



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA

***“ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, NECRÓTICA Y APOPTÓTICA DE LA
SAPONINA ESTEROIDAL DIOSGENINA-3-GLU EN LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE MAMA (MDA-MB-231) Y CÁNCER DE PULMÓN (SK-LU-1)”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

LUNA CABAÑAS MONICA ISABEL

DIRECTOR DE TESIS: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **LUNA CABAÑAS MONICA ISABEL**, con número de cuenta **415017848**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **12 de marzo de 2019** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

VOCAL Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SECRETARIO Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

SUPLENTE M. en C. ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la saponina esteroidal Diosgenina-3-glu en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cáncer de pulmón (SK-LU-1).**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 14 de febrero de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR
DIRECCIÓN



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de Lourdes Mora García por apoyarme con sus aportaciones y observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo, permitiéndome concluirlo satisfactoriamente.

Al Dr. Hugo López Muñoz por compartirme desde el inicio de la carrera su entusiasmo y conocimiento, por brindarme su tiempo y sobre todo por contagiarme el amor por la biología celular y molecular. Muchas gracias.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por aceptarme primero para la realización de una estancia corta de investigación y después para la realización de este trabajo. Gracias por el apoyo, la confianza, el trato tan humano, todas sus enseñanzas, su tiempo y su dedicación.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por apoyarme con sus aportaciones, sus enseñanzas y por siempre ser tan amable y alegre, lo que hizo más amena esta experiencia. Muchas gracias.

A la M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez por apoyarme con sus amables observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de los proyectos:

CONACyT 255881

CONACyT 253979

PAPIIT N220916

PAPIIT IN216718

Con todo mi amor para mi familia y amigos que incondicionalmente me han
brindado tanto cariño, apoyo y tiempo.

Especialmente a Teresa, Felipe, Daniel, Luis, Martha, Zeitlin y Miguel.

ÍNDICE

RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO	
CÉLULA	7
PROLIFERACIÓN	7
MUERTE CELULAR	9
APOPTOSIS	10
NECROSIS	13
CÁNCER	16
CÁNCER DE MAMA	21
CÁNCER DE PULMÓN	24
TRATAMIENTO DEL CÁNCER	28
SAPONINAS	31
SAPOGENINA DIOSGENINA	35
DIOSGENINA-3-GLU	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
JUSTIFICACIÓN	42
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
MÉTODO	45
RESULTADOS	50
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
CONCLUSIONES	63
LITERATURA CITADA	64
APÉNDICE	
EVENTO RELACIONADO CON EL TEMA DE LA TESIS	70

RESUMEN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública, ya que a pesar de los avances en investigación y la gama de tratamientos sugeridos, actualmente causa la muerte a más de siete millones de personas en el mundo. Por tanto, es fundamental continuar con la investigación encaminada a la generación de nuevos fármacos orientados a la prevención y tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, el uso de compuestos de origen natural y sus derivados ha tomado gran relevancia. Los compuestos de origen natural no sólo poseen una importancia farmacéutica *per se*, sino que su importancia también radica en que pueden funcionar como precursores en la elaboración de los fármacos semisintéticos. Actualmente ya existen agentes en uso clínico y en ensayos preclínicos avanzados que ejemplifican la utilidad de los “compuestos basados en estructuras de productos naturales”, ya sea parcialmente o totalmente sintético. En ese sentido, la diosgenina, una saponina natural obtenida principalmente de plantas del género *Dioscorea* ha sido diversamente estudiada debido a que se han generado reportes que indican que esta saponina así como algunos de sus derivados, suprimen el crecimiento de células cancerosas a través de múltiples eventos de señalización celular asociados con la proliferación, diferenciación y apoptosis. Por ello, se modificó la estructura de la diosgenina, adicionando una glucosa en el carbono 3 con la intención de analizar si este cambio pudiera mejorar su actividad biológica, obteniéndose como producto la Diosgenina-3-glu (β -d-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo). En ese sentido, se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de este nuevo compuesto sobre líneas celulares tumorales de cáncer de mama y pulmón. Los resultados obtenidos muestran que el potencial proliferativo de la línea celular SK-LU-1 y la línea celular MDA-MB-231 tratadas con Diosgenina-3-glu es afectado de manera dosis-dependiente con una CI_{50} de 25 μ g/ml y 20 μ g/ml respectivamente, sin generar de manera significativa una muerte necrótica ya que no induce la liberación de la enzima LDH en el medio de cultivo. El análisis morfológico, así como la detección del incremento de la caspasa3 activa muestran que la Diosgenina-3-glu promueve un efecto apoptótico en el 13% de la población para la línea celular SK-LU-1 y 16% para la línea celular MDA-MB-231. Además, un estudio en células linfocíticas no tumorales mostró que esta saponina indujo la proliferación del 84% de la población, sin inducir un efecto necrótico, lo que lo hace un excelente candidato para continuar con su estudio enfocado a ser utilizado en un futuro como quimioterapéutico.

MARCO TEÓRICO

CÉLULA

El término célula se atribuye a Robert Hooke, un microscopista inglés quien en su libro *Micrographia* (1665) describe como al observar al microscopio un corte de corcho se puede distinguir una estructura formada por huecos o espacios que llamo celdas o células (Jiménez, 2003).

Posteriormente en 1839 Theodor Schwann, un zoólogo alemán, publicó un informe detallado sobre las bases celulares del mundo animal donde concluyó que las células de plantas y animales son estructuras similares y propuso dos principios de lo que ahora postula la teoría celular: 1) todos los organismos están compuestos de una o más células; 2) la célula es la unidad estructural de la vida. Finalmente en 1855, el patólogo alemán Rudolf Virchow formuló un argumento convincente para el tercer postulado de la teoría celular: 3) las células solo pueden surgir de la división de una célula preexistente (Karp, 2004). De esta manera la teoría celular establece que la célula es la unidad básica estructural y funcional de los seres vivos y que todos los organismos están constituidos por una o más de células.

Una célula se reproduce mediante una secuencia ordenada de acontecimientos en los que duplica su contenido, y luego, se divide en dos. Esta capacidad de las células es la base de toda la reproducción, del crecimiento y de la reparación de los organismos multicelulares (Campbell, 2007).

El número de células en los diferentes tejidos está determinado por un balance homeostático entre la proliferación de células nuevas y la muerte de células agotadas, dañadas o seniles (Elena, 2002).

PROLIFERACIÓN

La teoría celular establece que las células solo pueden surgir de la división de una célula preexistente, por lo tanto, la vida de una célula comienza cuando la división de una célula madre le da origen y concluye con la formación de sus células hijas o con su muerte (Karp, 2004). El intervalo entre cada división celular es definido como ciclo celular (Meza-Junco, 2006).

Cada ciclo celular consiste en cuatro fases ordenadas y estrictamente reguladas, denominadas G1 (brecha o gap 1), S (síntesis de ADN), G2 (brecha o gap 2) y M (mitosis/meiosis) (Meza-Junco, 2006). Dado su papel central en el mantenimiento de la homeostasis tisular y la regulación de los procesos de crecimiento fisiológico, como la regeneración y la reparación, el ciclo celular está estrechamente regulado por estimuladores e inhibidores (Kumar, 2013).

A nivel intracelular el control está a cargo de proteínas denominadas *ciclinas*, llamadas así por su naturaleza cíclica de producción y degradación, y por enzimas asociadas, las *cinasas dependientes de ciclina* (CDK). Estas últimas adquieren actividad catalítica al unirse a las ciclinas formando complejos. Los complejos CDK-ciclina producen la fosforilación de proteínas diana que son fundamentales para dirigir el tránsito de la célula a través del ciclo celular. Al terminar esta tarea, las concentraciones de ciclina disminuyen con rapidez (Kumar, 2013). Además de la síntesis y degradación de las ciclinas, en la regulación de los complejos ciclina-CDK también interviene su unión a los inhibidores de CDK, los cuales se activan en presencia de agentes que dañan el ADN, o en ausencia de factores que inducen el crecimiento, las tres principales son p21, p27 y p16 (Meza-Junco, 2006).

A nivel extracelular, una célula puede entrar al ciclo celular cuando recibe señales adecuadas (mitógenos) ya sea del medio extracelular o de otras células. Los mitógenos son proteínas que estimulan la división celular, contrarrestando los mecanismos intracelulares de freno (Rb) que bloquean la progresión del ciclo. Estas proteínas, actúan en la fase G1 para permitir la entrada de la célula a la fase S, por ejemplo, los factores de crecimiento que actúan durante el desarrollo embrionario y la curación de heridas (Angulo, 2012).

Según la capacidad proliferativa de sus células, los tejidos se dividen en lábiles, estables y permanentes. Las células que forman tejidos *lábiles* se pierden continuamente y son sustituidas por maduración de las células madre y proliferación de células maduras, entre las células lábiles destacan las hematopoyéticas medulares y la mayor parte de los epitelios de superficie. Las células pertenecientes a tejidos *estables* están en reposo y, en estado normal, su actividad de replicación es mínima, algunos ejemplos son, las células endoteliales, los fibroblastos, las células musculares lisas y las células que constituyen el parénquima de la mayor parte de los tejidos sólidos, como el hígado, los riñones o el páncreas, con la excepción del hígado, los tejidos estables tienen una capacidad limitada de regeneración tras una lesión. Las células de los tejidos *permanentes* se consideran diferenciadas de forma terminal y no proliferativas en la vida posnatal. La mayor parte de las neuronas y de los miocardiocitos pertenecen a esta categoría. Salvo los tejidos constituidos principalmente por células permanentes sin capacidad de dividirse (p. ej., músculo cardíaco, nervios), la mayor parte de los tejidos maduros contienen porcentajes variables de los tres tipos celulares: células en división continua, células quiescentes que pueden volver a entrar en el ciclo celular y células que han perdido su capacidad de replicación (Kumar, 2013). Por lo tanto, el tamaño normal de las poblaciones celulares viene determinado por el equilibrio entre la proliferación celular, la muerte celular por apoptosis y la aparición de células recién diferenciadas a partir de las células madre (Kumar, 2013).

MUERTE CELULAR

El término “muerte celular” puede definirse como la pérdida irreversible de las funciones celulares vitales (Galluzzi, 2018), por lo tanto, una célula debe considerarse muerta cuando presenta al menos una de las siguientes características: la membrana plasmática ha perdido su integridad, la célula, incluyendo su núcleo ha sido fragmentado en cuerpos apoptóticos o el cadáver o sus fragmentos han sido fagocitados por células vecinas (Kepp, 2011). Este proceso altamente diverso puede activarse a través de distintas cascadas bioquímicas (aunque a veces se superponen parcialmente) y puede manifestarse con diferentes características morfológicas (Galluzzi, 2009). Vale la pena mencionar además, que dentro de una población el proceso de muerte no ocurre de manera simultánea en todas las células (Kroemer, 2005).

Existen diversos tipos de muerte celular y diversos criterios para clasificarlos. El principal de ellos se basa en características morfológicas específicas (por ejemplo, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear son propias de un proceso apoptótico), también se utilizan criterios enzimológicos (por ejemplo, la contribución de las caspasas se observa con frecuencia en la apoptosis, mientras que las calpaínas y las catepsinas a menudo se asocian con la necrosis), además se consideran características inmunológicas (inmunogénicas si activan una respuesta inmune adaptativa en huéspedes inmunocompetentes o no inmunogénicas sino lo hacen) inclusive se toman aspectos funcionales (programados o accidentales) (Galluzzi, 2007; Galluzzi, 2018).

Aplicando esta última, podemos distinguir claramente dos categorías, la primera se conoce como muerte celular accidental (ACD), debido a que es un proceso prácticamente instantáneo e incontrolable causado por exposición a agresiones físicas graves como fuerzas osmóticas, químicas como variaciones extremas de pH o mecánicas como heridas (Galluzzi, 2018). Por otro lado se encuentra la muerte celular programada, que contrario a la ACD, depende de señales o actividades codificadas genéticamente que inician uno o más de los múltiples módulos de transducción de señales altamente interconectados que precipitan la muerte celular regulada (Fink, 2005). Este mecanismo se activa cuando hay una pérdida de la homeostasis celular producido por perturbaciones del microambiente intracelular o extracelular, tales perturbaciones son demasiado intensas o prolongadas para que las respuestas adaptativas puedan hacer frente al estrés, inclusive puede ocurrir en ausencia de cualquier perturbación ambiental, (Galluzzi, 2018) y por lo tanto operar como un efector para numerosos procesos fisiológicos que incluyen la embriogénesis, el desarrollo post-embriionario y la homeostasis del tejido adulto (Galluzzi, 2009).

Se ha informado que aunque los niveles altos de glucosa y ATP favorecen la ejecución de la apoptosis, su agotamiento cambia la muerte celular a necrosis en varios escenarios experimentales. Por lo tanto además del estímulo iniciador, la determinación de la subrutina de muerte celular está limitado metabólicamente (es decir, el reabastecimiento de las reservas de energía intracelular, el nivel de oxígeno, entre otros) (Galluzzi, 2007).

Generalmente se alude a tres formas principales de muerte celular (apoptosis, muerte celular autofágica y necrosis) y se numeran muchas formas menores basadas en la morfología y lo que se conoce del mecanismo, (Douglas, 2012) por ejemplo, la "piroptosis", que afecta a las llamadas caspasas inflamatorias, se produce en respuesta a patógenos u otras señales de peligro; la "necroptosis" que implica la activación y función de la serina-treonina quinasa 3 (RIPK3) (Douglas, 2012); "partenatos", que implica la participación de las enzimas sensibles al daño del ADN poli ADP-ribosa polimerasas (PARP), y en particular PARP1; la "muerte celular entótica", provocada por la pérdida de la interacción de la MEC (matriz extracelular), pero no implica la activación de los verdugos apoptóticos; la muerte celular "NETotic", donde los neutrófilos y los eosinófilos liberan estructuras microbicidas compuestas de cromatina nuclear, histonas y proteínas antimicrobianas granulares, llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET); la "catástrofe mitótica", referente a los casos de muerte celular que se desencadenan por mitosis aberrante y se ejecutan durante la mitosis o en la interfase posterior; entre otras (Galluzzi, 2012; Galluzzi, 2018).

APOPTOSIS

La palabra 'apoptosis' fue introducida por Kerr et al. 1972, para describir un mecanismo general de eliminación celular controlada, que es complementario pero opuesto a la mitosis en la regulación de poblaciones de células animales y que está involucrado en la renovación celular en muchos tejidos normales (Kerr, 1972). Este término sigue en vigencia ya que sería erróneo y confuso reemplazar esta definición (Kroemer, 2005).

Actualmente se sabe que la apoptosis forma parte integral del desarrollo normal tisular y el mantenimiento de la homeostasis, eliminando las células redundantes durante la embriogénesis (Solís, 2004).

Morfológicamente se caracteriza por: un aumento brusco de la densidad intracelular, debido a que el retículo endoplásmico se dilata; el incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmática; cambios en la composición de la membrana celular, como la translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos; una alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto, produciendo una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas; el aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular y finalmente, la condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos denominados oligonucleosomas (Jordán, 2003).

Este tipo de muerte celular puede ser inducida por múltiples estímulos, (tabla 1) entre los que figura el estrés oxidativo, la radiación, la ausencia de factores de crecimiento y la exposición al factor transformador del crecimiento β , el sistema Fas/Ligando Fas o el factor de necrosis tumoral α (Solis, 2004).

Tabla 1. Inductores de la apoptosis (Jordan, 2003)

Fisiológicos	Asociados al daño celular	Terapia	Toxinas
TNF	Golpe térmico	Quimioterapéutica	Etolanol
Ligando Fas	Infección viral	(cisplatino, doxorubicina,	Betaamiloide
TGF- β	Toxinas bacterianas	pleomycina, cyticina,	Veratridina
Neurotransmisores (glutamato, dopamina)	Oncogenes: myc, rel, E1A	arabinosida, metotrexato, vincristina)	6-OHDA
Ausencia de factores de crecimiento	Factores de transcripción: p53	Radiación X	3-NP
Perdida de fijación de la matriz	Linfocitos T citotóxicos	Radiación UV	Metanfetamina
Ca^{2+}	Agentes oxidantes		
Glucocorticoides	Radicales libres		
	Retirada de nutrientes- antimetabólicos		

Estos factores ponen en marcha un sistema enzimático, dependiente del ATP, responsable de la muerte celular denominado cascada de caspasas (*c-asp-ase*: c-, cisteína; *asp-*, ácido aspártico; *ase*, proteasa) (Solís, 2004). Esta familia de proteasas, conocidas como caspasas o proteasas específicas de aspartato dependientes de la cisteína, existen como zimógenos latentes que contienen un prodominio N-terminal seguido de la región que forma un dominio de efector catalítico de dos subunidades. Aunque todos los miembros de la familia de caspasas comparten similitudes en la secuencia y estructura de aminoácidos, difieren significativamente en sus funciones fisiológicas. Las caspasas se pueden dividir en dos grupos: las que están involucradas centralmente en la apoptosis (caspasa-2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10) y las relacionadas con la caspasa-1 o enzima convertidora de IL-1 β (caspasa -1, -4, -5, -13 y -14, así como la caspasa-11 y -12 murinas, cuyo papel principal parece ser el procesamiento de citoquinas durante las respuestas inflamatorias) (Fink, 2005).

Las caspasas implicadas en la apoptosis se pueden dividir en dos subgrupos según su estructura y los aspectos temporales de su activación durante la muerte celular. Las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) son las principales responsables de iniciar la cascada de activación de caspasas, poseen largos dominios, circulan inactivas en forma de monómeros y para su activación es necesaria su dimerización. Los dímeros se forman debido a su reclutamiento a través de la unión de sus prodominios al adaptador FADD. En contraste, las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) son responsables del desmantelamiento real de la célula mediante la división de sustratos celulares, contienen solo un pequeño prodominio, circulan inactivas en forma de dímeros y tan solo es necesaria la escisión por parte de una caspasa iniciadora para su activación. Tras la activación, las caspasas iniciadoras propagan las señales de muerte al activar las caspasas efectoras corriente abajo en forma de cascada. Las caspasas efectoras activadas escinden selectivamente un conjunto restringido de proteínas diana (proteínas del citoesqueleto, proteínas estructurales, nucleares y enzimas, y algunos controladores de activación de caspasa) para producir las características morfológicas y bioquímicas asociadas con la apoptosis (Fink, 2005; Nicotera, 2004). Sin embargo, la apoptosis

puede ser letal sin activación de caspasas, y la activación de caspasas no necesariamente causa la muerte celular (Galluzzi, 2007).

La activación de caspasas compromete a las células en una de las dos vías convergentes: las vías del receptor de muerte y la mitocondrial, (Hotchkiss, 2009) es decir, el proceso apoptótico puede ser activado por una inducción negativa o intrínseca, o bien, por una inducción positiva o extrínseca. La apoptosis intrínseca es iniciada por una variedad de perturbaciones microambientales que incluyen (pero no se limitan a) extracción del factor de crecimiento, daño al ADN, estrés del retículo endoplásmico, sobrecarga de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés de replicación, alteraciones microtubulares o defectos mitóticos (Elena, 2002; Galluzzi, 2018).

El paso crítico durante la apoptosis intrínseca es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, irreversible y extendida, que está controlada por miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia de proteínas BCL2, un grupo de proteínas que se caracteriza por tener cuatro dominios de homología estructuralmente conservados: BH1, BH2 y BH3 los cuales se requieren para interactuar con otros miembros de la familia Bcl-2, mientras que el dominio BH4, media las funciones de control del ciclo celular (Galluzzi, 2018; Jutinico, 2015).

La familia de proteínas Bcl-2 se compone de tres grupos basados en su estructura y función: a) las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1 y Bcl-2), que contienen por lo general los cuatro dominios de homología y contrarrestan el proceso a través de la unión directa a las proteínas con dominio único BH3; b) las proteínas proapoptóticas (Bax/Bak) o proteínas efectoras multidominio, que comparten homología en los dominios BH 1-3 y permiten la liberación del citocromo c de la mitocondria para generar la MCP (muerte celular programada) y c) las proteínas de dominio único BH3 (Bim, Puma, Bad, Noxa, Bmf, Bid, Bik/nbk y Hrk) vigilan el bienestar de la célula y se activan en respuesta a señales de estrés (Jutinico, 2015).

La visión actual es que BAX activado y BAK forman homodímeros (también heterodímeros en entornos específicos), lo que resulta en la liberación de proteínas de dominio único BH3 y en la oligomerización de dímero por dímero. La oligomerización conduce finalmente al ensamblaje de un poro lipídico tioridal que altera la permeabilidad mitocondrial y provoca profundos reordenamientos de la ultraestructura mitocondrial. Se ha sugerido que diferentes proteínas BH3 solo se unen preferencialmente a miembros de la familia BCL2 específicos antiapoptóticos (p. Ej., BID, BIM y PUMA se unen potentemente a todos los miembros de la familia BCL2 antiapoptóticos; BAD interactúa preferentemente con BCL2, BCL-X L y BCL -W; NOXA inhibe preferentemente MCL1, y HRK preferentemente inhibe BCL-X L) (Galluzzi, 2018).

Por otro lado, la apoptosis extrínseca es iniciada por perturbaciones del microentorno extracelular, por ejemplo: la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas (Galluzzi, 2018; Jordán, 2003).

Los receptores de muerte incluyen: el receptor de muerte de superficie celular Fas (FAS, también conocido como CD95 o APO-1) y un miembro de la superfamilia de receptor de TNF 1A (TNFRSF1A, mejor conocido como TNFR1), 10a (TNFRSF10A; como TRAILR1 o DR4) y 10b (TNFRSF10B; más conocido como TRAILR2 o DR5). La unión de un ligando al receptor de muerte permite el ensamblaje de un complejo multiproteico dinámico en la cola intracelular del receptor, como el llamado "complejo de señalización que induce la muerte" (DISC), el "complejo I" y el "complejo II". Que operan como plataformas moleculares para regular la activación y las funciones de CASP8 (Galluzzi, 2018; Jordán, 2003).

NECROSIS

El término necrosis se utiliza para denominar un tipo de muerte celular dentro de un tejido en un organismo. Proviene del vocablo griego *nekrós*, y significa muerte o cadáver (McCall, 2010).

Se ha considerado como necrosis aquel tipo de muerte sin signos de apoptosis o autofagia (De Toro, 2006). Con el tiempo esta definición se volvió ambigua. Ahora, específicamente se define como un mecanismo que comprende una serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente liberación del contenido intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria (Ramírez, 2010). Esta lesión puede ser provocada por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere caída de ATP, (Elena, 2002) ya que se considera la supresión o el agotamiento súbito de esta molécula, el fenómeno crítico inicial (Ramírez, 2010).

Se ha considerado una división en las rutinas de muerte celular entre aquellas que acontecen a través de una secuencia controlada, y las que no lo hacen. Dentro de los tipos de muerte celular accidental o no controlada se incluía la necrosis. Sin embargo, estudios recientes en diversos organismos muestran que la necrosis sigue una serie constante de eventos celulares y moleculares, que incluyen: hinchazón de orgánulos, aumento de especies reactivas de oxígeno y calcio citoplásmico, disminución de ATP, activación de proteasas de calpaína y catepsina, y finalmente la ruptura de orgánulos y de la membrana citoplasmática (McCall, 2010).

Además, las manipulaciones genéticas y químicas demuestran que la necrosis se puede inhibir, por ejemplo, puede reducirse mediante la expresión de la *pinpin-6*, un inhibidor de las calpaínas y cisteína proteasas lisosómicas, lo que indica que la necrosis se puede controlar y que sigue un "programa" específico (McCall, 2010). Es por eso que actualmente se considera como un evento cuyas vías de señalización no dependen completamente del esquema de mensajeros en respuesta a un ligando sino que pueden ir desde la regulación alostérica sobre enzimas efectoras hasta modificaciones estructurales que afecten su función y la especificidad de sustratos (Ramírez, 2010). Por lo tanto, la necrosis se puede programar tanto en su curso como en su

aparición (Galluzzi, 2007; Golstein, 2006). También podemos añadir que la necrosis puede ocurrir durante el desarrollo de los mamíferos (por ejemplo, en los condrocitos controla el crecimiento longitudinal de los huesos) o en la homeostasis de los tejidos adultos (por ejemplo, en células epiteliales intestinales). Otro dato que refuerza su carácter regulado es que la susceptibilidad a la muerte necrótica puede ser regulada por factores genéticos y epigenéticos. Por ejemplo, se ha reportado que algunas cepas de ratones varían en su susceptibilidad a la isquemia cerebral, y las diferencias importantes son dictadas por la edad de los ratones y por distintas regiones cerebrales (Golstein, 2006).

Varios factores pueden inducir la necrosis regulada, incluido el daño del ADN por agentes alquilantes, las excitotóxicas y la unión a los receptores de muerte, al menos en determinadas circunstancias (Galluzzi, 2012). Obviamente, en condiciones severas como el estrés del detergente o la congelación y descongelación, las células mueren a través de un proceso necrótico no regulado, mal definido (Golstein, 2006).

La necrosis se puede diferenciar de otras subrutinas de muerte celular a través de la cinética de aparición de marcadores comunes, como la inflamación celular, la pérdida de integridad de la membrana celular y liberación de los contenidos intracelulares. No obstante, no todas las células que mueren por necrosis exhiben necesariamente las mismas características, pero ha surgido una progresión general (Kepp, 2011; Galluzzi, 2011; McCall, 2010). En primer lugar el ADN es partido en fragmentos irregulares al azar, esto causa cambios nucleares como: retracción del núcleo con condensación de la cromatina (picnosis), la disolución del núcleo (cariolisis), la fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada (cariorrhexis) y la hinchazón de orgánulos. A esto le sigue la tumefacción de la célula y la ruptura de los núcleos y las mitocondrias (McCall, 2010; Elena, 2002; Ramírez, 2010). Por último, se presenta la característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis, la rápida pérdida de los potenciales de membrana. Esto puede ser consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos. Entre ellos hay sinergia, ya que la alteración de uno produce un efecto en la función de los otros, siendo difícil definir cuál ocurre primero (De Toro, 2006).

Se ha descrito la necrosis inducida por deficiencias de ATP en un ambiente hipóxico por isquemia prolongada, durante el estrés resultante de la escasez de alimento o de un aporte de O₂ insuficiente e incluso en ambientes altamente oxidantes durante la reperfusión. Primeramente, la disminución de la función de las bombas ATP dependientes causa la apertura de los canales iónicos en la membrana citoplasmática. La apertura de estos canales resulta en una gran fuerza coloidal osmótica y entrada de cationes que llevan al hinchamiento celular y la posterior ruptura de membrana (De Toro, 2006; Ramírez, 2010).

Prácticamente todos los tipos de células dependen de alguna manera de la generación de señales de Ca^{2+} citoplasmáticas para regular alguna función celular o para desencadenar respuestas específicas. Por lo general, estas señales implican una combinación de liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Putney, 2005). En células viables, las membranas intracelulares son casi impermeables al calcio. Bajo condiciones fisiológicas, la concentración de calcio es ~ 1.2 mM en el extracelular y ~ 0.1 mM en el citosol. La mayor parte se almacena en el retículo endoplasmico (RE). Cuando el calcio del RE es liberado al citosol, o el calcio extracelular atraviesa la membrana plasmática, la muerte celular puede comenzar por activación de lipasas, endonucleasas y proteasas como las calpaínas dependientes de calcio (McCall, 2010).

La activación de proteasas, como las calpaínas, clivan el intercambiador Na/Ca, lo que lleva a la incapacidad de la célula para extraer el calcio, provocando un aumento sostenido de la concentración intracelular, esto produce una sobrecarga mitocondrial que inactiva la producción de ATP a través de la cadena respiratoria. El destino de la célula depende de la concentración intracelular de este ion. Se ha observado que las concentraciones bajas a moderadas (200-400 nM) desencadenan la apoptosis, mientras que altas concentraciones (mayores de 1 mM) se asocian con necrosis, además, la liberación del calcio del RE se asocia principalmente a la apoptosis, mientras que la entrada a través de la membrana plasmática se asocia principalmente a la necrosis (De Toro, 2006; Ramírez, 2010).

Las células en un ambiente aerobio generan constantemente ROS (especies reactivas de oxígeno) que son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada (Macedo, 2012). Los niveles fisiológicos de ROS pueden regular la transcripción, sirviendo como moléculas de señales y también como defensa contra infecciones patógenas. Su excesiva producción lleva al estrés oxidativo, daño intracelular de moléculas y membranas y finalmente a la necrosis. Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de ROS. El exceso mitocondrial de ROS puede dañar el ADN causando el quiebre de sus hebras, enlaces cruzados ADN-proteínas y oxidación de purinas. Esto puede iniciar la respuesta al daño del ADN, a través de la hiperactivación de PARP lo que lleva a la necrosis. Las ROS también pueden iniciar el daño de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Rompen puentes disulfuro y hacen modificaciones cis-trans que promueven proteólisis ulteriores y modifican la estructura y función de proteínas. Favorecen la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, formando enlaces cruzados entre proteínas, la oxidación del citoesqueleto proteico, la fragmentación de proteínas y la necrosis de coagulación. Además, promueven la apertura del poro de transición mitocondrial por medio de la oxidación del grupo tiol del ANT (adenine nucleotide traslocator) y modifican los canales de calcio asociados al retículo endoplásmico y los de la membrana plasmática, aumentando así la concentración intracelular de calcio (Ramírez, 2010; De Toro, 2006).

Debido a la pérdida de integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es volcado al espacio extracelular, produciéndose la atracción de células inmunes en el área, lo que genera el proceso de inflamación en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis (Elena, 2002). Específicamente las células necróticas liberan ácido úrico que induce IL-1 β y proteínas de choque térmico como Hsp70 y Hsp90 (heat shock proteins). Hay señales por receptores de tipo Toll que reconocen lípidos y ácidos nucleicos modificados. Las células necróticas también pueden activar el factor nuclear kB (NF-kB) en fagocitos mononucleares, neutrófilos y células dendríticas y estimular la producción de IL-6, IL8 y TNF- α . Las proteínas de choque térmico pueden inducir tanto la expresión de genes involucrados en la inflamación como la de genes reparadores de tejido como el factor de crecimiento endotelial vascular (Ramírez, 2010).

Las condiciones patológicas a menudo, si no siempre, están ligadas a la muerte celular desregulada (excesiva o deficiente). Por ejemplo: el SIDA es causado por la pérdida de células inmunes proliferantes a un ritmo que no puede ser compensado por la proliferación. Por el contrario, la oncogénesis se caracteriza por la supresión parcial de los programas de muerte celular, que a su vez causa resistencia a la quimioterapia y la radioterapia, lo que finalmente sella el destino del paciente (Galluzzi, 2007).

CÁNCER

El término “cáncer” es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier célula del cuerpo, es decir, no es un padecimiento único, sino un conjunto de éstos, que se clasifica en función del tejido y de la célula de origen (Gandur, 2004). En función del tejido que afectan se pueden identificar más de 100 tipos diferentes de cáncer (Hanahan, 2000). Según el origen embrionario del tejido, encontramos tres grandes grupos: carcinomas; leucemias y linfomas, y sarcomas. Los carcinomas se originan en tejidos endodérmicos o ectodérmicos, como la piel, este grupo es el de mayor incidencia (80% de los casos) debido a la alta tasa replicativa celular. Las leucemias y linfomas se producen a partir de células hematopoyéticas de la médula ósea. Finalmente los sarcomas se derivan de tejido conjuntivo mesodérmico, como el hueso (Kindt, 2007).

A nivel fisiológico la palabra cáncer hace referencia a un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales procedentes de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal (Gandur, 2004).

El proceso mediante el cual se produce el cáncer se denomina carcinogénesis (Garza, 2014). La primera etapa de ese proceso se denomina “inicio” y comienza con la sensibilización de la célula a ser transformada, esto puede ser causado por agentes exógenos o errores endógenos (García, 2000).

Los agentes exógenos se clasifican en biológicos, físicos y químicos. Los biológicos hacen referencia a organismos tales como los virus, que a través de proteínas víricas inducen la transformación oncogénica, o a mecanismos como la herencia, específicamente la transferencia de mutaciones en ciertos genes (Gandur, 2004). Algunos agentes físicos son la luz ultravioleta que induce dímeros de pirimidina y la radiación ionizante que produce una gran variedad de daños sobre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Finalmente, dentro de los agentes químicos mutagénicos encontramos algunos reactivos alquilantes del ADN (Kindt, 2007).

Tanto los agentes exógenos como los errores endógenos inducen cambios en la expresión genética (García, 2000) esto vuelve a las células más sensibles a agentes que dañan el ADN y a la adquisición y acumulación de nuevas mutaciones que favorecen la carcinogénesis (Sanchez, 2013). Los genes susceptibles a estos cambios los podemos clasificar en base a su función en tres grupos: genes que inducen la proliferación celular, genes que inhiben la proliferación celular y genes que regulan la muerte celular programada (Kindt, 2007).

El primer grupo de genes se denomina proto-oncogenes, y está relacionado con el crecimiento y la proliferación celular (Sanchez, 2013). Entre éstos destacan *sis*, *fms*, *erbB*, *neu*, *erbA*, *myc*, *jun*, *fos* y *ras*, que codifican proteínas que funcionan como factores de crecimiento, receptores de estos factores, transductores de señales o como factores de transcripción. Cuando se encuentran mutados se llaman oncogenes, y provocan un aumento de la sobrevivencia y la proliferación. Es decir, la mutación se traduce en la activación o sobreexpresión del oncogén, causando así inestabilidad genómica, lo que conduce a otras mutaciones críticas. Estudios recientes muestran que las células cancerosas a menudo son fisiológicamente dependientes de la actividad constante de oncogenes activados o sobreexpresados específicos para el mantenimiento de su fenotipo maligno (Weinstein, 2002).

El segundo grupo corresponde a los genes antagónicos al primer grupo, los genes supresores de tumor, que codifican proteínas que inhiben la proliferación celular excesiva (Kindt, 2007). En este caso una mutación conlleva al bloqueo de la expresión, es decir, pérdida de su función, de las proteínas que codifican y por lo tanto, una falla en los mecanismos de control y reparación internos de la célula, permitiendo su proliferación y crecimiento descontrolados. En este grupo sobresale el gen p53 conocido como "el guardián de la célula" (García, 2000).

El tercer grupo está integrado por genes que codifican proteínas que bloquean la apoptosis o la inducen (Kindt, 2007). En esta categoría se encuentra un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, específicamente proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. Además de las mutaciones, existen las anomalías epigenéticas (no mutacionales) que conducen al aumento o disminución de la expresión de estos genes, por ejemplo, la metilación de ADN, la acetilación de histonas, entre otros (Weinstein, 2002).

La siguiente etapa de la carcinogénesis es la “promoción”, llamada así porque es aquí donde actúan los promotores que estimulan la división celular (Kindt, 2007). Representa el período de crecimiento tisular con la formación del tumor (Gandur, 2004). Es en este lapso en donde las células cancerosas mutantes han reclutado y alterado algunos tipos de células normales para actuar como colaboradores activos (Figura 1) (Hanahan, 2000). Estas células cooperadoras proporcionan el soporte funcional y nutricional a la célula cancerígena, lo que conocemos como microambiente tumoral. Algunos tipos celulares involucrados son: fibroblastos anormales, células endoteliales y del sistema inmune innato y adaptativo (Sánchez, 2013).

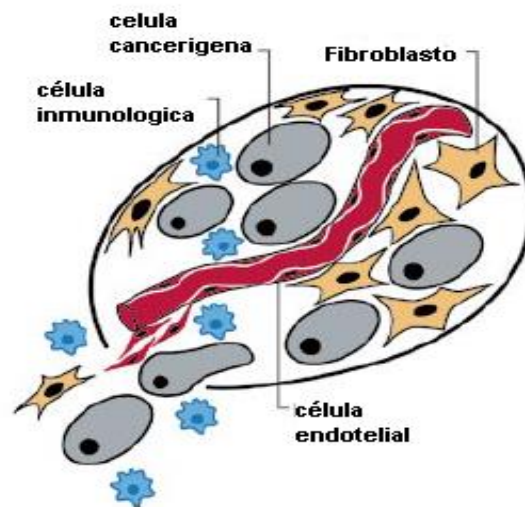


Figura 1. Durante el crecimiento tisular tumoral intervienen células auxiliares, como fibroblastos y células endoteliales que desempeñan un papel clave en la conducción de la proliferación de las células tumorales (Hanahan, 2000).

Además de las células, los mediadores de la inflamación también forman una parte importante del microambiente tumoral (Candido, 2013), un claro ejemplo de esto, son las citocinas que actúan como mediadores de la comunicación entre las células en el microambiente tumoral inflamatorio, se ha demostrado que pueden actuar induciendo o inhibiendo el desarrollo tumoral, entre éstas encontramos el factor inhibidor migratorio de macrófagos (MIF), TNF- α , IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, IL-10 y TGF- β (Candido, 2013).

Como se había mencionado, esta etapa se caracteriza por la rápida proliferación y el consecuente crecimiento tumoral. En una célula normal, la división celular es estimulada por señales externas de proliferación (principalmente factores de crecimiento) que activan receptores presentes en la superficie celular, éstas a su vez activan las vías de señalización aguas abajo, que influyen en la expresión génica y la fisiología celular (DeBerardinis, 2008; Sanchez, 2013). Sin embargo, durante la carcinogénesis ocurre una alteración de estas señales de crecimiento extracelular, de transductores transcelulares de esas señales, o de circuitos intracelulares que traducen

esas señales a la acción. En este sentido encontramos la intervención de muchos oncogenes cuya función es imitar la señalización de proliferación, induciendo la autonomía de la señalización exógena del crecimiento. La sobreexpresión de los receptores de los factores de crecimiento, es otra de las estrategias que le permiten a la célula tumoral activar los mecanismos de proliferación. Esta proliferación descontrolada también es consecuencia de la alteración de los transductores transcelulares de esas señales, por ejemplo, en algunos tipos de cáncer las proteínas Ras están presentes en formas estructuralmente alteradas, lo que les permite liberar un flujo de señales mitogénicas, sin la estimulación continua de sus reguladores normales corriente arriba (Hanahan, 2000).

El crecimiento tumoral no solo depende del aumento en la proliferación celular sino también de la tasa de muerte celular (Hanahan, 2000; Sanchez, 2013). Las células tumorales desarrollan mecanismos que les permiten evadir uno de los principales mecanismos de muerte celular programada, la apoptosis (Figura 2).

La apoptosis alterada se asocia frecuentemente con la inactivación de un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de cisteína-proteasas, denominadas “caspasas”.

En condiciones normales estas proteínas activadas clivan muchas proteínas celulares vitales y rompen el andamiaje nuclear y el citoesqueleto. Además de las caspasas, la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis está estrechamente regulada por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, específicamente las proteínas pro-apoptóticas que actúan promoviendo la liberación

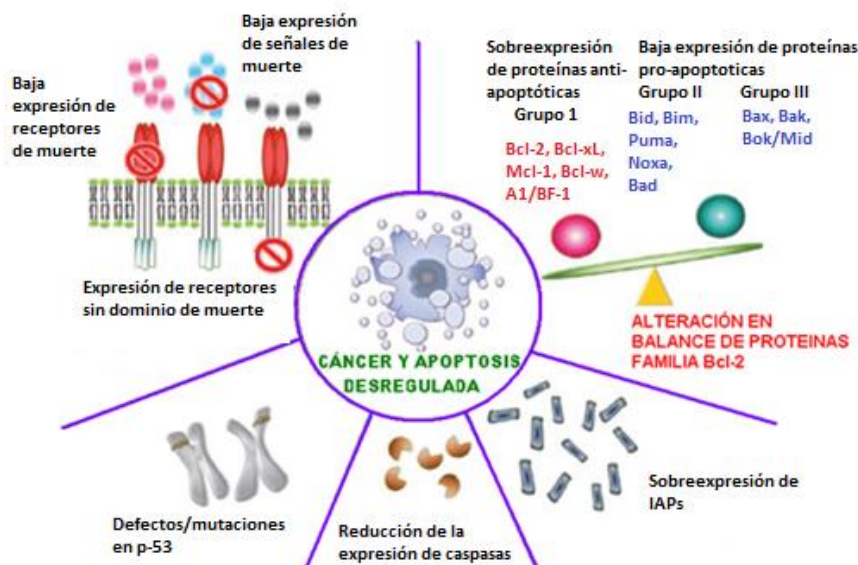


Figura 2. Mecanismos que llevan a la evasión de la apoptosis (Sánchez, 2013).

de citocromo-c desde la mitocondria hacia el citoplasma y las anti-apoptóticas que detienen la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c. Otros mecanismos asociados con la evasión de la muerte celular son: la sobreexpresión de las IAPs, estas actúan bloqueando la apoptosis a través de la inhibición de caspasas efectoras, la falla en la señalización del receptor de muerte y mediante la inactivación de p-53, una de las proteínas supresoras de tumores (Sanchez, 2013).

La última etapa de la carcinogénesis es la “progresión”, durante este periodo las células cancerígenas poseen la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia (Gandur, 2004). Es esta cualidad la que ocasiona la mayor parte de las muertes asociadas a tumores sólidos debido al consecuente desarrollo de metástasis (Sanchez, 2013).

La metástasis permite a las células cancerosas escapar de la masa tumoral primaria y colonizar nuevos tejidos en el cuerpo donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no son limitantes. Esta capacidad de invasión es causada por la alteración de proteínas, que incluyen moléculas de adhesión célula-célula (CAM) principalmente miembros de las inmunoglobulinas y familias de cadherinas dependientes de calcio, y las integrinas, que unen células a sustratos de matriz extracelular (Hanahan, 2000).

Es indispensable para la nutrición de las células tumorales y de la metástasis la formación de nuevos vasos sanguíneos que le permitan al parénquima tumoral tener un gran aporte de oxígeno y nutrientes, este proceso se denomina angiogénesis. Este mecanismo es responsable de la formación de extensas redes de capilares y vasos sanguíneos nuevos por medio de la secreción de ciertas sustancias, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Garza, 2014).

Por lo tanto, podemos concluir que el cáncer es una colección compleja de distintas enfermedades genéticas unidas por características comunes (Luo, 2009). Son estas características las causantes de que este padecimiento éste catalogado como una enfermedad común que se convirtió en un importante problema de salud pública a escala mundial. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirman que el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, con más de 11 millones de nuevos casos diagnosticados cada año, y ese número se espera que aumente a 16 millones para 2020 (Health, 2013). A nivel nacional, en 2013, el cáncer fue la causa del 12.84% de muertes (Mohar, 2017). Siendo el cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago los más diagnosticados a nivel mundial.

Por sexo, los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado (OMS, 2015). La variación en la incidencia de esta enfermedad está asociada a deficiencias estratégicas para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad (Rizo, 2015).

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad en la que se desarrollan células malignas en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos (figura 3), y esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares (Brandan, 2006).

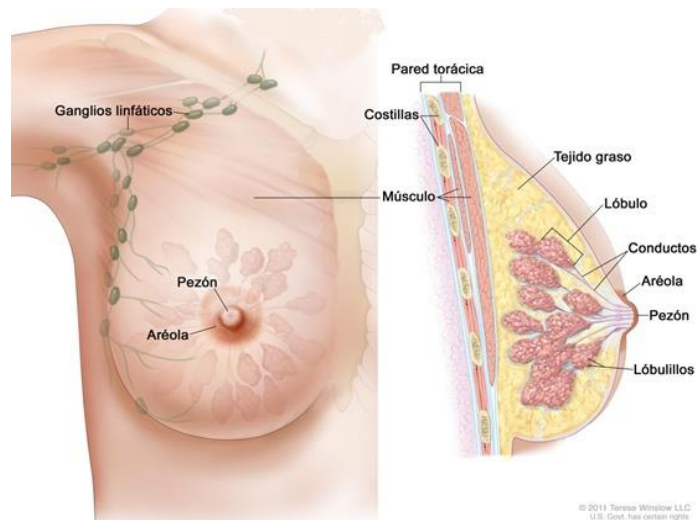


Figura 3. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos.

Se presenta como una neoplasia de biología heterogénea; que muestra considerables variaciones clínicas, morfológicas y moleculares (Romero, 2014). Se han identificado cinco subtipos moleculares que van de la mano con la clasificación histológica actual, denominándose: carcinomas de mama tipo basal, Her2-neu, parecido a la mama normal, Luminal A, Luminal B y recientemente se ha agregado a la clasificación el subtipo bajo en Claudina (Romero, 2014). Estos subtipos difieren en su biología, pronóstico, estrategias de tratamiento y patrón de metástasis (Lambertini, 2016).

Los subtipos luminales están asociados con la expresión de receptores de estrógeno y progesterona y marcadores de células epiteliales luminales diferenciadas (Banerji, 2012).

Entre las mujeres, el cáncer de mama es la causa más común de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, y las tasas de letalidad son más altas en los países de bajos recursos (Anderson, 2008). Esta gran diferencia entre países con más y menos recursos económicos refleja, por un lado, la influencia que el estilo de vida y, posiblemente también, el sesgo que los diferentes métodos de detección y registro pueden inducir en

datos de incidencia (Brandan, 2006). Además, de acuerdo con las últimas estimaciones estadísticas de GLOBOCAN 2018 el cáncer de mama es la neoplasia más probable para la población femenina mundial actual, registrándose más de 2 088 849 nuevos casos cada año (Bray , 2018).

En México, el número de fallecimientos por esta causa se ha duplicado en los últimos 18 años, en el año 2000 eran 3026 las muertes anuales por cáncer de mama, y en 2018 fueron 6869, un aumento del 100% en poco más de una década (Brandan, 2006; Bray , 2018).

Como ocurre en otros tipos de cáncer, en el de mama existen factores que pueden favorecer el desarrollo de esta neoplasia. Algunos de los más importantes están relacionados con el estado hormonal, y la evidencia disponible indica que el periodo de exposición a estrógenos es un factor crítico de la carcinogénesis en mama. Por lo tanto, la ingesta de hormonas, el uso de anticonceptivos, el tiempo de uso, la edad a la que se inició la ingesta, la dosis y el tipo de hormonas empleadas afectan su efecto como factores de riesgo. Además, una menarca temprana y menopausia tardía se asocian a periodos prolongados de exposición a estrógenos, por lo tanto, cuantos más ciclos menstruales tiene la mujer en su vida, mayor es el riesgo. También, la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Brandan, 2006).

Además de la exposición prolongada a diferentes hormonas, existen algunos factores de riesgo genéticos, entre ellos se encuentran las mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2, se trata de polimorfismos genéticos asociados a la síntesis de estrógenos y su metabolismo. Además, las mujeres con antecedentes de hiperplasia epitelial atípica, patología benigna proliferativa, tienen 4-5 veces más riesgo de desarrollar cáncer mamario que las mujeres que no muestran cambios proliferativos en su mama. Si la mujer tiene antecedentes familiares de cáncer de mama en primera línea, asociados a cambios proliferativos en ella misma, su riesgo se incrementa nueve veces. Sin embargo, el riesgo más importante para sufrir cáncer de mama es ser mujer, la relación de cáncer de mama entre mujeres y hombres es aproximadamente de 100 a 1. A esto hay que añadir, que la incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, etapa en que el ritmo de crecimiento disminuye. En el 46% de las mujeres mexicanas afectadas por el cáncer de mama este se presenta antes de los 50 años y el grupo de edad más afectado es el de 40-49 años (Brandan, 2006). Por otro lado existen comportamientos de salud que pueden reducir el riesgo de presentar cáncer de seno, estos incluyen la lactancia prolongada, actividad física regular, control de peso, evitar el consumo excesivo de alcohol, evitar el uso prolongado de la terapia hormonal exógena y evitar la exposición excesiva a la radiación. Es probable que estos comportamientos, aunque no hayan sido probados en ensayos clínicos para reducir el riesgo, sean beneficiosos (Anderson, 2008).

Una célula cancerosa de mama generalmente se duplica cada 100-300 días. Una neoplasia de mama de 1 cm realiza cerca de 30 duplicaciones antes de alcanzar este tamaño, por lo que este cáncer tiene, como mínimo, unos 7 años de evolución. Esta simple estimación sugiere la utilidad de la detección temprana, con métodos capaces de visualizar alteraciones (subclínicas) de tamaño inferior a un centímetro (Brandan, 2006). A pesar de los avances científicos significativos en el manejo del cáncer de mama, la mayoría del mundo enfrenta restricciones de recursos que limitan la capacidad de mejorar la detección temprana (Anderson, 2008). En México, donde la mayoría de los tumores malignos de mama son diagnosticados en etapa avanzada, las mamografías se han utilizado casi totalmente con fines de diagnóstico. En 2003 se publicó una Norma Oficial Mexicana que abre la posibilidad para un programa de escrutinio poblacional que instrumente el uso de las mamografías como herramienta de detección. La NOM-041 reconoce 3 tipos de intervenciones específicas para la detección del cáncer, la autoexploración, el examen clínico y la mastografía. La autoexploración mamaria es una técnica de detección basada en la observación y palpación que hace la mujer en sus propias mamas. Durante el examen clínico mamario, se obtiene una historia clínica completa y una exploración física en que se observa la configuración general y se palpan los senos revisando también axilas y pezones. Se ha encontrado que la exploración física de la mama permite una detección de hasta 50% de lesiones no vistas en mamografías, con un valor predictivo positivo de 73% y negativo de 87%. Por último, la mamografía (también llamada mastografía) es una imagen plana de la glándula mamaria obtenida con rayos X. Se recomienda la autoexploración mensual a partir de la menarca, el examen clínico de las mamas (realizado por médico o enfermera capacitados) en forma anual a todas las mujeres mayores de 25 años que asisten a las unidades de salud, y la toma de mastografía, anual o cada dos años a las mujeres de 40 a 49 años con dos o más factores de riesgo, y en forma anual a toda mujer de 50 años o más, de existir el recurso (Brandan, 2006).

La tendencia reciente hacia la mejora en la tasa de mortalidad por cáncer de mama se debe en gran parte al aumento en el diagnóstico de la enfermedad en estadio temprano, mientras que nuestras opciones terapéuticas para los carcinomas de mama en estadio avanzado todavía son bastante limitadas (Allinen, 2004).

El tratamiento es multimodal (cirugía, quimioterapia, hormonoterapia, terapia biológica y radioterapia), el uso de cada una depende de la etapa clínica en la que se encuentre la paciente. La cirugía es la principal modalidad de tratamiento local del cáncer mamario, existen diversos procedimientos quirúrgicos, considerándose la mastectomía radical modificada (MRM) el tratamiento estándar, sin embargo si el cáncer de mama se detecta en una etapa clínica temprana, se puede ofrecer un tratamiento conservador (Tumorectomía), en el que la paciente puede incluso conservar su seno sin comprometer el tratamiento oncológico radical. Dependiendo del tamaño tumoral, el número de ganglios linfáticos con metástasis y de otros factores clínicos y patológicos se ofrecerá tratamiento con radioterapia, hormonoterapia y/o quimioterapia adyuvante (Martínez, 2007).

El cáncer de mama metastásico e inflamatorio debe tratarse inicialmente con terapia preoperatoria independientemente del nivel de recursos. La terapia preoperatoria estándar incluye la quimioterapia basada en antraciclina. La adición de taxano secuencial después de la quimioterapia basada en antraciclina mejora las respuestas patológicas y las tasas de conservación de la mama, aunque puede no mejorar la supervivencia. La combinación se considera un tratamiento apropiado en los niveles mejorado y máximo; sin embargo, los costos y la falta de un claro beneficio de supervivencia no justifican su uso a niveles de recursos limitados. La quimioterapia combinada con ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo (CMF) es menos potente que la antraciclina y los taxanos, pero se puede utilizar en su esquema clásico en los países de bajo costo debido a los menores costos y las menores complicaciones (Anderson, 2008).

Recientemente la terapia biológica ha demostrado efectos benéficos en el tratamiento de cáncer de mama, específicamente el trastuzumab incrementa la supervivencia cuando se administra como tratamiento adyuvante a mujeres cuyos tumores expresan la oncoproteína Her-2 y asociados a quimioterapia en el cáncer de mama metastásico (Martínez, 2007).

CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer pulmonar fue considerado hasta mediados del siglo pasado como una enfermedad poco frecuente. A partir de 1930 su frecuencia ha aumentado y en la actualidad es el tumor maligno más frecuente en el mundo, con 2 093 876 nuevos casos cada año. Diversos autores denotan un incremento en la frecuencia del cáncer pulmonar en México en décadas recientes. Actualmente en nuestro país ocupa el segundo lugar en las causas de muerte por tumores malignos en hombres mayores de 35 años, aunque se ha reportado un incremento mundial en los casos en mujeres (Bray, 2018; Moctezuma, 2009).

La carcinogénesis pulmonar es el resultado final de la acción de múltiples factores que de forma aislada, aditiva o sinérgica, lesionan irreversiblemente el epitelio bronquial, (Carretero, 2005) el cual comprende la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos (Eguino, 2005). Se clasifica en dos tipos principales: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, dependiendo de cómo se ven las células en el microscopio. Cada tipo de cáncer de pulmón crece y se disemina de forma diferente y se trata también de forma diferente (Eguino, 2005).

El cáncer del pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es el más frecuente y se subdivide a su vez, en tres tipos: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y carcinomas de células grandes (Eguino, 2005). El *cáncer de células escamosas (epidermoide)* representa el 30% de todos los casos de cáncer de pulmón, muestra una fuerte relación con el tabaco y está asociado al mejor pronóstico. El *adenocarcinoma* ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica (50%) y es también el tipo más común en pacientes

no fumadores. Surge de células mucoproducidas y se clasifica en cuatro subtipos: acinar, papilar, bronquiolo-alveolar y variedad sólida secretora de mucina. Por último, se encuentran los carcinomas indiferenciados, que ocupan el 5% de los casos, entre ellos el *carcinoma de células grandes*, que puede surgir en cualquier parte del pulmón, tiene pronóstico malo y también se asocia a tabaquismo (Moctezuma, 2009). A su presentación sólo el 25% son estadios localizados, y un 35% son estadios localmente avanzados (estadio III o IV). Aproximadamente el 80% de los pacientes con CNCP presentan enfermedad metastásica en alguna de sus fases evolutivas: 30-40% al diagnóstico, 50% por recidiva de los estadios I-II y 80% por progresión o recaída de los estadios III, y su supervivencia es muy pobre (Bartolomé, 2007).

Por el contrario, el cáncer del pulmón de células pequeñas (CPCP), llamado también cáncer microcítico, cuyas células parecen granos de avena al verlas al microscopio; crece con rapidez y de igual forma se disemina a otros órganos, (Eguino, 2005) constituye aproximadamente el 15-20% de las neoplasias pulmonares. Aproximadamente el 60-70% de los pacientes tienen enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico (Bartolomé, 2007).

Entonces, dado que el cáncer es una enfermedad genética, resultado de las alteraciones que presentan las células cancerosas, existen diversos estudios, específicamente para el cáncer pulmonar, que reportan mutaciones en genes relacionados con el control de la proliferación y muerte celular (Carretero, 2005). Por ejemplo, en el caso del cáncer de pulmón los principales genes alterados en componentes reguladores del ciclo celular son; el gen supresor tumoral de retinoblastoma (Rb) y p16. Rb se altera principalmente en cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y p16 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). En cuanto a los genes alterados en vías transductoras de señales bioquímicas las mutaciones más frecuentes en cáncer de pulmón son; las mutaciones en Kras, en tumores de tipo histológico adenocarcinomas. Otros genes habitualmente mutados son PTEN y LKB1, el primero en CPCP y el segundo en adenocarcinomas. Igualmente se reportan mutaciones en genes relacionados con la muerte celular, específicamente con la vía de la apoptosis. Entre las moléculas que regulan este mecanismo y que se encuentran alteradas en el cáncer de pulmón tenemos p53 y p14, ambas alteradas en distintas proporciones en los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón (Sánchez-Céspedes, 2005).

El tabaco es la causa principal de cáncer de pulmón, siendo responsable de más del 90% de los casos no sólo directamente sino indirectamente (tabaquismo pasivo) y en asociación con otras sustancias. Existen otras causas (polución ambiental, laboral o en los hogares) y factores modificadores del riesgo individual como la dieta o la susceptibilidad genética. Sin embargo, el consumo de cigarrillos es el elemento que confiere el carácter de epidemia a la enfermedad. Además, debido a la clara relación entre tabaco y cáncer de pulmón, se puede considerar al cáncer de pulmón como marcador del tabaquismo de una población (Franco, 2005). Sin embargo, no en todos los casos de cáncer de pulmón existe una causa concreta detectada, ni la presencia de un

agente etiológico conlleva siempre la aparición de cáncer de pulmón (p.ej. sólo el 10-15% de los fumadores desarrollará un cáncer de pulmón a lo largo de su vida). Estos hechos hacen pensar en la existencia de efectos aditivos y sinérgicos entre las distintas causas para determinados casos; así como en la existencia de factores de predisposición y de riesgo para el cáncer de pulmón que quizás por sí solos no son suficientes para la carcinogénesis, pero asociados a otros factores conducen a la aparición del tumor (p.ej., factores de susceptibilidad genética) (Carretero, 2005).

El cáncer de pulmón tiene un pronóstico malo debido a que típicamente se diagnostica en un estadio avanzado, cuando el paciente presenta síntomas (Moctezuma, 2009). Es decir, un cáncer de pulmón puede manifestarse de diferentes formas. En las etapas iniciales este tipo de tumores suelen ser asintomáticos, cuando la enfermedad progresa uno de los síntomas más frecuentes es la aparición o exacerbación de la tos previamente existente. Otro síntoma es el dolor constante en el pecho, que aumenta con la respiración profunda o la tos (Eguino, 2005). Hasta el momento no existe un cuadro clínico específico para el diagnóstico de cáncer pulmonar. Inicialmente se recomienda realizar a todo paciente independientemente de su edad: Anamnesis (entrevista con el médico) y exploración física, radiografía de tórax, pruebas de laboratorio (hemograma, bioquímica general y estudio de coagulación) y electrocardiograma (Bartolomé, 2007).

Para confirmar el diagnóstico de sospecha y conocer la estirpe tumoral se utilizan diversas técnicas:

- a) Broncoscopia. Un broncoscopio es un tubo delgado que se inserta por la nariz o la boca y permite visualizar el interior del árbol traqueo-bronquial. Este estudio se recomienda en pacientes con lesiones centrales (Eguino, 2005).
- b) Punción aspiración con aguja fina (PAAF) bajo control de radioscopia o TAC. Puede ser la primera elección en los tumores periféricos en los que la rentabilidad alcanza el 90% (Bartolomé, 2007).
- c) Citología de esputo. Es un método de diagnóstico sencillo y no invasivo pero de rentabilidad muy variable. Reservado únicamente para los pacientes que rechazan o son incapaces de tolerar otros procedimientos más agresivos (Bartolomé, 2007).

Cuanto antes se diagnostica el cáncer de pulmón, más fácil es tratarlo. Hay varios tipos de tratamiento para el cáncer de pulmón. La estadificación es una medida para determinar hasta donde se ha diseminado el cáncer de pulmón. Generalmente, los cánceres que se limitan a una pequeña área, y no se han diseminado muy lejos son mejor tratados con terapias locales para extirpar todo el tumor. La cirugía y la radiación son formas de tratamientos locales. La cirugía generalmente, es más eficaz que la radiación en la eliminación de la totalidad del cáncer, pero, no todos los pacientes pueden tolerar de manera segura una cirugía (Slatore, 2014).

Si el cáncer se ha diseminado, la quimioterapia y/o terapia dirigida se utilizan con mucha frecuencia ya que estos tratamientos pueden eliminar las células cancerosas en todo el cuerpo. La terapia dirigida se refiere a los medicamentos, que van dirigidos a un

mecanismo específico o a vías de las células cancerosas para desacelerar o detener el crecimiento de células cancerosas. Actualmente, las terapias dirigidas están disponibles únicamente para algunos tipos de estadios avanzadas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Slatore, 2014).

Algunas veces la quimioterapia se administra antes o después de los tratamientos locales. La quimioterapia después de la cirugía es llamada terapia adyuvante. Se administra para ayudar a eliminar las células cancerosas que no fueron extraídas por la cirugía. Cuando la quimioterapia se administra antes de la cirugía se le llama terapia neoadyuvante. La quimioterapia también se puede administrar como el único tratamiento (Slatore, 2014).

La quimioterapia (4-6 ciclos) constituye el tratamiento estándar cuando la enfermedad se ha diseminado. La quimioterapia basada en cisplatino ha demostrado, en ensayos realizados generalmente antes de 1990, aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes con CPCNP avanzado. Estudios aleatorizados han reflejado que los costes por año de vida ganado son equivalentes a los de otras terapias médicas consideradas efectivas. Durante los últimos 15 años la gemcitabina, los taxanos paclitaxel y docetaxel, y la vinorelbina han mostrado actividad en monoterapia asociada a una toxicidad aceptable. Todos estos compuestos han sido comparados como agentes únicos con tratamiento de soporte con resultados positivos. De modo similar los cuatro compuestos han sido combinados con cisplatino (y carboplatino) dando lugar a dobletes con perfiles de toxicidad predecibles y tasas de respuesta superiores a las obtenidas con cisplatino en monoterapia. Globalmente, los resultados sugieren una equivalencia en términos de eficacia para carboplatino/paclitaxel, cisplatino/vinorelbina, cisplatino/gemcitabina, cisplatino/docetaxel, con tasas de respuesta y supervivencia en el rango de 20%-35% y 7-11 meses, respectivamente. Estos estudios revelaron un diferente espectro de toxicidad para cada esquema, incluyendo una mayor neurotoxicidad con los agentes antimicrotúbulo (vinorelbina, taxanos), y mayor toxicidad hematológica con cisplatino/gemcitabina (particularmente con el esquema cada 4 semanas) o cisplatino/vinorelbina. En conclusión, todas las combinaciones de última generación de cisplatino o carboplatino con gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel o docetaxel pueden utilizarse de modo estándar en pacientes con CPCNP avanzado, de igual manera, EC (carboplatino-etoposido), ACE (adriamicina-ciclofosfamida-etoposido), IP (irinotecan-cisplatino) y TP (topotecan-cisplatino) pueden utilizarse de modo estándar en pacientes con CPCP avanzado, tal y como reconocen las agencias de aprobación de medicamentos. El régimen de elección para un paciente individual ha de considerar el perfil de toxicidad esperado, la comorbilidad del paciente (cardiaca, renal, alcoholismo, etc.) y sus preferencias (en hospital de día versus hospitalizado, semanal versus trisemanal, etc.), sistema de salud, implicaciones económicas para el paciente, sistema sanitario y experiencia del médico responsable (Bartolomé, 2007).

TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El tratamiento del cáncer ha evolucionado mucho en los últimos años, y se ha conseguido aumentar la supervivencia frente a algunos tipos de cáncer (por ejemplo, leucemias o linfomas), pero no se ha conseguido la efectividad deseada debido fundamentalmente a una insuficiente actividad terapéutica (30%) ó a una excesiva toxicidad (30%). Estos problemas sólo podrán solucionarse seleccionando las mejores dianas terapéuticas y mediante el uso de biomarcadores para identificar a los pacientes apropiados para recibir cada tratamiento (Benson, 2006).

Después de un cuarto de siglo de avances rápidos, la investigación sobre el cáncer ha generado un conjunto de conocimientos rico y complejo que revela que el cáncer es una enfermedad que implica cambios dinámicos en el genoma. La base se ha establecido en el descubrimiento de mutaciones que producen oncogenes con ganancia dominante de función y genes supresores de tumores con pérdida de función recesiva; ambas clases de genes de cáncer se han identificado a través de su alteración en células de cáncer humano y animal y mediante la obtención de fenotipos de cáncer en modelos experimentales (Hanahan, 2000). La activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores en la célula tumoral implican una modificación de las vías de señalización induciendo: la falta de respuesta frente a factores homeostáticos, la pérdida del control del ciclo celular y la proliferación descontrolada, el aumento de la supervivencia celular, la disminución de la apoptosis, la inmortalización y la estimulación de procesos como invasión, angiogénesis y metástasis. Todos estos procesos presentan potenciales dianas desde el punto de vista de una intervención terapéutica (Collins, 2006). Es por ello que para el tratamiento del cáncer se utilizan (o se intenta utilizar) quimioterapéuticos, hormonas y antihormonas, anticuerpos e inmunomoduladores, interferones y otras citoquinas. Además, están en distintas fases de su desarrollo, drogas con otros efectos: inducción de diferenciación celular, modificación de la expresión de los oncogenes, interferencia con factores de crecimiento, etc. (Tessler, 2004).

En cuanto a la quimioterapia, hay que considerar que todos los medicamentos tienen efectos secundarios más o menos graves (figura 4) (Homedes, 2009). Casi todas las reacciones, adversas comunes a la mayor parte de los quimioterapéuticos antineoplásicos, son debidas a citotoxicidad sobre tejidos de alta fracción de crecimiento. Esa toxicidad puede ser aguda o crónica y, además, pueden observarse efectos secundarios a la lisis tumoral y reacciones de hipersensibilidad (Tessler, 2004).

Existen manifestaciones tóxicas que obligan a interrumpir momentánea o definitivamente el tratamiento: se las denomina *toxicidad limitante*. En general, la toxicidad limitante aguda corresponde a efectos reversibles y se relaciona con la dosis por vez o por serie (por ejemplo, mielotoxicidad). La toxicidad limitante crónica corresponde a efectos muchas veces irreversibles y se relaciona con la dosis total (por ejemplo, fibrosis pulmonar) (Tessler, 2004).



Figura 4. Efectos adversos comunes a la mayor parte de los quimioterapéuticos antineoplásicos (Tessler, 2004).

También, existen otras adversidades referentes a la inaccesibilidad. Nunca había tenido el mundo, como sucede en la actualidad, tantas armas terapéuticas para hacer frente a las enfermedades que afligen la humanidad. Al mismo tiempo, millones de personas mueren por falta de medicamentos para los cuales existe la capacidad tecnológica y financiera (por lo menos teórica) para ponerlos a disponibilidad de todos. Todos los esfuerzos actuales son insuficientes. Los precios de los nuevos fármacos, especialmente los tratamientos oncológicos, dificultan su acceso, si no hay un sistema público que garantice la prestación farmacéutica gratuita y cuestionan la sostenibilidad financiera de los sistemas de salud que intentan garantizarla. Partiendo de la premisa de que el objetivo final de la investigación farmacéutica debería ser la obtención de los medicamentos que la sociedad necesite y que la sociedad pueda pagar, el actual sistema de innovación farmacéutica ha fracasado, especialmente para los países en desarrollo. La elevada mortalidad por cáncer en los países desarrollados, y el hecho de que sea una de las enfermedades diana de la investigación mundial explica, aunque no justifica, este incremento. Porque este aumento no siempre se traduce en un aumento similar de la supervivencia o de la calidad de vida de los pacientes tratados (Homedes, 2009).

Además, la resistencia al tratamiento es otra limitación importante para el empleo exitoso de los numerosos citostáticos disponibles (Tessler, 2004).

Por varias razones, entre las que se incluyen la seguridad, la toxicidad mínima (o ninguna), y una mejor disponibilidad, alternativas como los fitoquímicos naturales que

se encuentran en los alimentos son cada vez más populares entre las drogas sintéticas (Raju, 2009). Desde hace 3,500 años el hombre ha empleado las plantas para el tratamiento del cáncer y son más de 3,000 especies de plantas las que se han reportado para el tratamiento de esta enfermedad. Las plantas son una fuente importante de sustancias anticancerosas y es significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos de América (EUA) aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural. El periodo de investigación científica al respecto es mucho más reciente, ya que es en 1958 cuando se aisló la vinblastina, y como resultado de ello, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) inició diversas investigaciones acerca de las plantas con actividad anticancerosa, lo que condujo al aislamiento y conocimiento del mecanismo de acción de sustancias como las podofitoxinas, taxanos y camptotecinas (Vega-Ávila, 2006).

La farmacognosia estudia los principios activos de origen natural que pueden poseer un potencial terapéutico o aplicación en la industria. Los estudios farmacognósicos sobre la biosíntesis y la estructura molecular de las drogas naturales permiten sintetizar compuestos análogos con una mayor actividad biológica y potencia terapéutica (Cortez, 2004).

Aproximadamente a principios de la década de 1980, la "influencia de los productos naturales" en el descubrimiento de fármacos en todas las áreas terapéuticas aparentemente ha ido disminuyendo debido a la llegada de la tecnología de química combinatoria y la "expectativa asociada" de que estas técnicas serían la fuente futura de cantidad de esqueletos nuevos y derivaciones de fármacos / nuevas entidades químicas (NCE) (figura5) (Newman, 2008).

Estos medicamentos se han clasificado como: productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural. Se consideran como productos naturales a los producidos por bacterias, a los materiales obtenidos de organismos marinos o de plantas (Vega-Ávila, 2006).

Sin embargo, las técnicas de química combinatoria han revolucionado el desarrollo de conductores químicos activos en los que actualmente, en lugar de los químicos farmacéuticos que producen derivados desde cero, se utiliza un procedimiento mediante el cual las síntesis se basan en procesos combinatorios para que las modificaciones se puedan realizar de forma iterativa (Newman, 2008).

Actualmente hay agentes en uso clínico y en ensayos clínicos avanzados que ejemplifican aún más la utilidad de los "compuestos basados en estructuras de productos naturales", ya sea parcialmente o totalmente sintético (Newman, 2008).

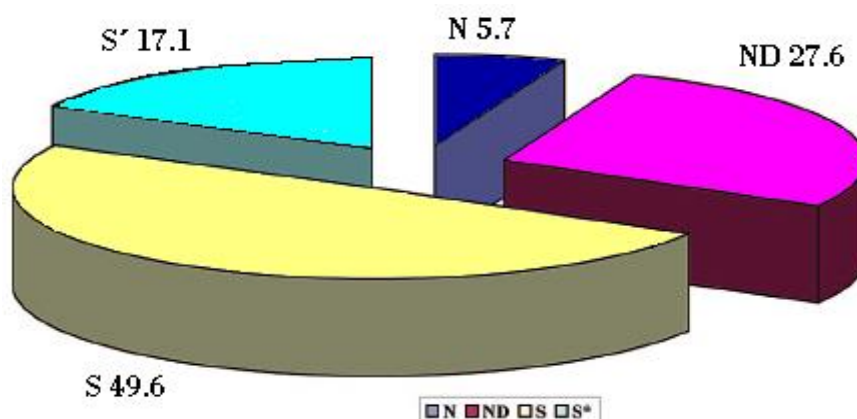


Figura 5. Fuente de los fármacos de moléculas pequeñas, 1981–2006: categorías principales, $N = 983$ (en porcentajes). Las principales categorías son las siguientes: "N", producto natural; "ND", derivado de un producto natural y generalmente una modificación semisintética; "S", droga totalmente sintética que se encuentra a menudo mediante la selección / modificación aleatoria de un agente existente; "S *", hecho por síntesis total, pero el farmacóforo es / era de un producto natural (Newman, 2008).

Por lo tanto, los compuestos de origen natural no sólo poseen una importancia farmacéutica *per se*, sino que su importancia también radica en que pueden funcionar como precursores en la elaboración de los fármacos semisintéticos. Por ejemplo, la progesterona (considerada una hormona sexual femenina) puede obtenerse a partir de la diosgenina, una saponina esteroidea derivada de la dioscina; biosintetizada por varias especies vegetales del género *Dioscorea*. En otros casos, los principios activos naturales pueden ser modificados en su estructura molecular básica con la finalidad de obtener compuestos más estables y efectivos, con escasos efectos colaterales y de fácil asimilación por el organismo (Cortez, 2004).

Si consideramos que el 58% de las plantas empleadas en la medicina tradicional no han sido estudiadas, éstas representan al material inicial que puede conducir al descubrimiento de nuevos compuestos con actividad potencial anticancerosa (Vega-Ávila, 2006). Si bien, algunos compuestos aislados no se han empleado en la clínica, ya sea por problemas de solubilidad, toxicidad severa o porque no logran la remisión del tumor, han servido como moléculas base, con modificaciones químicas, para la obtención de compuestos menos tóxicos y más potentes. El avance en los métodos empleados para identificar los mecanismos de acción de las sustancias anticancerosas han conducido al desarrollo de sustancias que actúan de manera selectiva sobre diferentes tipos de cánceres (Vega-Ávila, 2006). Para obtener medicamentos seguros, útiles y eficaces, es importante estudiar el efecto citotóxico de plantas con potenciales usos medicinales (Rivas Morales, 2016).

SAPONINAS

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales). Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (García, 2009).

Dentro del grupo de metabolitos secundarios se encuentran las saponinas, una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Figura 6). Algunas saponinas tienen adicionalmente un motivo de azúcar, el cual es generalmente glucosa, unido al carbono-26 o 28 (Puentes, 2009; Ahumada, 2016). Sin embargo, se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas (García, 2009).

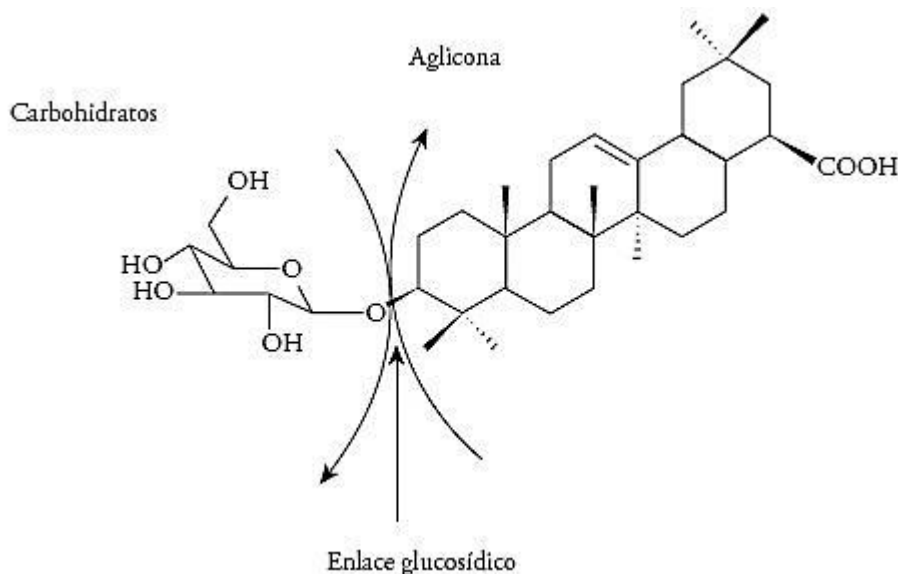


Figura 6. Estructura de una saponina (Moghimpour, 2015)

Las saponinas son glucósidos, esta característica hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (García, 2009). Los cambios bruscos de pH, valores muy ácidos o básicos generan la ruptura de estos enlaces *O*-glucosídicos. Esta característica es útil y empleada en metodologías para su cuantificación y elucidación estructural (Ahumada, 2016). Con respecto a su estabilidad térmica, las saponinas resisten temperaturas superiores a 150 °C e inferiores a 400 °C, temperatura a la cual se inicia el proceso de carbonización de la molécula, posibilitando la implementación de procesos de extracción convencionales que usualmente son favorecidos por el uso de calor (Ahumada, 2016).

Estos compuestos comparten algunas propiedades biológicas únicas, como la capacidad de lisar eritrocitos o formar espuma. Este último contribuyó a nombrar a este grupo como "saponinas", que se deriva del *sapo* latino, es decir, jabón (Podolak, 2010). La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (García, 2009). La hemólisis de los glóbulos rojos parece ser consecuencia de la capacidad de las saponinas para formar complejos con el colesterol de la membrana celular que conduce a la formación de poros y permeabilización celular y también a alteraciones en las porciones de hidratos de carbono cargadas negativamente en la superficie celular. Sin embargo, se debe mencionar que el mecanismo exacto de la actividad hemolítica de las saponinas no se entiende con claridad y es tema de debate dentro de la comunidad científica (Podolak, 2010).

Las saponinas ofrecen también una alta actividad superficial debido a la combinación estructural de un grupo polar (azúcar) y uno no polar (esteroide o triterpeno), propiedad que permite su uso como un detergente natural, agente estabilizante y emulsificador en productos de limpieza y cosméticos (Ahumada, 2016).

Las saponinas son comunes en una variedad de plantas superiores y generalmente se encuentran en raíces, tubérculos, hojas, flores o semillas (Man, 2010) pero también se encuentran en algunas fuentes animales, como por ejemplo invertebrados marinos (Podolak, 2010).

Como se mencionó anteriormente la aglicona puede tener estructura esteroide o triterpenoide según la cual las saponinas se clasifican generalmente. Los compuestos esteroideos son menos comunes y generalmente se encuentran presentes en el grupo Liliopsida (ex Monocotyledones) específicamente en los miembros de las familias *Liliaceae*, *Dioscoreaceae*, *Agavaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Amaryllidaceae*, *Leguminosae* y *Rhamnaceae* mientras que las saponinas triterpenoides son más ampliamente distribuidos y se encuentran distribuidos en las familias de Magnoliopsida (antiguas dicotylédones), por ejemplo; *Primulaceae*, *Sapotaceae*, *Scrophulariaceae*, *Caryophyllaceae*, *Acanthopanax*, *Leguminosae*, *Araliaceae*, *Campanulaceae*. En casos raros, ambos tipos de saponinas pueden acumularse en una planta, como por

ejemplo en *Avena* sp. (Poaceae *monocotiledóneas*) o *Lysimachia paridiformis* (*Myrsinaceae* dicotiledóneas) (Podolak, 2010; Man, 2010).

Existen diversas propiedades biológicas reportadas y asociadas a estos compuestos, entre las que se resaltan su capacidad antitumoral, su actividad hemolítica expectorante, antiinflamatorio, vasoprotector, hipocolesterolémico, inmunomodulador, hipoglucemiante, molusquicida, antifúngico, antiparasitario, y muchos otros.; su funcionalidad depende de la diversidad estructural y conformacional que adoptan las saponinas (Ahumada, 2016; Podolak, 2010).

Se ha informado la presencia de saponinas en más de 100 familias de plantas, de las cuales, al menos 150 tipos poseen propiedades anticancerígenas significativas. Los reportes muestran que inhiben el crecimiento de células tumorales mediante la detención del ciclo celular, la estimulación de la muerte celular autofágica, la inhibición de la metástasis, la inhibición de la angiogénesis la desintegración del citoesqueleto y la inducción de apoptosis (generalmente a través de su ruta intrínseca) con valores de CI50 de hasta 0.2 mM. (Podolak, 2010). La capacidad de inducir apoptosis en células tumorales; es una característica muy buscada en los medicamentos para el tratamiento del cáncer, porque la eliminación de células tumorales por apoptosis es útil para disminuir los efectos secundarios en los pacientes al evitar la necrosis (Man, 2010). Por ejemplo, la polifilina D (PD), la formosanina C y la dioscina pertenecientes a las diosgenil saponinas (tabla 2), mostraron una fuerte actividad anticancerígena e inmunoestimuladora (Man, 2010).

Tabla 2. Diosgenil saponinas (R'=H).

R	Nombre (R' = H)
-H	Diosgenina
-3- O -Glc	Trillin
-3- O -Rha (1 → 2) -Glc	ParisV
-3- O -Ara (1 → 4) - [Rha (1 → 2)] - Glc	Polifilina D
-3- O -Rha (1 → 4) - [Rha (1 → 2)] - Glc	Dioscina
-3- O -Rha (1 → 2) - [Glc (1 → 3)] - Glc	Gracillin
-3- O -Rha (1 → 4) -Rha (1 → 4) - [Rha (1 → 2)] - Glc	Formosanina c

Las observaciones de numerosos estudios confirman que la actividad biológica de las saponinas está influenciada tanto por la aglicona como por la fracción de azúcar (Podolak, 2010). En resumen, la relación estructura-actividad está representada por: la influencia de la estructura de la aglicona (diferentes posiciones o el número de grupos hidroxilo, la configuración R / S en la aglicona); la influencia de la cadena lateral del azúcar (enlace del azúcar, número, lipofilia o diferentes tipos); los tipos de secuencia del azúcar; y la presencia del ácido carboxílico libre en C-28 (Man, 2010; Ahumada, 2016).

Una buena comprensión de los mecanismos antitumorales de las saponinas es necesaria para una mejora dirigida de las terapias tumorales basadas en saponinas en el futuro. Mientras tanto, se debe prestar especial atención a las combinaciones de saponinas y otros medicamentos anticancerígenos, ya que ofrecen regímenes de tratamiento muy eficaces contra el cáncer (Man, 2010; Podolak, 2010).

SAPOGENINA DIOSGENINA

La diosgenina (25 R -spirost-5-en-3 β -ol) (Patel, 2012) es una sapogenina esteroidea espiroacetal C 27 disponible en abundancia en la naturaleza (Hamid, 2014).

Las sapogeninas esteroideas son metabolitos secundarios cuyos precursores biosintéticos son los esteroides, especialmente el colesterol (Liu, 2005). Se encuentra en las semillas de *Trigonella foenumgraecum*, en las raíces del ñame silvestre (*Dioscorea villosa*), también se encuentra en niveles altos en numerosas especies de plantas, incluyendo *Costusspeciosus*, *Smilax menispermoidea*, especies de *Paris Aletris* y *Trillum*, *Solanum incanum*, *Solanum xanthocarpumy* en especies de *Dioscorea* (Sethi, 2018; Patel, 2012). Debido a su alto contenido saponiesteroides, *Dioscorea zingiberensis* se usa en China para la obtención de diosgenina. La hidrólisis ácida de esta hierba cruda es el método tradicional de producción de esta saponina (Patel, 2012).

Se sabe que los compuestos como los que se encuentran en las plantas comestibles o especias se dirigen a múltiples moléculas en las vías de señalización, otorgándoles así un amplio potencial preventivo / terapéutico contra varias enfermedades (Raju, 2012). Se ha demostrado que la diosgenina posee diversas actividades farmacológicas incluidas: hipolipemiente, hipocolesterolémico, auxiliar de lactancia, antibacteriano, estimulante gástrico, anti-anoréxico, antidiabético, galactogógico, hepatoprotector, antitrombosis, antiviral, hipoglucemiante y antioxidante (Raju, 2012; Sethi, 2018; Patel, 2012; Raju, 2009).

También, a lo largo de los años, se han proporcionado abundantes datos sobre su papel en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades provocadas por la inflamación, incluido el cáncer (Sethi, 2018).

Actualmente existe evidencia sustancial *in vitro* para comprender el mecanismo molecular de acción de la diosgenina contra varios tipos de cáncer, algunos de los cuales se encuentran resumidos en la Tabla 3 (Raju, 2012).

Tabla 3. Actividad antitumoral *in vitro* de diosgenina

Modelo de cáncer	Líneas celulares	Dosis de diosgenina	Objetivo molecular	Referencias
Cáncer de mama	MCF-7 y MDA-MB-231	20 μ M and 30 μ M	Inhíbe de la proliferación Induce apoptosis Induce detención del ciclo celular en G1 al regular a la baja la expresión de ciclina D1, cdk-2 y cdk-4 Regula a la baja la ruta de señalización de NF κ B.	(Srinivasan, 2009)
	MDA-MB-231	20 μ M, 40 μ M, and 60 μ M	Regula a la baja de Bcl-2	(Raju J. , 2012) (Sowmyalakshmi , 2005)
	MCF-7	20 μ M and 40 μ M	Regula al alza el gen supresor de tumor p53	(Sowmyalakshmi , 2005)
	Células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2	5-20 μ M	Modula la fosforilación de Akt, mTOR y JNK Mejora la citotoxicidad inducida por paclitaxel	(Chiang, 2007)
	MDA-MB-231	5 μ M	inhíbe la migración	(He, 2014)
Cáncer hepatocelular	C3A, HUH-7 y HepG2	50 μ M y 100 μ M	Regula a la baja de la ruta de señalización de STAT3 regula la expresión de SH-PTP2, induce la apoptosis. Potencia los efectos apoptóticos de la doxorubicina y paclitaxel	(Li, 2010)
Cáncer de próstata	PC3	5 μ M, 10 μ M y 20 μ M	Regula a la baja la ruta de señalización de NF κ B. Inhíbe las metaloproteínas de la matriz Inhíbe la invasión y migración de células	(Chen, 2011)
Osteosarcoma	1547	40 μ M, 80 μ M y 100 μ M	Inhíbe la proliferación celular con una detención del ciclo en la fase G ₁ Induce apoptosis Modula la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)	(Moalic, 2001)
	1547	40 μ M	Inhíbe la proliferación celular Induce la unión de NF- κ B al ADN Regula al alza el gen supresor de tumor p53	(Corbier , 2003)
	1547	40 μ M	inhíbe la proliferación Induce la detención del ciclo celular: en la fase G ₁	(Trouillas , 2005)

Eritroleucemia humana	HEL, K562	40 μ M	Inhibe la vía de señalización NF κ B	(Liagre, 2005)
	HEL	40 μ M	Inhibe la proliferación Induce apoptosis Regula a la alza p21	(Leger, 2004)
	K562	6.44 μ M	Inhibe la proliferación	(Wang, 2004)
leucemia mielógena crónica humana	KBM-5	10 μ M,	inhibe la osteoclastogénesis, la invasión y la proliferación a través de la regulación a la baja de la activación de la quinasa Akt, <i>IκB</i> y la expresión de genes regulados por NF- κ B	(Shishodia, 2006)
	K562	10 μ M	Induce la detención del ciclo celular en la fase G ₂ / M y la apoptosis Con disminución dramática en la concentración de Ca ²⁺ citoplásmico	(Liu, 2005)
Melanoma humano	HEp-2	40 μ M	Inhibe la proliferación celular Induce la detención del ciclo celular en las fases S y G ₂ / M respectivamente. Induce la apoptosis dependiente de caspasa-3 Regula al alza el gen supresor de tumor p53	(Corbier, 2004)
Laringocarcinoma humano	M4Beu	40 μ M	Inhibe la proliferación celular Induce la detención del ciclo celular en las fases S y G ₂ / M respectivamente. Induce la apoptosis dependiente de caspasa-3 Regula al alza el gen supresor de tumor p53	(Corbier, 2004)
Carcinoma epitelial humano	A431	9.33 μ M	Inhibe la proliferación	(Wang, 2004)
Cáncer de ovario humano	A2780	18.7 μ M	Inhibe la proliferación	(Wang, 2004)
Cáncer de colon	HCT-15	5.86 μ M	Inhibe la proliferación Induce apoptosis a través de la vía dependiente mitocondrial	(Wang, 2004)
	HT-29	40 μ M y 60 μ M	linhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis en parte por inhibición de bcl-2 y por inducción de la expresión de la proteína caspasa-3	(Raju J., 2004)
Cáncer cervicouterino	HELA	30 μ M	Inhibe la proliferación Induce apoptosis a través de la vía de la caspasa. Regula a la baja la expresión de Bcl-2	(Huo, 2004)
Cáncer de pulmón	LA795	149.75 μ M	Inhibe la proliferación Induce apoptosis	(Yan, 2009)
	A459	9.98 μ M	Inhibe la proliferación	(Wang, 2004)
	A549	47 μ M, 44 μ M, 43 μ M	Inhibe la expresión del gen hTERT	(Rahmati-Yamchi, 2014)

De los estudios revisados aquí hasta ahora, parece que el efecto de la diosgenina contra varios cánceres no es a través de un mecanismo único; es decir, la actividad de la diosgenina implica múltiples dianas celulares y moleculares (Raju, 2009). Además de la inhibición *in vitro* de la proliferación de células cancerosas inducida por diosgenina, un componente bioactivo, varios estudios han demostrado que la diosgenina es un potente inhibidor del crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de cáncer en roedores. A continuación se muestran algunos casos reportados, (Tabla 4) (Sethi, 2018).

Tabla 4. Actividad antitumoral *in vivo* de diosgenina

Modelo de cáncer	Organismo modelo	Dosis de diosgenina	Resultados	Referencias
Sarcoma-180	Ratón	400 mg por kg	Mostró inhibición el 55.84%, del crecimiento de células tumorales Incrementó los pesos de timo y bazo Mejoro el nivel de secreción de TNF- α en suero	(He, 2012)
Xenoinjertos tumorales MCF-7 y MDA 231	Ratones desnudos hembra	10 mg / kg,	linhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos No mostró efectos tóxicos en órganos vitales	(Srinivasan, 2009)
Adenocarcinoma de pulmón LA795	Ratones T739 consanguíneos	200mg / kg	linhibió significativamente (33,94%) el crecimiento de tumores	(Yan, 2009)
tumores orales inducidos por DMBA	modelo de bolsa bucal de hámster	80 mg / kg	Inhibio el crecimiento de tumores orales	(Jagadeesan, 2013)
Cáncer de colon inducido por azoximetano(AOM)	Ratas F344	Dieta al 0,1% y al 0,05%	linhibió la formación de lesiones de colon pre-neoplásicos (focos de cripta aberrante)	(Raju,2004)
Carcinogénesis mamaria inducida por NMU	Ratas Sprague Dawley hembra	20 mg / kg	atenuó la peroxidación lipídica a través de un sistema de defensa antioxidante	(Jagadeesan, 2012)
Carcinogénesis de colon de ratón inducida por AOM / DSS	Ratones ICR macho	20, 100 y 500 mg / kg	Se redujo la aparición de úlcera en la mucosa colónica y cripta displásica Se redujo la expresión de citoquinas inflamatorias como la <i>IL 1β</i> Se redujo los niveles elevados de triglicéridos en suero Se incrementó en 12 veces la expresión de la lipoproteína lipasa,	(Miyoshi, 2011)

En un estudio la actividad biológica se atribuyó en parte a la presencia del resto heteroazúcar y al doble enlace 5,6. En eso, la diosgenina poseía estos dos criterios y mostraba una fuerte apoptosis y detención del ciclo celular. Sin embargo, la ausencia del doble enlace 5,6 podría compensarse con otras características estructurales, como en la

estructura de sarsasapogenina que posee un doble enlace 5,6 saturado con una conformación 5 β . De hecho, se demostró que esta molécula tenía una actividad biológica importante: el mismo efecto en la inducción de la apoptosis, pero la detención del ciclo celular en diferentes fases, en comparación con la diosgenina (Trouillas, 2005).

Los estudios comparativos que han abordado la relación estructura-función de la diosgenina y las saponinas relacionadas son limitados (Raju, 2009).

La diosgenina y los productos que contienen diosgenina están surgiendo en el mercado y se están promoviendo como productos naturales para la salud (Raju, 2012), sin embargo, existe poca información sobre la biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinámica en relación con sus efectos beneficiosos para la salud (Raju, 2012). Se sabe que tiene la capacidad de penetrar las membranas celulares (Sethi, 2018). Actualmente, un estudio in vivo ha demostrado que se pueden absorber parcialmente a través del intestino y distribuirse a varios tejidos, lo que indica su biodisponibilidad potencialmente buena (Liu, 2004; Chiang, 2007; Liu, 2005) y su consumo se considera seguro, debido a que la diosgenina no se sintetiza ni se convierte metabólicamente en subproductos esteroideos en el cuerpo de mamíferos. (Raju, 2012)

En conjunto, estos hallazgos preclínicos y mecánicos implican fuertemente el uso de la diosgenina como un agente quimiopreventivo o terapéutico novedoso basado en múltiples objetivos contra varios tipos de cáncer (Raju, 2009). Sin embargo, realizar cambios específicos en la estructura esteroidea de la diosgenina, podría perfeccionar su actividad biológica (Sethi, 2018).

DIOSGENINA-3-GLU (TRILLIN)

La Diosgenina-3-glu, también llamado trillin o diosgenin β -D-glucopiranosido (β -d-glucopiranosido de (25R)-espirost-5-en-3 β -ilo) es un derivado de la diosgenina producto de la adición de una glucosa en el carbono 3 de su estructura (Figura7). Este cambio estructural de la diosgenina ha mostrado que puede modificar la actividad biológica de esta molécula.

Es por ello, que algunas investigaciones recientes han puesto especial interés en las propiedades farmacológicas de este compuesto glicosilado encontrando que la Diosgenina-3-glu puede suprimir selectivamente la producción / expresión de marcadores M1 pro-inflamatorios por microglía activada, sin afectar a los marcadores M2, y podría proporcionar neuroprotección al regular la polarización microglial M1, por lo tanto, podría utilizarse en el tratamiento de diversas enfermedades neuroinflamatorias mediadas por microglía (Wang S, 2017).

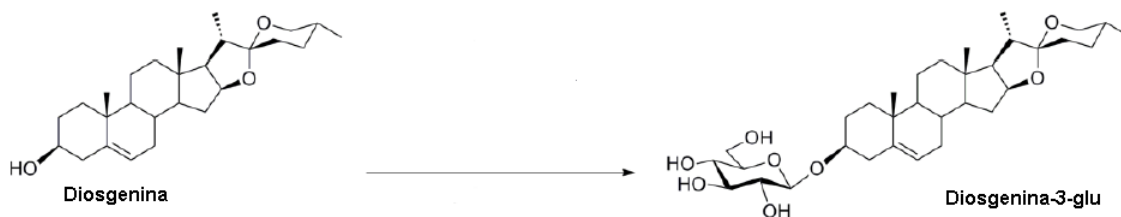


Figura 7. Obtención de la saponina Diogenina-3-glu a partir de la glicosilación de la sapogenina Diosgenina.

Además se ha demostrado que la actividad hemolítica de las saponinas esteroides depende en gran medida de sus estructuras, es decir, la longitud del azúcar, el enlace del azúcar, los sustitutos del azúcar, así como la aglicona. Un estudio demostró que Diosgenina-3-glu exhibe una actividad hemolítica de $\gg 100 \mu\text{M}$ expresada como la concentración que causan el 50% de hemólisis de los eritrocitos humanos, es decir, sin actividad hemolítica a $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ (Wang, 2007).

En cuanto a su potencial actividad citotóxica, Mimaki *et.al.*, demostró que esta molécula logró inhibir la proliferación en células de leucemia promielocítica humana HL-60 ($\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Mimaki, 2001). De igual manera Shu-liet.*al.*, reportan una IC_{50} de $> 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ en células de cáncer de pulmón LA795 y de $> 34.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ en células de leucemia mieloide aguda HL-60 (Shu-li, 2013). Otro estudio mostró en sus resultados de citomorfología que la Diosgenina-3-glu indujo la multinucleación en las células HL-60, NB4 y K562, lo que indica que podría inducir una parada mitótica en estas células de leucemia. En particular, encontraron algunas células apoptóticas con mayor volumen celular en células HL-60 tratadas con $10 \mu\text{M}$ del compuesto, lo que indica la aparición de apoptosis después de la detención mitótica. Se demostró que también podría causar los efectos citotóxicos en estas células; por ejemplo, la IC_{50} que se determinó mediante el ensayo MTT en células K562, fue de aproximadamente $7.5 \mu\text{M}$ (Liu, 2004). Además de la apoptosis, las células que experimentan una catástrofe mitótica pueden deberse a la muerte celular mitótica, que se asocia con la segregación anormal de los cromosomas y la citocinesis aberrante, lo que resulta en células de tamaño anormal y contenido de ADN. Esta forma de muerte celular se ha definido como pérdida de integridad reproductiva después de una entrada inapropiada en la mitosis, y se caracteriza con frecuencia por la aparición de células que contienen fragmentos multinucleares o "micronúcleos". Los resultados no mostraron condensación de cromatina o condensación y fragmentación citoplasmática, lo que indica que los remanentes nucleares se estaban sometiendo a una cariólisis (disolución nuclear) (Liu, 2004).

No obstante, en estos reportes aun no es claro si esta molécula posee actividad antitumoral ni se ha estudiado la posible actividad inductora de apoptosis en diferentes tipos de cáncer, por lo que es indispensable abundar en su estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen diversos métodos destinados al tratamiento del cáncer, cada uno ofrece alternativas ciertamente alentadoras, sin embargo, éstos afectan a las células cancerígenas indistintamente de todas las demás células del cuerpo, el problema ocasiona una serie de efectos secundarios que dañan aún más la salud del paciente, además de que todas estas opciones resultan ser poco o nada eficaces cuando el cáncer ha generado metástasis.

En la actualidad de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos de América (EUA) aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural. Es por ello que actualmente se estudian diversos compuestos de origen vegetal como la diosgenina y sus derivados, los cuales se espera que presenten propiedades antiproliferativas, de baja o nula citotoxicidad, inductores de muerte celular programada y de acción selectiva.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema global de salud pública. En todo el mundo, se diagnostican más de 11 millones de nuevos casos de cáncer cada año, y ese número se espera que aumente a 16 millones para 2020 (Health, 2013). A nivel nacional, en 2013, el cáncer fue la causa del 12.84% de muertes en México (Mohar-Betancourt, 2017).

Por ello, es fundamental continuar con la investigación encaminada a la generación de nuevos fármacos orientados a la prevención y tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, el uso de compuestos de origen vegetal ha tomado gran relevancia. Dentro de estos compuestos naturales encontramos a las saponinas esteroidales, de las cuales se ha reportado que poseen actividad citotóxica *in vitro* contra diferentes líneas celulares de cáncer humano. Sin embargo, se tienen pocos estudios sobre la actividad de éstos compuestos en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cáncer de pulmón (SK-LU-1) sobre todo la relacionada con la inducción de muerte por apoptosis. Por lo que es necesario generar mayor información acerca de la actividad de las saponinas esteroidales para que en un futuro puedan ser considerados como agentes terapéuticos contra el cáncer.

HIPÓTESIS

Las saponinas son glucósidos naturales que poseen una amplia gama de propiedades farmacológicas, incluida la actividad citotóxica y antiproliferativa en algunos tipos de cáncer, por lo que se espera que la saponina Diosgenina-3-glu (derivado de la diosgenina) presente actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cáncer de pulmón (SK-LU-1).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de Diosgenina-3-glu en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y cáncer de pulmón SK-LU-1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar la actividad antiproliferativa de la saponina esteroideal Diosgenina-3-Glu en células tumorales provenientes de cáncer de mama MDA-MB-231 y de pulmón SK-LU-1.
- ❖ Determinar la actividad necrótica de Diosgenina-3-Glu en cultivos de células tumorales a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares.
- ❖ Evaluar la inducción de muerte apoptótica producida por la Diosgenina-3-Glu en cultivos de células tumorales de cáncer de mama y pulmón mediante el análisis morfológico (condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, pyknosis) por microscopia de fluorescencia, así como la detección de la caspasa 3 activa observada por microscopía de fluorescencia y cuantificada por citometría de flujo.
- ❖ Evaluar el efecto de la Diosgenina-3-glu sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana marcado con carboxifluoresceína (CFSE) y cuantificado por citometría de flujo.
- ❖ Determinar la actividad necrótica de la Diosgenina-3-Glu en cultivos de linfocitos humanos a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares.

MÉTODO

CULTIVO DE CELULAS TUMORALES

La línea celular MDA-MB-231

Las células tumorales provenientes de un adenocarcinoma de mama triple negativo establecido a partir de células metastásicas provenientes de un derrame pleural MDA-MB-231 (ATCC, USA), se sembraron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) con 10 ml de medio DMEM (Sigma, USA) al 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA).

Las células tumorales provenientes de un adenocarcinoma de pulmón estadio III microcítico SK-LU-1 (ATCC, USA) se sembraron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) con 10 ml de medio RPMI-1640 (Microlab, MEX) suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina y rojo de fenol, al 5% de suero de neonato bovino (STN) (Biowest, USA).

Ambos cultivos se conservaron en una incubadora (Nuair US Autoflow) bajo condiciones controladas de temperatura (37°C), CO_2 (5%) y presión (una atmósfera húmeda a saturación).

Para la realización de los ensayos, los cultivos se conservaron en una saturación máxima del 70%.

PREPARACIÓN DEL STOCK DEL COMPUESTO DIOSGENINA-3-GLU

El compuesto fue suministrado en sólido por el Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se preparó una solución stock con 1mg del compuesto en sólido Diosgenina-3-glu disuelto en 100µl de una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO)-Etanol 1:3 (J.T. Baker, USA).

Se realizó una serie de disoluciones de la solución stock en medio de cultivo DMEM (Sigma, USA) al 10% de SFB y RPMI 1640 (Microlab, MEX) al 5% SFB para obtener una concentración final de 10µg/10µl.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Las líneas celulares: SK-LU-1 (ATCC, USA) y MDA-MB-231 (ATCC, USA) se sembraron en placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) (7500 células con 100µl de medio de cultivo por pozo). Transcurridas las 24 horas de adhesión celular, se retiró el medio de cultivo y se prepararon las siguientes condiciones (6 repeticiones por condición): control testigo al cual solo se le adicionó medio de cultivo

(100µl por pozo), control vehículo al cual se le adicionó la concentración máxima requerida de disolvente para la preparación del compuesto (2µl/ml de DMSO-Etanol) y una curva de concentraciones del compuesto Diosgenina-3-glu (10,12,14,16,18,20,22 y 24µg/ml).

Transcurridas 24 horas de tratamiento, se evaluó el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng et al, 1989. Dicha técnica consiste en retirar el medio de cultivo y fijar las células con glutaraldehído al 1.1% (Sigma, USA) en agua desionizada por 20 minutos, se realizó un lavado con agua desionizada y se dejó secar al aire, posteriormente se añadió el colorante cristal violeta (Sigma, USA) al 0.1% en ácido fórmico por 20 minutos se realizó un lavado con agua desionizada y se dejó secar al aire, por último se adicionó ácido acético al 10% (J.T. Baker, MEX) y se conservó en agitación constante por 20 minutos. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 590nm en un espectrofotómetro (ChroMate Awareness Technology Inc, USA). Los datos obtenidos se procesaron en Microsoft Office Excel 2010.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NÉCROTICA MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

En una placa de plástico de 96 pozos se sembraron 7500 células por pozo de cada línea celular tumoral con 100µl de medio de cultivo por 24 horas.

Posteriormente se generaron 4 condiciones (6 repeticiones por condición): un control al que únicamente se le cambió el medio de cultivo, un control positivo al que únicamente se le cambió el medio de cultivo, un control vehículo (DMSO-Etanol) con la concentración empleada para preparar la CI_{50} correspondiente, el tratamiento con el Diosgenina-3-glu con la concentración CI_{50} correspondiente.

Transcurridas 23 horas se retiró el medio de cultivo del control positivo y se le adicionó medio fresco al 0.1% de tritón X-100 por una hora más.

Después se colectaron los sobrenadantes de cada condición y se centrifugaron a 2000 rpm/5min. El sobrenadante de cada condición se depositó en una placa de 96 pozos y se le adicionaron 50 µl de la mezcla de reacción del kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Finalmente, se leyó la absorbancia a 490nm en un espectrofotómetro. Los datos obtenidos se procesaron en Microsoft Office Excel 2010.

MORFOLOGÍA CELULAR, CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA MEDIANTE TINCIÓN CON DAPI Y DETECCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA POR MARCAJE CON FITC EN CÉLULAS TRATADAS CON DIOSGENINA-3-GLU, POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las células se sembraron en placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) (7500 células con 100µl de medio de cultivo por pozo). Posteriormente se adicionó el tratamiento con la concentración de la CI_{50} del compuesto Diosgenina-3-glu, al control únicamente se le realizó cambio de medio fresco, al control positivo se le agregó medio fresco con camptotecina (10µg/ml) y para el control vehículo se utilizó DMSO/Etanol a una concentración de 0.5% en medio de cultivo. Después de 24 horas se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS durante 3 minutos cada uno en agitación suave. A continuación, las células se fijaron durante 15 minutos con 50 µl de paraformaldehído-glutaraldehído. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS y enseguida las células se permearon con una solución de tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 minutos a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con PBS y se le adicionó 30 µl del anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3 humana (Sigma, USA) 1:500 en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente las muestras se lavaron varias veces con PBS y se le aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo de cabra anticonejo acoplado aFIT-C (Sigma, USA), 1:500 en PBS y se mantuvo a 37°C en la obscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionó 500 µl de PBS a cada muestray se adicionaron 10 µl por muestra del fluorocromo DAPI (Sigma, USA) durante 1 minuto a temperatura ambiente, después se retiró el exceso del fluorocromo y nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS durante 3 minutos cada uno, finalmente las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E600 (Nikon, USA).

DETECCIÓN DE EL INCREMENTO DE CASPASA 3 ACTIVA EN CÉLULAS TRATADAS CON DIOSGENINA-3-GLU, MEDIANTE MARCAJE CON FITC POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se sembraron 30000 células por pozo en placas de cultivo de plástico de 48 pozos (Coming, USA), para el tratamiento con Diosgenina-3-glu las células se trataron con la concentración de la CI_{50} durante 24 horas. Después las células se cosecharon y fijaron con etanol al 70% por 5 minutos a 4°C, inmediatamente se lavaron cuidadosamente 2 veces con PBS y posteriormente se le adicionó el anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa 3 humana (Sigma, USA) 1:500 en PBS y se incubó toda la noche a 4°C.

Posteriormente las muestras se lavaron varias veces con PBS y se le aplicaron el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo de cabra anticonejo con FIT-C (Sigma, USA), 1:250 en PBS y se mantuvieron a 37°C en la obscuridad durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionó 500 µl de PBS a cada muestra. Por último, el botón celular se re suspendió y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSAria II.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIOSGENINA-3-GLU SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS HUMANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE INCORPORACIÓN DE CARBOXIFLUORESCÉINA (CFSE)

Se realizaron cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana. Los linfocitos obtenidos se resuspendieron en 4 ml de PBS y se marcaron con 10 μ l de una solución de carboxifluoresceína (Sigma, USA) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS al 5% SFB, y se centrifugaron (Dinac, USA) a 1500 rpm por 5 minutos, el botón obtenido se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo. Después del tratamiento los linfocitos se sembraron en una placa de 96 pozos (200000 células por pozo en 200 μ l de medio de cultivo) por 24 horas. Posteriormente fueron activados con fitohemaglutinina (25 μ l/ml) (Microlab, USA), el volumen final de cada pozo fue de 200 μ l. Para el tratamiento con Diosgenina-3-glu las células se trataron con la **CI₅₀** de cada línea.

Después la muestra se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de verseno frío. Después de 5 minutos se centrifugó a 1500rpm 5 minutos y se retiró el verseno. Por último se resuspendió el botón celular en 500 μ l de PBS y 500 μ l de paraformaldehído al 2%. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACS Aria II y los datos se analizaron en el programa Flowing Software versión 2.5.1.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NECRÓTICA DE DIOSGENINA-3-GLU SOBRE LINFOCITOS HUMANOS MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

En una placa de plástico de 96 pozos se sembraron 200,000 células/pozo con 200 μ l de medio de cultivo por 72 horas con las siguientes condiciones (6 repeticiones por condición): un control que únicamente contiene medio de cultivo, un control positivo que contiene solamente medio de cultivo, un control vehículo (DMSO-Etanol) con la concentración empleada para preparar la **CI₅₀** correspondiente y el tratamiento con Diosgenina-3-glu con la concentración **CI₅₀** correspondiente.

Transcurridas 71 horas de tratamiento se retiró el medio de cultivo del control positivo y se le adicionó medio fresco al 0.1% de tritón X-100 por una hora más.

Transcurridas 72 horas, la placa se centrifugó a 1500rpm/5min en frío. El sobrenadante (100 μ l de cada muestra) se trasladaron a tubos canónicos de plástico de 0.6 ml, se centrifugaron a 1500 rpm/5min y se trasladaron 50 μ l de cada muestra a una placa de 96 pozos. A continuación, se le adicionó 50 μ l de la mezcla de reacción del kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay cada muestra y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Finalmente se leyó la absorbancia a 490nm en un espectrofotómetro. Los datos se analizaron haciendo comparación relativa al control positivo tratado con Tritón X-100. Los datos obtenidos fueron procesados en Microsoft Office Excel 2010.

ANALISIS ESTADISTICO

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

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE DIOSGENINA-3-GLU POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Con el propósito de evaluar si la saponina esterooidal, Diosgenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de células tumorales provenientes de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cáncer de pulmón (SK-LU-1), éstas fueron tratadas con diferentes concentraciones de este compuesto (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g/ml}$). La concentración inhibitoria del 50% de proliferación (CI_{50}) fue calculada para cada línea celular mediante una regresión lineal.

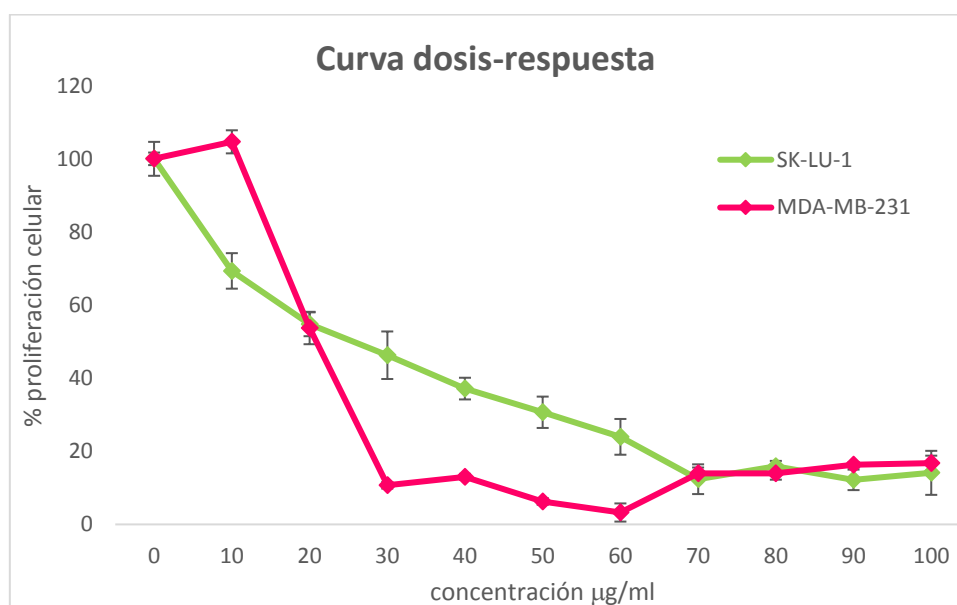


Figura 8. Efecto de la saponina Diosgenina-3-glu sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares tumorales SK-LU-1 y MDA-MB-231. El gráfico representa tres ensayos independientes con al menos 6 repeticiones.

Los resultados revelan como el compuesto Diosgenina-3-glu afectó el potencial proliferativo de ambas líneas celulares tumorales de manera dosis-dependiente, es decir, se obtuvo una disminución del número celular conforme incrementaba la concentración de la dosis administrada (figura 8). La concentración inhibitoria del 50% de proliferación (CI_{50}) obtenida para la línea celular proveniente de cáncer de pulmón (SK-LU-1) fue de 25 $\mu\text{g/ml}$ y para la línea celular proveniente de cáncer de mama (MDA-MB-231) fue de 20 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 5).

Tabla 5. Concentración inhibitoria del 50% de proliferación de Diosgenina-3-glu

MDA-MB-231	20 $\mu\text{g/ml}$ (34.6 μM)
SK-LU-1	25 $\mu\text{g/ml}$ (43.3 μM)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NECRÓTICA DE DIOSGENINA-3-GLU MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Debido a que la disminución de la proliferación observada pudo ser causada por un efecto necrótico, las células tumorales provenientes de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cáncer de pulmón (SK-LU-1) fueron tratadas 24 horas con la concentración inhibitoria del 50% de proliferación (CI_{50}) obtenida, posteriormente se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cada uno de los sobrenadantes provenientes de los cultivos de células tumorales (figura 9).

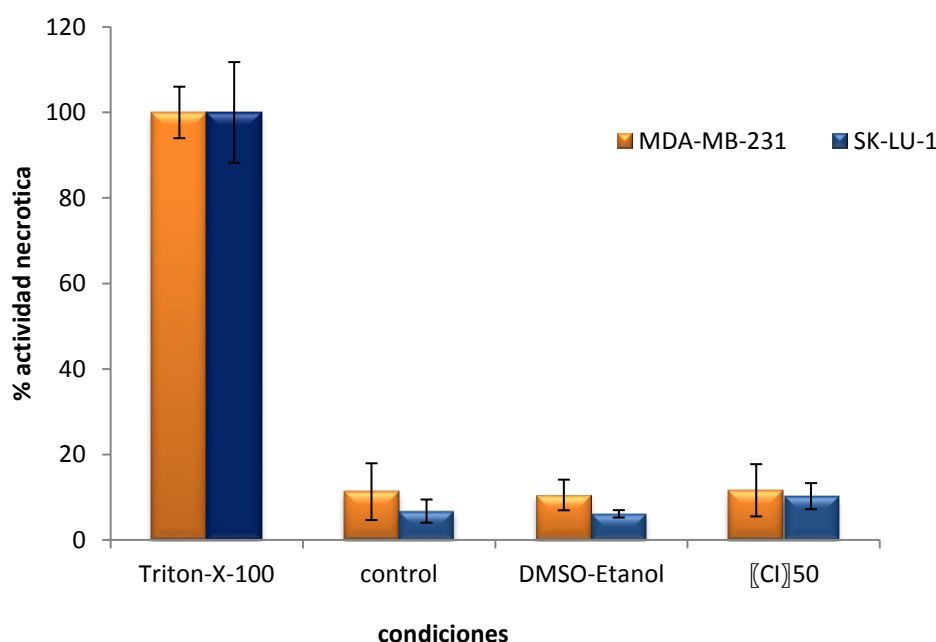


Figura 9. Determinación de la actividad de la enzima LDH en sobrenadantes de células tumorales tratadas 24 horas con la CI_{50} correspondiente para cada línea celular. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control, ANDEVA seguida de una prueba Tukey).

Una característica propia del proceso necrótico, es la pérdida de integridad de la membrana plasmática, por lo tanto, la presencia de enzimas citoplasmáticas como la LDH en sobrenadantes de cultivos celulares se utiliza como un parámetro para evaluar éste tipo de muerte. Los resultados muestran que las células tumorales tratadas con la CI_{50} obtenida no provocaron la liberación de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares esto indica que Diosgenina-3-glu no induce la pérdida de integridad de la membrana plasmática y por lo tanto no induce muerte por necrosis en ambas líneas celulares.

EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR EN CÉLULAS TRATADAS CON DIOSGENINA-3-GLU

Una vez que se determinó que el tratamiento con la saponina esteroideal no induce muerte de tipo necrótica en los cultivos de células tumorales, surge la duda si este tratamiento induce muerte por apoptosis en los cultivos celulares. Para averiguarlo se trataron cultivos de células tumorales MDA-MB-231 y SK-LU-1 con las CI_{50} correspondientes de Diosgenina-3-glu y se analizó por microscopia de contraste de fases si se producía un cambio en la morfología celular como parámetro inicial que indicara la inducción de muerte por apoptosis.

MDA-MB-231

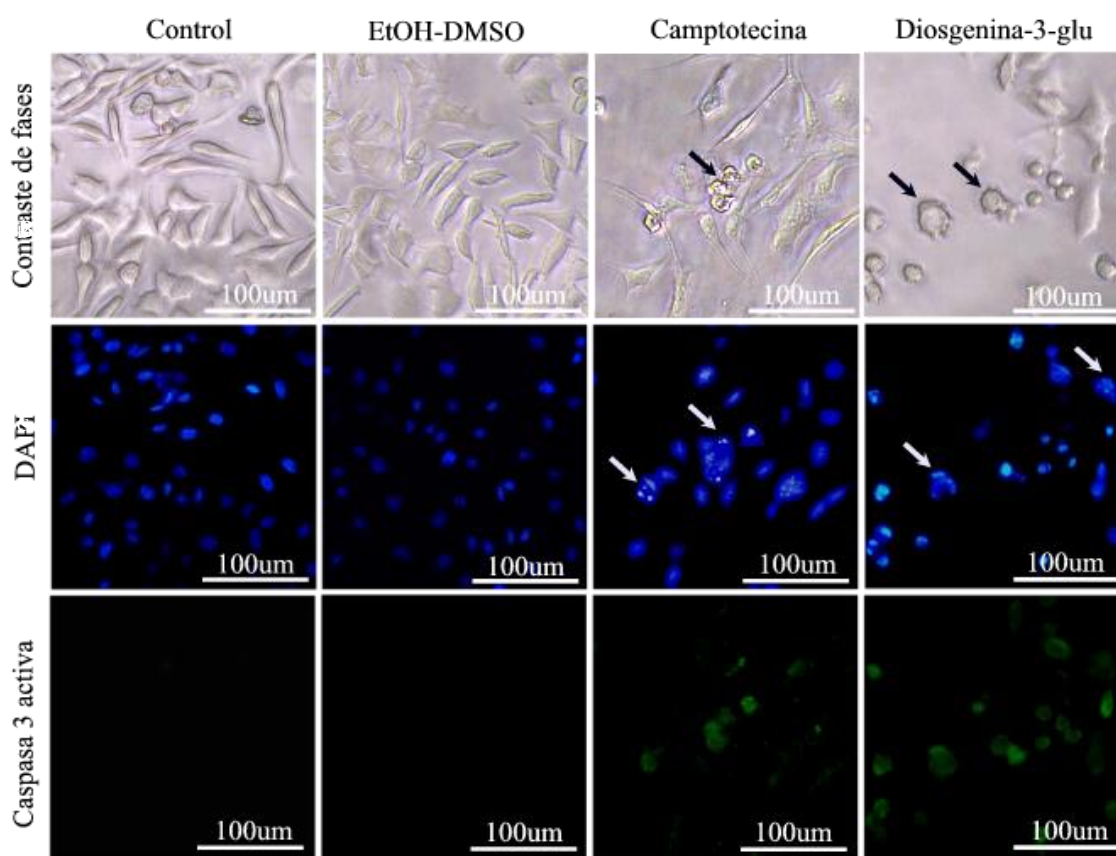


Figura 10. Efecto de Diosgenina-3-glu sobre la morfología de la línea celular MDA-MB-231 tratada con 20 $\mu\text{g/ml}$. CONTROL, células sin tratamiento. EtOH, células tratadas con la concentración de disolvente utilizada para solubilizar el compuesto (2 $\mu\text{l/ml}$ de DMSO-Etanol 3:1). CAMPTOTECINA, células tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina al 0.005%. DIOSGENINA-3-GLU, células tratadas con Diosgenina-3-glu por 24 horas con la CI_{50} correspondiente. Se observa la formación de cuerpos apoptóticos (flechas negras), fragmentación nuclear y condensación de la cromatina (flechas blancas).

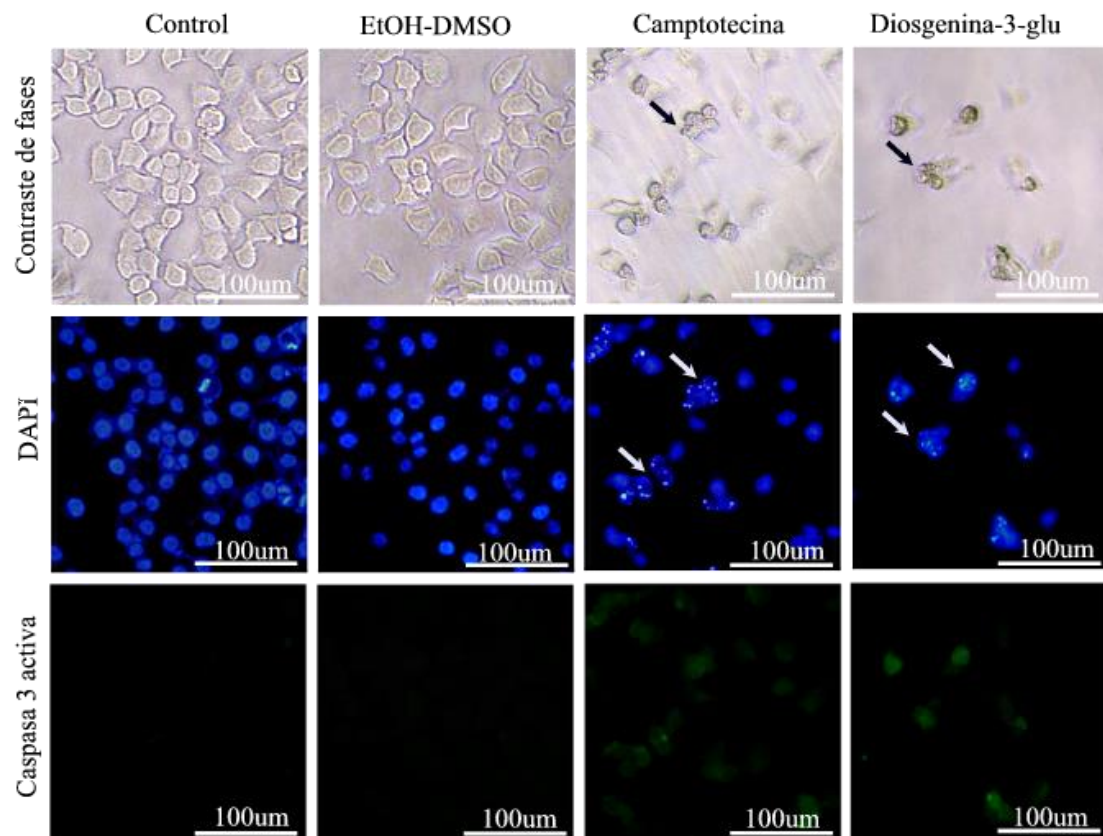


Figura 11 Efecto de Diosgenina-3-glu sobre la morfología de la línea celular MDA-MB-231 tratada con 25 µg/ml. CONTROL, células sin tratamiento. EtOH, células tratadas con la concentración de disolvente utilizada para solubilizar el compuesto (2µl/ml de DMSO-Etanol 3:1). CAMPTOTECINA, células tratadas con 10 µg/ml de camptotecina al 0.005%. DIOSGENINA-3-GLU, células tratadas con Diosgenina-3-glu por 24 horas con la CI_{50} correspondiente. Se observa la formación de cuerpos apoptóticos (flechas negras), fragmentación nuclear y condensación de la cromatina (flechas blancas).

Los resultados revelaron que la saponina Diosgenina-3-glu indujo un cambio importante en la morfología celular. En ambas líneas celulares se puede observar como algunas células han comenzado a perder adherencia, disminuyeron de tamaño y han tomado una forma esférica, en el caso de MDA-MB-231 es evidente la pérdida de sus proyecciones citoplasmáticas. Este cambio en la morfología celular indica que la disminución de la proliferación está asociada a una alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto, produciendo una deformación, resultado de la actividad de las proteasas. Además, muestran que la saponina Diosgenina-3-glu indujo condensación de la cromatina y fragmentación nuclear en ambas líneas celulares, esto acompañado de la activación de la caspasa 3, lo que se puede interpretar como un signo evidente de muerte celular apoptótica.

Por lo tanto, dado que la apoptosis es un tipo de muerte celular que se acompaña de una reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo (cariorexis) se podría entender que la saponina Diosgenina-3-glu ocasiona la inhibición de la proliferación en células tumorales acompañado de una morfología típica apoptótica.

DETECCIÓN DEL INCREMENTO DE CASPASA 3 ACTIVA EN CÉLULAS TRATADAS CON DIOSGENINA-3-GLU, POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Una vez que se a determinado que el tratamiento de las células tumorales con la Diosgenina-3 – glu induce muerte apoptótica, se procedió a cuantificar este evento biológico mediante la cuantificación de la caspasa-3 activa por citometría de flujo (figura 12).

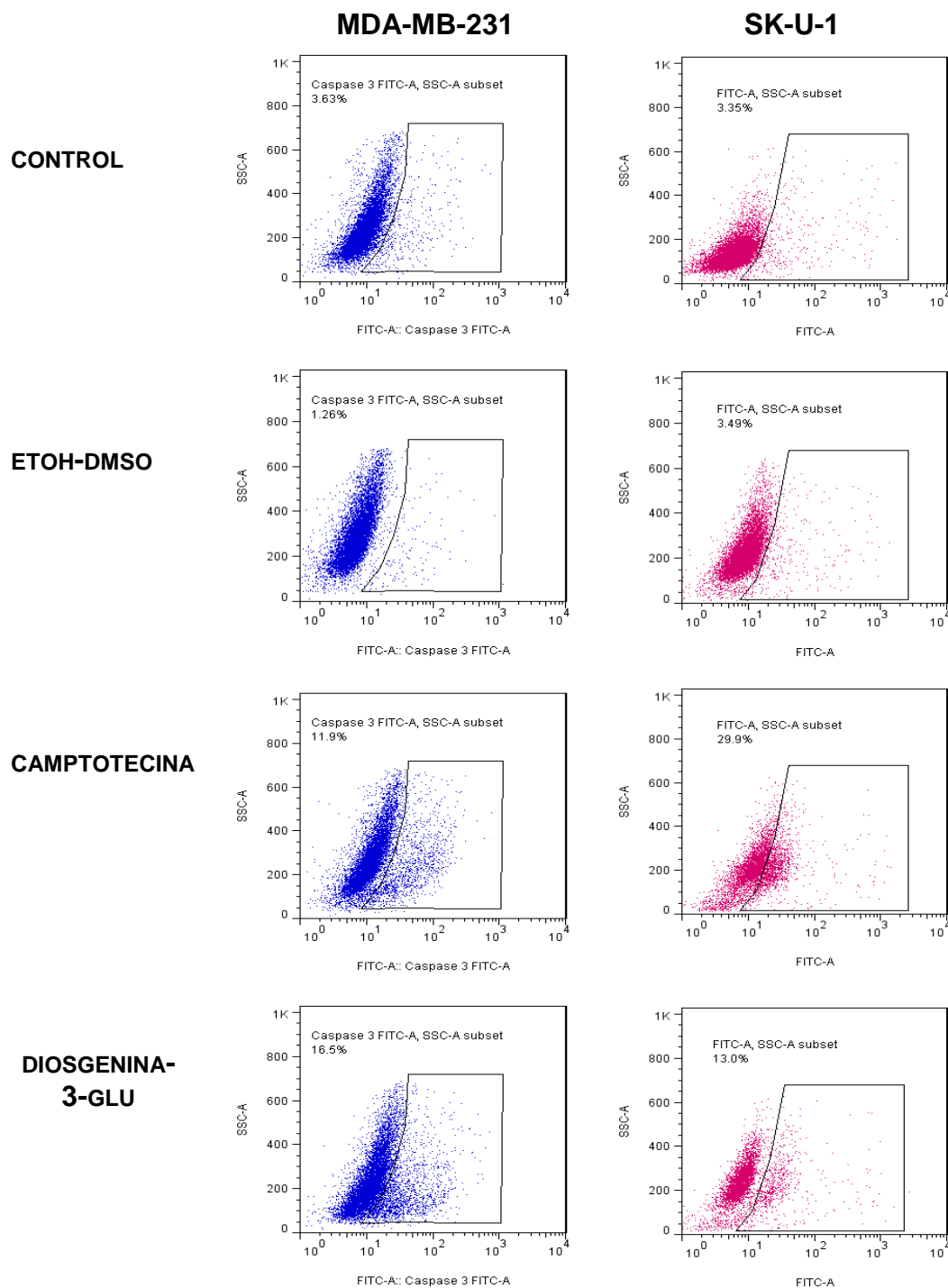


Figura 12. Efecto del compuesto Diosgenina-3-glu sobre la inducción de caspasa 3 activa en las líneas celulares MDA-MB-231 y SK-LU-1. El polígono marcado indica las células positivas a caspasa 3 activa.

Los resultados expresan que la Diosgenina-3-glu incrementa el número de células positivas a caspasa 3 activa en los cultivos de células tumorales en un porcentaje de 16.5% para la línea celular MDA-MB-231 y de 13.0 para la línea celular SK-LU-1, indicando que la muerte celular por apoptosis es dependiente de caspasa-3 (tabla 6).

Tabla 6. % Caspasa 3 activa		
Condición	MDA-MB-231	SK-LU-1
Control	3.63	3.35
EtOH/DMSO	1.26	3.49
Camptotecina	11.9	29.9
Diosgenina-3-glu	16.5	13.0

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DIOSGENINA-3-GLU SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS HUMANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE INCORPORACIÓN DE CARBOXIFLUORESCEÍNA (CFSE)

Además de la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis, otra cualidad buscada en los compuestos antineoplásicos es la selectividad, por lo tanto, se evaluó si la saponina Diosgenina-3-glu afectaba la proliferación de células no tumorales, para ello se obtuvieron linfocitos humanos de sangre periférica que posteriormente fueron marcados con carboxifluoresceína y activados con fitohemaglutinina. Después de 48 horas de proliferación las células fueron estimuladas con las CI_{50} correspondientes y evaluadas a las 24 horas mediante citometría de flujo (figura 13).

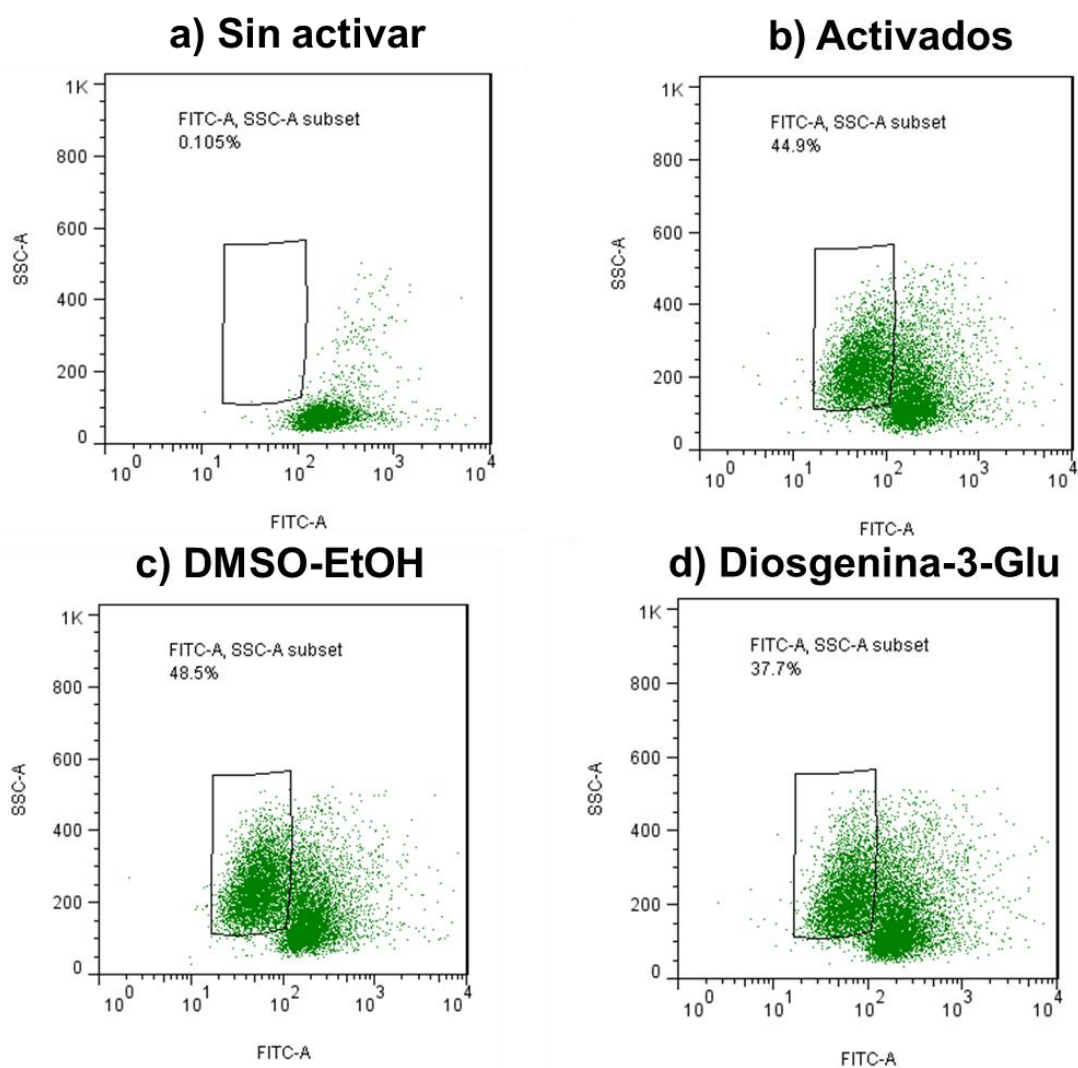


Figura 13 Efecto de Diosgenina-3-glu sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. La proliferación fue evaluada a través del marcaje con carboxifluoresceína y evaluada por citometría de flujo. A) linfocitos sin activar. B) linfocitos activados con fitohemaglutinina C) linfocitos tratados con 2µl/ml de DMSO-Etanol D) linfocitos tratados con la CI_{50} más alta obtenida con Diosgenina-3-glu (25 µg/ml). El polígono marcado indica la región de células en proliferación.

Los resultados muestran que la saponina Diosgenina-3-glu a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, afectó el potencial proliferativo de linfocitos humanos en un 16% con respecto al control (tabla 7), lo que determina su acción selectiva a la concentración evaluada.

Linfocitos sin activar	0.105%
Linfocitos activados	44.9%
EtOH-DMSO	48.5%
Diosgenina-3-glu	37.7%

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NECRÓTICA DE DIOSGENINA-3-GLU EN LINFOCITOS HUMANOS MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Una vez que se determinó que la Diosgenina-3-glu afectó el potencial proliferativo de linfocitos humanos en un 16% , se procedió a evaluar si se induce en ellos una muerte de tipo necrótica, para lo cual los linfocitos fueron tratados con 25 $\mu\text{g/ml}$ de la saponina y posteriormente se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cada uno de los sobrenadantes de los cultivos celulares (figura 14).

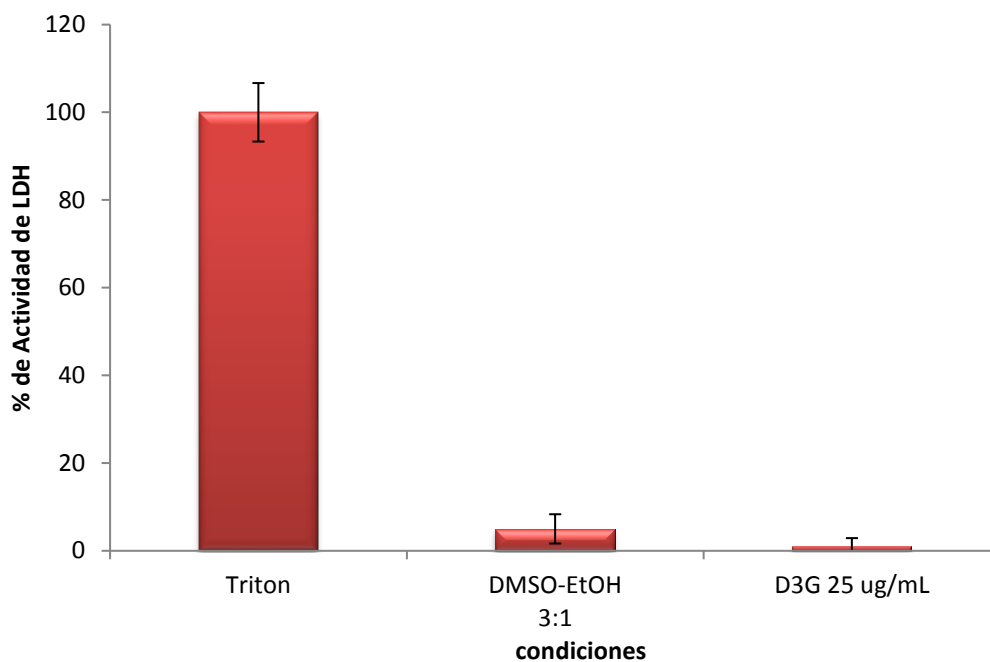


Figura 14. Determinación de la actividad de la enzima LDH en sobrenadantes de células linfocíticas tratadas 24 horas con 25 $\mu\text{g/ml}$. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control, ANDEVA seguida de una prueba Tukey).

Los resultados muestran que las células no tumorales tratadas con 25 $\mu\text{g/ml}$ no provocó de manera estadísticamente significativa la liberación de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares (tabla 8). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la saponina Diosgenina-3-glu no induce muerte por necrosis en linfocitos humanos.

Tabla 8. % Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)	
Tritón	100 %
EtOH-DMSO	5 %
Diosgenina-3-glu	1%

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Nunca había tenido el mundo, como sucede en la actualidad, tantas armas terapéuticas para hacer frente al cáncer, sin embargo, todavía continua la búsqueda de tratamientos que ofrezcan mayor seguridad, toxicidad mínima (o ninguna), y una mejor disponibilidad, alternativas como los fitoquímicos naturales que se encuentran en los alimentos son cada vez más populares entre las drogas sintéticas (Raju, 2009).

Las saponinas esteroidales son glucósidos naturales presentes en plantas, en las familias *Liliaceae*, *Dioscoreaceae*, *Agavaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Amaryllidaceae*, *Leguminosae* y *Rhamnaceae*. Estos metabolitos secundarios poseen propiedades como la producción de espuma, la actividad hemolítica y la formación de complejos con el colesterol (Podolak, 2010). Algunas de las saponinas esteroideas aisladas recientemente han demostrado ser antidiabéticas, antitumorales en asociación con la modificación del sistema inmunitario e inhibidores de la agregación plaquetaria (Mimaki, 2001).

Dentro de las saponinas esteroideas con actividad antitumoral se encuentra la diosgenina, una saponina esteroidea derivada de la dioscina; biosintetizada por varias especies vegetales del género *Dioscorea*. La dioscina es una de las saponinas esteroidales más comunes y se ha aislado de más de veinte géneros de plantas, incluyendo varios vegetales y plantas medicinales. Se encuentra entre las saponinas espirostánicas con mayor actividad antiproliferativa y exhibe citotoxicidad frente a varios tipos de células cancerosas con valores de IC50 en el orden micromolar.

Estructuralmente, la diosgenina es una saponina espirostanol que consiste en un azúcar hidrófilico unido a una aglicona esteroide hidrofóbica (Raju, 2012). Se han realizado un número limitado de experimentos para comprender el efecto preclínico de la diosgenina como agente quimiopreventivo / terapéutico contra el cáncer. Los estudios mecanicistas que utilizan modelos *in vitro* sugieren que la diosgenina suprime el crecimiento de células cancerosas a través de múltiples eventos de señalización celular asociados con la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación y oncogénesis (Raju, 2012), es decir, parece que el efecto de la diosgenina contra varios tipos de cáncer no es a través de un mecanismo único; ya que implica múltiples dianas celulares y moleculares (Raju, 2009).

En este y otros casos, los principios activos naturales pueden ser modificados en su estructura molecular básica con la finalidad de obtener compuestos más estables y efectivos, con escasos efectos colaterales y de fácil asimilación por el organismo (Cortez, 2004).

Informes recientes mostraron que la Diosgenina-3-glu, un derivado de la diosgenina, es capaz de inhibir la proliferación celular tumoral e inducir multinucleación debido a una catástrofe mitótica *in vitro* en diferentes líneas celulares (Mimaki, 2001; Shu-li, 2013; Liu, 2004).

Para valorar la posible introducción de la Diosgenina-3-glu como un posible agente terapéutico para el tratamiento del cáncer, en el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico ejercido sobre dos líneas celulares tumorales.

Los resultados revelan cómo el compuesto Diosgenina-3-glu afectó el potencial proliferativo de ambas líneas celulares tumorales de manera dosis-dependiente, es decir, se observó una disminución del número celular conforme incrementaba la concentración de la dosis administrada.

Las observaciones de numerosos estudios confirman que la actividad biológica de las saponinas está influenciada tanto por la aglicona como por la fracción de azúcar (Podolak, 2010).

La aglicona posee *per se* propiedades citotóxicas, sin embargo, la actividad biológica de la saponina está fuertemente influenciada por la cadena lateral del azúcar, en especial por el enlace del azúcar, el número, la lipofilia y los diferentes tipos que se presentan (Man, 2010; Ahumada, 2016). Esto se puede apreciar claramente cuando comparamos el efecto antiproliferativo de una saponina unida a una glucosa (diosgenina-3-glu), una saponina unida a una ramnosa (dioscina) y de una saponina, es decir, una saponina sin azúcar (diosgenina), es decir, las 3 saponinas presentan la misma aglicona en su estructura y solamente cambia el sustituyente del C-3. Las CI_{50} reportadas demuestran que la presencia de la ramnosa en el C-3 potencia la actividad citotóxica de la diosgenina, sin embargo la presencia de una glucosa en la misma posición no parece incrementar fuertemente este efecto en las líneas celulares tumorales HL-60 y LA795 (Shu-li, 2013). En el caso de las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa la ramnosa en el C-3 incrementa la actividad citotóxica de la diosgenina,

sin embargo la presencia de una glucosa en la misma posición disminuyó su actividad (López, 2013). En el caso de la línea celular K562 la dioscina y la diosgenina presentaron un efecto muy similar y para esta línea en particular diosgenina-3-glu tuvo un efecto ligeramente mayor (Liu, 2004; Liu, 2005). Por último, en la línea celular MDA-MB-231 la diosgenina presentó un efecto más potente y la adición de la glucosa disminuyó drásticamente su actividad (Aumsuwan, 2016). Los resultados obtenidos revelan, por lo tanto, que la glucosa afecta negativamente la actividad antiproliferativa de la diosgenina en la línea celular MDA-MB-231. En el caso de la línea celular SK-LU-1 no hay aún estudios sobre su actividad antiproliferativa en Diosgenina y Dioscina, sin embargo, estos nuevos datos reiteran su actividad antiproliferativa.

Además, en el presente trabajo se demostró que la disminución en la proliferación no estaba asociado a una muerte por necrosis en ambas líneas celulares, entonces dado que se ha reportado que su precursora diosgenina induce fuertemente a apoptosis, la adición de la glucosa al carbono 3 no promovió un efecto negativo.

Los resultados demostraron cómo la saponina Diosgenina-3-glu causó un cambio drástico en la morfología celular acompañado de compactación de la cromatina y fragmentación nuclear.

En la fase final de la apoptosis, las endonucleasas provocan la partición del ADN (fragmentación del ADN) a nivel de las regiones internucleosomales, lo que origina fragmentos de unos 200 pares de bases, estas endonucleasas son activadas por caspasas. Por lo tanto, la evaluación del incremento de activación de la caspasa 3, (16.5% para la línea celular MDA-MB-231 y de 13.0% para la línea celular SK-LU-1) corroboró que las células tumorales tratadas con Diosgenina-3-glu presentaban una muerte celular apoptótica. Entonces, dado que la diosgenina son moléculas inductoras de apoptosis en varias líneas celulares de cáncer incluida la línea MDA-MB-231 (Kim, 2014) la presencia de una glucosa en el carbono 3 no alteró esta actividad biológica. Además diosgenina-3-glu indujo un incremento mayor de células positivas a caspasa 3 (16.5%), en contraste con diosgenina (4.35%) (Rosas, 2016) para la línea celular MDA-MB-231.

Los resultados obtenidos también muestran que la saponina Diosgenina-3-glu a una concentración de 25 µg/ml, afectó el potencial proliferativo de linfocitos humanos en un 16% sin causar necrosis. Por lo tanto en conjunto los resultados muestran que la

diosgenina-3-glu inhibe la proliferación celular tumoral mediante la inducción de apoptosis, sin afectar la proliferación de células linfocíticas no tumorales, lo que establece su acción selectiva a la concentración probada. La inducción de apoptosis y la selectividad son dos cualidades ampliamente buscadas en los tratamientos antineoplásicos, por lo tanto, aunque se requieren de más estudios, la saponina diosgenina-3-glu representa un buen candidato como potencial quimioterapéutico.

CONCLUSIONES

El compuesto Diosgenina-3-glu afecta el potencial proliferativo de manera dosis-dependiente de las líneas celulares MDA-MB-231 y SK-LU-1 con una CI_{50} de 20.3 y 25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

La concentración inhibitoria del 50% de proliferación no presenta un efecto necrótico en las líneas tumorales MDA-MB-231 y SK-LU-1.

La saponina Diosgenina-3-glu induce muerte por apoptosis en ambas líneas celulares MDA-MB-231 y SK-LU-1.

La Diosgenina-3-glu afectó la proliferación de células linfocíticas humanas no tumorales en un 16% sin inducir muerte por necrosis.

LITERATURA CITADA

- Allinen, M. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* , 17-32.
- Anderson, B. (2008). Guideline Implementation for Breast Healthcare in. *Cancer*; 2221-43.
- Angulo, A. (2012). *Biología celular*. Sinaloa, México: UAS-DGEP.
- Aumsuwan, P. (2016). The anticancer potential of steroidal saponin, dioscin, isolated from wild yam (*dioscorea villosa*) root extractin invasive human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 98-110.
- Banerji, S. (2012). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* , 405-409.
- Bartolomé, A. (2007). *Diagnóstico y tratamiento. Cáncer de Pulmón*. Madrid: Fundación Médica Mutua Madrileña.
- Benson, J. (2006). Validating cancer drug targets. *Nature* , 451-456.
- Brandan, M. (2006). Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología 1* , 147-162.
- Bray , F. (2018). Estimación de la incidencia mundial de cáncer y mortalidad en 2018. Obtenido de GLOBOCAN: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>
- Campbell, N. (2007). *Biología*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Candido, J. (2013). Cancer-Related Inflammation. *J Clin Immunol* , 579-84.
- Carretero, J. (2005). Carcinógenos y origen del cáncer de pulmón. En M. Sánchez-Céspedes, *Cáncer de pulmón*(págs. 41-44). Madrid: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.
- Chen, P. (2011). Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer pc-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *Plos one*.
- Chiang, C.-T. (2007). Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *Federation of European Biochemical Societies* , 5735–5742.
- Collins, I. (2006). New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat Chem Biol* , 689-700.
- Corbiere, C. (2003). Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol* , 899-905.
- Corbiere, C. (2004). Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Research* , 188-196.

- Cortez, V. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. 2004 , 123- 136.
- De Toro, G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. Actas hispanoamericanas de Patología , 1-6.
- DeBerardinis, R. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Metabolism , 11-20.
- Douglas, R. (2012). The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? Trends in Cell Biology , 555-556.
- Eguino, A. (2005). Cáncer de pulmón Una Guía práctica. Madrid: Asociación Española Contra el Cáncer.
- Elena. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. Revista Argentina de Anestesiología , 391-401.
- Fink, S. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. Infection and Immunity , 1907–1916.
- Franco, J. (2005). Epidemiología del cáncer de pulmón. En M. Sánchez-Céspedes, Cáncer de pulmón(págs. 17-23). Madrid: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.
- Galluzzi, L. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. Cell death and differentiation , 1237-1266.
- Galluzzi, L. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death and Differentiation , 1093–1107.
- Galluzzi, L. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death and Differentiation , 107-120.
- Galluzzi, L. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death & Differentiation , 486-541.
- Gandur, N. (2004). Introducción a la oncología. Breve historia del cáncer. Definiciones. En S. Aibar, Manual de enfermería oncologica (pág. 7). Buenos Aires: Instituto Nacional del Cancer.
- García, J. (2000). Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética. ANALES , 31-52.
- Garza, J. (2014). El Cáncer. Nuevo León: La ciencia a tu alcance, 35-45.
- Golstein, P. (2006). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Biochemical Sciences , 37-43.
- Hamid, A. (2014). Synthesis of novel anticancer agents through opening of spiroacetal ring of diosgenin. Steroids , 108–118.
- Hanahan, D. (2000). The Hallmarks of Cancer Review. Cell , 57-70.

- He, Z. (2012). Anti-tumour and immunomodulating activities of diosgenin, a naturally occurring steroidal saponin. *Natural Product Research* , 2243–2246.
- He, Z. (2014). Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. *Phytomedicine* , 871–876.
- Health, O. P. (2013). *Safe Handling of Hazardous Chemotherapy Drugs in Limited-Resource Settings*. PAHO , 1.
- Homedes, N. (2009). *Medicamentos. Entre la salud y el mercado*. Barcelona: Icaria Antrazyt.57
- Hotchkiss, R. (2009). *Cell Death. Mechanisms of disease* , 1570-1583.
- Huo, R. (2004). Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacologica Sinica* , 1077-1082.
- Jagadeesan, J. (2013). Diosgenin exhibits beneficial efficiency on human mammary carcinoma cell line MCF-7 and against N-nitroso-N-methylurea (NMU) induced experimental mammary carcinoma. *Biomed. Prev. Nutr.* , 381–388.
- Jagadeesan, J. (2012). Diosgenin, a steroidal saponin, exhibits anticancer activity by attenuating lipid peroxidation via enhancing antioxidant defense system during NMU-induced breast carcinoma. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* .
- Jiménez, F. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson educación.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica* , 100-106.
- Jutinico, A. (2015). Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*, 83-92.
- Karp, G. (2004). *Biología Celular y molecular: conceptos y experimentos*. Mc Graw Hill.
- Kepp, O. (2011). Cell death assays for drug discovery. *Drug Discovery* , 221-237.
- Kerr, J. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Cáncer* , 239-257.
- Kim, E.-A. (2014). Dioscin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis* , 1165–1175.
- Kindt, T. (2007). *Inmunología de Kuby*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Kroemer, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation* , 1463-1467.
- Kueng, W. (1989). Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates, *Analytical biochemistry*. 16-19
- Kumar, V. (2013). *Robbins. Patología humana*. Barcelona, España: Elsevier Inc.

- Lambertini, M. (2016). Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Treatment Reviews* , 65-76.
- Leger, D. (2004). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in hel cells with increase in intracellular calcium level, activation of CPLA2 and COX-2 overexpression. *Int. J. Oncol.* , 555–562.
- Li, F. (2010). Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters* , 197–207.
- Liagre, B. (2005). Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 map kinase signalling and inhibition of NF-kappaB binding. *Int. J. Mol. Med.* , 1095–1101.
- Liu, M.-J. (2005). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol* , 79–90.
- Liu, M.-J. (2004). The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.* , 1059—1065 .
- Luo, J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* 136 , 823-837.
- López M. (2013). Efecto antitumoral de los derivados sapogenínicos provenientes de la diosgenina. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, FES-Zaragoza, México.
- Macedo, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas* , 97-103.
- Martínez, J. (2007). *Cáncer de mama*. Cuernavaca, México: NLS.
- McCall, K. (2010). Genetic control of necrosis—another type of programmed cell death. *Cell Biology* , 882-888.
- Meza, J. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica* , 56-70.
- Mimaki, Y. (2001). Cytotoxic Activities and Structure–Cytotoxic Relationships of. *Pharmaceutical Society of Japan* , 1286-1289.
- Miyoshi, N. (2011). Chemoprevention of Azoxymethane/Dextran Sodium Sulfate–Induced Mouse Colon Carcinogenesis by Freeze-Dried Yam *Sanyaku* and Its Constituent Diosgenin. *Cancer Prev Res* , 924-934.
- Moalic, S. (2001). A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cell. *FEBS Letters* , 225-230.
- Moctezuma Velasco, C. (2009). Cáncer de pulmón. *Anales de Radiología México* , 33-45.

- Mohar, A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *J Glob Oncol* , 740–748.
- Newman, D. (2008). Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? *J. Med. Chem.* , 2589–259.
- Nicotera, P. (2004). Regulacion of the apoptosis- necrosis switch. *Oncogene* , 2757-2765.
- Patel, K. (2012). A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Nat. Prod. Bioprospect.* , 46–52.
- Putney, J. (2005). Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *The Journal of Cell Biology* , 381–382.
- Rahmati, M. (2014). Fenugreek extract diosgenin and pure diosgenin inhibit the hTERT gene expression in A549 lung cancer cell line. *Mol Biol Rep* , 6247–6252.
- Raju, J. (2004). Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), Inhibits Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in F344 Rats and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* , 1392-1398
- Raju, J. (2009). Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin. *Nutrition and Cancer* , 27–35.
- Raju, J. (2012). Diosgenin, a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: Emerging evidence for applications. In *Bioactive Compounds Medicine in Phytomedicine*. Rasooli, I., Ed , 125–142..
- Ramírez,E. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *IATREIA* , 166-177.(2016). En C. Rivas Morales, *Investigación en plantas de importancia médica*, 269-312.
- Rizo, P. (2015). Trends in cancer mortality in Mexico: 1990---2012. *Sociedad Médica del Hospital General de México* , 85-94.
- Romero, A. (2014). Cáncer de Mama: Entidad Patológica de Biología Heterogénea. *Arch Salud Sin* , 109-116.
- Rosas, A. (2016). Actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica de la sapogenina esteroideal diosgenina, en cultivos de células tumorales y no tumorales. Tesis de Licenciatura Biología, FES-Zaragoza, México.
- Sanchez, C. (2013). Conociendoy comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cancer. *Revista Medica Clinica Condes* , 553-562.
- Sánchez-Céspedes, M. (2005). Alteraciones genético-moleculares en el cáncer de pulmón. En M. Sánchez-Céspedes, *Cáncer de pulmón*. Madrid: Centro Ncaional de Investigaciones Oncologicas, 47-49.
- Sethi, G. (2018). Pro-Apoptotic and Anti-Cancer Properties of Diosgenin: A Comprehensive and Critical Review. *Nutrients* , 645.

- Shishodia, S. (2006). Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I kappa B kinase activation and NF-kappa B-regulated gene expression. *Oncogene*, 1463–1473.
- Shu-li, M. (2013). Phytochemistry, Pharmacology, Toxicology, and Structure-. *Chinese Herbal Medicines*, 33-46.
- Slatore, C. (2014). Tratamiento del cáncer de pulmón. *Am J Respir Crit Care Med*.
- Solís, J. (2004). Apoptosis: a rapid and silent form of death. *Revista española de enfermedades digestivas*, 512-514.
- Sowmyalakshmi, S. (2005). Effect of diosgenin (Fenugreek) on breast cancer cells. *Cancer Res*, 1382.
- Srinivasan, S. (2009). Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 961–967.
- Tessler, J. (2004). Quimioterapicos antineoplasicos e inmunosupresores. *Farmacología II*, 1-31.
- Trouillas, P. (2005). Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1141–1149.
- Vega-Ávila, E. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*, 97-111.
- Wang, S.-L. (2004). Diosgenin-3-O- α -l-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -dglucopyranoside obtained as a new anticancer agent from *Dioscorea futschauensis* induces apoptosis on human colon carcinoma HCT-15 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *Journal of Asian Natural Products Research*, 115-125.
- Wang, Y. (2007). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorg. Med. Chem.*, 2528–2532.
- Wang S, W. F. (2017). Diosgenin glucoside provides neuroprotection by regulating microglial M1 polarization. *Int Immunopharmacol*, 22-29.
- Weinstein, B. (2002). Addiction to Oncogenes—the Achilles Heal of Cancer. *Science* 297 (5578), 63-64.
- Yan, L. (2009). In vitro and in vivo anticancer activity of steroid saponins of *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis*. *Exp. Oncol.*, 27–32.

**LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**
y
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente
Constancia
a:
Luna cabañas Monica Isabel, López Muñoz Hugo, Sánchez Sánchez Luis, Escobar Sánchez Ma Luisa, Reyes Hernández Octavio Daniel.
Por la presentación del trabajo:
“ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, NECRÓTICA Y APOPTÓTICA DE LA SAPONINA ESTEROIDAL DIOSGENINA-3-GLU EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN SK-LU-1”
en el XXIII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud
22 al 26 de Octubre de 2018
Sala Cuicacaalli
Dr. José Luis Gómez Olivares
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Coordinadora
Dra. Elsa Cervantes Ríos
Coordinadora
