



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

“Actividad Antiproliferativa y Apoptótica del compuesto clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) sobre Líneas Celulares de Cáncer Cervicouterino”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

NELLY AVEITUA VILLEDA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Hugo López Muñoz



México D.F.,

Octubre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Sin especulación no hay ninguna nueva observación"

Charles R. Darwin

"Pies, ¿para qué los quiero si tengo alas para volar?"

Magdalena Carmen Frida Kahlo Calderón

DEDICATORIAS

Es un orgullo y una gran felicidad para mi saber que hoy lograre uno de mis sueños más grandes. Que el esfuerzo que hice cada año al fin tendrá una recompensa. En este tiempo en la universidad aprendí de mis errores, conocí cual es mi verdadero potencial y descubrí que la vida es más bonita cuando se trabaja por las cosas que uno quiere junto a personas de buen corazón. En este largo trayecto he conocido gente maravillosa con la que he pasado buenos momentos juntos y de quienes he aprendido cosas valiosas.

Dedico la presente, como agradecimiento al apoyo brindado durante estos años de estudio y como un reconocimiento de gratitud al haber finalizado esta carrera:

A mis Padres, Ricardo Azeitua y Manuela Villeda, porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar la más grande de mis metas. La cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir; con admiración y respeto. Viviré eternamente agradecida.

A mis hermanos, Fabiola y Jonathan, como una muestra de cariño y agradecimiento, por todo el apoyo brindado y porque hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida. Les agradezco la orientación que siempre me han otorgado.

A mi sobrino, Máximo, con un testimonio de gratitud por haber significado la inspiración que necesitaba para terminar mi carrera profesional.

A Daniel Hernández; tu amor cambió para bien mi vida, me hizo tener esperanzas y ser feliz. Gracias por quererme tal y como soy, te amo.

A mis amigos, aunque no lo diga, mi corazón recuerda cada gesto amable, cada favor y cada sonrisa que alegró mi vida. Gracias a todos los que hacen de mi vida la mejor.

Ésta Tesis fue realizada con apoyo del proyecto

PAPIIT: IN 222114 y del proyecto PAPIIME-

PE 206812.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme ser parte de su laboratorio, por todas sus enseñanzas, su paciencia. Digna labor y merecido reconocimiento por fomentar la educación de generación en generación, inculcando valores y sembrando el conocimiento, formando mejores personas.

Al Dr. Hugo López Muñoz, Por su entrega en mi aprendizaje, por compartir su sabiduría y por impulsarme a ser cada día mejor. Porque detrás de un gran Profesionista, hay un gran Maestro.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por sus enseñanzas durante mi formación en el laboratorio, su paciencia y sus valiosas aportaciones para concluir ésta Tesis.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su colaboración técnica en los ensayos inmunocitoquímicos de éste trabajo y por compartirme su experiencia y conocimientos.

A los miembros del jurado:

- § Dra. María E. Ayala Escobar
- § Dr. Hugo López Muñoz
- § M. en C. Luis Sánchez Sánchez
- § M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez
- § M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez

Por sus aportaciones y observaciones que enriquecieron el presente trabajo, permitiéndome concluir satisfactoriamente.

A la Dra. María Antonieta Fernández Herrera y al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, investigadores del laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por sintetizar y otorgar el compuesto para realizar éste trabajo.

ABREVIATURAS

| | |
|---|------------------|
| Disminuir la Densidad Celular en un 50% | IC ₅₀ |
| Cell Signaling Technology | CST |
| Organización Mundial de la Salud | OMS |
| Organización Panamericana de la Salud | OPS |
| Virus del Papiloma Humano | VPH |
| International Agency for Research on Cancer | IARC |
| Secretaría de Salud | SSA |
| American Cancer Society | ACS |
| Cancer Cérvico uterino | CaCu |
| Instituto Nacional de Estadística y Geografía | INEGI |
| Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios | ISSEMYM |
| Suero de Ternera Neonata | SNT |
| Suero Fetal Bovino | SFB |

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | I |
| Marco teórico | 2 |
| Ciclo Celular | 2 |
| <i>Control Del Ciclo Celular</i> | 3 |
| Muerte Celular | 4 |
| <i>Necrosis</i> | 4 |
| <i>Apoptosis</i> | 5 |
| <i>Vía extrínseca</i> | 5 |
| <i>Vía intrínseca</i> | 7 |
| Cáncer | 8 |
| <i>Cáncer Cérvico uterino</i> | 10 |
| Tratamientos | 14 |
| <i>Cirugía</i> | 15 |
| <i>Radioterapia</i> | 15 |
| <i>Quimioterapia</i> | 17 |
| Saponinas Esteroidales | 19 |
| <i>Hecogenina y Diosgenina</i> | 20 |
| <i>MF-II</i> | 23 |
| Planteamiento del problema | 24 |
| Justificación | 25 |
| Hipótesis | 25 |
| Objetivos | 26 |
| Método | 27 |
| Resultados | 32 |
| Discusión de resultados | 43 |
| Conclusión | 46 |
| Referencias | 47 |
| Apéndice I: Clasificación de las etapas del cáncer cérvico uterino | 52 |
| Apéndice II: Cirugías | 56 |
| Apéndice III: Preparación de reactivos | 60 |

Resumen

Actualmente se considera al cáncer como una de las principales causas de muerte en todo el mundo y el cáncer cérvico uterino representa el 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Como tratamientos para combatir ésta enfermedad se utilizan la cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales, desafortunadamente presentan selectividad limitada entre células tumorales y células normales, además de inducir una muerte por necrosis, generando graves efectos secundarios en los pacientes demeritando con ello su calidad de vida y además son ineficientes en estados avanzados de la enfermedad. Es por ello que entre la comunidad científica existe un creciente interés por analizar nuevos compuestos alternativos sobre todo de origen vegetal, capaces de eliminar dicha enfermedad afectando mínimamente a células no tumorales y disminuyendo con ello los efectos secundarios de la quimioterapia. Dentro de estas investigaciones se ha encontrado que algunos compuestos como las saponinas esteroidales y sus derivados, pueden presentar diversas actividades biológicas, entre las que destacan su poder antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral. En ese sentido se avaluó, en el presente trabajo, si el clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II), una saponina esteroideal derivada de la Diosgenina presenta actividad antiproliferativa, selectiva y apoptótica en líneas de células tumorales de cáncer cérvico uterino, HeLa, CaSki y ViBo así como la actividad antiproliferativa en linfocitos no tumorales de sangre periférica humana. Los resultados obtenidos mostraron que la saponina esteroideal afecta el potencial proliferativo de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo de una manera dosis dependiente con una IC_{50} de 25 $\mu\text{g/ml}$ para las líneas HeLa y CaSki y 50 $\mu\text{g/ml}$ para línea ViBo. La nula detección de LDH en los sobrenadantes de células tumorales así como no tumorales, sugiere que el fitoesteroide no induce muerte necrótica. Sin embargo, la observación de la disminución del tamaño celular, la formación de cuerpos apoptóticos, la detección de la Caspasa-3 activa y la fragmentación de ADN en los cultivos de células tumorales tratadas con la saponina, indican que el compuesto induce a dichas células a una muerte por apoptosis. Por lo anterior el clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) podría ser un candidato para ser evaluado como agente terapéutico, con acción selectiva contra el cáncer.

Marco Teórico

Ciclo Celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y su división. Para que ocurra una apropiada división y proliferación, toda célula eucariota debe seguir un correcto programa genético, el cual hace que esta pase por diferentes fases y culmine en la división celular. La progresión del ciclo en las células eucariotas se asocia con la expresión de un conjunto de genes específicos. Tales genes codifican para proteínas específicas que controlan la progresión del ciclo celular o funcionan en procesos metabólicos unidos a él. Para asegurar una apropiada división, las proteínas que están íntimamente involucradas en su regulación deben ser expresadas dentro de una ventana de tiempo en el ciclo celular (Rodríguez *Et al.*, 2004).

En un ciclo celular la célula se divide en dos, y cada una de las células formadas cuenta con los elementos estructurales y funcionales que le permiten repetir el proceso de crecimiento y división. Sin embargo, para que esto suceda se necesita la replicación del genoma, la distribución equitativa de la masa celular y una segregación precisa de cromosomas. La ejecución de esos eventos divide al ciclo celular en cuatro fases: crecimiento 1 (G1), síntesis (S), crecimiento 2 (G2) y mitosis (M). Una reproducción exacta de la célula requiere que esas fases y su secuencia estén coordinadas (Rodríguez *Et al.*, 2004).

La fase G1, llamada primera fase de crecimiento, se "inicia" con una célula que proviene de una división previa. Durante esta fase se capacita a la célula para crecer y producir todas las proteínas necesarias para la síntesis del ADN. La célula aumenta de tamaño y se sintetiza nuevo material citoplásmico, sobre todo proteínas y ARN (Rodríguez *Et al.*, 2004).

La fase S o de síntesis, es el periodo en que tiene lugar la duplicación del ADN. Cuando termina, el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares. Esto asegura que al dividirse cada una de las células tenga una copia completa de ADN (Rodríguez *Et al.*, 2004).

En la fase G2, segunda fase de crecimiento, se sigue sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y organelos, por lo que la célula aumenta de tamaño y hay cambios visibles en la estructura celular que nos indican el principio de la mitosis o división celular. Al periodo de tiempo que transcurre entre dos mitosis, y que comprende los periodos G1, S y G2, se le denomina interfase (Rodríguez *Et al.*, 2004).

La fase M o mitosis, es cuando ocurre la división nuclear y celular, en este periodo los cromosomas se separan y ocurre la citocinesis (Rodríguez *Et al.*, 2004).

Existe un estado llamado G0, el cual recibe ese nombre porque queda fuera del ciclo. En este estado la célula está "quiescente", es decir, no está en división, por lo que se encuentra fuera del ciclo celular. La célula puede permanecer en G0 por días, semanas, o incluso años antes que se divida otra vez. Una vez que recibe nuevamente señales, sobre todo extracelulares, son estimuladas a salir de G0 y entran a

G1 para iniciar un nuevo ciclo de división. Una vez que la célula "regresa" a G1 continuará las fases sucesivas del ciclo celular en las siguientes 12-24 horas (Rodríguez *Et al.*, 2004).

Control del ciclo celular

El control del crecimiento de células eucariotas y la división implica circuitos moleculares conocidos como "puntos de control" (fig. 1) que aseguran la sincronización apropiada de eventos celulares. El paso por un punto de control de una fase del ciclo celular a la siguiente requiere un conjunto coordinado de las proteínas que controlan el crecimiento celular y la integridad del ADN. La división celular incontrolada o propagación del ADN dañado pueden contribuir a la inestabilidad genómica y la tumorigénesis (Rodríguez *Et al.*, 2004).

El punto de control G1/S controla la progresión de las células a través del punto de restricción en la fase S de síntesis de ADN. Durante G1, el supresor de tumor Rb se une e inhibe el factor de transcripción E2F. La fosforilación de Rb por cinasas dependientes de ciclina (CDK) durante G1 induce la disociación de Rb y permite la transcripción mediada por E2F de los genes que promueven la fase S. En respuesta a las señales ascendentes, INK4 y los inhibidores de la familia Kip/Cip controlan la actividad de CDK y evita su entrada en la fase S. El daño del ADN activa las vías de respuesta a través de ATM/ATR y Chk1/2 cinasa para bloquear la actividad de CDK, dando lugar a la detención del ciclo celular y reparación del ADN o la muerte celular (Rodríguez *Et al.*, 2004).

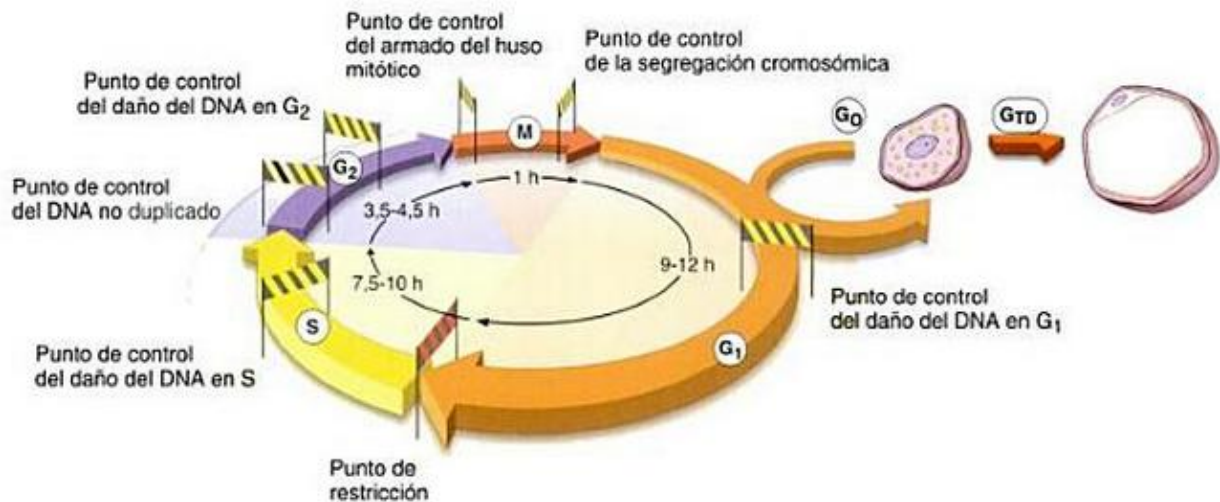


Figura 1: Ciclo celular y sus puntos de control. El diagrama ilustra el ciclo celular de las células de división rápida en relación con la síntesis de ADN. Después de la mitosis la célula entra en interfase. G₁ representa el periodo en que se produce una pausa en la síntesis de ADN. S corresponde al periodo durante el cual hay síntesis de ADN. G₂ es una segunda pausa en la síntesis de ADN. G₀ representa el camino que sigue una célula que ha dejado de dividirse; no obstante, esta célula puede reingresar en el ciclo celular después de un estímulo adecuado. La célula que está en G₀ puede sufrir una diferenciación terminal, G_{0D}, para establecer una población de células que nunca se dividirán (p. ej., adipocitos maduros). En el diagrama se indica la duración promedio de cada fase del ciclo celular. Cada fase contiene varios puntos de control que aseguran que el sistema solo progrese hacia la etapa siguiente cuando la etapa previa se haya complementado y ni se detecte daño del ADN. Tomado de Ross y Pawlina, 2007.

El punto de control G2/M evita que las células que contienen el ADN dañado entren en mitosis (M). CDKI Activado (cdc2), vinculado a la ciclina B promueve la entrada en la fase-M. Wee1 y Myt1 cinasas y cdc25 fosfatasa competitivamente regulan la actividad de CDKI; Wee1 y Myt1 inhiben CDKI y evitar su entrada en la fase-M, mientras que cdc25 elimina fosfatos inhibidores. El daño del ADN activa múltiples cinasas que fosforilan cinasas Chk1/2 y proteína p53 supresora de tumores. Chk1/2 cinasas estimulan la actividad Wee1 e inhiben cdc25C, impidiendo la entrada en la fase-M. La fosforilación de p53 promueve la disociación entre p53 y MDM2 y permite la unión del factor de transcripción al ADN (Rodríguez *Et al.*, 2004).

| Tipo de ciclina | Proteinacinasas dependiente de la ciclina asociada | Fase del ciclo celular en la que actúan | Proteínas efectoras sobre las que actúan |
|-----------------|--|---|---|
| Ciclina D | Cdk4/6 | Progresión de la fase G ₁ | Proteína supresora de tumores p53, proteína de susceptibilidad al retinoblastoma (pRb) |
| Ciclina E | Cdk2 | Entrada en la fase S | Proteinacinasas ATM _A o ATR _B , proteína supresora de tumores p53 |
| Ciclina A | Cdk2 | Progresión de la fase S | Proteína de replicación A (RPA), DNA polimerasa, proteína de mantenimiento de minicromosoma (Mcm) |
| Ciclina A | Cdk1 | Fase S a fase G ₂ y entrada en la fase M | Fosfatasa cdc25, ciclina B |
| Ciclina B | Cdk1 | Progresión de la fase M | Proteínas asociadas con la cromatina, histona H1, láminas nucleares, proteínas reguladoras de la miosina, proteínas centrosómicas, factores de transcripción <i>c-fos/jun</i> , <i>c-myb</i> , <i>oct-1</i> , SWI5, proteinacinasas p60src, caseincinasa II, proteinacinasas <i>c-mos</i> |

Figura 2: Reseña funcional de los complejos de ciclina-Cdk que participan en la regulación del ciclo celular humano. Tomado de Ross y Pawlina, 2007.

El centro de control asegura el apego de cromátidas adecuado antes de la progresión de la metafase a anafase. El SCF y complejos de proteínas APC/C juegan un papel importante, con APC/Cdc20 inicia la entrada en anafase promoviendo la degradación mediada por ubiquitina de múltiples sustratos, incluyendo ciclina B y la securina proteína reguladora (fig. 2) (Rodríguez *Et al.*, 2004).

Muerte Celular

Para que un organismo pluricelular se desarrolle y se mantenga con eficiencia no solo es esencial la división celular, que aumenta el número de células, sino también un proceso de muerte celular (Peralta-Zaragoza *Et al.*, 1997). Al respecto se ha reportado distintos tipos de muerte celular sin embargo dos de las más estudiadas y mejor caracterizadas son la muerte por necrosis y muerte por apoptosis.

Necrosis

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular (Vanlangenakker *Et al.*, 2008; Golstein and Kroemer, 2007). Desde el punto de vista morfológico se la ha definido como el espectro de cambios *post mórtem* en un tejido por la

acción progresiva de enzimas propias de las estructuras lesionadas (Vanlangenakker *Et al.*, 2008). El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica. Por microscopía electrónica se observan soluciones de continuidad en las membranas plasmática y los organelos y marcada dilatación mitocondrial con apariencia de grandes densidades amorfas. Los análisis histológicos evidencian células eosinofílicas por la unión más fuerte de la eosina con las proteínas citoplasmáticas desnaturalizadas y por la pérdida de la basofilia del citoplasma debida a los ácidos nucleicos.

Los cambios nucleares se deben a la fragmentación inespecífica del ADN, entre ellos se han descrito: picnosis nuclear o pérdida de volumen, ligera condensación del ADN, aumento de la basofilia nuclear, llamada cariorrexis, y cariólisis cuando ya no se detecta estructura cromatínica (Ramírez *Et al.*, 2010). Algunos de estos cambios se pueden observar *pre mórtem* en las células apoptóticas.

Apoptosis

La apoptosis es esencial para el desarrollo y homeostasis de los tejidos, participa en la respuesta inmune y en general en todos los procesos fisiológicos. En la mayoría de los casos la apoptosis no desencadena una respuesta inflamatoria. Algunos han acuñado el término *piroptosis* para definir la muerte celular debida a la activación de la caspasa 1, la cual está directamente relacionada con el procesamiento de las interleucinas IL-1 β e IL-18 (Fink and Cookson, 2005). Los cuerpos piroptóticos están asociados con procesos inflamatorios pero no están claras las diferencias en el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos y los piroptóticos ni las consecuencias que esto tenga en la respuesta inmune (Fink and Cookson, 2005).

En condiciones normales, las células fagocíticas, sean concurrentes al sitio de la muerte o espectadoras presentes en el momento en que se produce reconocen y eliminan los cuerpos apoptóticos; en este proceso, la unión de dichos cuerpos a receptores que reconocen la fosfatidilserina induce, en fagocitos mononucleares, activación M2, producción de citoquinas como la IL-10 y el TGF β que potencian las funciones de los mismos fagocitos, reclutamiento de fibroblastos y reconstrucción de la matriz extracelular (Kroemer *Et al.*, 2009; Kroemer and Levine, 2008; Fink and Cookson, 2005), lo que permite la reparación del tejido (Gray *Et al.*, 2007) y la activación de células B reguladoras (Gray *Et al.*, 2007). Sin embargo, sensores de ácido úrico activan el inflamosoma en la necrosis secundaria previniendo la activación M2 y la de células reguladoras (Peng *Et al.*, 2007).

Vía extrínseca

La apoptosis puede ser inducida a través de la activación de receptores de muerte (fig. 3) incluyendo Fas, TNF α R, DR3, DR4, DR5 y por sus respectivos ligandos. Los ligandos del receptor inician la señalización a través de la oligomerización del receptor, que a su vez resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras especializadas y la activación de cascadas de Caspasas. La unión del FasL induce trimerización de Fas, que recluta a la procaspasa-8 a través de la proteína adaptadora FADD. La caspasa-8 oligomerizada se activa vía autocatálisis. La caspasa-8 activada estimula la apoptosis a través de dos cascadas paralelas: se puede romper directamente y activar la caspasa-3, o,

alternativamente, se puede romper Bid, una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2. Bid incompleto (tBid) se transloca a la mitocondria, lo que induce la liberación del citocromo C, que secuencialmente activa la caspasa-9 y -3. TNF- α y el DR-3L pueden liberar señales pro o antiapoptóticas. Los receptores TNF α R y DR3 promotores de la apoptosis mediante las proteínas adaptadoras TRADD/FADD y la activación de la caspasa-8. Interacción del TNF- α con el TNF α R puede activar la ruta del NF- κ B mediante las NIK/IKK. La activación del NF- κ B induce la expresión de genes de supervivencia incluyendo las proteínas Bcl-2 y FLIP, esta última puede inhibir directamente la activación de caspasa-8. Los ligando FasL y TNF- α también pueden activar la cinasa JNK mediante las proteínas ASK1/MKK7. La activación de la cinasa JNK puede conducir a la

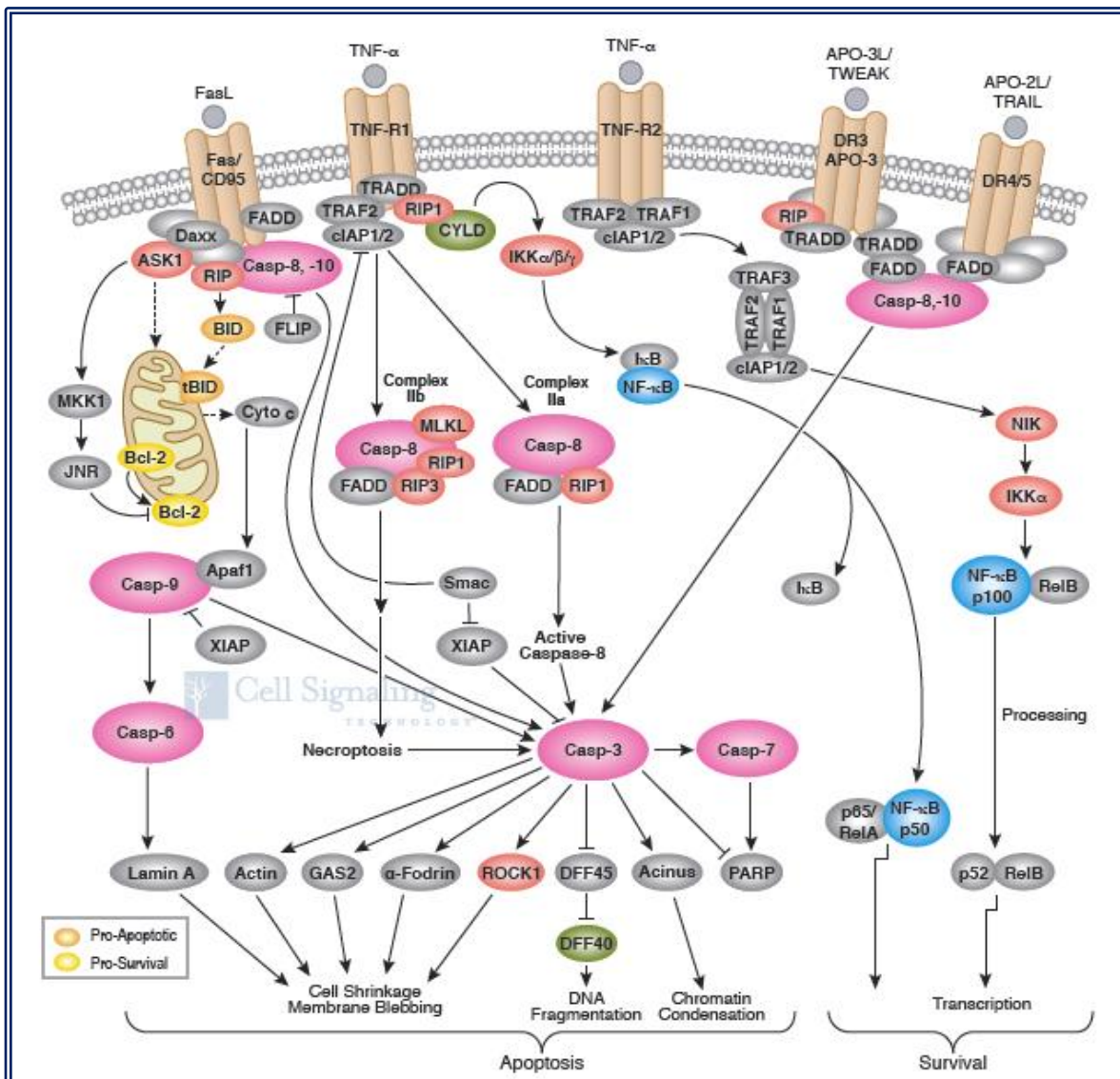


Figura 3: Esquema de apoptosis vía extrínseca. Tomada de <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-apoptosis-death>

inhibición de la proteína Bcl-2 por fosforilación. En la ausencia de activación de la caspasa, la

estimulación de los receptores de muerte puede conducir a la activación de una vía alternativa de muerte celular programada denominada necroptosis mediante la formación de complejo IIb (CST, 2014).

Vía intrínseca

La familia de proteínas Bcl-2 regulan la apoptosis mediante el control de la permeabilidad mitocondrial (fig. 4). Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL residen en la pared mitocondrial externa e inhiben la liberación del citocromo C. Las proteínas proapoptóticas Bcl-2 Bad, Bid, Bax y Bim pueden residir en el citosol, pero también se traslada a la mitocondria tras la señalización de muerte, donde promueven la liberación de citocromo C. La translocación de Bad a la mitocondria, forma un complejo proapoptótico con la proteína Bcl-xL. Esta translocación es inhibida por factores de supervivencia que inducen la fosforilación de Bad, conduce a la retención en citosol. La proteína Bid en el citoplasma es escindida por la caspasa-8 siguiendo la señalización a través del receptor Fas;

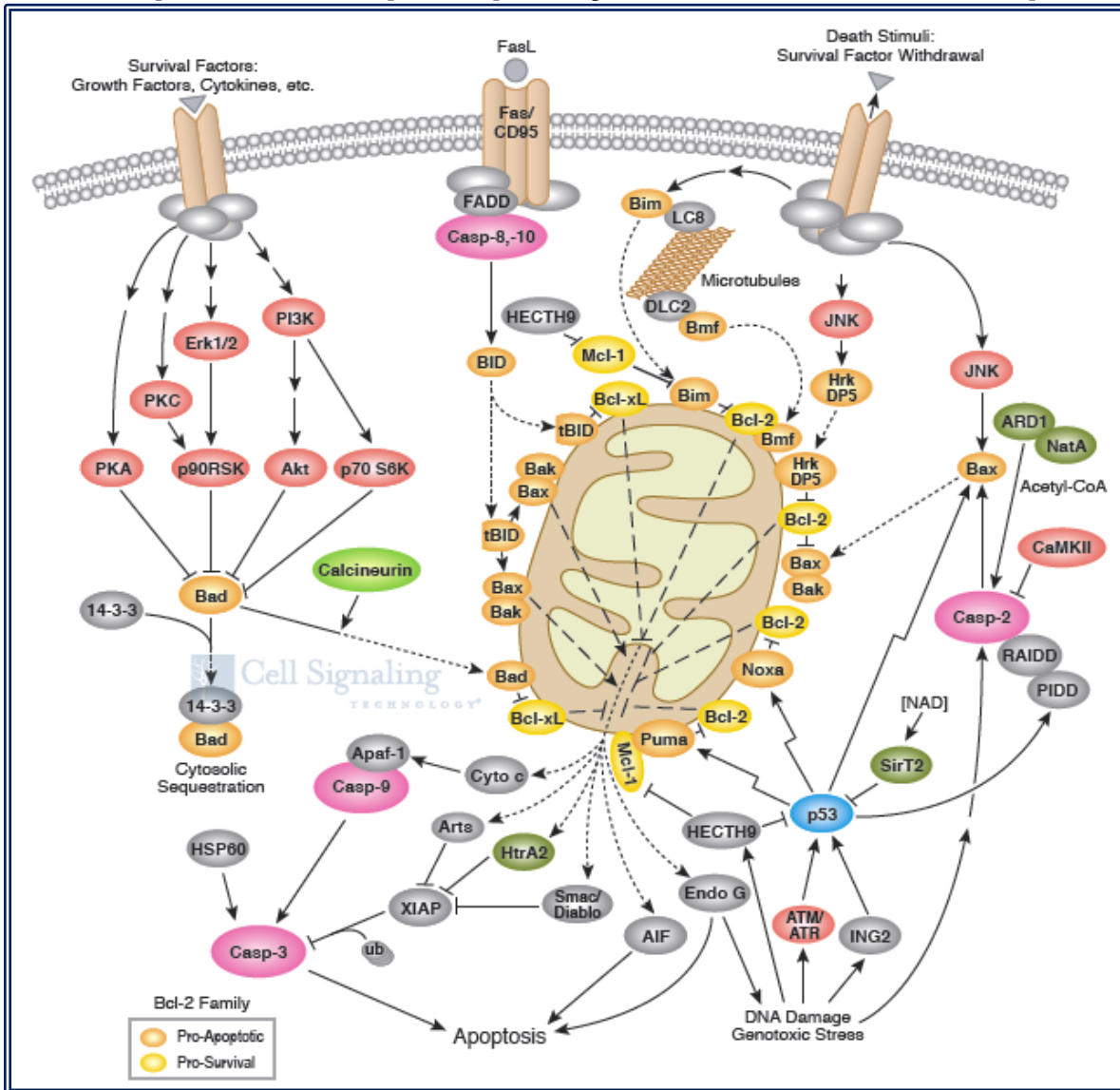


Figura 4: Esquema de la apoptosis vía intrínseca. Tomada de: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-apoptosis-control>

su fragmento activo (tBid) se transloca a la mitocondria. Las proteínas Bax y Bim se translocan a las mitocondrias en respuesta a los estímulos de muerte, incluyendo la retirada del factor de supervivencia. Activado tras el daño del ADN, p53 induce la transcripción de los genes Bax, Noxa, y PUMA. Tras la liberación de la mitocondria, el citocromo C se une a Apaf-I y forma un complejo con la activación de la caspasa-9. Aunque el mecanismo(s) de la regulación de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo C durante la apoptosis no se entienden completamente, Bcl-xL, Bcl-2, Bax y pueden influir en el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), que pueden desempeñar un papel en regulación de la liberación del citocromo C. Mule/ARF-BP1 es un daño de ADN activado por E3 ubiquitina ligasa para p53, y Mcl-I, un miembro de antiapoptótica de Bcl-2. (CST, 2014). La apoptosis es entonces un proceso altamente regulado que tiene como finalidad la eliminación de células que el organismo ya no necesita sin embargo, cuando existe alguna falla en este mecanismo de regulación las células pueden evadir la muerte por apoptosis generando enfermedades como el cáncer que pueden llegar a comprometer la vida del individuo.

Cáncer

El cáncer es el nombre general que se utiliza para denominar a un grupo de enfermedades que tienen en común la pérdida del control de funciones celulares fundamentales como la proliferación, la diferenciación y la muerte. Aunque hay muchos tipos de cáncer, todos tienen en común que en su origen algunos de los genes que son primeramente afectados son los que controlan los mecanismos de reproducción, ignorando las señales normales que el organismo les pone como restricción y aumentando, con ello, la probabilidad de que incidan en estas células nuevas mutaciones que les permitan generar ventajas selectivas sobre el resto de las células que forman el tejido. Otro de los controles que es alterado por la adquisición de mutaciones es la regulación de la muerte, ya que las células ignoran las señales apoptóticas que recibe del medio y generando estirpes celulares immortalizadas. Esto significa que el ADN dirige todas las funciones metabólicas de la célula y en una célula normal, cuando el ADN se afecta se repara el daño o la célula muere. En las células cancerosas el ADN dañado no se repara pero a pesar de ello la célula no muere, en cambio continúa produciendo nuevas células que el cuerpo no necesita. Estas nuevas células tienen el mismo ADN anormal como la primera y finalmente las células cancerosas adquieren la capacidad de invadir otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer generando con ello tumores (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

El cáncer es generalmente considerado como un proceso evolutivo que resulta de la acumulación de mutaciones somáticas en la progenie de una célula normal, lo que lleva a una ventaja de crecimiento selectiva en las células mutadas y en última instancia, a la proliferación incontrolada (Merlo *Et al*, 2006).

En las últimas décadas la investigación del cáncer ha caracterizado a los eventos celulares y moleculares que permiten la transformación maligna de las células que albergan alteraciones oncogénicas. Estos eventos incluyen: proliferación incontrolada; evasión de la eliminación de tumores, la inhibición de la muerte celular; creación de un microambiente en particular que contiene vasos sanguíneos, células del estroma e inmune, y la adquisición de potencial invasivo y metastásico (fig. 5) (Hanahan and Weinberg, 2011). Además, nuestro conocimiento de los oncogenes y los genes



Figura 5: Todas las células poseen una maquinaria que regula la proliferación, diferenciación y muerte. La última década ha sido testigo de notables progresos en la comprensión del fundamento de los mecanismos de cada característica del cáncer (Tomado de Hanahan and Weinberg, 2011)

supresores de tumores se ha enriquecido con el desarrollo de técnicas de secuenciación de nueva generación, que se han identificado muchos genes que están mutados en diferentes tipos de cáncer (Stratton, 2011). Aunque esta información es crítica en la comprensión de la base genética del desarrollo del cáncer y la progresión, el orden de adquisición de estas mutaciones y las células en las que se acumulan para permitir la formación del cáncer siguen siendo poco conocidos.

La OMS (2011) estimó que durante el 2008, la principal causa de muerte en el mundo fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama (INEG, 2011).

En América Latina, de acuerdo con la OPS (2011) durante el periodo 2007-2009, la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de alguna neoplasia maligna fue de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes; para la región, las tasas más altas se ubicaron en Uruguay (168.4), Cuba (143.3) y Perú (136.6); en contraste, México presentó la tasa más baja de Latinoamérica (75.4) resultado de

los esfuerzos que se han llevado a cabo en materia de prevención, atención oportuna y sensibilización entre la población (INEGI, 2011).

Para 2030, se espera que la carga mundial crezca a 21,4 millones de nuevos casos de cáncer y 13,2 millones de muertes por cáncer, simplemente debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como reducciones en la mortalidad infantil y la mortalidad por enfermedades infecciosas en los países en desarrollo (IARC, 2011)

Cáncer Cérvico uterino

La gran variación regional en las tasas de cáncer cérvico uterino refleja principalmente la disponibilidad de cribado con el Papanicaloau (Pap) (organizados o puntuales), que permite la detección y eliminación de las lesiones precancerosas. Las diferencias geográficas en la prevalencia del VPH, también desempeña un papel importante en la detención y eliminación de la enfermedad. En varios países occidentales, donde siempre se han establecido programas de detección, las tasas de cáncer cérvico uterino se han reducido hasta en un 65% en las últimas cuatro décadas (fig. 6). Por ejemplo, en Finlandia, las tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino se redujeron de 21.1 por 100,000 en 1966 a 7.3 por 100,000 en 2007. Las cifras también han disminuido en zonas de alto riesgo, entre ellos China, Corea y la India, en parte debido a la mejora de las actividades de detección y condiciones socioeconómicas, a pesar de la disminución en términos proporcionales eran mucho más pequeñas en comparación con las de los países occidentales (IARC, 2011).

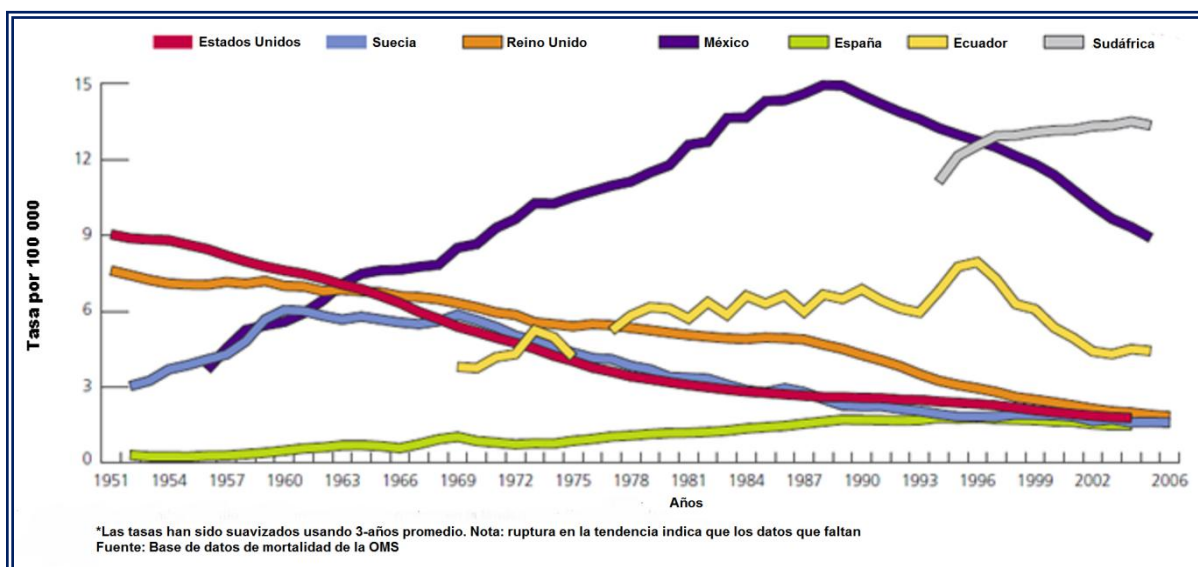


Figura 6: Tendencias en las tasas de mortalidad por cáncer de cuello de útero estandarizadas por edad en los países seleccionados. Tomado de: <http://www.who.int/cancer/treatment/es/>

La causa principal del cáncer cérvico uterino es la infección por ciertos tipos de VPH.

En México, de 1990 a 2000, se reportaron 48,761 defunciones, lo que representó un promedio de 12 mujeres fallecidas cada 24 horas, con incremento anual de 0.76%,(Caro and Zúñiga, 2009 y Tovar *Et al.*, 2008) aun cuando la Secretaría de Salud (2004) informó una reducción de la mortalidad a partir de 1998 a un ritmo de casi 5% anual. La cifra de fallecimientos por cáncer cérvico uterino para el año 2000 fue de 4,576, con una tasa de 20.1 por 100,000, y descendió a 4,024 para 2008, con una tasa de 14.0 por cada 100,000 mujeres (Fernández C. *Et al.*, 2011)

En estudios efectuados por la Secretaría de Salud se señala que para abatir la mortalidad por esta enfermedad es necesario alcanzar una cobertura de 80% en la detección en población blanco y asegurar el diagnóstico y tratamiento adecuados y oportunos en mujeres con resultados anormales de la citología cervical. Al respecto, la cobertura actual en el país, reportada por la SSA, es de sólo 43% (Fernández C. *Et al.*, 2011).

El cuello del útero es la parte inferior del útero (fig. 7), algunas veces se le llama “cuello uterino”. El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama *endocérvix*. La parte próxima a la vagina, es el *exocérvix* (*o ectocérvix*). Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células *escamosas* (en la *exocérvix*) y las *celulas glandulares* (en la *endocérvix*). Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado *zona de transformación*. La mayoría de los cánceres cérvico uterino se originan en la zona de transformación (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

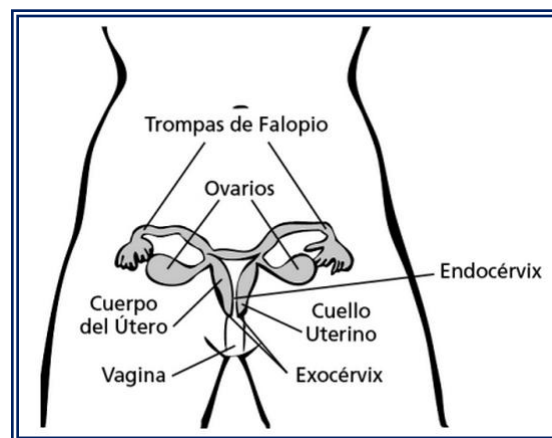


Figura 7: Partes del Aparato reproductor femenino. Tomado de: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/resumen/resumen-sobre-el-cancer-de-cuello-uterino-what-is-cervical-cancer>

La mayoría de los cánceres cérvico uterino se originan en el revestimiento de las células del cuello uterino. Estas células no se tornan en cáncer de repente, sino que las células normales del cuello uterino primero se transforman gradualmente con cambios precancerosos, los cuales se convierten en cáncer. Los médicos usan varios términos para describir estos cambios precancerosos, incluyendo *neoplasia intraepitelial cervical* (CIN, por sus siglas en inglés), *lesión intraepitelial*

escamosa (SIL, por sus siglas en inglés) y *displasia*. Estos cambios se pueden detectar mediante la prueba de Papanicolaou y se pueden tratar para prevenir el desarrollo de cáncer (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>)

Los cánceres cérvico uterino y los precánceres se clasifican de acuerdo al aspecto que presentan bajo el microscopio. Existen dos tipos principales de cáncer cérvico uterino: el *carcinoma de células escamosas* y el *adenocarcinoma*. Aproximadamente un 80% a 90% de los cánceres de cuello uterino son carcinomas de células escamosas. Estos cánceres se producen en las células escamosas que cubren la superficie del exocérvix. Cuando se examina con un microscopio, este tipo de cáncer está compuesto por células parecidas a las células escamosas. Los carcinomas de células escamosas se originan con mayor frecuencia donde el exocérvix se une al endocérvix (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

La mayoría de los otros cánceres cervicales son adenocarcinomas. Los adenocarcinomas cervicales parecen haberse vuelto más comunes en los últimos 20 a 30 años. Este se origina en las células de las glándulas productoras de mucosidad del endocérvix. Con menor frecuencia, el cáncer de cuello uterino tiene características tanto de los carcinomas de células escamosas como de los adenocarcinomas. Estos tumores se llaman *carcinomas adenoescamosos* o carcinomas mixtos (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

Aunque los cánceres cérvico uterinos se originan en células con cambios precancerosos (precánceres), sólo algunas de las mujeres con precánceres cérvico uterino padecerán cáncer. El cambio de precáncer cérvico a cáncer cérvico usualmente toma varios años, aunque puede ocurrir en menos de un año. En la mayoría de las mujeres, las células precancerosas desaparecerán sin tratamiento alguno. Aun así, en algunas mujeres los precánceres se convierten en cánceres verdaderos (invasivos). El tratamiento de todos los precánceres puede prevenir casi todos los cánceres verdaderos. Las mujeres con cánceres de cuello uterino en etapa temprana y precánceres usualmente no presentan síntomas. Estos a menudo no comienzan hasta que un cáncer se torna invasivo y crece hacia el tejido adyacente. Cuando esto ocurre, los síntomas más comunes son:

- » Sangrado vaginal anormal, tal como sangrado después del coito vaginal, sangrado después de la menopausia, sangrado y manchado entre periodos y periodos menstruales que duran más tiempo o con sangrado más profuso de lo usual. También puede ocurrir sangrado después de una ducha vaginal o después del examen pélvico.
- » Una secreción vaginal inusual (la secreción puede contener algo de sangre y se puede presentar entre sus periodos o después de la menopausia).
- » Dolor durante las relaciones sexuales (coito).

Estas señales y síntomas también pueden ser causados por otras condiciones que no son cáncer cérvico uterino. Por ejemplo, una infección puede causar dolor o sangrado (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

Los cambios precancerosos se dividen en diferentes categorías según la forma en que se ven las células del cuello uterino bajo el microscopio. La *clasificación por etapas* (estadios) o estadificación es el proceso para determinar hasta dónde se ha propagado el cáncer. Se utiliza la información de los exámenes y pruebas de diagnóstico para determinar el tamaño del tumor, hasta qué punto éste ha invadido los tejidos dentro o alrededor del cuello uterino y la propagación a los ganglios linfáticos u otros órganos distantes (metástasis). Este es un proceso importante porque la etapa del cáncer es el factor más relevante para seleccionar el plan de tratamiento adecuado (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

La etapa de un cáncer no cambia con el paso del tiempo, incluso si el cáncer progresa. A un cáncer que regresa o se propaga se le sigue conociendo por la etapa que se le asignó cuando se encontró y diagnosticó inicialmente, sólo se agrega información sobre la extensión actual del cáncer (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Un sistema de estadificación o clasificación por etapas es un método que utilizan los especialistas en cáncer para resumir la extensión de la propagación de un cáncer. Los dos sistemas utilizados para clasificar por etapas (estadios) la mayoría de los tipos de cáncer de cuello uterino, son el sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (fig. 8) y el sistema TNM de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) que son muy similares (APENDICE I). Los ginecólogos y los oncólogos ginecológicos usan el sistema FIGO. El sistema AJCC (en vigor en enero de 2010) clasifica el cáncer cérvico uterino basándose en tres factores: el alcance del cáncer (Tumor), si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos (Nódulos), y si se ha propagado a órganos distantes (Metástasis). El sistema FIGO usa la misma información (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Este sistema clasifica la enfermedad en etapas de 0 a IV. La clasificación por etapas o estados se basa en los hallazgos clínicos en vez de los hallazgos de la cirugía. Esto significa que la extensión de la enfermedad se evalúa por medio del examen físico realizado por el médico y algunas otras pruebas que se realizan en algunos casos, tales como la cistoscopia y la proctoscopia, no se basa en los hallazgos de la cirugía (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Cuando se hace una cirugía, podría verse si el cáncer se ha propagado más de lo que los médicos pensaban al principio. Esta nueva información podría cambiar el plan de tratamiento, pero no cambia la etapa de la paciente (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

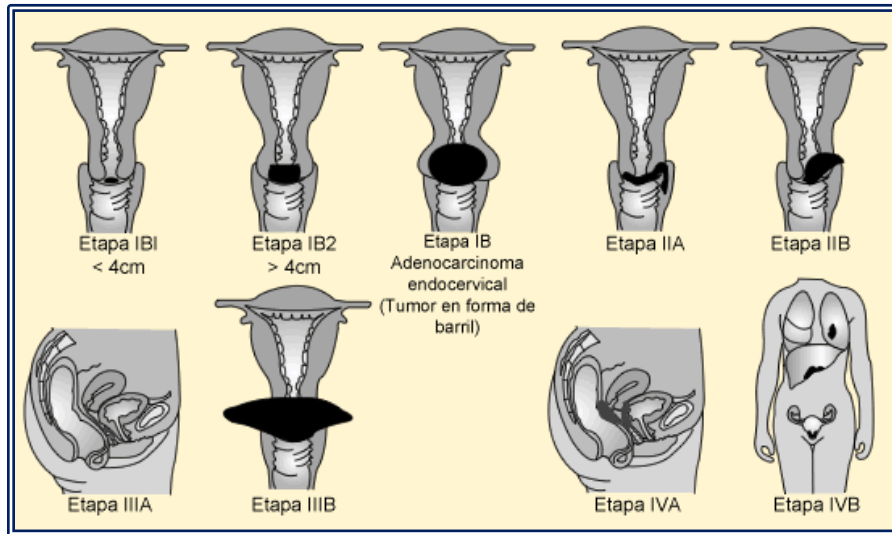


Figura 8: Clasificación de FIGO de los carcinomas cérvico uterinos. Tomado de <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tiposcancer/ginecologico/cervix?start=8>

Tratamientos

Las opciones para tratar a cada paciente con cáncer cérvico uterino dependen de la etapa de la enfermedad. La etapa de un cáncer describe su tamaño, la profundidad de invasión (cuán profundamente ha crecido hacia el cuello uterino) y hasta dónde se ha propagado (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

Después de que se ha establecido la etapa de cáncer de cuello uterino, el equipo médico le recomendará sus opciones de tratamiento. Aunque la elección del tratamiento depende en gran medida de la etapa de la enfermedad en el momento del diagnóstico, otros factores que pueden influir en las opciones son la edad, estado general de salud, circunstancias individuales y preferencias. El cáncer cérvico uterino puede afectar la vida sexual y la capacidad para tener hijos (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

Dependiendo del tipo y la etapa del cáncer, tal vez sea necesario más de un tipo de tratamiento. Los médicos en su equipo de atención al cáncer pueden incluir:

- » Un ginecólogo: médico que trata enfermedades del sistema reproductor femenino.
- » Un oncólogo especializado en ginecología: médico especializado en los cánceres del sistema reproductor femenino.
- » Un oncólogo especialista en radiación: un médico que usa radiación para tratar el cáncer.

» Un médico oncólogo: un médico que usa quimioterapia y otras medicinas para tratar el cáncer.

Puede que muchos otros especialistas también participen en la atención, incluyendo enfermeras practicantes, enfermeras, psicólogos, trabajadores sociales, especialistas en rehabilitación y otros profesionales de la salud (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Los principales objetivos de un programa de diagnóstico y tratamiento del cáncer son curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes, y garantizar la mejor calidad de vida posible a quienes sobreviven a la enfermedad (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Los tipos de tratamientos del cáncer cérvico uterino comunes incluyen: Cirugía, Radioterapia y/o Quimioterapia. A menudo se utiliza una combinación de tratamientos.

» Cirugía

Procedimiento en el que se extrae o destruye solo el tejido lesionado. Se puede extraer el resto del órgano y órganos cercanos (que estén dañados), de tal forma que después cicatriza y recupera su forma y función normal, en el mejor de los casos (APENDICE II) (ISSEMYM, 2014).

» Radioterapia

La radioterapia usa rayos X de alta energía para destruir las células cancerosas. Estos rayos X se pueden administrar externamente en un procedimiento que es muy parecido a la radiografía diagnóstica. Este procedimiento se llama *radioterapia de haz externo*. Este tratamiento por lo general toma de 6 a 7 semanas. Para el cáncer cérvico uterino, este tipo de radioterapia se administra a menudo con bajas dosis de un medicamento de quimioterapia llamado *cisplatino* (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Otro tipo de radioterapia recibe el nombre de *braquiterapia* o terapia de radiación interna. Para tratar el cáncer de cuello uterino en mujeres que se han sometido a una histerectomía, se coloca el material radiactivo en un cilindro dentro de la vagina. Para tratar a una mujer que aún conserva el útero, el material radiactivo se coloca en un pequeño tubo de metal llamado *tándem* que va dentro del útero, junto con pequeños soportes de metal redondos llamados *ovoides* colocados cerca del cuello uterino. A esto algunas veces se le llama *tratamiento con tándem y ovoides* (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Para tratar algunos cánceres, el material radiactivo se coloca en agujas delgadas que se insertan directamente en el tumor. Esta forma de braquiterapia no se usa con frecuencia en el tratamiento de cáncer de cuello uterino. Existen dos tipos principales de braquiterapia: tasa de baja dosis y tasa de

alta dosis. La braquiterapia con baja dosis se completa en sólo unos días. Durante ese tiempo, la paciente permanece acostada en el hospital con instrumentos que mantienen el material radiactivo en el lugar. La quimioterapia en altas dosis se administra de forma ambulatoria durante varios tratamientos. Para cada tratamiento con dosis alta, el material radiactivo se inserta por varios minutos y luego se remueve. La ventaja del tratamiento con alta tasa de dosis consiste en que no necesita permanecer inmóvil por períodos prolongados de tiempo (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Los efectos secundarios comunes de la radioterapia externa pueden incluir:

- » Cansancio (fatiga)
- » Problemas estomacales
- » Irritación en la vejiga (cistitis por radiación)
- » Menopausia prematura
- » Diarrea o deposiciones blandas o aguadas
- » Náuseas y vómitos
- » Ocasiona sensibilidad, dolor y/o secreción en vulva y vagina,
- » Cambios en los periodos menstruales
- » Puede ocasionar anemia y/o leucopenia
- » Estenosis vaginal (tejido cicatricial puede causar que la vagina sea más estrecha o incluso más corta, lo que ocasiona dolor durante la penetración vaginal).

Los cambios en la piel también son comunes. A medida que la radiación pasa a través de la piel hacia el tumor, puede dañar las células de la piel. Esto puede causar irritación que puede ir desde enrojecimiento leve temporal hasta la descamación. La piel puede liberar líquido que puede causar infección; por lo tanto, se debe tener cuidado en limpiar y proteger el área expuesta a la radiación. Estos efectos secundarios tienden a ser peores cuando la quimioterapia se combina con radiación (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

La sequedad vaginal y el dolor durante las relaciones sexuales pueden ser efectos secundarios a largo plazo de la radiación. Los estrógenos vaginales (locales) pueden ayudar con la sequedad vaginal y los cambios al revestimiento vaginal, especialmente si la radiación a la pelvis causó daño a los ovarios, provocando la menopausia temprana. La radiación a la pelvis también puede debilitar los huesos, lo que causa fracturas. Las fracturas de las caderas son las más comunes, y pueden ocurrir 2 a 4 años después de la radiación. Se recomiendan estudios de densidad ósea (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

El tratamiento de los ganglios linfáticos con radiación puede derivar en problemas con el drenaje de líquido en las piernas. Esto puede causar hinchazón severa en las piernas, una condición llamada *linfedema* (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

»» Quimioterapia

La quimioterapia es un término general que se refiere al uso de uno o más fármacos para el tratamiento del cáncer, que se inyectan en una vena o se administran oralmente. Estos medicamentos entran al torrente sanguíneo y pueden llegar a todas las áreas del cuerpo, lo que hace que este tratamiento sea útil para eliminar las células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo. A menudo, la quimioterapia se administra en ciclos, de manera que cada período de tratamiento va seguido de un período de recuperación (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Uno de los problemas de la quimioterapia estándar es que los fármacos funcionan atacando a células que se dividen activamente, tanto si son cancerosas como si no. Pero algunas células normales se dividen constantemente, de modo que son más propensas a dañarse por el efecto de la quimioterapia. El tipo de efectos secundarios que se producen dependen de muchos factores: los agentes utilizados, la combinación de fármacos, la dosis y tiempo de tratamiento, el estado de salud general del paciente, y el historial de quimioterapia aplicado con anterioridad (Murray, 2004).

La quimioterapia se puede recomendar en algunas situaciones, como para algunas etapas del cáncer de cuello uterino, la quimioterapia se administra para ayudar a que la radiación sea más eficaz. Cuando se administran la quimioterapia y la radioterapia juntas, se conoce como *quimiorradiación concurrente*. Una opción consiste en administrar una dosis del medicamento cisplatino cada semana durante la radiación. Este medicamento se administra por una vena alrededor de cuatro horas antes de la cita para recibir la radiación. Otra opción es administrar cisplatino junto con 5-fluorouracilo (5-FU) cada 4 semanas durante la radiación. También se utilizan otras combinaciones de medicamentos (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Algunas veces la quimioterapia se administra antes y/o después de la quimiorradiación. Para tratar el cáncer cérvico uterino que ha regresado después del tratamiento o que se ha propagado, la quimioterapia también se puede emplear para tratar cánceres que se han propagado a otros órganos y tejidos. También puede ser útil cuando el cáncer regresa después del tratamiento con quimiorradiación (ACS, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>).

Los medicamentos que se utilizan con más frecuencia para tratar el cáncer de cuello uterino incluyen:

- »» Cisplatino
- »» Carboplatino
- »» Paclitaxel (Taxol®)
- »» Docetaxel (Taxotere®)
- »» Ifosfamida (Ifex®)

- »» 5-fluorouracilo (5-FU)
- »» Irinotecán (Camptosar®)
- »» Mitomicina
- »» Topotecán
- »» Gemcitabina (Gemzar®)

Los medicamentos utilizados en la quimioterapia destruyen las células cancerosas pero también dañan algunas células normales, lo que puede resultar en ciertos efectos secundarios. Los efectos secundarios dependen del tipo y dosis de los medicamentos administrados, así como del período de tiempo durante el cual se administran (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Algunos efectos secundarios comunes de la quimioterapia pueden incluir:

- »» Náuseas y vómitos
- »» Neuropatía periférica
- »» Llagas en la boca
- »» Caída del cabello
- »» Falta de apetito
- »» Cansancio

Como la quimioterapia puede dañar las células hematopoyéticas en la médula ósea, los recuentos de células sanguíneas pueden bajar (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>). Esto puede resultar en:

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

Cuando se administra quimioterapia con radiación, a menudo los efectos secundarios son más graves. Asimismo, la náusea y el cansancio a menudo son peores. La diarrea también puede ser un problema si se administra quimioterapia al mismo tiempo que la radiación. También se pueden empeorar los problemas con los bajos recuentos sanguíneos. El equipo de especialistas en cáncer estará pendiente de los efectos secundarios y le puede administrar medicamentos para prevenirlos o ayudar a que se sienta mejor. También es posible que surjan otros efectos secundarios. Algunos de éstos son más comunes con ciertos medicamentos de quimioterapia (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

También existen cambios en los periodos menstruales, para las mujeres más jóvenes a quienes no se les ha extirpado el útero como parte del tratamiento, los cambios en los periodos menstruales son un efecto secundario común de la quimioterapia. La menopausia prematura (interrupción de los periodos menstruales) y la infertilidad (incapacidad para quedar embarazada) pueden ocurrir y ser permanentes. Algunos medicamentos de quimioterapia tienden a causar estas complicaciones más que otros. Mientras más edad tenga una mujer cuando recibe la quimioterapia, más probabilidades hay de que se vuelva infértil o que pase por la menopausia como resultado de este tratamiento. Cuando esto ocurre, existe un mayor riesgo de pérdida ósea y osteoporosis. Existen medicamentos que pueden tratar o ayudar a prevenir problemas con la pérdida ósea (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Quedar embarazada mientras recibe la quimioterapia podría causar defectos de nacimiento e interferir con el tratamiento. Por esta razón, es importante que las mujeres que no han pasado por la menopausia antes del tratamiento y que estén activas sexualmente hablen con sus médicos sobre el uso de anticonceptivos. Las pacientes que hayan terminado el tratamiento (como quimio) pueden tener hijos, pero puede ser peligroso quedar embarazada mientras se recibe el tratamiento (ACS, <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>).

Existen medidas naturales para reducir la toxicidad de la quimioterapia. También se han producido avances en el tratamiento, así los regímenes de tratamiento son menos tóxicos y más tolerables que en el pasado (Murray, 2004). Ante la situación contraproducente que pueden generar los tratamientos contra el cáncer mencionados anteriormente, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de nuevos compuestos que pudieran ser una alternativa para tratar esta enfermedad. Entre estos las *saponinas esteroideas*, parecen ser candidatos prometedores ya que se les atribuyen actividades biológicas importantes como su actividad antiproliferativa, antiinflamatoria y antitumoral.

Saponinas Esteroidales

Las *saponinas* son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados ampliamente distribuidos en animales, plantas y hongos. La química medicinal de las saponinas esteroideas ha generado una gran variedad de estructuras y actividades biológicas. Este grupo de productos naturales ha sido ampliamente estudiado en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones, diabetes y cáncer, entre otros (Fernández M. *Et al.*, 2012).

Las saponinas reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espuma, por esto se han utilizado ampliamente por sus propiedades detergentes. Esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares; tienen propiedades hemolíticas, son tóxicas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas (Anaya L. 2003).

Las saponinas esteroidales (fig. 9a) se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son: *Liliaceae* (*Agavaceae*), *Dioscoreaceae* y *Amaryllidaceae*. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias *Solanaceae* y *Scrofulariaceae* (Hernández *Et al.*, 2011).

Se ha reportado que la actividad de las saponinas está relacionada con la estructura, usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas, derivadas sintéticamente (Hong-Ji *Et al.*, 2006). Sin embargo, en la actualidad se pretende encontrar compuestos adecuados con propiedad antitumoral; esto es difícil ya que dicha actividad debe estar basada en el efecto selectivo que debe tener el compuesto entre las células tumorales y las normales.

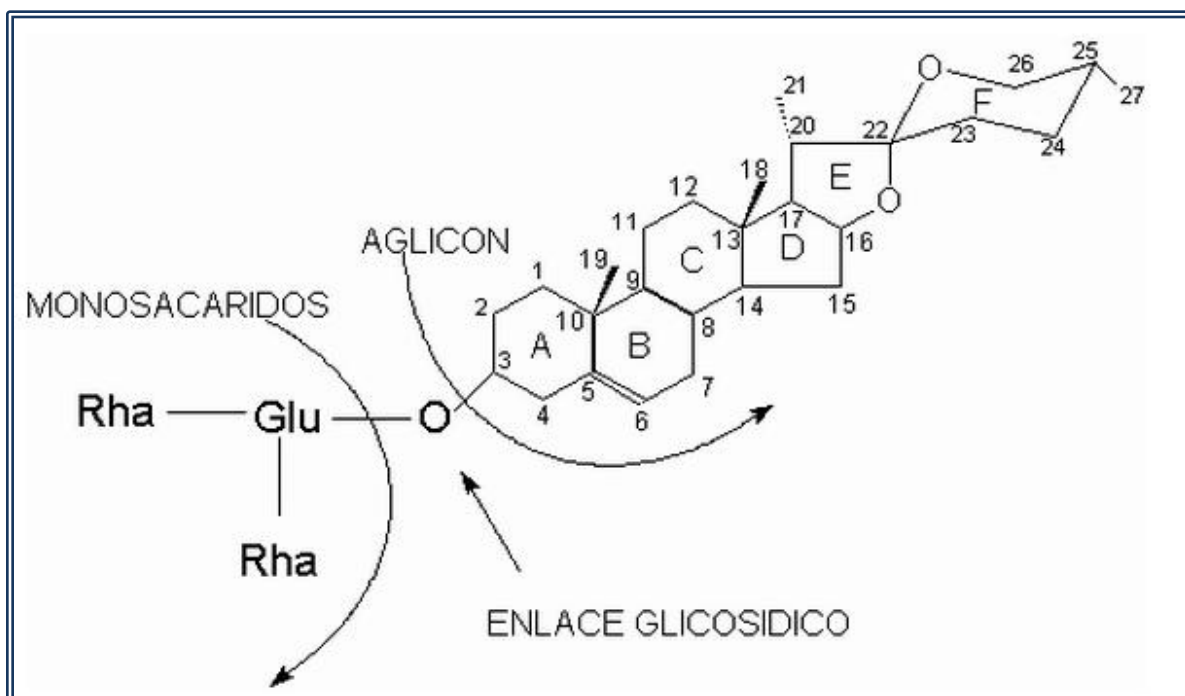


Figura 9a: Ejemplo de saponina esteroidal. Tomado de <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas.shtml>

La Hecogenina y La Diosgenina

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides, se encuentran las saponinas, que son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, poseen una compleja estructura anfipática formada por un núcleo esteroideo hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Los humanos han aprendido a emplear en su provecho la amplia actividad biológica de las saponinas; además, muchas de ellas son sintetizadas para la obtención de compuestos de origen natural (Hostettmann and Marston, 1995). De la hidrólisis enzimática o química de las saponinas, se obtienen sapogeninas esteroidales, las cuales poseen 27 átomos de

carbono y además del núcleo esteroidal presentan dos anillos más: los anillos E (tetrahidrofuránico) y F (tetrahidropiránico).

La Hecogenina es una sapogenina que se extrae del *Agave sisalana*; su empleo creció fuertemente en los años 50s debido a que a partir de ella se sintetizaron corticoesteroides (Kongkathip *Et al.*, 2006)

En el año 2003, se encontró que la Hecogenina inducía apoptosis en el osteosarcoma I547 (Corbière *Et al.*, 2003).

La Hecogenina también se ha utilizado para sintetizar compuestos diméricos con actividad antineoplásica como las cefalostatinas y las ritterazinas (Lee *Et al.*, 2009); Fuchs *Et al.*, reportaron el uso de acetato de Hecogenina en la síntesis de una parte de la cefalostatina I y el grupo de Jiménez publicó (Poza *Et al.*, 2010), un año después, la síntesis de un análogo tipo cefalostatina/ritterazina a partir de Hecogenina y 22-*epi*-hippuristanol.

La Diosgenina es una sapogenina esteroidal que fue aislada por primera vez en 1936 por Takeo Tsukamoto, a partir de *Dioscorea tokoro* (Marker *Et al.*, 1940). En la década de los cuarentas, Russell Marker encontró en México que la *Dioscorea composita*, conocida como barbasco, contiene de 7 a 9% de Diosgenina y desarrolló un proceso para sintetizar progesterona, proceso que fue conocido como la “Degradación de Marker” (Marker *Et al.*, 1940). La Diosgenina se ha utilizado también como material de partida para la obtención de diversos compuestos esteroideos de interés en síntesis parcial (Anil *Et al.*, 1981). Recientemente, se encontró que la Diosgenina posee actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares; como HeLa (Huo *Et al.*, 2004), HEL y K562 (eritroleucemia) (Bertrand *Et al.*, 2008); osteosarcoma I547 (Trouillas *Et al.*, 2004), HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular) (Li and Fernández, 2010), MCF-7 (cáncer de mama) (Li *Et al.*, 2005) y otras. Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo (Raju *Et al.*, 2009). Debido a ello, se abrió un nuevo campo de estudio en el ámbito de las sapogeninas, en donde se ha demostrado que alterando la estructura base puede mejorar la actividad biológica del compuesto

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 y al tiempo de acción, y dirigiendo a la molécula al sitio activo (Yamasaki *Et al.*, 1987). En general, reportes indican que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado y que al eliminar los azúcares de la molécula, ésta disminuye su actividad antitumoral (Pui-Kwong, 2007). Por ello se realizó una modificación en la estructura de la Diosgenina agregándole una pentosa en su oxígeno terminal. Para tal efecto primero se requiere sintetizar el compuesto β -glucósido 7, en donde el grupo OH es sustituido por un azúcar y una amina, posteriormente la amina se convirtió en su sal de hidrócloruro de MF-II (fig. 9b), después de la eliminación de los grupos protectores en el resto de azúcar, el compuesto amino bruto se trató con ácido clorhídrico (HCl), obtenido a partir de una cantidad equivalente de cloruro de actinio (AcCl) en metanol seco (MeOH). Obteniendo así el compuesto **clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II)**.

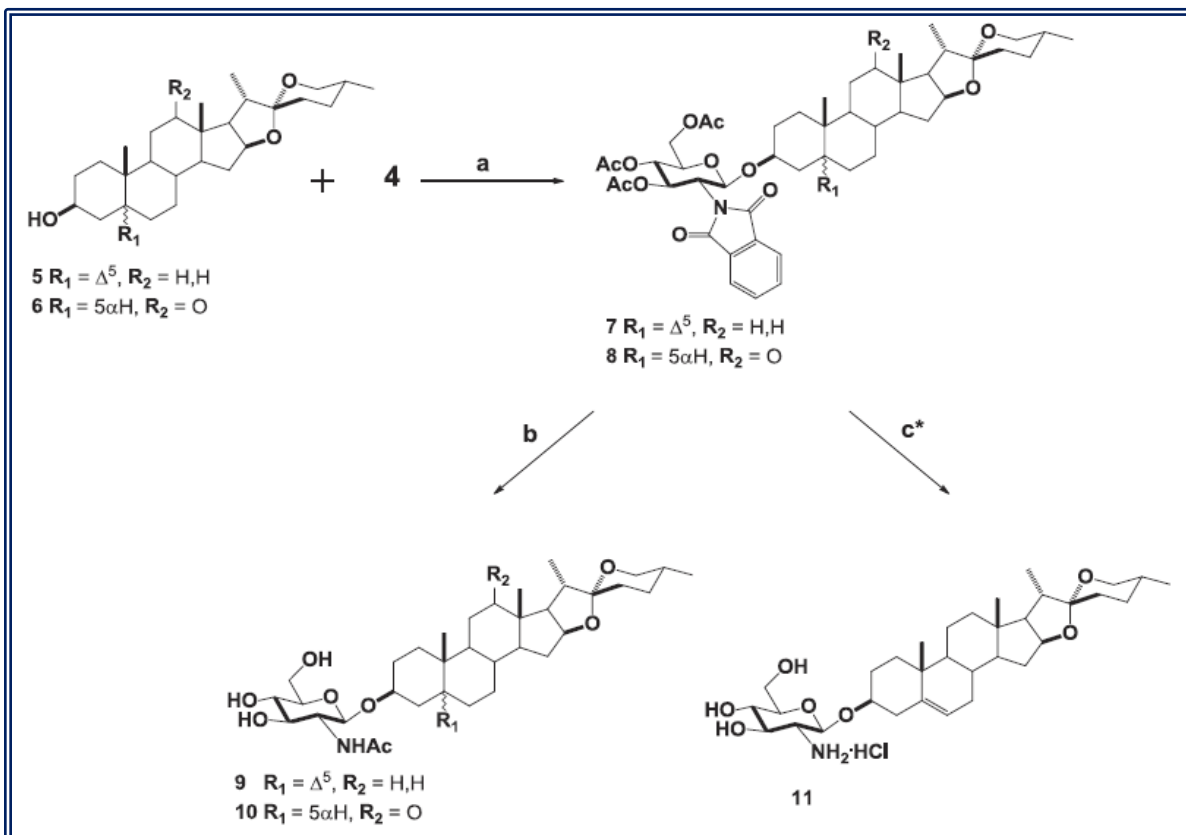


Figura 9b: Esquema de la síntesis del compuesto MF-11. Tomado de Fernández M. Et al., 2012. Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates, European Journal of Medicinal Chemistry.

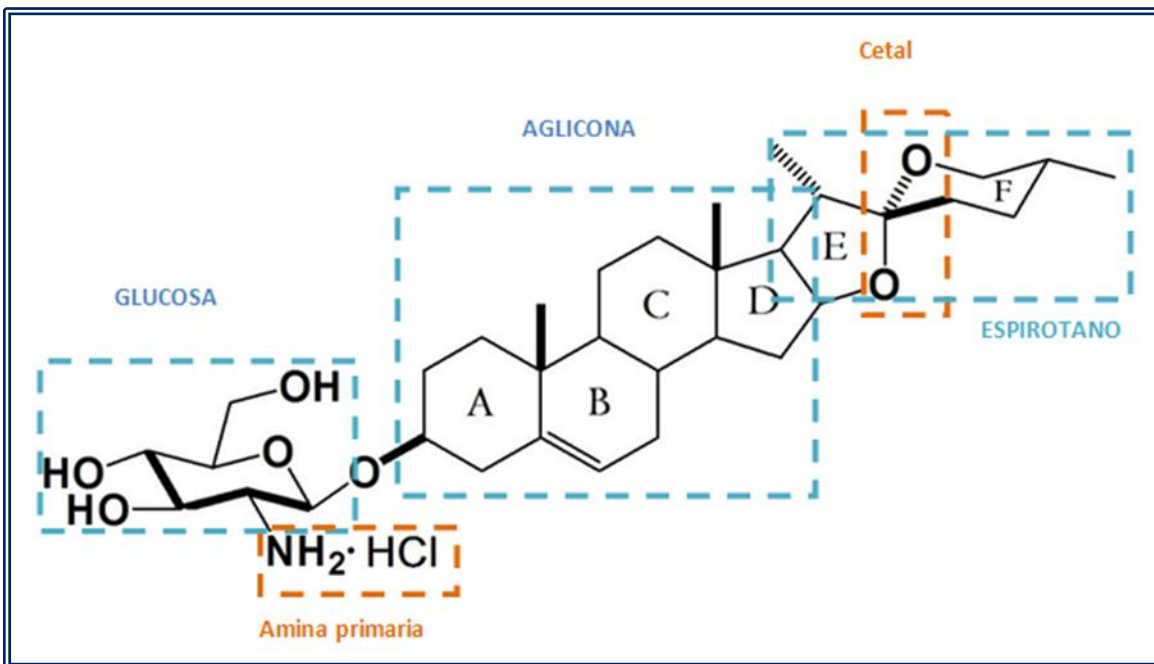


Figura 9c: Estructura del MF-11, los cuadros señalan las diferentes partes que conforman el compuesto.

El **MF-II** (fig. 9c) en la parte aglicona está formada por las siguientes estructuras:

- » Presenta una estructura esteroidal, conformada por cuatro anillos fusionados A, B, C los cuales, constan de seis átomos de carbono, de los cuales, el anillo B presenta una instauración (doble enlace) entre el carbono 5 y 6, por ultimo un anillo D formado de cinco átomos de carbono.
- » Presenta dos metilos, uno de ellos ubicado en el carbono 10, el cual, se localiza entre en anillo A y B, y el otro en el carbono 13, ubicado entre el anillo C y D.
- » A partir del carbono 17 se originan dos anillos adicionales, uno de cuatro tomos de carbono y uno de oxígeno localizado con la letra E y el otro de seis átomos de carbonos ubicado con la letra F.
- » Dichos anillos se encuentran fusionados por medio del carbono número 22, el cual, está unido a dos átomos de oxígeno, formado así una estructura denominada cetol mediante dos grupos oxidrilos.
- » A la estructura formada por los anillos E y F se lo conoce como espiroetano o espiránico.
- » El anillo E presenta un grupo metilo en el carbono 20 mientras que en el anillo F se presenta en el carbono 25.
- » En el carbono 3 mediante un enlace glicosídico se encuentra unida una glucosa, la cual, a su vez forma parte de una amina primaria.

Planteamiento Del Problema

Los tratamientos actualmente utilizados en la terapia contra el cáncer resultan ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, además que han mostrado ser poco selectivos y producen efectos secundarios graves que demeritan la calidad de vida de los pacientes. Es por ello que actualmente se estudian diversos compuestos de origen vegetal que presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que pueden tener un importante potencial antitumoral. Adicionalmente se ha encontrado que al modificar estructuralmente a estos compuestos se pueden mejorar su actividad contra células tumorales además de incrementar su selectividad. En ese sentido, se espera que el MF-II, una molécula generada por modificación estructural de la Diosgenina presente actividad antiproliferativa y apoptótica en células de cáncer cervical.

Justificación

Actualmente el cáncer cérvico uterino representa el 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Desafortunadamente los tratamientos utilizados para el cáncer, como son, la quimioterapia y la radioterapia son altamente agresivos y muestran poca selectividad que deterioran notablemente la calidad de vida de los pacientes, además son ineficientes en etapas avanzadas de esta enfermedad, por lo que es necesario obtener compuestos de origen vegetal, en los que se mejore sus propiedades antiproliferativas e inductores de muerte apoptótica además de ser selectivas para la células tumorales y puedan ser utilizados como agentes terapéuticos eficientes.

Hipótesis

Se sabe que la Diosgenina así como algunos de sus derivados presenta actividad antiproliferativa en algunos tipos de cáncer. Se sabe también que la modificación estructural de algunas moléculas puede mejorar su actividad biológica por lo que se espera que el MF-II derivado de la Diosgenina, ejerza un efecto antiproliferativo e inductor de muerte apoptótica sobre líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

Objetivos

Objetivo General

- » Determinar si el compuesto clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) induce un efecto antiproliferativo y apoptótico en células provenientes de CaCu.

Objetivos Particulares

- » Cultivar líneas celulares provenientes de cáncer CaCu: HeLa, CaSki y ViBo.
- » Determinar la concentración requerida de MF-II, para inducir un decremento del 50% del número celular (IC_{50}), en cultivos de células provenientes de CaCu (HeLa, CaSki y ViBo).
- » Evaluar si la concentración IC_{50} obtenida para el MF-II, induce un efecto necrótico en las líneas celulares tumorales: HeLa, CaSki y ViBo a través de la evaluación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).
- » Determinar si la concentración IC_{50} de MF-II induce condensación de ADN en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo por microscopía.
- » Determinar si la concentración IC_{50} de MF-II induce expresión de Caspasa-3 activa en cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo por citometría de flujo.
- » Establecer cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana.
- » Evaluar si la IC_{50} del MF-II obtenida para las diferentes líneas tumorales, afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana (células no tumorales).
- » Evaluar si la concentración IC_{50} obtenida para el MF-II, induce un efecto necrótico en células linfocíticas de sangre periférica humana a través de la evaluación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

MÉTODOS

Cultivo de células tumorales provenientes de cérvix.

Se utilizaron tres líneas celulares provenientes de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo. Las líneas celulares HeLa y CaSki fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD), la línea celular ViBo, fue obtenida por nuestro grupo de trabajo a partir de muestras de tumores de tres diferentes pacientes (Monrroy *Et al.*, 1992). Las células fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), al 5% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA) que previamente fue desactivado a 56° C por 30 minutos. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (Nuair, USA) a 37° C, al 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación (APENDICE III).

Preparación del stock de clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II)

1 mg de clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) fue solubilizado en 300 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, vehículo) en un tubo cónico tipo eppendorf de 600 µl y se almacenó a temperatura ambiente.

Determinación de la concentración de clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) que abate el 50 % del número celular de cultivos de células tumorales.

Se cultivaron células de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 µl de RPMI-1640 al 5 % de SNT, por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio de cultivo fresco con diferentes concentraciones de MF-II en concentraciones de 6.5 µg/ml a 50 µg/ml, durante 24 h. se utilizó como control del vehículo 5 µl de DMSO diluido en 1 ml RPMI-1640 al 5% de SNT, al control testigo únicamente se le realizó el cambio de medio por medio de cultivo fresco. Al término del tratamiento se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de Cristal Violeta descrita por Kueng *Et al.*, 1989. Para ello se retiró el medio de cultivo e inmediatamente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con agua desionizada, a continuación se dejó secar al aire y se añadió el colorante cristal violeta (100 µl) al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante incorporado en el núcleo de las células fue solubilizado con ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación por 20 minutos. Para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro (Image Tecan Spectra). Cada uno de los tratamientos se realizó por duplicado. En cada caso los resultados fueron analizados por regresión lineal para la obtención de la concentración que abata el 50 % de la población celular (IC₅₀).

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH.

En una caja de 96 pozos fueron sembradas 7,500 células de cada una de las tres líneas provenientes de CaCu; HeLa, CaSki y ViBo con 100 μ l de RPMI al 5 % de SNT, por 24 h. Los tratamientos se hicieron por triplicado. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le cambió el medio de cultivo, un control positivo al cual se le cambió el medio, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la IC₅₀ correspondiente y el tratamiento con MF-II con la concentración IC₅₀ correspondiente a cada línea celular. A las 23 h de tratamiento, al cultivo del control positivo se le hizo un nuevo cambio de medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 y se dejó que el ensayo complete las 24 h de tratamiento.

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml y centrifugados a 2,000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes fueron traspasados a una placa de 96 pozos, 50 μ l por pozo, para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 50 μ l de la mezcla de reacción. Se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 30 min. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (Image Tecan Spectra). Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100.

Morfología celular y condensación de la cromatina en células tumorales por microscopía con tinción con DAPI

Se sembraron 500,000 células de CaCu en cajas Petri de 50 mm (Pirex, USA) sobre cubreobjetos de 1 x 1 cm, con un volumen de 3 ml de RPMI-1640 suplementado al 5 % de SNT y se incubaron por 24 h bajo las condiciones antes descritas. A las 24 h., para la administración del MF-II, se trataron las células con la concentración de la IC₅₀ respectiva; teniendo un total de 48 h de cultivo. Al término, las células fueron fijadas con Etanol al 70% durante 5 min, enseguida se hicieron 3 lavados suaves para quitar el exceso. Enseguida se adicionó 10 μ l a una concentración de 3 μ g/ml del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) formando un domo sobre cada cubreobjeto y se dejó por 30 segundos en una placa de hielo. A continuación, las muestras fueron lavadas con PBS y se montaron con medio para fluorescencia (Vector Laboratories, USA) sobre portaobjetos. Las muestras fueron selladas con resina acrílica transparente. Después de ser etiquetadas según corresponda, fueron guardadas en obscuridad a -20 °C hasta su observación. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600, equipado con una cámara de alta resolución DXMI200F.

Detección específica de la Caspasa-3 activa en cultivos celulares.

Se sembraron 50,000 células/pozo en placas de 24 pozos, y se agregaron 500 μ l de RPMI-1640 al 5 % de SNT por pozo, al término de 24 h se estimuló teniendo un control y un control "sin marca" al que solo le agregó medio fresco, una concentración de DMSO de acuerdo IC₅₀ obtenido, una

concentración de MF-II de acuerdo a lo obtenido en IC_{50} y un control positivo con Colchicina (HeLa 10 μ l/ml; CaSki 16 μ l/ml; ViBo 18 μ l/ml). Después de 24 h, se recuperó el medio y fueron despegadas las células, pasándolo todo a tubos de citometría para centrifugar a 1500-1800 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante con la micropipeta y se resuspendió el botón celular en 500 μ l de PBS, se centrifugó y se desechó el sobrenadante con la micropipeta (lavado). Inmediatamente después fueron fijadas las células con 500 μ l de etanol 70%, durante 15 minutos en el refrigerador, en seguida se centrifugó a 1500-1800 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante con la micropipeta; se agregó 500 μ l de PBS y se guardó en el refrigerador. Fueron teñidas con Cristal Violeta para rectificar IC_{50} y se procesaron los datos. Por otro lado se retiró el PBS con la micropipeta y fueron adicionados 500 μ l de anticuerpo 1° a 4° C (1 μ l de anticuerpo 1° anti-caspasa 3: 500 μ l de PBS). Después de 24 h, se centrifugó a 1500-1800 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante con la micropipeta y resuspendió el botón con 500 μ l PBS (lavado). Se centrifugó a 1500-1800 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante con la micropipeta y se aplicó 500 μ l del anticuerpo 2° acoplado al fluorocromo FIT-C, durante 3 h a T° ambiente (se guardó en la incubadora; 1 μ l de anticuerpo 2°: 250 μ l de PBS). Se centrifugó a 1500-1800 rpm durante 5 min, y fue desechado el sobrenadante con la micropipeta y resuspendido el botón con 500 μ l PBS (lavado) y se analizó en el citómetro de flujo. Al término de la lectura, se procesaron los datos en el programa estadístico WinMDI 2.9. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

Cultivo de linfocitos (células no tumorales) provenientes de sangre periférica humana.

En tubos Vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónico de vidrio de 15 ml (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) (un total de 4 tubos), se centrifugó (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, después de lo cual se dejó centrifugando por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, fue retirado el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % SFB. El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml. Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1 hora en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecen en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero.

Evaluación del efecto del MF-II sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE).

Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer. Para el ensayo de Carboxifluoresceína, inicialmente se agregaron en tubos cónicos de 2 ml

la concentración de MF-II correspondiente a la IC₅₀ más alta (50 µg/ml) para las tres líneas celulares de CaCu evaluadas, se cuidó mantener la concentración final de 1, 000,000 de células por mililitro de medio total. Para marcar con Carboxifluoresceína (SIGMA-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en PBS con Carboxifluoresceína (2 µM) y se incubaron por 15 minutos protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS al 5% de SFB, luego se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con FGH (fitohemaglutinina), los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 2 ml a una densidad de 1, 000, 000 de células por mililitro de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y 25 µl/ml de fitohemaglutinina (Micro Lab S.A., MEX).

Para el ensayo se obtuvieron, un grupo de linfocitos sin activar, un grupo de linfocitos activados sin tratamiento y tres grupos de linfocitos activados tratados con las IC₅₀ de MF-II, en RPMI al 20% de SFB. Las células contenidas en cada tubo fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200, 000 células por cada pozo a un volumen de 200 µl, fueron incubadas durante 72 horas. Transcurrido el tiempo, las células fueron cosechadas y resuspendidas en 1 ml de verseno a 4°C durante 3 minutos, se retiró el verseno, y se lavaron dos veces con 500 µl de PBS, posteriormente se resuspendieron en 500 µl de paraformaldehído al 1%.

Finalmente se leyeron en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems USA) y se analizaron con el programa BDFacs Diva.

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH en cultivos de linfocitos humanos.

Se tomó una alícuota de 20 µl, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer. Los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10⁶ células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 µl de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realizó en ese momento: control solo con medio de cultivo con y sin FGH, control positivo al cual en ese momento no se agregó tritón X-100, control para el vehículo al cual se le agregó la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la concentración IC₅₀ más alta obtenida para células tumorales de CaCu, y MF-II en la concentración IC₅₀ más alta. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 µl y fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación, a las 71 h de tratamiento al control positivo se le agregó 2 µl Tritón X-100 y se homogenizó pipeteando suavemente el medio de cultivo, se incubó por 1 h más. A las 72 h de cultivo las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo, y se colectó en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml de manera individual. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, y se traspasaron 50 µl de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 50 µl de la mezcla de reacción. Se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 30 min. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (Image Tecan Spectra). Los datos fueron analizados

haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con Tritón X-100. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos experimentales son presentados como la media \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes con seis repeticiones y son estadísticamente analizados usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparada con el control.

Resultados

Efecto antiproliferativo del MF-II (IC_{50}).

Se sabe que la Diosgenina así como algunos de sus derivados presenta actividad antiproliferativa y citotóxica en algunas líneas de cáncer como HEL y K562 (eritroleucemia) (Bertrand et. al, 2008); osteosarcoma I547 (Trouillas et. al., 2004), HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular) (Li and Fernández, 2010), MCF-7 (cáncer de mama) (Li et. al., 2005); y que la modificación estructural de algunos derivados puede mejorar su actividad biológica. En ese sentido en el presente trabajo se evaluó si el clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) una saponina esterooidal derivada de la Diosgenina, pudiera exhibir actividad antitumoral, por lo que, se procedió en principio a determinar el efecto antiproliferativo del MF-II, cultivos de líneas celulares de CaCu HeLa, CaSki y ViBo, para ello los cultivos fueron tratados con diferentes concentraciones del compuesto y de este modo obtener la concentración que disminuye la densidad celular de estos cultivos en un 50 %.

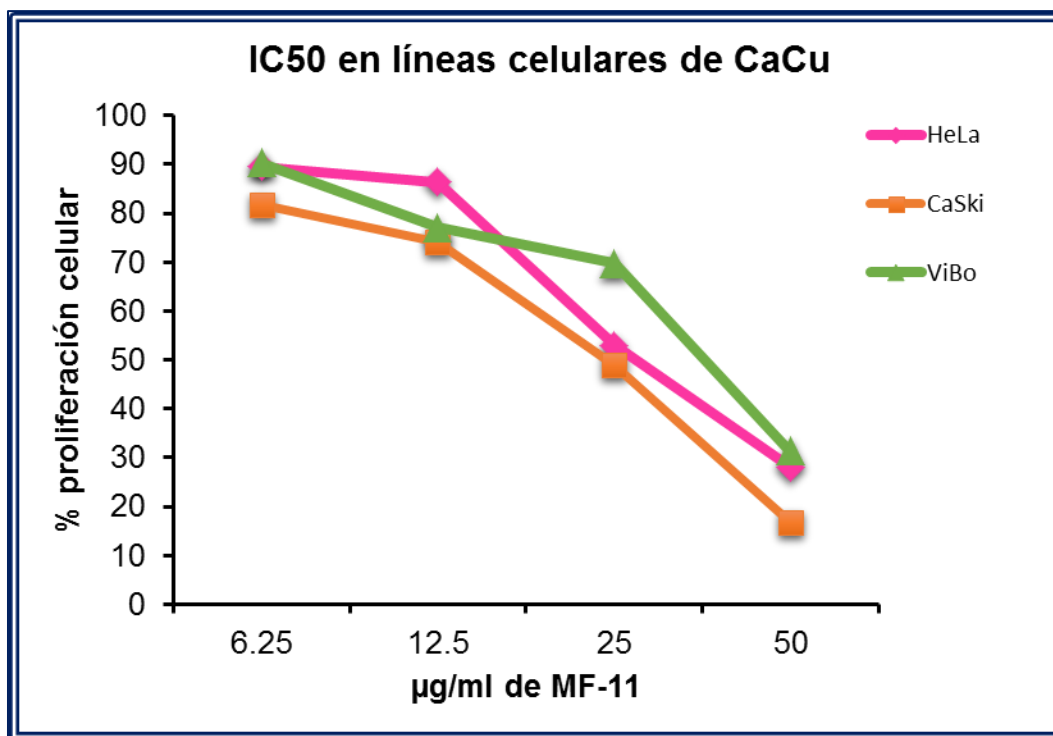


Figura 10: Efecto antiproliferativo de MF-11 sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. 7,500 células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos por 24 h y posteriormente tratadas con diferentes concentraciones de MF-11 de 6.25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

| Línea Celular | IC50 ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------|---------------------------|
| HeLa | 25 $\mu\text{g/ml}$ |
| CaSki | 25 $\mu\text{g/ml}$ |
| ViBo | 50 $\mu\text{g/ml}$ |

Tabla 1: Concentración requerida de MF-11 para inducir un 50 % de decremento en la densidad celular de cultivos de HeLa, CaSki y ViBo.

Los resultados obtenidos indican que MF-II afecta negativamente en el potencial proliferativo de células tumorales HeLa, Caski y ViBo de manera dosis dependiente, ya que al incrementar la concentración del tratamiento, el número celular disminuye (fig. 10). Una vez determinado que el compuesto MF-II afecta el potencial proliferativo de las células tumorales de CaCu se procedió a delimitar si esta disminución en la proliferación está relacionada con una inducción de muerte celular, para lo cual se definió la liberación de la enzima LDH como parámetro de muerte por necrosis

Actividad citotóxica de MF-II en células tumorales

Para determinar si MF-II induce una muerte por necrosis, cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con sus respectivas IC_{50} por 24 h, y al término del tiempo se determinó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos.

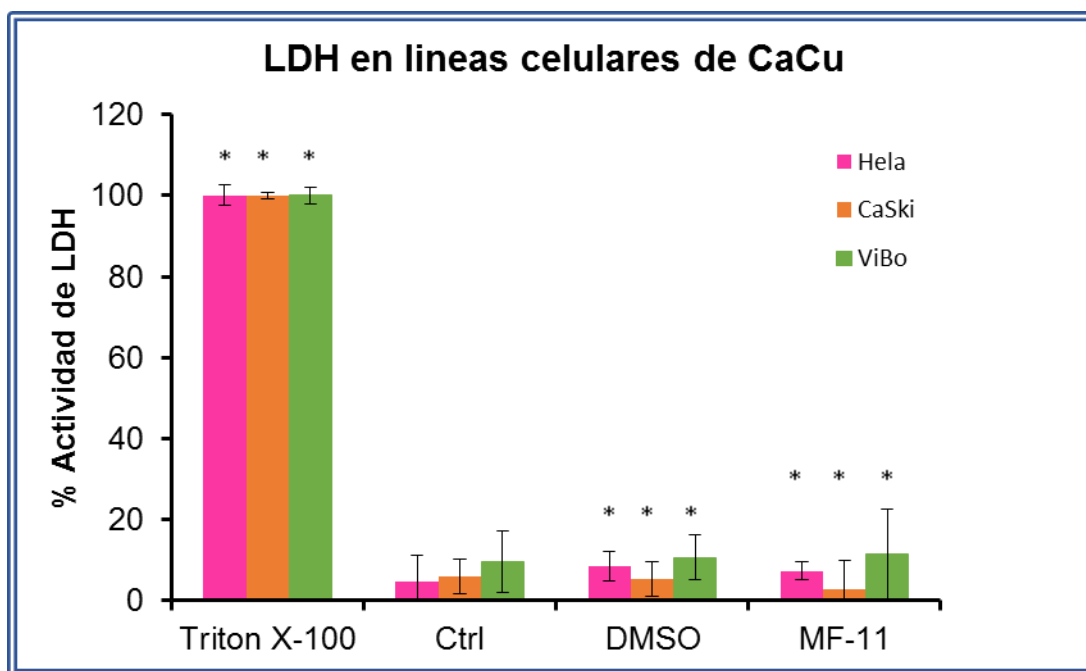


Figura 11: Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo (7,500 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos), estimuladas con la IC_{50} respectiva para cada línea celular por 24 h. La liberación máxima de LDH se determinó con la aplicación de tritón X-100 a las 48 h de cultivo de un tratamiento control, la actividad de la enzima liberada se tomó como el 100 % de actividad. La gráfica representa uno de 3 ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por triplicado.

* $p < 0.05$ vs Control (Anova seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos muestran que el MF-II no induce muerte celular por necrosis (fig. II) en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, ya que no se observa diferencia significativa entre los tratamientos y el cultivo control, lo que nos indica que el efecto antiproliferativo inducido por el MF-II no está relacionado con este tipo de muerte celular. Por tal motivo se procedió a determinar si el efecto observado está relacionado con la inducción de muerte por apoptosis en las células tumorales.

Efecto en la morfología celular y nuclear en células tumorales

Para confirmar el efecto apoptótico inducido por el MF-II en cultivos de células tumorales, se procedió a evaluar la morfología celular, en ese sentido, cuando las células son inducidas a una muerte apoptótica, presentan cambios como la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, entre otras características. Con la intención de establecer si el MF-II induce apoptosis en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con el MF-II 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 microscopía de contraste de fases y tinción con el compuesto fluorescente DAPI respectivamente.

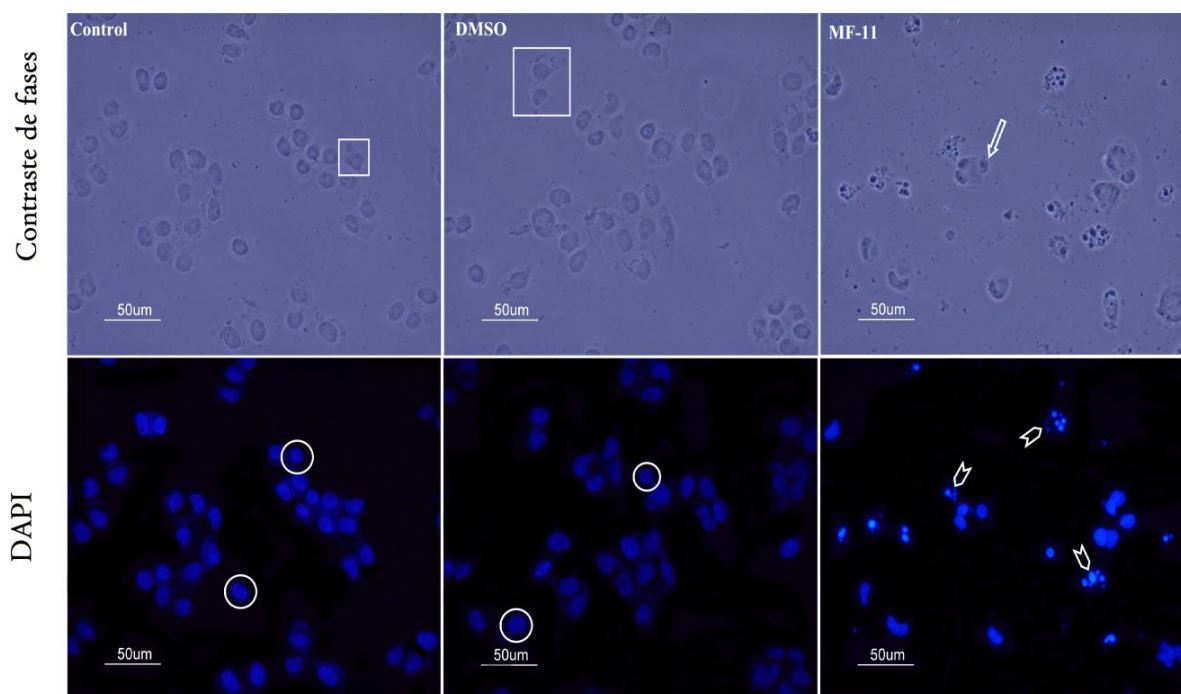


Figura 12a: Efecto en la morfología celular y en la condensación de la cromatina en células de CaCu HeLa. Las células sembradas en cubreobjetos y tratadas por 24h con las IC_{50} respectivas. Círculo: núcleos con una forma esférica de bordes bien definidos. Flechas: disminución de la adherencia, los núcleos son compactos con nucléolos poco definidos. Punta de flechas: condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del ADN.

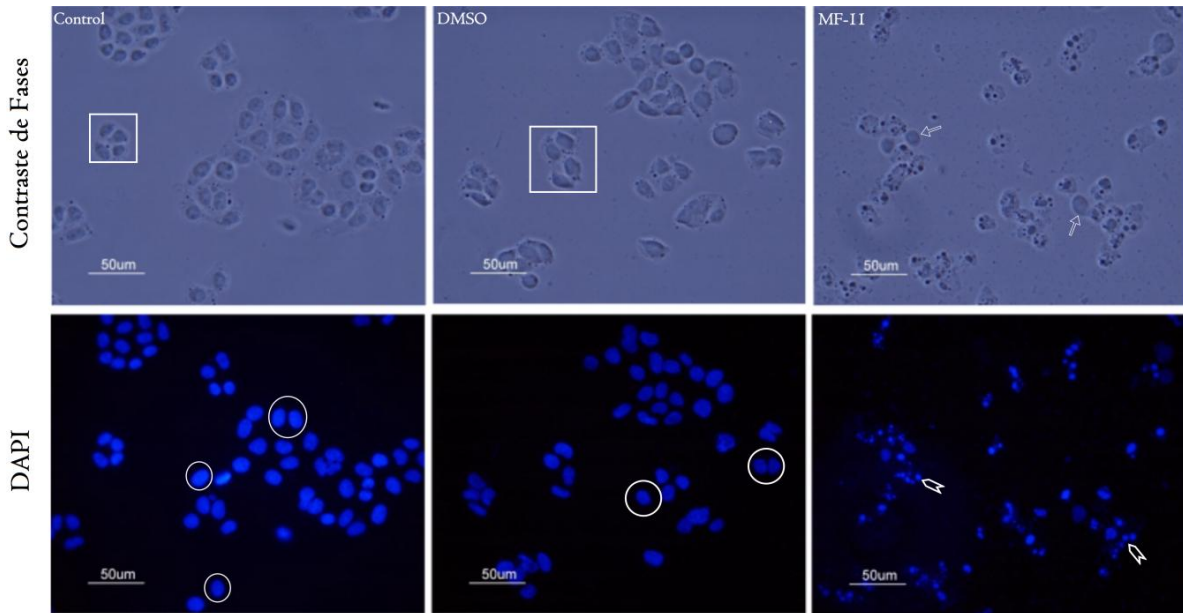


Figura 12b: Efecto en la morfología celular y en la condensación de la cromatina en células de CaSki. Las células sembradas en cubreobjetos y tratadas por 24h con las IC50 respectiva. Círculo: núcleos con una forma esférica de bordes bien definidos. Flechas: disminución de la adherencia, los núcleos son compactos con nucléolos poco definidos. Punta de flechas: condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del ADN.

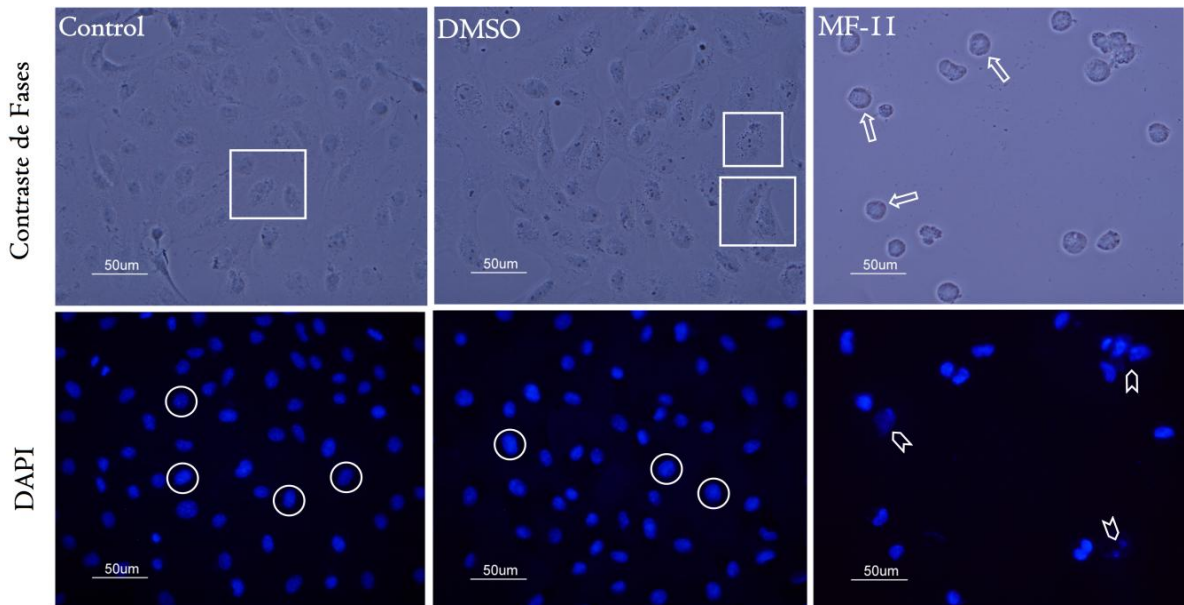


Figura 12c: Efecto en la morfología celular y en la condensación de la cromatina en células de CaCu ViBo. Las células sembradas en cubreobjetos y tratadas por 24h con las IC50 respectiva. Círculo: núcleos con una forma esférica de bordes bien definidos. Flechas: disminución de la adherencia, los núcleos son compactos con nucléolos poco definidos. Punta de flechas: condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del ADN.

Con base en los resultados obtenidos, se establecen que el MF-II 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, los núcleos tienen forma redonda y bien definida ocupando poco más de la mitad del volumen celular y con nucléolos bien delimitados (cuadro en figs. 12 a, b, y c). 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 perinucleolar son numerosos, de tamaños diversos y se encuentran distribuidos en toda el área del núcleo (círculo en figs. 12 a, b, y c). Sin embargo, las células tratadas con el MF-II presentan forma redonda, de menor tamaño, con el volumen del citoplasma reducido hasta ser casi imperceptible (picnosis), 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 (flechas en figs. 12 a, b, y c). La observación de núcleos marcados con DAPI, muestran núcleos de menor tamaño y/o fragmentados que indican condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del ADN, algunos núcleos presentan una morfología arriñonada indicando cuerpos apoptóticos (punta de flechas en figs. 12 a, b, y c). A pesar de que los resultados obtenidos muestran cambios morfológicos directamente relacionados con la muerte apoptótica, algunos pueden confundirse con la muerte necrótica en donde también ocurre una fragmentación del ADN, por lo que para corroborar este hecho se procedió a evaluar la expresión de la caspasa-3 activa como otro parámetro de inducción de muerte apoptótica

Inmunodetección de la Caspasa-3 activa

Para verificar que el compuesto MF-11 induce muerte celular por apoptosis en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, éstas fueron tratadas por 24 h con sus respectivos IC_{50} y se determinó actividad de la enzima Caspasa-3 activa, como parámetro de muerte apoptótica.

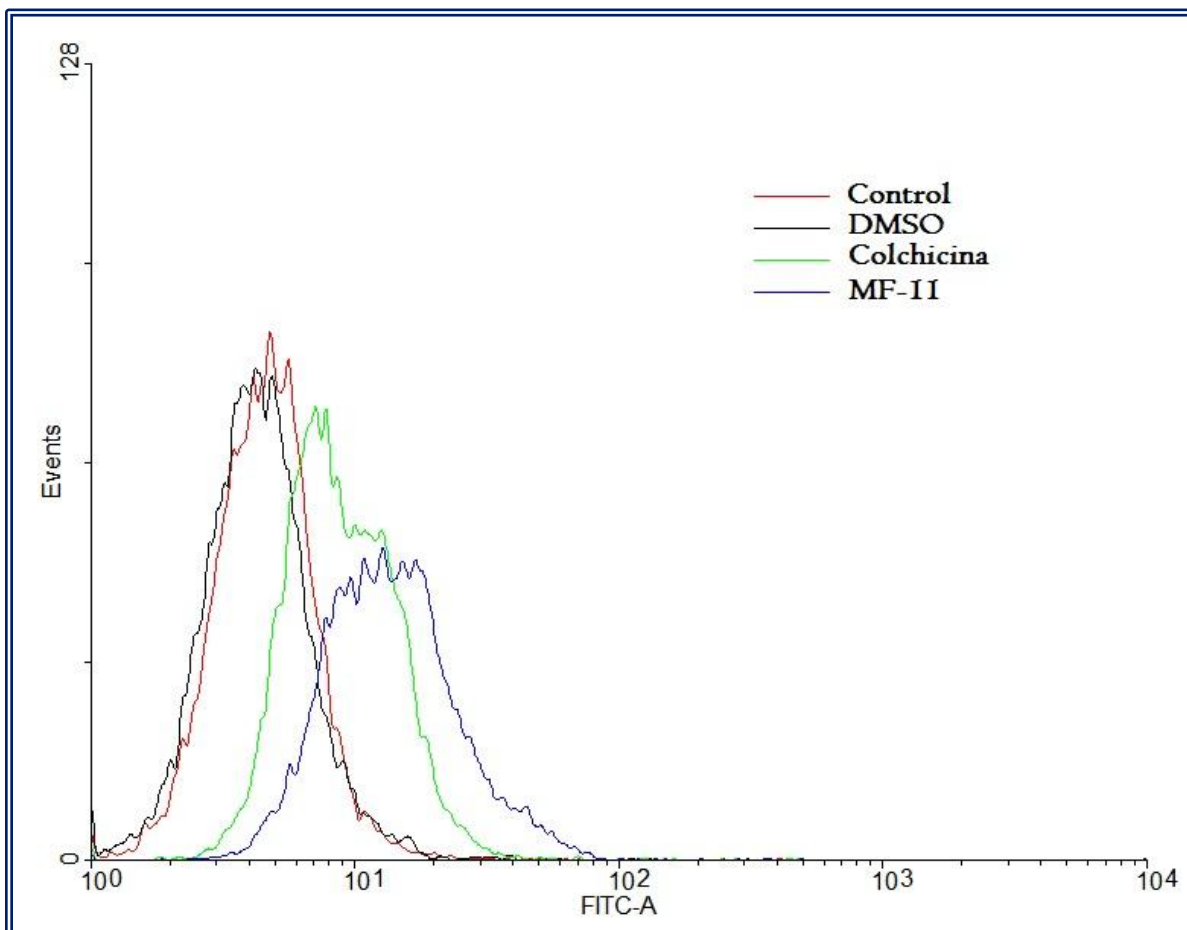


Figura 13a: Detección de Caspasa-3 activa correspondiente a la línea HeLa de CaCu, al ser tratada con 25 $\mu\text{g/ml}$ de MF-11.

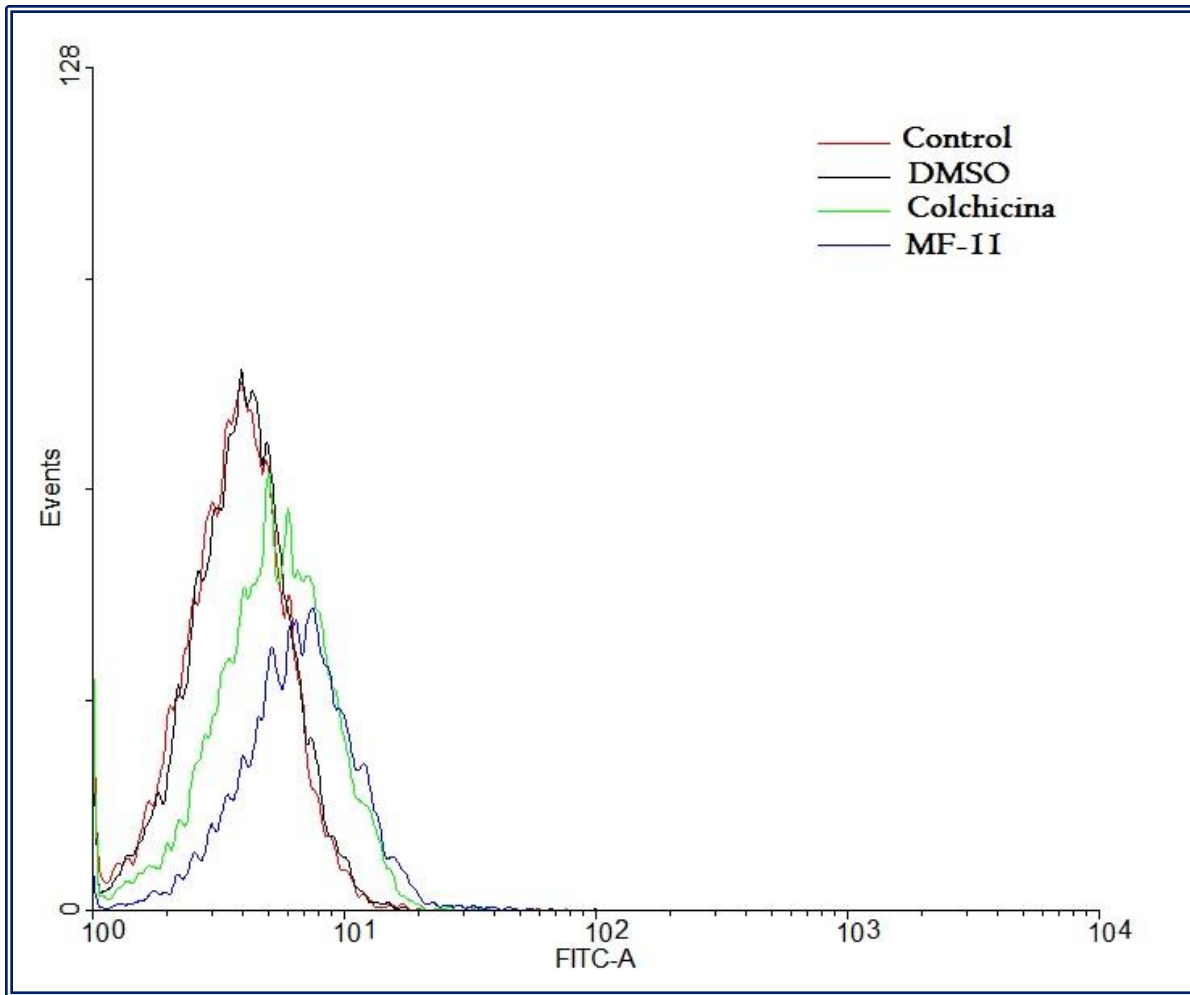


Figura 13b: Detección de Caspasa-3 activa correspondiente a la línea CaSki de CaCu, al ser estimulada con 25 µg/ml de MF-11.

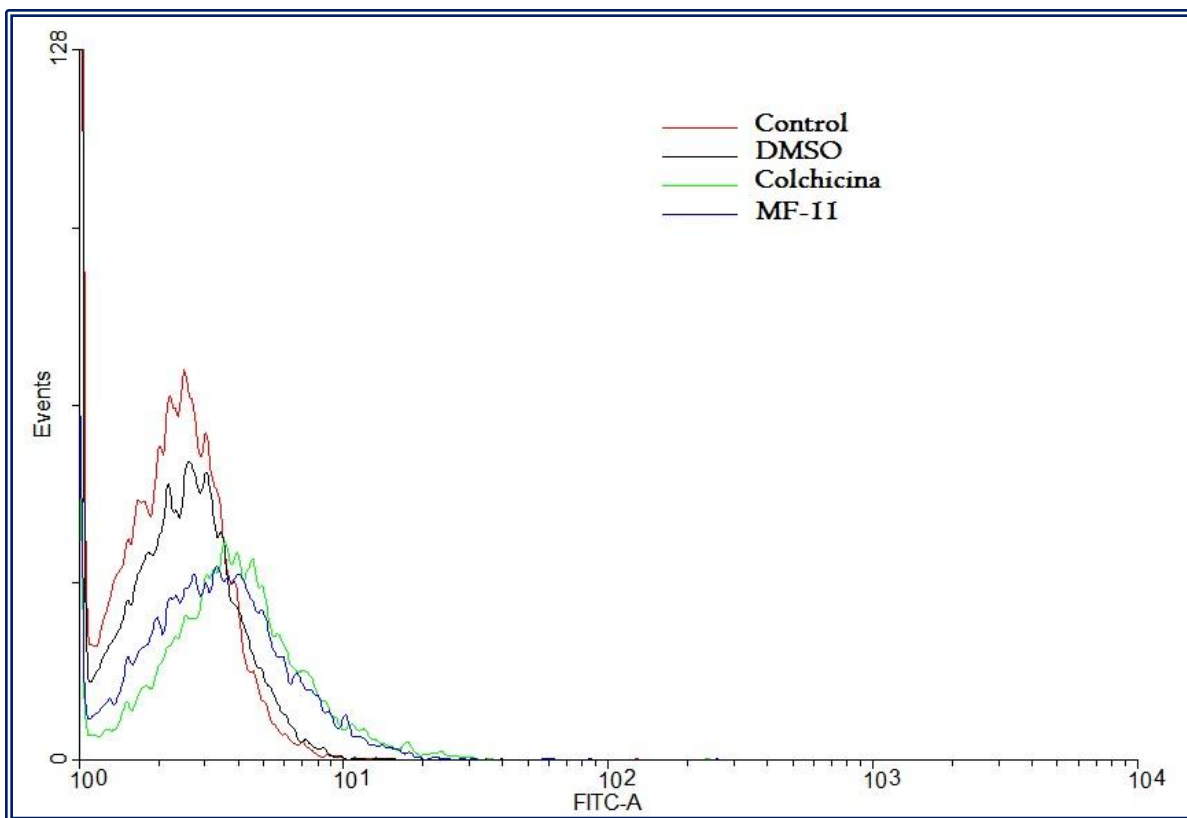


Figura 13c: Detección de Caspasa-3 activa correspondiente a la línea ViBo de CaCu, al ser tratada con 50 µg/ml de MF-11.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en la expresión de la Caspasa-3 activa en los cultivos de células HeLa (fig. 13a), CaSki (fig. 13b) y ViBo (fig. 13c) tratados con el MF-11 de forma similar al control positivo (cultivos tratados con colchicina) confirmando con ello que se induce a los cultivos de células tumorales de CaCu a una muerte por apoptosis.

Una vez establecido que el compuesto MF-11 afecta el potencial proliferativo de cultivos de células tumorales induciendo en ellos una muerte apoptótica, surge la duda si este compuesto afecta de la misma forma a células no tumorales y para resolver esta cuestión se procedió a determinar el efecto de este compuesto sobre el potencial proliferativo así como la inducción de muerte por necrosis en cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana como parámetro de selectividad.

Efecto del MF-II sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos

Con la intención de determinar si el compuesto MF-II afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos (celulas no tumorales), se establecieron cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, se trataron con 50 μ g/ml del compuesto y se evaluaron por citometría de flujo.

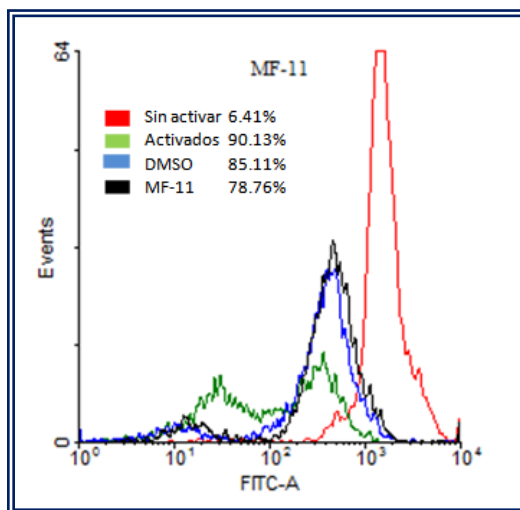


Figura 14. Efecto del compuesto MF-11 sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, marcados con carboxifluoresceína, activados con fitohemaglutinina y tratados con 50 μ g/ml de MF11. A las 72h de cultivo los linfocitos fueron evaluados por citometría de flujo.

Con base en los resultados obtenidos en la fig. 14, se muestra que el compuesto MF-II no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas ya que se observa un comportamiento similar al cultivo tratado con el vehículo (DMSO). Adicionalmente se evaluó si el MF-II induce muerte necrótica en linfocitos humanos.

Actividad necrótica de MF-II en linfocitos humanos de sangre periférica

Para determinar si el MF-II induce muerte por necrosis en cultivos de linfocitos humanos (celulas no tumorales), se midió la actividad de la enzima LDH en los medios de cultivo de estas celulas tratadas con 50µg/ml de MF-II.

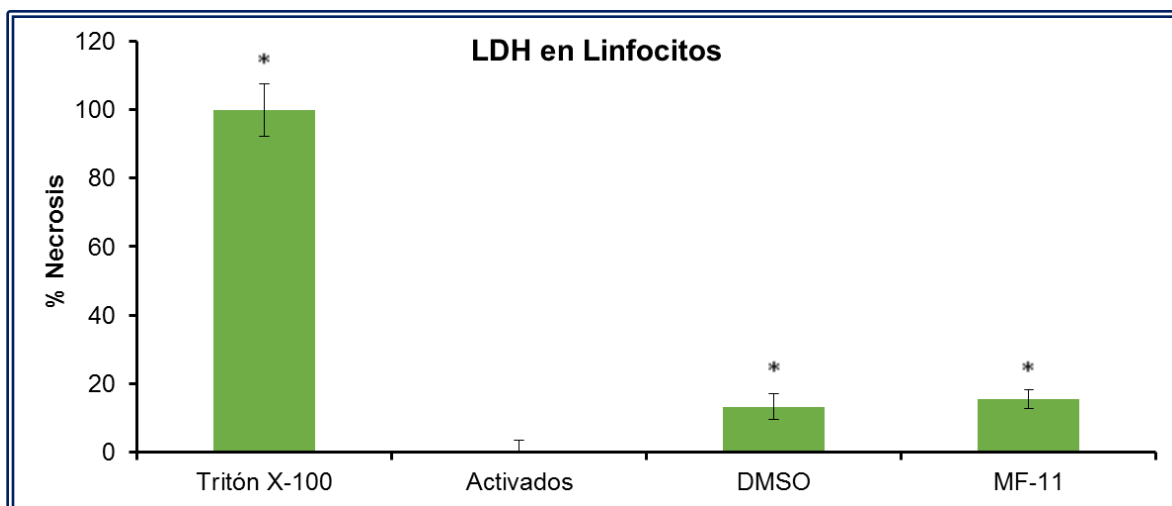


Figura 15: Determinación de la liberación de LDH en cultivos de linfocitos humanos (200,000 celulas por pozo, 200 ml por pozo en placas de cultivo de 96 pozos) estimulados con la IC₅₀ de ViBo (50 µg/ml). La gráfica representa uno de tres ensayos independientes, cada tratamiento se hizo por duplicado.

*p<0.05 vs Control (T-student seguida de una prueba Andeva).

Los resultados obtenidos muestran que en estos cultivos el compuesto no induce una muerte por necrosis a la concentración de la IC₅₀ más alta, 50 µg/ml (fig. 15), esta concentración solo indujo actividad de LDH en un 2.7 % cultivos tratados con MF-II, la cual está por debajo de la actividad detectada en los cultivos controles.

Discusión de resultados

Las saponinas son estructuralmente una clase diversa de glucósidos, las cuales han atraído mucha atención debido a la gran cantidad de actividades biológicas que presentan, tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiproliferativas e inductoras de apoptosis por lo que, constituyen una importante fuente de productos de origen natural que conducen al desarrollo de novedosos y prometedores quimioterapéuticos. Debido a esta diversidad estructural y a sus múltiples actividades biológicas, éstas son un tema de interés en la investigación científica. Estudios han revelado que la diferencia entre las diversas saponinas, además de otras características e independientemente del tipo y número de azúcares que posean, es respecto a su actividad biológica, ya que compuestos de estructura química similar son capaces de presentar respuestas biológicas diferentes (Sparg *Et al.*, 2004). Sin embargo, no se deja atrás la posibilidad de que saponinas esteroidales con similitud estructural a otras que tienen actividad antitumoral, también puedan mostrar esta característica. Un ejemplo claro es la Diosgenina y Hecogenina, las cuales han sido descritas con actividades antiproliferativas, necróticas e inductoras de apoptosis (Fernández M. *Et al.*, 2012).

En ese sentido, nuestros resultados muestran que la saponina esteroideal clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) es capaz de inhibir la proliferación de células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo, con IC_{50} de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las dos primeras y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ViBo. Cabe destacar que las líneas celulares HeLa y CaSki son positivas a VPH-I8 y I6 respectivamente, mientras que las células ViBo son negativas a VPH (Monrroy *Et al.*, 1992), la presencia del VPH podría estar relacionada con la diferente sensibilidad al compuesto, sin embargo, para confirmar esta relación es necesario probar en más líneas celulares que sean VPH-I6 y/o VPH-I8 positivas, así como líneas negativas a VPH.

Adicionalmente, encontramos que las IC_{50} del MF-II obtenidas para las células tumorales de CaCu, no inducen la liberación de LDH en los cultivos tratados, lo que significa que no se produce un daño en la membrana celular de los cultivos tratados y por tanto no se produce muerte por necrosis ni en células tumorales ni no tumorales (linfocitos humanos de sangre periférica). Es importante mencionar, que los compuestos utilizados para el tratamiento del cáncer cérvico uterino en la quimioterapia son fuertemente necróticos, y se le atribuye a esta citotoxicidad la generación de efectos secundarios graves en el paciente. El hecho de observar que el MF-II no produce un efecto necrótico tanto en células tumorales como en no tumorales es de gran relevancia ya que en el caso de poder ser aplicado como un agente antitumoral, los efectos secundarios que generaría en los pacientes serían mínimos, no induciría estado inflamatorio agudo y los efectos secundarios en los pacientes serían menores.

Por otro lado, se sabe que la estructura de las saponinas, como la Diosgenina y Hecogenina, 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*. En el caso del MF-II no se tienen problemas de solubilidad en el rango encontrado para las IC_{50} 's, este dato es

importante de considerar ya que nos garantiza que la concentración del utilizada de este compuesto para tratar a las células tumorales quedará completamente a disposición de las células tratadas garantizando la consistencia y reproducibilidad de los experimentos, además de ser en un futuro utilizado en la terapia, facilitaría la administración en sistemas *In Vivo*.

En lo que respecta al tipo de muerte celular que el MF-II induce en las células tumorales de CaCu, se ha reportado que algunos derivados de saponinas como la Diosgenina y Hecogenina pueden inducir una muerte celular por apoptosis y en ese sentido encontramos que el MF-II induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis, como lo sugiere la observación de cuerpos apoptóticos, la inducción de la expresión de la Caspasa-3 activa así como la detección de ADN fragmentado en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo. Es importante resaltar que una característica de la muerte celular por apoptosis es la no activación de la respuesta inmune, permitiendo que las células sean eliminadas eficientemente tanto por fagocitos profesionales como por las células vecinas evitando generar un proceso inflamatorio, de tal manera que las células tumorales mueren silenciosamente con la posibilidad de generar efectos secundarios no significativos.

Por otro lado, en la literatura se han descrito una diversidad de compuestos con actividad antitumoral, coincidiendo en la mayoría de ellos en una actividad antiproliferativa o citotóxica, y en pocos casos una actividad inductora de apoptosis, entre otras, destacando con esto que la mayoría de los compuestos estudiados tienen un fuerte potencial citotóxico, es decir, la mayor parte de los compuestos inducen a las células tumorales a morir por necrosis. Además, arriba del 90 % de los trabajos donde se reporta la actividad antitumoral de los compuestos, no incluyen pruebas o controles en células no tumorales, dejando sin determinar el efecto del compuesto en células normales así como su verdadero potencial antitumoral. Al respecto, en nuestro trabajo, se destaca que el MF-II no induce un efecto necrótico en células tumorales con las concentraciones obtenidas para las células HeLa, CaSki y ViBo ni en células linfocíticas (células no tumorales), además, no disminuyó el potencial proliferativo de estas células, sugiriendo que el MF-II presenta una actividad antiproliferativa con acción selectiva sin actividad necrótica

Adicionalmente, se ha descrito que el mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos utilizados actualmente 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 M. *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.

Esto implica que en el tratamiento tradicional contra el cáncer, el sistema inmunológico se ve fuertemente afectado y 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, 1984). La mayoría de los trabajos enfocados en compuestos descritos con propiedades antitumorales, evalúan únicamente el efecto de éste sobre células tumorales dejando de lado el efecto que generan en células normales. Contrario a lo anterior Camoutsis *Et al.*, 2005, demostraron que análogos de la Hecogenina sintetizados por su grupo de trabajo producían una limitada actividad inhibitoria sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana aunque resultaban citotóxicos para las células tumorales. Por nuestra parte, los resultados obtenidos al tratar cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, muestran que el MF-II no abate su proliferación ni induce en ellos una muerte necrótica, comparado con las células tumorales, lo que sugiere que el MF-II presenta una acción selectiva, sobre este tipo celular. Es importante resaltar que las características encontradas en el MF-II (antiproliferativo, no citotóxico inductor de apoptosis en células tumorales de CaCu, sin efecto antiproliferativo y citotóxico en células no tumorales) sugieren que esta saponina esteroidea 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 concentración de la saponina esteroideal clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-D-glucopiranosido diosgenilo (MF-II) requerida para disminuir la densidad celular en un 50% (IC_{50}) de las células HeLa y CaSki es de 25 $\mu\text{g/ml}$ y de 50 $\mu\text{g/ml}$ para células ViBo.
- » Las concentraciones IC_{50} obtenidas para el MF-II, no induce un efecto necrótico en las líneas celulares tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
- » El MF-II induce muerte por apoptosis en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
- » El MF-II a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ no afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana.
- » La concentración máxima de 50 $\mu\text{g/ml}$ obtenida para el MF-II, no induce un efecto necrótico en células linfocíticas de sangre periférica humana.

Referencias

American Cancer Society. Revisado el 21 de Abril de 2014. <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada/cancer-de-cuello-uterino-what-is-what-is-cervical-cancer>.

American Cancer Society. Revisado el 3 de Abril de 2014, de: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>.

Anaya L. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdés editores. 2ª ed. México. pp 343.

Anil K. S. and Durga N. D. 1981. Partial synthesis of diosgenin to obtain various steroidal compounds. Bulletin of Society of Chemistry of Belgica. 90: 981-985.

Bertrand J., Liagre B., Bégau-Grimaud G., Jauberteau M. O., Cardot P., Beneytout J. L., Battu S. 2008. Study of diosgenin-induced apoptosis kinetics in K562 cells by Sedimentation Field Flow Fractionation. Journal of Chromatography B. 869: 75-83.

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. II FÁRMACO. 60: 826–829.

Caro L. J. and Zúñiga C. 2009. Perfil epidemiológico del cáncer cérvico uterino en México. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 23: 36-37.

Cell Signaling Technology. Revisado el 25 de abril de 2014, de: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=science-pathways-apoptosis>

Corbière C., Liagre B., Bianchi A., Bordji K., Dauça M., Netter P., Beneytout J. L. 2003. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. International Journal of Oncology. 22: 899-905.

Dillman R. 1984. Immunoincompetence in Cancer Patients: Assessment by *In Vitro* Stimulation Tests and Quantification of Lymphocyte Subpopulations. Cancer. 7: 1484-1491.

Fernández C, León G., Herrera C., Salazar E. 2011. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, México DF. (SINAIS/SINAVE/DGE/Salud). 15: 46-138

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.

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)-3b,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.

Fink S. L. and Cookson B. T. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 73: 1907–1916

Golstein P. and Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*. 32: 37–43.

Gray M., Miles K., Salter D., Gray D., Savill J. 2007. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 104: I4080–I4085.

Hanahan D. and Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646–674.

Hernández J., Fernández M., López H., López M., Sankar M., Ecobar M., Sánchez L., Pinto M., Sandoval J. 2011. Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-22-oxocholest-5-en-26-yl β -d-glucopyranoside: A selective anticancer agent in cervicouterine cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46: 3877-3886

Hong-Ji Q., Jyunichi K., Ken H., Xing-Ri C., Yasunori I., Seiichi K., Setsuo S. 2006. Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with various nucleophiles and pharmacological activities of the products. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 54: 72-79

Hostettmann K. and Marston A. 1995. Saponin. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press. New York. pp 564

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 Sinica*. 25: 1077-1082.

Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM). Revisado el 26 de mayo de 2014. <http://www.issemym.gob.mx/index.php?page=cancer-cervico-uterino>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Revisado el 3 de marzo de 2014, de: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temasv2/default.aspx?s=est&c=I7484>

Instituto Nacional del Cáncer. Revisado el 21 de Junio de 2014. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/Patient/page4>

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2011. Global Cancer: Facts & Figures. Revisado el 3 de marzo de 2014, de: <http://www.iarc.fr/en/publications/list/sp/index.php>

Kongkathip N., Kongkathip B., Noimai N. 2006. Synthesis of Betamethasone from the Waste of Thai *Agave sisalana*. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*. 36: 865-874.

Kroemer G., and Levine B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 9: 1004–1010.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 16: 3–11.

Kueng W., Silver E. and Eppenverg V. 1989. Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical*. E.U. pp 186.

Lee S., Jamieson D., Fuchs P. L. 2009. Synthesis of C14, 15-Dihydro-C22, 25-epi North Unit of Cephalostatin I via “Red-Ox” Modifications of Hecogenin Acetate. *Organic letters*. 11: 5-8.

Li F., Fernández P. P., Rajendran P., Hui K. M., Sethi G. 2010. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*. 292:197- 207

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 diosgenin. *Analytical sciences*. 21: 561-564.

Marker R. E., Tsukamoto T., Turner D. L. J. 1940. Sterols. C. Diosgenin¹. *Journal of the American Chemistry Society*. 62: 2525-2532.

Merlo L. M., Pepper J. W., Reid B. J., Maley C. C. 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews: Cancer*. 6: 924–935

Monografias.com. Revisado el 15 de Junio de 2014. <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas.shtml>

Monrroy G., Rangel C., Rocha Z., Trejo B., Ramírez G., Martínez R., Weiss-Steider B. 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico uterino y sus diferentes contenidos y localización de desmogleína-I. *Revista Mexicana de Oncología*. 7: 69-76

Murray M. 2004. *La curación del Cáncer: Métodos naturales*. Ediciones Robinbook. México. pp 396.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Revisado el 3 de abril de 2014, de: <http://www.who.int/cancer/treatment/es/>

Peng Y., Martin D., Kenkel J., Zhang K., Ogden C., Elkon K. 2007. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *Journal of Autoimmunity*. 29: 303–309

- Peralta-Zaragoza O., Bahena-Roman M, Díaz-Benítez C., Madrid-Marina V. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública México*. 39: 451-462.
- Poza J. J., Rodríguez J., Jiménez C. 2010. Synthesis of a new cytotoxic cephalostatin/ritterazine analogue from hecogenin and 22-*epi*-hippuristanol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 58-63.
- Pui-Kwong C. 2007. Acylation with diangeloyl groups at C21-22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochemical Pharmacology*. 73: 341-350.
- Raju J. and Mehta R. 2009. Actividad antiproliferativa de la Diosgenina frente a varias líneas celulares. *Cáncer*. 61: 27-35.
- Ramírez M. E. and Rojas M. 2010. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*. 23: 166-177.
- Rodríguez L., Hernández E., Reyes J. A. 2004. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada*. 21: 60-69
- Ross M. H. y Pawlina W. 2007. *Histología*. 5ª ed. Médica Panamericana. México. pp 974.
- Secretaría de Salud. Revisado el 22 abril de 2014 de: <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=1011>
- Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J. 2004. Review Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94: 219–243.
- Stratton M. R. 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*. 331: 1553–1558.
- Tovar G.V.J., Ortiz C. F., Jiménez G., Valencia V. 2008. Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cérvico uterino en México (1980-2004). *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* 51:47-51.
- Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J. L., Beneytout J. L. 2005. Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13: 1141-1149.
- Vanlangenakker N., Berghe T., Krysko D., Festjens N., Vandenabeele P. 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current Molecular Medicine*. 8: 207–220.
- Varela S. 2002. *El cáncer: etiología, epidemiología, diagnóstico y prevención*. Elsevier. España. pp 184.

Yamasaki Y., Ito K., Enomoto Y., Sutko J. L. 1987. Alterations by saponins of passive calcium permeability and sodium-calcium exchange activity of canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 897:481-487.

APENDICE I: Clasificación de las Etapas del Cáncer Cérvico uterino

Extensión del tumor (T)

Tis: las células cancerosas sólo se encuentran en la superficie del cuello uterino (la capa de las células que reviste el cuello uterino) sin crecer hacia (invadir) los tejidos más profundos.

TI: las células cancerosas han crecido desde la capa de la superficie del cuello uterino hasta los tejidos más profundos de éste. Además, el cáncer puede estar creciendo hacia el cuerpo del útero, aunque no ha crecido fuera del útero.

TIa: existe una cantidad muy pequeña de cáncer que sólo se puede observar con un microscopio.

TIaI: el área de cáncer es de menos de 3 milímetros (alrededor de 1/8 de pulgada) de profundidad y de menos de 7 mm (alrededor de 1/4 de pulgada) de ancho.

TIa2: el área de invasión del cáncer es entre 3 mm y 5 mm (alrededor de 1/5 de pulgada) de profundidad y de menos de 7 mm (alrededor de 1/4 de pulgada) de ancho.

TIb: esta etapa incluye los cánceres de etapa I que se pueden ver sin un microscopio. Esta etapa incluye también los tumores cancerosos que se pueden ver solamente con un microscopio y que se han propagado a más de 5 mm (alrededor de 1/5 de pulgada) de profundidad dentro del tejido conectivo del cuello uterino o que tienen más de 7 mm de ancho.

TIbI: el cáncer se puede ver, pero no tiene más de 4 centímetros (alrededor de 1 3/5 de pulgada).

TIb2: el cáncer se puede ver y tiene más de 4 centímetros.

T2: en esta etapa, el cáncer ha crecido más allá del cuello uterino y el útero, pero no se ha propagado a las paredes de la pelvis o a la parte inferior de la vagina. Puede que el cáncer haya crecido hacia la parte superior de la vagina.

T2a: el cáncer se ha propagado a los tejidos próximos al cuello uterino (parametrio).

T2aI: el cáncer se puede ver, pero no tiene más de 4 centímetros (alrededor de 1 3/5 de pulgada).

T2a2: el cáncer se puede ver y tiene más de 4 centímetros.

T2b: el cáncer se ha propagado a los tejidos adyacentes al cuello uterino (el parametrio).

T3: el cáncer se ha propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas. El cáncer puede estar bloqueando los uréteres (conductos que transportan la orina de los riñones a la vejiga).

T3a: el cáncer se ha propagado al tercio inferior de la vagina, pero no a las paredes pélvicas.

T3b: el cáncer ha crecido hacia las paredes de la pelvis y/o está bloqueando uno o ambos uréteres (a esto se le llama hidronefrosis).

T4: el cáncer se propagó a la vejiga o al recto o crece fuera de la pelvis.

Propagación a los ganglios linfáticos (N)

NX: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos cercanos.

N0: no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.

NI: el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos.

Propagación distante (M)

M0: el cáncer no se ha propagado a otros ganglios linfáticos, órganos o tejidos distantes.

MI: el cáncer se propagó a órganos distantes (como por ejemplo el hígado o los pulmones), a los ganglios linfáticos del pecho o el cuello, y/o al peritoneo (el tejido que cubre el interior del abdomen).

Agrupación de las etapas y etapas FIGO

Para asignar una etapa a la enfermedad, se combina la información sobre el tumor, los ganglios linfáticos y cualquier propagación del cáncer. Este proceso se conoce como agrupación por etapas. Las etapas se describen usando el número 0 y con números romanos del I al IV. Algunas etapas se dividen en subetapas indicadas por letras y números. Las etapas FIGO son las mismas que las etapas AJCC, excepto la etapa 0, que no existe en el sistema FIGO.

Etapas 0 (Tis, N0, M0): las células cancerosas sólo se encuentran en las células de la superficie del cuello uterino (la capa de las células que reviste el cuello uterino) sin crecer hacia (invadir) los tejidos más profundos del cuello uterino. Esta etapa también se llama carcinoma in situ (CIS), y es parte de neoplasia intraepitelial cervical en grado 3 (CIN3).

La etapa 0 no está incluida en el sistema de FIGO.

Etapa I (T1, N0, M0): en esta etapa el cáncer creció hacia (invadió) el cuello uterino, pero no fuera del útero. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IA (T1a, N0, M0): esta es la forma más temprana de la etapa I. Hay una cantidad muy pequeña de cáncer que es visible solamente bajo el microscopio. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IAI (T1aI, N0, M0): el cáncer es de menos de 3 milímetros (alrededor de 1/8 de pulgada) de profundidad y de menos de 7 mm (alrededor de 1/4 de pulgada) de ancho. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IA2 (T1a2, N0, M0): el cáncer es entre 3 mm y 5 mm (alrededor de 1/5 de pulgada) de profundidad y de menos de 7 mm (alrededor de 1/4 de pulgada) de ancho. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IB (T1b, N0, M0): incluye los cánceres en etapa I que se pueden ver sin un microscopio, así como los cánceres que sólo se pueden ver con microscopio, si se han propagado a más de 5 mm (alrededor de 1/5 de pulgada) de profundidad dentro del tejido conectivo del cuello uterino o tienen más de 7 mm de ancho. Estos cánceres no se han propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IBI (T1bI, N0, M0): el cáncer se puede ver, pero no tiene más de 4 centímetros (alrededor de 1 3/5 de pulgada). El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IB2 (T1b2, N0, M0): el cáncer se puede ver y mide más de 4cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa II (T2, N0, M0): en esta etapa, el cáncer ha crecido más allá del cuello uterino y el útero, pero no se ha propagado a las paredes de la pelvis o a la parte inferior de la vagina.

Etapa IIA (T2a, N0, M0): el cáncer se ha propagado a los tejidos próximos al cuello uterino (parametrio). Puede que el cáncer haya crecido hacia la parte superior de la vagina. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IIAI (T2aI, N0, M0): el cáncer se puede ver, pero no tiene más de 4 cm (alrededor de 1 3/5 de pulgada). El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IIA2 (T2a2, N0, M0): el cáncer se puede ver y mide más de 4cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IIB (T2b, N0, M0): el cáncer se ha propagado a los tejidos adyacentes al cuello uterino (el parametrio). El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa III (T3, N0, M0): el cáncer se ha propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas. El cáncer puede estar bloqueando los uréteres (conductos que transportan la orina de los riñones a la vejiga). El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IIIA (T3a, N0, M0): el cáncer se ha propagado al tercio inferior de la vagina, pero no a las paredes pélvicas. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IIIB (T3b, N0, M0; o T1-3, N1, M0): cualquiera de lo siguiente está presente: El cáncer creció hacia las paredes de la pelvis y/o bloqueó uno o ambos uréteres (una condición llamada hidronefrosis), pero no se propagó a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes o El cáncer se propagó a los ganglios linfáticos en la pelvis (N1), pero no a sitios distantes (M0). El tumor puede ser de cualquier tamaño y pudo haberse propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas (T1-T3).

Etapa IV: ésta es la etapa más avanzada del cáncer de cuello uterino. El cáncer se ha propagado a órganos adyacentes o a otras partes del cuerpo.

Etapa IVA (T4, N0, M0): el cáncer se propagó a la vejiga o al recto, que son órganos cercanos al cuello uterino (T4). El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IVB (cualquier T, cualquier N, M1): el cáncer se propagó a órganos distantes más allá del área pélvica, tales como los pulmones o el hígado.

APENDICE II: CIRUGÍAS

Criocirugía

Se coloca una sonda de metal enfriada con nitrógeno líquido directamente en el cuello uterino. Esto destruye las células anormales mediante congelación.

Etapas: La criocirugía se usa para tratar los precánceres de cuello uterino (etapa 0), pero no el cáncer invasivo.

Ventajas/desventajas: Esto se puede hacer en un consultorio médico o en una clínica.

Cirugía láser

Se usa un rayo láser enfocado (a través de la vagina) para vaporizar (quemar) las células anormales o extirpar una porción pequeña de tejido para estudiarlo.

Etapas: La cirugía por láser se usa para tratar los precánceres de cuello uterino (etapa 0). No se usa en el tratamiento del cáncer invasivo.

Ventajas y Desventajas: Este procedimiento se puede realizar en el consultorio del médico o en la clínica usando un anestésico local.

Conización

Se extrae del cuello uterino un pedazo de tejido en forma de cono. Este procedimiento se hace utilizando un bisturí quirúrgico o bisturí láser (biopsia cónica con bisturí frío) o utilizando un alambre delgado calentado mediante electricidad (procedimiento electroquirúrgico, LEEP o LEETZ). Después de la biopsia, el tejido extirpado (el cono) se examina con un microscopio. Si los márgenes (bordes más externos) del cono contienen células cancerosas (o precáncer), se necesitará más tratamiento para asegurarse de que todo el cáncer se removió.

Etapas: También se puede usar como el único tratamiento en las mujeres con cáncer en etapa temprana (etapa IAI) que quieren preservar su capacidad para tener hijos.

Ventajas/desventajas: Una biopsia cónica se puede usar para diagnosticar el cáncer antes del tratamiento adicional con cirugía o radiación.

Histerectomía

Se hace para extirpar el útero (tanto el cuerpo del útero como el cuello uterino) (fig. 16), pero no las estructuras próximas al útero (parametrio y ligamentos uterosacros). Cuando se extirpa el útero a través de una incisión quirúrgica en la parte delantera del abdomen, se llama histerectomía abdominal. Cuando se extirpa el útero a través de la vagina, se llama histerectomía vaginal.

Al procedimiento que se emplea para extirpar el útero mediante laparoscopia, se le llama histerectomía laparoscópica. En algunos casos, la laparoscopia se realiza con herramientas especiales para ayudar al cirujano a que vea mejor y con instrumentos que son controlados por el cirujano. A este procedimiento se le llama cirugía asistida por robot.

Etapa: se realiza para tratar el cáncer de cuello uterino en la etapa IA1. La operación también se realiza para algunos tumores cancerosos en la etapa 0 (carcinoma in situ), si hay células cancerosas en los bordes de la biopsia cónica (a esto se le llama márgenes positivos). La histerectomía también se utiliza para tratar algunas condiciones no cancerosas. La más común de éstas es el leiomioma, un tipo de tumor benigno conocido comúnmente como fibroma.

Ventajas/desventajas: Ni la vagina ni los ganglios linfáticos de la pelvis se extirpan. Los ovarios y las trompas de Falopio usualmente se dejan en su lugar a menos que haya alguna otra razón para extirparlos.

Para todas estas operaciones se usa anestesia general o epidural (regional). El tiempo de recuperación y hospitalización tiende a ser más corto para una histerectomía laparoscópica o vaginal que para una histerectomía abdominal. Para una histerectomía vaginal o laparoscópica, la hospitalización es usualmente de uno a dos días y la recuperación demora de dos a tres semanas. Para una histerectomía abdominal se requiere usualmente de 3 a 5 días de hospitalización, y la recuperación completa toma alrededor de 4 a 6 semanas. Normalmente no hay complicaciones, pero pudiera presentarse sangrado excesivo, infección de la herida o daños a los sistemas urinario o intestinal.

Impacto sexual: normalmente, la histerectomía no cambia la capacidad en una mujer de sentir placer sexual. Una mujer no necesita un útero o cuello uterino para alcanzar un orgasmo. El área alrededor del clítoris y la membrana que recubre la vagina permanecen tan sensitivas como antes. Cualquier tipo de histerectomía causa esterilidad.

Histerectomía radical

Extirpa el útero junto con los tejidos contiguos al útero (el parametrio y los ligamentos uterosacros), así como la parte superior (alrededor de una pulgada) de la vagina adyacente al cuello uterino (fig. 16). Los ovarios y las trompas de Falopio no se extirpan a no ser que haya otra razón médica para hacerlo. Esta cirugía usualmente se hace a través de una incisión abdominal. A menudo, también se extirpan algunos ganglios linfáticos pélvicos. Otro método quirúrgico se conoce como histerectomía vaginal radical asistida por laparoscopia. Esta operación combina la histerectomía vaginal radical con una disección laparoscópica de los ganglios pélvicos. La laparoscopia permite observar el interior del abdomen y la pelvis a través de un tubo insertado dentro de una incisión quirúrgica muy pequeña. Algunos instrumentos pequeños se pueden controlar a través del tubo, permitiendo que el cirujano extirpe los ganglios linfáticos a través de los tubos sin hacer una incisión grande en el abdomen. La laparoscopia también puede facilitar a los médicos el extirpar el útero, los ovarios y las trompas de Falopio a través de una incisión vaginal. La laparoscopia también se puede usar para llevar a cabo una histerectomía radical a través del abdomen. Los ganglios linfáticos también son extirpados. Este método se conoce como histerectomía radical asistida por laparoscopia con linfadenectomía.

Etapa: Una histerectomía radical y disección de los ganglios linfáticos pélvicos son el tratamiento usual contra el cáncer de cuello uterino en las etapas IA2, IB, y con menos frecuencia en la etapa IIA, especialmente en las jóvenes.

Ventajas/desventajas: En la histerectomía radical se extirpa más tejido que en la histerectomía simple, por lo que la estadía en el hospital puede ser más larga, de cinco a siete días. Debido a que se extirpa el útero, esta cirugía resulta en infertilidad. Después de esta operación, algunas mujeres presentan problemas al vaciar sus vejigas porque se remueven algunos de los nervios que conducen a

la vejiga. Normalmente no hay complicaciones, pero pudiera presentarse sangrado excesivo, infección de la herida o daños a los sistemas urinario o intestinal.

Impacto sexual: esta cirugía no cambia la capacidad de una mujer de sentir placer sexual. Aunque se acorta la vagina, el área alrededor del clítoris y la membrana que recubre la vagina es tan sensitiva como antes. Una mujer no necesita un útero o cuello uterino para alcanzar un orgasmo. Cuando el cáncer ha causado dolor o sangrado con la relación sexual, la histerectomía puede en realidad mejorar la vida sexual de una mujer al eliminar estos síntomas.

Cervicectomía

En este procedimiento se extirpa el cuello uterino y la parte superior de la vagina, pero no el cuerpo del útero. El cirujano coloca una sutura "en bolsa de tabaco" para que funcione como abertura artificial del cuello uterino dentro de la cavidad uterina. También se extirpan los ganglios linfáticos cercanos mediante una laparoscopia, lo que puede requerir otra incisión (corte).

Etapas: mujeres en etapa IA2 y etapa IB

Ventajas/desventajas: Esta operación se hace a través de la vagina o del abdomen.

Impacto sexual: permite a algunas de estas mujeres ser tratadas sin perder la capacidad de tener hijos. Después de la cervicectomía, algunas mujeres pueden completar el embarazo y dar a luz bebés saludables mediante cesárea. En un estudio, la tasa de embarazo después de 5 años fue de más de 50%, pero las mujeres que se sometieron a esta cirugía presentaron un mayor riesgo de aborto que las mujeres normales que estaban saludables. El riesgo de que el cáncer reaparezca después de este procedimiento es bajo.

Diseción de los ganglios linfáticos pélvicos

El cáncer que se origina en el cuello uterino puede propagarse a los ganglios linfáticos de la pelvis (los ganglios linfáticos son grupos de tejido del sistema inmunológico que tienen forma de frijol). Para saber si hay propagación a los ganglios linfáticos, el cirujano podría extirpar algunos de estos ganglios. Este procedimiento se conoce como diseción de ganglios linfáticos o muestreo de ganglios linfáticos. Se realiza al mismo tiempo que se hace la histerectomía (o la cervicectomía).

Ventajas/desventajas: La extirpación de ganglios linfáticos puede derivar en problemas con el drenaje de líquido en las piernas. Esto puede causar hinchazón severa en las piernas, una condición llamada linfedema.

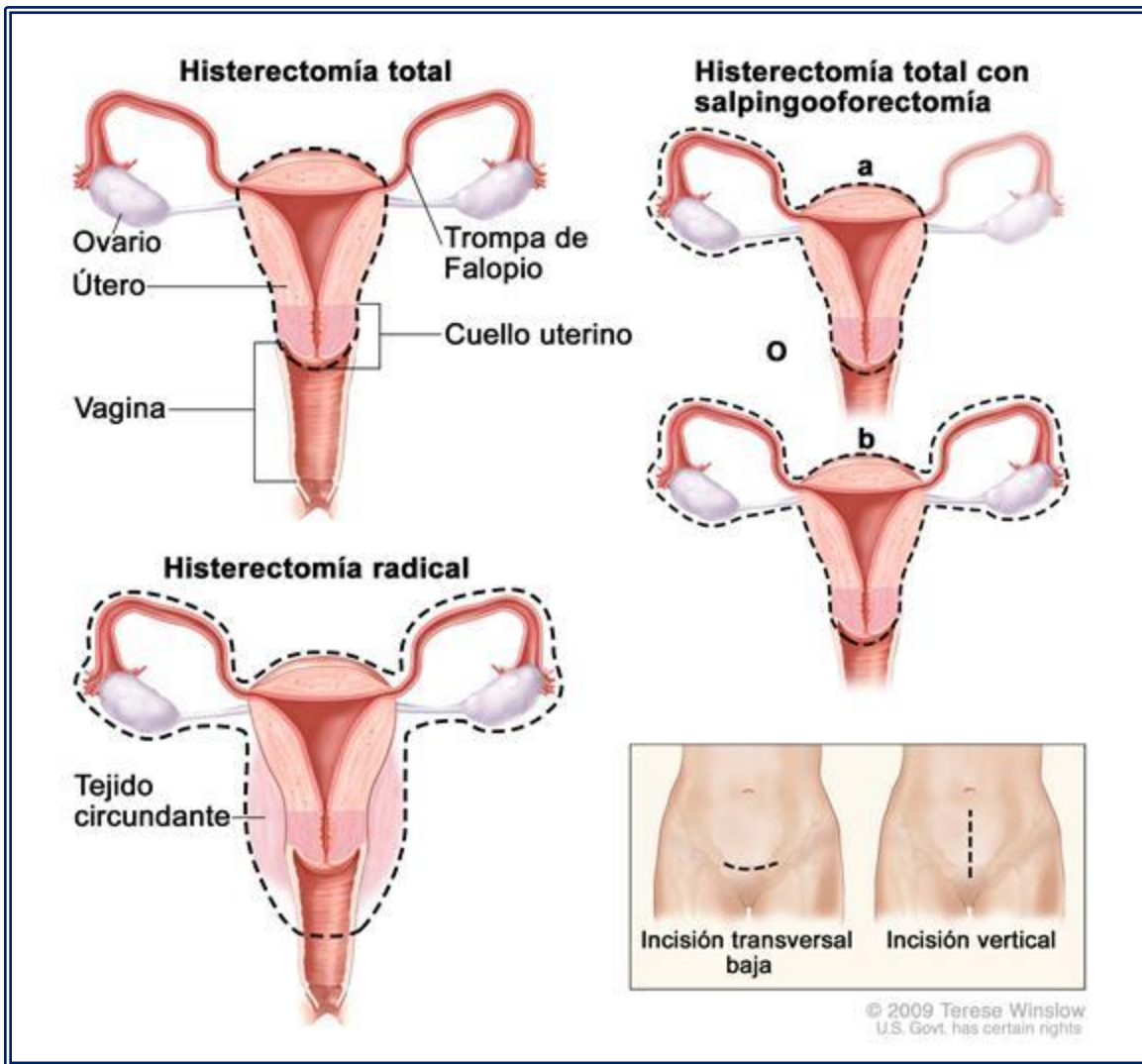


Figura 16: Ejemplos de cirugía para eliminar el CaCu. Tomado de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/Patient/page4>

APENDICE III: Preparación de Reactivos

Verseno

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

Tris base 3.04 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de sodio 8.00 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de potasio 0.04 g (SIGMA, U.S.A)

Etilen – diamina- tetra- acético (EDTA) 0.40 g (SIGMA, U.S.A)

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

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Cloruro de magnesio 0.10 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de calcio 0.10 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de sodio 8.00 g (SIGMA, U.S.A)

Cloruro de potasio 0.20 g (SIGMA, U.S.A)

Fosfato mono ácido de sodio 2.16 g (SIGMA, U.S.A)

Fosfato di ácido de potasio 0.20 g (SIGMA, USA)

El $MgCl_2$ y $CaCl_2$ 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 22 micras y se almacena a 4 °C.

Colorante Cristal Violeta

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

Desactivación del suero

Una botella de Suero Fetal Bovino (Hyclone, U.S.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57° C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml. para su mejor uso y manipulación.

Glutaraldehído

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

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2%)

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

Composición del RPMI-1640 (Sigma .USA).

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

