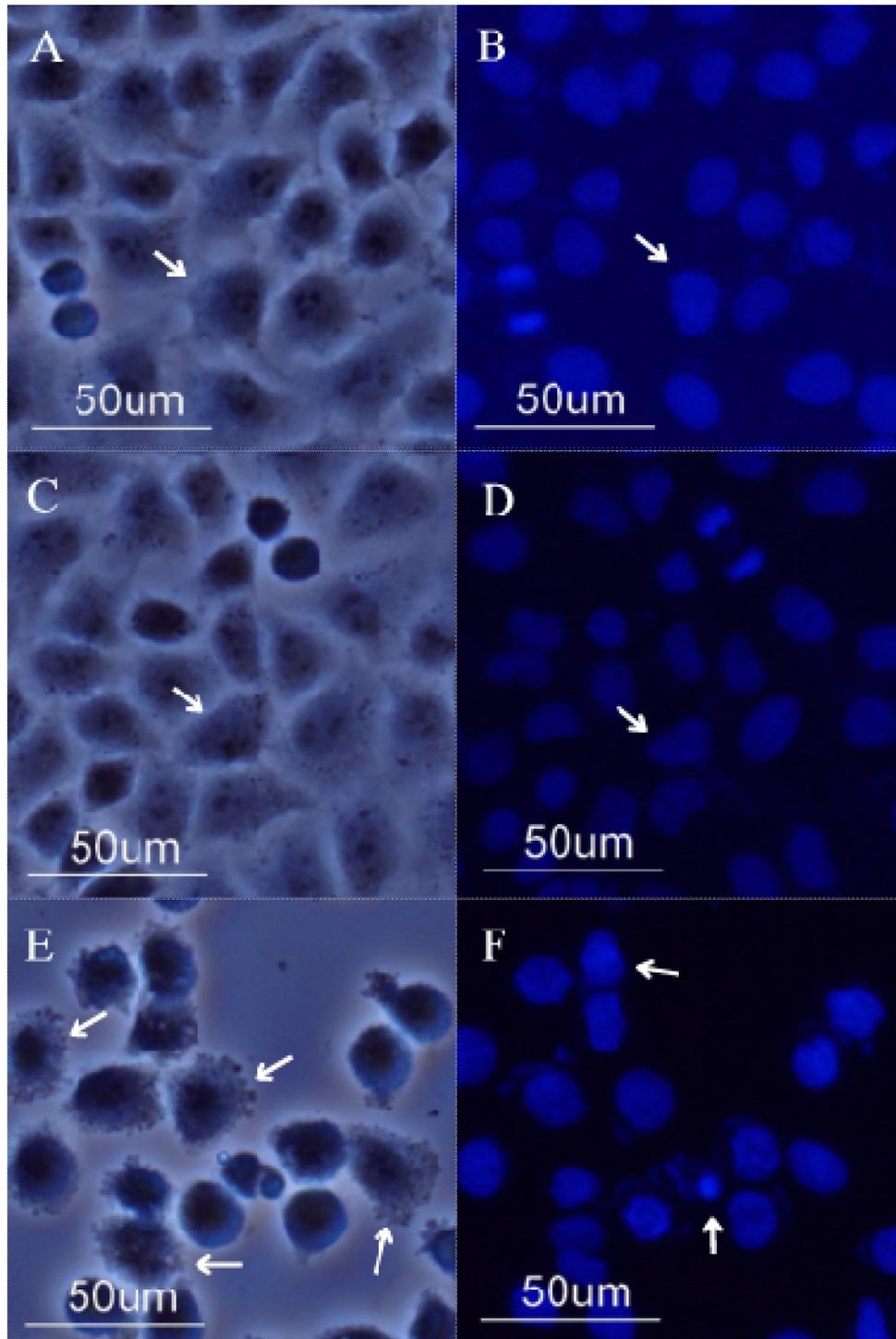


Figura 13. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la morfología celular y nuclear de la línea de cáncer de cérvix CaSki. A, C y E: Fotografías en contraste de fases; B, D y F: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. A y B: Células sin tratamiento (Control); C y D: Células tratadas con 2.48 $\mu\text{l/ml}$ de Etanol-DMSO 1:3; E y F: Células tratadas con 24.85 $\mu\text{g/ml}$ de Diosgenina-3-glu. A, B, C y D: Las flechas indican células con morfología poliédrica y núcleos grandes. E: Se aprecia la formación de protrusiones en la membrana celular así como la formación de cuerpos apoptóticos; F: se aprecia condensación de cromatina así como fragmentación nuclear.

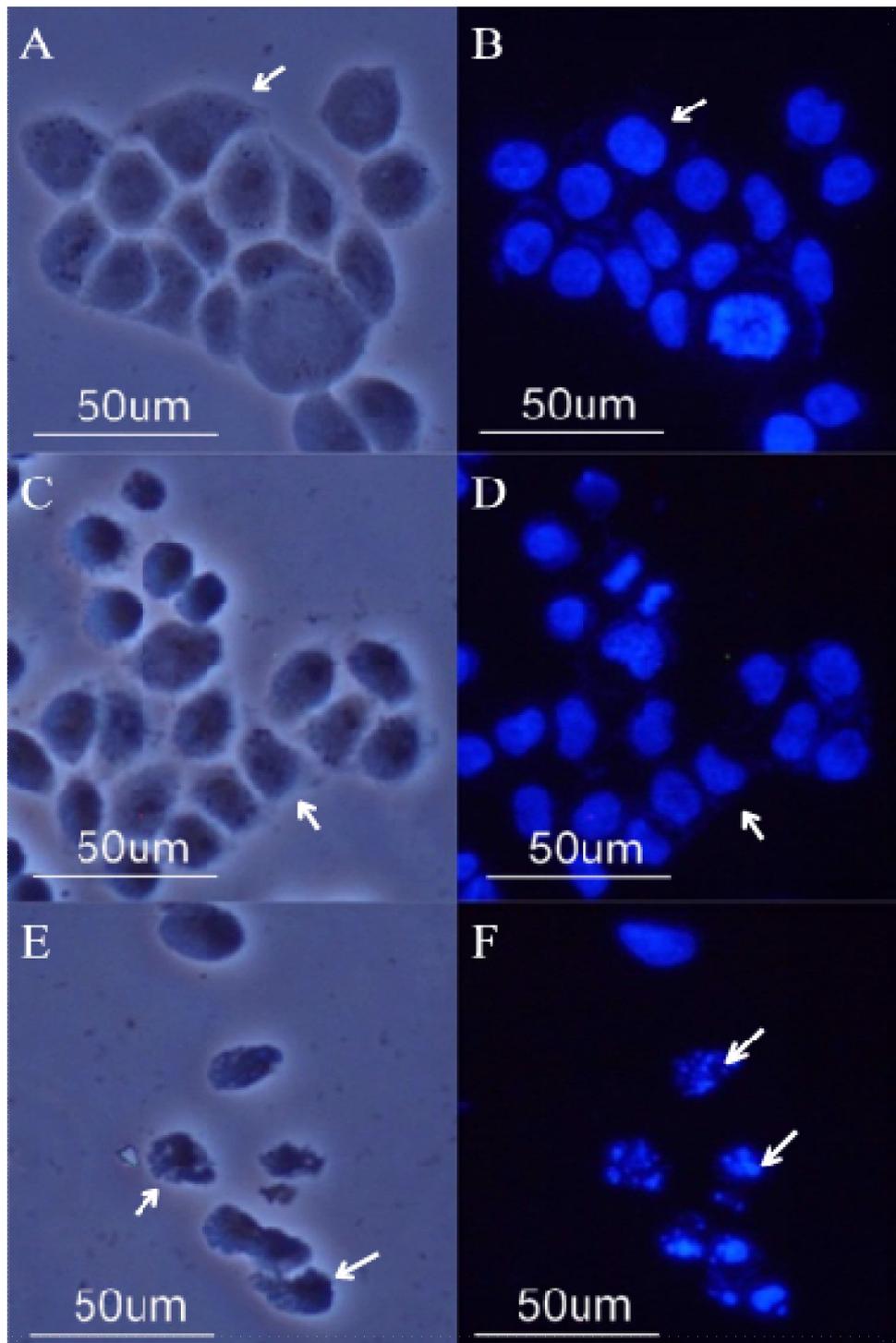


Figura 14. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la morfología celular y nuclear de la línea de cáncer de cérvix HeLa. A, C y E: Fotografías en contraste de fases; B, D y F: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. A y B: Células sin tratamiento (Control); C y D: Células tratadas con 2.25 $\mu\text{l/ml}$ de Etanol-DMSO 1:3; E y F: Células tratadas con 22.56 $\mu\text{g/ml}$ de Diosgenina-3-glu. A, B, C y D: Las flechas indican células con morfología poliédrica y núcleos grandes. E: Se aprecia la formación de protrusiones en la membrana celular así como la formación de cuerpos apoptóticos; F: se aprecia condensación de cromatina así como fragmentación nuclear.

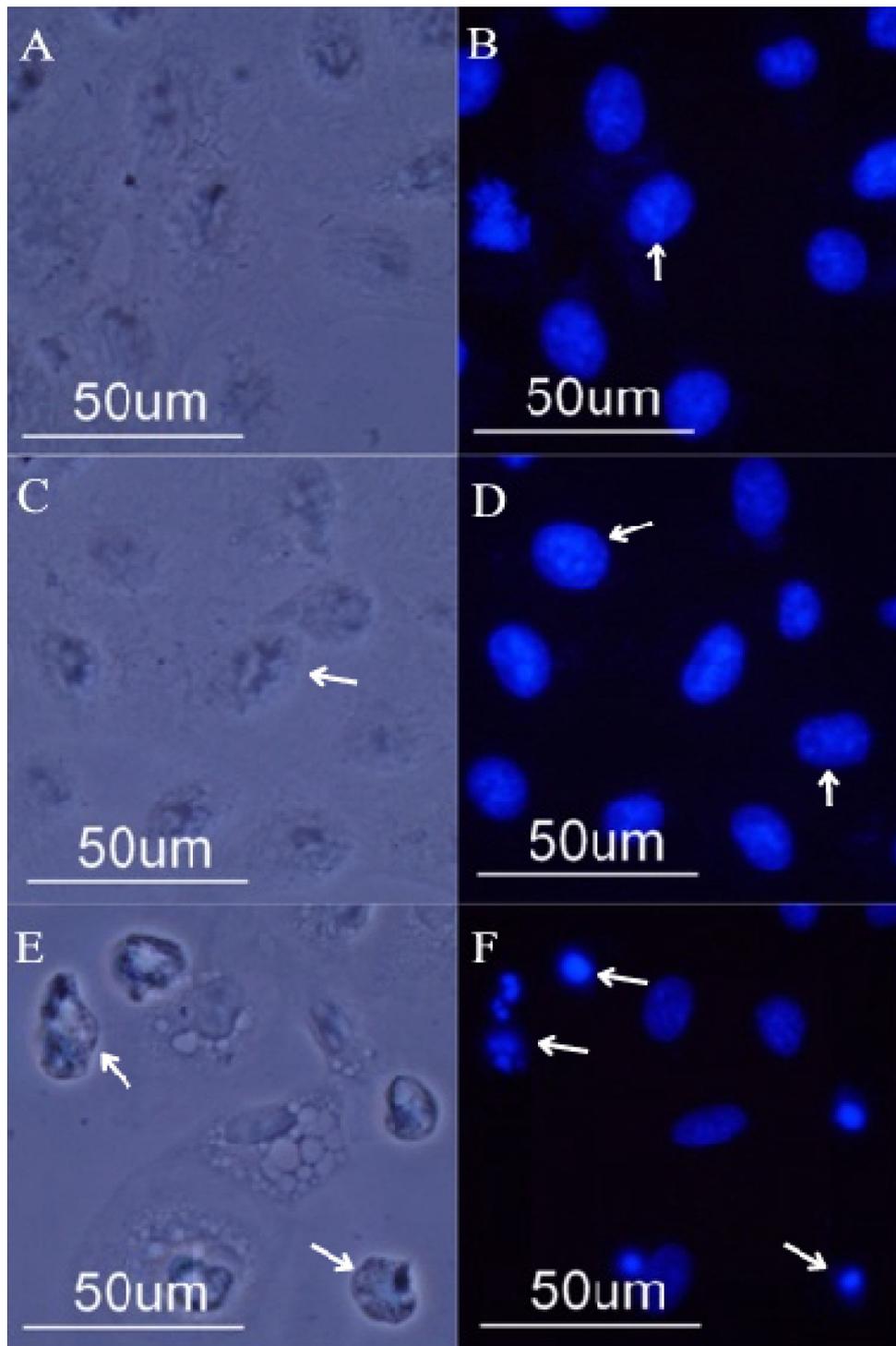


Figura 15.- Efecto de la Diosgenina-3-glu en la morfología celular y nuclear de la línea de cáncer de cérvix ViBo. A, C y E: Fotografías en contraste de fases; B, D y F: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. A y B: Células sin tratamiento (Control); C y D: Células tratadas con 1.49 μ l/ml de Etanol-DMSO 1:3; E y F: Células tratadas con 14.19 μ g/ml de Diosgenina-3-glu. A, B, C y D: Las flechas indican células con morfología poliédrica y núcleos grandes. E: Se aprecia la formación de protrusiones en la membrana celular así como la formación de cuerpos apoptóticos; F: se aprecia condensación de cromatina así como fragmentación nuclear.

Los resultados obtenidos, mostrados en las Figuras 13, 14 y 15, establecen que el fitoesteroide afecta la morfología de las células HeLa, CaSki y ViBo, observando en las fotografías de contraste de fases que las células no tratadas presentan forma poliédrica con proyecciones citoplasmáticas, en su totalidad se encuentran bien adheridas con citoplasma abundante, casi transparente y vacuolado, los núcleos tienen forma redonda y bien definida ocupando poco más de la mitad del volumen celular y con nucléolos bien delimitado. La observación de núcleos marcados con DAPI, muestran núcleos con una forma esférica de bordes bien definidos, los puntos más brillantes correspondientes a la cromatina perinuclear, de tamaños diversos y se encuentran distribuidos en toda el área del núcleo (Figuras: 13, 14 y 15: A, B, C y D). Sin embargo, las células tratadas con la saponina presentan forma redonda, de menor tamaño, con el volumen del citoplasma reducido hasta ser casi imperceptible, con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas características de la adhesión celular, indicando una disminución de la adherencia, los núcleos son compactos con nucléolos poco definidos. La observación de núcleos marcados con DAPI de las células tratadas, muestran núcleos de menor tamaño y/o fragmentados que indican condensación de la cromatina y/o fragmentación del DNA que forman cuerpos apoptóticos y la cromatina perinuclear ha desaparecido casi totalmente, características morfológicas típicas de células apoptóticas (Figuras 13, 14 y 15: E y F).

Con el fin de concluir que la Diosgenina-3-glu induce a las células tumorales a una muerte apoptótica y partiendo del hecho que la saponina induce a las células tumorales a expresar una morfología celular y nuclear característica de células apoptóticas, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con el fitoesteroide a las concentraciones de las IC_{50} respectivas, la expresión de la caspasa 3 activa, así como la fragmentación del ADN fueron evaluados por inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente (Figuras 16 a 21).

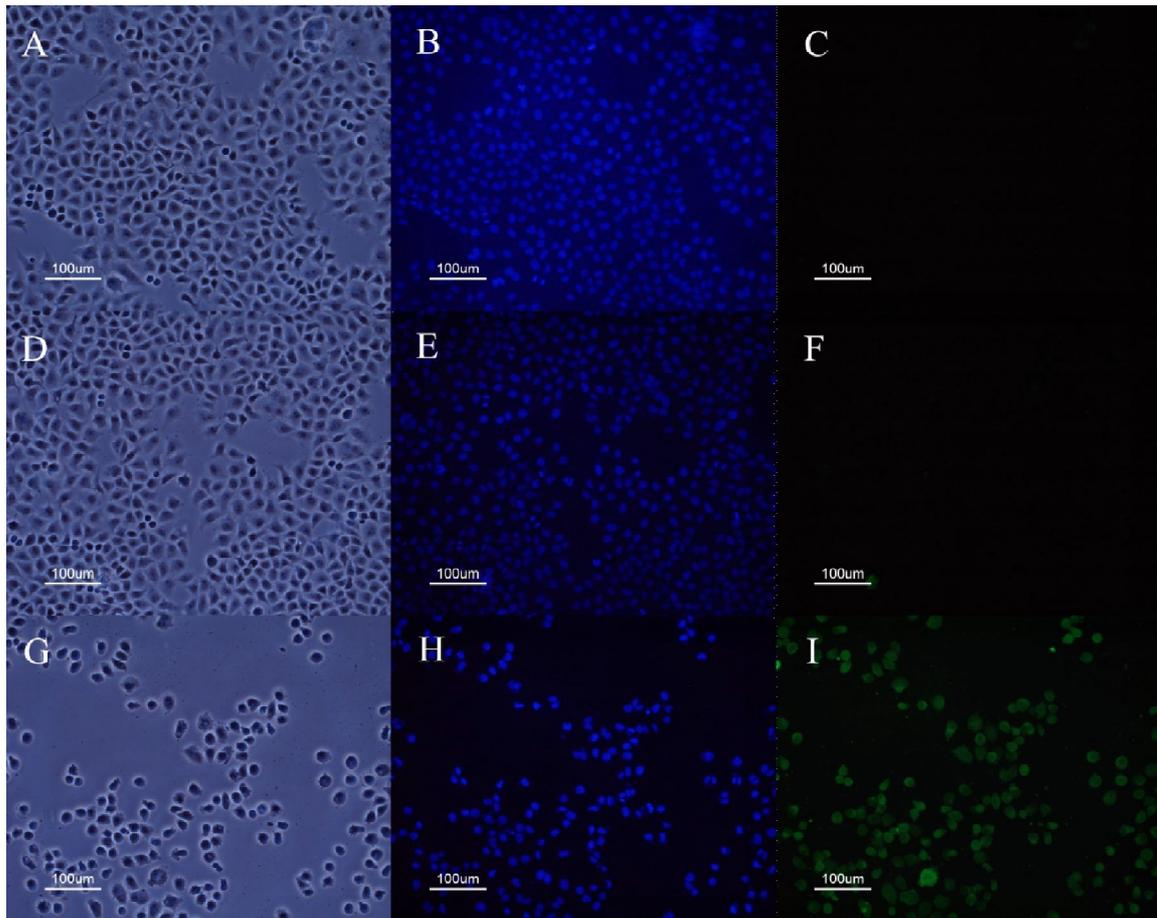


Figura 16. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la activación de la caspasa 3 en células tumorales de cérvix CaSki. A, D y G: Fotografías en contraste de fases; B, E y H: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. C, F e I: Fotografías de epifluorescencia marcadas con FIT-C. A, B y C: Células sin tratamiento (Control); D, E y F: Células tratadas con 2.25 µl/ml de Etanol-DMSO 1:3; G, H e I: Células tratadas con 22.56 µg/ml de Diosgenina-3-glu. I: La marca verde indica la expresión de la caspasa 3 activa.

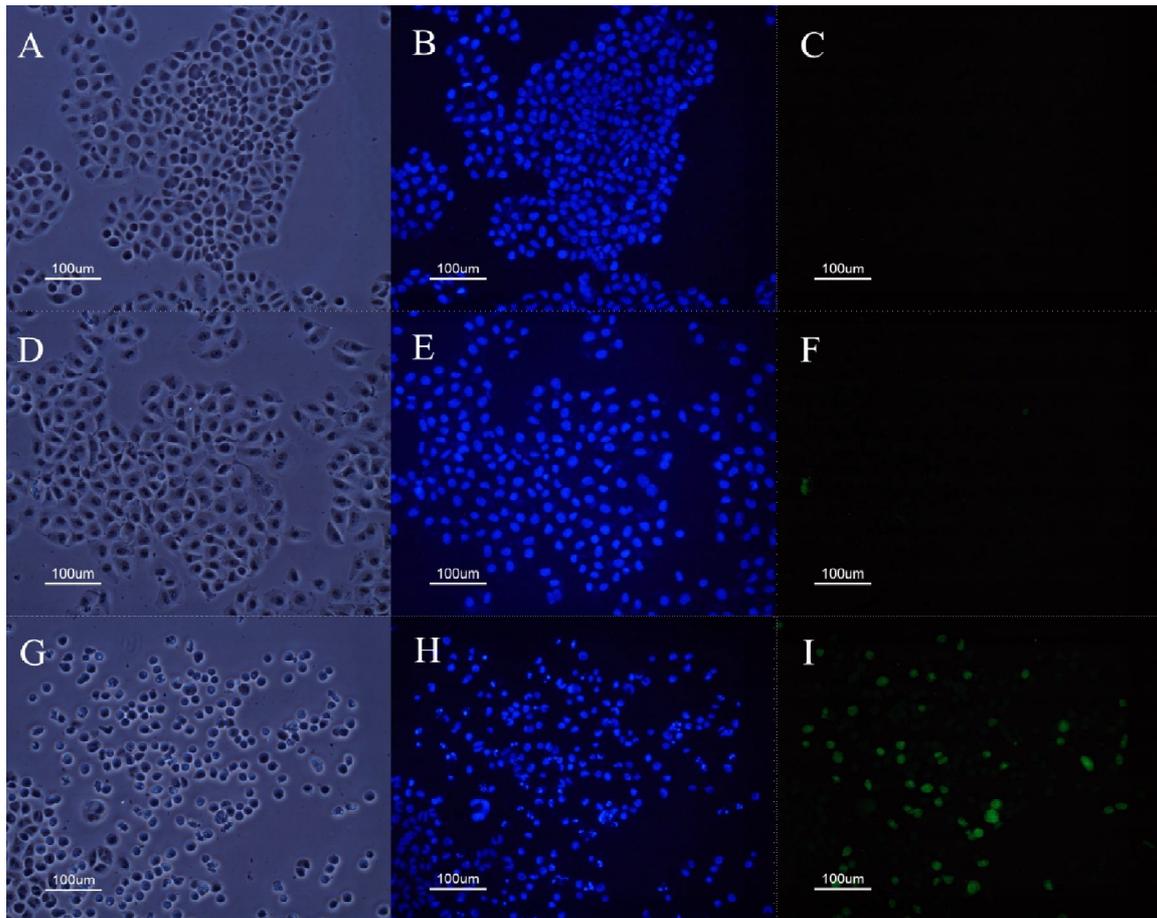


Figura 17. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la activación de la caspasa 3 en células tumorales de cérvix HeLa. A, D y G: Fotografías en contraste de fases; B, E y H: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. C, F e I: Fotografías de epifluorescencia marcadas con FIT-C. A, B y C: Células sin tratamiento (Control); D, E y F: Células tratadas con 2.48 µl/ml de Etanol-DMSO 1:3; G, H e I: Células tratadas con 24.85 µg/ml de Diosgenina-3-glu. I: La marca verde indica la expresión de la caspasa 3 activa.

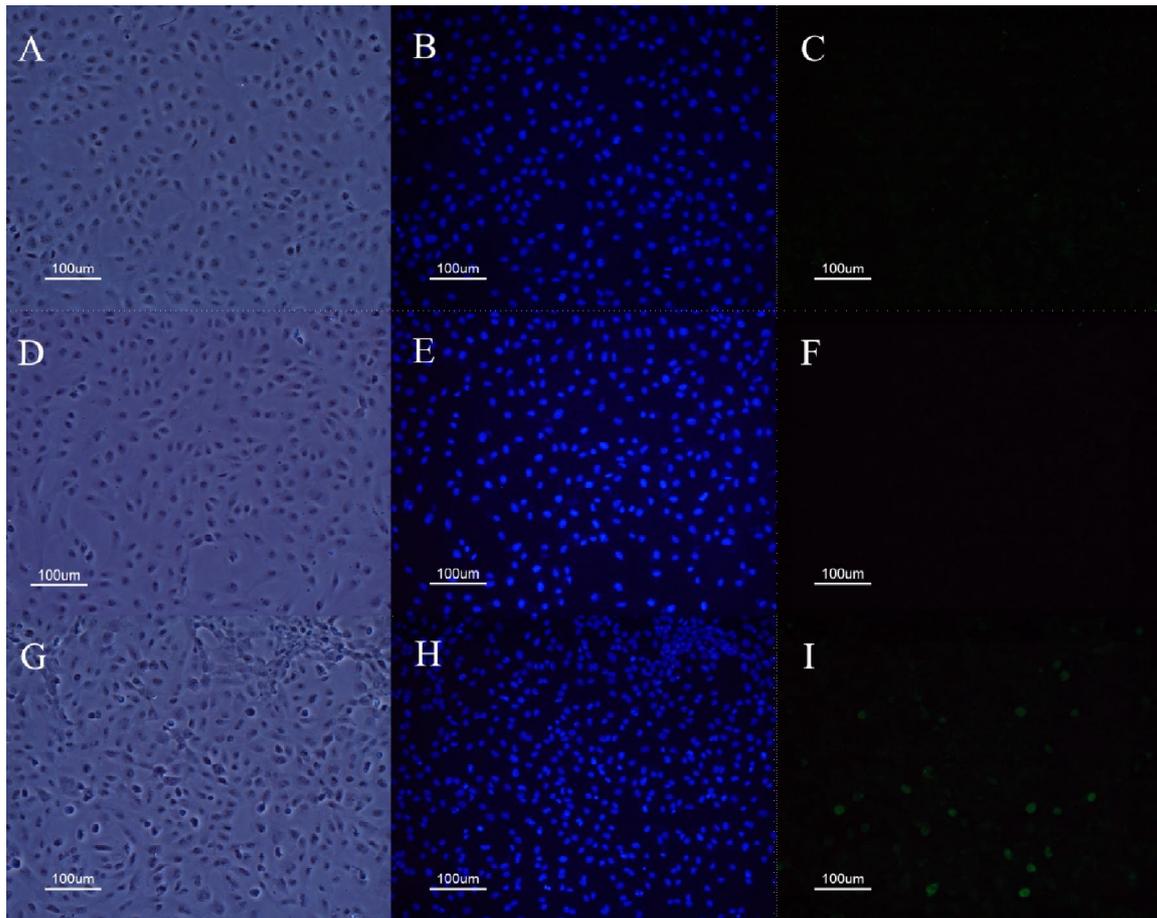


Figura 18. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la activación de la caspasa 3 en células tumorales de cérvix ViBo. A, D y G: Fotografías en contraste de fases; B, E y H: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. C, F e I: Fotografías de epifluorescencia marcadas con FIT-C. A, B y C: Células sin tratamiento (Control); D, E y F: Células tratadas con 1.41 $\mu\text{l/ml}$ de Etanol-DMSO 1:3; G, H e I: Células tratadas con 14.19 $\mu\text{g/ml}$ de Diosgenina-3-glu. I: La marca verde indica la expresión de la caspasa 3 activa.

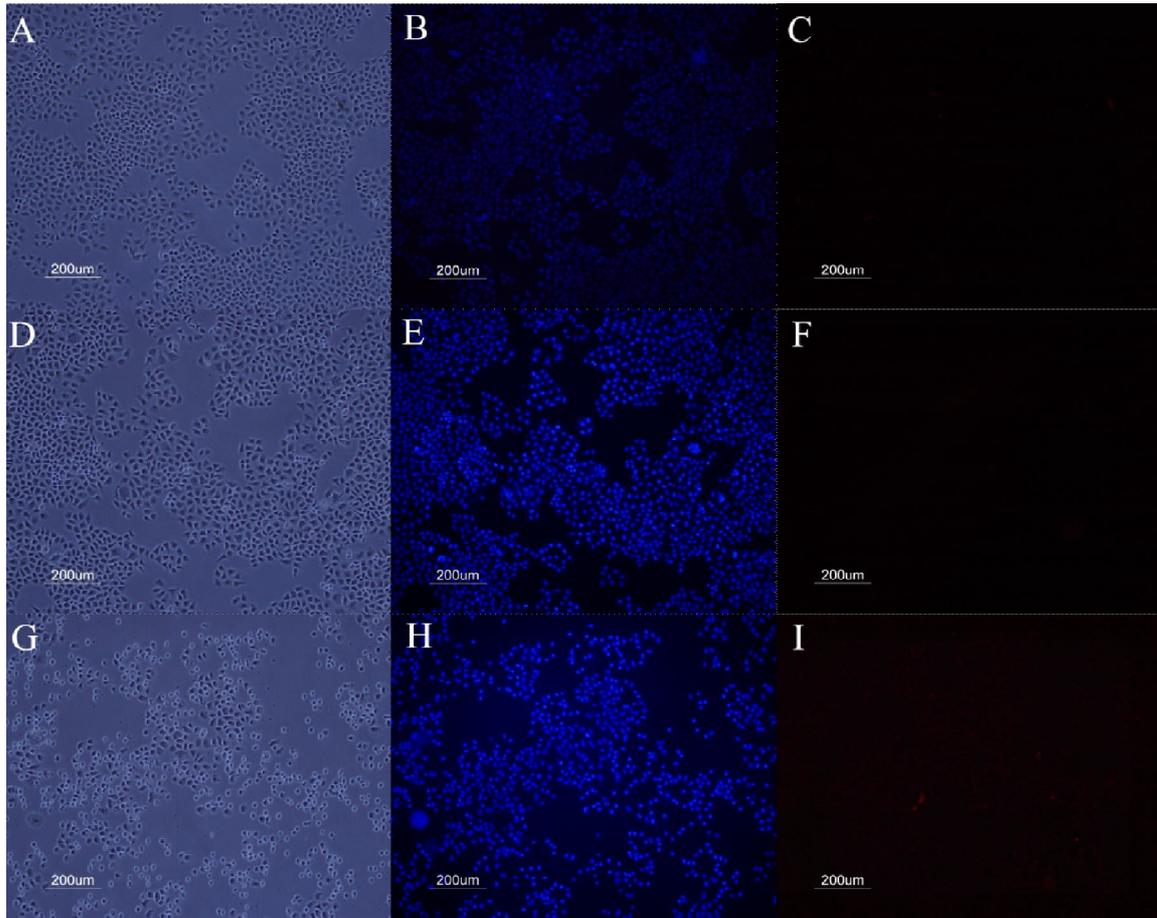


Figura 19. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la fragmentación del ADN en células tumorales de cérvix CaSki. A, D y G: Fotografías en contraste de fases; B, E y H: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. C, F e I: Fotografías de epifluorescencia marcadas con FIT-C. A, B y C: Células sin tratamiento (Control); D, E y F: Células tratadas con 2.25 µl/ml de Etanol-DMSO 1:3; G, H e I: Células tratadas con 22.56 µg/ml de Diosgenina-3-glu. I: La marca roja indica la fragmentación del ADN.

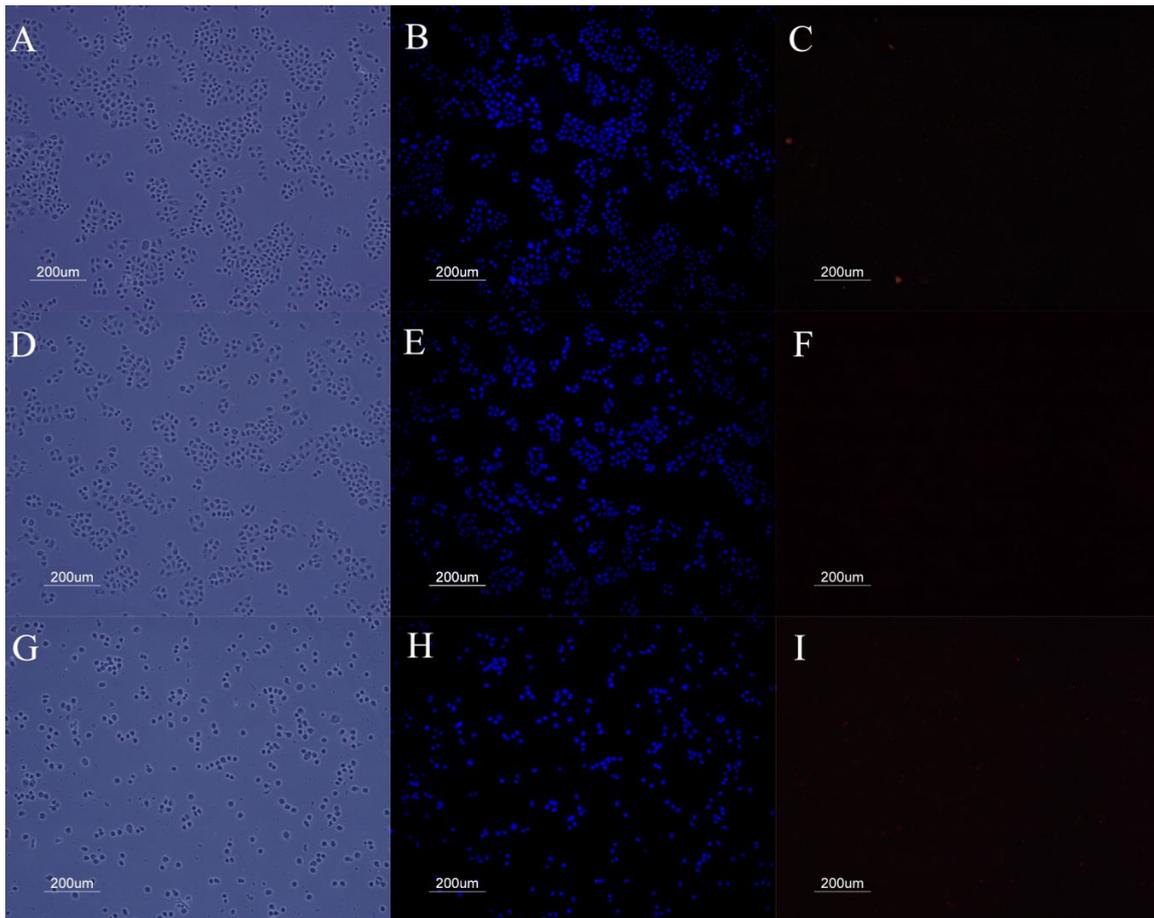


Figura 20. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la fragmentación del ADN en células tumorales de cérvix HeLa. A, D y G: Fotografías en contraste de fases; B, E y H: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. C, F e I: Fotografías de epifluorescencia marcadas con FIT-C. A, B y C: Células sin tratamiento (Control); D, E y F: Células tratadas con 2.48 µl/ml de Etanol-DMSO 1:3; G, H e I: Células tratadas con 24.85 µg/ml de Diosgenina-3-glu. I: La marca roja indica la fragmentación del ADN.

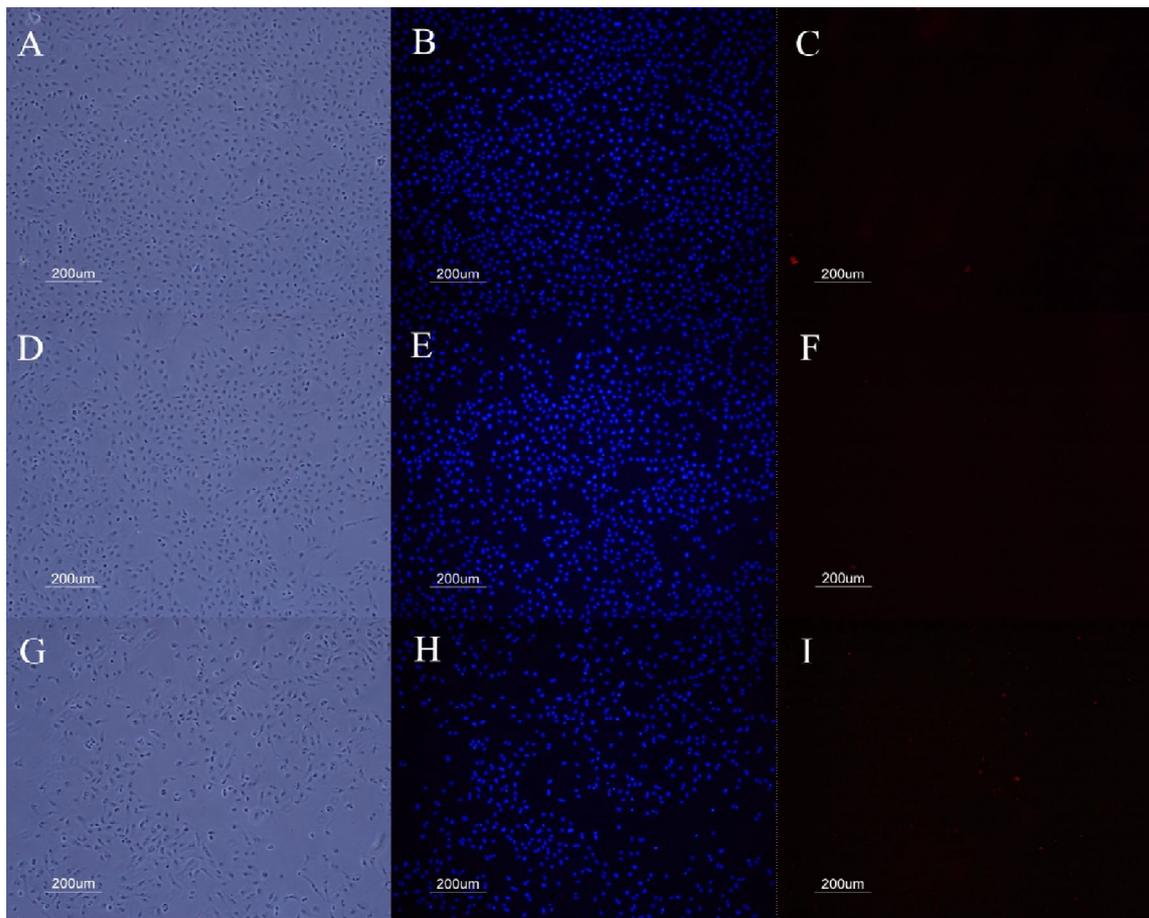


Figura 21. Efecto de la Diosgenina-3-glu en la fragmentación del ADN en células tumorales de cérvix ViBo. A, D y G: Fotografías en contraste de fases; B, E y H: Fotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI. C, F e I: Fotografías de epifluorescencia marcadas con FIT-C. A, B y C: Células sin tratamiento (Control); D, E y F: Células tratadas con 1.41 µl/ml de Etanol-DMSO 1:3; G, H e I: Células tratadas con 14.19 µg/ml de Diosgenina-3-glu. I: La marca roja indica la fragmentación del ADN.

Con base en los resultados obtenidos en las Figuras 15 a 20, se puede apreciar que las células tratadas con la Diosgenina-3-glu son inducidas a expresar la caspasa 3 activa así como a generar la fragmentación del ADN, confirmando que la Diosgenina-3-glu induce a las células tumorales a una muerte apoptótica.

Actividad antiproliferativa de la Diosgenina-3-glu en células no tumorales

Una de las características que se espera que presenten los compuestos antitumorales, es la selectividad. Debido a que los quimioterapéuticos actualmente en uso actúan indiscriminadamente tanto sobre células tumorales como células no tumorales. Con el fin de establecer si el

fitoesteroide Diosgenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica humana fueron tratados con 24.85 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto por 72 h, y el número celular fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, cuantificada por citometría de flujo. (Figura 22).

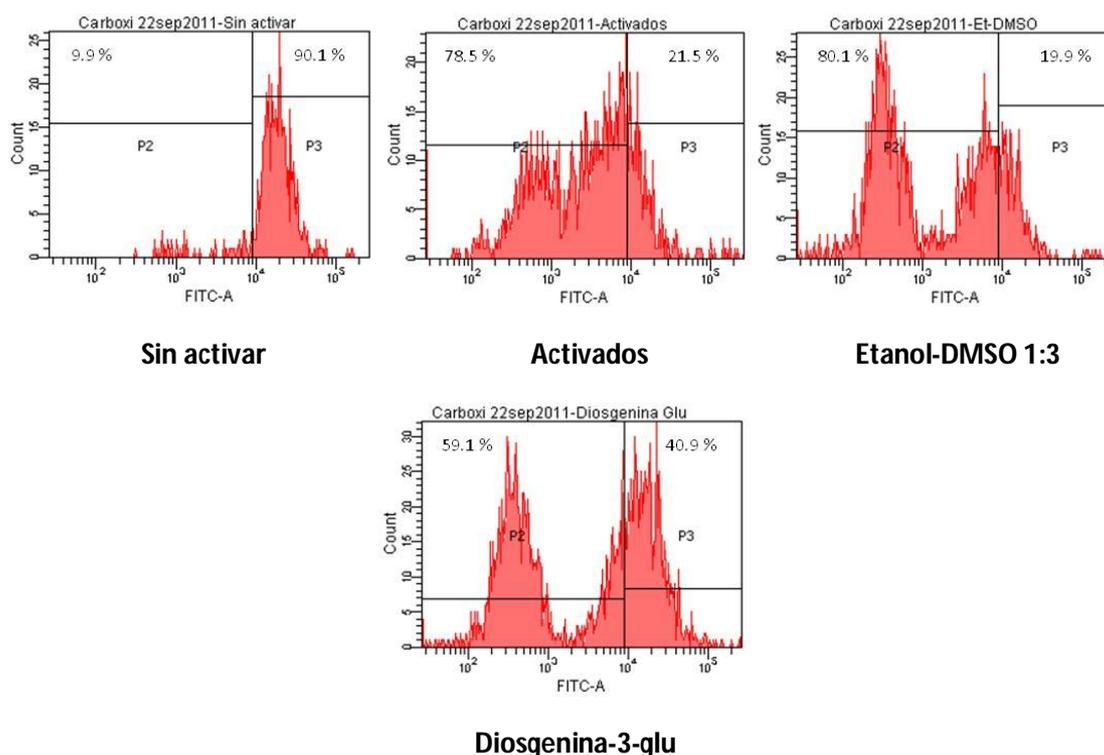


Figura 22.-Efecto de la Diosgenina-3-glu sobre la proliferación de cultivos de linfocitos de sangre humana. Los cultivos de linfocitos humanos fueron marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo. El gráfico muestra los resultados de un ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

Los resultados obtenidos en la Figura 22 muestran que la Diosgenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas en un 25% comparado con los linfocitos activados y/o con el vehículo. Los resultados muestran que existe una diferencia del efecto del compuesto sobre células no tumorales con respecto a su efecto sobre células tumorales, sugiriendo que puede existir cierta selectividad de la Diosgenina-3-glu.

Determinación del efecto citotóxico y/o necrótico de la Diosgenina-3-glu en cultivos de células linfocíticas

Con la intención de establecer si la Diosgenina-3-glu ejerce una acción citotóxica y/o necrótica en células no tumorales, cultivos de linfocitos de sangre periférica humana fueron estimulados con el fitoesteroide a una concentración de 24.85 $\mu\text{g/ml}$ por 72 h, y la actividad de la enzima LDH fue evaluada (Figura 23).

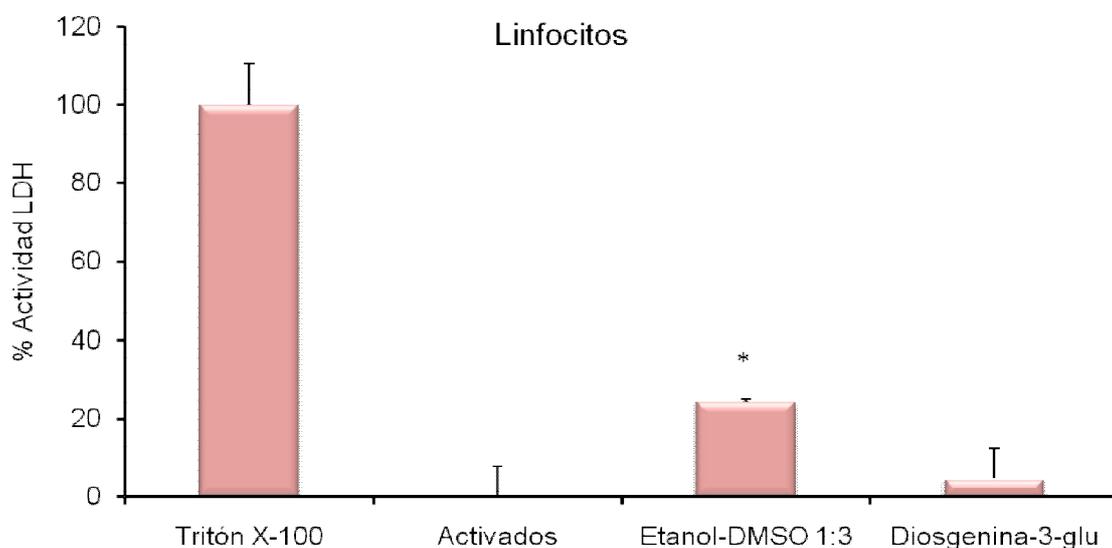


Figura 23.- Efecto citotóxico de la Diosgenina-3-glu sobre cultivos de linfocitos de sangre humana periférica. La actividad de la enzima LDH fue determinada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos tratados por 72 h con 24.85 $\mu\text{g/ml}$ de Diosgenina-3-glu (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey $p > 0.05$).

Los resultados mostrados en la Figura 23, establecen que la Diosgenina-3-glu no ejerce una acción citotóxica y/o necrótica en las células linfocíticas.

Discusión

Aproximadamente la mitad de los fármacos quimioterapéuticos son de origen natural, y se ha estimado que alrededor del 60 % de las nuevas entidades químicas presentadas de 1981 a 2002 en este campo, son productos naturales o derivados de un compuesto de origen natural (Fernández *et al.*, 2010).

Aunque la mayoría de los reportes se centran principalmente en aspectos de síntesis y caracterización química (Fernández *et al.*, 2009; Poza *et al.*, 2010), la exploración del efecto de las saponinas sugiere que el efecto antiproliferativo y el de sus derivados, puede ser la base de nuevos compuestos terapéuticos, ya que se ha encontrado que disminuyen la proliferación en diversas líneas celulares de cáncer.

Se ha reportado actividad antiproliferativa y apoptótica de la Diosgenina y Hecogenina, ambas sapogeninas esteroides, que han demostrado tener actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer humano, como en la línea de osteosarcoma humano 1547, en la línea leucémica K562, en la línea de cáncer de mama AU516, en las líneas de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo entre otras, este efecto antiproliferativo es llevado a cabo mediante la detención en alguna de las fases del ciclo celular y/o mediante la inducción de muerte celular por apoptosis (Corbiere *et al.*, 2003; Huo *et al.*, 2004; Raju *et al.*, 2004; Trouillas *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2010), como se ha descrito para las células de cáncer de mama MCF-7 (Li *et al.*, 2005) y en células humanas de tipo eritroleucemia (Léger *et al.*, 2004).

La estructura de las sapogeninas, como la Diosgenina, les confiere una baja solubilidad en sistemas acuosos además de presentar una actividad hemolítica de manera natural, características que limitan su estudio en cultivos celulares *in vitro*. Según reportes de Fernández y colaboradores (2012), la Diosgenina induce un decremento del número celular del 50 % generando muerte apoptótica en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de 81, 80 y 81 μM respectivamente, mientras que el 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido de hecogenina, presenta los mismos efectos en las líneas HeLa y CaSki a concentraciones de 129 y 136 μM . La Dioscina, saponina nativa en las plantas, presenta un efecto de IC_{50} sobre las líneas HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de 2.01, 2.01 y 2.88 μM respectivamente. Con respecto a la saponina Diosgenina-3-glu, ésta conservó y presentó un efecto antiproliferativo en las líneas celulares de CaCU: CaSki, HeLa y ViBo con unas IC_{50} de 60, 54 y 34 μM respectivamente, indicando que es más potente que la Diosgenina y menos potente que la Dioscina. Es relevante resaltar que la diferencia entre la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu es solo la glucosa añadida al carbono tres de la aglicona, lo cual sugiere que la glucosa no solo incrementa la solubilidad de la saponina, sino que además modula la magnitud de la actividad antiproliferativa presente en la Diosgenina. De igual manera, la presencia de tres azúcares en la Dioscina, la cual mostró la mayor actividad antiproliferativa, sugiere al igual que la Diosgenina-3-glu que los azúcares juegan un papel modulador de la magnitud de la actividad antiproliferativa mostradas en estas saponinas y sapogeninas.

Con respecto a la actividad citotóxica de las saponinas y/o sapogeninas, estudios revelaron que la diferencia en las estructuras de las saponinas, incluyendo el tipo y número de azúcares, el doble anillo, entre otros, influye en su efecto biológico (Trouillas *et al.* 2005). De acuerdo con Fernández *et al.*, 2009, la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado. Como se esperaba, las IC₅₀ de las saponinas fueron más bajas con respecto a las IC₅₀ de la sapogenina (agliconas), indicando que las saponinas presentan una actividad antiproliferativa más potente que las sapogeninas. La Dioscina que cuenta con un mayor número de azúcares (dos ramnosas unidas a una glucosa en el carbono 3), presentó las IC₅₀ más bajas. A su vez las IC₅₀ de la Diosgenina-3-glu (con una glucosa unida al carbono 3), son menores comparadas con las de la sapogenina: Diosgenina.

Estos resultados generan una fuerte relevancia de las saponinas y/o sapogeninas si se les compara con los agentes quimioterapéuticos que actualmente se usan para el tratamiento contra el cáncer, ya que éstos son sumamente citotóxicos y los efectos colaterales están asociados a la actividad citotóxica, sugiriendo que las saponinas y/o sapogeninas esteroides al ser de baja o nula actividad citotóxica sus efectos colaterales serían mínimos.

En lo que respecta a la actividad apoptótica de las saponinas y/o sapogeninas, Trouillas y colaboradores (2005) reportó que la Diosgenina a una concentración de 40 µM induce una muerte apoptótica generando la fragmentación del ADN a las 24 h, y que la Hecogenina a una concentración de 40 µM, inhibe en un 38 % la proliferación pero no induce muerte por apoptosis a las 24 h en células de osteosarcoma 1547, sugiriendo que la actividad apoptótica podría no presentarse en todas las saponinas y/o sapogeninas. Al respecto, la Diosgenina-3-glu induce una fragmentación del ADN en las líneas celulares HeLa, CaSki y VBo, acompañada de un incremento en la expresión de la caspasa 3, indicando que esta saponina induce a las células tumorales de CaCu a una muerte apoptótica.

Por otro lado, es conocido que el objetivo de la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer, es destruir a las células tumorales malignas mediante la inhibición de algunos de los mecanismos implicados en la división celular. En consecuencia, los compuestos antitumorales desarrollados a través de este enfoque son citostáticos o citotóxicos, donde la química ha jugado un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de fármacos contra el cáncer desde los principios de las terapias contra el cáncer. La química sintética se ha utilizado ampliamente para modificar dianas de medicamentos, especialmente los de origen natural. El fundamento para el uso de los fármacos antitumorales citotóxicos convencionales se basa en la teoría de que las células tumorales proliferan y se dividen rápidamente, por lo tanto son más sensibles a estos compuestos que las células no tumorales (Fernández *et al.*, 2010). Sin embargo, en el organismo existen células normales con una alta tasa de proliferación similar a la de las células tumorales, como lo son las células epiteliales del tubo digestivo, o células del sistema inmunológico como los linfocitos, que también se ven afectadas por este tipo de compuestos. De ahí la importancia de evaluar la selectividad de los candidatos de compuestos antitumorales.

En el tratamiento tradicional contra el cáncer, el sistema inmunológico se ve fuertemente afectado. Tanto la radioterapia como la quimioterapia pueden causar un efecto inmunosupresor e incluso se ha observado que el número de linfocitos en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento puede disminuir hasta en un 50 % (Dillman *et al.*, 1984). La mayoría de los trabajos enfocados en compuestos descritos con propiedades antitumorales, evalúan únicamente el efecto de éste sobre células tumorales. Camoutsis *et al.*, 2005, demostró que ninguno de los análogos de la Hecogenina sintetizados en dicho trabajo mostró actividad citotóxica, ni inhibidora sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana. Los resultados de la prueba con linfocitos de sangre periférica humana, muestran que la Diosgenina-3-glu no abate completamente su proliferación y presenta una baja citotoxicidad, que al compararse con las células tumorales, sugiere que la Diosgenina-3-glu presenta una acción selectiva, sin embargo, esto tendría que ser corroborado con otras técnicas y con más líneas celulares no tumorales. Es importante resaltar que las características encontradas en la Diosgenina-3-glu (antiproliferativo, no citotóxico, inductor de apoptosis en células tumorales de CaCu, ligeramente antiproliferativo y sin efecto citotóxico en células no tumorales) sugieren que esta saponina podría ser considerada como un fuerte candidato para ser evaluado en modelos *in vivo*, con la intención de establecer su potencial terapéutico como agente con actividad antitumoral.

Conclusiones

- La Diosgenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de las células tumorales CaSki, HeLa y ViBo de manera dependiente de la dosis con una IC_{50} de 22.56, 24.85 y 14.19 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, a las 24 h.
- La Diosgenina-3-glu a la concentración de 24.85 $\mu\text{g/ml}$ afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas no tumorales en un 20 % a las 72 h, sin acción citotóxica.
- La Diosgenina-3-glu genera apoptosis en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, induciendo la expresión de la caspasa 3 así como la fragmentación del ADN en las líneas de CaCu: HeLa, CaSki y ViBo.

Bibliografía

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2006, Introducción a la biología celular, 2a edición, Editorial Médica Panamericana, México, 740 pp.
2. Bégaud G, 2006, Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation: The effect of channel thickness on sorting performance, *Journal of Chromatography A.*, 1128(1):194-202.
3. Berek J y Hacker N, 2010, Oncología ginecológica, 5a edición, Editorial Lippincott, México, 912 pp.
4. Burdon T, Smith A, Savatier P, 2002, Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells, *Trends in Cell Biology*, 12(9): 432-438.
5. Burgués G, Pontones M, Vera D, Jiménez C, Ozonas M, 2005, Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga, *Actas Urológicas Españolas*, 29(9): 846-859.
6. Calzada A, Bueno A, Sánchez M, 2000, El inicio de la replicación del ADN, *Ciencia al día*, 3(1): 1-15.
7. Camargo M, Wiesner C, Díaz C, Tovar L, 2004, El cáncer: Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento, Instituto nacional de cancerología. República de Colombia.
8. Cai J, Liu M, Wang Z, Ju Y, 2002, Apoptosis induced by Dioscin in Hela cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(2):193-196.
9. Cameron R, 1995, *Oncología Práctica*, Editorial Medica Panamericana, 769 pp.
10. Camoutsis C, Trafalis D, Pairas G, Papageorgiou T, 2005, On the formation of 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity, *Il Farmaco*, 60:826-829.
11. Características principales de células eucariotas (Tomado y modificado de: <http://neetescuela.com/wp-content/uploads/2011/01/Diferencias-entre-las-celulas-eucariotas-y-procariotas-300x169.gif>; Consultada: 02 Dic 2012).
12. Corbière C, Battu S, Liagre B, Cardot P, Beneytout J, 2004, SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line, *Journal of Chromatography B*, 808(2):255-262.
13. De Toro G, 2006, Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular, VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Disponible en: <http://conganat.cs.urjc.es/index.php/conganat>.
14. Dilman R, 1984, "Immunoincompetence in Cancer Patients: Assessment by InVitro Stimulation Tests and Quantification of Lymphocyte Subpopulations, *Cancer*, 7:1484-1491.
15. Esquema de apoptosis y necrosis (Tomado y modificado de: "http://www.contrerasrobledo.com/docencia/UNIDAD_DOCENTE_DE_PATOLOGIA/Tema_5.html"; Consultada: 02 Dic 2012).
16. Fernández M, Sandoval J, López H, Sánchez L, 2009, Formation of the steroidal 3 β -hydroxy-6-oxo-moiety: Synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin, *Arkivoc*, 13:170-184.

17. Fernández M, Mohan S, López H, Hernández J, Pérez E, Escobar M, Sánchez L, Regla I, Pinto M, Sandoval J, 2010, Synthesis of the steroidal glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-12, 22-dioxo-5 α -cholestan-26-yl β -D-glucopyranoside and its anti-cancer properties on cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 3877-3886.
18. Fernández M, López H, Hernández J, Escobar M, Sánchez L, Pinto M, Sandoval R, 2012, Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54:721-727.
19. Gariglio P, 1995, Genética molecular del cáncer humano: virus y cáncer, *Ciencia y Desarrollo*, 20(120):65-74.
20. Grillo C, Martínez M, Morales B, 2008, Virus del papiloma humano: Aspectos moleculares y cáncer de cérvix, *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(4):310-315.
21. Hanahan D y Weinberg R, 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100:57–70.
22. Hostettmann K y Marston A, 1995, Saponins, Cambridge University Press, UK.
23. Huo R, Zhou Q, Wang B, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T, 2004, Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway, *Acta Pharmacol Sin*, 25:1077-1082.
24. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Disponible en: www.inegi.org.mx, Consultada: 11 Octubre 13.
25. Iracheta L, 2007, El suicidio y la muerte celular, *Rev. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101(2),133.
26. Jordan J, 2003, Apoptosis: Muerte celular programada, *OFFARM*, 22(6):100-106.
27. Kim Y y Zhao M, 2005, Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma, *Yonsei Med J*, 46(5):597–613.
28. Kueng W, Silber E, Eppenberger U, 1989, Quantification of cells cultured on 96-well plates", *Anal Biochem*, 182(1):16-9.
29. Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
30. Léger D, Liagre B, Corbiere C, Cook J, Beneytout J, 2004, Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA₂ and COX-2 overexpression, *International Journal of Oncology*, 25(3):555-562.
31. Lehmann P, Bolivar A, Marker R, 1973, Pioneer of the mexican steroid industry, *Journal Chemical Education*, 50(3):195-199.
32. Li J, Liu X, Guo M, Liu Y, Liu S, Yao S, 2005, Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of Diosgenina, *Analytical Sciences*, 21(5):561-564.
33. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J, 2005, *Biología celular y molecular*, 5ª edición, Editorial Medica Panamericana, México, 973 pp.
34. López F., 2002, El ciclo celular bien vale un galardón, *Ciencia*, Enero-Marzo:74-77.
35. López S y Lizano S, 2006, Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, *Cancerología*, 1(1): 31-55.
36. Maillat M, 2003, *Biología celular*, Editorial Masson, Barcelona, 548 pp.

37. Miyashita T y Reed J, 1993, Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line, *Blood*, 81:151-157.
38. McAnuff M, Omoruyi F, Asemota H, 2006, Intestinal disaccharidases and some renal enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*), *Life Sciences*, 78(22):2595-2600.
39. Ming J, Zhao W, Yong J, Wong N, Qing Y, 2005, Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis, *Cancer Chemother Pharmacol*, 55(1):79-90.
40. Mirunalini S y Shahira, 2011, Novel effects of Diosgenina: A plant derived steroids, *Pharmacologyonline*, 1: 726-736.
41. Moalic S, Liagre B, Corbiere C, 2001, A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells, *FEBS Lett*, 506(3):225-230.
42. Monroy G, Rangel C, Rocha Z, Trejo B, Ramírez G, Martínez R, Weiss B, 1992, Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1, *Revista Mexicana de Oncología*, 7:69-76.
43. Nakashima N, Kimura I, Kimura M, Matsuura H, 1993, Isolation of pseudoprotosaponin: Allil from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice, *J Nat Prod*, 56(3):345-350.
44. Narula A, Kumar S, Srivastava P, 2007, Genetic fidelity of in vitro regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera L*, a potential alternative source of diosgenin, *Biotechnology Letters*, 29(4):623-629.
45. Niwa A, Takeda O, Ishimaru M, Nakamoto Y, Yamasaki K, Kohda H, Nishio H, Segawa T, Fujimura K, Kuramoto A, 1998, Screening test for platelet aggregation inhibitor in natural products. The active principle of *Anemarrhena rhizome*, *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 108: 555-561.
46. Noguchi E, Fujiwara Y, Matsushita S, Ikeda T, Ono M, Nohara T, 2006, Metabolism of tomato steroidal glycosides in humans, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(9):1312-1314.
47. Organización Mundial de la Salud, Disponible en: <http://www.who.int>, Consultada: 02 Oct 13.
48. Pardo F, 1998, Anatomía patología general y especial de las neoplasias, Editorial Científico-Médico, España, 335 pp.
49. Poza J, Rodríguez J, Jiménez C, 2010, Synthesis of a new cytotoxic cephalostatin/ritterazine analogue from hecogenin and 22-epi-hippuristanol, *Bioorganic et Medicinal Chemistry*, 18:58-63.
50. Quezada M, 2007, El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias, *Contactos*, 65:5-12.
51. Raju J, Patlolla J, Swamy M, Rao C, 2004, Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenumgraecum* (Fenugreek), Inhibits Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci

- Formation in F344 Rats and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(8); 1392-1398.
52. Sánchez L y Diosdado F, 2003, Apoptosis: el fenómeno y su determinación, *TécPecu*, 41(1):49-62.
53. Taponjoug L, Ponou K, Teponno R, Mbiantcha M, Djoukeng J, Nguelefack T, Watcho P, Gomez A, Park H, 2008, In vivo anti-inflammatory effect of saponins and its derivatives isolated from *Dracaena mannii*, *Arch Pharm Res*, 31:653-658.
54. Trouillas P, Corbière C, Liagre B, Duroux J, Beneytout J, 2005, Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to Diosgenina, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(4):1141-1149.
55. Williams J y Gong H, 2007, Biological activities and syntheses of steroidal saponins: The shark-repelling pavoninins, *Lipids*, 42(1):77-86.
56. Yang C, Zhang Y, Jacob M, Khan S, Zhang Y, Li X, 2006, Antifungal activity of C-27 steroidal saponins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5): 1710-1714.

Apéndice

Composición del medio de cultivo RPMI-1640

Componente	mg / l
L-arginina (base libre)	200
L-asparagina	50
Ácido L-aspártico	20
L-cistina	50
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	300
Glicina	10
L-histidina (base libre)	15
L-hidroxiprolina	20
L-isoleucina	50
L-leucina	50
L-lisina HCl	40
L-metionina	15
L-fenilalanina	15
L-prolina	20
L-serina	30
L-treonina	20
L-triptofano	5
L-tirosina	20
L-valina	20

Biotina	0.2
D-Ca pantotenato	0.25
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
i-inositol	35
Nicotinamida	1
Riboflavina	0.2
Tiamina HCl	1
Vitamina B12	0.005
PiridoxinaHCl	1
Ácido p-aminobenzoico	1
KCl	400
MgSO ₄ 7 H ₂ O	100
NaCl	6 000
NaHCO ₃	2 200
Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	1 512
CaNO ₃ 4 H ₂ O	100
D-glucosa	2 000
Glutation reducido	1
CO ₂ fase de gas	5 %

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Gibco BRL, USA) 10.42 g

NaHCO₃ (Sigma Chem. USA) 2 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm. Se almacena a 4 °C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino o con suero de neonato de ternera, en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm.

Verseno

EDTA (Sigma Chem. USA) 0.40 g

NaCl (Sigma Chem. USA) 8.00 g

KCl (Sigma Chem. USA) 0.40 g

Tris (Sigma Chem. USA) 3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1,000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² durante 15 min. Se almacena a 4 °C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

MgCl₂ (Sigma Chem. USA) 0.10 g

CaCl₂ (Sigma Chem. USA) 0.10 g

NaCl (Sigma Chem. USA) 8.00 g

KCl (Sigma Chem. USA) 0.20 g

Na₂HPO₄ (Sigma Chem. USA) 2.16 g

KH₂PO₄ (Sigma Chem. USA) 0.20 g

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

Glutaraldehído(1.1%)

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

Solución cristal violeta (0.1 %)

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

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Desactivación de suero fetal bovino (SFB)

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