



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, necrótica y apoptótica de los derivados de Diosgenina: 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-11), en la línea tumoral de cáncer de pulmón SK-LU-1"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA :

Ana Karen Zamora López

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Hugo López Muñoz



CDMX, AGOSTO 2017



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.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Marco teórico	2
2.1 Ciclo celular	2
2.2 Muerte celular	5
2.2.1 Necrosis	5
2.2.2 Apoptosis	6
2.3 Cáncer	9
2.3.1 Agentes carcinógenos	11
2.3.2 Epidemiología	11
2.4 Cáncer de pulmón	12
2.4.1 Factores de riesgo	14
2.4.2 Signos y síntomas	16
2.4.3 Estadificación	16
2.4.4 Métodos diagnósticos	18
2.4.5 Tratamiento	21
2.5 Saponinas	25
2.5.1 Clasificación	26
2.5.2 Distribución	27
2.5.3 Propiedades	27
2.5.4 Relación estructura-función	28
3. Planteamiento del problema	32
4. Justificación	33
5. Hipótesis	34
6. Objetivos	35
6.1 General	35
6.2 Particulares	35
7. Metodología	36
8. Resultados	42
9. Discusión	52
10. Conclusiones	57
11. Perspectivas	58
12. Bibliografía	59
13. Apéndice	65

1. RESÚMEN

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años, siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte por cáncer en el mundo.

En México el cáncer pulmonar se ubica como la segunda causa de muerte por tumores malignos en el hombre y la octava en mujeres y es la enfermedad más importante atribuible al tabaquismo. La mayoría de los pacientes son diagnosticados con la enfermedad en estadio avanzado y, en consecuencia, tienen un pronóstico de vida muy corto. Debido a que los tratamientos utilizados para combatir ésta enfermedad presentan poca o nula selectividad, tienden a causar graves efectos secundarios y son ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas enfocadas en la obtención de compuestos más selectivos, accesibles y menos tóxicos que los utilizados en la actualidad.

Los compuestos de origen vegetal han abierto un nuevo campo hacia la quimioprevención y/o tratamiento contra el cáncer, como es el caso de las saponinas esteroidales y sus derivados, los cuales pueden presentar diversas actividades biológicas sobre distintos tipos de cáncer, entre las que destacan su poder antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral a nivel *in vitro*. Sin embargo, existen pocos estudios sobre su actividad biológica en líneas de cáncer pulmonar. En ese sentido, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el 2-deoxi-2-amino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-11), ambos saponinas esteroidales derivadas de la Diosgenina. Los resultados obtenidos mostraron que ambos compuestos afectan el potencial proliferativo de las células tumorales SK-LU-1 de manera dependiente de la dosis con una IC₅₀ de 25 μ g/ml para el MF-10 y de 20 μ g/ml para el MF-11.

Los compuestos no indujeron muerte celular por necrosis en células tumorales ni en las células no tumorales. Sin embargo, la observación de la disminución del tamaño celular, la formación de cuerpos apoptóticos y la detección de caspasa-3 activa en los cultivos de células tumorales tratadas con dichos compuestos, indica que si inducen a las células tumorales a una muerte celular por apoptosis sin afectar significativamente a células no tumorales, sugiriendo que el 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el 2-deoxi-2-amino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-11) presentan una acción selectiva por lo que podrían ser candidatos para ser evaluados como agentes terapéuticos, con acción selectiva contra el cáncer.

2. MARCO TEÓRICO

La célula es la unidad estructural y funcional de todo ser vivo (Ramírez & Rivera, 2014). En la actualidad, es posible clasificar a las células en grupos ateniéndose a su función, ya que cada célula desarrolla atributos estructurales para adecuarse a una función específica gracias a un proceso de diferenciación (Anderson & Lowe, 2015).

Muchos organismos, como bacterias, amebas y levaduras se componen de células únicas capaces de autorreplicarse independientemente. Los organismos más complejos están compuestos por una colección de células que funcionan de manera coordinada, el cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto por más de 200 tipos de células diferentes, cada una de ellas especializada para una función distintiva y consideradas generalmente como componentes de los cuatro tipos principales de tejidos: tejido epitelial, tejido nervioso, tejido muscular, tejido conectivo y la sangre (Cooper & Hausman, 2011). Los diferentes tejidos, a su vez, forman órganos, que se agrupan para formar sistemas, al conjunto de los cuales se les denomina aparatos (Cerezo, 2009).

2.1 CICLO CELULAR

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos mismos que duplican su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división, conocido como ciclo celular, es el mecanismo mediante el cual todos los seres vivos se reproducen (Alberts *et al.*, 2008). La progresión del ciclo celular es una tarea crucial para todos los organismos multicelulares, ya que determina el tamaño y forma del cuerpo, la renovación de tejidos, la senescencia y la reproducción (Tume, 2014).

La secuencia de eventos que se producen durante el ciclo celular inicia con células en reposo (estado G0), las cuales tienen que ser estimuladas por factores de crecimiento con el fin de entrar en el ciclo celular (Lagunas *et al.*, 2014), el cual se divide en G1, S, G2 y M (Pierce, 2009).

Durante la fase G1 existe crecimiento celular donde la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como son proteínas y ARN. Durante la fase S (síntesis) se produce la replicación o síntesis del ADN, permitiendo la formación de las cromátidas hermanas. La fase G2 es la segunda fase de crecimiento en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN (Lagunas *et al.*, 2014). La fase M incluye: la mitosis, durante la cual los cromosomas duplicados se separan con exactitud en dos núcleos, y la citocinesis, en la que la célula se separa en dos células hijas con contenido genético idéntico entre sí y al de la célula madre de la que provienen (Karp, 2014) (Figura 1).

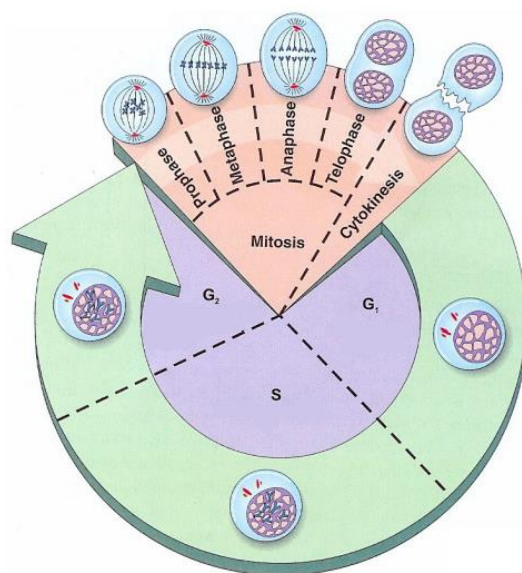


Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular y sus fases. El ciclo celular está dividido en dos etapas que se alternan cíclicamente: interfase y fase M. La interfase se subdivide en tres períodos G₁, S y G₂, mientras que la fase M corresponde a la mitosis y la citocinesis (Fuente: Núñez & Escalona, 2008).

El paso de una fase a otra en el ciclo celular está controlado por proteínas en el citoplasma. Entre ellas las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (Cdk). La concentración de ciclinas cambia en las diferentes fases del ciclo, sintetizándose y degradándose, en cambio, la concentración de las Cdk permanece estable durante todas las etapas del ciclo, pero cada una de ellas ha de unirse a la ciclina apropiada para ser activadas. Estas cinasas, cuando se activan fosforilan una serie de sustratos proteicos que controlan determinados momentos del ciclo celular (Boticario & Cascales, 2012).

La ciclina D forma complejos activos con CDK4 y CDK6 tempranamente en G₁. La subsiguiente activación del complejo CDK2-ciclinaE dirige la progresión de G₁ a S y, para llevar a cabo una adecuada replicación del genoma durante la fase S, la célula requiere la activación del complejo CDK2-ciclinaA (Ramírez *et al.*, 2014). La transición entre G₂/M está regulada de manera similar por la ciclina B que se combina con la CDK1 lo que empuja a la célula a dividirse (Pierce, 2009). Adicionalmente, para asegurar un adecuado paso a través de cada una de las fases, los complejos CDK-ciclina pueden ser regulados por inhibidores específicos de CDK, conformados por dos grandes familias: INK4 (p16, p15, p18 y p19) y KIP (p21, p27 y p57) (Ramírez *et al.*, 2014) (Figura 2).

En el ciclo celular existen también mecanismos de vigilancia preparados para detectar daños del ADN o los cromosomas denominados puntos de control. Estos puntos de control funcionan para mantener la estabilidad genética, proporcionando tiempo adicional para la reparación de daños en el ADN y la terminación de los acontecimientos que son necesarios para la división celular precisa (Tume, 2014).

El punto de control de G1 se encarga de asegurar el tamaño y la duplicación del centrosoma; el de G1/S verifica que la replicación del ADN sea correcta; el de G2 verifica que la replicación del ADN sea completada correctamente y el punto de control de la fase mitótica verifica que los husos y cromosomas funcionen correctamente para distribuir equitativamente el ADN a las células hijas (Medina & Martínez, 2009). En estos puntos participan proteínas que, a manera de sensores, reconocen el daño en el ADN, deteniendo de forma transitoria el progreso del ciclo celular para que la célula pueda reparar el daño antes de ingresar a una nueva etapa. En el caso de que el daño no sea reparado se conduce a la muerte de la célula (Salazar *et al.*, 2013).

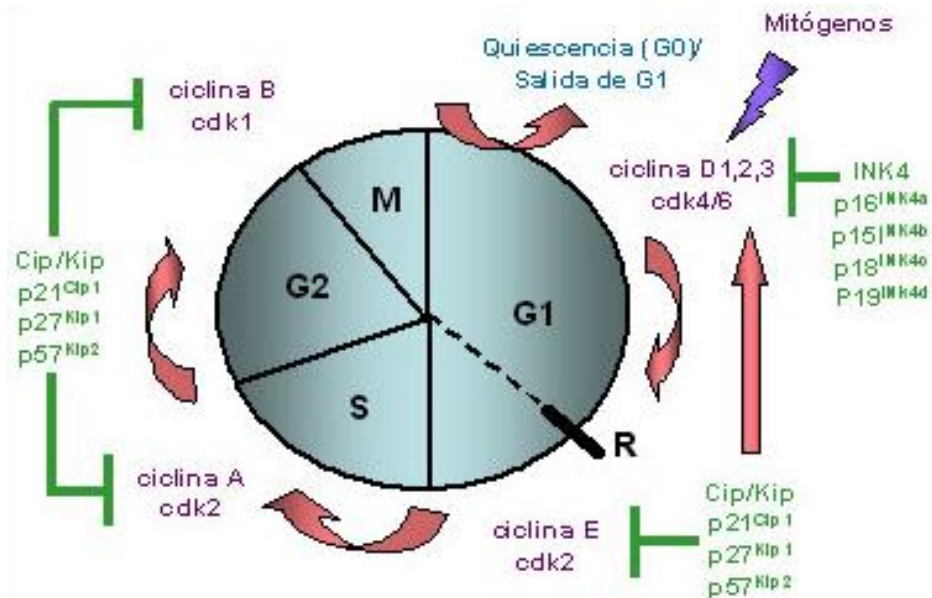


Figura 2. Ciclinas, CDK e inhibidores de CDK en la regulación del ciclo celular. Los complejos ciclina D-CDK 4/6 y ciclina E-CDK2 regulan la transición de G1 a S. El complejo ciclina A-CDK2 está activo en la fase S. El complejo ciclina B-CDK1 es esencial para la transición de G2 a M. Dos familias de inhibidores de CKD pueden bloquear su actividad y la progresión a lo largo del ciclo celular. Los inhibidores INK4 actúan sobre los complejos ciclina D-CDK4 y CDK6. La otra familia de tres inhibidores, puede inhibir todas las CDK (Fuente: Cánepa, 2007).

2.2 MUERTE CELULAR

Las células se hallan inmersas en un ciclo continuo de proliferación y muerte. El equilibrio entre ambos procesos es fundamental para mantener el correcto funcionamiento de los tejidos, sin embargo, el desequilibrio entre ambos mecanismos puede dar lugar a la aparición de diferentes enfermedades. Si se da una mayor proliferación, pueden desarrollarse tumores o procesos cancerosos y, si se da una mayor mortalidad, pueden surgir trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer. La muerte celular permite por lo tanto, que aquellas células que no funcionan correctamente, sean destruidas de una manera controlada (Oropesa *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista morfológico se considera que una célula está muerta cuando ha perdido la integridad de su membrana plasmática y ha sufrido fragmentación completa, incluyendo su núcleo (López *et al.*, 2012). Aunque se han descrito diferentes tipos de muerte, solo tres de ellas se han estudiado con mayor detalle: la necrosis, la apoptosis y la autofagia (Chaabane *et al.*, 2013).

2.2.1 Necrosis

El tipo de muerte celular por necrosis se produce cuando el daño del tejido es letal o se produce una muerte accidental, considerándose una muerte “patológica” de las células o tejidos del organismo (Ramírez & Rivera, 2014).

La necrosis se caracteriza por ejecutarse en ausencia de síntesis proteica e independiente de un programa celular definido, además de que se genera por la entrada masiva de iones y agua al interior de la célula, lo que ocasiona su hinchamiento y subsecuente explosión, razón por la que se considera un proceso pasivo y desordenado (López *et al.*, 2012).

Las características morfológicas propias de la necrosis incluyen el hinchamiento temprano de los organelos intracelulares como las mitocondrias y el retículo endoplásmico, así como de la célula en general (oncosis), el núcleo se mantiene relativamente preservado (López *et al.*, 2012) mientras que, hay ruptura de la membrana plasmática y una posterior pérdida de los contenidos intracelulares, por lo que se genera una respuesta inflamatoria causada por los componentes citosólicos que se vierten en el espacio intercelular a través de la membrana dañada (Chaabane *et al.*, 2013) (Figura 3).

2.2.2 Apoptosis

La apoptosis se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que se desencadenan en respuesta a determinados estímulos y que conduce a la muerte de la célula en forma ordenada y “silenciosa” (Rugeles *et al.*, 2009), de manera contraria a la necrosis, es un mecanismo activo dependiente de energía y sin presencia de inflamación (Ramírez *et al.*, 2014).

Las alteraciones morfológicas que se producen en la célula durante la apoptosis afectan tanto al núcleo como al citoplasma. Los cambios morfológicos en el núcleo consisten en la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. Estos vienen acompañados de un redondeamiento de la célula y una reducción de su volumen. Por otro lado, en la membrana plasmática, que se mantiene intacta, se forman una serie de protrusiones (fenómeno conocido como blebbing) (Oropesa *et al.*, 2015). Finalmente, la célula encoge y se rompe en fragmentos envueltos de membrana denominados cuerpos apoptóticos, los cuales son reconocidos de manera eficaz y fagocitados mediante macrófagos y células vecinas, de modo que las células que mueren por apoptosis son rápidamente retiradas de los tejidos (Cooper & Hausman, 2011).

La eliminación de células apoptóticas está mediada por la expresión de señales presentes en la superficie celular, estas señales incluyen a la fosfatidilserina, que normalmente se encuentra en la cara interna de la bicapa lipídica (Fuchs & Steller, 2015). Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se expone en el lado externo de los cuerpos apoptóticos actuando como señal para atraer a los macrófagos, siendo de esta forma fagocitados eficientemente (Chaabane *et al.*, 2013) (Figura 3).

La apoptosis puede ser provocada intrínseca o extrínsecamente y culmina en la activación de caspasas, que son una clase de Cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos en casi todas las células (Fuchs & Steller, 2015), éstas son las encargadas de ejecutar el proceso de muerte celular y activar a otras enzimas que degradan múltiples proteínas con el consiguiente desmantelamiento de la arquitectura celular (Ramírez & Rivera, 2014).

En la especie humana, se conocen al menos 11 caspasas; la 1 y la 11 se encuentran involucradas en el procesamiento de citocinas, mientras que las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 se asocian con la regulación de la apoptosis (Ramírez *et al.*, 2014). Las caspasas se clasifican en tres grupos de acuerdo con sus funciones: 1) Caspasas inflamatorias: incluye las caspasas 1, 4 y 5; 2) Caspasas iniciadoras de la apoptosis: a este grupo pertenecen las caspasas 2, 8, 9 y 10; y 3) Caspasas efectoras o ejecutoras: pertenecen a este grupo las caspasas 3, 6 y 7 (Rugeles *et al.*, 2009).

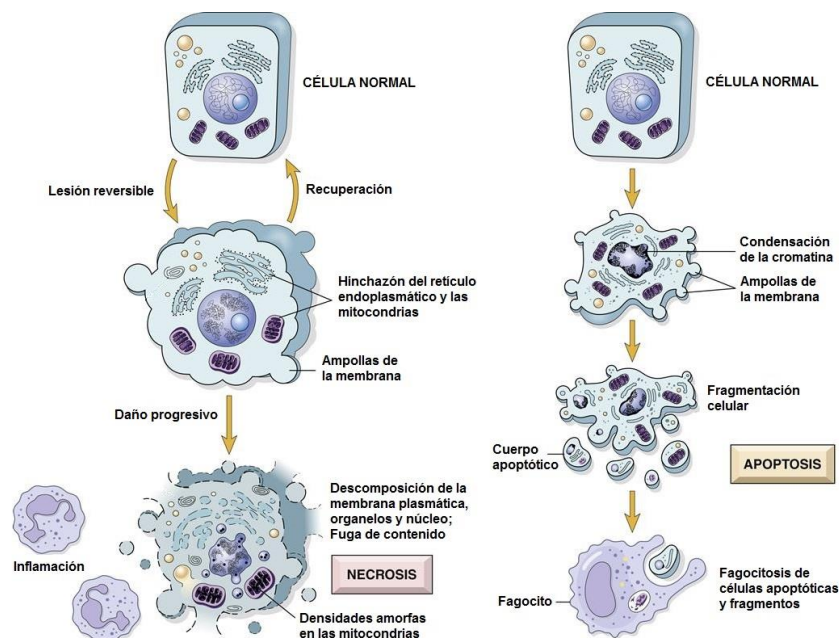


Figura 3. Cambios morfológicos que ocurren durante la necrosis y apoptosis. La necrosis implica la muerte de células por alteración de la homeostasis y lleva consigo una reacción inflamatoria. La apoptosis es un proceso más selectivo por el cual las células son eliminadas y no se acompaña de inflamación (Fuente: Kumar *et al.*, 2009).

Vía intrínseca

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, como activación de oncogenes o daño del ADN. Esta vía es mediada desde la mitocondria (Muñoz & Cuca, 2016) y está regulada por miembros de la familia de proteínas Bcl-2, que se caracteriza por la presencia de uno o más dominios BH. Los miembros de esta familia pueden dividirse en tres grupos: 1) miembros que fomentan la apoptosis (Bax, Bak), 2) miembros antiapoptóticos que protegen a las células de la apoptosis (Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-2) y 3) proteínas solo BH3 (llamadas así porque solo comparten el dominio BH3 con otros miembros de la familia), que fomentan la apoptosis por un mecanismo indirecto (Bid, Bad, Puma y Bim) (Karp, 2014).

Los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax y Bak) se insertan en la membrana mitocondrial y forman conductos o poros por los que se libera citocromo c al citosol (Fuchs & Steller, 2015), éste interactúa con el factor apoptótico activador de proteasas (APAF-1) y ATP para formar el apoptosoma, mismo que posteriormente activa a la caspasa-9, que a su vez promueve la activación de la caspasa-3 (López *et al.*, 2012), la cual actúa a través de sus actividades proteolíticas para inducir los múltiples cambios celulares asociados con el programa apoptótico (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 4).

Vía extrínseca

La activación de la vía extrínseca involucra la participación de receptores localizados en la membrana plasmática comúnmente llamados “receptores de muerte celular”, que pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (López *et al.*, 2012) tales como Fas o TNFR-1 a través de la unión de un ligando de muerte asociado a su respectivo receptor en la superficie celular (Muñoz & Cuca, 2016). Tras la unión del ligando a los receptores de muerte sus dominios de muerte citoplásmica (usualmente actuando como trímeros) atraen moléculas adaptadoras (típicamente FADD) que conducen a la activación de la caspasa-8. Este reclutamiento provoca la posterior activación de las caspasa efectora 3 (Chaabane *et al.*, 2013).

La vía extrínseca puede activar también la vía intrínseca a través de la caspasa-8. La escisión de la proteína BID por caspasa-8 genera un fragmento de t-BID que se une a Bcl-2 en la membrana externa mitocondrial, llevando a la liberación de citocromo c en el citosol y la consecuente activación de la caspasa-9 y las caspasas efectoras 3, 6 y 7 a través de la vía intrínseca de la apoptosis (Lodish *et al.*, 2013) (Figura 4).

El papel más importante de la apoptosis es la eliminación de células dañadas, ya que las células con genomas dañados pueden portar mutaciones que podrían desencadenar el desarrollo de un cáncer (Cooper & Hausman, 2011).

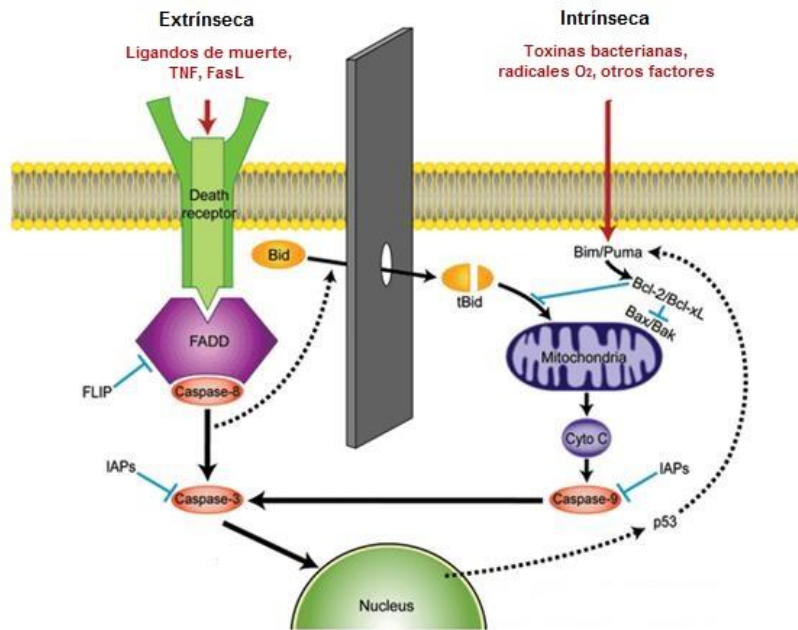


Figura 4. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. La apoptosis puede ser desencadenada por señales internas de las células por la vía intrínseca, o bien puede tener lugar mediante un mecanismo extrínseco que es disparado por señales externas a la célula (Fuente: Coto, 2007).

2.3 CÁNCER

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (OMS) y que tienen en común la habilidad de hacer crecer las células en forma no controlada y con pérdida de respuesta a los mecanismos reguladores de crecimiento, provocando la aparición de tumores (Valencia & Ancer, 2013).

Los tumores presentan poco riesgo para el paciente si se encuentran localizados en los tejidos de donde se originan, éstos son llamados tumores benignos, las células que componen estos tumores se asemejan mucho a las células normales y pueden funcionar como tales además de que un tumor benigno se rodea por una capsula que lo convierte en un blanco fácil para su extracción, sin embargo, se convierten en problemas médicos cuando su gran volumen interfiere con las funciones normales o si secretan cantidades en exceso de sustancias biológicamente activas como las hormonas. Por el contrario, las células que componen un tumor maligno (canceroso), por lo general crecen y se dividen más rápidamente que las células normales y no mueren a la tasa normal (Lodish *et al.*, 2013). A medida que las células normales evolucionan a un estado neoplásico, adquieren una sucesión de características distintivas (Figura 5), entre las cuales la característica clave de las células malignas es su capacidad para invadir los tejidos circundantes y adquirir la capacidad de metastatizar (Hanahan & Weinberg, 2011). En consecuencia, el cáncer es difícil de erradicar, siendo la metástasis responsable del 90% de las muertes asociadas con esta enfermedad (Alberts *et al.*, 2008).



Figura 5. Conjunto de ventajas adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo cancerígeno (Fuente: Modificado de Hanahan *et al.*, 2011).

Los tumores malignos y benignos se clasifican de acuerdo al tipo de célula del que proceden (Cooper & Hausman, 2011). El 90% de los tumores son generados por células epiteliales debido a que estas son las que mantienen durante más tiempo la capacidad de dividirse a lo largo de la vida, además, debido a su localización recubriendo las superficies externas e internas del organismo, están más expuestas a la acción de agentes tóxicos (Muñoz, 2004). Este tipo de tumores derivados de células epiteliales se denominan carcinomas; los sarcomas son los que derivan de tejido conjuntivo o de fibras musculares y, entre los cánceres que no encajan en ninguna de estas dos categorías se encuentran las diversas formas de leucemia y linfomas, derivados de las células de la línea blanca sanguínea y células hematopoyéticas. Paralelamente existen nombres relacionados con tumores benignos, donde cada uno tiene características que reflejan su origen, un adenoma por ejemplo, es un tumor epitelial benigno con organización glandular, siendo el tipo de tumor maligno un adenocarcinoma (Alberts *et al.*, 2008).

Durante la conversión de las células normales hacia células cancerosas, la aparición de múltiples mutaciones en los genes de reparación del ADN, predisponen a los portadores a un aumento de inestabilidad genómica. Las mutaciones se producen principalmente en dos clases de genes: los oncogenes y genes supresores de tumores (Tume, 2014).

Los oncogenes codifican proteínas que promueven la conversión de una célula a su estado maligno actuando como aceleradores de la proliferación celular. Los oncogenes provienen de protooncogenes (Karp, 2014), que son genes que codifican proteínas que regulan de manera normal la progresión del ciclo celular y el estado normal de diferenciación (Salazar *et al.*, 2013). Las células con mutaciones en protooncogenes transforman éstos en oncogenes, los cuales son capaces de transferir estas mutaciones a las células hijas de manera dominante, es decir, un oncogen requiere tan solo una mutación para contribuir al desarrollo del tumor. Entre los oncogenes más prominentes figura c-myc y miembros de la familia Ras (Granados *et al.*, 2013).

Los genes supresores de tumores o antioncogenes desempeñan un papel clave en la tumorigénesis, ya que operan restringiendo o suprimiendo la proliferación celular. Los más importantes son Rb y p53. La proteína Rb se encarga de detener la célula en la fase G1 e impide la entrada a la fase S al unirse al factor de transcripción E2F. A medida que avanza el ciclo celular Rb se hiperfosforila, lo que provoca que se desprenda de E2F y le permite comenzar la síntesis de ADN (Salazar *et al.*, 2013). Por su parte p53 es un factor de transcripción que regula las señales de estrés, la supervivencia celular, el control del ciclo celular y la estabilidad del genoma. El incremento de p53 inhibe la progresión de G1 a S en células con ADN dañado. Si el daño no es demasiado grave, p53 induce la detención del ciclo celular mientras que se repara el daño. Sin embargo, si el daño es grave, la célula es impulsada hacia la muerte celular (Lagunas *et al.*, 2014).

2.3.1 Agentes carcinógenos

Una sustancia carcinógena es cualquier agente físico, químico o biológico capaz de originar un cáncer en el organismo (Medina & Martínez, 2009). Éstos actúan sobre los oncogenes y genes supresores de tumores (Granados *et al.*, 2013).

Los carcinógenos químicos son responsables de la gran mayoría de cánceres en el hombre, entre un 80 y un 90% (Muñoz, 2004). Se clasifican en: 1) Agentes de acción directa, que no requieren activación metabólica. Algunos de ellos se usan como quimioterapéuticos (ciclofosfamida, cisplatino, busulfano) y 2) Agentes de acción indirecta, que requieren activación metabólica para convertirse en dañinos para el ADN, como son los hidrocarburos policíclicos presentes en derivados del petróleo y en productos de la cocción de alimentos como carnes rojas y pescado, otros como el benzopireno son productos de la combustión del tabaco (Valencia & Ancer, 2013).

Los agentes físicos cancerígenos son principalmente la luz ultravioleta, las radiaciones ionizantes y las fibras minerales. Dentro de las fibras minerales, los asbestos son los que tienen un potencial mutagénico mejor estudiado ya que son utilizados desde hace tiempo por sus propiedades como aislante térmico, y más recientemente en la industria como protector del fuego (Muñoz, 2004).

Entre los carcinógenos biológicos, los virus constituyen una causa muy importante en la aparición de cánceres. Los virus cuyo material genético está constituido por ARN se les conoce como retrovirus a los cuales pertenece el virus del sida (Medina & Martínez, 2009). Algunos de los virus oncogénicos de ADN son: virus del Papiloma Humano (Granados *et al.*, 2013), virus de Epstein Barr y los virus de hepatitis B y hepatitis C (Boticario & Cascales, 2012).

2.3.2 Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, siendo el cáncer pulmonar el más frecuente en ambos sexos (1.59 millones de defunciones), seguido por el cáncer hepático (745,000 defunciones), gástrico (723,000 defunciones), colorrectal (694,000 defunciones), mamario (521,000 defunciones) y cáncer de esófago (400,000 defunciones). En el año 2015 hubo 8.8 millones de defunciones por cáncer en el mundo y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015).

El cáncer de pulmón es más frecuente entre las personas de sexo masculino, sin embargo, la prevalencia en el sexo femenino se ha incrementado en los últimos diez años (Amorín, 2013).

En México, el cáncer pulmonar representa la segunda causa de muerte por tumores malignos en el hombre y la octava en mujeres y es la enfermedad más importante atribuible al tabaquismo. Para el año 2012 se registraron en nuestro país 148,000 nuevos casos de cáncer, con 78,700 defunciones por esta causa. La incidencia de cáncer de pulmón fue de 8,439 casos nuevos, siendo el sexo masculino ligeramente más afectado con una incidencia de 5,471 y el femenino de 2,968. Para ese mismo año la mortalidad registrada fue de 4,945 varones y 2,663 mujeres, 12.8 % y 6.6 % del total de casos en varones y mujeres respectivamente (GLOBOCAN, 2012).

2.4 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer pulmonar es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células, tanto pulmonares como bronquiales (Moctezuma & Patiño, 2009) (Figura 6).

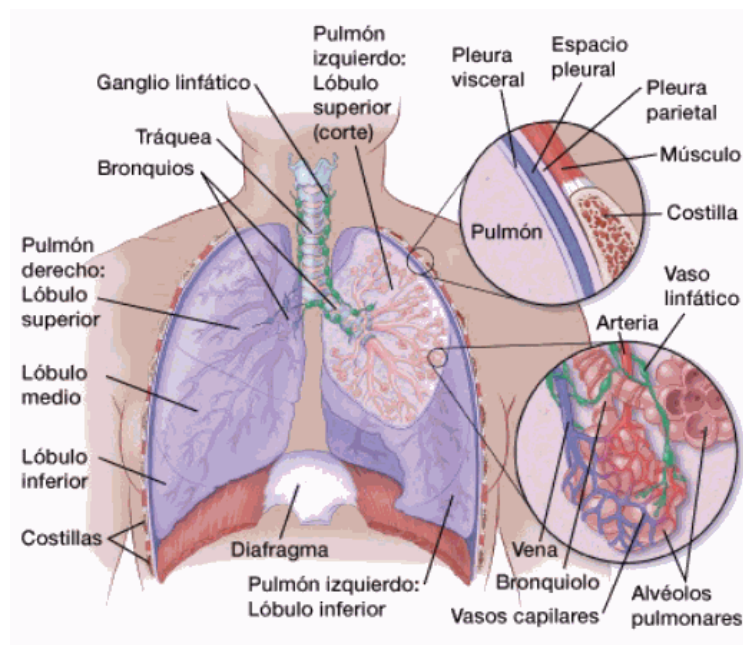


Figura 6. Anatomía del sistema respiratorio que muestra ambos pulmones con sus lóbulos y las vías respiratorias. También se muestran los ganglios linfáticos, el diafragma, entre otras estructuras. El oxígeno se inhala a los pulmones y pasa a través de las membranas delgadas de los alvéolos hacia el torrente sanguíneo (Fuente: (American Cancer Society, 2016).

Existen dos categorías de cáncer pulmonar considerando el origen y el comportamiento de las células cancerosas:

- ❖ Carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP), el cual es de comportamiento muy agresivo, prolifera rápidamente provocando metástasis extensas tempranas y muestra la mayor relación con el tabaquismo, ya que el 98% de los pacientes que lo presentan cuentan con historial de tabaquismo.
- ❖ Carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), este tipo de cáncer muestra un patrón de crecimiento relativamente lento y metastatiza tardíamente (Moctezuma & Patiño, 2009).

A pesar de ello, el CPCP representa aproximadamente solo un 15% de todos los nuevos casos de cáncer de pulmón, mientras que el CPCNP representa aproximadamente el 85% restante (Gridelli *et al.*, 2015). Estos cánceres se denominan “amicrocíticos”, “no microcíticos” o “de células no pequeñas” porque las células que se encuentran en el tumor no se ven pequeñas al microscopio, a diferencia del otro tipo de cáncer pulmonar menos habitual denominado carcinoma pulmonar “microcítico” o “de células pequeñas”, que se caracteriza por el pequeño tamaño de las células que lo componen. El cáncer pulmonar de células no pequeñas puede surgir en cualquier lugar del tejido que reviste las vías aéreas en el pulmón (ESMO, 2016) y se divide a su vez en tres subtipos:

- **Adenocarcinoma:** Ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica (50 %) siendo el tipo más común de cáncer de pulmón observado en pacientes no fumadores. Surge de células glandulares mucoproducidas (Moctezuma & Patiño, 2009) y es más común en mujeres que en hombres. En comparación con otros tipos de cáncer de pulmón, es más probable que ocurra en personas jóvenes (American Cancer Society, 2016). Por lo general, el adenocarcinoma suele originarse en la periferia pulmonar (Resano & Anta, 2014) (Figura 7a).
- **Carcinoma de células escamosas (epidermoide):** Aproximadamente un 25% a 30% de todos los cánceres de pulmón son carcinomas de células escamosas. Éstos se originan de versiones inmaduras de células escamosas, las cuales son células planas que cubren el interior de las vías respiratorias en los pulmones. A menudo están relacionados con antecedentes de tabaquismo y tienden a estar localizados en la parte central de los pulmones, cerca de una vía respiratoria principal (bronquio) (American Cancer Society, 2016) (Figura 7b).
- **Carcinomas indiferenciados:** Ocupan el 5% de los casos, entre ellos el carcinoma de células grandes, que puede surgir en cualquier parte del pulmón y también se asocia a tabaquismo (Moctezuma & Patiño, 2009) (Figura 7c).

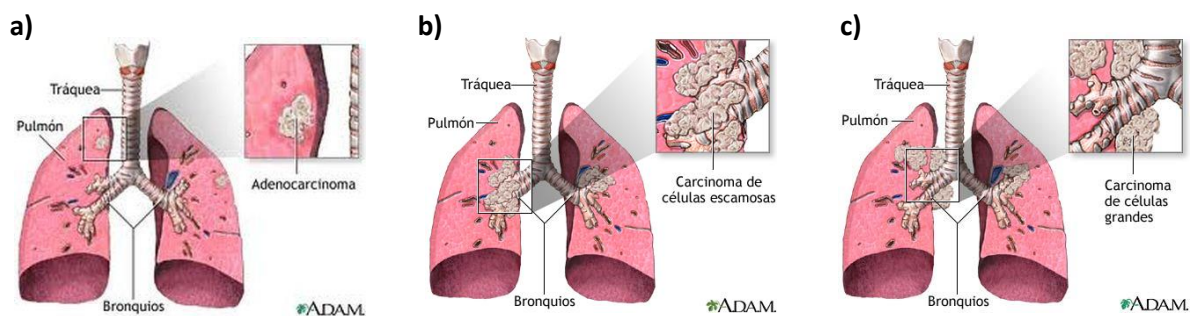


Figura 7. El cáncer pulmonar de células no pequeñas se divide en cáncer no escamoso, principalmente adenocarcinomas (a), escamocelular, al cual pertenece el cáncer de células escamosas (b) y un tercer tipo que son los carcinomas indiferenciados (c), basándose en las características histopatológicas (Fuente: Enciclopedia Médica A.D.A.M, 2016).

2.4.1 Factores de riesgo

Tabaquismo

Los factores de riesgo del cáncer de pulmón son diversos, pero destaca el tabaquismo, tanto activo como pasivo (Moctezuma & Patiño, 2009), siendo responsable del 80-90% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y del 55-80% en mujeres. El tabaco contiene aproximadamente cuatro mil compuestos químicos (Fernández & Ruano, 2009), de los cuales más de sesenta son reconocidos cancerígenos, entre los más conocidos están las nitrosaminas, los benzopirenos y los radioisótopos del radón, todos ellos con la capacidad de alterar el ADN y, con ello contribuir en la carcinogénesis (Amorín, 2013). Se ha confirmado que el riesgo de cáncer de pulmón es notablemente mayor al aumentar el número de cigarrillos fumados por día. También parecen tener influencia la intensidad de la inhalación, el uso o no de filtro o el tipo de tabaco, ya que el uso de filtros permite reducir la cantidad de alquitrán inhalada (Fernández & Ruano, 2009).

El fumador pasivo, tiene un riesgo 35% mayor de contraer cáncer de pulmón (Medina & Martínez, 2009), ya que la exposición al humo de tabaco en el ambiente (es decir, pasivo o exposición de “segunda mano”) es una mezcla de la corriente lateral (humo emitido por el cigarrillo encendido) y la corriente principal (el humo que es exhalado) (Sun *et al.*, 2007). Existe también el término “humo de tercera mano” refiriéndose a los componentes que se depositan en las superficies y se pueden absorber por la dermis o las mucosas. La dosis de carcinógenos recibidos en la exposición en el tabaquismo pasivo es mucho inferior que, en el tabaquismo activo, pero puede ser mucho más prolongada, ya que en ocasiones se inicia desde la niñez (Resano & Anta, 2014).

Exposición ocupacional o ambiental

- ✓ **Radón:** Es un gas radiactivo producido por la descomposición del uranio natural en rocas y suelo (Sun *et al.*, 2007). Se encuentra a concentraciones muy bajas en el aire atmosférico pero puede acumularse en suelos, paredes y cimientos de casas. Es especialmente importante para los mineros que suelen estar expuestos a altas concentraciones (ESMO, 2016), ya que cuando se inhala, es en su mayoría exhalado inmediatamente, pero los productos de su desintegración tienden a depositarse sobre el epitelio bronquial (Gridelli *et al.*, 2015).
- ✓ **Asbesto:** Se usa en diversos productos para aislamiento térmico, protección antiincendios, aislamiento acústico, suelos, techos y muchos otros materiales de construcción (ESMO, 2016).
- ✓ **Humo de leña doméstico:** La quema de carbón para calefacción y cocción de alimentos en hogares sin una ventilación adecuada, implica calentar los aceites de cocina a altas temperaturas, lo que resulta en la generación de altos niveles de sustancias volátiles que son mutagénicas y contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos, así como aldehídos (Sun *et al.*, 2007), y otras partículas nocivas como fenoles, cresoles, compuestos orgánicos como el benceno, el formaldehído y el butadieno (Amorín, 2013).

Otros factores de riesgo son la exposición a ciertos metales (cromo, cadmio, arsénico), radiación, contaminación del aire y las emisiones de diésel (American Cancer Society, 2016).

Susceptibilidad genética

La susceptibilidad genética podría contribuir al riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en los no fumadores, particularmente en aquellos que desarrollan la enfermedad a una edad menor (<50 años) (Gridelli *et al.*, 2015). La susceptibilidad genética se asocia con 1.5 veces mayor riesgo de cáncer de pulmón en los no fumadores (Sun *et al.*, 2007).

Enfermedad pulmonar benigna

En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) tiene un papel principal el consumo de tabaco; sin embargo, la propia patología se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, probablemente relacionado con la inflamación y cicatrización que es parte de su desarrollo. Otras enfermedades benignas son: algunos tipos de fibrosis pulmonar, neumonías, tuberculosis, silicosis y asbestosis (Resano & Anta, 2014).

Edad

Tanto la incidencia como la mortalidad aumentan con la edad. La edad de diagnóstico es siempre mayor en hombres que en mujeres, debido a que en los hombres la enfermedad se desarrolla en edades más tardías. Además, cuantos más años se haya fumado mayor será el riesgo ya que la cantidad de alteraciones generadas por los carcinógenos será mayor (Fernández & Ruano, 2009). Es por ello que hoy en día se ha documentado que el cáncer pulmonar afecta con más frecuencia a las personas entre los 50 a 60 años de edad (Amorín, 2013).

2.4.2 Signos y síntomas

El cáncer pulmonar temprano rara vez da síntomas, durante estos estadios el 80% de los pacientes presenta síntomas generales e inespecíficos como debilidad, pérdida de peso (Amorín, 2013), pérdida de apetito y fatiga. Mientras que los síntomas más específicos, como tos, aumento de la producción de esputo, disnea (falta de aliento), ronquera (disfonía), dolor torácico y presencia de sangre en el esputo se relacionan con la presencia del tumor primario (ESMO, 2016). En la mayoría de los casos se detecta la enfermedad en etapa tardía. Esto puede ser debido en parte al mayor tiempo entre la aparición de los síntomas del cáncer y la presentación del paciente a la atención médica, lo que lleva a diagnósticos más tardíos de la etapa y por lo tanto menos elegibles para el tratamiento potencialmente curativo (Walter *et al.*, 2015).

Cuando los pacientes acuden a la consulta generalmente el cáncer de pulmón se encuentra en estadio IIIB o IV, lo que implica una pobre supervivencia a cinco años (Amorín, 2013).

2.4.3 Estadificación

El CPCP se divide en estadio “limitado” y “extendido”. El estadio limitado ocurre cuando el cáncer de pulmón está confinado a un solo lado o área del tórax. El estadio extendido ocurre cuando el cáncer de pulmón se ha diseminado en ambos pulmones, o en otras áreas fuera de los pulmones tales como el hígado, los huesos o el cerebro (Slatore & Lareau, 2014).

La clasificación actual del CPCNP se realiza en base al sistema TNM, siendo el componente T el tamaño tumoral, N la afectación ganglionar y M la existencia o no de metástasis (Tabla 1). Una vez que se ha realizado la clasificación TNM, se asigna un estadio, que va desde el 0 (menos avanzado) al IV (más avanzado). Así mismo algunas etapas se subdividen en A y B (Sanchez *et al.*, 2011) (Tabla 2, Figura 8)

T	Tumor primario
TX	Tumor probado por la existencia de células tumorales malignas en esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por métodos de imagen o broncoscopia
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤3 cm, sin evidencia broncoscópica de invasión proximal del bronquio principal T1a: Tumor ≥2 cm T1b: Tumor >2 cm y <3 cm
T2	Tumor >3 cm pero ≤7 cm, afecta al bronquio principal, pero no al pulmón entero T2a: Tumor >3 cm pero ≤5 cm T2b: Tumor >5 cm pero ≤7 cm
T3	Tumor >7 cm o de cualquier tamaño que invada directamente la pared torácica, el diafragma o la pleura mediastínica; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en su mismo lóbulo
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade el mediastino, el corazón, los vasos, la tráquea, el esófago; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral
N	Ganglios linfáticos regionales
NX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No existen metástasis ganglionares linfáticas regionales
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos
N3	Metástasis ganglionares linfáticas mediastínicas
M	Metástasis a distancia
M0	No existen metástasis a distancia
M1	M1a: Existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario; o tumor con nódulos pleurales o derrame pleural maligno M1b: Existen metástasis a distancia

Tabla 1. Sistema internacional de estadificación TNM-estadios 2009 (7ª edición). Las iniciales TNM representan el Tamaño y la ubicación del tumor, la ubicación de cáncer en los Nódulos linfáticos, y si el cáncer se ha diseminado, llamado Metástasis (Fuente: Modificado de Resano & Anta, 2014).

ESTADIOS			
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1 a,b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T1 a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Estadio IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier t	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1 a, b

Tabla 2. Agrupación por estadios. El sistema TNM ayuda a asignar al cáncer de pulmón uno de estos cuatro estadios, los cuales se vuelven más complicados según avanza el grado de la enfermedad (Fuente: Modificado de Sánchez *et al.*, 2011).

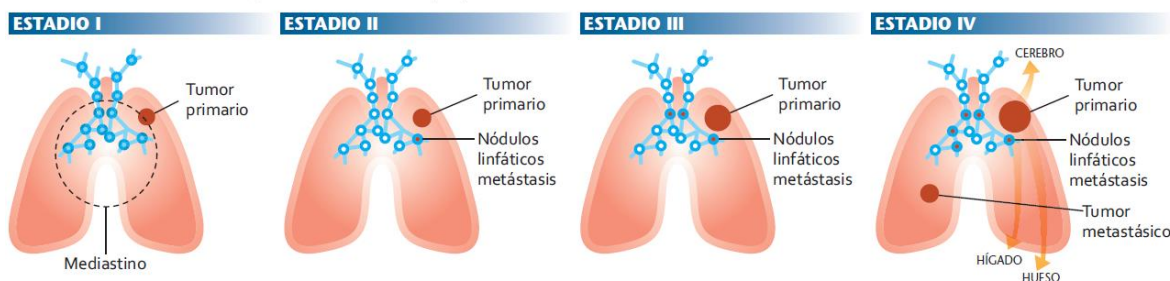


Figura 8. Estadios del cáncer de pulmón según el sistema de clasificación TNM que va desde el menos avanzado al más avanzado. En el primer estadio se observa un tumor primario, mientras que en el estadio final (IV) existe la presencia de un tumor metastásico (Fuente: Slatore & Lareau, 2014).

El riesgo de un segundo tumor es significativo. Se define como sincrónico (1-7%) a la presencia de dos tumores al mismo tiempo o detectados en un intervalo corto de tiempo; o metacrónico (10%) al segundo cáncer que aparece después de un intervalo amplio. La diseminación puede ser por extensión directa, afectando pleura, vasos, ganglios o pared torácica, por vía linfática a ganglios bronquiales, hiliares y mediastinales y por vía hematogéna que no respeta ningún órgano. Los más afectados son hueso, hígado y cerebro (Moctezuma & Patiño, 2009).

2.4.4 Métodos diagnósticos

TÉCNICAS DE IMAGEN

Radiografía de tórax

Es un examen diagnóstico por rayos X que se utiliza cuando existe la sospecha de cáncer de pulmón, debido a la rapidez en su realización permite mostrar la existencia de áreas sospechosas. Aunque cabe destacar que no es la prueba más precisa (GEPAC, 2013) ya que los resultados son normales en hasta el 4% de los pacientes con cáncer de pulmón (Gridelli *et al.*, 2015) (Figura 9a).

Tomografía computarizada (TC)

Es un estudio con rayos X que produce imágenes de los diferentes órganos y huesos del cuerpo (GEPAC, 2013). Permite obtener información detallada sobre el tamaño, la localización, las relaciones anatómicas con estructuras vecinas y puede detectar nódulos de muy pequeño tamaño, habitualmente no detectables mediante radiografía de tórax. Antes de realizarla, el paciente debe tomar una solución de contraste para aumentar su eficacia (Sanchez *et al.*, 2011).

Tomografía por emisión de positrones (PET)

Basa su capacidad diagnóstica en la elevada actividad metabólica del tejido neoplásico por lo que la 18-fluorodesoxiglucosa (18-FDG) se incorpora con más avidéz a las células tumorales que a las normales. Esta técnica incorpora un equipo de TC por lo que se combinan las ventajas de ambas modalidades: la información metabólica de la PET y la anatómica de la TC (Rosell *et al.*, 2008) (Figura 9b).

Resonancia magnética (RM o RMN)

Utiliza ondas de radio e imanes potentes para proveer imágenes detalladas de los tejidos blandos. El gadolinio, un material de contraste, a menudo se inyecta en una vena antes de realizar el estudio para mostrar mejor los detalles. La RM se usa con frecuencia para determinar la presencia de metástasis en el cerebro o a la médula espinal (American Cancer Society, 2016) (Figura 9c).

Gammagrafía ósea

Una pequeña cantidad de sustancia radiactiva se inyecta en un vaso sanguíneo, ésta viaja por el torrente sanguíneo y se acumula en los huesos. Un escáner detecta y mide la radiación creando imágenes de los huesos que pueden mostrar si el cáncer se ha diseminado a ellos (NIH, 2014) (Figura 9d).

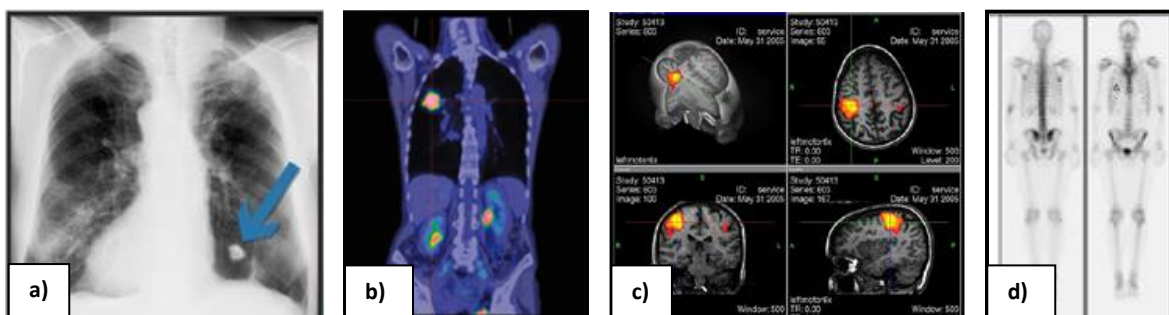


Figura 9. Técnicas de imagen para el diagnóstico del cáncer de pulmón. (a) Radiografía de tórax. (b) Tomografía por emisión de positrones/Tomografía computarizada. (c) Resonancia magnética. (d) Escáner óseo. Todas ellas en pacientes con cáncer pulmonar (Fuente: GEPAC, 2013).

Una vez localizadas las lesiones positivas mediante técnicas de imagen, requieren de una confirmación histológica, por lo que el siguiente paso es seleccionar la técnica apropiada para obtener una muestra de biopsia y confirmar un diagnóstico patológico (Gridelli *et al.*, 2015).

Citología de esputo

Consiste en un examen, al microscopio, de las células del pulmón que se encuentran en el esputo (moco y otras materias expulsadas desde los pulmones al expectorar). Para inducir el esputo se administra una solución salina al paciente (en caso de no conseguir esputo, se aumenta la concentración de sales hasta obtener la muestra necesaria) (Fernández & Ruano, 2009).

Biopsia por aspiración con aguja fina (AAF)

Hace referencia a la extracción de tejido o líquido del pulmón mediante una aguja fina. Para localizar el tejido o líquido anormal, se realiza una exploración con una TC y se realiza un pequeño corte en la piel donde se introduce la aguja de biopsia en el tejido o líquido anormal. Se extrae una muestra y se envía al laboratorio para verificar si hay células cancerosas (NIH) (Figura 10a).

Broncoscopía

Se utiliza para examinar la tráquea y los bronquios. Se realiza mediante la introducción de un broncoscopio en las vías respiratorias, el cual contiene fibra óptica que permite visualizar todo el recorrido desde un monitor. Tiene además un mecanismo que permite tomar muestras de lesiones sospechosas y, una vez aspirados se analizan en el microscopio (AECC) (Figura 10b).

Ultrasonografía endoscópica respiratoria

Permite el abordaje de casi todas las estaciones ganglionares (Resano & Anta, 2014), confirmando la invasión de ganglios linfáticos. Se usa un tubo de ultrasonografía para identificar el ganglio sospechoso y obtener una biopsia (ESMO, 2016) (Figura 10c).

Mediastinoscopia

Procedimiento que se utiliza para examinar y obtener una biopsia de los ganglios linfáticos mediastínicos (NIH) con un laparoscopio insertado a través de una incisión de aproximadamente 1 cm por encima de la unión del esternón con la clavícula (ESMO, 2016) (Figura 10d).

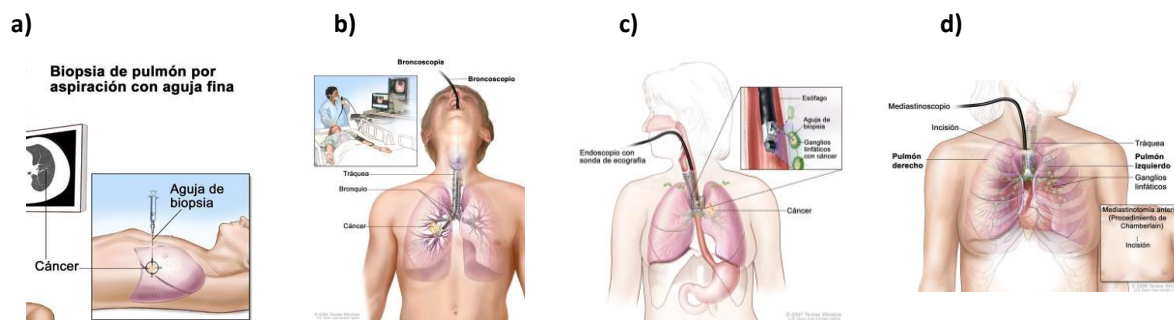


Figura 10. Representación esquemática de algunas técnicas utilizadas para obtener una muestra tumoral. (a) Biopsia por aspiración con aguja fina. (b) Broncoscopia. (c) Ultrasonografía endoscópica respiratoria. (d) Mediastinoscopia (Fuente: NIH).

2.4.5 Tratamiento

El tratamiento depende de la histología (CPCP o CPCNP), la extensión (estadio) y de factores relacionados con el paciente (edad, función pulmonar y comorbilidad) (Resano & Anta, 2014). Los tratamientos pueden incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia y/o terapias dirigidas.

En el CPCP se distinguen dos estrategias de tratamiento: En los de estadio limitado consiste en la combinación de quimioterapia y radioterapia, con una mejora en la supervivencia a cinco años del 5% comparada con la quimioterapia sola. En los de estadio extendido se utiliza quimioterapia donde se producen tasas de respuesta del 50 - 80%. Aunque el CPCP responde más a la quimioterapia y radioterapia, es difícil lograr la curación porque tiene mayor tendencia a estar ampliamente diseminado en el momento del diagnóstico (Rodríguez & Rodríguez, 2010).

El CPCNP en estadio I-II (tempranos) es un cáncer localizado por lo que puede curarse con cirugía en la mayoría de los casos, la radioterapia es una opción para pacientes no candidatos a cirugía, mientras que, la quimioterapia adyuvante es una opción después de la operación quirúrgica para el estadio II. El CPCNP en estadio III (localmente avanzado) aunque todavía está localizado, representa un estado de enfermedad muy heterogénea por lo que el tratamiento suele ser una integración de todas las modalidades: cirugía, radioterapia y quimioterapia. El CPCNP en estadio IV es una enfermedad que se ha diseminado a lugares u órganos lejanos del cuerpo (huesos, cerebro, hígado, glándulas suprarrenales, pleura y el otro pulmón), por lo que la radioterapia está indicada como tratamiento paliativo. La terapia dirigida es el pilar de tratamiento, sus objetivos son mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia (ESMO, 2016).

Cirugía

Tiene por objetivo extirpar el cáncer de pulmón y algunos tejidos que están alrededor, como los nódulos linfáticos. La cantidad de tejido que se extirpa depende del tamaño y la diseminación del tumor, así como de la cantidad que se puede extirpar sin que exista algún riesgo. Los tipos de cirugías del cáncer de pulmón son:

- 1) Resección en cuña: consiste en extraer una porción pequeña del lóbulo en forma de triángulo.
- 2) Segmentectomía: consiste en extirpar una sección más grande, pero no el lóbulo entero.
- 3) Lobectomía: se extirpa el lóbulo entero del pulmón.
- 4) Neumonectomía: se extirpa todo el pulmón, ya sea izquierdo o derecho (Slatore & Lareau, 2014) (Figura 11).

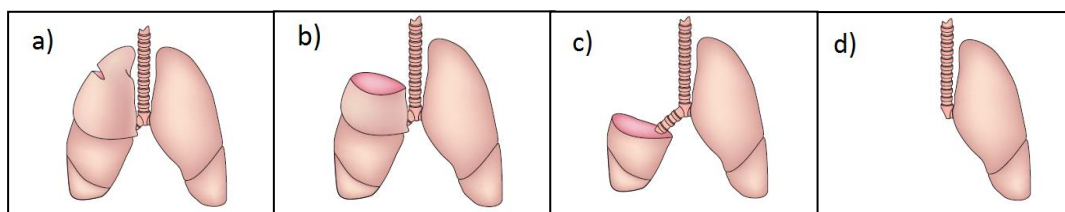


Figura 11. Tipos de cirugías del cáncer de pulmón. a) Resección en cuña, b) Segmentectomía, c) Lobectomía, d) Neumonectomía. Los pulmones están divididos en 2 secciones o lóbulos, 3 lóbulos en el pulmón derecho y 2 en el izquierdo (Fuente: (Slatore & Lareau, 2014).

La cirugía puede tener efectos secundarios graves, éstos dependen de la extensión de la cirugía y de la condición de salud previa de la persona, entre ellos se incluyen: exceso de sangrado, coágulos sanguíneos en los pulmones, infecciones y neumonía. Aunque en pocas ocasiones, es posible que algunas personas no sobrevivan a la cirugía (American Cancer Society, 2016).

Radioterapia

También llamada terapia con rayos X o irradiación, es el uso de un tipo de energía (llamada radiación ionizante) que puede destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o destruye las células, en el área que recibe tratamiento, al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano de alrededor (Rodríguez & Rodríguez, 2010).

La radioterapia puede ser radical, si se pretende eliminar el tumor y que este no crezca más, o paliativa con el objetivo de reducir o estabilizar el tumor para mejorar la calidad de vida del paciente (GEPAC, 2013).

Existen dos tipos principales de radioterapia: Radioterapia con haces externos y braquiterapia (terapia de radiación interna). La radioterapia con haces externos dirige la radiación desde fuera del cuerpo hacia el cáncer. Por su parte, la braquiterapia se usa para reducir el tamaño de los tumores que están en la vía respiratoria y así aliviar los síntomas ya que la radiación sólo viaja una distancia corta (American Cancer Society, 2016).

Aunque la radioterapia no causa dolor, sí puede causar otros efectos secundarios que dependen principalmente de la cantidad de radiación administrada y de la parte del cuerpo que recibe el tratamiento. La radioterapia dirigida al pecho puede causar irritación de garganta, tos, falta de aire (NIH, 2014), daño a los tejidos cerca del tumor como pulmones y esófago, dificultad o dolor para tragar, daños en la piel, cansancio, pérdida de apetito y del cabello (Slatore & Lareau, 2014).

Quimioterapia

La quimioterapia consiste en la utilización de drogas muy potentes, también llamadas citotóxicas, que frenan el crecimiento de las células tumorales, matándolas o impidiendo su división y crecimiento (GEPAC, 2013).

Existen múltiples fármacos quimioterápicos utilizados solos o en combinación para el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer de pulmón. Los medicamentos de quimioterapia que se emplean con más frecuencia para el cáncer de pulmón no microcítico incluyen: Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel (Taxol), Paclitaxel basado en albúmina (nab-paclitaxel, Abraxane), Docetaxel (Taxotere), Gemcitabina (Gemzar), Vinorelbina (Navelbine), Irinotecán (Camptosar), Etopósido (VP-16), Vinblastina y Pemetrexed (Alimta) (American Cancer Society, 2016).

Los efectos secundarios dependen principalmente de los fármacos que se usen y de la dosis. La quimioterapia destruye células cancerosas que crecen con rapidez, pero también puede dañar las células normales que se dividen rápidamente como son:

- Glóbulos de la sangre: Cuando los fármacos hacen que bajen las concentraciones de glóbulos de la sangre sanos, existe mayor probabilidad de contraer infecciones o de sangrar con facilidad, por lo que suelen presentarse síntomas como debilidad y cansancio.
- Células en las raíces del pelo: La quimioterapia puede causar la caída del pelo. Este volverá a crecer después del tratamiento, pero es posible que cambien el color y la textura.

- Células que revisten el tubo digestivo: La quimioterapia puede causar falta de apetito, náuseas, vómitos, diarrea, o llagas en la boca y labios.

Otros efectos secundarios posibles son la sordera, el dolor en articulaciones y cosquilleo o entumecimiento en manos y pies (NIH, 2014).

Terapia dirigida

Un tratamiento puede considerarse “dirigido” para atacar sólo células cancerosas dejando intactas las células normales; puede estar dirigido contra una proteína específica cuya desactivación deja las células cancerosas incapaces de dividirse o sobrevivir; o puede estar dirigido contra las células cancerosas de un paciente con base en su patrón único de mutaciones somáticas (Karp, 2011). En la actualidad existen 3 tipos de mutaciones relacionadas con diversos tipos de cáncer de pulmón de células no pequeñas, que tienen terapias dirigidas eficaces como son: 1) Mutación EGFR; 2) Mutación K-RAS y 3) Traslocación de genes EML4-ALK (GEPAC, 2013).

Existen medicamentos que atacan a las células que tienen un reordenamiento en el gen de linfoma quinasa anaplásico (ALK). El reordenamiento en este gen produce una proteína anormal que causa que las células crezcan y se propaguen. Los medicamentos incluyen: Crizotinib (Xalkori), Ceritinib (Zykadia) y Alectinib (Alecensa) (American Cancer Society, 2016). Otro tipo de medicamentos son los llamados inhibidores del EGFR. El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína en la superficie de las células que normalmente les ayuda a crecer y dividirse, por lo que estos fármacos bloquean la señal del EGFR para el crecimiento de las células. Entre estos se encuentran: Erlotinib (Tarceva), Afatinib (Gilotrif) y Gefitinib (Iressa) (American Cancer Society, 2016). En cuanto a las mutaciones en K-RAS, éstas son mutuamente excluyentes de las mutaciones EGFR y están asociadas a la resistencia de los inhibidores tirosin quinasa del EGFR (Campos *et al.*, 2012), sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible formular inhibidores de su señalización (NIH).

Las terapias dirigidas para tumores que albergan este tipo de mutaciones, tienen una tasa de respuesta alta (Gridelli *et al.*, 2015). Desafortunadamente, se ha observado que el 50% de los pacientes tratados con EGFR desarrollan resistencia después de 6 a 12 meses de tratamiento (Campos *et al.*, 2012), además de que al igual que el resto de los tratamientos puede tener efectos secundarios como erupción de la piel, diarrea, dificultad visual suave (Slatore & Lareau, 2014), cansancio, falta de aliento, dolor en el vientre, tensión arterial alta, vómitos e hinchazón de pies y manos (NIH, 2014).

Éstos efectos secundarios pueden ser muy graves, incluso algunas veces más severos que la misma enfermedad (Schlaepfer & Mendoza, 2010), por lo que el uso de éstos métodos para combatir el cáncer no suelen curar al paciente, debido a que matan grandes cantidades de células normales junto con las cancerosas y tienen utilidad curativa limitada para los estados más avanzados de la enfermedad (Karp, 2014), además, la mayoría de medicamentos utilizados para tratar el cáncer son poco selectivos y presentan altos niveles de resistencia y toxicidad, afectando considerablemente el pronóstico de vida en pacientes con cáncer (Muñoz & Cuca, 2016).

Se ha demostrado por numerosos estudios que las saponinas esteroidales poseen potencial para inhibir la proliferación de células tumorales malignas. Por tal motivo se necesitan estudios adicionales para explorar la eficacia de estas en el tratamiento del cáncer de pulmón (Zhu *et al.*, 2016). Esto ha despertado el interés de conocer el efecto antiproliferativo, necrótico e inductor de apoptosis del MF-10 y el MF-11.

2.5 SAPONINAS

Las saponinas son metabolitos secundarios de naturaleza glicosídica (Podolak *et al.*, 2010) formadas por un núcleo esteroidal hidrofóbico (o genina) y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos (Cervantes, 2016), la cual se encuentra unida a la genina por el hidroxilo del carbono-3 (Díaz, 2009) y puede ser de una a tres cadenas de azúcares lineales o ramificadas, más a menudo compuestas de D-glucosa, L-ramnosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, L-arabinosa, D-xilosa o D-fucosa (Podolak *et al.*, 2010) (Figura 12).

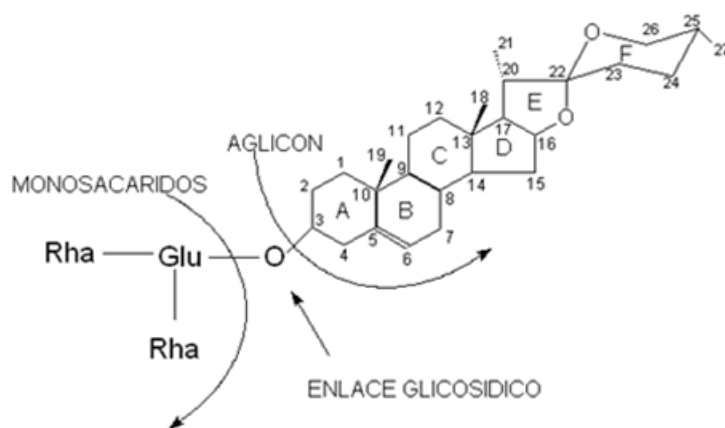


Figura 12. Ejemplo de saponina esteroidea (Fuente: Cervantes, 2016).

2.5.1 Clasificación

Las saponinas a menudo se subdividen en dos clases principales, las saponinas triterpenoides y las saponinas esteroides, ambas derivadas de los 30 átomos de carbono que contiene su precursor, el oxidosqualeno. La diferencia entre las dos clases radica en el hecho de que las saponinas esteroides son moléculas con 27 átomos de carbono, mientras que en las saponinas triterpenoides se mantienen todos los 30 átomos de carbono (Vincken *et al.*, 2007). Las saponinas esteroidales comprenden generalmente un esqueleto de estrosterano (estructura de seis anillos) o un esqueleto de furosterano (estructura de cinco anillos) (Deore *et al.*, 2009).

Algunos autores distinguen un tercer grupo clasificado como alcaloides esteroides o glicoalcaloides (Díaz, 2009). Aunque estos compuestos tienen el mismo ancestro biosintético que las saponinas esteroides y triterpenoides, contienen un átomo de nitrógeno en su estructura de aglicona, lo que los clasifica como un grupo separado (Vincken *et al.*, 2007) (Figura 13).

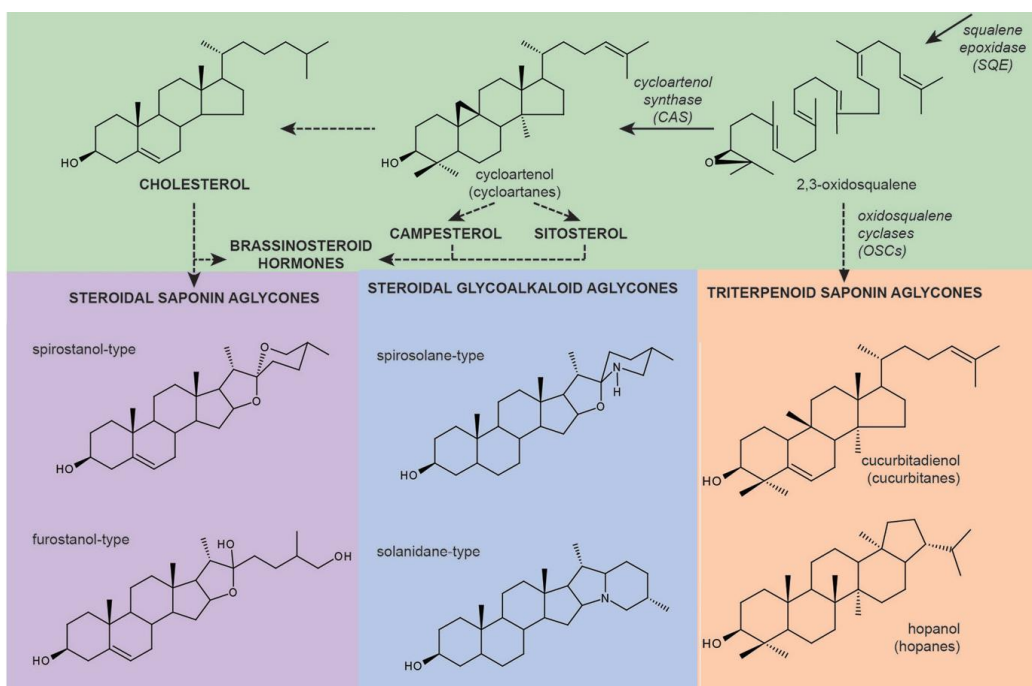


Figura 13. Diversidad estructural de saponinas. El colesterol es el precursor para la síntesis de saponinas esteroidales (violeta) y glicoalcaloides esteroides (azul). Las saponinas triterpenoides (naranja) se sintetizan a partir de 2,3-oxidossqualeno (Fuente: Modificado de Tessa *et al.*, 2014).

2.5.2 Distribución

Las saponinas son sintetizadas y acumuladas por muchas familias de plantas diferentes y generalmente se encuentran de forma específica en órganos y tejidos como raíces, tallos, corteza, hojas, semillas, frutos y flores y de plantas enteras, a partir de las cuales se han aislado diferentes tipos de saponinas (Sparg *et al.*, 2004, Shuli *et al.*, 2010, Tessa *et al.*, 2014).

Las saponinas esteroidales 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 Scrophulariaceae (Cervantes, 2016).

Las saponinas triterpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas (Díaz, 2009) como Acanthopanax, Leguminosae, Araliaceae, Scrophulariaceae, Campanulaceae y Caryophyllaceae (Shuli *et al.*, 2010). Ambas presentes en alimentos como garbanzos, habas, lentejas, ajo, espinacas, alfalfa (Deore *et al.*, 2009), avena, semilla de tomate, yuca (Negi, 2013), espárragos, frijoles, moras y el té (Sparg *et al.*, 2004).

Los glicoalcaloides esteroideos se encuentran comúnmente en miembros de la familia Solanaceae incluyendo tomate, patata, berenjenas y pimiento (Tessa *et al.*, 2014).

Aunque se ha reportado que la mayoría de saponinas están presentes en más de 500 géneros de plantas (Negi, 2013), un menor número se encuentran en algunas fuentes animales, como por ejemplo invertebrados marinos (Podolak *et al.*, 2010) tales como pepinos de mar (Holothuroidea) y estrellas de mar (Asteroidea) (Tessa *et al.*, 2014) y en el reino fúngico (Fernández *et al.*, 2012).

2.5.3 Propiedades

La complejidad estructural de las saponinas da lugar a una serie de propiedades físicas, químicas y biológicas (Negi, 2013). Se ha encontrado que al menos 150 tipos de saponinas naturales poseen propiedades anticancerígenas significativas, y que debido a su toxicidad para diversos organismos, pueden ser utilizadas para su aplicación insecticida, antibiótica (Shuli *et al.*, 2010) antifúngica, antibacteriana y antiviral (Sparg *et al.*, 2004), además de poseer diversas propiedades farmacológicas como inmunoestimulantes, antihepatotóxicos, antidiarreicos, antiulcerogénicos, anticoagulantes, hepatoprotectores, neuroprotectores, antiinflamatorios (Negi *et al.*, 2013) e hipoglucémicos (Zhao *et al.*, 2016).

A pesar de su gran diversidad estructural, estos compuestos comparten algunas propiedades biológicas únicas, como la capacidad de lisar los eritrocitos o de producir espuma en soluciones acuosas (Podolak *et al.*, 2010). De ahí el nombre “saponina” que se deriva de la palabra latina 'sapo', que significa jabón y hace alusión a las propiedades detergentes de esta familia de compuestos (Vincken *et al.*, 2007).

La propiedad hemolítica se atribuye generalmente a la interacción entre las saponinas y los esteroides de la membrana eritrocitaria. Como resultado, la membrana rompe, causando un aumento en la permeabilidad y una pérdida de hemoglobina (Sparg *et al.*, 2004). Esta capacidad de lisis vuelve a las saponinas agentes altamente tóxicos cuando se inyectan en el torrente sanguíneo. Sin embargo, son relativamente inofensivas cuando se toman por vía oral ya que la toxicidad se minimiza durante la ingestión por baja absorción y por hidrólisis (Deore *et al.*, 2009).

2.5.4 Relación estructura-función

La naturaleza de la genina y los grupos funcionales en las saponinas, así como el número y la naturaleza de los azúcares pueden variar enormemente (Deore *et al.*, 2009). La presencia en la genina policíclica de diferentes sustituyentes, tales como hidroxilos, hidroximetilos, carboxilos y grupos acilo, así como las diferencias en la composición, el enlace y el número de cadenas de azúcar, representan una diversidad estructural significativa de saponinas (Podolak *et al.*, 2010).

Aunque la genina juega el papel principal en la actividad biológica, es bien conocido que los restos azúcares también desempeñan un papel importante en la actividad de los glicósidos esteroideos, por ejemplo, aumentando la solubilidad en los medios fisiológicos, ayudando con la permeabilidad celular y la vida útil, y en la dirección de la molécula al sitio activo (Fernández *et al.*, 2010).

Las diferencias en la estructura de la saponina que incluyen el tipo, la posición y el número de restos de azúcar unidos por un enlace glicosídico en diferentes posiciones de los anillos pueden influir característicamente en las respuestas biológicas, especialmente para la actividad antitumoral (Shuli *et al.*, 2010).

Entre las saponinas con mayor actividad antitumoral desatacan la dioscina y la diosgenina. La Dioscina ((25R)-espirost-5-en-3 β -ilo-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopiranosido) es un tipo de saponina esteroidea aislada de la corteza de la raíz de *Dioscorea nipponica*. Su estructura presenta dos ramnosas unidas a una glucosa en el C-3 de la genina (Jaeyong *et al.*, 2013) (Figura 14a).

La Dioscina posee efectos antiproliferativos y apoptóticos contra un número de células de cáncer humano, incluyendo las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB de cáncer de mama (Aumsuwan *et al.*, 2016), la línea Kyse510 para cáncer de esófago (Wang *et al.*, 2012), la línea K562 proveniente de leucemia mielógena crónica humana (Ming *et al.*, 2004), las líneas HeLa y SiHa de cáncer cervical (Zhao *et al.*, 2016) y en las líneas A549, H1299 (Hsieh *et al.*, 2013), NCI-H460 y NCI-H446 para cáncer pulmonar (Yongli *et al.*, 2013). Además, estudios farmacológicos demuestran que la Dioscina posee diversas actividades biológicas, incluyendo antiinflamación y hepatoprotección (Wang *et al.*, 2012), se utiliza como medicina tradicional en el tratamiento de la hipercolesterolemia, hiperglucemia y diabetes (Aumsuwan *et al.*, 2016) y ha sido ampliamente utilizada para la síntesis de fármacos hormonales esteroideos (Hsieh *et al.*, 2013).

Se ha reportado que los derivados de la Dioscina entre las saponinas esteroidales poseen varias propiedades terapéuticas, incluyendo anticancerígenos, antivirales y antineoplásticos, especialmente la Diosgenina ((25R)-espirost-5-en-3 β -ilo) (Jaeyong *et al.*, 2013), la cual es una saponina esteroide formada por la hidrólisis de la dioscina (Figura 14b) que sirve para la producción de corticosteroides, hormonas sexuales, anticonceptivos orales, así como otros fármacos esteroideos (Shah & Lele, 2012).

La actividad anticancerígena de la Diosgenina está relacionada con la presencia de un doble enlace en el carbono 5 de su estructura, además de la conformación estructural en su átomo de carbono 25R. Diversos estudios sugieren que la Diosgenina suprime el crecimiento de células cancerosas a través de múltiples eventos de señalización celular asociados con proliferación, diferenciación y apoptosis (Iraj, 2011), de igual forma ha demostrado ejercer efectos anticancerígenos contra una amplia variedad de células tumorales, incluyendo cáncer de hígado en la línea tumoral HepG2 (Dae *et al.*, 2012), leucemia mielógena crónica humana sobre la línea K562 (Ming *et al.*, 2004), cáncer de próstata con la línea PC3 (Chen *et al.*, 2011). En conjunto, estos hallazgos implican el uso de Diosgenina como un nuevo agente quimioterapéutico contra varias enfermedades (Iraj, 2011).

La Diosgenina-3-glu (β -D-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo) es una saponina esteroideal, sintetizada a partir de la Diosgenina, por la adición de una glucosa en el carbono 3 de su estructura esteroideal (Figura 14c). Posee actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células de cáncer cervicouterino sobre las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo (Martínez, 2013).

A pesar de su gran aplicación, las saponinas en determinadas concentraciones son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos (Díaz, 2009), además de causar hemólisis. En particular, se ha demostrado que la dioscina y la diosgenina son citotóxicas frente a varias líneas celulares de cáncer (Hu & Yao, 2002). No obstante, las plantas ricas en saponinas se han utilizado con fines medicinales desde la antigüedad y hasta la fecha siguen desempeñando un papel importante en la medicina. Una de sus aplicaciones es su uso como adyuvantes en la producción de vacunas, y en particular, las saponinas esteroidales han servido para la producción de hormonas esteroides (Podolak *et al.*, 2010).

El desarrollo de nuevos fármacos en épocas recientes, se enfoca en encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios (Schlaepfer & Mendoza, 2010).

El resto carbohidrato de las saponinas esteroidales juega un papel muy importante en la actividad biológica, y es de interés, por lo tanto, buscar nuevas variantes de glucósidos esteroidales con actividad anticancerígena selectiva (Fernández *et al.*, 2012) y efectos adversos reducidos para generar una nueva gama de fármacos candidatos con actividad mejorada (Tessa *et al.*, 2014).

Por ello, se realizó una modificación en la estructura de la Diosgenina-3-glu obteniendo dos nuevos compuestos esteroidales. El 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10), el cual contiene una acetilglucosamina en el carbono 3 de la genina (Figura 14d) y el 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11), el cual posee una glucosamina hidroclicorada unida al carbono 3 de la genina (Figura 14e), ya que se ha demostrado que la glucosamina exhibe propiedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo* y tiene un riesgo muy bajo de efectos adversos (Brasky, *et al.*, 2011).

Se reconoce que la adición de acetilglucosamina puede modular funciones celulares, tales como transcripción, traducción, degradación proteolítica, señalización celular y apoptosis en cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2011), mientras que la glucosamina hidroclicorada ha evidenciado actividades antitumorales, antiproliferativas y proapoptóticas sobre diversas líneas tumorales como las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama (Chou *et al.*, 2015) y las líneas A549, H1299, H460 y A226B de cáncer de pulmón (Song *et al.*, 2014).

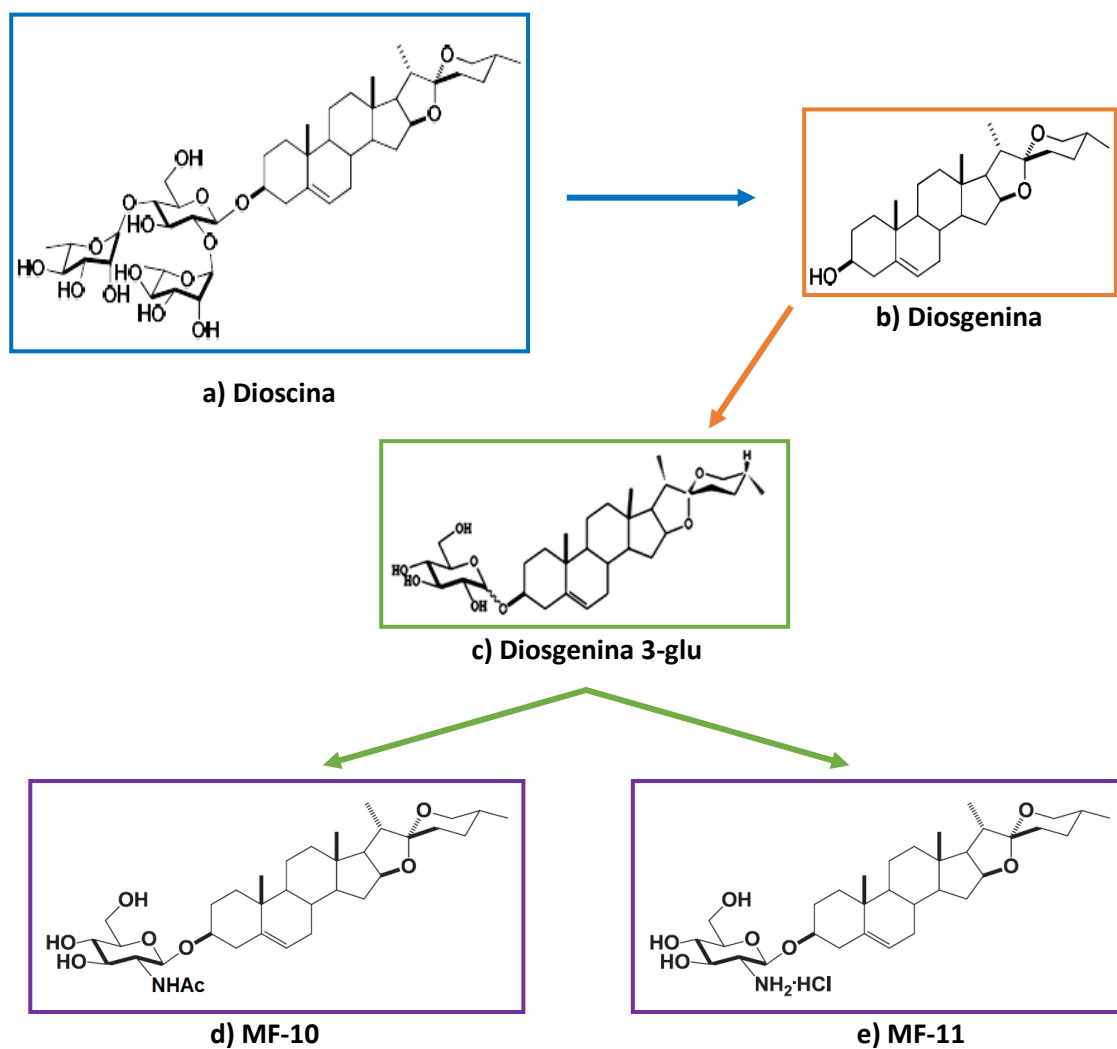


Figura 14. Estructura molecular de la Dioscina (a), Diosgenina (b), Diosgenina 3-glu (c), MF-10 (d) y MF-11 (e) (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las terapias actualmente utilizadas para erradicar el cáncer no han sido del todo benéficas, ya que suelen tener efectos secundarios graves que deterioran notablemente la calidad de vida de los pacientes, muestran poca o nula acción selectiva afectando tanto a las células tumorales como a las normales, en muchos casos presentan cierto grado de citotoxicidad, es decir inducen una muerte necrótica en las células del organismo y son ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad.

La investigación basada en compuestos de origen natural y/o vegetal propuestos como nuevas terapias alternativas orientadas hacia la prevención y tratamiento del cáncer van cada día en aumento y, dentro de este grupo de compuestos se encuentran las saponinas esteroides, a las cuales se les han atribuido efectos citotóxicos, anticancerígenos, antioxidantes e inductores de apoptosis.

Por tal motivo en el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos glico-conjugados esteroidales MF-10 y MF-11 para generar información sobre su potencial antitumoral y en un futuro puedan ser propuestos como agentes terapéuticos contra el cáncer.

4. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más frecuente en ambos sexos siendo la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres de todo el mundo. En México, representa la segunda causa de muerte por tumores malignos en el hombre y la octava en mujeres (GLOBOCAN, 2012).

Desafortunadamente los tratamientos utilizados para el cáncer son altamente agresivos y muestran poca selectividad por lo que es necesario obtener compuestos de origen vegetal, que presenten la característica de ser selectivos e inductores de muerte apoptótica, para así ser utilizados como agentes terapéuticos eficientes.

5. HIPÓTESIS

Se sabe que, las saponinas esteroidales como la diosgenina y algunos de sus derivados pueden presentar actividad antiproliferativa y apoptótica en algunos tipos de cáncer, por lo que se espera que los compuestos 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) derivados de la Diosgenina, presenten esta misma actividad antiproliferativa, apoptótica y no necrótica en células de la línea tumoral SK-LU-1 provenientes de cáncer pulmonar.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los compuestos 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) sobre cultivos de células tumorales de la línea celular SK-LU-1 proveniente de cáncer de pulmón, así como actividad antiproliferativa en cultivos de linfocitos humanos no tumorales.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar cultivos de la línea celular proveniente de cáncer de pulmón SK-LU-1, así como de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica de donadores sanos.
2. Determinar la actividad antiproliferativa de los compuestos MF-10 y MF-11 en cultivos de la línea celular SK-LU-1, definida como la concentración de compuesto a la cual se observa una inhibición de la proliferación celular del 50% (IC₅₀), por medio de la técnica de incorporación de cristal violeta.
3. Evaluar la actividad necrótica de los compuestos MF-10 y MF-11 en cultivos de la línea celular SK-LU-1, por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
4. Determinar si los compuestos MF-10 y MF-11 a la concentración de IC₅₀ inducen muerte celular apoptótica, mediante la observación de la morfología celular por tinción nuclear con el fluorocromo DAPI y la detección de la caspasa 3 activa por citometría de flujo.
5. Determinar la actividad antiproliferativa y citotóxica de los compuestos MF-10 y MF-11 en cultivos de linfocitos humanos, por incorporación de carboxifluoresceína y la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cultivo de células tumorales

La línea celular SK-LU-1 proveniente de cáncer de pulmón fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD) y sembrada en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) en un volumen de 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con rojo fenol suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) al 5% de suero de ternera neonata (STN Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 °C. Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales con un máximo del 70 % de saturación (fase de crecimiento exponencial).

7.2 Preparación de los compuestos

Los compuestos 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) fueron obtenidos del Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez. Se preparó una solución stock con 1 mg de cada uno de los compuestos (por separado), que fueron solubilizados en 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) en tubos cónicos tipo eppendorf de 600 μ l (Corning, USA) y se almacenaron a temperatura ambiente.

7.3 Determinación de IC₅₀ a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta

Tras separar las células tumorales SK-LU-1 de la caja de cultivo con verseno y ser contabilizadas por medio de un hematocitómetro, estas se sembraron en placas de plástico estériles de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 μ l de medio RPMI-1640 al 5% de STN y se mantuvieron en incubación por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se trataron con los compuestos en un rango de concentración de 1.67 a 200 μ g/ml. Se incluyó en todos los experimentos un control interno con DMSO ya que fue el vehículo para preparar las soluciones stock y un control testigo al cual únicamente se le realizó cambio de medio por medio de cultivo fresco. A las 24 horas de estímulo, se evaluó la inhibición del crecimiento celular usando la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al.*, 1989, para la cual se fijaron

las células con 50 µl/pozo de una solución de glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada manteniendo la placa bajo agitación durante 20 minutos.

Una vez fijadas, se lavó la placa con agua destilada y se dejó secar al aire. A continuación, se procedió a la tinción de las células con 50 µl/pozo de una solución de cristal violeta (Sigma-Chemical Co.) al 0.1% en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) y se mantuvo en agitación durante 20 minutos para que la coloración fuera homogénea en todos los pocillos. Se retiró el colorante, se lavó con agua destilada para eliminar los excesos de tinción y nuevamente se dejó secar al aire. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo de ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% para solubilizar el colorante y se mantuvieron bajo agitación durante 20 minutos. Finalmente se realizó la lectura en un lector de placas de ELISA (ChroMate, USA) a una longitud de onda de 600 nm. Con los datos obtenidos se elaboraron gráficas concentración-efecto por regresión lineal, sobre las curvas obtenidas se estimó la IC₅₀, que se define como la concentración de compuesto a la cual se abate el 50% de la población celular tratada respecto a las no tratadas (células control). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.4 Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Se realizaron cultivos de la línea celular SK-LU-1 en placas estériles de 96 pozos, en las cuales se sembraron 7,500 células/pozo en 100 µl de medio RPMI-1640 al 5% de STN y se incubaron por 24 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: Un control basal, únicamente con medio de cultivo, con el fin de utilizarlo como blanco en la reacción colorimétrica y al que solo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco. Un control positivo, en el cual las células fueron lisadas por 1 hora con 100 µl de una solución al 0.1 % de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) en RPMI-1640. Un control para DMSO con la concentración empleada para preparar las IC₅₀ y, los tratamientos de los compuestos con la concentración requerida para obtener la IC₅₀ correspondiente. A las 24 horas de tratamiento, los sobrenadantes de los cultivos celulares se recolectaron de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml (Corning, USA) y se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA) a 2,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se traspasaron 50 µl/pozo de cada uno de ellos a una placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo se determinó con el kit Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA), del cual se agregaron 50 µl/pozo de la mezcla de reacción. Se dejó incubar a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 20 min. Se realizó la evaluación a una longitud de onda de 490 nm en un

lector de placas de ELISA. Los datos se analizaron realizando una comparación relativa al control y al control positivo tratado con tritón X-100. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.5 Evaluación de la morfología celular por microscopia con tinción de DAPI

Se sembraron células de la línea tumoral SK-LU-1 sobre cubreobjetos de 1x1 cm en placas estériles de 24 pozos (Corning, USA) a una densidad de 30,000 células/pozo con un volumen de 500 µl de medio RPMI-1640 al 5% de STN y se mantuvieron dentro de una incubadora por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Pasadas las 24 horas se les retiró el medio de cultivo y se les trató con las concentraciones correspondientes de las IC₅₀ confirmadas, considerando un control testigo al que sólo se le cambio el medio de cultivo por medio fresco, un control para vehículo correspondiente a la cantidad de DMSO en la que se solubilizó la IC₅₀ de cada compuesto y un control positivo con 50 µg/ml de Camptotecina (Sigma-Aldrich, USA), por ml de medio.

Después de 24 horas de estímulo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 20 min. Al término de ese tiempo fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS (por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline) y posteriormente se adicionaron 10 µl a una concentración de 3 µg/ml del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA), formando un domo sobre cada cubreobjeto y dejándolo por 30 segundos en una placa de hielo. A continuación, las muestras fueron lavadas con PBS filtrado y se montaron con medio para fluorescencia VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA) sobre portaobjetos. Las muestras fueron selladas con resina acrílica transparente y se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su observación. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.6 Determinación de muerte celular por apoptosis mediante la detección de caspasa-3 activa por inmunocitoquímica

Las células SK-LU-1 fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm en placas estériles de 24 pozos (Corning, USA) a una densidad de 30,000 células/pozo en un volumen de 500 µl de medio RPMI-1640 al 5% de STN y se mantuvieron en incubación por 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: un control testigo (células sin tratamiento, a las que sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), un control para el vehículo (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de DMSO utilizado para diluir los compuestos), un control positivo (células tratadas con 50 µg/ml de Camptotecina por ml de

medio) y los tratamientos (con la IC₅₀ correspondiente para cada compuesto). Después de 24 horas de tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 20 minutos, posteriormente fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS filtrado. Se recuperaron los cristales y se pasaron a una placa limpia para realizar la reacción.

Se permearon las células con una solución de tritón X-100 al 0.2 % en PBS durante 5 minutos a 4 °C, posteriormente se lavó 3 veces con PBS filtrado y se realizó un bloqueo con PBS-BSA (Albumina Sérica de Bovina)-tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el bloqueador y se colocó anticuerpo primario: anticaspasa 3 activa (1:100 en PBS) (LabVision, USA), durante toda la noche a 4 °C. Las muestras fueron lavadas con PBS y posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario: antiIgG acoplada a FITC (1:500 en PBS) (Invitrogen, USA) bajo condiciones de oscuridad durante 2 horas, se lavaron 3 veces las muestras con PBS, para después aplicar el fluorocromo DAPI durante 30 segundos e inmediatamente después se lavó 3 veces con PBS.

Finalmente se procedió a montar las muestras con medio de montaje y fueron selladas con resina a base de nitrocelulosa. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.7 Determinación de muerte celular por apoptosis mediante la expresión de caspasa-3 activa por citometría de flujo

Las células SK-LU-1 fueron sembradas en placas estériles de 24 pozos a una densidad de 30,000 células/pozo en un volumen de 500 µl de medio RPMI-1640 al 5% de STN y se mantuvieron en incubación por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Transcurridas las 24 horas las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: Un control testigo, el cual son células sin tratamiento a las que solo se les cambio el medio de cultivo por medio fresco.

Un control de células tratadas con la máxima cantidad de volumen de DMSO utilizado para obtener la concentración de la IC₅₀. Un control positivo tratado con 50 µg/ml de Camptotecina por ml de medio de cultivo, y los tratamientos con las IC₅₀ correspondientes.

Después de 24 horas, se recuperó el medio y se despegaron las células pasándolas a tubos de citometría. Se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se fijaron las células con 500 µl de metanol al 50% en PBS, dejándolo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron dos lavados con PBS filtrado centrifugando a 1,500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendió el botón celular en 50 µl de anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (1:500 ml de PBS filtrado); y se les dejó por 24 horas a 4

°C. Pasadas las 24 horas se realizaron 2 lavados con PBS filtrado y se resuspendió el botón en 50 μ l de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (1:500 en PBS) IgG anti-conejo (J.T. Baker, MEX) manteniendo las muestras en oscuridad durante 3 horas a una temperatura de 37 °C.

Finalmente se lavaron las muestras 2 veces con PBS filtrado y fueron analizadas en un citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA). Los datos fueron procesados en el programa estadístico Flowing Software 2.5.1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.8 Obtención de linfocitos humanos

Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario aparentemente sano en tubos vacutainer con EDTA (BD Franklin Lakes N.J., USA), posteriormente se agregaron lentamente 5 ml de sangre a tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA) los cuales contenían 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) (un total de cuatro tubos). Se centrifugaron los tubos inicialmente a una velocidad de 300 rpm por 5 min. Esta velocidad se fue incrementando gradualmente 300 rpm cada 5 min hasta llegar a 1500 rpm donde se dejó centrifugar durante 25 minutos más.

En seguida con ayuda de una pipeta de 1000 μ l se colectó el anillo de linfocitos (evitando extraer la fase con Histopaque), en tubos cónicos de vidrio de 15 ml y se lavó 2 veces con 10 ml de PBS por tubo. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se les retiró el sobrenadante y los botones celulares fueron transferidos a un nuevo tubo cónico de vidrio de 15 ml y se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB).

7.8.1 Evaluación de la proliferación de células linfocíticas humanas a través de la técnica de marcaje con carboxifluoresceína

Se sembraron las células en una caja Petri de 100 mm y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 5% de CO₂ en una atmosfera húmeda. Transcurrido el tiempo, se colectaron todas las células en suspensión en un tubo cónico de vidrio de 15 ml. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón en 5 ml de RPMI-1640 sin suero y finalmente fue determinado el número celular mediante una cámara de Neubauer.

Para marcar los linfocitos, éstos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS, marcados con 10 μ l de carboxifluoresceína (CFSE; Zigma-Aldrich, USA) (2 μ M/ml/millón de células) y se incubaron por 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces con

medio RPMI-1640 al 5% de SFB, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 4 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activar los linfocitos con fitohematoglutinina (PHA; Micro Lab S.A., Méx.), se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml (Corning, USA) a una densidad de 1,000,000 células/tubo con medio RPMI-1640 al 20% de SFB y fitohematoglutinina (10 μ M/ml/millón de células).

Se realizaron los siguientes tratamientos: un control sin activar, es decir sin PHA. Un control activado con PHA. Un control para vehículo al cual se le agregó la cantidad más alta de DMSO empleada en la preparación de las IC₅₀ correspondientes para los compuestos MF-10 y MF-11 en células tumorales SK-LU-1, y los tratamientos con las concentraciones IC₅₀ obtenidas para cada compuesto en células tumorales SK-LU-1.

Las células de cada uno de los tubos cónicos se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ en una atmosfera húmeda por 72 horas. Para su evaluación, se extrajo el medio de cultivo y se colectó en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml (1 tubo por condición). Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se colectó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 1 ml de verseno frío por 5 min, se lavó dos veces, se centrifugo de nuevo a 1500 rpm por 5 min y se resuspendió en 500 μ l de PBS y 500 μ l de paraformaldehído al 2%. Las muestras fueron leídas por citometría de flujo (BD FACSAria II, USA) y los datos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1. Los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.8.2 Determinación de muerte celular por necrosis en linfocitos mediante la técnica de LDH

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de linfocitos tratados con las IC₅₀ correspondiente a los compuestos MF-10 y MF-11 y el resto de las condiciones, incluyendo el control positivo en el cual las células fueron lisadas por 1 hora previo a la extracción del medio de cultivo con 100 μ l de una solución al 0.1 % de Tritón X-100 en RPM1 1640, se traspasaron a una placa de plástico estéril de 96 pozos a un volumen de 50 μ l/pozo para su evaluación de LDH con el kit Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, del cual se agregaron 50 μ l/pozo de la mezcla de reacción. Se dejó incubar a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 20 min y posteriormente se realizó la evaluación a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas de ELISA. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

7.9 Análisis estadístico

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

8. RESULTADOS

8.1 Actividad antiproliferativa en células tumorales

Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo de los compuestos MF-10 y MF-11 en cultivos de la línea celular SK-LU-1 proveniente de cáncer de pulmón, los cultivos celulares fueron estimulados de manera independiente con diferentes concentraciones del compuesto que van de 1.67 a 200 $\mu\text{g/ml}$. El número celular fue cuantificado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta (Figura 15, 16).

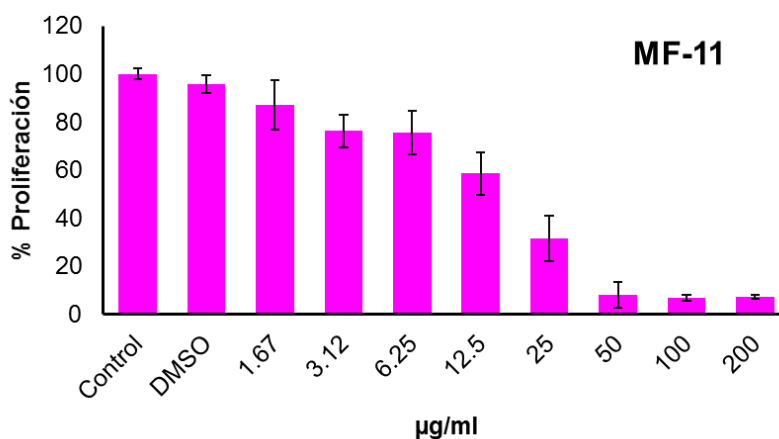
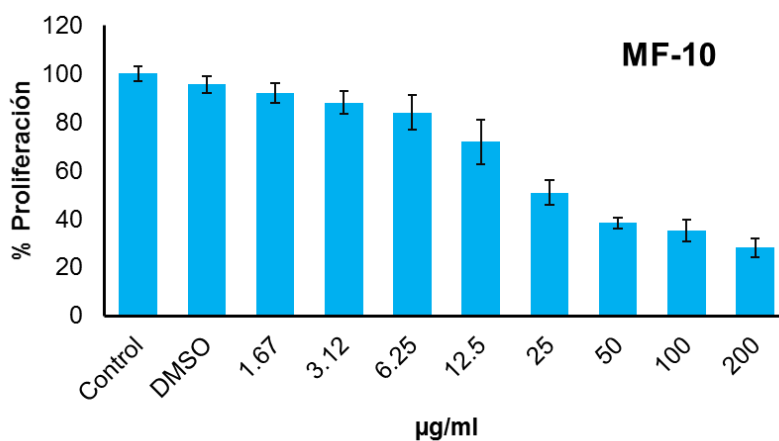


Figura 15. Efecto antiproliferativo de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre la línea celular SK-LU-1. 7,500 células fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24 horas y posteriormente estimuladas con diferentes concentraciones de los compuestos MF-10 y MF-11 en un rango de 1.67 a 200 µg/ml, el número celular fue cuantificado mediante la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

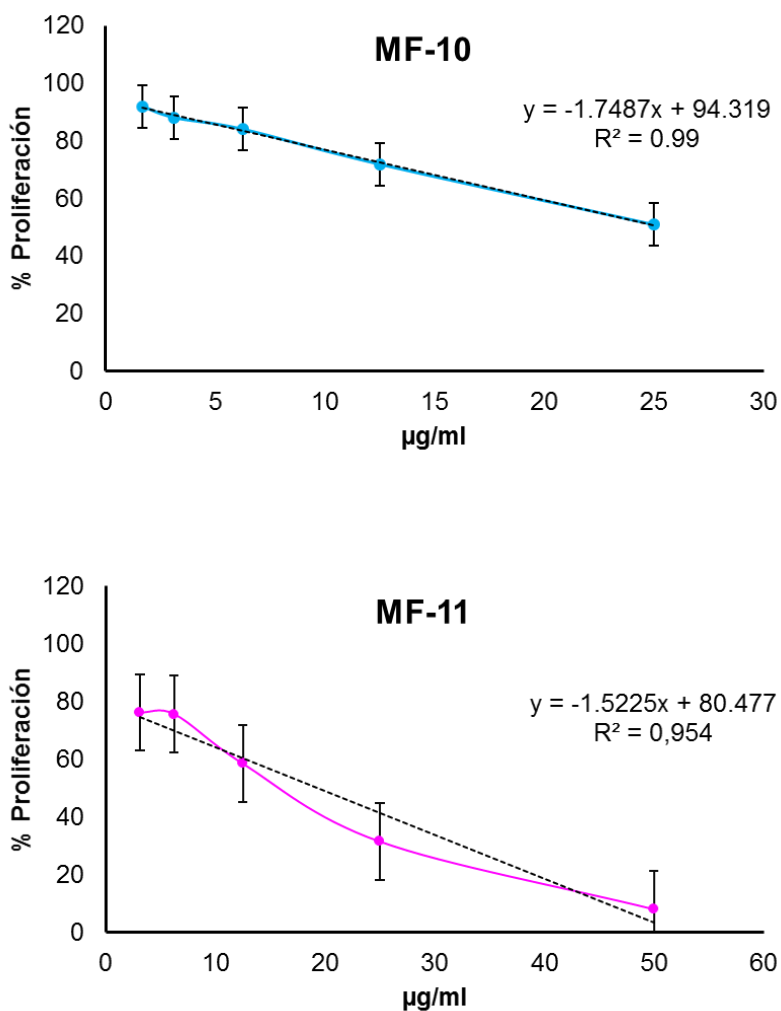


Figura 16. Efecto antiproliferativo de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre la línea celular tumoral SK-LU-1. La IC₅₀ fue calculada mediante la linealización de los datos con ayuda de la ecuación de la línea recta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado.

La actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto que disminuye la densidad celular en un 50% (IC₅₀). Dado que las IC₅₀ fueron calculadas mediante la ecuación de la línea recta, cultivos de células SK-LU-1 fueron estimuladas con las IC₅₀ correspondientes a cada compuesto y el número celular fue evaluado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta con la intención de corroborar las IC₅₀ (Figura 17).

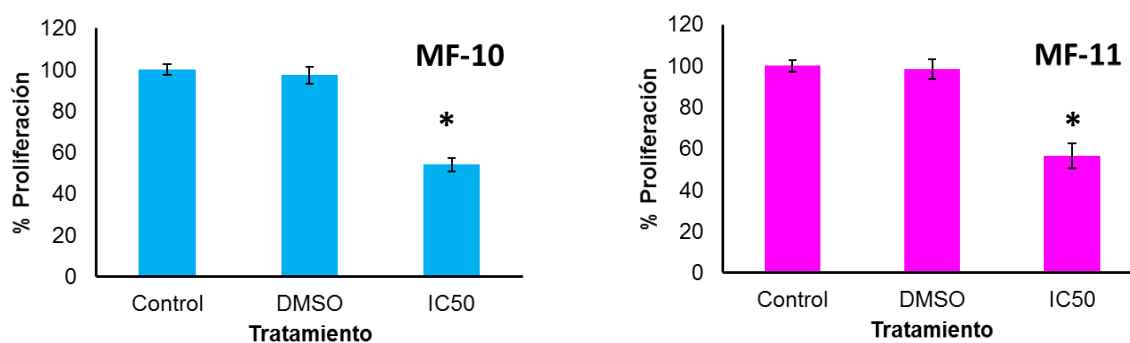


Figura 17. Confirmación del efecto antiproliferativo de los compuestos MF-10 y MF-11 a las concentraciones IC₅₀ correspondientes (25 µg/ml para el MF-10 y 20 µg/mL para el MF-11). Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por triplicado. * p < 0.05 vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Una vez corroboradas las IC₅₀ se obtuvieron valores de 25 µg/ml y 20 µg/ml para el MF-10 y MF-11 respectivamente, indicando que ambos compuestos afectan el potencial proliferativo de la línea tumoral SK-LU-1 de una manera dependiente de la dosis ya que, al incrementar la dosis de tratamiento, el número celular disminuye.

En base a estos resultados, se procedió a evaluar si la disminución en la proliferación celular está relacionada con una muerte necrótica.

8.2 Efecto necrótico en células tumorales

Con la intención de evaluar si los compuestos MF-10 y MF-11 inducen a las células tumorales a una muerte necrótica, cultivos de la línea celular SK-LU-1 fueron estimulados con cada uno de los compuestos con sus respectivas IC₅₀ para evaluar la integridad de la membrana plasmática mediante la determinación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa

(LDH) presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares, tomada como un parámetro indicativo de muerte necrótica (Figura 18, tabla 3).

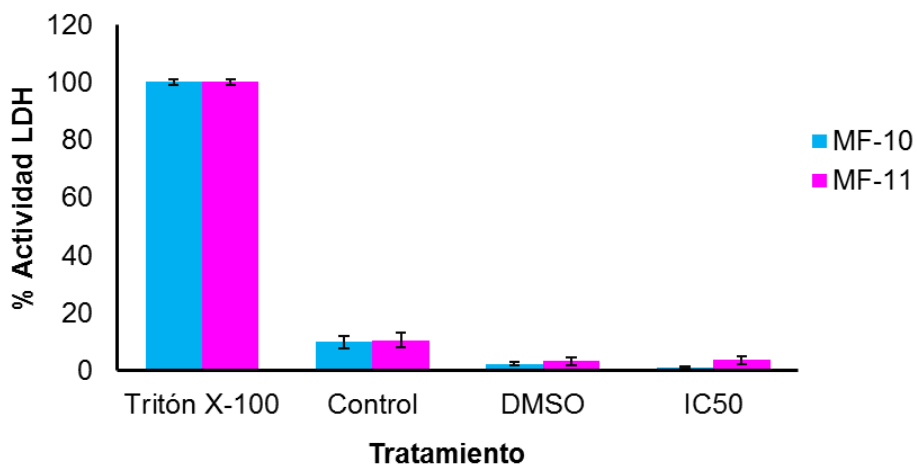


Figura 18. Actividad de la enzima citoplasmática LDH en sobrenadantes de cultivos de la línea celular SK-LU-1. 7,500 células/pozo fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24 h y posteriormente estimuladas con la IC₅₀ respectiva para cada compuesto. Se observa el control (células sin tratamiento en RPMI), DMSO (células tratadas con dimetilsulfóxido) y los cultivos estimulados con las IC₅₀ correspondientes (25 µg/ml para el MF-10 y 20 µg/ml para el MF-11). * p < 0.05 vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

% Actividad LDH				
	Tritón X-100	Control	DMSO	Compuesto
MF-10 (25 µg/ml)	100 %	9.90 %	2.37 %	1.06 %
MF-11 (20 µg/ml)	100%	10.59 %	3.32 %	3.60 %

Tabla 3. Porcentaje de liberación de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales SK-LU-1 tratados con las IC₅₀ respectivas a cada compuesto. La liberación máxima de LDH se determinó con la aplicación de tritón X-100 a las 48 h de cultivo, la actividad de la enzima liberada se tomó como el 100% de actividad.

Como se observa en las figuras 18, tabla 3, el porcentaje de liberación de la enzima citoplasmática LDH al medio (1.06% para el MF-10 y 3.60% para el MF-11, restando el porcentaje del control respectivo) no presentan una alta actividad de la enzima en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales SK-LU-1, ya que no se observa diferencia significativa entre los tratamientos y el cultivo control, indicando que el efecto antiproliferativo inducido por ambos compuestos se debe a causas diferentes a la muerte celular por necrosis pudiendo ser la apoptosis la causa de la disminución celular.

8.3 Efecto apoptótico en células tumorales

- **Evaluación de la morfología celular**

Con la finalidad de determinar si los compuestos MF-10 y MF-11 producen una muerte celular y específicamente una muerte por apoptosis en células SK-LU-1, en la cual dos de sus principales características son la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos, células SK-LU-1 fueron sembradas en cubreobjetos, estimuladas con las IC₅₀ correspondientes a cada compuesto y teñidas con el flourocromo DAPI para ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Figura 19).

- **Detección de caspasa-3 activa por inmunocitoquímica**

Con la intención de establecer que los compuestos MF-10 y MF-11 inducen a las células SK-LU-1 a una muerte por apoptosis, debido a que la observación de condensación de cromatina así como la formación de cuerpos apoptóticos no es suficiente para concluir que ambos compuestos producen apoptosis, cultivos de células SK-LU-1 fueron tratados con las concentraciones IC₅₀ de los compuestos MF-10 y MF-11 y la expresión de caspasa-3 activa fue determinada por inmunocitoquímica y revelada mediante microscopia de epifluorescencia (Figura 19).

CONTRASTE DE FASES

DAPI

CASPASA-3 ACTIVA

Control

DMSO

Camptotecina

MF-10

MF-11

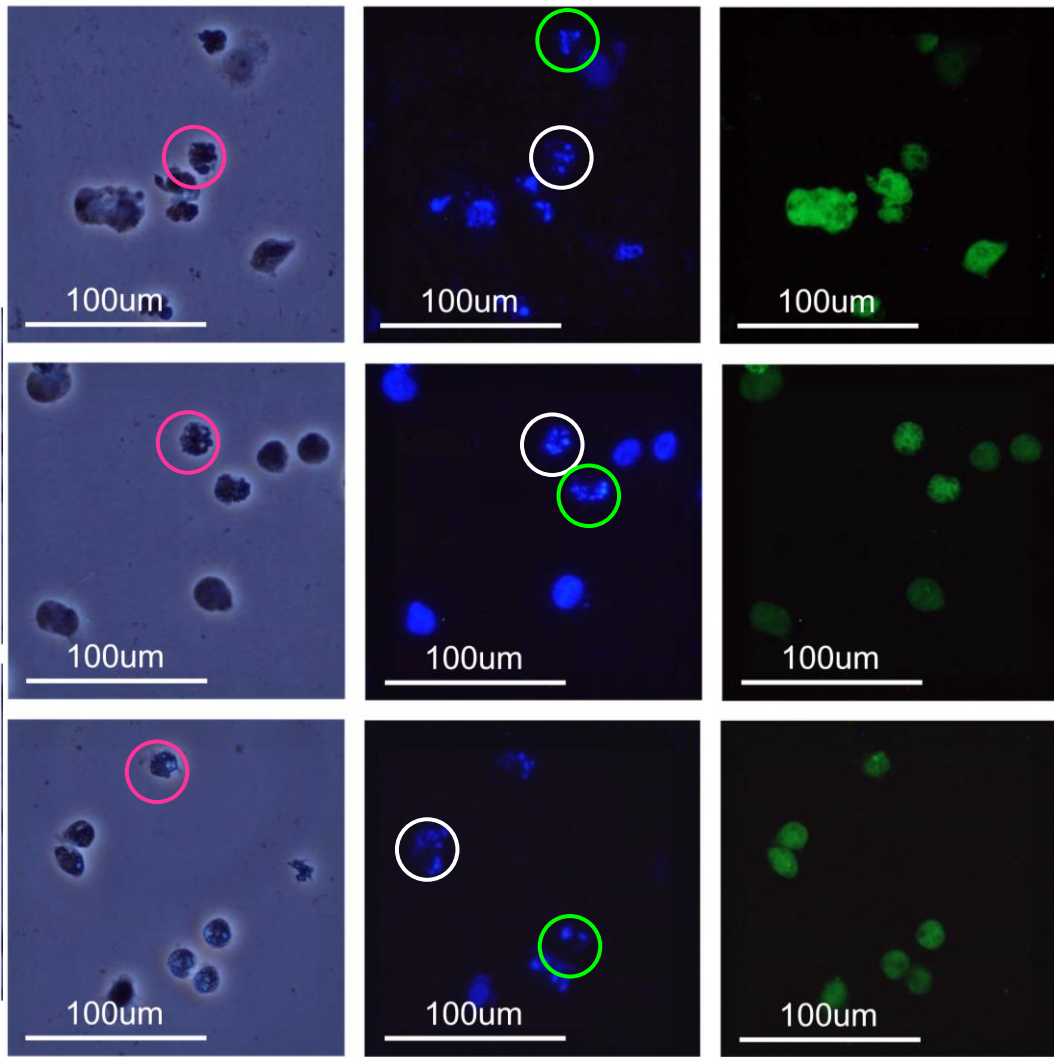


Figura 19. Efecto del MF-10 y MF-11 en la morfología celular y la expresión de caspasa-3 activa por inmunocitoquímica en la línea tumoral SK-LU-1. 30,000 células/pozo fueron sembradas en cubreobjetos y tratadas por 24h con las IC50 respectivas. En las fotografías en contraste de fases los círculos rosas muestran células con formación de cuerpos apoptóticos. En las fotografías teñidas con el fluorocromo DAPI, los círculos verdes señalan células con condensación de la cromatina, mientras que los círculos blancos muestran fragmentación nuclear. En las fotografías evaluadas por la expresión de caspasa 3-activa, la marca verde indica la expresión de caspasa-3 activa.

Los resultados obtenidos establecen que los compuestos MF-10 y MF-11 afectan la morfología de las células tumorales SK-LU-1, observando en las fotografías de contraste de fases que las células no tratadas con los compuestos (Control y DMSO) presentan proyecciones citoplasmáticas, se encuentran bien adheridas, con citoplasma abundante y los núcleos tienen forma redonda y bien definida. Mientras que las células marcadas con DAPI, muestran núcleos con una forma esférica y de bordes bien definidos. En tanto que, las células tratadas con Camptotecina y con los compuestos MF-10 y MF-11 observadas en contraste de fases, muestran una forma esférica, contraída, de menor tamaño y con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas, indicando una disminución de la adherencia y los núcleos son compactos y poco definidos. Mientras que los núcleos marcados con DAPI presentan un tamaño relativamente menor y se encuentran fragmentados, lo que indica la presencia de condensación de la cromatina nuclear y/o fragmentación del ADN, del mismo modo, se observa la presencia de cuerpos apoptóticos sugiriendo que estos compuestos inducen a las células tumorales a expresar una morfología típica de células apoptóticas.

Por otro lado, en las fotografías donde fue evaluada la expresión de caspasa-3 activa, se observa que los cultivos tratados con los compuestos MF-10 y MF-11 inducen a las células a expresar caspasa-3 activa, de forma similar al control positivo (Camptotecina), confirmando con ello, que tanto el MF-10 como el MF-11 inducen a las células tumorales a una muerte celular apoptótica.

- **Evaluación de la expresión de caspasa-3 activa por citometría de flujo**

Con el fin de cuantificar la proporción de la población que muestra positividad a caspasa-3 activa inducida por los compuestos MF-10 y MF-11 en las células tumorales, cultivos de células SK-LU-1 fueron estimulados con las concentraciones de IC50 correspondientes a cada compuesto y la caspasa-3 activa fue determinada y tomada como un parámetro de término de muerte apoptótica (Figura 20).

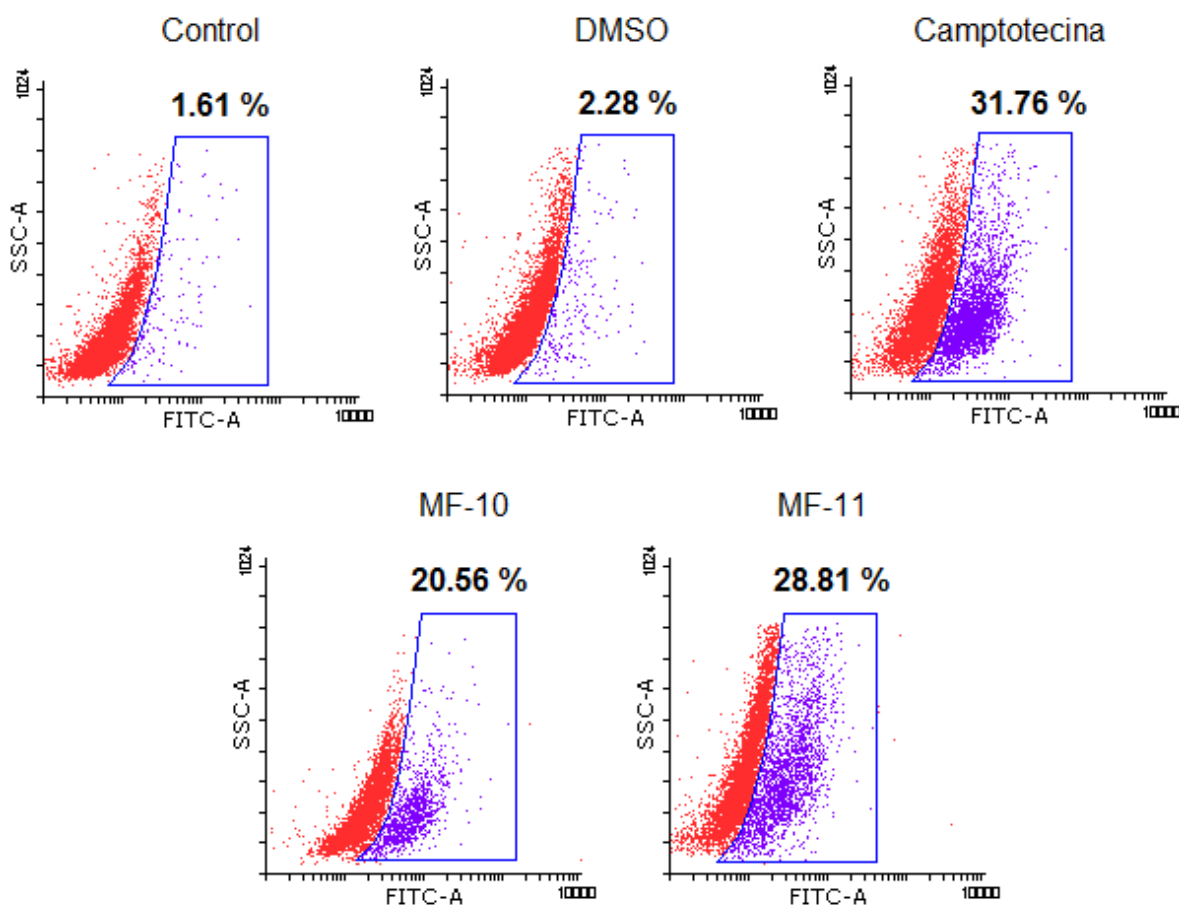


Figura 20. Detección de caspasa-3 activa en células pertenecientes a la línea de cáncer pulmonar SK-LU-1. 30,000 células/pozo fueron sembradas en placas de 24 pozos y se trataron con las concentraciones IC50 correspondientes por 24h (25 µg/ml en el caso del MF-10 y 20 µg/ml para el MF-11). El gráfico es un ensayo representativo de tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que los compuestos MF-10 y MF-11 presentan una alta expresión de la caspasa-3 activa de forma similar al control positivo (cultivo tratado con Camptotecina), los cultivos tratados con MF-10 inducen la expresión de caspasa-3 activa en un 20.56 %, mientras que el MF-11 la induce en un 28.81 %, confirmando con ello que el decremento en el número celular es debido a una muerte celular por apoptosis.

Una vez establecido que los compuestos MF-10 y MF-11 poseen actividad antiproliferativa sobre cultivos de células tumorales SK-LU-1 provenientes de cáncer de pulmón induciendo en ellos una muerte apoptótica, se determinó si estas saponinas afectan de la misma forma a las células no tumorales.

Para ello se procedió a determinar el efecto de ambos compuestos sobre el potencial proliferativo, así como la inducción de muerte celular por necrosis en cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana con el fin de establecer su acción selectiva.

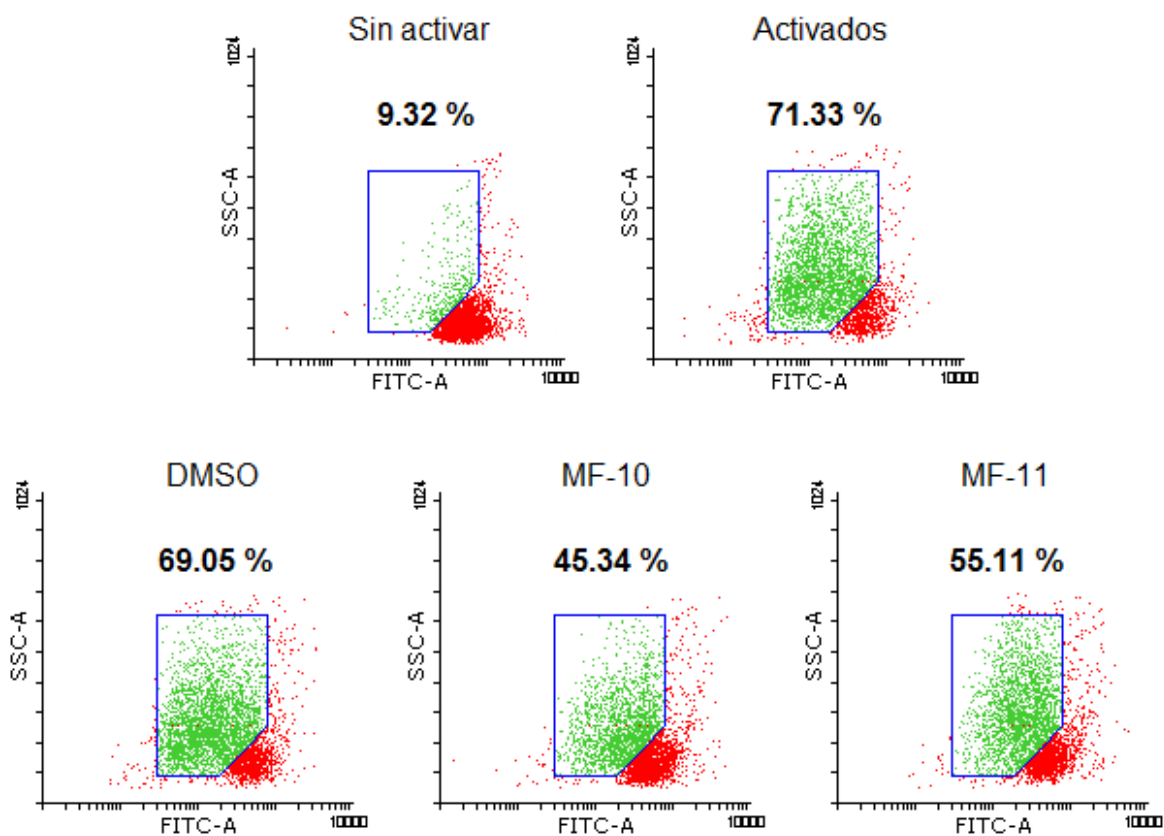
8.4 Efecto sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos

Con la intención de determinar si los compuestos MF-10 y MF-11 afectan el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica fueron tratados con las IC50 correspondientes a cada compuesto (25 µg/ml del MF-10 y 20 µg/ml del MF-11) por 72 h. El potencial proliferativo fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína y cuantificado por citometría de flujo (Figura 21).

Figura 21. Efecto de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos no tumorales. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, marcados con carboxifluoresceína (CSFE), activados con fitohematoglutina (PHA) y tratados con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del MF-10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del MF-11 por 72h. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres pruebas independientes.

Los resultados obtenidos indican que el MF-10 y MF-11 solo afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas en un 25.99% y 16.22% respectivamente, se observa un comportamiento similar al cultivo tratado con el vehículo (DMSO), sugiriendo de esta forma que estos compuestos presentan acción selectiva.

8.5 Efecto necrótico en células no tumorales



Para determinar si los compuestos MF-10 y MF-11 inducen una muerte celular por necrosis en células linfocíticas, cultivos de linfocitos humanos fueron tratados con el MF-10 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el MF-11 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se midió la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes de estos cultivos de la misma manera como se determinó para las células tumorales (Figura 22).

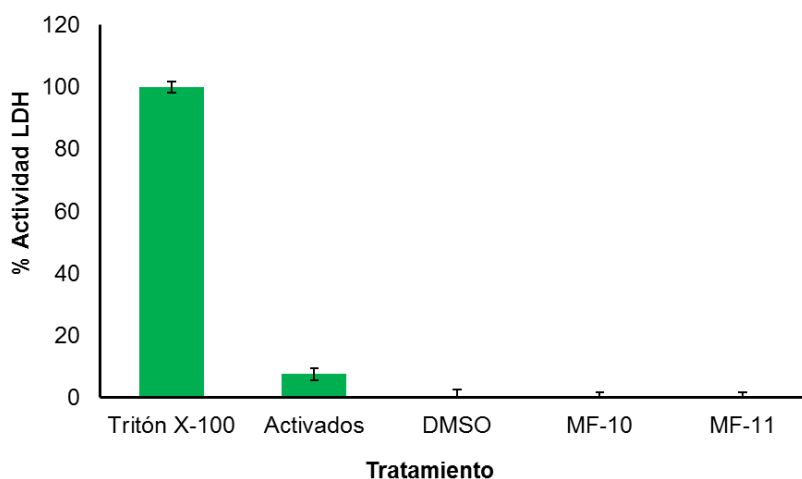


Figura 22. Efecto necrótico del MF-10 y MF-11 sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. La actividad de la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de cultivos tratados por 72 horas con la IC50 respectiva para cada compuesto (25 µg/ml para el MF-10 y 20 µg/ml para el MF-11). $p < 0.05$ vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados mostrados en la figura 22 establecen que, en cultivos de linfocitos humanos los compuestos MF-10 y MF-11 no ejercen una muerte celular por necrosis a la concentración IC50 de 25 µg/ml y 20 µg/ml respectivamente.

9. DISCUSIÓN

El cáncer es un problema de salud pública ya que constituye la primera causa de mortalidad en todo el mundo. A la fecha no existe un tratamiento adecuado para esta enfermedad (Schlaepfer & Mendoza, 2010) debido a la baja especificidad de los tratamientos terapéuticos utilizados actualmente hacia diversos tipos de cáncer, lo cual se ve reflejado en el deterioro de la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad (Muñoz & Cuca, 2016). Por lo tanto, se necesita urgentemente desarrollar nuevos agentes terapéuticos que puedan administrarse eficazmente y utilizarse en el control del cáncer. En ese sentido, los productos naturales son alternativas adecuadas para el desarrollo de fármacos (Zhu et al., 2016).

Las plantas han sido y seguirán siendo una posible alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos, y México una fuente de recursos interesantes puede jugar un papel importante en esta búsqueda (Schlaepfer & Mendoza, 2010). En los últimos años, las saponinas esteroides han atraído la atención científica por su gran diversidad estructural y actividades biológicas, incluyendo su propiedad antitumoral (Zhu *et al.*, 2016). Por tal motivo, se requieren análisis adicionales de las saponinas esteroidales para investigar su actividad y crear una base para el diseño molecular y el desarrollo de nuevos medicamentos antitumorales.

Las observaciones de numerosos estudios confirman que la actividad biológica de las saponinas está influenciada tanto por la genina como por el resto azúcar (Podolak *et al.*, 2010). Pequeños cambios como posiciones diferentes, el número de grupos hidroxilo o configuración R y S en la genina provocan cambios en la actividad de la saponina. De la misma forma se ha observado que con la misma genina, la cadena de azúcar determina la potencia antitumoral (Shuli *et al.*, 2010).

En el presente trabajo fue evaluada la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos MF-10 y MF-11, dos nuevas saponinas esteroidales con una estructura similar a las saponinas Dioscina y Diosgenina-3-glu, sobre la línea celular SK-LU-1 de cáncer de pulmón, ya que no existen documentos publicados para informar los efectos anticancerígenos de dichos compuestos sobre células de cáncer pulmonar.

En ese sentido, en 2004 Ming *et al.*, informó algunas relaciones de estructura-actividad de tres saponinas esteroides sobre la línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562, donde obtuvieron valores IC₅₀ de 10 μM para Dioscina, 15 μM para Diosgenina y 7.5 μM para Trillina (Diosgenina-3-Glu), por lo que los autores concluyeron que probablemente la eficacia de los compuestos puede ser debida a la parte aglicona (Ming *et al.*, 2004).

Sin embargo, en el año 2010 Fernandez Herrera *et al.*, describen la síntesis de un nuevo glucósido esteroideal nombrado como (25R)-3b, 16b-diacetoxi-12,22-dioxo-5a-colestan-26-ilo β -D-glucopiranosido derivado de la Hecogenina, el cual mostró actividad antitumoral selectiva y mayor actividad antiproliferativa contra tres líneas celulares de cáncer cervicouterino con valores IC₅₀ de 65 μM para las líneas HeLa y CaSki y 42 μM para células ViBo. En comparación con la IC₅₀ del propio aglicón, en células CaSki la actividad del glucósido se incrementó (188 frente a 42 μM), demostrando así que la glucosilación de la hecogenina promovió la biodisponibilidad y la actividad biológica de la molécula (Fernández *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo respecto a la actividad antiproliferativa, muestran que las saponinas esteroidales 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-

deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) inhiben la proliferación de células de cáncer pulmonar SK-LU-1 de una manera dependiente de la dosis con valores IC₅₀ de 25 μ g/ml (39 μ M) para el MF-10 y de 20 μ g/ml (34 μ M) para el MF-11 a las 24 horas de tratamiento.

Estos resultados demuestran una mayor actividad antiproliferativa de ambos compuestos sobre la Diosgenina y Diosgenina-3-glu, ya que estudios anteriores han demostrado que la Diosgenina inhibe la proliferación de células de cáncer de pulmón a una dosis de 47 μ M (Rahmati *et al.*, 2014), mientras que nuestro grupo de trabajo ha encontrado que para la Diosgenina-3-glu se reporta una IC₅₀ de 45 μ M sobre la proliferación de células de cáncer pulmonar (Datos no publicados). Sin embargo se requiere mayor cantidad de compuesto MF-10 y MF-11 para realizar la misma actividad antiproliferativa que la Dioscina, de la cual se reporta un valor IC₅₀ de 5.75 μ M (Yongli *et al.*, 2013) sobre líneas de cáncer de pulmón.

Dado que, estructuralmente la Dioscina posee una cadena ramificada de azúcares compuesta por dos unidades de ramnosa unidas a la glucosa en el C-3 de la aglicona y presenta una mayor actividad antiproliferativa sobre células de cáncer pulmonar en comparación con la Diosgenina, la Diosgenina 3-glu, el MF-10 y MF-11, sugiere que la presencia de las dos ramnosas incrementan la actividad antiproliferativa. Estos resultados indican que el MF-10 y MF-11 podrían estar favoreciendo alguna otra actividad biológica sobre la Dioscina.

Por otro lado, se ha descrito que aunque la diversidad estructural de saponinas es beneficiosa, el amplio espectro de actividades biológicas puede resultar antagónico a su aplicación, particularmente en el sector farmacéutico, ya que el objetivo de la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos para el cáncer actualmente en uso clínico, es matar 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 citotóxicos (Hu & Yao, 2002; Diaz, 2009; Fernández *et al.*, 2010; Podolak *et al.*, 2010).

Al respecto, se ha reportado que la Dioscina y Diosgenina pueden poseer efectos citotóxicos, es decir, inductores de necrosis frente a varias líneas celulares de cáncer (Hu & Yao, 2002) así como en células normales no tumorales. Por ejemplo, Yongli *et al.*, demuestra que la Dioscina presenta un efecto citotóxico sobre células MRC-5 pulmonares normales cuando son tratadas con 10 μ g/ml de Dioscina (Yongli *et al.*, 2013). De igual manera se ha informado de esta actividad necrótica sobre células epiteliales cervicales normales H8 al ser tratadas con 5 μ g/ml de Dioscina (Zhao *et al.*, 2016). En cuanto a la Diosgenina, Chen *et al.*, observa citotoxicidad en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata al tratar las células con 30 μ M de Diosgenina (Chen *et al.*, 2011).

Es por ello importante destacar que en nuestro trabajo las IC₅₀ obtenidas para el MF-10 (25 µg/ml) y MF-11 (20 µg/ml) no inducen liberación de la enzima LDH en los cultivos tratados lo que significa que no se produce un daño en la membrana celular y por tanto no se genera muerte celular por necrosis en las células tumorales SK-LU-1 de cáncer de pulmón ni en células linfocíticas no tumorales, similar a lo que se reporta para citotoxicidad de la Diosgenina-3-glu (Martínez, 2013).

Estos resultados indican que, la presencia de una sola glucosa en la Diosgenina-3-glu y la adición de una acetilglucosamina en el caso del compuesto MF-10 y una glucosamina hidrociorada para el MF-11 no genera actividad necrótica, en comparación con la Diosgenina la cual no posee ningún azúcar, y la Dioscina con dos ramnosas unidas a la glucosa, sugiriendo que la adición de azúcares tales como la ramnosa pueden ser las responsables de generar una actividad citotóxica.

Es importante mencionar, que los compuestos utilizados en quimioterapia para el tratamiento del cáncer son fuertemente necróticos y presentan cierto grado de citotoxicidad por lo que generan graves efectos secundarios en el paciente.

Se considera que el uso de glucosamina es seguro ya que no tiene efectos secundarios conocidos (Brasky, et al., 2011). El hecho de observar que el MF-10 y MF11, los cuales poseen glucosamina dentro de sus estructuras, no producen efecto necrótico ni en células tumorales de cáncer pulmonar ni en células linfocíticas no tumorales y que además no abaten la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana sugiere que estos compuestos presentan una acción selectiva sobre este tipo celular, lo que es de gran relevancia ya que en el caso de poder ser aplicados como un agentes antitumorales, los efectos secundarios que generarían en los pacientes serían mínimos y, además, no inducirían un estado inflamatorio agudo.

En cuanto a la actividad apoptótica, la apoptosis es uno de los mecanismos clave para el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos (Wang *et al.*, 2012). La mayoría de las saponinas inducen apoptosis en células tumorales por lo que son fármacos preferibles para el tratamiento del cáncer, ya que la eliminación de las células tumorales por apoptosis es útil para disminuir los efectos secundarios en los pacientes evitando la necrosis (Shuli *et al.*, 2010). De igual forma, estudios *in vitro* revelan que la glucosamina ejerce una acción apoptótica sobre células tumorales de cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2011) y cáncer pulmonar (Song *et al.*, 2014). Un dato importante en base a ello fue el análisis realizado por Brasky, *et al.*, en 2011 en el cual encontró que el uso de glucosamina se asocia con una reducción aproximada de 35-45% en el riesgo de cáncer de pulmón (Brasky, *et al.*, 2011).

La apoptosis es un proceso controlado de forma estricta para eliminar células no deseadas (Wang *et al.*, 2012). Entre las principales características morfológicas se encuentran la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y las ampollas en la membrana (Dae *et al.*, 2012). En nuestros resultados, ambos compuestos indujeron una muerte apoptótica sobre la línea tumoral de cáncer de pulmón SK-LU-1, expresada por los cambios morfológicos típicos de la apoptosis, como la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos que se observaron claramente en la tinción con el fluorocromo DAPI después de 24 horas de tratamiento con los compuestos MF-10 y MF-11. De igual forma, se observó un incremento significativo en la expresión de caspasa-3 activa a las 24 horas de tratamiento con un 20.56 % en el caso del MF-10 y de 28.81 % para el MF-11 en comparación con el grupo control.

Estos resultados muestran las grandes ventajas que presentan las saponinas esteroidales, y en este caso específicamente el MF-10 y MF-11 frente a los agentes quimioterapéuticos usados actualmente para el tratamiento contra el cáncer, ya que la mayoría de ellos están diseñados para destruir las células mientras se dividen. Generalmente, las células tumorales se multiplican rápidamente, por lo que se ven fácilmente afectadas por estos fármacos citotóxicos que las dañan y destruyen. Sin embargo, en el organismo también existen células sanas que normalmente se multiplican a gran velocidad, como pueden ser las del tubo digestivo, de los folículos pilosos (lugar de nacimiento del pelo) o de la médula ósea (donde se forman las células de la sangre), por lo que también se ven afectadas por la quimioterapia desencadenando efectos secundarios tales como náuseas, vómitos, pérdida de apetito, caída del cabello, cansancio y propensión a las infecciones (AECC, 2011).

La actividad antiproliferativa alcanzada con valores IC₅₀ de 25 µg/ml para el MF-10 y 20 µg/ml para el MF-11 sobre la línea celular SK-LU-1 de cáncer de pulmón, además de la gran actividad apoptótica, la nula citotoxicidad (necrosis) tanto en células tumorales de cáncer pulmonar como en células linfocíticas no tumorales, y la acción selectiva sobre linfocitos de sangre periférica humana vuelve al MF-10 y MF-11 candidatos idóneos para continuar su evaluación en modelos *in vivo* con el fin de establecer su potencial terapéutico y poder ser utilizados en un futuro como agentes con actividad antitumoral contra el cáncer.

10. CONCLUSIONES

- Los compuestos 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) presentan actividad antiproliferativa en células tumorales SK-LU-1 con una IC50 de 25 μ g/ml y 20 μ g/ml respectivamente.

- Las concentraciones IC50 obtenidas de ambos compuestos no inducen un efecto necrótico en la línea tumoral SK-LU-1.
- Los compuestos MF-10 y MF-11 inducen muerte celular por apoptosis mediante la expresión de caspasa-3 activa en la línea celular SK-LU-1 en un 50.82% y 29.02% respectivamente.
- Los compuestos MF-10 y MF-11 a la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente solo afectan el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas en un 25.99% y 16.22% respectivamente, sin inducir en ellas un efecto necrótico.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la ruta de inducción de apoptosis con el fin de determinar el mecanismo de acción de los compuestos MF-10 y MF-11.

- Evaluar el resto de los compuestos dentro de la ruta de síntesis (Dioscina, Diosgenina y Diosgenina-3-glu) para realizar un análisis comparativo.
- Evaluar ciclo celular y apoptosis en células linfocíticas con la finalidad de determinar el efecto de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre este tipo celular.
- Evaluaciones *in vivo*.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1 AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. Cáncer de pulmón: Diagnóstico. [Internet]. [actualizada 07 ene 2017; citado el 10 Ene 2017]. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdepulmon/Paginas/diagnostico.aspx>
- 2 AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. 2011. ¿Qué es la quimioterapia? Madrid, España. 39pp.

- 3 Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. 5ª edition. Omega. Barcelona, España. 1266pp.
- 4 American Cancer Society, 2016. *Cáncer de pulmón no microcítico (células no pequeñas): Guía detallada*. [Internet]. [citado el 15 Ene 2017]. Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepulmonnomicrocitico-celulasno/guiadetallada/sp-pulm-dg-pg-df>
- 5 Amorín Kajatt E. 2013. *Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 30(1):85-92.
- 6 Anderson Peter G. & Lowe James S. 2015. *Histología humana*. 4ª edición. Elsevier. Barcelona, España. 448pp.
- 7 Aumsuwan P., Khan Shabana I., Khan Ikhlas A., Ali Zulfiqar, Avula Bharathi, Walker Larry A., Shariat-Madar Zia, Helferich William G., Katzenellenbogen Benita S. & Dasmahapatra Asok K. 2016. The anticancer potential of steroidal saponin, dioscin, isolated from wild yam (*Dioscorea villosa*) root extract in invasive human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 591: 98-110.
- 8 Boticario C. & Cascales M. 2012. *Innovaciones en cáncer*. UNED. Madrid, España. 624pp.
- 9 Brasky Theodore M., Lampe Johanna W., Slatore Christopher G. & White Emily. 2011. Use of Glucosamine and Chondroitin and Lung Cancer Risk in the VITamins And Lifestyle (VITAL) Cohort. *Cancer Causes Control*. 22(9): 1333–1342.
- 10 Campos Parra A., Cruz Rico G. & Arrieta O. 2012. Genotipificación en cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 11(1):35-44.
- 11 Cánepa Eduardo T. 2007. Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular. *Revista Química Viva*. 1(6):17-26.
- 12 Cerezo García M. 2009. *Fundamentos de biología básica*. UNIVERSITAS. Universitat Jaume. 230pp.
- 13 Cervantes Dueñas A. 2016. Presencia de saponinas en *Agave* spp. de México. *BIOZ*. Revista electrónica de Biología, Universidad Autónoma de Zacatecas 1(1); Disponible en: <http://editorial-uaie.uaz.edu.mx/index.php/bioz/article/view/108>
- 14 Chaabane Wiem, User Sirma D., El-Gazzah Mohamed, Jaksik Roman, Sajjadi Elaheh, Rzeszowska-Wolny Joanna & Łos Marek J. 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cáncer. *Archivos de Inmunología*. 61(1):43-58.

- 15 Chen P., Shih Y., Huang H., Cheng H. 2011. Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. PLoS ONE. 6(5): e20164.
- 16 Chou Wan Y., Chuang Kun H., Sun David, Lee Yu H., Kao Pu H., Lin Yen Y., Wang Hsei W. & Wu Yuh L. 2015. Inhibition of PKC-Induced COX-2 and IL-8 Expression in Human Breast Cancer Cells by Glucosamine. Journal of Cellular Physiology. 230: 2240–2251.
- 17 Cooper Geoffrey M. & Hausman Robert E. 2011. La célula. 5ª edición. Marbán Libros. Madrid, España. 818pp.
- 18 Coto Celia E. 2007. Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. Revista Química Viva. 1(6):9-16.
- 19 Dae Sung K., Byoung Kook J., Young Eun L., Won Hong W. & Yeun Ja M. 2012 Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 1-8.
- 20 Deore S., Khadabadi S., K.P.Chittam, P. G. Bhujade, T. P. Wane, Y. R. Nagpurkar, P. D. Chanekar & R. Jain. 2009. Properties and pharmacological applications of saponins. Pharmacologyonline. 2: 61-84.
- 21 Díaz Puentes L. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 1(2):32-55.
- 22 Enciclopedia Médica A.D.A.M. [Internet]. Atlanta (GA): A.D.A.M., Inc.; 2016. Cáncer pulmonar. [actualizado 02 dic 2016; consulta 8 Ene 2017]; Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007270.htm>
- 23 ESMO (European Society for Medical Oncology). 2016. Cáncer de pulmón de células no pequeñas: Una guía para pacientes. Anticancer fund. 35pp.
- 24 Fernández Herrera M., López Muñoz H., Hernández Vázquez J., Sánchez Sánchez L., Escobar Sánchez M., Pinto M. & Sandoval Ramírez J. 2012. Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates. European Journal of Medicinal Chemistry. 54:721-727.

- 25 Fernández Herrera M., Mohan Sankar, López Muñoz H., Hernández Vázquez J., Pérez Cervantes E., Escobar Sánchez M., Sánchez Sánchez L., Ignacio Regla, Pinto B. Mario & Sandoval Ramírez J. 2010. Synthesis of the steroidal glycoside (25R)-3b,16b-diacetoxy-12, 22-dioxo-5a-cholestan-26-yl b-D-glucopyranoside and its anti-cancer properties on cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells. European Journal of Medicinal Chemistry. 45:4827-4837.
- 26 Fernández Rubio A. & Ruano Raviña A. 2009. Cribado de cáncer de pulmón. Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid, España. 140pp.

- 27 Fuchs Yaron & Steller Hermann. 2015. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 16(6): 329–344.
- 28 GEPAC. Grupo Español de Pacientes con Cáncer. 2013. *Cáncer de pulmón. Guía para pacientes y familiares*. Madrid, España. 49pp.
- 29 GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer. 2012 [Internet]. [citado el 20 Ene 2017]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- 30 Granados García M., Arrieta Rodríguez O. & Cantú de León D. 2013. *Oncología y cirugía. Bases y principios. El manual moderno*. México, D. F. 768pp.
- 31 Gridelli Cesare, Rossi Antonio, Carbone David, Guarize Juliana, Karachaliou Niki, Mok Tony, Petrella Francesco, Spaggiari Lorenzo & Rosell Rafael. 2015. Non-small-cell lung cancer. *Nature* 1: 1-16.
- 32 Hanahan Douglas & Weinberg Robert A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144 (5): 646–674.
- 33 Hsieh M., Tsai T., Hsieh Y., Wang C. & Chiou H. 2013. Dioscin-induced autophagy mitigates cell apoptosis through modulation of PI3K/Akt and ERK and JNK signaling pathways in human lung cancer cell lines. *Arch. Toxicol.* (87):1927–1937.
- 34 Hu Ke & Yao Xinsheng. 2002. Protodioscin (NSC-698 796): its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. *Planta Médica*. 68:297-301.
- 35 Iraj Rasooli. 2011. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. Chapter 7: Diosgenin, a Steroid Saponin Constituent of Yams and Fenugreek: Emerging Evidence for Applications in Medicine. 228pp.
- 36 Jaeyong Cho, Hyemin Choi, Juneyoung Lee, Mi-Sun Kim, Ho-Yong Sohn & Dong Gun Lee. 2013. The antifungal activity and membrane-disruptive action of dioscin extracted from *Dioscorea nipponica*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828:1153–1158.
- 37 Karp Gerald. 2014. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. 6° edición. McGraw-Hill. México, D.F. 840pp.
- 38 Kueng W., Silber E. & Eppenberger U. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, 182 (1): 16-19.
- 39 Kumar Vinay, Abbas Abul K. & Aster Jon. C. 2009. *Robbins & Cotran. Pathologic Basis of Disease*. 8ª edición. Elsevier. Barcelona, España.
- 40 Lagunas Cruz M., Valle Mendiola A. & Soto Cruz I. 2014. Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 17(2):98-107.
- 41 Liu Bao-Qin, Meng Xin, Li Chao, Gao Yan-Yan, Li Ning, Niu Xiao-Fang, Guan Yifu & Wang Hua-Qin. 2011. Glucosamine induces cell death via proteasome inhibition in human ALVA41 prostate cancer cell. *Experimental and Molecular Medicine*. 43(9):487-493.

- 42 Lodish Harvey, Berk Arnold, Kaiser Chris A., Krieger Monty, Bretscher Anthony, Ploegh Hidde, Amon Angelika & Scott Matthew P. 2013. *Molecular Cell Biology*. 7ª edición. Médica Panamericana. New York. 1180pp.
- 43 López Meráz M., Juárez Aguilar E., Medel Matus J., Álvarez Croda D., Galán Zamora R., Pérez Estudillo C., Hernández María E., Miquel Marta & Manzo Jorge. 2012. Necrosis Neuronal Programada. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. Volumen Especial: 18-22.
- 44 Martínez Mata S. 2013. Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina-3-glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y ViBo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Zaragoza. México. 58pp.
- 45 Medina Villaseñor E. & Martínez Macías R. 2009. *Fundamentos de oncología*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 611pp.
- 46 Ming-Jie L., Zhao Wang, Yong Ju, Jiang-bing Z., Yu Wang & Ricky Ngok-Shun W. 2004. The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(7): 1059-1065.
- 47 Moctezuma Velasco C. & Patiño Zarco M. 2009. Cáncer de pulmón. *Anales de Radiología México*. (1):33-45.
- 48 Muñoz Alberto. 2004. *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice. Madrid, España. 374pp.
- 49 Muñoz Cendales D. & Cuca Suárez L. 2016. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*. 20(3):124-134.
- 50 Negi J., Negi P., Pant G., Rawat M. & Negi S. (2013). Naturally occurring saponins: Chemistry and biology. *Journal of Poisonous and Medicinal Plant Research* 1(1):001-006.
- 51 NIH. National Cancer Institute. [Internet]. [citado el 28 Ene 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer>
- 52 NIH. National Cancer Institute. 2014. Lo que usted necesita saber sobre el cáncer de pulmón. Departamento de salud y servicios humanos de EE. UU. 34pp.
- 53 Núñez Rodrigo & Escalona José. "Ciclo Celular". 2008. Tomado de: <http://132.248.233.60/deptos/embrio/images/PDF/ciclo%20celular.pdf>
- 54 OMS. Organización Mundial de la Salud. 2015. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. [Internet]. [citado el 3 Ene 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 55 Oropesa Ávila M., Fernández Vega A. & Sánchez Alcázar J. 2015. Vida tras la muerte celular. *Revista Investigación y ciencia*. 462:50-56.
- 56 Pierce Benjamin A. 2009. *Genética: un enfoque conceptual*. 3ª edición. Médica Panamericana. Madrid, España. 832pp.

- 57 Podolak Irma, Galanty Agnieszka & Sobolewska Danuta. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*. 9:425–474.
- 58 Rahmati Yamchi M., Ghareghomi Somayyeh, Haddadchi Gholamreza, Milani Morteza, Aghazadeh Mohammad & Daroushnejad Hasan. 2014. Fenugreek extract diosgenin and pure diosgenin inhibit the hTERT gene expression in A549 lung cancer cell line. *Mol Biol Rep* 41:6247–6252
- 59 Ramírez García M., Márquez González H., Barranco Lampón G. & López Aguilar J. 2014. Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Residente*. 9(3): 84-94.
- 60 Ramírez Sánchez S. & Rivera Gildardo. 2014. Efecto a nivel celular y molecular de agentes antitumorales. *Revista Acta Universitaria*. 24(4): 15-20.
- 61 Resano Barrio P. & Anta Mejía Y. 2014. Cáncer de pulmón. *Medicine*. 11(67):3983-94.
- 62 Rodríguez Garrido M. & Rodríguez de la Peña T. “Revisión Sistemática Rápida sobre Radioterapia en Cáncer de Pulmón”. *IPE 62/2010 (AETS-ISCIII)*.
- 63 Rosell Gratacós A., Ginés Gibertb A., Serra Mitjansc M. & Gámez Cenzanod C. 2008. Estadificación mediastínica del cáncer de pulmón en el siglo XXI: un reto de carácter multidisciplinario. *Medicina Clínica*. 130(11):415-22.
- 64 Rugeles López M., Patiño Grajales P. & Montoya Guarín C. 2009. *Inmunología. Una ciencia activa*. 2ª edición. Universidad de Antioquia. Medellín. 710pp.
- 65 Salazar Montes A., Sandoval Rodríguez A. & Armendáriz Borunda J. 2013. *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Mc Graw Hill. México, D.F. 322pp.
- 66 Sánchez de Cos J. 2011. Normativa SEPAR sobre estadificación del cáncer de pulmón. *Archivos de Bronconeumología*. 47(9):454–465.
- 67 Schlaepfer L. & Mendoza Espinoza J. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41(4):18-27.
- 68 Shah H. & Lele S. 2012. Extraction of Diosgenin, a Bioactive Compound from Natural Source *Dioscorea alata* Var *purpureae*. *Anal Bioanal Techniques*. 3:141.
- 69 Shuli Man, Wenyuan Gao, Yanjun Zhang, Luqi Huang & Changxiao Liu. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 81: 703–714
- 70 Slatore Christopher & Lareau Suzanne. 2014. Serie de información al paciente de la American Thoracic Society. # 1-3. *Revista Norteamericana de Medicina Respiratoria y Cuidados Intensivos*. 189:1-20.
- 71 Song Ki H., Kang Ju H., Woo Jong K., Nam Jeong S., Min Hye Y., Lee Ho Y., Kim Soo Y. & Oh Seung H. 2014. The novel IGF-IR/Akt-dependent anticancer activities of glucosamine. *Bio Med Central Cáncer*. 14(31):1-12.

- 72 Sparg S., Light M. & Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94:219–243.
- 73 Sun Sophie, Schiller Joan H. & Gazdar Adi F. 2007. Lung cancer in never smokers, a different disease. *Nature Reviews Cáncer*. 7:778-90.
- 74 Tessa Moses, Kalliope K. Papadopoulou & Anne Osbourn. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49(6):439-462.
- 75 Tume Farfán L. 2014. Implicaciones del estudio de inestabilidad del ciclo celular en la biología del cáncer. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 45(3):200-209.
- 76 Valencia M. & Ancer R. 2013. *Patología*. Mc Graw Hill Interamericana. México, D.F. 807pp.
- 77 Vincken Jean P., Heng Lynn, de Groot Aede & Gruppen Harry. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68: 275–297.
- 78 Walter F., Rubin G., Bankhead C., Morris H., Hall N., Mills K., Dobson C., Rintoul R., Hamilton W. & Emery J. 2015. Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study. *British Journal of Cancer*. 112:6–13.
- 79 Wang Zhiyu, Cheng Yue, Wang Neng, Wang Dong Mei, Li Ying Wei, Han Feng, Shen Jian Gang, Yang De Po, Guan Xin Yuan & Chen Jian-Ping. 2012. Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins. *Cancer Biology & Therapy*. 13(3):138-147.
- 80 Yongli Wei, Yousong Xu, Xu Han, Yan Qi, Lina Xu, Youwei Xu, Lianhong Yin, Huijun Sun, Kexin Liu & Jinyong Peng. 2013. Anti-cancer effects of dioscin on three kinds of human lung cancer cell lines through inducing DNA damage and activating mitochondrial signal pathway. *Food and Chemical Toxicology* 59: 118–128.
- 81 Zhao Xinwei, Tao Xufeng, Xu Lina, Yin Lianhong, Qi Yan, Xu Youwei, Han Xu & Peng Jinyong. 2016. Dioscin Induces Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa and SiHa Cells through ROS-Mediated DNA Damage and the Mitochondrial Signaling Pathway. *Molecules*. 21(6), 730.
- 82 Zhu Xinhai, Jiang Hao, Li Jinhui, Xu Ji & Fei Zhenghua. 2016. Anticancer Effects of Paris Saponins by Apoptosis and PI3K/AKT Pathway in Gefitinib Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical Science Monitor*. 22: 1435-1441.

13.APÉNDICE

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO RPMI-1640

Sales inorgánicas	Cantidad (g/l)
Nitrato de Calcio • 4H ₂ O	0.1
Sulfato de magnesio (anhidro) Cloruro de potasio	0.04884
Cloruro de sodio	0.4
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	6
	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-isoileucina	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	
Glutati3n (reducido)	0.001
Rojo de fenol • Na	0.0053
Adicionar	
Bicarbonato de Sodio	2

PREPARACI3N DE REACTIVOS

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (GIBCO, USA)	10.42g
NaHCO ₂ (SIGMA, USA)	2g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La soluci3n se esteriliza por medio de filtrado en vac3o a trav3s de una membrana con poro de 0.47 μm . Se almacena a 4 $^{\circ}\text{C}$. El medio de cultivo se complementa con suero de ternera neonata (STN), en la proporci3n requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vac3o a trav3s de una membrana con poro de 0.47 μm .

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 utiliza:

EDTA (SIGMA, USA)	0.4g
NaCl (SIGMA, USA)	8g
KCl (SIGMA, USA)	0.4g
Tris (SIGMA, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² durante 15 min. Se almacena a 4 °C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Para su preparación se utiliza:

Cloruro de sodio (SIGMA, USA)	8.00g
Cloruro de potasio (SIGMA, USA)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA)	2.16g
Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA)	0.20g

Los componentes se diluyen en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1 N y se afora a un volumen final de 1000 ml. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana con diámetro de 22 µm y se almacena a 4 °C hasta el momento de su uso.

Desactivación del suero (STN)

Una botella de suero de ternera neonata (STN) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 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 y se almacena a una temperatura de 4 °C.

Solución cristal violeta (0.1%)

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

NaOH (SIGMA, USA)	3.96g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA)	4.28MI
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	1g

Solución de ácido acético (10 %)

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

Paraformaldehído (2 %)

Paraformaldehído al 2 % en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60°C. Se almacena a 4°C.

Desactivación del suero (SFB)

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 a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml en tubos cónicos de plástico para su mejor uso y manipulación.