



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA

Evaluación de la actividad antiproliferativa y necrótica del 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el clorhidrato de 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) en células de cáncer de mama MDA-MB-231

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

LÓPEZ DURAN BRIAN SAIDEL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

CIUDAD DE MÉXICO

OCTUBRE 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.

Las palabras son pálidas sombras de nombres olvidados. Los nombres tienen poder, y las palabras también. Las palabras pueden hacer prender el fuego en la mente de los hombres. Las palabras pueden arrancarles lágrimas a los corazones más duros. Existen siete palabras que harán que una persona te ame. Existen diez palabras que minarán la más poderosa voluntad de un hombre. Pero una palabra no es más que la representación de un fuego. Un nombre es el fuego en sí.

Fragmento de El Nombre del Viento

Agradecimientos:

El presente trabajo de Tesis se llevó a cabo con apoyo de los proyectos PAPIIT IN220916, PAPIIT IN222114, CONACyT 258156, CONACyT 255881 y CONACyT 253979 dentro de las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, bajo la dirección del Dr. Luis Sánchez Sánchez.

Un especial agradecimiento a la Dra. Antonieta Fernández Herrera, Dr. Jesús Sandoval Ramírez y a al grupo de investigadores del laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad de Puebla por la síntesis de los compuestos evaluados en este trabajo.

Con reconocimiento especial a los sinodales:

- Dra. María de Lourdes Mora García
- Dr. Hugo López Muñoz
- Dr. Luis Sánchez Sánchez
- M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez
- Dra. Itzen Aguiñiga Sanchez

Por sus aportaciones y observaciones en el presente trabajo.

Agradecimientos:

A mi familia que nunca me dejo solo. En especial a mi madre Angélica Duran por darme su apoyo cada que lo necesite y a mi padre Ernesto López por enseñarme que hay cosas que no se aprenden en un aula de clases.

Al **Dr. Hugo López** por compartir sus experiencias y conocimiento, además de siempre estar ahí para guiarme y resolver mis dudas.

Al **Dr. Luis Sanchez** por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Le agradezco su apoyo, tiempo y dedicacion.

Al **M. en C. Jose Misael Vicente Hernandez** por sus consejos y enseñanzas. Y que ademas de su conocimiento compartio anécdotas y risas

A mis compañeros de laboratorio Sergio, Ivan, Karen, Karina, Beatriz, Amanda, Elena, Mayra y Denise, de los que aprendi muchas cosas y comparti momentos de alegría. Les agradezco por se el mejor equipo de trabajo.

A mis amigos Enrique, Juan, Alfonso, Uriel, Rafael, Luis, Eduardo, Fernando, Salvador, Grez, Adrian y David por ser de las primeras personas que conoci en a carrera y que volvieron estos 4 años unos de los mas memorables de mi vida.

A mis amigos Alan, Alberto, Uriel, Mauricio, Thelma, Demi, Daniel y Arisai que aunque los conoci a mitad de la carrera se convirtieron en personas muy especiales para mi y me acompañaron tanto en las aulas como fuera de ellas.

Por ultimo a Febe Cabrera por estar ahí cada que necesite su apoyo, y por aguantar mis innumerables quejas e inconformidades despues de tanto tiempo.

Índice

Resumen	1
Marco Teórico	2
La célula	2
El ciclo celular	2
Muerte Celular	6
Apoptosis	6
Necrosis	11
Cáncer	12
Cáncer de Mama	14
Epidemiología	14
Factores de riesgo	18
Detección del cáncer de mama	19
Estadificación	21
Tratamientos	22
Productos de origen natural	26
Saponinas	27
Saponinas esteroidales	28
Dioscina	29
Diosgenina	29
Diosgenina-3-glu	29
MF-10	29
MF-11	29
Planteamiento del problema	31
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivos	33
Material y Método	34
Resultados	39
Discusión de resultados	49
Conclusiones	53
Referencias	54
Anexo I: Medicamentos indicados en el tratamiento de cáncer de mama	I
Anexo II: Preparación de reactivos	IV

Resumen

El cáncer es un proceso que se caracteriza por la multiplicación descontrolada de las células y que puede diseminarse en cualquier parte del organismo. Además, el cáncer representa uno de los principales problemas a nivel mundial, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia dentro de la población femenina. Aunado a que los quimioterapéuticos actuales resultan ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad, o presentan una baja o nula selectividad conlleva efectos secundarios que afectan la calidad de vida de los pacientes sometidos a estos tratamientos. Es por ésto que surge la necesidad de buscar nuevos tratamientos que presenten actividad antiproliferativa, la cual induzca preferentemente una muerte de tipo apoptótica y presenten una actividad selectiva, evitando dañar otras células sanas del organismo. Candidatos a éstas nuevas opciones terapéuticas son las saponinas esteroidales, un grupo de compuestos de origen natural al cuál se le han atribuido diversas actividades biológicas. En ese sentido, la diosgenina ha sido ampliamente estudiada, se le ha atribuido actividad anticancerígena e inductora de apoptosis. Por ello, se sintetizaron los derivados de la diosgenina; MF-10 y MF-11, a los cuales se les ha añadido una glucosamina, con la intención de potenciar la actividad biológica de la diosgenina. En el presente trabajo, se evaluó la actividad antiproliferativa del MF-10 y MF-11 en células de la línea MDA-MB-231 por la técnica de cristal violeta, encontrando una IC_{50} de 20.47 y 24.98 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Para explicar el decaimiento de la población, se evaluó la actividad de la enzima LDH como parámetro de muerte necrótica, sin que se encontrara una diferencia significativa entre los grupos control y los tratados con los compuestos. Posteriormente, la tinción con el fluorocromo DAPI, mostro que los compuestos MF-10 y MF-11 inducen la compactación de la cromatina y morfología característica de una muerte apoptótica en los cultivos celulares tratados con estos compuestos. Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la caspasa-3 activa a las 24 horas de tratamiento, encontrando incremento de 21.01% para el MF-10 y de 17.01% para el MF-11. Finalmente, se evaluó si los compuestos inducían un efectos similar sobre células linfocíticas de sangre periférica, a través del marcaje con carboxifluoresceina y la presencia de la enzima LDH en el sobrenadante del cultivo, mostrando que no hay un efecto negativo sobre su proliferación a las 72 horas con las concentraciones IC_{50} de ambos compuestos ni se genera una muerte de tipo necrótico. Los resultados del presente trabajo muestran que los compuestos MF-10 y MF-11 conservan la actividad antiproliferativa de la diosgenina, además de mejorar su actividad apoptótica y ser selectivos sobre células no tumorales.

Marco Teórico

La célula

Con el descubrimiento del microscopio a principios del siglo XVIII y los trabajos de diversos investigadores como Antoni Van Leewenhoek y Robert Hooke, Mathias Jakob Schleiden y Theodor Schanwan proponen el primer postulado de teoría celular, el cual establece que la célula constituye la unidad mínima de la jerarquía biológica por su capacidad para llevar a cabo todas las funciones básicas de la vida¹. El segundo postulado fue propuesto por Rudolf Virchow e indica que las células no se crean de la nada, sino que proceden de células preexistentes². La célula cumple con diversas funciones a lo largo de su vida, como la nutrición y relación con otras células, sin embargo, hay dos procesos primordiales que regulan la homeostasis y desarrollo de los organismos, la reproducción y la muerte celular³.

El ciclo celular

La única manera de que se forme una nueva célula es a partir de la duplicación de una preexistente, para ésto, la célula ejecuta una secuencia ordenada de eventos en la cual duplica y divide su contenido. A este proceso de duplicación y división se le conoce como ciclo celular⁴. Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están divididos en cuatro fases diferentes, la fase G1 (Gap, espacio o hueco) la cual es una fase intermedia entre la Fase M y la Fase S, la Fase S, en la que se asegura que el material genético se duplique adecuadamente, la Fase G2 la cual se considera un intermedio previo a la fase M en la cual primero se reparte el material genético entre dos núcleos y posteriormente el contenido celular se divide para formar dos células diferentes, en un proceso conocido como citocinesis⁵. Las células también se pueden encontrar en un estado fuera del ciclo celular denominado G0 en donde las células realizan todas las funciones requeridas para su supervivencia, hasta que reciban el estímulo adecuado para entrar en la fase G1 (Figura 1)⁶.

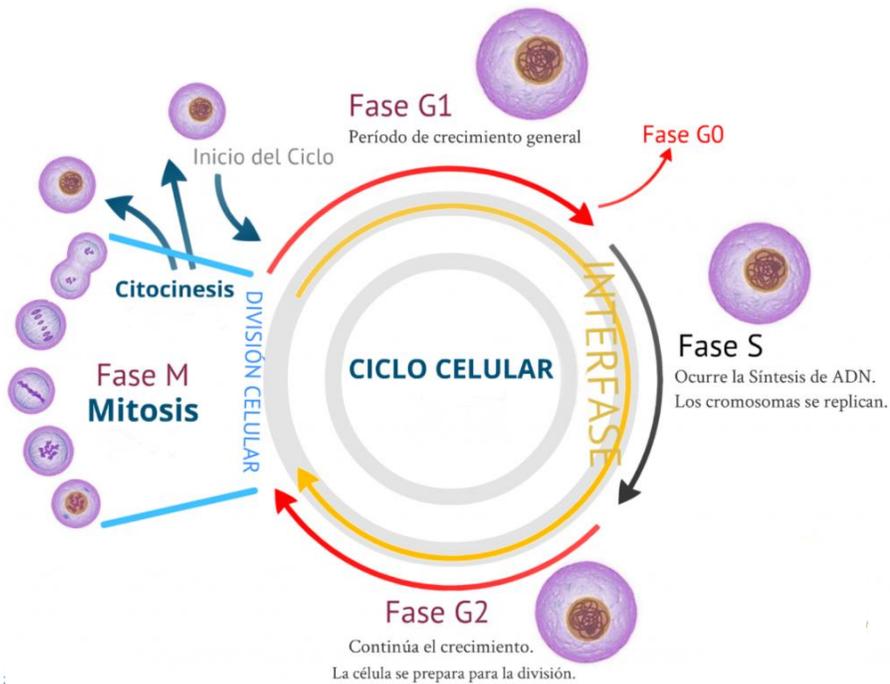


Figura 1. Fases del ciclo celular (G1, S, G2 & M) y la fase G0. Imagen tomada y modificada de <http://www.acercaciencia.com/2012/10/15/ciclo-celular/>

La fase G1 es un periodo de alta actividad bioquímica en donde la célula aumenta el material enzimático, replica sus organelos y aumenta el número de otras moléculas y estructuras citoplasmáticas. Algunas de las estructuras sintetizadas por la célula son microtúbulos, microfilamentos y ribosomas, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático se renuevan y aumentan de tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos⁷. La fase de síntesis (S) da comienzo cuando la célula ha adquirido el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado y se tiene suficiente ATP, el proceso clave de la fase S es la duplicación de la molécula de ADN, sin embargo, durante este proceso también se sintetizan histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras de las proteínas asociadas al ADN (ADN polimerasas, ligasas, topoisomerasas)⁸.

Durante la fase G2 ocurre la preparación para la mitosis, la célula comienza a ensamblar estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto equitativo de cromosomas a cada célula hija⁹. Finalmente ocurre la Fase M o de división, la cual consta de 2 etapas; la cariocinesis, en la que el material genético se reparte equitativamente en células hijas y la citocinesis, el resto del contenido celular se distribuye para formar dos células funcionales¹⁰.

Regulación y puntos de control del ciclo celular

La progresión del ciclo celular está regulada por diversos factores de crecimiento los cuales determinan el comportamiento de la célula incluyendo el crecimiento, la diferenciación o el proceso de muerte. Todos estos factores actúan en el ciclo afectando a las proteínas que lo regulan⁶. Dentro de los cambios enzimáticos que se realizan para la progresión del ciclo se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CdK) y los complejos que forman entre ambas (ciclina-CdK)¹¹. Cuando las células salen del estado quiescente y entran a la fase G1, se induce la expresión de las ciclinas de tipo D y E. Al inicio de la síntesis del ADN en la fase S, se sintetiza la ciclina A seguida por la síntesis de la ciclina B, que ocurre durante el intervalo entre la fase S y la fase G2, degradándose ambas al final de la mitosis¹². Además de los complejos ciclina-CdK existen distintos genes que promueven los procesos de proliferación y división celular, conocidos como protooncogenes, y genes cuyos productos aseguran la correcta progresión de eventos durante el ciclo, denominados genes supresores de tumor¹³. Dentro de estas proteínas que interactúan con los distintos reguladores del ciclo se encuentran proteínas proapoptóticas como Bin, Bax y Bak, proteínas inhibidoras de ciclinas como p21 y p16 y otras como la proteína del retinoblastoma (pRb) y p53 (Figura 2)¹⁴.

Normalmente la progresión del ciclo celular es continua, sin embargo, si existe algún daño, la mayoría de las células tienen la capacidad de detener el proceso en alguna fase del ciclo y reanudarla cuando el daño es reparado. Análogo a esto, la célula puede inducir un proceso de muerte si el daño es irreparable. Los puntos de regulación más importantes dentro del ciclo celular son los que se encuentran en la transición de G1-S, G2-M y metafase-anafase¹⁵.

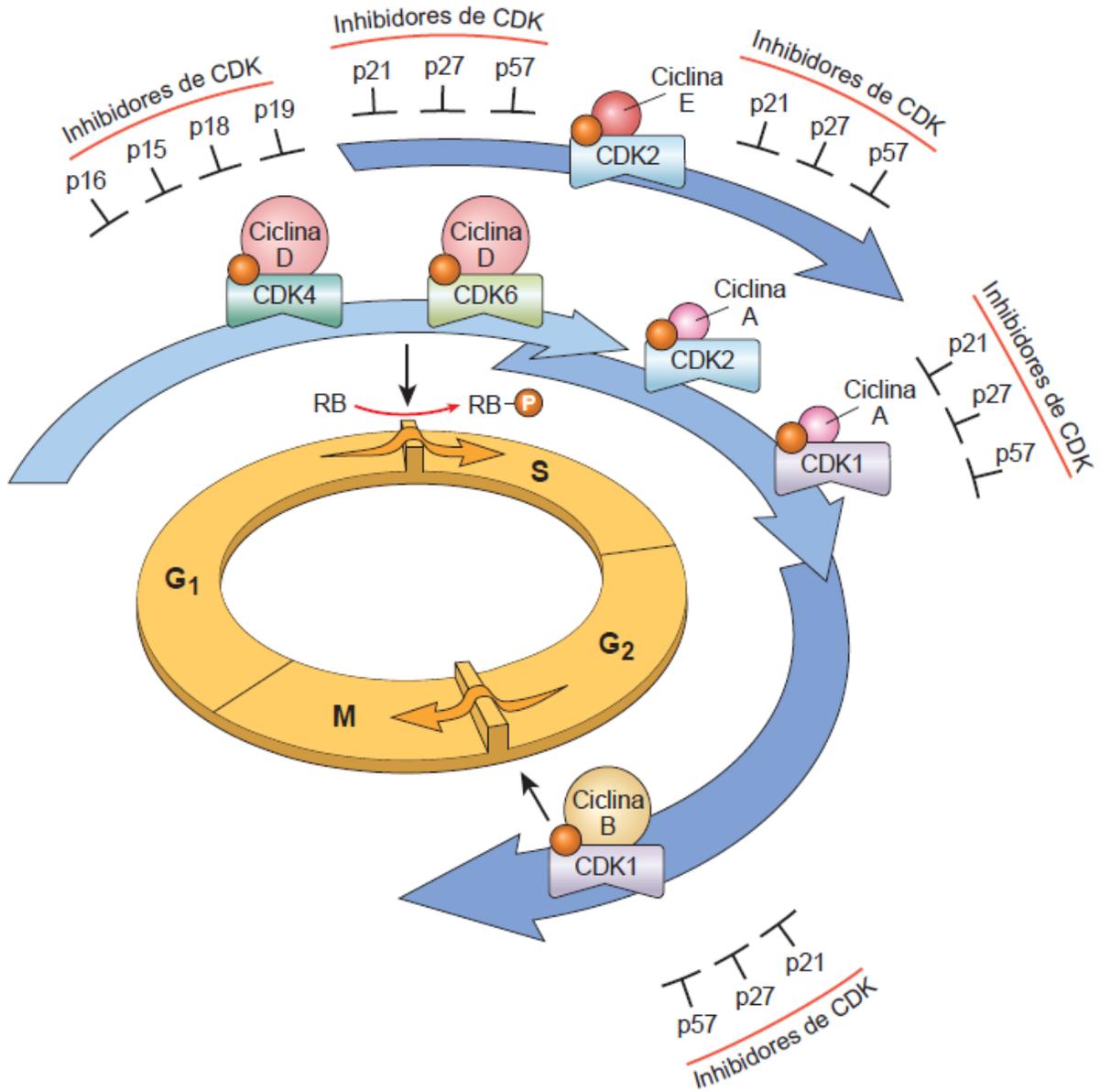


Figura 2. Fases del ciclo celular y complejos ciclina-CdK que los regulan. Imagen tomada y modificada de <http://primergrupob1bmc.blogspot.mx/2014/>

Muerte Celular

Dentro de un organismo pluricelular las células que lo componen forman parte de una comunidad ordenada y controlada por procesos de diferenciación y muerte celular⁴. Durante el desarrollo e incluso en la etapa adulta existen células que se deterioran y deben entrar a un proceso de muerte. Estos procesos de muerte son esenciales para la homeostasis y mantenimiento del organismo¹⁶. Sin embargo, en el 2009, el NCCD (por sus siglas en inglés Nomenclature Committee on Cell Death) describió diferentes tipos de muerte celular basándose en características morfológicas, pero sin una referencia precisa de los mecanismos bioquímicos que los desencadenan¹⁷ describiendo: apoptosis¹⁸, autofagia¹⁹, necrosis²⁰, cornificación²¹, catástrofe mitótica²², anoikis²³, excitotoxicidad¹⁷, degradación walleriana²⁴, paraptosis²⁵, pyroptosis²⁶, pyronecrosis²⁰, entosis²⁰ y NETosis²⁷, destacando la necrosis y la apoptosis como las principales causas de muerte por sus marcadas diferencias bioquímicas, morfológicas y su incidencia²⁸.

Apoptosis

El término “apoptosis” es utilizado para describir un proceso de muerte programada con características bioquímicas y morfológicas particulares, caracterizado por la activación de caspasas²⁹ (cisteín–aspartato proteasas) (Figura 3). Este proceso es responsable de numerosas respuestas fisiológicas o patológicas entre las que se encuentran: la embriogénesis, organogénesis, metamorfosis, atresia folicular, muerte de células del sistema inmune, lesiones virales en enfermedades como la hepatitis, muerte producida por diversos estímulos nocivos (Figura 4) y en procesos de senescencia¹⁸. El proceso apoptótico acaba con la pérdida total de la función y la muerte de la célula en donde participan numerosos genes con características proapoptóticas y antiapoptóticas que pueden ser activados o inhibidos por una serie de señales intrínsecas³⁰. Durante este proceso se han identificado 4 etapas: la activación de la célula

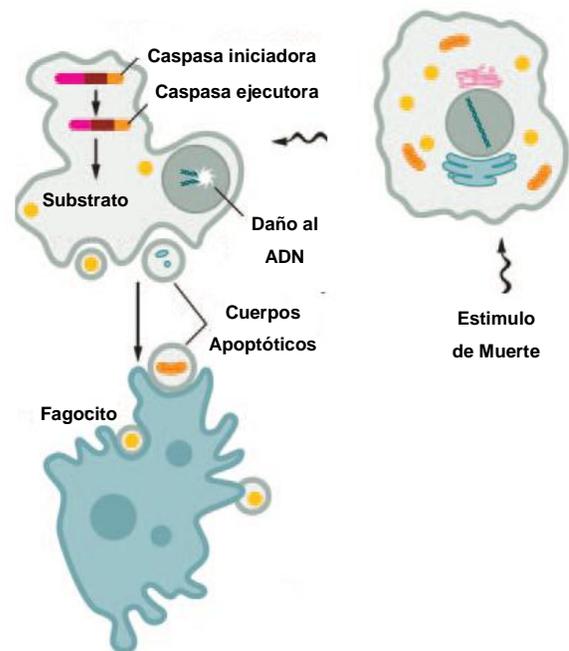


Figura 3. Apoptosis. Imagen tomada y modificada de Fink y Cookson, 2005

por estímulos internos o externos, la recepción y transducción de señales, la activación de caspasas o fase efectora y por último la fragmentación del ADN y la formación de los cuerpos apoptóticos. Terminado el proceso, estos cuerpos apoptóticos son fagocitados a través de células adyacentes o por macrófagos, a diferencia de la necrosis no desencadena un proceso inflamatorio³¹. La activación de las caspasas, que existen en calidad de procaspasas inactivas, se produce por diversas vías donde participan diversos complejos moleculares.

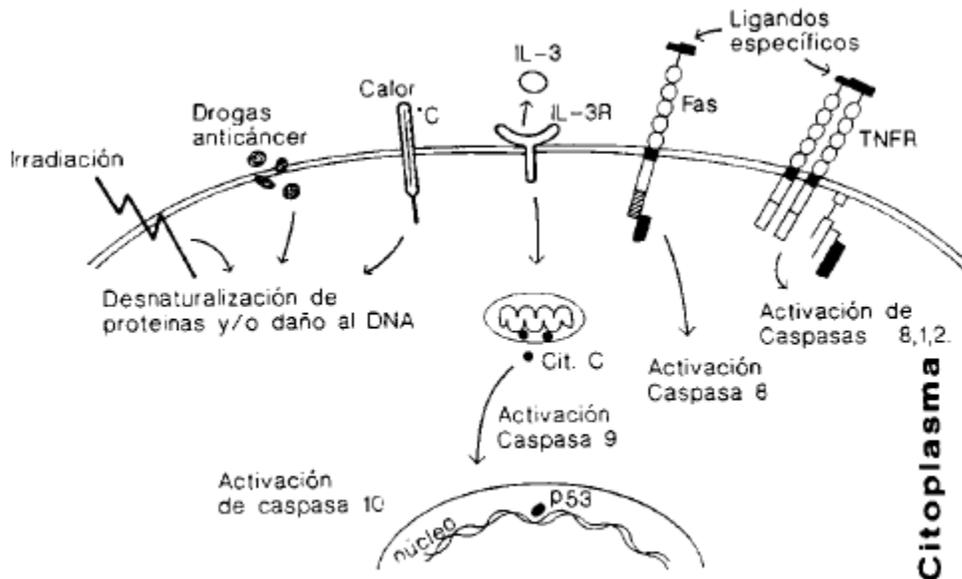


Figura 4. Señales de activación de las caspasas. Imagen tomada y modificada de Elinos et al, 2001

Vía extrínseca

La vía extrínseca o de los receptores, establece contacto en el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Se han identificado diversos receptores con estas características incluyendo Fas, TNF α R, DR3, DR4 y DR5 con sus respectivos sustratos. Los ligandos de los receptores de muerte inician la señalización a través de la oligomerización con el receptor, que resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la activación de la cascada de caspasas. La unión de Fas-L induce la trimerización de Fas que recluta a la caspasa-8 (iniciadora) por la vía de la proteína adaptadora FADD. Entonces, la caspasa-8 se oligomeriza y se activa por autocatálisis. En su forma activa la caspasa-8 estimula la apoptosis a través de dos cascadas de señalización paralelas: puede escindir y activar directamente la caspasa-3 o escindir Bid, una proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2, llevando a una señalización por la vía mitocondrial o intrínseca. TNF- α y DR-3L pueden enviar señales pro o antiapoptótica. TNF α R y DR3 promueve la apoptosis por medio de las

Vía Intrínseca

Otra vía de activación de la apoptosis es la vía intrínseca o mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis controlando la permeabilidad mitocondrial. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL residen en la parte externa de la pared mitocondrial, inhibiendo la liberación del citocromo c. Las proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, Bad, Bid, Bax y Bim pueden estar presentes en el citosol o translocarse a la mitocondria después de la señal de muerte, que promueve la liberación del citocromo c. Bad es translocado a la mitocondria y forma un complejo proapoptótico con Bcl-xL. Esta translocación es inhibida por los factores de supervivencia que inducen la fosforilación de Bad. Bid, en el citosol, es escindido por la caspasa 8 a través de la señalización de Fas, esto activa un fragmento (tBid) que es translocado a la mitocondria. Bax y Bim son translocados a la mitocondria en respuesta al estímulo de muerte. Activando por el daño al ADN, p53 induce la transcripción de Bax, Nox y Puma. Tras la liberación de citocromo c de la mitocondria, se une con Apaf-1 y forma el complejo de activación (apoptosoma) con caspasa-9. Los mecanismos de regulación de la permeabilidad y la liberación de citocromo c durante la apoptosis no están descritos totalmente, sin embargo, se sabe que Bcl-xL, Bcl-2 y Bad pueden influenciar el voltaje dependiente de canales aniónicos (VDAC) el cual juega un papel importante en la liberación del citocromo c. Mule/ARF-BP1 es un activador de daño del ADN que induce la expresión de E3 ubiquitin-ligasa sobre p53, y miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2³² (Figura 6).

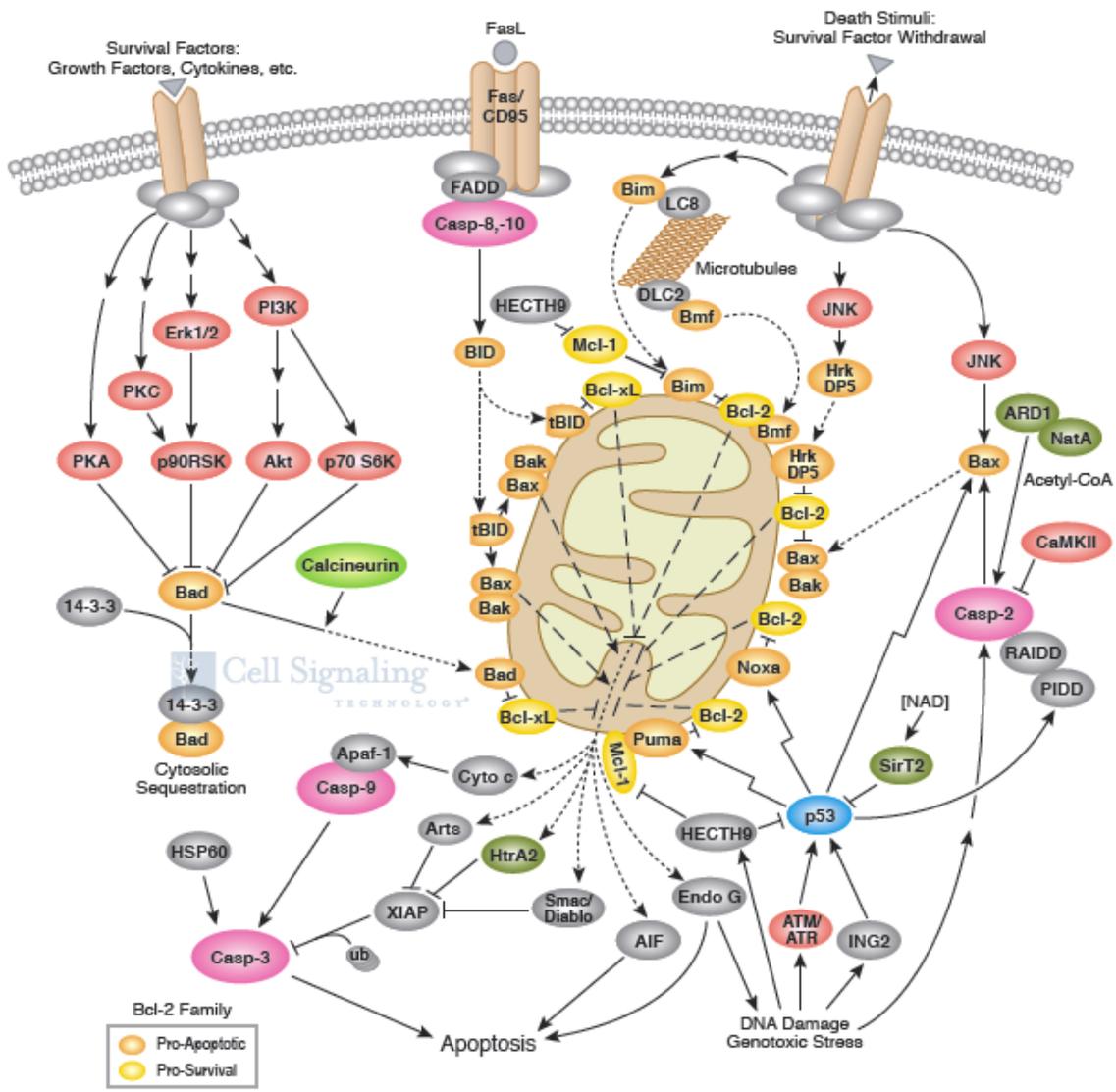


Figura 6. Cascada de señalización de la vía intrínseca de la apoptosis imagen tomada de Cell Signaling Technology (CST), 2017

Necrosis

La muerte necrótica o necrosis es comúnmente considerada como un proceso estocástico, accidental e incontrolado, caracterizado por una disrupción de la membrana plasmática²⁰. Consecuentemente el material citoplasmático es liberado, dañando las células adyacentes y provocando una respuesta inflamatoria³³. La necrosis primaria (Figura 7B) es regularmente definida como un proceso postmortem carente de las características de la apoptosis²⁰ resultado de perturbaciones en el ambiente como altas concentraciones de sustancias tóxicas, patógenos, fuerzas mecánicas, calor, frío o un resultado directo de un proceso necrótico³⁴. En etapas tardías de la apoptosis los cuerpos apoptóticos que no han sido fagocitados pierden la integridad de la membrana plasmática, ocasionando un proceso conocido normalmente como necrosis secundaria³⁵ (Figura 7A). Las células que mueren por un proceso necrótico poseen características bioquímicas y morfológicas distintivas: redondeamiento de la célula, hinchazón citoplasmática, presencia de organelos dilatados, ausencia de activación de caspasas y condensación y ruptura de la cromatina³⁶. También se ha descrito a la necroptosis como un tipo de muerte necrótica regulada, definida bioquímicamente por la señalización a través receptores de muerte (RIPK1, RIPK3) y la inhibición de caspasas³⁷. Esta señalización juega un papel importante en condiciones fisiológicas y patológicas como el desarrollo, la respuesta de daño al tejido y la inmunidad antiviral³⁸.

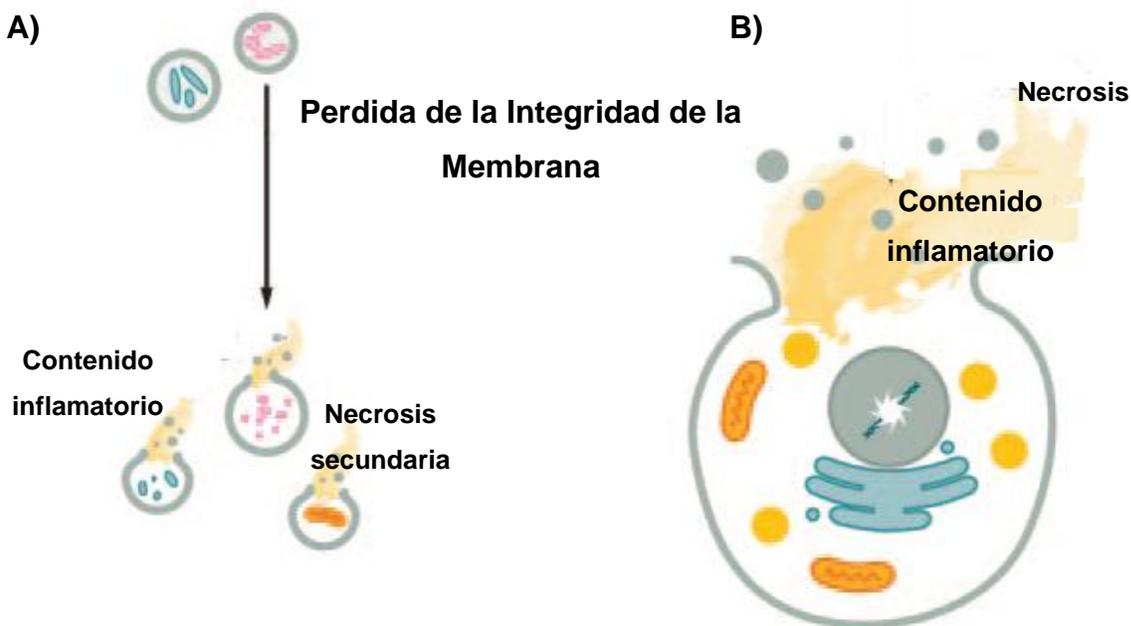


Figura 7. A) Proceso de necrosis secundaria. B) Proceso de necrosis primaria. Imagen tomada y modificada de Fink & Cookson, 2005

Cáncer

El cáncer es un término para designar a un grupo de enfermedades que pueden afectar prácticamente a cualquier parte del organismo y que se caracterizan por la diseminación y crecimiento descontrolado de las células³⁹. Este conjunto de células posee características únicas que las diferencian del resto de las poblaciones celulares bioquímica y morfológicamente, entre estas características se encuentran la inestabilidad genómica y la progresiva acumulación de mutaciones que tienen como consecuencia la inmortalización de las células cancerígenas, la evasión de los supresores de crecimiento, la desregulación de las vías energéticas y la resistencia a los procesos de muerte celular⁴⁰, otra característica destacable de este grupo de células es la capacidad que tienen de diseminarse e invadir otros sitios en el organismo por un proceso conocido como metástasis que, junto a la inducción de angiogénesis y la evasión del sistema inmunológico, aseguran la supervivencia de las células cancerígenas dentro del organismo⁴¹ (Figura 8).

Las alteraciones que dan inicio al proceso carcinogénico son el resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y factores externos, estos factores pueden ser: físicos, como la radiación ionizante o los rayos UV; químicos, como los asbestos, el arsénico, la aflatoxina y/o biológicos como algunas infecciones virales, bacterianas o parásitos³⁹.

Aunque las células cancerígenas comparten características entre sí, poseen características propias del tejido del cual se originaron, por lo que la mayoría de los tumores se agrupan en 3 grupos: los carcinomas (derivados de células epiteliales), los sarcomas (derivado de endotelio y tejido relacionado) y los linfomas (derivado de células sanguíneas y relacionados)⁴².

A nivel mundial y nacional el cáncer figura como una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad junto a las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia dentro de la población femenina, seguido del cáncer de pulmón, colon, cérvix y estómago⁴³.



Figura 8. Características necesarias para el crecimiento y progresión del cáncer. Imagen tomada de Hanahan y Weinberg, 2011.

Cáncer de Mama

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por el desarrollo células malignas en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas y en algunos casos el tejido conjuntivo⁴⁴ (Figura 9).

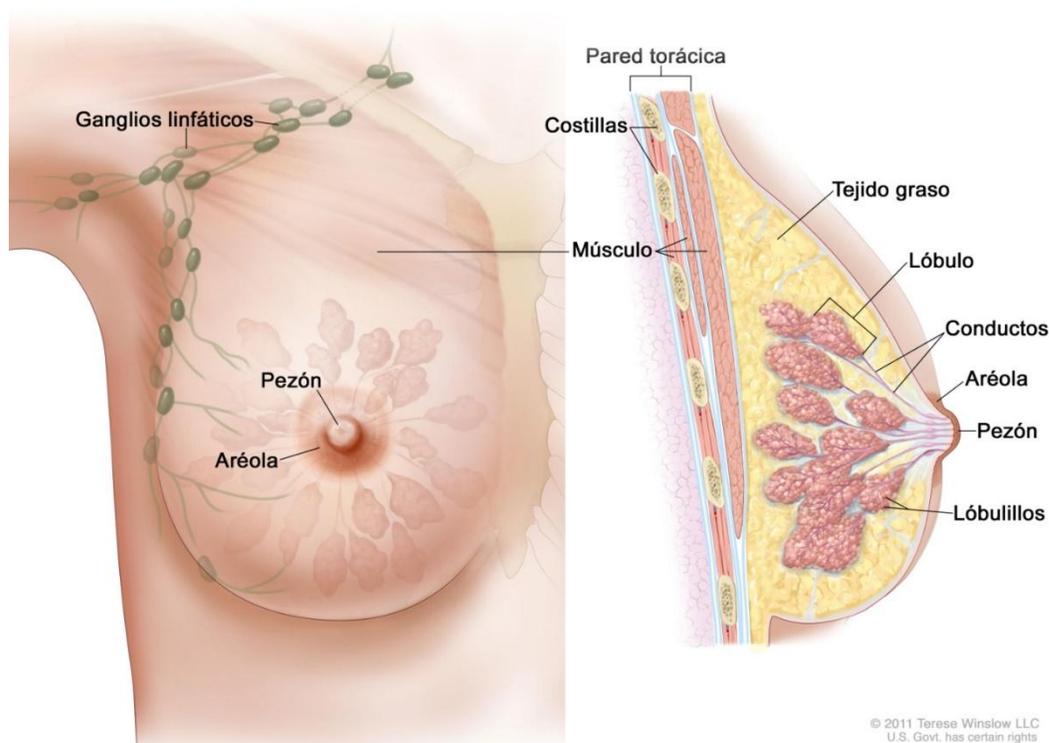


Figura 9. Estructura anatómica de la mama. Imagen tomada de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>

Epidemiología

El cáncer de mama es el segundo carcinoma con mayor incidencia a nivel mundial, y el más frecuente entre la población femenina, con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente representando un 25% de los casos de cáncer en mujeres. La incidencia es más alta en países desarrollados; varía desde 27 por cada 100,000 mujeres en África Central, hasta 96 en Europa occidental. Es también la principal causa de muerte por tumor maligno en mujeres de países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados (después del cáncer de pulmón) con tasas de mortalidad que van de 6 en Asia oriental a 20 defunciones por cada 100,000 mujeres en África Occidental y ocupa el quinto lugar en causas de muerte por carcinomas con un aproximado de 522,000 defunciones⁴³

(Figura 10). La tendencia de mortalidad es ascendente debido a una mayor incidencia de la enfermedad, el envejecimiento de la población y la poca capacidad de respuesta de los países subdesarrollados⁴⁵.

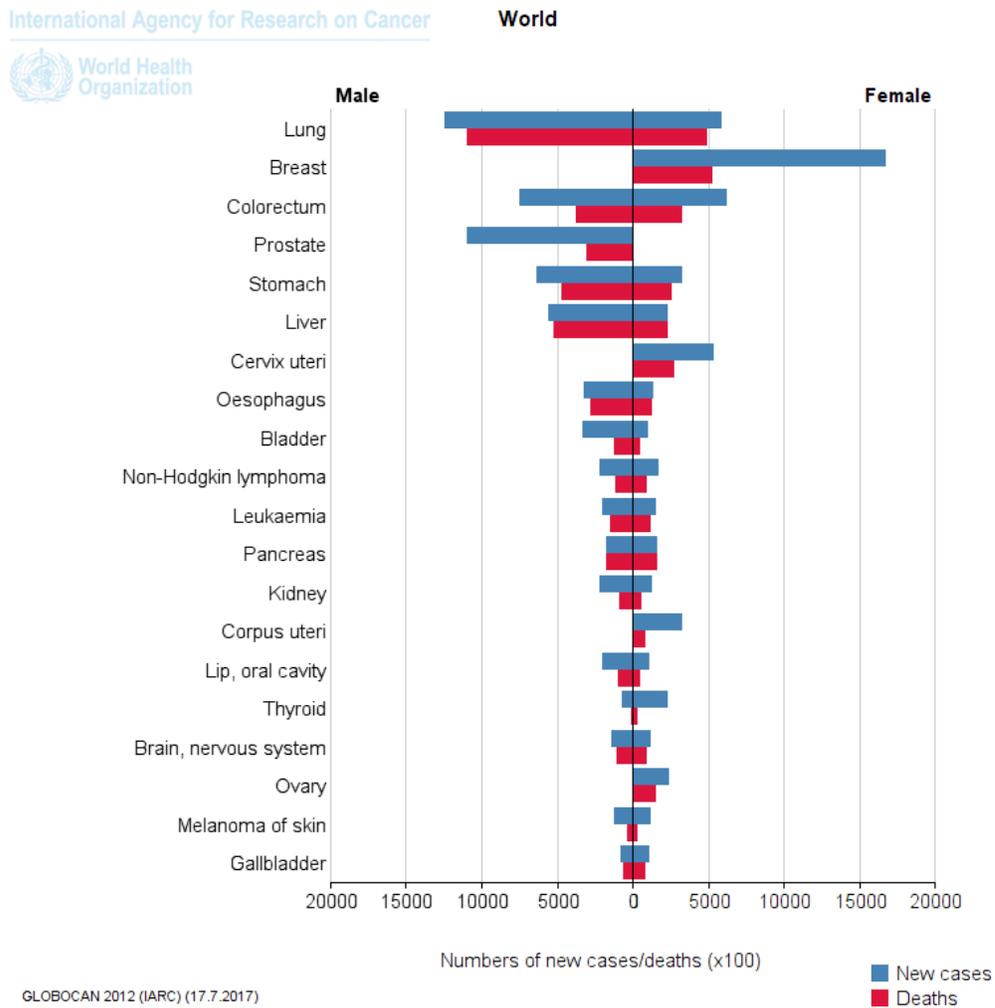


Figura 10. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población mundial. Imagen tomada de GLOBOCAN, 2012

En América Latina, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente con 152,059 casos diagnosticados anualmente, estos representa una cuarta parte (24.9%) de los casos de cáncer en mujeres. La incidencia regional es 47.2, la cual es más alta en países del ubicados en sur del continente, principalmente Argentina y Uruguay, donde las tasas son semejantes a la de países desarrollados (71.2 y 69.7 casos por 100,000 mujeres, respectivamente). Es también la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer latinoamericana, con 43,208 defunciones y tasas de mortalidad de 13, que varía de 5.0 en Guatemala a 22.6 defunciones por 100,000 mujeres en Uruguay⁴⁶ (Figura 11).

International Agency for Res: South America, Central America, Northern America

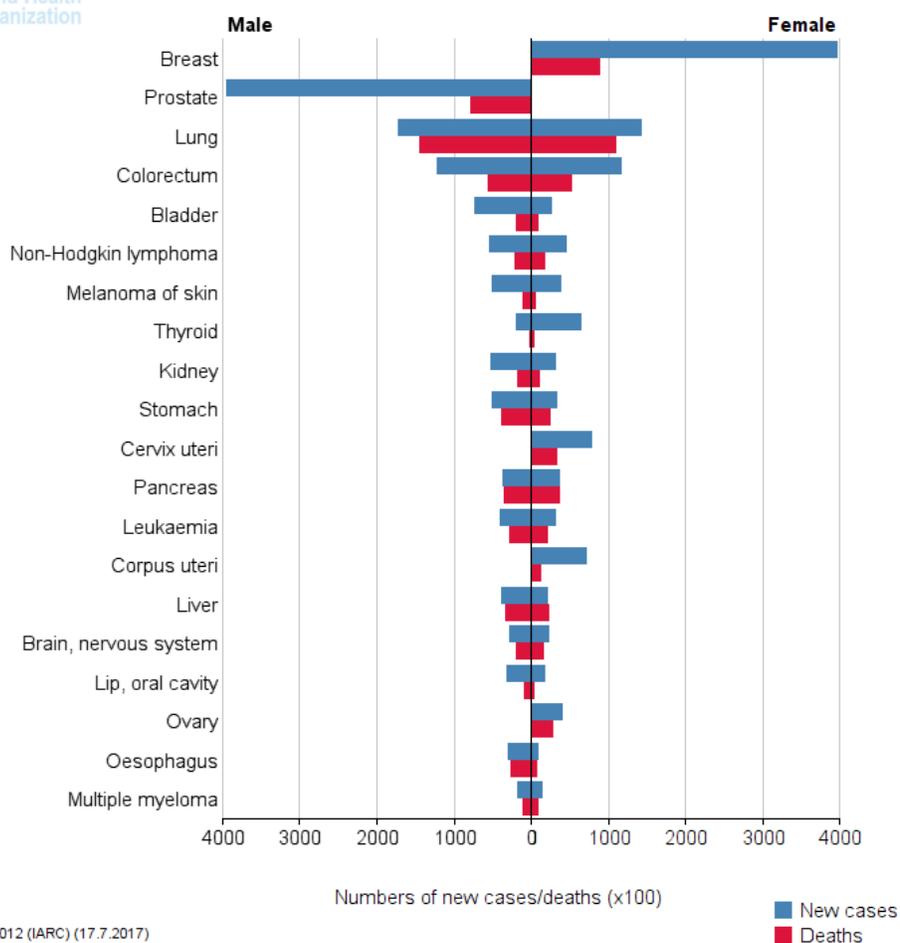


Figura 11. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población de América. Imagen tomada de GLOBOCAN, 2012

En México, constituye la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con 5,597 defunciones en el 2013 (el 7% del total de muertes causadas por tumores malignos). Destacando, con una mayor tasa de mortalidad (20 defunciones por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años), los estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Chihuahua, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas⁴⁷. Durante el periodo de 2000-2012 la mortalidad del cáncer de mama aumentó en un 21.3 %⁴⁶ (Figura 12).

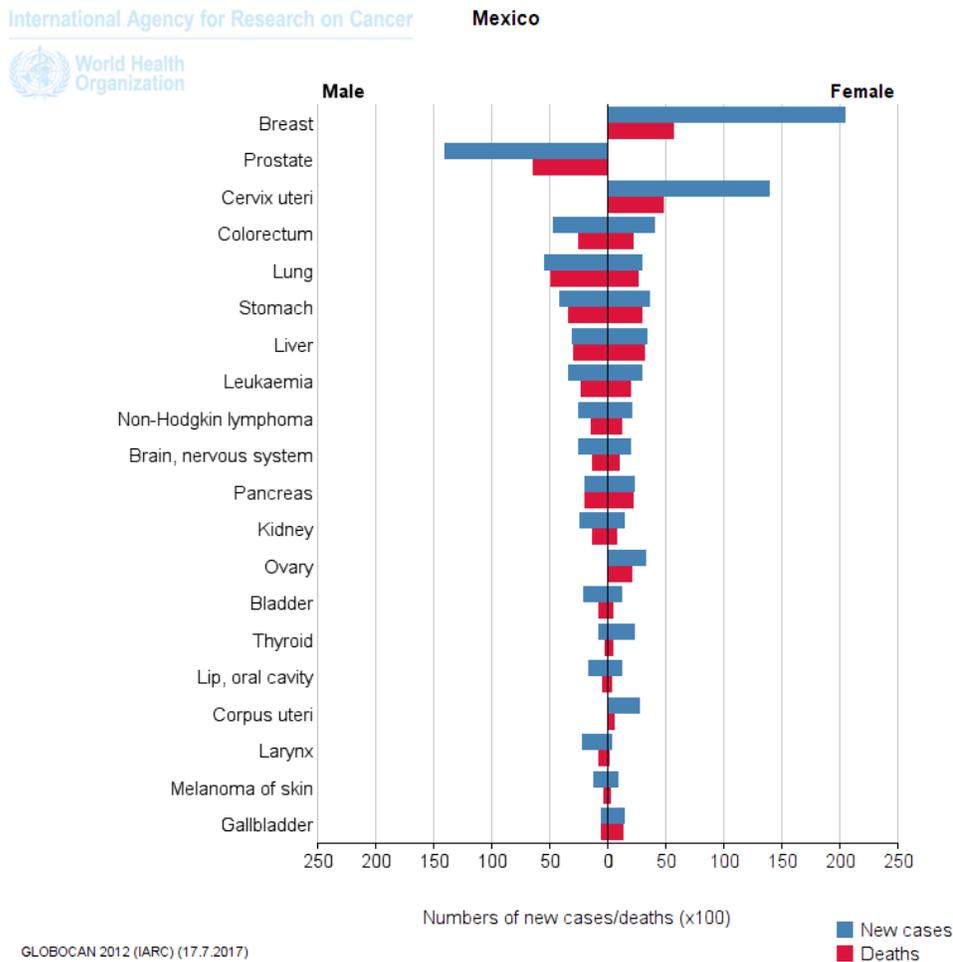


Figura 12. Muestra la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población de México. Imagen tomada de GLOBOCAN, 2012

Factores de riesgo

Los factores de riesgo son las características o atributos de la mujer que incrementan la probabilidad de desarrollar el Cáncer de mama, los dos principales son el género y la edad, otros están relacionados con la historia reproductiva, estilo de vida y algunos más de origen diverso⁴⁸.

Ser mujer: La relación de cáncer de mama entre mujeres y hombres es de 100 a 1⁴⁴.

Edad: Aunque el cáncer de mama puede afectar a cualquier mujer, el riesgo de padecerlo aumenta con la edad y la mayor incidencia se concentra entre los 50 y los 65 años⁴⁹.

Antecedentes de embarazo Las mujeres que nunca han tenido un embarazo a término o que han tenido su primer hijo después de los 30 años corren un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres que dieron a luz antes de los 30 años. Las células mamarias se desarrollan durante la adolescencia y son inmaduras y muy activas hasta el término del primer embarazo. Las células mamarias inmaduras responden a la hormona estrógeno así como a sustancias químicas que afectan las hormonas presentes en ciertos productos. El término del primer embarazo hace que las células mamarias maduren completamente y crezcan de manera más regular. Esta es la razón principal por la cual un embarazo reduce el riesgo de padecer cáncer de mama. Estar embarazada también reduce el número total de ciclos menstruales en la vida⁵⁰.

Antecedentes familiares de cáncer de mama: mutaciones genéticas en los genes que codifican a BRCA1 y BRCA2 (en aproximadamente una de cada mil mujeres), polimorfismos genéticos asociado a la síntesis de estrógenos y su metabolismo, son factores que determinan la prevalencia de cáncer mamario en una población. Aunque se debe considerar que en el 85% de los casos de cáncer mamario no hay evidencia de historia familiar, cuando ésta se presenta, el riesgo para la mujer con antecedentes familiares (madre, hermana, hija) es 2-3 veces mayor que en la población sin antecedentes familiares⁴⁴.

Otros factores asociados con el cáncer de mama son la raza y origen étnico, radiación en la mama, uso de terapia hormonal, ingesta de alcohol, las mamas densas, la falta de ejercicio, el tabaquismo, los niveles bajos de vitamina c, la dieta y la exposición a sustancias químicas⁵¹.

Detección del cáncer de mama

La detección del cáncer de mama se realiza mediante intervenciones específicas que se dirigen a la población femenina, éstas incluyen la autoexploración de senos, la exploración clínica por el personal de salud y la mastografía⁵².

Autoexploración: La autoexploración mamaria es una técnica de detección del cáncer de mama basada en la observación y palpación que hace la mujer en sus propias mamas (Figura 13). La autoexploración es referida por algunos críticos como una herramienta de poca utilidad ya que no detecta lesiones tempranas, sin embargo, la Asociación Estadounidense de Cáncer (ACA) recomienda la autoexploración de glándula mamaria de forma mensual a todas las mujeres a partir de la menarca, sobre todo en las mayores de 20 años⁴⁴.

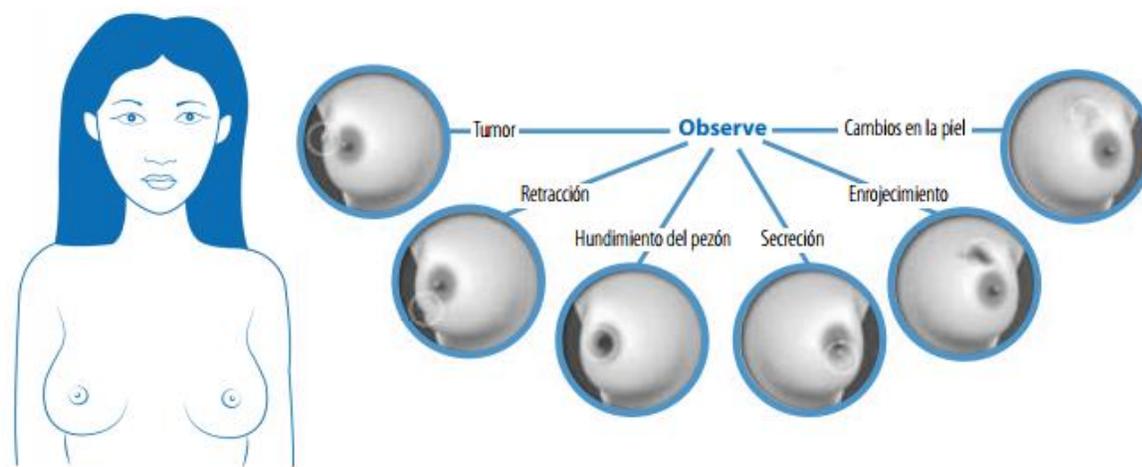


Figura 13. Primer paso de la autoexploración (observación de las mamas con los brazos a lo largo del cuerpo y las señales de anomalías en los senos. Imagen tomada y modificada de Torres et.al., 2011.

Examen clínico: El primer paso para la realización del examen clínico mamario es la obtención de una historia clínica que debe incluir antecedentes como el estado hormonal y la historia familiar de cáncer de mama, la identificación de prácticas de tamizaje de la salud de los senos, y preguntas acerca del cambio de los senos e identificación de los mismos. La exploración clínica de la región mamaria debe realizarse en condiciones adecuadas de iluminación, de preferencia entre 5 y 7 días después de la menstruación. Durante la exploración de la región mamaria en la que se observa forma y simetría de ambas mamas así como su tamaño y

posición, también se observa coloración, textura de la piel, presencia de hoyuelos y nódulos, integridad tanto de la piel de la mama como de la areola y pezón. Así mismo, debe buscarse la presencia de eczemas y ulceraciones⁵².

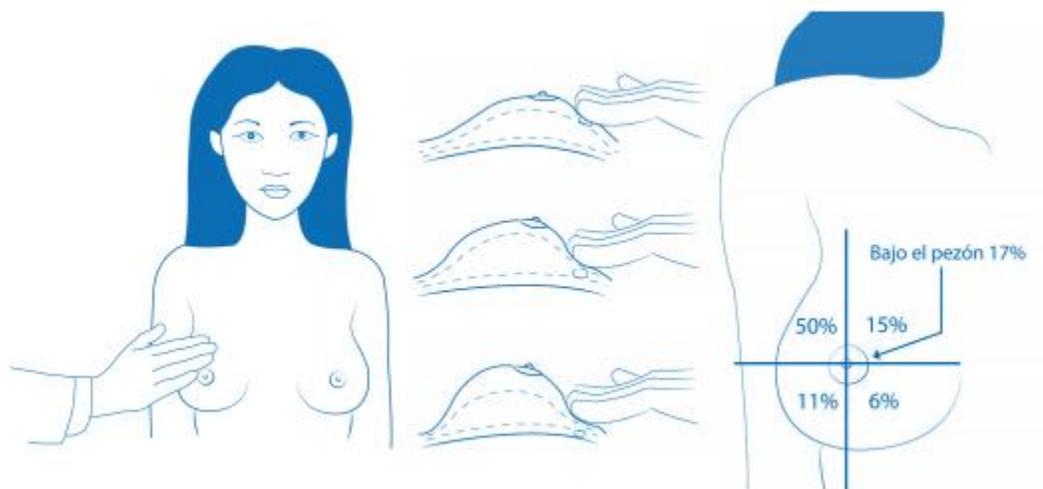


Figura 14. Tipos de palpación en la exploración clínica y la probabilidad de encontrar anomalías o desarrollo de cáncer de mama en los cuadrantes de la misma. Imagen tomada y modificada de Torres et al., 2011

Mastografía: La mastografía es una imagen radiográfica de la glándula mamaria cuya finalidad es reconocer lesiones pequeñas para incrementar la posibilidad de un diagnóstico oportuno. Existen tres tipos diferentes de mastografía: de tamizaje, diagnóstica y oportunista^{52,53}.

Ultrasonido mamario: Es una técnica complementaria y fundamental en el diagnóstico radiológico. Su función radica en la diferenciación entre masas quísticas y sólidas⁵².

Resonancia magnética: La mastografía puede tener resultados falsos negativos en 25-29% de los casos, sobre todo en mamas densas. Por lo anterior se han desarrollado otras modalidades de imagen con mayor especificidad, como la resonancia magnética⁵².

Estadificación

La estadificación del cáncer de mama proporciona información respecto al pronóstico y orientación del tratamiento⁵⁴. Actualmente los factores pronósticos han sido clasificados en 3 categorías: la categoría I incluye factores que proveen información del manejo del paciente, la categoría 2 factores biológicos y clínicos que han sido estudiados pero que aún necesitan información estadística más sólida para ser validados y la categoría III son todos aquellos factores biológico y clínicos que han sido totalmente estudiado⁵⁵. Clínicamente el estadio del tumor es usualmente expresado como un número en una escala que va del 0 al IV, el estadio 0 describe tumores no invasivos y el estadio IV cuando el tumor ya invadió otras partes del cuerpo. Estas clasificación se basa en el sistema TNM⁵⁶, que está dado, por el tamaño del tumor (T), la invasión a nódulos linfáticos (N) y si el tumor ha realizado metástasis a otras partes del cuerpo (M) (Figura 15).

- Estadio 0: Se utiliza para describir los casos en los que no se encuentra presencia de células cancerígenas o células anómalas en el tejido de la mama^{50,54,57}.
- Estadio I (Figura 15A): Describe el cáncer de mama invasivo (las células cancerígenas toman o invaden el tejido mamario normal que las rodea. El estadio I está dividido en subcategorías, conocidas como IA y IB^{50,54,57}.
- Estadio II (Figura 15B): se divide en las subcategorías IIA y IIB. IIA no hay evidencia de tumor o un tumor pequeño y la invasión de 1-3 ganglios linfáticos. IIB Tumores con tamaño de 2-5 cm que han invadido ganglios linfáticos cercanos a la axila^{50,54,57}.
- Estadio III (Figura 15C): Se divide en 3 subcategorías IIIA, IIIB y IIIC. IIIA no se detecta tumor en la mama pero han sido invadidos los ganglios linfáticos axilares y de estructuras cercanas. IIIB Tumores de cualquier tamaño que han invadido ganglios linfáticos axilares y han invadido la caja torácica y la piel de la mama. IIIC puede que no haya indicios de la enfermedad en la mama o si hay un tumor puede tener cualquier tamaño y haberse propagado hacia la pared torácica o a la piel de la mama invadiendo 10 o más ganglios linfáticos axilares o se ha propagado hacia los ganglios linfáticos ubicados sobre o debajo de la clavícula o cercanos al esternón^{50,54,57}.

- Estadio IV (Figura 15D): El estadio IV describe el cáncer de mama invasivo que se ha propagado más allá de la mama y los ganglios linfáticos circundantes hacia otros órganos del cuerpo, como los pulmones, ganglios linfáticos distantes, la piel, los huesos, el hígado y el cerebro^{50,54,57}.

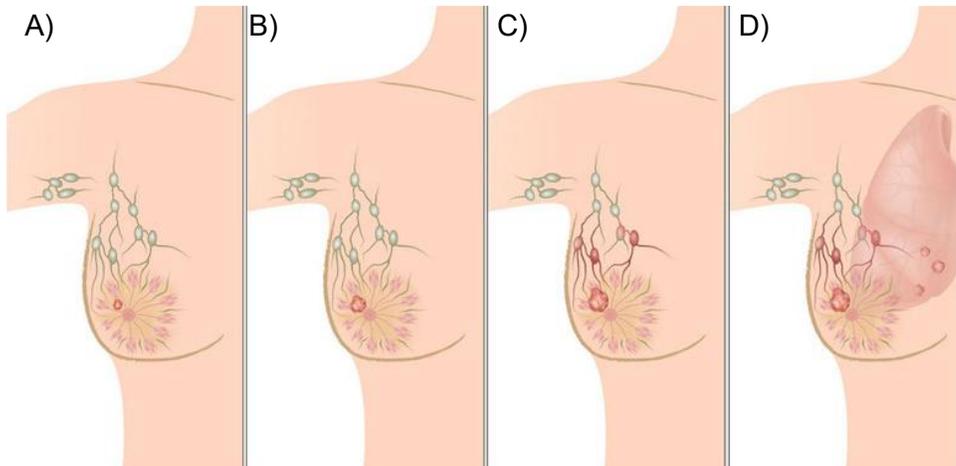


Figura 15. Estadios del cáncer de mama. A) Estadio I. B) Estadio II. C) Estadio III. D) Estadio IV. Imagen tomada y modificada de <http://vidadehoy.com/octubre-mes-de-concientizacion-sobre-el-cancer-de-mama/>

Tratamientos

La selección de un tratamiento o su combinación depende de la etapa en que se encuentre el tumor. En el caso de la quimioterapia, ésta es empleada como tratamiento principal cuando el tumor se encuentra en etapas tempranas de la enfermedad. Esta estrategia se basa en el potencial replicativo de las células tumorales, para inhibir su crecimiento. Sin embargo, esta característica puede provocar la muerte de las células sanas con un alto potencial proliferativo como las células del sistema inmune, de los epitelios o del recubrimiento del estomago, lo que ocasiona efectos secundarios que afectan la a calidad de vida de los pacientes sometidos a este tratamiento⁵⁸.

Cirugía

Las opciones de cirugía mamaria dependerán de la posibilidad de conservar la mama y el estadio del tumor. El tratamiento conservador consiste en la remoción total del tumor con márgenes negativos sin embargo en algunos casos es necesaria una mastectomía total⁵⁹.

- *Cirugía conservadora*: El objetivo principal de esta intervención es la resección amplia del tumor primario con el fin de preservar la estética de la glándula mamaria.
- *Cirugía curativa*: consiste en la resección de la mama, la aponeurosis del músculo pectoral mayor, el músculo pectoral menor y el contenido axilar⁵².
- *Tratamiento axilar*: El estado histológico de los ganglios linfáticos de la axila es el determinante más importante para la supervivencia de pacientes con cáncer de mama y es la disección axilar la que contribuye con la información necesaria para definir la etapa clínica del padecimiento e incrementa la supervivencia en un subgrupo pequeño de pacientes⁵².
- *Cirugía reconstructiva*: La cirugía reconstructiva de la glándula mamaria permite a la mujer tener mejor autopercepción de su imagen corporal, la cual le permite tener una mejor calidad de vida y bienestar⁵².

Efectos secundarios de la cirugía

Las infecciones, los hematomas y el seroma de las heridas son algunos de los efectos secundarios de la mastectomía o la tumorectomía. En el caso de las cirugías linfáticas axilares puede ocurrir insensibilidad en la piel de la parte interna de la extremidad superior, misma que puede ser permanente o transitoria. Este tipo de cirugía también puede limitar el movimiento del brazo y del hombro⁵².

Radiación

El tratamiento con radioterapia está indicado en todos los pacientes que hayan sido sometidos a cirugía conservadora⁵⁴, consiste en el uso de rayos o partículas de alta energía (como los rayos X) para eliminar las células del cancerígenas.

- *Radioterapia complementaria*. Tiene como finalidad la disminución de las recidivas locorregionales⁵².
- *Radioterapia paliativa*. Se utiliza principalmente en pacientes con metástasis ósea y cerebral, a quienes se les recomiendan esquemas hipofraccionados de 30 Grey (Gy) en 10 sesiones y 12 días o 20 Gy durante cinco días y cinco sesiones⁵².

Efectos secundarios de la radioterapia

La radioterapia provoca efectos secundarios locales. La piel del área irradiada puede presentar alteraciones similares a una quemadura solar. Posterior a dos o tres semanas de radioterapia, ocurre eritema y conforme avanza el tratamiento la piel se torna más oscura. Usualmente estos cambios desaparecen después de dos o tres meses de terminada la radioterapia. Posterior a este tratamiento, en algunas mujeres, la mama se hace más pequeña y más consistente⁵².

Quimioterapia

El objetivo de la quimioterapia eliminar la enfermedad micrometastásica antes del desarrollo de clones resistentes⁵⁴. Aún no existe un consenso de cómo se deben combinar las drogas utilizadas en la quimioterapia, sin embargo existen combinaciones bien estudiadas y que son consideradas como esquemas básicos⁶⁰ (Anexo I).

- *Quimioterapia neoadyuvante*: Se refiere a la indicada antes de un tratamiento radical (cirugía o radioterapia). Algunas ventajas de este tratamiento son: inicio temprano de terapia sistémica, modelo in vivo para valorar la sensibilidad al tratamiento, incremento de las posibilidades de cirugía conservadora, obtención de respuestas patológicas completas con valor pronóstico y excelente para realizar estudios clínicos y valorar estrategias de tratamientos novedosos y específicos⁵². Esta modalidad terapéutica se ha utilizado desde hace muchos años y se considera el estándar en los tumores localmente avanzados. Se recomienda un esquema basado en taxanos y antraciclenos durante seis a ocho ciclos⁵⁴.
- *Quimioterapia adyuvante*. Se refiere a la que se administra después del tratamiento quirúrgico radical. Su objetivo es incrementar el periodo libre de enfermedad, reducir las recurrencias locales y sistémicas e incrementar la supervivencia sin disminuir la calidad de vida de los pacientes. La terapia adyuvante está indicada en las pacientes que presenten metástasis en los ganglios axilares y en aquellas con ganglios negativos (pN0) y con alto riesgo de recaída⁵².
- *Quimioterapia paliativa*: Tiene como objetivo mejorar la calidad de vida de la paciente. Se utiliza en mujeres cuyos tumores son metastásicos (con diseminación a otros tejidos distintos a la mama). Este tipo de quimioterapia no tiene intención curativa pero sí la de extender la vida del paciente⁵².

Efectos secundarios de la quimioterapia

Los efectos secundarios más comunes son náusea y vómito, pérdida temporal del cabello, aumento de probabilidades de infección, cansancio, disminución del deseo sexual, pérdida de la menstruación en la mujer premenopáusica, infertilidad y defectos en el nacimiento cuando se utiliza durante el primer trimestre del embarazo. Dichos efectos dependerán del tipo de medicamento, de la cantidad administrada y la duración de la terapia. Algunos efectos pueden ser más difíciles de tolerar. En ocasiones es necesario controlar los efectos secundarios con medicamentos, métodos de apoyo o cambios en el programa del tratamiento⁵².

Hormonoterapia

La hormonoterapia es el tratamiento que añade, bloquea o elimina hormonas. En el cáncer de mama, se administran hormonas sintéticas u otros medicamentos para bloquear las hormonas naturales del cuerpo⁵². Entre 50 y 70% de los pacientes con cáncer de mama el tumor será hormonosensible por lo que se podrán beneficiar de una de las siguientes modalidades de manejo. La decisión dependerá de las condiciones de la paciente, biología tumoral y perfil de seguridad de cada tratamiento⁵⁴ (Cuadro 1).

- *Tamoxifén*: La administración de tamoxifén durante cinco años ha demostrado una disminución en el riesgo a recurrencia de 40% y en riesgo de muerte de 35%, así como reducción en el desarrollo de otro cáncer de mama, lo que se traduce en un beneficio absoluto a 15 años de 12% y de muerte de 9%. Los beneficios de tamoxifén son similares en mujeres premenopáusicas que en posmenopáusicas⁵⁴.
- *Inhibidor de la aromataasa*: Estos fármacos representan otra opción terapéutica en el tratamiento adyuvante exclusivo de mujeres posmenopáusicas, administrados de forma inicial o secuencial, han demostrado mejorar la supervivencia libre de enfermedad, no así en la supervivencia global⁶¹.
- *Supresión ovárica*: En mujeres premenopáusicas, la ablación ovárica se ha asociado con disminución en recaída y mortalidad, los beneficios son similares en magnitud a los obtenidos con quimioterapia en pacientes con receptores hormonales positivos. La supresión ovárica puede conseguirse con radiación, cirugía o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)⁵⁴.

Tratamiento	Mecanismo de acción
Ovariectomía	Eliminación de estrógenos ováricos
Adrenalectomía	Reducción de andrógenos (y por tanto de estrógenos)
Hipofisectomía	Reducción de ACTH, FSH y LH (y por lo tanto de andrógenos adrenales y esteroides sexuales ováricos)
Estrógenos (en postmenopausia)	Ocupar receptores de estrógenos (reduciendo así su efecto)
Tamoxifén	Ocupar receptores de estrógeno
Otros antiestrógenos	"bloqueo total" acción estrogénica (antiestrógenos puros)
Inhibidores de la aromatasa (en postmenopausia)	Interferencia con la aromatasa que convierte andrógenos en estrógenos
Análogos a la LHRH (principalmente en premenopausia)	Regulación por disminución de la liberación de gonadotropina de la hipófisis (reduce secreción de estrógenos por ovarios)
Progestágenos	Ocupar receptores de progesterona (Reduciendo RE y acción estrogénica)
Andrógenos	Ocupar receptores de andrógenos (con posterior reducción de RE que limita los efectos estrogénicos)

Cuadro 1. Mecanismos de acción de los tratamientos endocrinos contra el cáncer de mama. Tabla tomada y modificada de Herruzo, 2004.

Efectos secundarios de la hormonoterapia

En general la hormonoterapia es bien tolerada pero pueden presentarse efectos secundarios, como bochornos, trastornos genitourinarios (sequedad vaginal o cistitis de repetición), disminución del líbido, astenia y trastornos en el estado de ánimo⁵².

Productos de origen natural

El potencial de las plantas en la cura de enfermedades ha sido aplicado desde la antigüedad en las sociedades, éste se ve reflejado en la medicina tradicional y actualmente el desarrollo de la química permitió el aislamiento de los principios activos⁵⁸. Estos productos de origen natural son metabolitos secundarios de plantas, hongos y organismos marinos cuya función no se sabe con exactitud, aunque se cree que muchos se originaron en estos seres para defenderse de diversos agentes externos⁶². Debido a su amplia diversidad en estructuras y actividades biológicas los productos de origen natural han sido utilizados en la medicina, como agentes terapéuticos y en la farmacología como modelos de sustancias bioactivas, o como modelo para la síntesis de nuevas moléculas⁶³. Dentro de esta diversidad de actividades biológicas destaca la de los productos naturales como agentes anticancerígenos, tales como la vincristina, la camptotecina y el taxol⁶⁴.

Saponinas

Las saponinas son un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde se han descrito la presencia de saponinas en más de 100 familias⁶⁵ y en algunos animales como invertebrados marinos⁶⁶, el nombre proviene del latín *sapo* que significa jabón⁶⁷. Químicamente poseen altos pesos moleculares y están conformadas por una genina hidrofóbica (denominada sapogenina) y residuos de azúcares (1-8 residuos) (Figura 16). Dicha cadena está normalmente unida en la posición de C3 aunque también puede estar unida en la posición C26 o C28⁶⁸ y estar constituida por distintas combinaciones de monosacáridos, los más comunes son la D-glucosa, L-rhamnosa, D-galactosa, D-ácido glucorónico, L-arabinosa, D-xylosa y D-fucosa⁶⁹. Las saponinas se pueden dividir en dos grupos dependiendo de la estructura de su grupo aglicona⁷⁰ (genina).

- Saponinas esteroidales (27 carbonos)

Saponinas triterpenoides (30 carbonos)

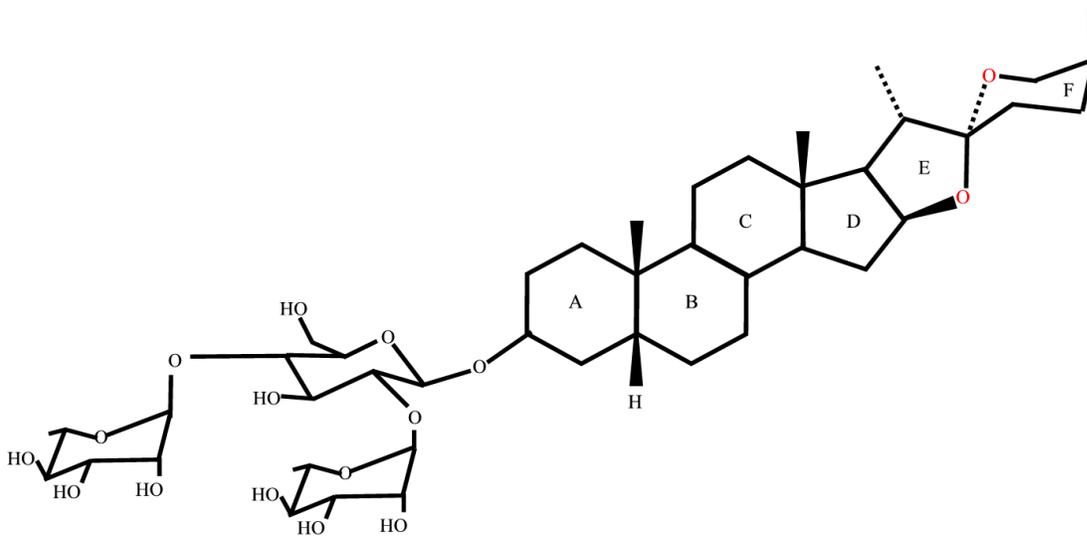


Figura 16. Estructura típica de una saponina. Imagen tomada de Escobar *et al.*, 2016.

Saponinas esteroideas

Las saponinas esteroideas poseen un esqueleto de 27 carbonos en su parte aglicona, y a su vez se dividen en dos grupos basados en las diferencias estructurales de la misma^{70,71}:

- Espirostanoles: Posen una estructura de 6 anillos (A-F). Son monodesmosídicos y típicamente contienen restos glicosilados unidos al C-3 de la genina (Figura 17B).
- Furostanoles Poseen una estructura de 5 anillos (A-E). Son desmosídicos. Contienen restos glicosilados unidos al C-3 y C-26 de la genina (Figura 17C)

La composición de la carbohidratos de las saponinas esteroideas está comúnmente conformada por D-glucosa,

D-galactosa, D-acido glucaronico, D-rhamnosa, D-galactosa, D-xylosa y D-fucosa. Esta composición de azúcares puede variar desde una a múltiples azúcares unidas por enlaces glucosídicos en diferentes posiciones, lo que genera una alta diversidad en estructuras de manera natural o como modelos para la síntesis para nuevas moléculas⁷⁰.

Adicionalmente se ha reportado la presencia de saponinas esteroideas en 100 familias de plantas de las que destacan las familias Agavaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Amaryllidaceae, Leguminosae, Solanaceae y Rhamnaceae⁶⁶ al igual que en algunos invertebrados marinos.

Actualmente las saponinas han sido blanco de diversos estudios y se ha reportado diversas actividades biológicas entre ellas: Adyuvante, analgésica, antialérgica, antifúngica, antígeno tóxica, antiinflamatoria, antimicrobiana, antimutagénica, antioxidante, antiparasítica, antiviral, citotóxica, diurética, hemolítica, hipoglucémica, inmunomoduladora, quimiopreventiva y anticancerígena⁷². Candidatos como nuevos quimioterapéuticos destacan las siguientes saponinas y la diosgenina una sapogenina, cuya parte aglicona es igual a los compuestos evaluados en el presente trabajo:

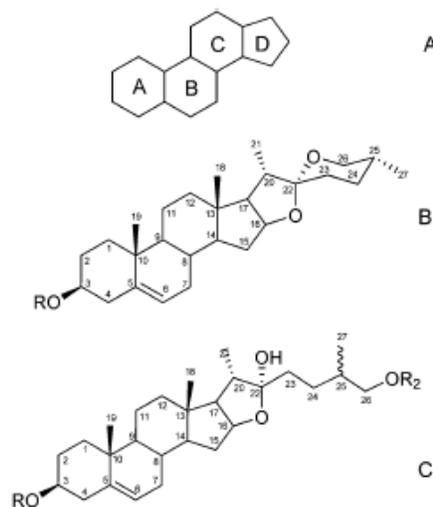


Figura 17. A) Estructura general de los esteroides. B) Estructura química de las saponinas spirostánicas. C) Estructura de las saponinas furostánicas. Imagen tomada de Munafo y Gianfagna, 2015.

Dioscina (Figura 18A): es una saponina esteroidea que ha sido aislada de *Dioscorea rizoma*, la cual ha demostrado tener potencial anticancerígeno en varios tipos de cáncer⁷² incluyendo: leucemia humana K562⁷³ y HL60^{73,74}, cáncer de pulmón A549^{75,76}, NCI-H446⁷⁶, NCI-H460^{76,77} y H1299⁷⁵, cáncer de esófago KYSE51⁷⁸, carcinoma hepatocelular Huh7 y HepG2⁷⁷, cáncer gástrico SGC-7901^{79,80}, cáncer de colon HCT-116, LoVo, Caco-2, SW620 y LS⁸¹, carcinoma epitelial de cérvix HeLa⁸², cáncer de ovario SKOV3⁸³, cáncer de próstata LNCaP⁸⁴ y cáncer de mama MCF-7⁷⁷, MDA-MB-231, MDA-MB-453 y T47D⁸⁵.

Diosgenina (Figura 18B): Es una saponina esteroidea, obtenida a partir de la hidrólisis de la dioscina, que ha demostrado tener una actividad antitumoral en diferentes líneas celulares⁸⁶ como: cáncer de próstata PC-3 y DU-145⁸⁷, carcinoma de colon HCT-116 y HT-29⁸⁸, eritroleucemia HEL⁸⁹, carcinoma de células escamosas A431, Hep2 y RPMI 2650⁹⁰, carcinoma hepatocelular HepG2 y HCC^{91,92,93}, cáncer gástrico BGC-823⁹⁴, cáncer de pulmón A549⁹⁵ y cáncer de mama MCF-7^{91,96,97}. Adicionalmente se sabe que la diosgenina causa el arresto del ciclo celular, la inducción de apoptosis por la activación de p53 y la activación de caspasa-3⁹⁸.

Diosgenina-3-glu (Figura 18C): (β -D-glucopiranosido de (25R)-spirost-5-en-3 β -ilo) es una saponina esteroidea monodesmosídica, sintetizada a partir de la diosgenina por la adición de una glucosa en el carbono tres de la estructura esteroidea. Por ser una saponina de reciente síntesis aún no hay información de su actividad biológica, pero en dentro nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que presenta actividad antiproliferativa en cáncer de cérvix CaSki, HeLa y ViBo, además de inducir la activación de caspasa 3 y la fragmentación del ADN sobre estas líneas celulares⁹⁹.

MF-10: (Figura 18D): Se ha reportado que la actividad de las saponinas está relacionada con el número y el tipo de azúcar unido a la parte aglicona. A partir de esto surge el 2-deoxi-2-acetamido- β -D-glicopiranosido de Diosgenilo (MF-10) una saponina esteroidea sintetizado a partir la adición de amina acetilada a la glucosa de la Diosgenina-3-glu. Este compuesto es reciente y existen pocos estudios, dentro de los cuales se ha demostrado tener un efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa y CaSki, además de tener nulo efecto sobre células linfocíticas humanas¹⁰⁰. Por lo que en el presente trabajo se evaluará este compuesto en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

MF-11: El segundo compuesto a evaluar en este trabajo es el 2-deoxi-2-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11), otra saponina esteroidea sintetizada a partir de la

adición una amina clorada en la glucosa de la Diosgenina-3-glu. Al igual que el MF-10 existen pocos estudios por ser un compuesto de reciente síntesis, pero se ha demostrado tener actividad antiproliferativa en células de cáncer de cérvix Hela, Caski y ViBo. Igualmente se reporta un nulo efecto sobre células linfocíticas de sangre periférica humana¹⁰⁰.

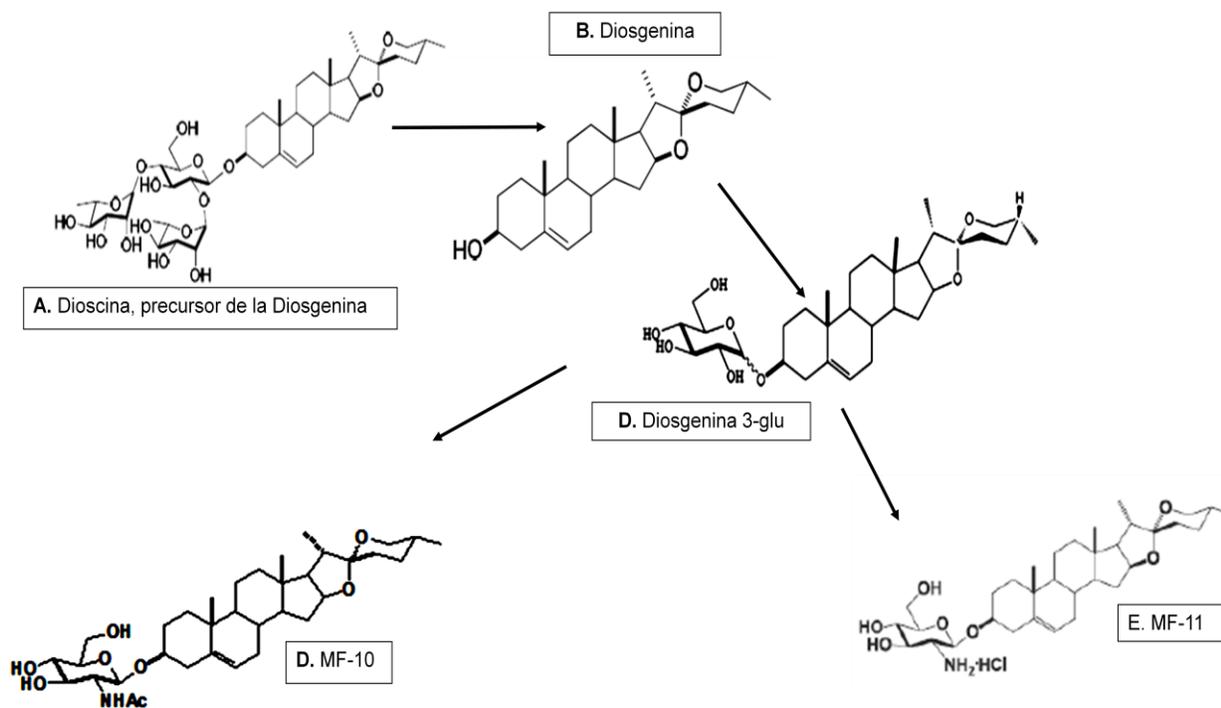


Figura 18. Estructura molecular de la Dioscina (A), Diosgenina (B), Diosgenina 3-glu (C) MF-10 (D) y MF-11(F) (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Planteamiento del problema

Actualmente el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor presencia en las mujeres a nivel mundial⁴⁷. Datos de la Organización Mundial de la Salud³⁹ señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad. En México el cáncer de mama se ubica como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres⁴⁷. Por otro lado, se sabe que los tratamientos contra el cáncer son altamente agresivos y los principales fármacos utilizados presentan actividad citotóxica y nula selectividad.

Justificación

Actualmente los tratamientos contra el cáncer resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad, además de que conllevan efectos secundarios que reducen la calidad de los pacientes sometidos a estos. Por lo que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que pudieran presentar actividad antiproliferativa sobre células tumorales y selectividad sobre células no tumorales, candidatos a estas nuevas opciones terapéuticas son las saponinas esteroidales un grupo de compuestos a los que se les ha atribuido diversas actividades biológicas. En particular la diosgenina una sapogenina ampliamente estudiada y sus derivados el MF-10 y MF-11 dos moléculas cuyas modificaciones estructurales podrían estar mejorando su actividad biológica tumorales de cáncer de mama, además de aportar información que permita establecer el potencial terapéutico de estos dos nuevos compuestos.

Hipótesis

La diosgenina es una saponina esteroideal de origen vegetal que presenta actividad antiproliferativa, también se sabe que las modificaciones estructurales de la molécula pueden potenciar su actividad biológica por lo que se espera que los compuestos glicoconjugados esteroidales MF-10 y el MF-11 derivados de la diosgenina presenten una actividad antiproliferativa y apoptótica sobre las línea celular MDA-MB-231

Objetivos

General

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico e inductor de apoptosis de los compuestos 2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo(MF-10) y 2-deoxi-amino- β -D-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) sobre la línea celular MDA-MB-231.

Particulares

- Determinar la concentración de MF-10 y MF-11 necesaria para reducir el 50% del número celular (IC_{50}) en cultivos celulares de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Determinar si la concentración IC_{50} de MF10 Y MF-11 presenta una actividad necrótica sobre los cultivos de células MDA-MB-231 a través de la evaluación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos.
- Evaluar el efecto de la IC_{50} de los compuestos MF-10 y Md-11 sobre la morfología de células MDA-MB-231 por microscopía de contraste de fases y epifluorecencia como parámetro de inducción de muerte apoptótica.
- Determinar si la concentración IC_{50} de MF-10 Y MF-11 induce la activación de caspasa-3 por citometría de flujo.
- Determinar si la concentración IC_{50} de ambos compuestos para la línea tumoral MDA-MB-231 afecta el potencial antiproliferativo de células linfocíticas de sangre periférica.
- Evaluar si las concentraciones IC_{50} de ambos compuestos presentan una actividad necrótica sobre los cultivos de células linfocíticas de sangre periférica a través de la evaluación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Material y Método

Preparación de la solución stock de los compuestos MF-10 y MF-11

Los compuestos MF-10 (2-deoxi-2-acetamino- β -D-glicopiranosido) y MF-11 (2-deoxi-amino- β -D-glicopiranosido de diosgenilo) obtenidos del Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y se solubilizaron 5000 μ g de cada compuesto en 250 μ l de Dimetilsulfóxido(DMSO) evitando que se generen cristales o precipitados.

Cultivo Celular

Para el desarrollo de los cultivos celulares, se sembraron células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 en placas de Petri de 10 mm con 5 ml de medio de cultivo DMEM (Anexo II) (GIBCO, USA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, USA), los cultivos se mantuvieron a temperatura de 37° con una concentración al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y una atmósfera húmeda en una incubadora (Nuair, USA).

Determinación de la actividad antiproliferativa

Técnica de tinción de cristal violeta

Se sembraron 7500 células de la línea MDA-MB-231 por pozo, en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) con 100 μ l de medio DMEM suplementado con 5% de SFB y se dejaron incubando durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación se retiró el medio y fue sustituido con concentraciones de ambos compuestos disueltos en medio DMEM al 5 % de SFB (200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 6.25 μ g/ml, 3.12 μ g/ml, 1.67 μ g/ml, un control y la máxima concentración del vehículo utilizado (DMSO)). El efecto de los compuestos se evaluó a las 24 horas después de agregar el estímulo mediante el método de incorporación del colorante cristal violeta. Para esto, las células fueron fijadas durante 20 minutos con glutaraldehído al 1% (Sigma-Aldrich, USA), posteriormente fueron lavadas con agua y se dejaron secar, una vez secas se agregaron 50 μ l por pozo de colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA) pH 6.0 durante 20 minutos en agitación constante, al término se retiró el exceso de colorante y se dejaron secar nuevamente, finalmente, se añadieron 200 μ l de ácido acético (J.T, Baker) al 10 % y se dejaron en agitación constante durante 20 minutos, para proceder a realizar la lectura de la absorbancia a 590 nm en un lector de placas ELISA (Chromate 4300, USA).

Determinación de la concentración necesaria para reducir un 50% el número celular (IC_{50})

Las densidades ópticas fueron graficadas como porcentajes de proliferación con respecto al control en el programa Microsoft Office Excel por medio de un análisis de regresión lineal simple, se calculó la concentración necesaria para inhibir el número celular en un 50% expresada como IC_{50} .

Determinación de la actividad necrótica

Evaluación de la expresión de la enzima LDH en los cultivos celulares

Se sembraron 7500 células por pozo, en placas de 96 pozos y se dejaron en incubación por 24 horas, al día siguiente se retiró el medio y se sustituyó con una disolución cuya concentración es equivalente a la IC_{50} de ambos compuestos, además de un control experimental en el que sólo se cambió el medio de cultivo, un control positivo de células lisadas durante una hora con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 1% en medio de cultivo y la máxima concentración del vehículo (DMSO), el efecto de los compuestos fue evaluado transcurridas las 24 horas del estímulo por medio de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Terminado el estímulo, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, en frío, se recuperaron 50 μ l de medio sobrenadante y se colocó en una placa de 96 pozos de fondo plano (3 pozos por condición) Se le adicionó 50 μ l de la mezcla de reacción del kit Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 490 nm, usando un lector de placas. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado en el programa Microsoft Office Excel, por medio de una comparación relativa con control positivo tratado con Tritón X-100.

Determinación de la actividad apoptótica

Evaluación de la morfología celular por tinción DAPI

Se sembraron 30,000 células por pozo sobre cubreobjetos de 1 cm x 1 cm en placas de 24 pozos (Corning Inc) y se dejaron en incubación por 24 horas, al día siguiente, se retiró el medio y fue sustituido con el estímulo correspondiente a la concentración de IC_{50} de ambos compuestos, considerando un control al que solo se le realizó cambio de medio, una condición con la máxima cantidad de vehículo utilizado DMSO y un control positivo a apoptosis (camptotecina 5 μ g/ml), fueron incubadas durante 24 horas desde la aplicación del estímulo. Al término del estímulo, se fijaron la células con formaldehído 1% y se dejaron en agitación suave

durante 30 minutos, posteriormente fueron lavadas gentilmente con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) filtrada, para ser teñidas con 10 μ l de fluorocromo 4',6-diamidino-2 fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) formando un domo en el cubreobjetos durante 30 segundos en hielo, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso de colorante y montar las muestras con medio para fluorescencia sobre portaobjetos. Las muestras fueron observadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio de contraste de fases y de epifluorescencia (Nikon, Japón).

Inmunodetección de Caspasa-3 Activa

Se sembraron 30,000 células en placas de 24 pozos y se dejaron en incubación por 24 horas para posteriormente ser estimuladas con la concentración IC_{50} de ambos compuestos considerando los controles experimentales necesarios (control sin marca, control con anticuerpo secundario, un control con ambos anticuerpos y la máxima concentración del vehículo) y ser evaluadas transcurridas 24 horas después del estímulo. Posterior al estímulo, las células fueron recolectadas en tubos de citometría, centrifugadas a 1800 rpm y fijadas con metanol al 50% durante 1 hora, una vez fijadas se realizaron 3 lavados con PBS y fueron agregados 50 μ l de una solución 1:500 de anticuerpo anticaspasa-3 (Sigma, USA) durante 24 horas en frío. Para eliminar el excedente de anticuerpo, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS y se agregaron 50 μ l de una solución 1:500 de anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo FIT-C (Sigma-Aldrich, USA) durante una hora a 35°C, para su posterior lectura en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems USA) . Los datos fueron procesados en el programa estadístico Flowing Software 2.5.1.

Determinación de la selectividad

Evaluación del efecto antiproliferativo en células linfocíticas de sangre periférica

Para la obtención de las células linfocíticas, se extrajeron 20 ml de sangre periférica humana de un donador aparentemente sano y se colocaron en tubos cónicos estériles con 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) en proporción 1:1. Para la separación, se centrifugó iniciando a 300 rpm hasta llegar a 1500 rpm durante 30 minutos aumentando la velocidad cada 5 minutos, al término se recolectó el anillo de linfocitos y se realizaron 2 lavados con 5 ml de medio RPMI, sin suero, para eliminar el exceso de proteína e histopaque, se realizó el conteo con una cámara de Neubauer y se colectaron 2 tubos con 1×10^6 de células cada uno llevando el volumen a 1 ml con medio RPMI al 20% de SFB, el resto de las células fueron marcadas con 10 μ l/ml de carboxifluoresceína al 2 μ M (Sigma-Aldrich, USA) y fueron incubadas durante 15

minutos a 37 °C, al término se realizaron 2 lavados con 5 ml de RPMI al 5% de SFB y 1 con medio RPMI al 20 % de SFB, se realizó un conteo nuevamente y se separo 1×10^6 de células como control experimental. El resto de las células fueron activadas con 20 $\mu\text{l/ml}$ de fitohemaglutinina y estimuladas las concentraciones IC_{50} de ambos compuestos MF-10 y MF-11 considerando un control con la concentración máxima de vehículo (DMSO). Se consideraron las siguientes condiciones experimentales (Cuadro 2):

	Carboxifluoresceína	Fitoheamaglutinina
Sin marcar y sin activar (-/-)	-	-
Sin marcar y activado (-/+)	-	+
Marcado y sin activar (+/-)	+	-
Activado y marcado (+/+)	+	+
Vehículo (DMSO)	+	+
IC_{50} MF-10 (20 $\mu\text{g/ml}$)	+	+
IC_{50} MF-11 (25 $\mu\text{g/ml}$)	+	+

Cuadro 2. Condiciones experimentales consideradas para la evaluación del efecto de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre la proliferación de células linfocíticas de sangre periférica. (-) sin carboxifluoresceína o fitohemaglutinina; (+) con carboxifluoresceína o fitohemaglutinina.

Las células fueron colocadas en una placa de 96 pozos con 200,000 células por pozo y se dejaron incubando durante 72 horas. Transcurrido el tiempo del estímulo, la placa fue centrifugada a 1800 rpm durante 5 minutos, se recuperaron 40 μl del medio sobrenadante para una posterior evaluación. Se cosecharon las células de los pozos en tubos de citometría, se agregaron 500 μl de verseno con el fin de disgregar las colonias celulares incubando durante 30 min, se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso de verseno, las células se mantuvieron suspendidas en 5 ml de PBS hasta su lectura en el citómetro de flujo. Los datos fueron procesados en el programa estadístico Flowing Software 2.5.1.

Evaluación de la actividad citotóxica en células linfocíticas de sangre periférica

Para ésta evaluación, se transfirieron 40 μl del medio sobrenadante a una placa de 96 pozos (5 pozos por condición) agregando 40 μl de la mezcla de reacción del kit de citotoxicidad a cada pozo, posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en completa oscuridad, finalmente se evaluó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas. Los datos obtenidos fueron procesados en el programa Excel 2013 comparándolos con el control positivo de Tritón X-100.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron procesados en el programa Microsoft Excel 2017, para calcular la media y la \pm desviación estándar. Se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) para la comparación entre medias utilizando el programa GraphPad InStat seguido de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre los pares de medias con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Actividad antiproliferativa de los compuestos MF-10 y MF-11.

Con el propósito de evaluar el efecto de los compuestos derivados de la diosgenina MF-10 y MF-11 sobre células de cáncer de mama, los cultivos de la línea celular MDA-MB-231 fueron estimulados con diferentes concentraciones de los compuestos y se obtuvo la concentración necesaria para reducir la población celular en un 50 %, expresada como IC₅₀ con valores respectivos de 20.47 y 24.98 µg/ml (Cuadro 3), estas concentraciones fueron confirmadas puntualmente y utilizadas en posteriores ensayos (Figura 19 y 20).

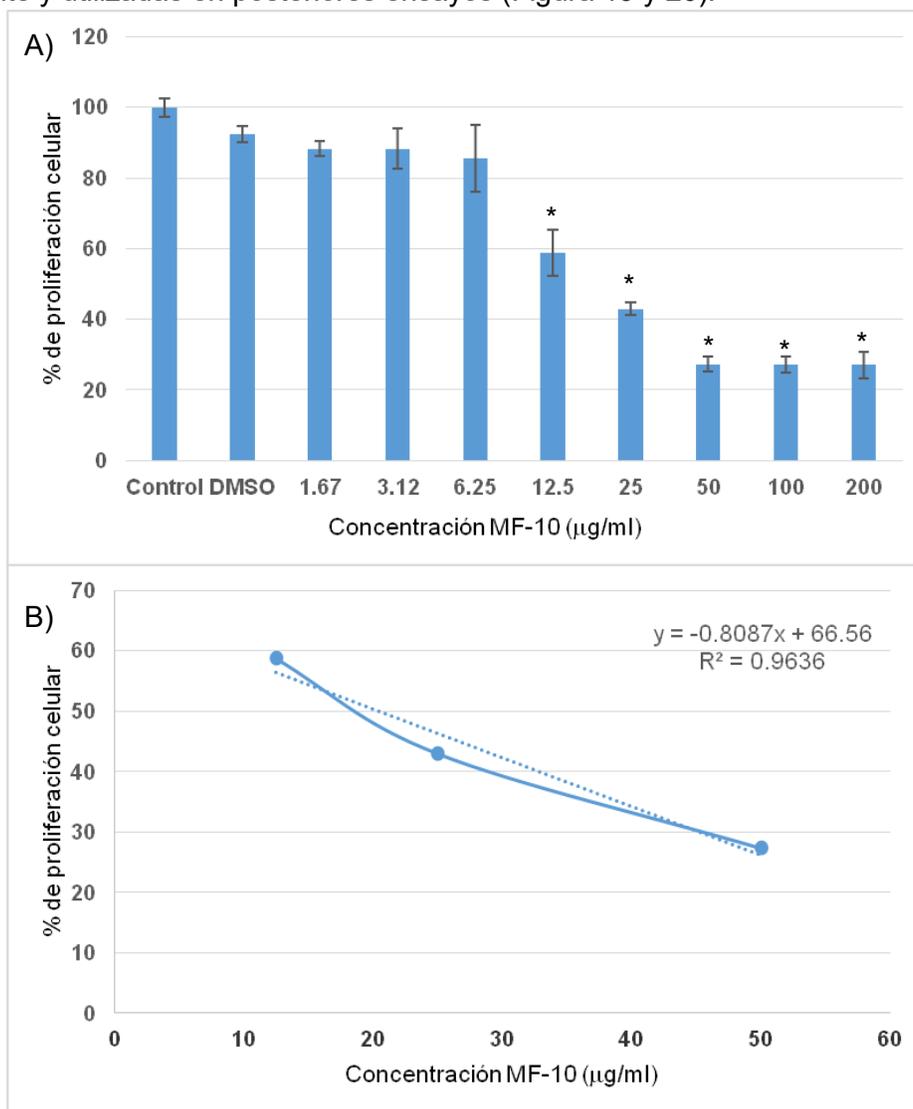


Figura 19. A) Actividad antiproliferativa del compuesto MF-10 sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. El número celular fue obtenido mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Los datos fueron obtenidos de tres ensayos independientes, donde cada condición fue obtenida por el promedio de 6 repeticiones. Las barras representan la SD. B) La gráfica muestra la linealización de la curva del análisis de regresión lineal. Prueba ANDEVA seguida de Tukey * diferencia significativa $p < 0.05$ vs Control.

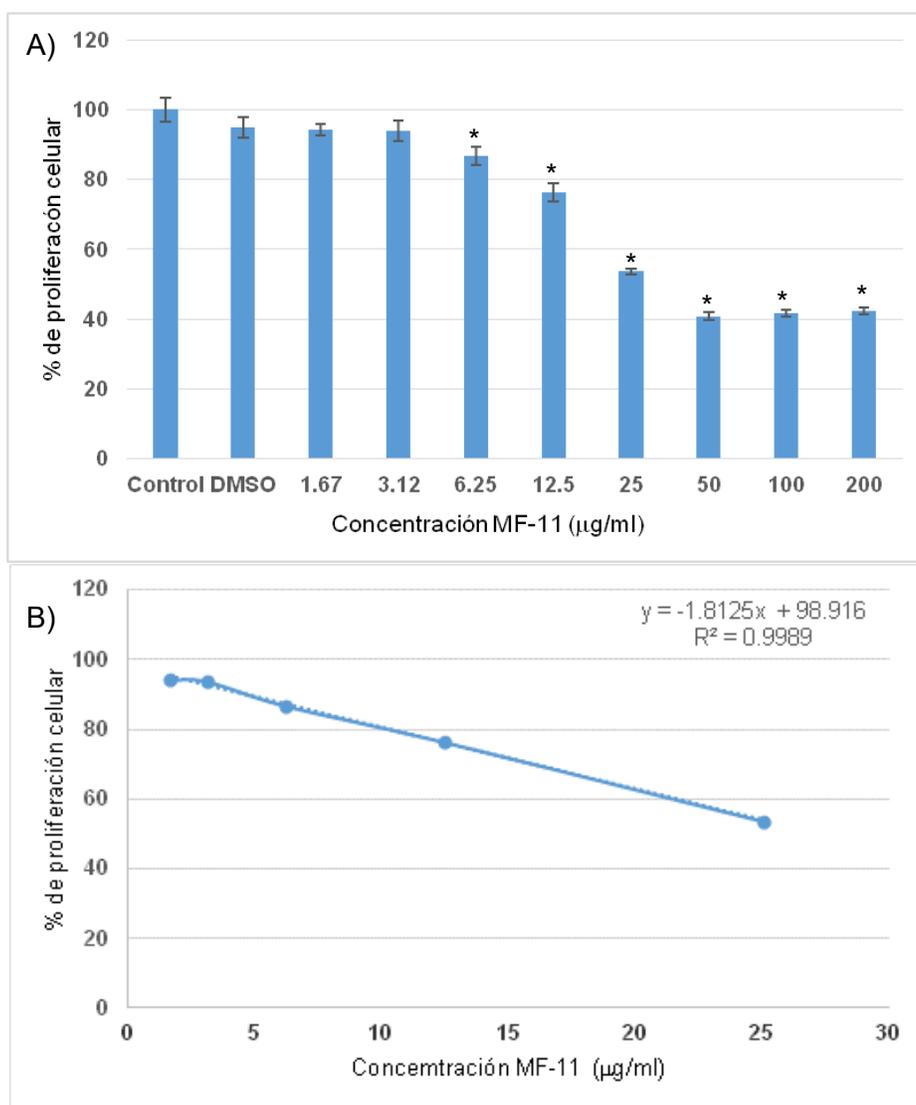


Figura 20. A) Actividad antiproliferativa del compuesto MF-11 sobre las línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. El número celular fue obtenido mediante la técnica de cristal violeta. Los datos fueron obtenidos de tres ensayos independientes, donde cada condición fue obtenida por el promedio de 6 repeticiones. Las barras representan la. B) La grafica muestra la linearización de la recta del análisis de regresión lineal. Prueba ANDEVA seguida de Tukey * diferencia significativa $p < 0.05$ vs Control.

	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
MF-10	20.47±0.25	32.27
MF-11	25.98±0.24	43.07

Cuadro 3. Valores calculados de las IC₅₀ de ambos compuestos MF-10 Y MF-11, expresadas en µg/ml y µM

Efecto Necrótico de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Después de evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos MF-10 y MF-11, los cultivos de la línea celular MDA-MB-231 fueron estimulados durante 24 horas con las concentraciones de ambos compuestos y se realizó la evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 21) (Cuadro 4) en el sobrenadante de los cultivos como indicador de la pérdida de integridad de la membrana celular, un evento característico en una muerte por necrosis. El análisis estadístico (ANDEVA) de los datos indicó que no hay diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que es posible asegurar que los compuestos MF-10 y MF-11 no producen una muerte de tipo necrótico sobre las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

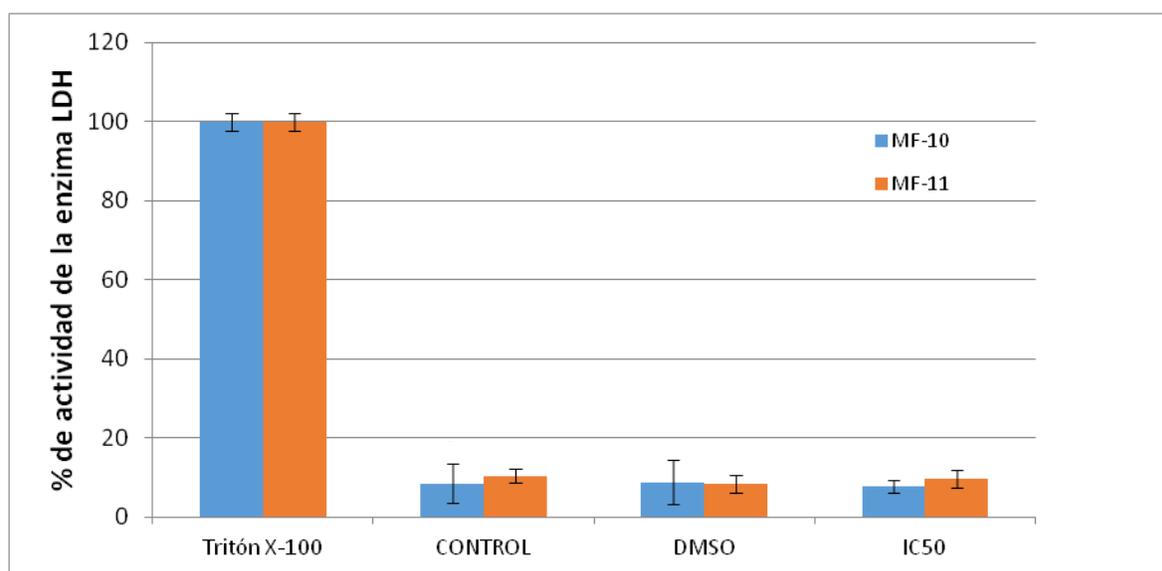


Figura 21. Evaluación de la actividad la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los cultivos celulares de la línea celular MDA-MB-231 estimulados con las concentraciones IC_{50} de los compuestos MF-10 y MF-11, expresada en porcentaje comparando con un control positivo de células lisadas con Tritón X-100. Resultados de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con una $p < 0.05$ muestra que no existen diferencia significativa entre los tratamientos.

	Tritón X-100	Control	DMSO	IC_{50}
MF-10	100±1.09	8.47±2.22	8.78±1.81	7.67±2.23
MF-11	100±1.09	10.34±4.98	8.44±5.55	9.59±1.58

Cuadro 4. Valores de la actividad la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los cultivos celulares de la línea celular MDA-MB-231 estimulados con Las concentraciones IC_{50} de los compuestos MF-10 y MF-11. Comparando con un control positivo de células lisadas con Tritón X-100

Evaluación de la morfología celular y la condensación de la cromatina

Obtenida la IC50 y determinando que los compuestos MF-10 y MF-11 no producen una muerte de tipo necrótico se evaluó la morfología celular y la condensación de la cromatina a través de la técnica de tinción con el fluorocromo DAPI. Para ello las imágenes se contrastaron con una población control a la cual solo se le cambio el medio de cultivo durante el estímulo, en las imágenes del contraste de fases (Figura 22A) podemos observar células con una morfología estrellada, prolongaciones citoplasmáticas bien definidas, núcleos grandes y adheridas a la placa de cultivo, adicionalmente observamos las imágenes teñidas con DAPI nos indican que la cromatina se encuentra laxa y sin ningún tipo de fragmentación (Figura 22E); el segundo control experimental muestra células que fueron estimuladas con la misma concentración de vehículo (DMSO) en el cual se disolvió el compuesto, lo que se observa son células con una morfología similar al control experimental tanto en el contraste de fases (Figura 22B) como en la tinción con DAPI (Figura 22F) descartando así algún efecto del vehículo sobre la morfología celular; el tercer tratamiento muestra un control positivo a apoptosis (Camptotecina) (Figura 22 C-G) en el que se observa una disminución en el número celular, contracción de las prolongaciones citoplasmáticas, las células pasan de tener una forma estrellada a una forma redondeada y pérdida de la adherencia; el último tratamiento muestra el efecto del compuesto MF-10 (Figura 22D), el cual se aprecia en la disminución del número celular, la contracción de las prolongaciones citoplasmáticas, la pérdida de la morfología estrellada por una redondeada y la pérdida de la adherencia, en la tinción con DAPI (Figura 22H) se observa compactación y fragmentación de la cromatina.

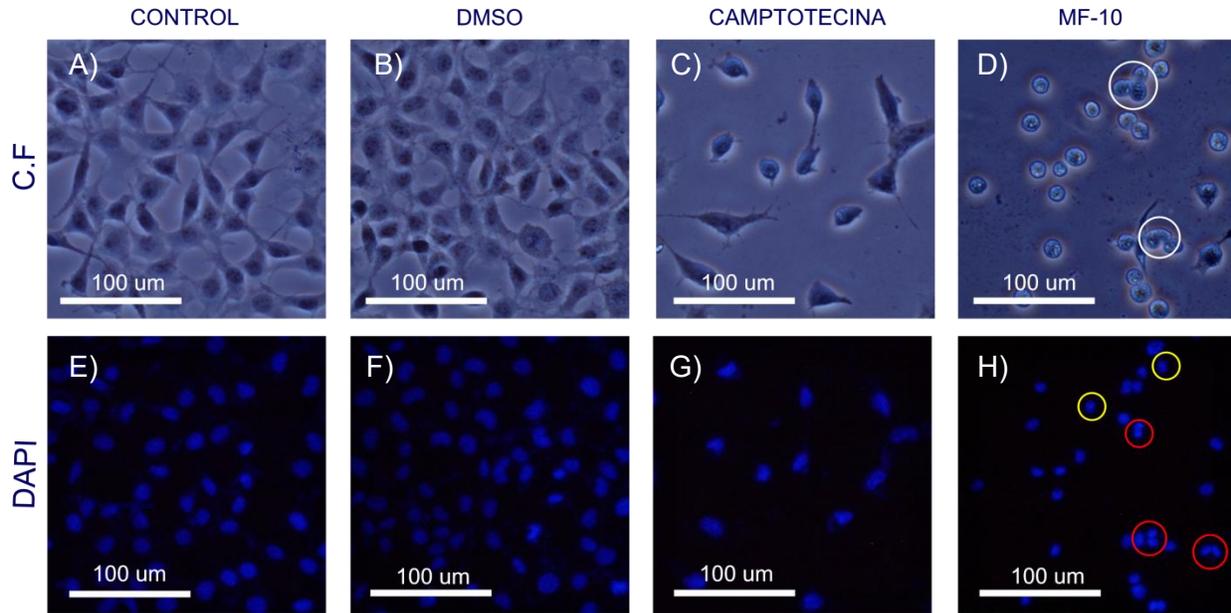


Figura 22. A-E) Contraste de fases y DAPI de control. B-F) contraste de fases y DAPI del efecto del vehículo (DMSO). C-G) Contraste de fases y DAPI del control positivo estimulado con camptotecina. D-H) Contraste de fases y DAPI del efecto de la concentración IC_{50} del compuesto MF-10. Resultados representativos de 3 ensayos independientes con 3 repeticiones por condición. Blanco muestra cuerpos apoptóticos; rojo muestra fragmentación nuclear; amarillo muestra condensación de la cromatina.

Para el compuesto MF-11 se utilizaron los mismos controles experimentales con las características antes descritas (Figura 23), en las imágenes de contraste de fases las células tratadas con el compuesto presentan una pérdida de la adherencia y de su morfología estreñada típica (Figura 23D), aunado a la presencia de cuerpos apoptóticos fragmentación nuclear y condensación de la cromatina (Figura 23H), características propias de la muerte por apoptosis.

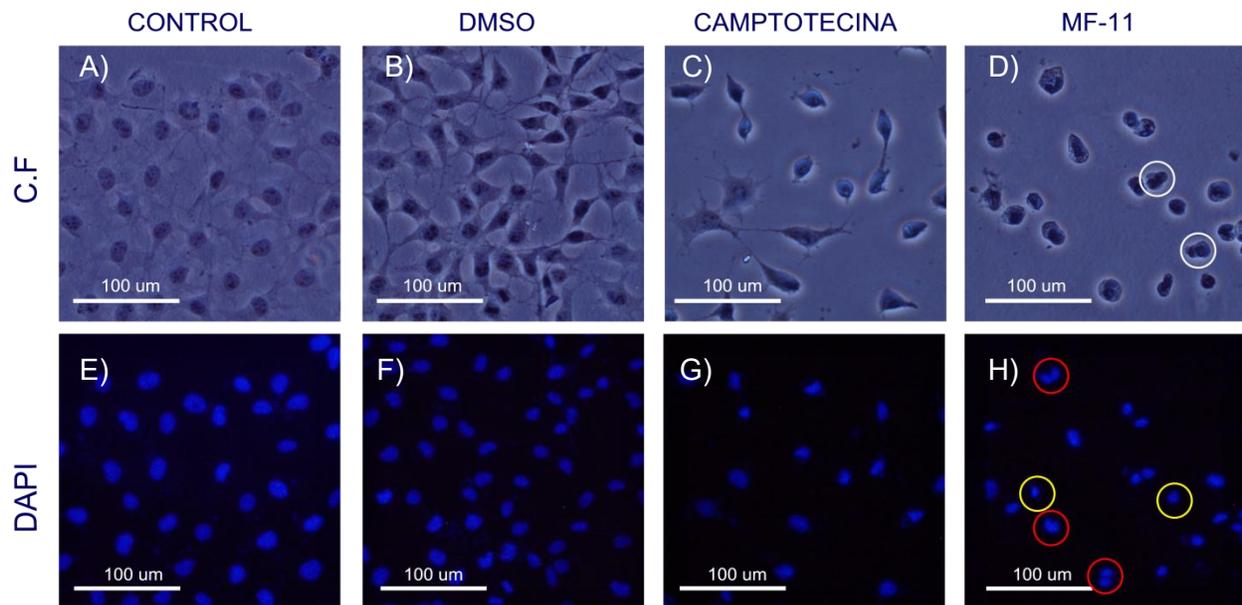


Figura 23. A-E) Contraste de fases y DAPI de control. B-F) contraste de fases y DAPI del efecto del vehículo (DMSO). C-G) Contraste de fases y DAPI del control positivo estimulado con camptotecina. D-H) Contraste de fases y DAPI del efecto de la concentración IC_{50} del compuesto MF-11. Resultados representativos de 3 ensayos independientes con 3 repeticiones por condición. Blanco muestra cuerpos apoptóticos; rojo muestra fragmentación nuclear; amarillo muestra condensación de la cromatina.

Evaluación de la activación de Caspasa-3

Los cambios en la morfología celular y la condensación de la cromatina, sugieren que las células están pasando por un proceso apoptótico, evidencia que es reforzada por la cuantificación de la activación de la caspasa-3 activa por medio de citometría de flujo (Figura 24) (Tabla 4). Para el control experimental se obtuvo un valor de 0.96 % del total de la población el cual no se considera significativo, para el vehículo se obtuvo un valor de 1.28% del total de la población el cual representa un valor muy cercano al control y por lo tanto, se descarta la idea de que el vehículo esté ejerciendo el efecto apoptótico. Para nuestro control positivo se utilizó camptotecina, un compuesto que ha reportado tener efecto apoptótico sobre este tipo de células y donde se observa un aumento del 61.81%, para el compuesto MF-10 un aumento en la presencia de la caspasa-3 activa del 21.01 % el cual resultó ser más elevado que el del MF-11 con un 17.01%. La expresión de caspasa confirma que los compuestos MF-10 y MF-11 poseen actividad apoptótica sobre las células de cáncer de mama MD-MB-231 y que ésta muerte está llevándose hasta las últimas fases de proceso (activación de caspasas ejecutoras).

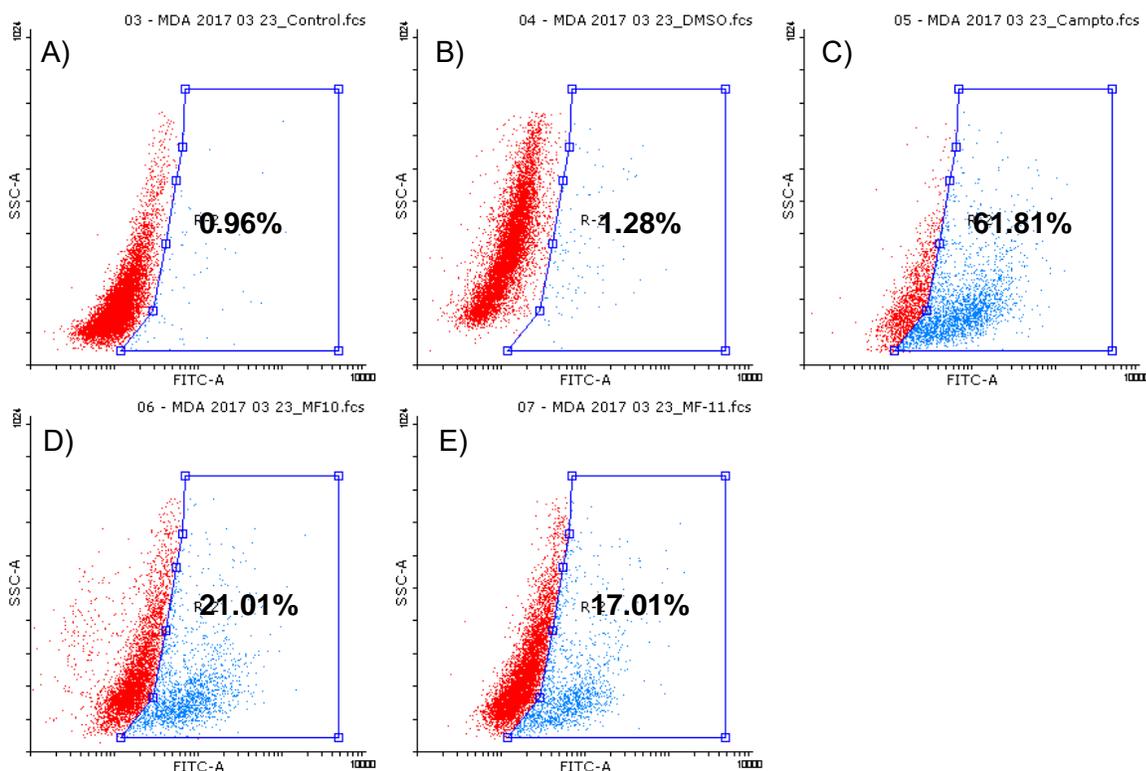


Figura 24. Evaluación de la activación de caspasa-3 en los cultivos celulares de cáncer de mama MDA-MB-233 estimulados con la concentración IC_{50} de los compuestos MF-10 y MF-11. A) Control; B) Vehículo (DMSO); C) Control positivos (Camptotecina); D) MF-10; E) MF-11. Resultados representativos de 3 ensayos independientes con 3 repeticiones por condición.

Evaluación del efecto en células linfocíticas de sangre periférica

La mayoría de los quimioterapéuticos tienen la desventaja de poseer nula o baja selectividad, por lo que se evaluaron las concentraciones IC₅₀ de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre la proliferación de células linfocíticas de sangre periférica humana, mediante el marcaje con carboxifluoresceína y su posterior lectura por citometría de flujo. Para comparar el efecto de los compuestos se utilizó un control el cual no se activó con fitohemaglutinina y en el cual las células no proliferaron (Figura 25A), posteriormente un control activado con fitohemaglutinina el cual se considerara el máximo de proliferación celular (Figura 25B), el tercer control es un control con el máximo volumen de vehículo utilizado (DMSO) el cual tiene un valor de proliferación similar a nuestro positivo de proliferación y descarta que el vehículo este afectando la proliferación celular (Figura 25C); del compuesto MF-10 se evaluó la concentración de 20 µg/ml (Figura 25D), el cual al ser comparados con el máximo valor de proliferación (+/+) y con el vehículo no hay efecto negativo sobre la proliferación (Tabla 5). El compuesto MF-11 también fue con la concentración IC₅₀ que corresponde a 25 µg/ml (Figura 25H) y comparado con el máximo de proliferación se observa una reducción de 6.28% y con un valor más elevado de 32.82% al ser comprados con el vehículo (Cuadro 5).

Tratamiento	% de proliferación	Comparación vs +/+		Comparación vs DMSO	
			Diferencia		Diferencia
01 +/-	2.45398773	5.4790	N/A	3.9271	N/A
02 +/+	44.78891821	100	N/A	71.6755	N/A
03 DMSO	62.48843663	100	N/A	100	N/A
04 MF-10 20 µg/ml	68.13987373	100	0%	100	0%
05 MF-11 25 µg/ml	41.97404372	93.7152	6.2847	67.1708	32.8291

Cuadro 5. Muestra los porcentajes de proliferación de células linfocíticas de sangre periférica humana, las cuales fueron estimuladas con los compuestos MF-10 y MF-11, además de su comparación con el máximo porcentaje de proliferación y el Vehículo (DMSO). Resultados de 3 ensayos independientes con 5 repeticiones por condición. +/- células sin fitohemaglutinina y marcadas con carboxifluoresceína +/+ células marcadas con carboxifluoresceína y con fitohemaglutinina.

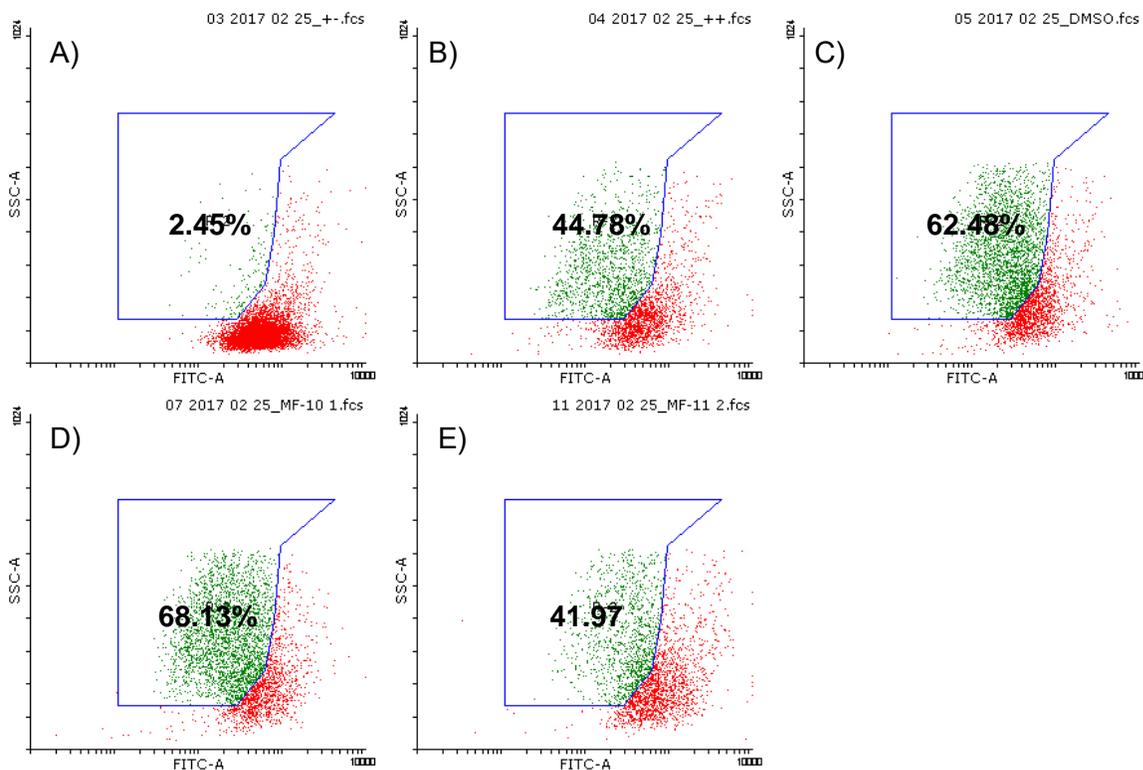


Figura 25. Evaluación de la proliferación celular en cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana estimuladas con la IC_{50} de los compuestos MF -10 (20 $\mu\text{g/ml}$) y MF-11(25 $\mu\text{g/ml}$). A) -/+; B) +/+; C) Vehículo (DMSO); D) MF-10;E) MF-11. Resultados de 3 ensayos independientes con 5 repeticiones por condición. -/+ células marcadas con carboxifluoresceína y sin activar con fitohemaglutinina; +/+ células marcadas con carboxifluoresceína y activadas con fitohemaglutinina

Efecto Necrótico de los compuestos MF-10 y MF-11 sobre células linfocíticas de sangre periférica humana

Determinando que las concentraciones más altas de los compuestos MF-10 y MF-11 afectan la proliferación de los linfocitos de sangre periférica humana, se evaluó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 26) (Cuadro 6) en el sobrenadante de los cultivos como indicador de la pérdida de integridad de la membrana celular, un evento característico en una muerte por necrosis. El análisis estadístico (ANDEVA) de los datos indicó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con la concentración por lo que es posible asegurar que los compuestos MF-10 y MF-11 no producen una muerte de tipo necrótico sobre las células linfocíticas.

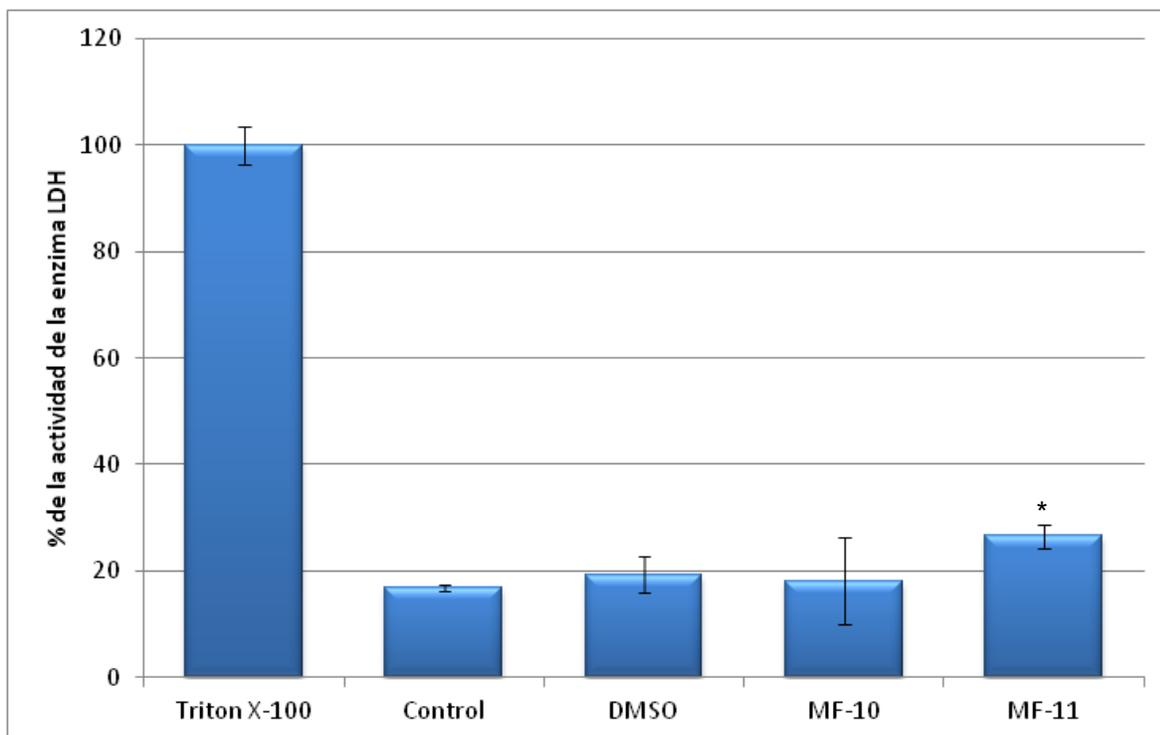


Figura 26. Evaluación de la actividad la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los cultivos celulares de células linfocíticas de sangre periférica humana estimulados los compuestos MF -10 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y MF-11 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), expresada en porcentaje comparando con un control positivo de células lisadas con Tritón X-100. Resultados de 3 ensayos independientes con 5 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA seguida de Tukey con una * $p < 0.5$ vs DMSO

Tratamiento	% de liberación de LDH
Tritón X-100	100 \pm 3.53
Control	16.86 \pm 0.66
DMSO	19.29 \pm 5.80
MF-10 (20 mg/ml)	18.15 \pm 8.05
MF-11 (25 mg/ml)	26.51 \pm 2.34

Tabla 6. Valores de la actividad la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana estimulados la IC_{50} de los compuestos MF -10 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y MF-11(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Comparando con un control positivo de células lisadas con Tritón X-100

Discusión de resultados

Para el análisis de datos se recopilaron algunos datos no publicados dentro de nuestro grupo de trabajo de los compuestos Dioscina, Diosgenina Y Diosgenina-3-glu tres compuestos que comparten la misma parte aglicona que los compuesto MF-10 y MF-11 para comprarlos con los datos obtenidos en el presente trabajo

Actualmente, las principales terapias contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, las cuales hasta la fecha, no han sido exitosas en la eliminación total de la enfermedad, además de ser ineficientes en estadios avanzados. Por otro lado, estos tratamientos ocasionan efectos secundarios que afectan la calidad de vida de los pacientes. Por ello, la investigación de nuevas moléculas con actividad antitumoral, ha generado gran cantidad de información, sin embargo, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos tratamientos inspirados en la química medicinal y la generación de nuevos fármacos, especialmente de aquellos de origen natural¹⁰¹.

Candidatos a nuevas opciones terapéuticas son las saponinas, un grupo de compuestos de origen natural a los que se les atribuyen diversas actividades biológicas como: expectorante, antiagregario plaquetario, hemolítica, insecticida, antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, antiparasitaria y antioxidante^{70,102}.

En particular, la Diosgenina ha reportado tener actividad antitumoral en distintos tipos de cáncer como cáncer de mama, cáncer colorrectal, osteosarcoma y leucemia¹⁰³, también se sabe que modificaciones en el número, tipo y posición de los restos glicosilados sobre los anillos de las saponinas influye en las respuestas biológicas, especialmente la actividad antitumoral⁶⁵. A partir de esto, inicia la obtención de derivados de la Diosgenina con distintos restos glicosilados, como la Diosgenina-3-glu, el MF-10 y el MF-11 compuestos de reciente síntesis, los cuales, solo han sido evaluados en líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa CaSKI y ViBo)¹⁰⁰.

El presente trabajo evalúa los compuestos MF-10 y MF-11, los cuales poseen actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama MDA-MB-231 cuyos valores son 20.47 $\mu\text{g/ml}$ y 24.98 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Cuadro 3), a estos compuestos se les agregó glucosaminas y modificaciones puntuales sobre la misma con la intención de potenciar su actividad antiproliferativa, por lo tanto al comparar las IC_{50} de ambos compuestos con la IC_{50} de la diosgenina reportada en 7.4 $\mu\text{g/ml}$ observamos que se necesita más cantidad de compuesto

para obtener el mismo efecto por lo que las modificaciones estructurales no mejoran la actividad antiproliferativa de la Diosgenina, no obstante, el cambio de glucosa en la Diosgenina-3-glu (25.66 $\mu\text{g/ml}$) por glucosamina el MF-10 mejora la actividad antitumoral y el MF-11 aunque requiere menos compuesto para lograr el mismo efecto la diferencia es mínima, por otro lado, la adición de un grupo acetilo a la glucosamina tiene mejores resultados que la adición de un cloro en la misma, mejorando la actividad del MF-10 en mayor medida que la del MF-11.

En los últimos años distintos autores han descrito la actividad antiproliferativa de numerosas moléculas de origen natural y/o derivados de las mismas, de estos reportes solo algunos aportan información del tipo de muerte o mecanismo bioquímico que explique el decaimiento de la población celular. Esta información es imprescindible, debido a que los principales quimioterapéuticos presentan alta actividad necrótica, generando múltiples efectos secundarios como náuseas, vómito, lesiones en la boca y dolor. Por otro lado, se ha reportado que la Dioscina produce una muerte de tipo apoptótico en células de cáncer gástrico¹⁰⁴, glioblastoma¹⁰⁵, cáncer de pulmón⁷⁵, cáncer de colon⁸¹, cáncer de cérvix¹⁰⁶, cáncer de hígado¹⁰⁷ y cáncer de mama¹⁰⁹ la diosgenina ha reportado ejercer su efecto sobre distintos tipos de cáncer a través de la activación de p53 y caspasa-3, inhibidor de nF-kB y liberador de Ca^{+2} . Con el fin de explicar el efecto antiproliferativo de los compuestos MF-10 y MF-11 en el presente trabajo se evaluaron dos tipos de muertes que se diferencian por sus marcadas diferencias bioquímicas y morfológicas; necrosis y apoptosis.

Primero, se evaluó la muerte de tipo necrótico, a través de la actividad de la enzima LDH como indicador de la pérdida de la integridad de la membrana celular, una característica distintiva de este tipo de muerte, la prueba ANDEVA indica que no existe diferencia entre los tratamientos (control, vehículo, IC50) por lo que es posible afirmar que los compuestos MF-10 y MF-11 no ocasionan una muerte de tipo necrótico sobre las células de la línea MDA-MB-231. No existen estudios de la Diosgenina-3-glu en donde se evaluó necrosis en cáncer de mama, sin embargo dentro de nuestro grupo de trabajo se evaluó su efecto sobre células de cáncer cérvico uterino (HeLa, CasKi, ViBo) la concentración más alta reportada en estas líneas (24.85 mg/ml) no produce un efecto necrótico, por otro lado, se reporta que la diosgenina en células de cáncer de mama MDA-MB-231 con una concentración de 7.4 mg/ml tampoco produce un efecto necrótico en las mismas. Aunque la IC_{50} de los compuestos MF-10 y MF-11 son más elevadas de que la Diosgenina, éstos conservan la baja actividad necrótica, proponiéndolos como candidatos a

otro tipo de estudios, ya que podrían estar generando en menor grado los efectos secundarios de los quimioterapéuticos actuales.

Debido a que la actividad necrótica no es suficiente para explicar el decaimiento de la población se evaluó morfológicamente el efecto de los compuestos MF-10 y MF-11 observando una reducción en el número celular, pérdida de la adherencia y el cambio en la morfología estrellada de las células por una redondeada en donde no se observan las prolongaciones citoplasmáticas, los núcleos se observan de menor tamaño y se identificaron estructuras semejantes a cuerpos apoptóticos, que posteriormente fueron confirmados a través de la tinción con el fluorocromo DAPI, técnica que también nos indicó que las células estaban atravesando un proceso de compactación y fragmentación de la cromatina. En ambos compuestos se observaron las mismas características. Dichas características son propias de una muerte de tipo apoptótico, sin embargo, una prueba cualitativa resulta insuficiente para tal afirmación, por lo que la información fue corroborada a través de la cuantificación la caspasa-3-activa por citometría de flujo, una caspasa ejecutora cuya concentración aumenta en las últimas etapas del proceso apoptótico y que es un punto de convergencia entre ambas vías de activación de la apoptosis. En las células tratadas durante 24 horas con la concentración IC_{50} del compuesto MF-10 se observó un aumento del 21.01 % mientras que para el MF-11 fue de 17.01%. Ambas pruebas resultan suficientes para afirmar que los compuestos MF-10 y MF-11 inducen una muerte apoptótica sobre las células de cáncer de mama MDA-MB-231. Además éste proceso se encuentra en una etapa considerada como punto de no retorno ocasionando cambios las características morfológicas de las células y en la cromatina. La actividad apoptótica es la mejor que se ve beneficiada por las modificaciones estructurales de los compuestos MF-10 y MF-11, que, comparados con la diosgenina, cualitativamente se observan más cambios morfológicos dentro de los cultivos celulares y que al cuantificar la activación de caspasa-3 la diosgenina tiene un aumento de 4.35, que representa aproximadamente una quinta parte del aumento del MF-10 y una cuarta parte del MF-11, lo que sugiere que la adición de una glucosamina en esta molécula mejora la actividad apoptótica. Otro punto a favor es que si evaluamos la caspasa-3 a distintos tiempos es probable que el proceso apoptótico inicie y/o concluya en menor tiempo en células tratadas con los compuestos MF-10 y MF-11, no existen datos suficientes para comparar la actividad apoptótica de los compuestos con la Diosgenina-3-glu y observar la respuesta de estos compuestos por la modificación en el tipo de azúcar. Finalmente, las células cancerígenas se caracterizan por tener altas tasas de proliferación y los quimioterapéuticos actuales hacen uso de esta característica concentrándose en eliminar las

células cancerígenas mediante la inhibición de alguno de los mecanismos implicados en la división celular, pero, existen otros tipos celulares que normalmente poseen altas tasas de división como las células de los epitelios, de las mucosas y del sistema inmune. A partir de este hecho surge el mayor problema de las terapias contra el cáncer, la baja o nula selectividad que estas presentan y surge la necesidad de búsqueda de nuevos tratamientos que aunque no erradiquen totalmente la enfermedad presente selectividad, evitando los efectos secundarios y así mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por otro lado, se sabe que las glucosaminas es un importante metabolito implicado en diversos procesos, precursor de glicolípidos y glicoproteínas, regulador en el transporte de glucosa, en el reconocimiento de moléculas y posee propiedades inmunomoduladoras^{110,111}. Cuando se probó la bioactividad a concentraciones no tóxicas, los derivados de la D-glucosamina resultaron ser inhibidores más efectivos de la liberación de IL-2 en linfocitos T activados con fitohemaglutinina que la D-glucosamina¹¹⁰. Los compuestos MF-10 y MF-11 presentan en el carbono 3 de la parte aglicona, glucosaminas unidas a un grupo acetato y un átomo de cloro respectivamente. Con el fin de evaluar el efecto sobre células sanas, las concentraciones y fueron evaluadas durante 72 horas en células linfocíticas de sangre periférica activadas con fitohemaglutinina por citometría de flujo mediante el marcaje con carboxifluoresceína, los datos indicaron que esas concentraciones el porcentaje de proliferación no se ve afectado con el MF-10 y se ve reducido en 32.83% con el MF-11, considerando que en células tumorales a las 24 horas de estímulo se observa una reducción del 50% de la población y a las 72 horas las células linfocíticas reducen su porcentaje de proliferación en un porcentaje nulo con el MF-10 y un porcentaje menor del 50% con el MF-11 podemos afirmar que los compuestos presentan selectividad en este tipo de celular y podría estar ejerciendo este mismo fenómeno en otros linajes celulares. Para reforzar esta información se analizó la actividad de la enzima LDH como parámetro de muerte necrótica, confirmando a través de un análisis estadístico (ANDEVA) que los compuestos MF-10 no ocasionan muerte de tipo necrótico en células de sangre periférica humana, sin embargo el compuesto MF-11 ocasiona un porcentaje mínimo de muerte por necrosis lo que podría estar explicando la reducción en la proliferación de células linfocíticas.

Conclusiones

- Los compuestos MF-10 y MF-11 afectan el potencial proliferativo de las células de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 de manera dosis-dependiente con IC_{50} de 20.47 $\mu\text{g/ml}$ y 25.98 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
- Las IC_{50} de los compuestos MF-10 y MF-11 no presenta un efecto necrótico sobre las células de cáncer de mama de la línea MDA-MB-231.
- Las IC_{50} de los compuestos MF-10 y MF-11 ocasionan un cambio en la morfología celular, fragmentación y condensación de la cromatina además de la activación de caspasas-3, por lo que podemos afirmar que los compuestos MF-10 y MF-11 inducen un proceso de muerte por apoptosis en células de la línea MDA-MB-231.
- La IC_{50} del compuesto MF-10 no afecta el potencial de proliferación de células de sangre periférica humana, sin embargo La IC_{50} del compuesto MF-11 afecta la proliferación en un 32.83%.
- La IC_{50} del compuesto MF-10 no presenta un efecto necrótico sobre células de sangre periférica humana, sin embargo La IC_{50} del compuesto MF-11 presenta un porcentaje de muerte necrótica de 9.65%.
- Las modificaciones estructurales de las moléculas conservan las características antiproliferativa, apoptótica y selectiva de la Diosgenina y la Diosgenina-3-glu en células de cáncer de mama, potenciando la actividad apoptótica de la Diosgenina y la antiproliferativa de la Diosgenina-3-glu.

Referencias

1. Mazzarello P. La historia de la teoría celular, un concepto unificador. *Elementos*. 2000;38:3-7.
2. Schultz M. Rudolph Virchow (1821–1902). *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(9):1479-81.
3. Hickman CP, Roberts LS, Parson A. *Principios Integrales de Zoología*. 10°. España: McGraw Hill; 2000. 936 p.
4. Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. United States of America: Garland Science; 2008. 1601 p.
5. Jiménez LF, Merchant H. *Biología celular y molecular*. 1°. México: Pearson Educación; 2003. 912 p.
6. López R. La regulación del ciclo celular y cáncer. *Revista especializada en ciencias de la salud*. 2013;6(1):40-4.
7. Lomanto LD, Ortiz ÓL, Bretón CO, Gómez Ál, Mesa VM. El ciclo celular. *MedUNAB*. 2010;6(16):21-9.
8. Reclin B, Van der Laan S, Tsanov N, Maiorano D. Molecular Mechanisms of DNA Replication Checkpoint Activation. *Genes*. 2014;5(1):147-75.
9. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells*. 2001;19(1):88-91.
10. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell*. 4.^a ed. United States of America: Sinauer Associates; 2007. 848 p.
11. Peralta O, Bahena M, Díaz CE, Madrid V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cancer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México*. 1997;39(5):451-62.
12. Cheng T. Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene*. 2004;23(43):7256-66.
13. Hernández M, Ríos MA. Oncogenes y cáncer. *Revista cubana oncología*. 1999;15(2):131-9.
14. Ríos MA, Hernández M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Revista cubana oncología*. 2001;17(1):65-71.
15. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect*. 1999;107 Suppl 1:5-24.
16. DeToro G. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2006.

17. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16(1):3-11.
18. Pérez J, Lie AE. Apoptosis, mecanismo de acción. *Revista de Ciencias Médicas La Habana*. 2012;18(2):138-53.
19. Li S, Wang L, Hu Y, Sheng R. Autophagy regulators as potential cancer therapeutic agents: a review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015;15(8):720-44.
20. McCall K, Klein C. *Necrosis - Methods and Protocols*. 1st ed. United States of America: Humana Press; 253 p.
21. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013;1833(12):3471-80.
22. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23(16):2825-37.
23. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013;1833(12):3481-98.
24. Conforti L, Gilley J, Coleman MP. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(6):394-409.
25. Lee D, Kim IY, Saha S, Choi KS. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016;162:120-33.
26. Fernandez T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*. 2007;14(9):1590-604.
27. Kazzaz NM, Sule G, Knight JS. Intercellular Interactions as Regulators of NETosis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2016 [citado 10 de septiembre de 2017];7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5107827/>
28. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(5):378-90.
29. Elinos CM, Maldonado V, Meléndez J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*. 2003;139(5):493-9.
30. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4): 495-516.
31. Navas M, Alfonso LE, Guerra I. Apoptosis Muerte celular programada. Aspectos generales y su relación con las enfermedades cardiovasculares. *Revista de Enfermedades Cardiovasculares*. 2009;1(2):1-9.

32. Cell Signaling Technology (CST) [Internet]. [citado 10 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.cellsignal.com/>
33. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007;32(1):37-43.
34. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2002;31(4):214-23.
35. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 2005;73(4):1907-16.
36. Sanchez L, Diosdado F. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México*. 2003;41(1):49-62.
37. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(2):135-47.
38. Wallach D, Kang T-B, Dillon CP, Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science*. 2016;352(6281):51-61.
39. OMS | Cáncer [Internet]. OMS. [citado 10 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
40. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
41. Arvelo F, Poupon MF. Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Científica Venezolana*. 2001;52:304-12.
42. F. Soimout. Neoplasias. Definiciones. Nomenclatura. *Eusalud*. 2007;139-46.
43. OMS. GLOBOCAN [Internet]. 2012 [citado 10 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
44. Brandan ME, Villaseñor Y. Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología*. 2006;1:147-62.
45. Reynoso N, Meneses A, Erazo A, Escudero P, Kuri PA, Mohar A. Challenges in the development and implementation of the National Comprehensive Cancer Control Program in Mexico. *Salud Publica De Mexico*. 2016;58(2):325-33.
46. Secretaria de Salud. Programa de acción específico: Prevención y control del cáncer de la mujer 2013 -2018. Mexico: Programa Sectoral de Salud; 98 p.
47. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) [Internet]. 2015 [citado 10 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=274>

48. Pérez SE, Sandoval L, Tapia H. Factores de riesgo para cáncer de mama. Revisión de la literatura: Rol potencial de Enfermería. *Enfermería Universitaria*. 2012;6(3).
49. Asociación Española Contra el Cáncer [Internet]. 2014 [citado 10 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.aecc.es/Paginas/PaginaPrincipal.aspx>
50. Breastcancer.org - Breast Cancer Information and Awareness [Internet]. Breastcancer.org. [citado 10 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.breastcancer.org/>
51. Matsen CB, Neumayer LA. Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA Surgery*. 2013;148(10):971-9.
52. Torres G, Marie F, Ortega C, Magaña L, Uscanga SR, Lazcano E. Detección temprana y manejo integral del cáncer de mama: manual para personal de medicina y enfermería en el primer nivel de atención. México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2011. 116 p.
53. Lara MDC, Olmedo Á. Detección temprana y diagnóstico del cáncer mamario. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2011;54(001):4-17.
54. Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Gamboa V, et al. Oncoguía. *Cancerología*. 2011;6:77-86.
55. Pérez VM, Vela TA, Mora A. Diagnóstico histopatológico y factores pronóstico en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Cancerología*. 2008;6:7-17.
56. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*. 2015;5(10):2929-43.
57. Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014;10(3):506-11.
58. Loraine S, Mendoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010;41(4):18-27.
59. León A, Barriga C, Bravo E, Camacho J, Camus M, Haffens M, et al. Cáncer de mama Etapas I y II: Cirugía. II Jornada Chilena de consenso en cáncer de mama. 2003;71-7.
60. Secretaria de Salud S de. Guía Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento del cáncer de Mama en el segundo y tercer nivel de atención. Mexico; 2009. 102 p.
61. Herruzo I. Tratamiento hormonal del cáncer de mama. *Oncología*. 2004;27:47-54.
62. Avendaño C. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2011;77(1).
63. Gutiérrez A, Estévez A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s.XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2009;103(2):409-20.

64. Vega E, Velasco R, Jiménez LF. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica*. 2006;31(3):97-111.
65. Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L, Liu C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*. 2010;81(7):703-14.
66. Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 2007;68(3):275-97.
67. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2010;9(3):425-74.
68. Das TK, Banerjee D, Chakraborty D, Pakhira MC, Shrivastava B, Kuhad RC. Saponin: Role in Animal system. *Veterinary World*. 2012;5(4):248-54.
69. Munafo JP, Gianfagna TJ. Chemistry and biological activity of steroidal glycosides from the *Lilium* genus. *Natural Product Reports*. 2015;32(3):454-77.
70. Escobar ML, Sánchez L, Sandoval J. Steroidal Saponins and Cell Death in Cancer. En: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. InTech; 2015.
71. Güçlü O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(3):231-58.
72. Xu XH, Li T, Fong CMV, Chen X, Chen XJ, Wang YT, et al. Saponins from Chinese Medicines as Anticancer Agents. *Molecules*. 2016;21(10).
73. Liu MJ, Wang Z, Ju Y, Zhou J, Wang Y, Wong RNS. The mitotic-arresting and apoptosis-inducing effects of diosgenyl saponins on human leukemia cell lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(7):1059-65.
74. Wang Z, Zhou J, Ju Y, Zhang H, Liu M, Li X. Effects of two saponins extracted from the *polygonatum Zanlanscianense* pamp on the human leukemia (HL-60) cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2001;24(2):159-62.
75. Hsieh MJ, Tsai TL, Hsieh YS, Wang CJ, Chiou H-L. Dioscin-induced autophagy mitigates cell apoptosis through modulation of PI3K/Akt and ERK and JNK signaling pathways in human lung cancer cell lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2013;87(11):1927-37.
76. Wei Y, Xu Y, Han X, Qi Y, Xu L, Xu Y, et al. 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*. 2013;59:118-28.
77. He X, Qiao A, Wang X, Liu B, Jiang M, Su L, et al. Structural identification of methyl protodioscin metabolites in rats' urine and their antiproliferative activities against human tumor cell lines. *Steroids*. 2006;71(9):828-33.

78. Wang Z, Cheng Y, Wang N, Wang DM, Li YW, Han F, et al. Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins. *Cancer Biology & Therapy*. 2012;13(3):138-47.
79. Gao LL, Li F-R, Jiao P, Yang MF, Zhou XJ, Si Y-H, et al. Paris chinensis dioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2011;17(39):4389-95.
80. Hu M, Xu L, Yin L, Qi Y, Li H, Xu Y, et al. Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways. *Journal of applied toxicology*. 2013;33(8):712-22.
81. Chen H, Xu L, Yin L, Xu Y, Han X, Qi Y, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of dioscin on human HCT-116 colon cancer cells. *Proteomics*. 2014;14(1):51-73.
82. Cai J, Liu M, Wang Z, Ju Y. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002;25(2):193-6.
83. Gao LL, Li FR, Jiao P, Yao ST, Sang H, Si YH. Apoptosis of human ovarian cancer cells induced by Paris chinensis dioscin via a Ca(2+)-mediated mitochondrion pathway. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2011;12(5):1361-6.
84. Chen J, Li H, Zhang X, Xiong C, Ruan J. Dioscin-induced apoptosis of human LNCaP prostate carcinoma cells through activation of caspase-3 and modulation of Bcl-2 protein family. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2014;34(1):125-30.
85. Kim EA, Jang JH, Lee YH, Sung EG, Song IH, Kim JY, et al. Dioscin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*. 2014;19(7):1165-75.
86. Jesus M, Martins APJ, Gallardo E, Silvestre S. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2016;4156293.
87. Chen PS, Shih YW, Huang HC, Cheng HW. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e20164.
88. Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Letters*. 2011;301(2):193-202.
89. Léger DY, Liagre B, Cardot PJP, Beneytout J-L, Battu S. Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Analytical Biochemistry*. 2004;335(2):267-78.

90. Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, MaitiChoudhury S, et al. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e46641.
91. Selim S, Al Jaouni S. Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15(1):301.
92. Kim DS, Jeon BK, Lee YE, Woo WH, Mun YJ. Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:1-8.
93. Li Y, Wang X, Cheng S, Du J, Deng Z, Zhang Y, et al. Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*. 2015;33(2):693-8.
94. Mao ZJ, Tang QJ, Zhang CA, Qin ZF, Pang B, Wei PK, et al. Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 α shRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(5):6521-33.
95. Mohammad RY, Somayyeh G, Gholamreza H, Majid M, Yousef R. Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2013;14(11):6945-8.
96. Sung B, Prasad S, Yadav VR, Aggarwal BB. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. *Nutrition and Cancer*. 2012;64(2):173-97.
97. Ghosh S, More P, Derle A, Kitture R, Kale T, Gorain M, et al. Diosgenin Functionalized Iron Oxide Nanoparticles as Novel Nanomaterial Against Breast Cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015;15(12):9464-72.
98. Trouillas P, Corbière C, Liagre B, Duroux J-L, Beneytout J-L. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005;13(4):1141-9.
99. Martínez SI. Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina-3-glu en líneas de cancer cervico uterino: HeLa, CaSki y ViBo [Tesis].UNAM; 2013 [citado 12 de septiembre de 2017].
100. Fernández MA, López H, Hernández JMV, Sánchez L, Escobar ML, Pinto BM, et al. Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates. *Eur J Med Chem*. 2012;54:721-7.

101. Sánchez L, Hernández MG, Escobar ML, López H, Zenteno E, Fernández MA, et al. Antiproliferative, Cytotoxic, and Apoptotic Activity of Steroidal Oximes in Cervicouterine Cell Lines. *Molecules*. 2016;21(11).
102. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;49(6):439-62.
103. Li F, Fernandez PP, Rajendran P, Hui KM, Sethi G. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*. 2010;292(2):197-207.
104. Zhao X, Xu L, Zheng L, Yin L, Qi Y, Han X, et al. Potent effects of dioscin against gastric cancer in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 2016;23(3):274-82.
105. Lv L, Zheng L, Dong D, Xu L, Yin L, Xu Y, et al. Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: a potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;59:657-69.
106. Zhao X, Tao X, Xu L, Yin L, Qi Y, Xu Y, et al. Dioscin Induces Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa and SiHa Cells through ROS-Mediated DNA Damage and the Mitochondrial Signaling Pathway. *Molecules*. 2016;21(6).
107. Li Y, Wang X, Cheng S, Du J, Deng Z, Zhang Y, et al. Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*. 2015;33(2):693-8.
108. Kim E-A, Jang J-H, Lee Y-H, Sung E-G, Song I-H, Kim J-Y, et al. Dioscin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis*. 2014;19(7):1165-75.
109. Zhu A, Huang J-B, Clark A, Romero R, Petty HR. 2,5-Deoxyfructosazine, a D-glucosamine derivative, inhibits T-cell interleukin-2 production better than D-glucosamine. *Carbohydrate Research*. 2007;342(18):2745-9.
110. Yan Y, Wanshun L, Baoqin H, Changhong W, Chenwei F, Bing L, et al. The antioxidative and immunostimulating properties of D-glucosamine. *International Immunopharmacology*. 2007;7(1):29-35.

Anexo I: Medicamentos indicados en el tratamiento de cáncer de mama

Principio Activo	Dosis recomendada	Tiempo (periodo de uso)	Efectos adversos
5Fluorouracilo	500 a 600 mg/m^2sc i.v.	c/21 días	Mucositis, náusea, vómito, diarrea, conjuntivitis, mielosupresión, alopecia, hiperpigmentación de piel y uñas, síndrome de mano-pie, crisis de angina, euforia, depresión. Teratógeno.
Ciclofosfamida	100 mg/m^2sc día v.o. 500 a 600 mg/m^2 día 1 i.v.	Diario por 10 días c/21 días	Mucositis, náusea, vómito, cistitis hemorrágica, alopecia, mielosupresión, SIADH, hiperuricemia, fibrosis pulmonar, segunda neoplasia. Teratógeno.
Epirubicina	75 a 100 mg/m^2sc día 1 i.v.	c/21 días	Mielosupresión, Mucositis, náusea, vómito, miocardiopatía, arritmias, tromboflebitis, alopecia, vesicación, segunda neoplasia, fatiga, amenorrea, fiebre. Genotóxico.
Paditaxel	80 a 90 mg/m^2sc semanal 175 mg/m^2sc día 1 i.v.	Semanal x 12 c/21 días	Mielosupresión, hipersensibilidad, hipotensión, Mucositis, náusea, vómito, diarrea, artralgias, mialgias, neuropatía periférica. Genotóxico.
Docetaxel	75 a 100 mg/m^2sc día 1 i.v.	c/21 días	Mucositis, conjuntivitis, mielosupresión, fiebre, hipersensibilidad, alopecia, edemas, parestesias, cambios en la piel, mialgias artralgias, alteraciones neurosensoriales.
Figrastim	5 a 10 ug/kg día 1 x 5 días. s.c.	5 días	Hipersensibilidad, cefalea, fiebre.
Metotrexato	40 a 60 mg/m^2sc día 1 i.v.	Casa 8 días con descanso de 2 semanas	Mielosupresión, Mucositis, náusea, vómito, diarrea, hiperuricemia. Teratógeno.
Trastuzumab	4 mg/kg dosis de carga i.v. 2 mg/kg mantenimiento i.v. semanal	1 vez 52 semanas	Vasodilatación, hipotensión, disfunción cardiaca, rash, náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, fatiga, mialgias, artralgias, cefalalgia, disnea.
Carboplatino	AUC 6 i.v.	Cada 21 a 28 días	Mielosupresión, náusea, vómito, insuficiencia renal, parestesias.
Doxorubicina liposomal pegilada	40 a 50 mg/m^2sc día 1 i.v.	Cada 28 días	Eritrodisestesia palmoplantar, fatiga, fiebre, mialgias, constipación, parestesias, neuropatía, Mucositis, segundas leucemias, hipersensibilidad, mielosupresión.
Capecitabina	2 g/día v.o. dividida en 2 dosis por 14 días y 7 descansa	c/21 días	Síndrome mano-pie, dermatitis, Mucositis, náusea, vómito, diarrea, anorexia, dolor abdominal, anemia, fatiga. Teratógeno.
Vinorelbina	60 mg/m^2sc día 1, 8 y 15. 8 mg/m^2sc día 1 y 8.	c/28 días c/21 días	Náusea, vómito, constipación, anorexia diarrea, Mucositis, leucopenia, aumento de bilirrubina y transaminasas, vesicante, neuropatía periférica, fatiga, fiebre, dolor del tumor. Embriotóxica.
Gemcitabina	800 a 1000	c/28 días	Mielosupresión, Rash, diarrea, náusea, vómito,

	<i>mg/m²sc</i> días 1, 8, 15 i.v. 1200 <i>mg/m²sc</i> días 1 y 8.	c/21 días	elevación de bilirrubina y transaminasas, proteinuria, hematuria, edema, fiebre, síndrome flue-like. Embriotóxico.
Tamoxifeno	20 mg al día v.o.	2 a 5 años	Bochornos, tromboembolismo, cefalea, depresión, náusea, vómito, resequedad vulvar y vaginal, cáncer de endometrio, sarcoma uterino, retinopatía, cataratas, mielosupresión. Genotóxico.
Anastrozol	1 mg v.o. al die	3 a 5 años	Insomnio, cefalea, rash, bochornos, náusea, constipación, vómito, diarrea, fatiga, sequedad vaginal, lipidemia, mioartralgias, disnea, tos. Embriotóxico.
Letrozol	2.5 mg al día v.o.	3 a 5 años	Edema periférico, depresión, ansiedad, cefalea, bochornos, náusea, constipación, leucorrea, lipidermia, mioartralgias, osteoporosis.
Exemestano	25 mg al día v.o.	2 a 5 años	Hipertensión, depresión, insomio, ansiedad, cefalea, bochornos, sudoraciones, aumento de apetito, náusea, fatiga, mioartralgias, disnea, tos, osteoporosis
Acido Zoledrinico	4 mg	1 vial cada 28 días por 12 meses	Dolor músculo esquelético.
Acetato de megestrol	40 mg		
Ondasetrón	Intravenosa lenta o por infusión. 1 ampolleta 15 minutos antes de la quimioterapia, repetir a las 4 y 8 horas después de la primera dosis.		Cefalea, estreñimiento, diarrea, sedación moderada, rash, prurito, broncoespasmo, edema facial, sensación de frío y calor, ansiedad, aturdimiento, fatiga, anorexia, dolor espasmo gástrico/ abdominal, disgeusia, sequedad de boca y vértigo.
Aprepitant	Cap 125 mg 30 minutos antes de iniciar la quimioterapia. Días 2 y 3 80 mg en ayunas		Cefalea, anorexia, mareos, hipo, estreñimiento, diarrea, dispepsia, eructos, astenia, aumento de las transaminasas.
Palonosetron	0.25 mg dosis única 30 min antes de la quimioterapia		Cefalea, mareos, diarrea, estreñimiento.
Dexametazona	12 mg IV o VO 1 mg día 2 a 4 IV o VO		Euforia, insomnio, hipertensión, edema, glaucoma, ulcera péptica, aumento del apetito, hiperglucemia, retraso en curación de heridas, acné, debilidad muscular, hirsurtismo, insuficiencia suprarrenal.
Ranitidina	Grageas de 150 mg 1 cada 12 horas por 5 días.		Neutropenia, trombocitopenia, cefalea, malestar, mareos, confusión, bradicardia, nauseas, estreñimiento, ictericia, exantema.
Difenhidramina	50 mg		Somnolencia, inquietud, ansiedad, temblores, crisis convulsivas, debilidad, calambres musculares, vértigo, mareo, anorexia, náusea, vómito, diplopía,

			diaforesis, calosfríos, palpitaciones, taquicardia, resequeidad de boca, nariz y garganta.
Ixabepilona	40 mg/m ²	Cada 3 semanas por 6 ciclos	Neuropatía periférica, mielosupresión, hipersensibilidad, infección de vías respiratorias, insomnio, cefalea, náusea, vómito, Mucositis, alopecia, síndrome mano-pie, mialgias y artralgias.
Bevacizumab	10 mg/kg día 1 y 15	Quincenal	Debilidad, dolor abdominal, náuseas, vómito, proteinuria, estreñimiento, hiporexia, Mucositis, hipertensión arterial.

Anexo II: Preparación de reactivos

Medio de cultivo DMEM

DMEM (GIBCO, USA)	13.44g
NaHCO ₂ (SIGMA, USA)	3.7g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (SNT), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de ternera (SNT) 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.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1000mL de agua bidestilada.

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

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 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, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

Verseno

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales CaSki y HeLa 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 800mL 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 en autoclave a 20 lbs. durante 20 min.

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)	4.28ml
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	1g

Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforado a 500 mL con agua bidestilada. Una vez preparada la solución debe ser filtrada.

Glutaraldehído

A 1.57 mL de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4°C.

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.