



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en diferenciación celular y cáncer

Laboratorio de Biología molecular y cáncer

Unidad Multidisciplinaria de investigación experimental zaragoza

Determinación de la ruta de inducción de apoptosis del compuesto hidroclorehidrato de 2-amino-2-deoxi- β -d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) en células de cáncer de mama (MDA-MB-231), pulmón (SK-LU-1) y cervicouterino (CaSki)

TESIS

Para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA

Conejo Carrasco Braulio

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Hugo López Muñoz



CDMX, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser uno de los mejores lugares donde pude estar

Al Dr. Hugo López Muñoz, por ser un buen guía al compartir todos sus conocimientos posibles de diferentes ámbitos, así como demostrarme las actitudes que debe tener un buen investigador

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por haberme aceptado como miembro de su equipo de trabajo además de ayudarme a comprender mejor diferentes aspectos de nuestra área de investigación

Al Dr. Octavio Reyes Hernández por apoyarme con sus conocimientos tanto en mi investigación como en mis experimentos durante todo el tiempo que pertencí en el laboratorio

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por sus observaciones y correcciones realizadas para mejorar este trabajo

A la M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez por sus observaciones y correcciones realizadas para mejorar este trabajo

Al Dr. Fernando Flores Guzmán que compartió muchas de sus experiencias mismas que, junto con sus conocimientos, me ayudaron a comprender mucho mejor el enorme mundo de la investigación

Esta tesis fue realizada con el apoyo de los
proyectos:

CONACyT 255881 y 258156

PAPIIT IN-226420 y IN-216718

DEDICATORIAS

A toda mi familia que me brindo toda su confianza y apoyo siempre que era necesario, además de estar siempre que los necesitaba. Gracias a ellos puedo estar en donde estoy y comprendí el tipo de hombre que quiero ser en el futuro.

A mis amigos dentro y fuera del laboratorio Jorge, Ulises Fer, Uriel, Bety, Helena, Mónica, Maya, Paloma, Diego, Andrea, Karen y Aida con quienes pasé muy buenos momentos con los cuales pude disfrutar completamente esta etapa de mi vida y que sin su compañía habría resultado más difícil llegar a estos momentos.

Contenido	
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CICLO CELULAR	7
MUERTE CELULAR	8
NECROSIS	9
APOPTOSIS	10
CÁNCER.....	14
Cáncer de pulmón	15
Cáncer cervicouterino	16
Cáncer de mama.....	18
SAPONINAS.....	19
Dioscina	21
Diosgenina	22
Diosgenina-3-glu	23
Hidroclorhidrato de 2-amino-2-deoxi-b-d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11)	23
Glucosamina	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
MÉTODO.....	27
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA	49
APÉNDICE	57

RESUMEN

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y aunque se pueden encontrar algunos tratamientos para combatirlo, todos ocasionan efectos secundarios. Por lo anterior, una prioridad es encontrar alternativas que logren eliminar las células cancerígenas de una manera eficaz. Es el caso de las saponinas, a las que se les ha atribuido diferentes propiedades biológicas entre las que destaca la anticancerígena.

Ejemplo de estas moléculas, es el compuesto hidroclorehidrato de 2-amino-2-deoxi- β -d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11), el cual es una saponina esteroidea, que se ha demostrado que tiene un potencial contra el cáncer ya que logra eliminar a las células malignas por la vía de la apoptosis. Sin embargo, para que se logre desarrollar como un medicamento contra el cáncer primero se debe de conocer de manera exacta la ruta por la cual se lleva a cabo la apoptosis, por lo que se busca resolver esta problemática en el presente trabajo

Los resultados obtenidos nos muestran el efecto que produce el MF-11 en el potencial antiproliferativo de las células tumorales MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki con una IC_{50} de 25.91 μ g/ml 24.05 μ g/ml y 25.45 μ g/ml respectivamente. Al evaluar muerte por necrosis, no se logró encontrar una diferencia significativa entre los grupos control y a los que se le añadió el compuesto. Por otro lado, observando la morfología que presentaban las células, los cambios eran muy notorios ya que las células se compactaban, además gracias al fluorocromo DAPI, se vio que su cromátida se encontraba compactada y en algunos casos fragmentada. Esto aunado a la presencia de la caspasa-3 activa, indica que este compuesto ocasiona en las células tumorales una muerte apoptótica.

En cuanto a la ruta de apoptosis que es activada, los resultados nos demuestran que la apoptosis se lleva a cabo mediante la ruta extrínseca por la presencia de la caspasa-8; aunado a esto, el hecho de que la caspasa-9 también se logre presentar da a entender que el MF-11 logra hacer que ambas rutas convergen, y esto se ve reflejado en el momento en que algunas proteínas proapoptóticas aumentan su concentración como lo son BAX y BID, siendo esta última una parte importante en donde tanto la ruta extrínseca como la intrínseca se unen. Además, se aprecia una disminución en la proteína Bcl-2, misma que presenta una sobreexpresión en células cancerígenas y a esto se le atribuye la resistencia a la apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del microscopio óptico supuso una gran revolución para la biología. Permitted descubrir los microorganismos, pero más importantes aun permitió descubrir que todos los seres vivos están formados de células. La célula es la unidad estructural y funcional de todos los seres vivos. Encontramos seres unicelulares (formado por una única célula), y organismos pluricelulares (formados por numerosas células). La célula de los organismos pluricelulares, que pueden ser pocas hasta millones, han perdido la capacidad de vivir independientemente y en cambio se organizan y reparten las funciones para crear un único organismo armónico (Orengo, 2012). Una célula tiene la capacidad de producir dos células hijas idénticas mediante un conjunto de procesos a los que se denominan ciclo celular.

CICLO CELULAR

El ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de la cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre (Figura 1). El control temporal preciso de los acontecimientos del ciclo celular asegura que la replicación de cromosomas y su segregación a las células hijas se produzca en el orden apropiado y con una fidelidad extraordinariamente alta (Lodish, 2005).

La mitosis se alterna con una etapa más larga llamada interfase, misma que se divide en tres subfases: la fase G₁, la fase S y la fase G₂. Durante la fase G₁, las células mantienen un número constante de cromosomas y su contenido en el ADN no está duplicado. La cromatina se descondensa de forma gradual hasta adoptar una conformación totalmente extendida, necesaria para la separación de las dos hebras en la siguiente fase. En este periodo la célula determina si las condiciones ambientales e internas son adecuadas para la división celular.

En la siguiente fase, la fase S o de síntesis, se produce la replicación del ADN de los cromosomas individuales. Cada hebra de este ADN sirve de molde para la síntesis o producción de la hebra nueva, que permanece asociada por apareamiento de bases. Las dos moléculas de ADN resultantes permanecen unidas por el centrómero, con lo que dan lugar a cromosomas con cuatro hebras de ADN. Las dos copias de cada cromosoma replicado permanecen íntimamente entre sí como cromátidas hermanas idénticas.

El ciclo continua con G₂, en donde la célula verifica si se ha completado la fase S de forma correcta y decide entre permitir el paso a mitosis, o de lo contrario, esperar a que se realicen las reparaciones necesarias. Se inicia la condensación de la cromatina que se completa en las primeras etapas de la mitosis.

Por último, se encuentra la fase M (mitosis) que es, en sí, un proceso continuo, que para su estudio se divide en etapas. Las primeras (profase, metafase, anafase y

telofase) constituyen la mitosis, y la citocinesis se produce en la última etapa. El eje principal de la mitosis consiste en separar y distribuir de manera equitativa los cromosomas con la finalidad de que cada célula hija reciba una copia idéntica del genoma (Borunda, 2013).

Para la división celular se precisa la sucesión controlada de dos acontecimientos críticos del ciclo celular: La fase S y la fase M. El comienzo de cada una de estas fases está regulado cuidadosamente y da lugar a dos “puntos de control” en el ciclo: uno al comienzo de S y otro al inicio de M. La integridad de los puntos de control resulta esencial para poder mantener la integridad genética y la incapacidad de detener el ciclo celular en los puntos de control cuando es necesario hacerlo constituye la característica distintiva del cáncer (Rang & Dale, 2008). En el caso de que el ADN se encuentre dañado, el ciclo se detendrá en uno de estos puntos de control hasta que el daño sea reparado, sin embargo, la célula no es capaz de reparar dicho daño la misma célula se verá obligada a llevar a cabo la muerte celular programada.

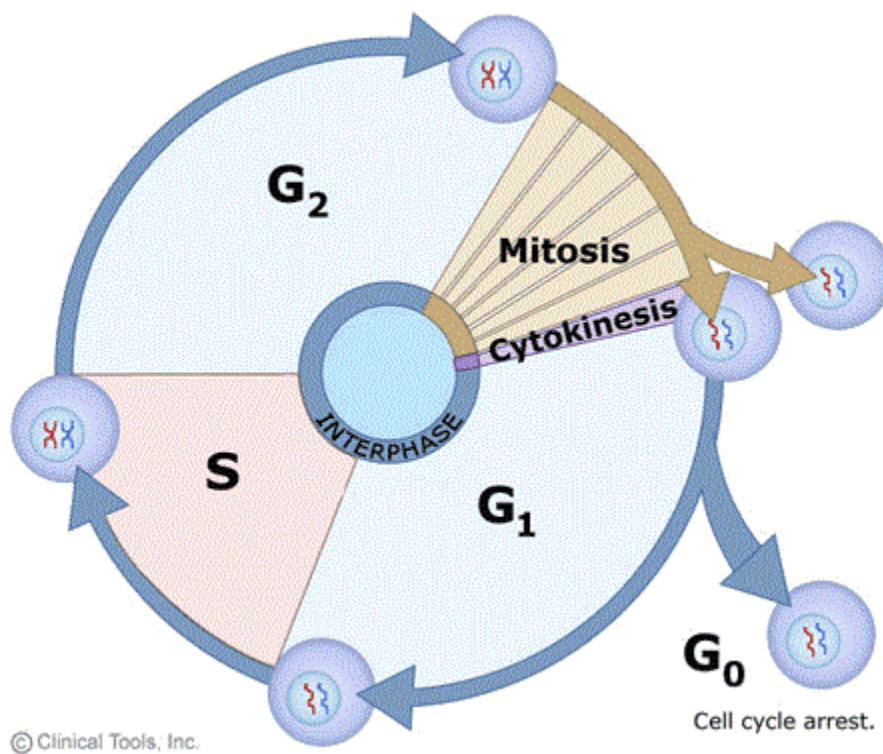


Figura 1. Fases en la que se divide el ciclo celular. Imagen tomada y modificada de <https://www2.le.ac.uk/projects/vqec/highereducation/topics/cellcycle-mitosis-meiosis>

MUERTE CELULAR

El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constantes. El recambio celular en los tejidos de un

organismo se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre proliferación y muerte celular, a fin de garantizar la población adecuada en cada momento. Un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, falta de nutrientes, entre otras (Lizarbe, 2007). La muerte celular puede ser el producto de una lesión accidental o de mecanismos que causen la autodestrucción de las células, los dos mecanismos principales de muerte celular son necrosis y apoptosis (Ross & Pawlina, 2007).

NECROSIS

La necrosis se ha definido como la serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria. Se ha entendido la necrosis como una muerte celular no controlada que promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y puede favorecer la diseminación de patógenos en un hospedero susceptible (Agudelo & López, 2010).

Este tipo de muerte se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia (Elena, 2002; Iracheta, 2007). En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y la salida del material intracelular (Agudelo & López, 2010) (Figura 2). La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Iracheta, 2007). Por otro lado, la pérdida de los potenciales de membrana, misma que es la característica fundamental para diferenciar la apoptosis de la necrosis, 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 cual ocurre primero (De Toro, 2006).

Entre todos los fenómenos que aparecen en la necrosis, el que inicialmente se consideró clave fue el agotamiento del ATP en un ambiente hipóxico por isquemia prolongada, e incluso, en ambientes altamente oxidantes durante la reperusión. El agotamiento del ATP altera el flujo de iones y se liberan y activan las enzimas propias de cada tipo celular, además puede llevar a la apertura de los canales de muerte en la membrana citoplasmática generando así una gran fuerza coloidal osmótica y entrada de cationes que llevan al hinchamiento celular y posterior ruptura de membrana (De Toro, 2006; Agudelo & López, 2010).

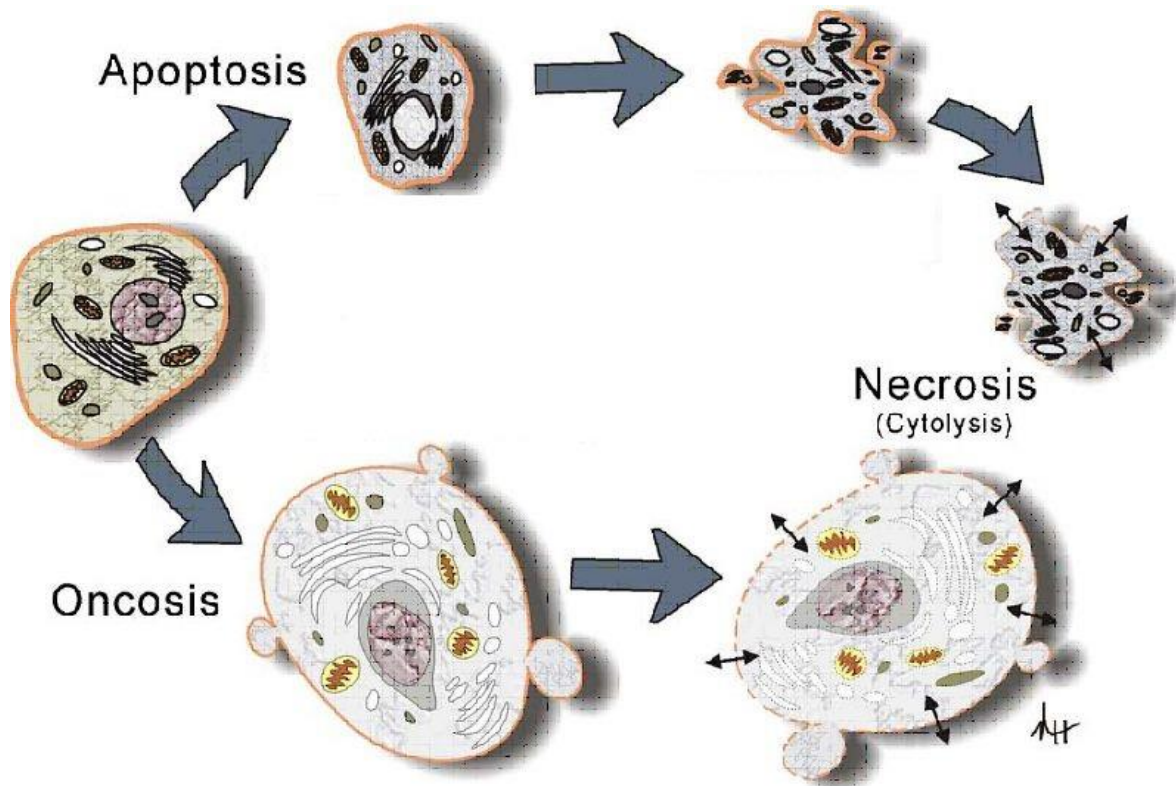


Figura 2 Características morfológicas que se observan en la apoptosis y en la necrosis. Imagen tomada y modificada de Grasso, et al., 2012

APOPTOSIS

La apoptosis es el tipo de muerte celular donde la misma célula es la responsable de llevar a cabo todos los procesos necesarios para que sea eliminada. Se caracteriza por una autodigestión controlada que mantiene la integridad de la membrana celular; así la célula muere sin derramar su contenido para no dañar a sus vecinas (Ross & Pawlina, 2007). Este tipo de muerte celular se produce en el curso de procesos fisiológicos (y también patológicos) como, por ejemplo: durante la embriogénesis y la organogénesis; en los procesos de cambio o involución dependiente de hormonas, por ejemplo procesos de degradación del endometrio durante el ciclo menstrual o de involución de las glándulas mamarias luego del destete; en la eliminación de células maduras, por ejemplo, en las puntas de las vellosidades intestinales; en la eliminación de linfocitos T autorreactivos en el timo (Welsch & Sobotta, 2008).

Este término fue establecido por Kerr, *et al.*, 1972, en donde observaron que este tipo de muerte celular se encuentra presente en diferentes tipos de tejidos. Durante la apoptosis, la célula presenta tanto cambios morfológicos como moleculares característicos de esta muerte. Entre estos cambios que sufren las células se encuentran la pérdida de contacto con sus células vecinas, una compactación celular, un burbujeo en la membrana celular mejor conocido como blebbing, la compactación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la transición de la

fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (Hockenbery, 1995; Lowe & Lin, 2000; Strasser, et al., 2000), para finalizar, la célula se fragmenta formando pequeñas vacuolas rodeadas de membranas (Figura 2), denominados como cuerpos apoptóticos, que posteriormente serán eliminados por el sistema inmune, para ser exactos por fagocitos, sin ocasionar algún tipo de respuesta inflamatoria (Reed, 2000) ni la liberación del contenido celular (Lawen, 2003). La apoptosis depende de la acción de una familia de proteasas llamadas caspasas (Alberts & Bray, 2006).

Caspasas

Estas moléculas son un grupo de cisteín-proteasa (Hengartner, 2000; Strasser, et al., 2000; Fan, et al., 2005) que se expresan ampliamente en forma de proenzima inactiva en la mayoría de las células y, una vez activadas, a menudo pueden reclutar a otras procaspasas, lo que permite el inicio de una cascada de proteasas (Elmore, 2007). Para que las caspasas se puedan considerar que están en su forma activa, deben de ocurrir un par de procesos: el primero es que la procaspasa en cuestión sea cortada formando dos subunidades, una pequeña (aproximadamente 10 kDa) y una grande (aproximadamente 20 kDa), y posteriormente deben formar un heterotetramero que consta de dos subunidades pequeñas y dos subunidades grandes (Hengartner, 2000; Reed, 2000; Strasser, et al., 2000; Fan, et al., 2005). Las cascadas activadoras de las caspasas que regulan la apoptosis pueden iniciarse desde receptores de superficie o ser inducidas por alteraciones de la integridad mitocondrial (Taleisnik, 2006).

Estas caspasas se pueden clasificar de acuerdo con su función y destacan dos grupos principalmente: las caspasas iniciadoras (como la caspasa-9 y -8) y las caspasas ejecutoras (siendo el mejor ejemplo la caspasa-3) (Strasser, et al., 2000; Lawen, 2003); no obstante en algunas ocasiones se puede considerar un tercer grupo el cual está relacionado con un efecto inflamatorio (Elmore, 2007) (Fan, et al., 2005).

Familia Bcl-2

Dentro del proceso de apoptosis, una parte fundamental son las proteínas de la familia Bcl-2, cuya función es regular los procesos de permeabilización mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis celular. Este grupo de proteínas se caracteriza por tener cuatro dominios de homología estructuralmente conservadas: BH1, BH2 y BH3 los cuales se requieren para interaccionar con otros miembros de la familia Bcl-2, mientras que el dominio BH4, media las funciones del ciclo celular (Jutinico, et al., 2015)

A partir de la proteína Bcl-2, se ha integrado una familia creciente de moléculas de acuerdo con su homología al compartir al menos uno de los cuatro dominios denominados BH y designados como BH1, BH2, BH3 y BH4, dicha familia incluye moléculas con actividad pro- y antiapoptótica. Cuando existe mayor proporción de alguna de estas actividades, se determina la susceptibilidad de la célula hacia la

muerte o la supervivencia. Las proteínas de la familia Bcl-2 de forma clásica han ido clasificadas en tres grupos:

- Aquellas con actividad prosupervivencia, en este grupo se incluyen las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BFL-1, BCL-B y A1, cuya función es protección a la célula de diversas alteraciones citotóxicas como la radiación gamma y ultravioleta.
- La segunda clase incluye aquellas con actividad proapoptótica, como son Bax, Bak, Bid y Bok. Se dividen en proteínas efectoras, las cuales comprenden la proteína antagonista de Bcl-2, Bak y la proteína X asociada con Bcl-2, Bax.
- Una tercera clase son aquellas que comparten únicamente el motivo BH3. Al menos ocho miembros se conocen: Bid, Bad, Bik, Bim, HRK, NOXA y PUMA. Este motivo es indispensable para llevar a cabo su actividad proapoptótica (Ramírez-García, et al., 2014).

Dentro de la muerte por apoptosis, hay dos rutas claves de señalización molecular responsables en desencadenar dicho proceso. La primera es la ruta intrínseca, que se activa desde el interior de célula por los miembros de la familia Bcl-2 y señales mitocondriales posteriores. Por otro lado, se encuentra la ruta extrínseca, que se activa desde el exterior de la célula mediante ligandos proapoptóticos que interactúan con receptores especializados de muerte en la superficie celular (Ashkenazi, 2008).

Ruta intrínseca

Para que esta ruta se lleve a cabo, diferentes estímulos son los responsables de activarla, entre los que resaltan agentes quimioterapéuticos, radiación UV, especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno, y estrés celular (Gupta, 2001). En esta ruta, la mitocondria juega un papel muy importante, ya que cuenta con diferentes proteínas que favorecen la apoptosis y que se encuentran ubicadas en el espacio intermembrana.

Para que el proceso de muerte comience, lo primero que debe ocurrir es que proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, principalmente BAX y BAK, formen poros en la membrana externa de la mitocondria liberando así las proteínas al citosol. Entre estas proteínas se encuentra el citocromo c, que una vez en el citosol interactúa con la proteína Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) que a su vez reclutan a la procaspasa-9, y con la participación de ATP forman el complejo conocido como apoptosoma. La formación del apoptosoma causa que la caspasa-9 cambie a su forma activa, logrando así activar la caspasa-3 la cual tiene sustratos claves para efectuar varios eventos celulares y bioquímicos en la apoptosis (Figura 3). Otras proteínas liberadas al citosol son Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, mismas que tienen la capacidad de favorecer a la apoptosis de manera indirecta ya que se encargan de inhibir la actividad de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP)

(Fulda & Debatin, 2006) (Elmore, 2007) (Choudhury, et al., 2012) (Ashe & Berry, 2003)

Ruta extrínseca

Para que esta ruta se active, contrario a la ruta intrínseca, lo primero que debe ocurrir es la interacción de los receptores de muerte, mismos que se caracterizan por ser transmembranales, con sus respectivos ligandos que proviene del exterior de la célula. Los receptores de muerte presentes en las células pertenecen a la superfamilia TNF (Factor de Necrosis Tumoral), dentro de esta familia los ligandos con su respectivo receptor caracterizados de mejor manera son FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2/DR4 y Apo2/DR5, sin embargo en donde la ruta de señalización de la apoptosis se encuentra mejor descrita es en modelos con FasL/FasR y TNF- α /TNFR1 (Elmore, 2007; Nair, et al., 2014; Belkacemi, 2018).

Comenzado con la interacción FasL/FasR, el receptor recluta a FAD (Fas-associated death domain) que es una proteína adaptadora ubicada en el citosol, esta misma proteína logra reclutar a la caspasa-8; esta interacción que se da entre Fas, FADD y la caspasa se le conoce como complejo DISC (death-inducing signaling complex). Gracias a este complejo, la caspasa-8 logra pasar a su forma activa y así es capaz de activar a las caspasas ejecutoras. Por otro lado, Ocorre algo similar con el receptor TNF- α , este se encarga de reclutar a la proteína adaptadora TRADD (TNFR1-associated death domain), una vez activada, esta proteína se encarga de reclutar a la procaspasa-8 formando el complejo DISC para lograr que la caspasa-8 sea activada y esto desencadene la cascada de caspasas para llevar a cabo el proceso de apoptosis de manera correcta (Figura 3) (Ashe & Berry, 2003; Fulda & Debatin, 2006; Elmore, 2007; Nair, et al., 2014).

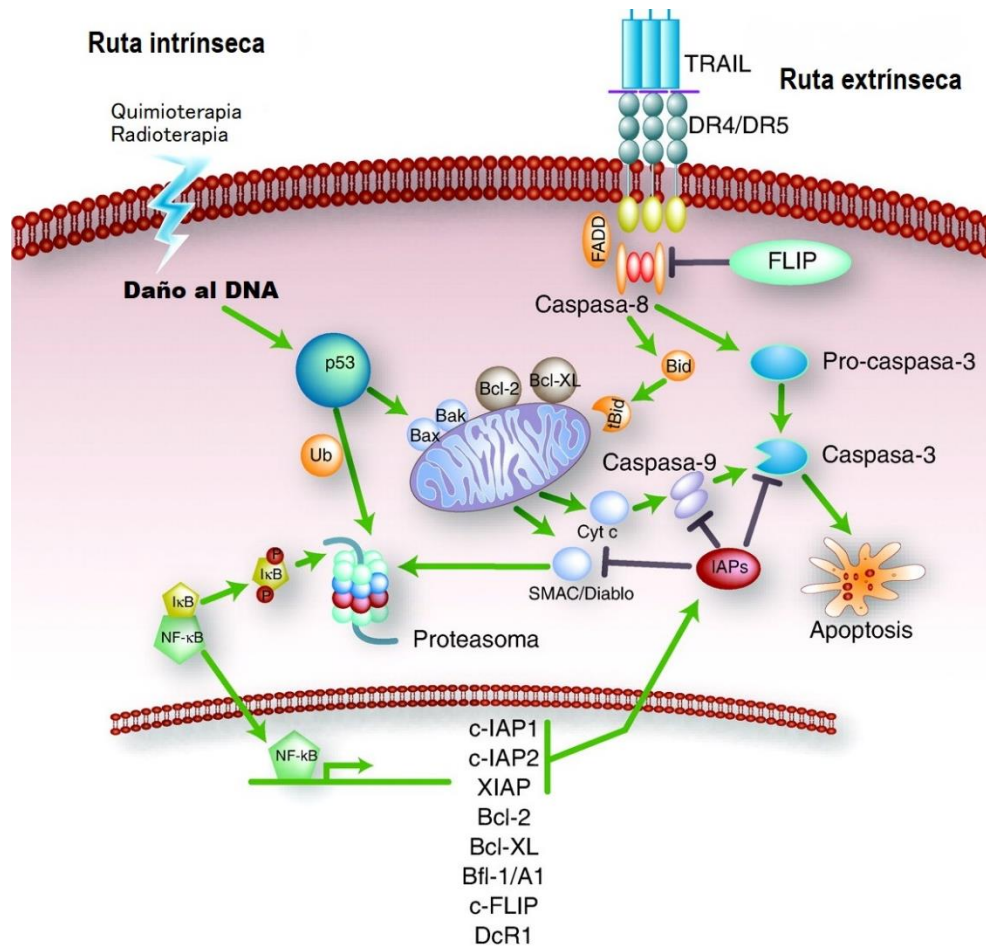


Figura 3. Señalización presente en ambas rutas de la apoptosis. Imagen tomada y modificada de de Vries, et al., 2006

Es importante indicar que las dos rutas no se deben de tomar siempre de manera aislada, ya que en ocasiones pueden cruzarse a partir de la activación de las caspasas iniciadoras. Esto ocurre cuando la caspasa-8 corta a la proteína proapoptótica BID convirtiéndola en su forma activa, tBID. tBID facilita la liberación del citocromo c ya que se encarga de reclutar y activar BAX para formar poros en la membrana mitocondrial externa (Ashkenazi, 2008; Belkacemi, 2018), liberando a las proteínas localizadas en el espacio intermembrana.

Sin embargo, si alguno de estos procesos controlados, tanto el ciclo celular como la apoptosis, se llega a ver modificado, las células comenzarían a duplicarse si control ocasionando neoplasias atípicas e inclusive llegar a generar diferentes tipos de cáncer.

CÁNCER

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores o neoplasias malignos. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación

rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis. El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

- Pulmonar (1,69 millones de defunciones)
- Hepático (788 000 defunciones)
- Colorrectal (774 000 defunciones)
- Gástrico (754 000 defunciones)
- Mamario (571 000 defunciones) (OMS, 2018)

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el segundo tumor maligno más frecuente (superado en el hombre por el cáncer de próstata y en la mujer por el de mama); sin embargo, es la primera causa de muerte por tumores malignos en ambos sexos (Resano & Anta, 2014). En Latinoamérica, el cáncer es la tercera causa de muerte y la incidencia de los diferentes tipos de cáncer es variable en cada país, tanto en el total como por sexo. La relación de cáncer entre el varón y la mujer es casi equivalente y de continuar la tendencia de crecimiento, las mujeres podrían superar a los hombres en los siguientes años (Amorín Kajatt, 2013).

Factores de riesgos

El cáncer de pulmón se puede originar por diferentes factores, sin embargo, el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer es el tabaquismo. El riesgo está relacionado con el número de cigarrillos, la duración del hábito, la edad de inicio, la profundidad de la inhalación del humo y la cantidad de alquitrán y nicotina de los cigarrillos (Barrio & Mejía, 2014). Del mismo modo, el tabaquismo pasivo repercute de manera positiva al desarrollo mismo debido al humo que se respira ya que contiene más de sesenta reconocidos cancerígenos, entre los más conocidos están las nitrosaminas, los benzopirenos y los radioisótopos del radón, todos ellos con la capacidad de alterar el ADN contribuyendo en el desarrollo de la carcinogénesis (Amorín Kajatt, 2013).

Por otro lado, la exposición al humo de leña por más de 50 años se ha relacionado con cáncer de pulmón en mujeres mexicanas no fumadoras afectadas en particular por este tipo de cáncer de tipo adenocarcinoma (Arrieta, et al., 2013), esto debido a las partículas nocivas como los fenoles, la acroleína, los crisoles, el acetaldehído, los compuestos orgánicos como el benceno, el formaldehído, el butadieno, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Amorín Kajatt, 2013).

Por último, aunque el cigarrillo ha sido identificado como el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer pulmonar, el menor porcentaje de pacientes que han desarrollado esta patología sin tener el antecedente de consumo de tabaco ha

hecho ver la influencia de otro tipo de exposiciones para desarrollar la enfermedad como el asbesto, aluminio, arsénico, sílice, radón, cromo, níquel, hidrocarburos aromáticos, cadmio, berilio, gas mostaza y otros (Cuervo Millan & Carrillo Bayona, 2004; Salvatierra, et al., 2005; Moctezuma Velasco & Zarco, 2009).

Clasificación

Existen dos categorías de cáncer pulmonar clínicamente importantes considerando el origen y el comportamiento de las células cancerosas: Cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y Cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), siendo este último el que engloba el epidermoide, el adenocarcinoma y el de células grandes (Moctezuma Velasco & Zarco, 2009). Siendo el primero el más agresivo, con una tasa de crecimiento rápida y una tendencia a metastatizar tempranamente en mediastino y en los tejidos extratorácicos. Histológicamente se caracteriza por una proliferación de células de bordes mal definidos, citoplasma escaso, cromatina nuclear de gránulos finos y nucleolos ausentes o discretos, con un alto índice mitótico y tendencia a la necrosis (Salvatierra, et al., 2005).

Continuando con el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el epidermoide representa el 25% de todos los tumores de pulmón. Es el más relacionado con el tabaco ya que el 90% se desarrolla en pacientes fumadores. Suele originarse en la vía aérea central en los segmentos proximales del árbol traqueobronquial, en zonas con epitelio crónicamente dañado, dando lugar a una obstrucción bronquial y a atelectasias o neumonía. Histológicamente, se caracteriza principalmente por la producción de queratina y la presencia de puentes celulares (Salvatierra, et al., 2005) (Expósito, et al., 2013) (de Vinuesa Calvo, 2017).

Por otro lado, el adenocarcinoma es el tipo más frecuente y se origina de forma periférica con frecuencia sobre cicatrices o en regiones con fibrosis intersticial. La característica morfológica más relevante es la formación de glándulas, estructuras papilares o producción de mucina intracitoplasmática (Salvatierra, et al., 2005; Expósito, et al., 2013).

Por último, el carcinoma de células grandes es el tipo menos frecuente. Es una neoplasia epitelial maligna indiferenciada que no cumple los criterios para considerarse adenocarcinoma o un carcinoma epidermoide. Suele encontrarse en las zonas periféricas y se caracteriza por grandes células poligonales, con un núcleo vesiculoso y gran nucleolo (Expósito, et al., 2013; de Vinuesa Calvo, 2017).

Cáncer cervicouterino

En el cáncer cervicouterino las células malignas se localizan en el cuello del útero (también llamado cérvix), una estructura localizada en el fondo de la vagina. Para que se forme un cáncer en el cuello uterino generalmente pasan de 10 a 20 años (Buenrostro, et al., 2011). Este tipo de cáncer es la segunda causa de muerte en la mujer a nivel mundial y es la principal causa de muerte por enfermedades malignas en las mujeres de los países en desarrollo (Martínez MartínezPinillo, et al., 2010). El cérvix normal se compone de diferentes tipos de células epiteliales: el canal

cervical medio y el cérvix superior están compuestos por epitelio columnar secretor, mientras la vagina y el ectocérvix distal están compuestos de epitelio escamoso. El punto donde estos dos tipos de células (escamosas y columnares) se denomina unión escamo-columnar y se caracteriza por ser una zona de transformación en donde un tipo de célula madura pasa a ser otro (Vicuña, et al., 2009).

Existen diferentes factores de riesgo para desarrollar este tipo de cáncer entre los cuales se encuentran la edad (mujeres entre 25 y 64 años), inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años, múltiples parejas sexuales, tabaquismo, desnutrición, deficiencia de antioxidantes, pacientes con inmunodeficiencias (Vicuña, et al., 2009), sin embargo, el que es considerado el principal detonante en el cáncer cervicouterino es el virus del papiloma humano (VPH) (Vicuña, et al., 2009; Buenrostro, et al., 2011; Zaldívar Lelo de Larrea, et al., 2012; Manzo-Merino, et al., 2014; Arévalo, et al., 2017).

VPH

Este virus se caracteriza por tener su genoma en forma de ADN circular de doble cadena constituida por aproximadamente 8,000 pares de bases (Vicuña, et al., 2009; Zaldívar Lelo de Larrea, et al., 2012; Arévalo, et al., 2017). El genoma se ha dividido en tres regiones: la región temprana (E: Early) que codifica para los genes implicados en replicación y mantenimiento del genoma viral (E1-E8); región tardía (L: Late), la cual codifica a las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2, y por último, la región larga de control (LCR: Long Control Region), la cual contiene los sitios de regulación de la transcripción y replicación viral (Manzo-Merino, et al., 2014). Se han identificado más de 100 tipos diferentes de VPH clasificados dependiendo de si la infección desencadena o no el desarrollo de cáncer en alto y bajo riesgo, entre los primeros los más comunes son el 16 y 18 que entre ambos son los responsables de ocasionar más del 75% de los cánceres de este tipo. (Vicuña, et al., 2009; Zaldívar Lelo de Larrea, et al., 2012; Manzo-Merino, et al., 2014).

Clasificación

Entre los tipos histológicos de cáncer cervicouterino reconocidos por la Organización Mundial de la Salud se pueden distinguir dos tipos principales, esto debido a la gran incidencia que presentan los mismos los cuales son el carcinoma de células escamosas, que constituyen aproximadamente el 75% de los casos, y el adenocarcinoma, mismo que representa entre 15-25% de los casos. Aun cuando ambos tipos tienen un comportamiento clínico similar, es importante reconocer los subtipos histológicos, algunos de los cuales muestran diferencias en su comportamiento clínico o respuesta terapéutica (Vicuña, et al., 2009; Pérez-Montiel, et al., 2014)

En lo que respecta al carcinoma de células escamosas, consta de dos grupos, aquellos carcinomas queratinizados que pueden ser bien diferenciados o moderadamente diferenciados y están compuestos de grandes células tumorales. Mientras que el grupo restante, los no queratinizados, no se logran diferenciar fácilmente y las células que lo conforman pueden ser grandes o pequeñas. Por otro

lado, los adenocarcinomas se presentan en diferentes tipos histológicos, cada uno diferente a los demás, y se puede encontrar más de un tipo en un solo tumor. Con frecuencia, presentan su origen en el endocérvix. Además, estos tumores pueden infiltrar el estroma del cérvix, algunas veces con extensión parametrial y metástasis a ganglios sin una destrucción importante del exocérvix. (Vicuña, et al., 2009).

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad en que se desarrollan células malignas en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, y esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas (Brandan & Villaseñor, 2006). Datos de la Organización Mundial de la Salud señala que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad. En el continente americano, el cáncer de mama es el más común entre las mujeres y es la segunda causa de muerte por tumores malignos para este grupo de población (INEGI, 2015).

El cáncer de mama se inicia usualmente en los conductos mamarios (denominado carcinoma ductal y es el más frecuente), aunque el 10% se inicia en los lóbulos mamarios (denominado carcinoma lobulillar). Se sospecha que la mayoría de los carcinomas ductales se inician en una forma no invasiva y se denomina carcinoma intraductal, este no puede extenderse a distancia dando metástasis. Sin embargo, si no se trata puede transformarse con el tiempo en cáncer invasivo, originando un verdadero cáncer de mama (Martín, et al., 2015).

Las características típicas del cáncer de mama cuando se diagnostican se deben a la combinación de los tipos *in situ* e invasivo: se denomina carcinoma *in situ* al tumor que no ha atravesado las uniones entre tejidos y dependiendo de donde sea localizado puede ser ductal *in situ* o lobulillar *in situ*. Por otro lado, el carcinoma invasivo es el tumor que invade tejidos subyacentes vertiendo células a la sangre o linfa generando metástasis a través del cuerpo haciéndose letales si afectan órganos vitales y dependiendo del lugar donde se originen puede encontrarse carcinoma ductal invasivo o carcinoma lobulillar invasivo (Guzmán-Santos, et al., 2012). El cáncer de mama puede invadir los vasos sanguíneos locales y emitir células metastásicas que pueden emigrar a órganos distantes (hueso, pleura, pulmón, hígado) dando lugar a metástasis a distancia (Martín, et al., 2015).

Factores de riesgo

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial en la que los factores genéticos y ambientales contribuyen a su aparición. Los factores de riesgo establecidos para el cáncer de mama incluyen factores reproductivos, aumento de la edad, alta densidad del tejido mamario y una historia familiar de cáncer, especialmente cáncer de mama (Prolla, et al., 2015).

Comenzando con la edad, la incidencia de cáncer de mama se incrementa con esta, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, etapa en que el ritmo de crecimiento disminuye. Además, se relaciona 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. Una menarca temprana y menopausia tardía se asocian a periodos prolongados de exposición a estrógenos; la menstruación temprana, el término de esta después de los 55 años, la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Brandan & Villaseñor, 2006). La terapia hormonal de reemplazo por tiempo prolongado (periodo mayor de cinco años) incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama. Este riesgo permanece latente cinco años después de suspender el tratamiento (Figuerola, et al., 2008).

Otro factor de riesgo son las mutaciones que se originan en las células ya que, en un pequeño porcentaje de los casos, existe una mutación germinal en un gen de predisposición al cáncer de alta penetrancia, el cual es considerado un factor determinante para la aparición de la enfermedad. El cáncer de mama hereditario corresponde a alrededor de un 10-15% de todos los tumores malignos de mama. Entre éstos se encuentran los tumores causados por mutaciones germinales de alta penetrancia en los genes BRCA1 y BRCA2 (Prolla, et al., 2015). Ambos genes son supresores tumorales que comúnmente tienen la función de controlar el crecimiento y la muerte celular. El BRCA1 es un gen involucrado en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN dañado, mantenimiento de la estabilidad genómica y regulación de la transcripción, y sus mutaciones están asociadas a la aparición de cáncer de mama en mujeres entre 40 y 50 años y también con el riesgo de padecer otros tumores como el de ovario. En contraparte, el gen BRCA-2 está asociado a la aparición de cáncer a edades más avanzadas, entre 60 y 70 años, y en la población en general predispone a padecer cáncer de mama masculino, de ovario, vejiga, próstata y páncreas (Guzmán-Santos, et al., 2012).

En la actualidad existen diferentes tratamientos para tratar el cáncer entre los que destacan principalmente tres: la cirugía oncológica, en donde se busca extirpar el tumor completo o todo lo que sea posible, la radioterapia, que como su nombre lo indica elimina las células cancerígenas por medio de la radiación, y por último la quimioterapia, que mediante medicamentos eliminan las células cancerígenas que se encuentran en división celular; sin embargo, dichos tratamientos ocasionan efectos adversos a la salud del paciente. Debido a esto, los compuestos de origen natural se han abierto paso como una alternativa contra el cáncer y un ejemplo de estos compuestos son las saponinas.

SAPONINAS

Las saponinas son glucósidos ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007). Las saponinas son metabolitos secundarios sintetizados por muchas especies de plantas diferentes. (Moghimpour & Handali, 2015). Las saponinas son básicamente fitoquímicos que se encuentran en la mayoría de las verduras, los frijoles y las hierbas. Las saponinas se encuentran constitutivamente en una gran cantidad de especies de plantas, tanto en plantas silvestres como en cultivos. En estos últimos, las saponinas triterpenoides son generalmente

predominantes, mientras que las saponinas esteroides son comunes en plantas utilizadas como hierbas o por sus propiedades que promueven la salud. Se han detectado saponinas triterpenoides en muchas leguminosas (Desai, et al., 2009)

El nombre de estas moléculas se deriva de la palabra latina "sapo", que significa jabón, debido a sus propiedades surfactantes que permiten formar una espuma estable similar al jabón al agitarse en solución acuosa (Moghimpour & Handali, 2015). Son un grupo complejo y químicamente variado de compuestos que consiste en agliconas triterpenoides o esteroidales unidas a restos oligosacáridos (Moses, et al., 2014).

De acuerdo con el carácter químico de la aglicona las saponinas se dividen en saponinas esteroides y triterpenoides. Las saponinas esteroidales de las plantas son principalmente compuestos que contienen 27 átomos de carbono que forman las estructuras centrales. En la naturaleza, las saponinas consisten principalmente en derivados de espirostan y derivados de furostán (Thakur, et al., 2011)

Las saponinas se clasifican de acuerdo con el número de cadenas de azúcar en su estructura como mono, bi o tridesmosídico. Las saponinas monodesmosídicas tienen una sola cadena de azúcar, normalmente unida a C-3. Las saponinas bidesmosídicas tienen dos cadenas de azúcar, a menudo con una unida a través de un enlace éter en C-3 y otra unida a través de un enlace éster en C-28 (saponinas triterpénicas) o un enlace éter en C-26 (saponinas de furastanol) (Güçlü-Üstündağ & Mazza, 2007)

Las saponinas esteroidales son menos comunes que las saponinas triterpenoides; aunque ambas se presentan en angiospermas, las primeras son más abundantes en monocotiledóneas mientras que las segundas son más comunes en las dicotiledóneas (Escobar-Sánchez, et al., 2015).

Se han reportado una gran cantidad de efectos biológicos que presentan las saponinas, entre los que se encuentran efectos sobre permeabilidad de la membrana, metabolismo del colesterol, actividad hipoglucemiante, antiviral, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatoria (Desai, et al., 2009), ente otros. Además, cuenta con la característica de tener actividad anticancerígena y entre las saponinas más estudiadas se encuentran la dioscina y diosgenina.

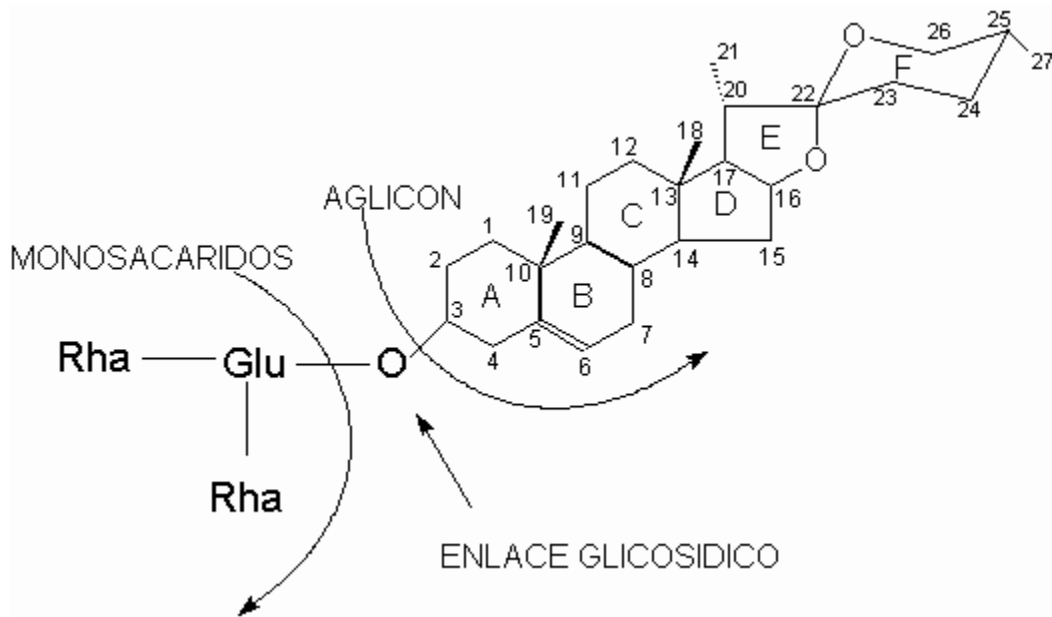


Figura 4. Estructura general de las saponinas esteroidales

Dioscina

La dioscina es una saponina esteroidea producida por muchas plantas de diferentes géneros. En experimentos de cultivo celular con células del carcinoma de cuello uterino HeLa, la dioscina indujo la apoptosis a través de la vía mitocondrial. Se observó una reducción en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 junto con la activación de caspasas (Bachran, et al., 2008). Esta saponina, induce la apoptosis de las células del cáncer de vesícula biliar al inhibir la señalización de PI3K/AKT a través de un mecanismo dependiente de especies reactivas de oxígeno, además de inhibir la migración de las células del mismo cáncer (Song, et al., 2017). El potencial anticancerígeno de la dioscina fue efectivo en diferentes células cancerosas, el cáncer de pulmón humano A549, NCI-H446, NCI-H460 y H1299, células HeLa de carcinoma epitelial cervical humano, cáncer de mama humano Células MDA-MB-231, células MDA-MB-453 y T47D, además de leucemia humana, células del cáncer de esófago humano, carcinoma hepatocelular, células del cáncer gástrico, cáncer de colon humano, cáncer de ovario humano y cáncer de próstata (Xu, et al., 2016). De manera adicional a esta información, también se ha reportado la vía de apoptosis que esta saponina induce en diferentes células cancerígenas. La ruta de apoptosis que induce la dioscina es la intrínseca y es demostrada en células de cáncer cervicouterino HeLa (Cai, et al., 2002), células de cáncer de esófago KYSE510 (Wang, et al., 2012), en la línea SGC-7901 de cáncer gástrico (Gao, et al., 2011; Hu, et al., 2013) y en la línea K562 de leucemia (Liu, et al., 2004).

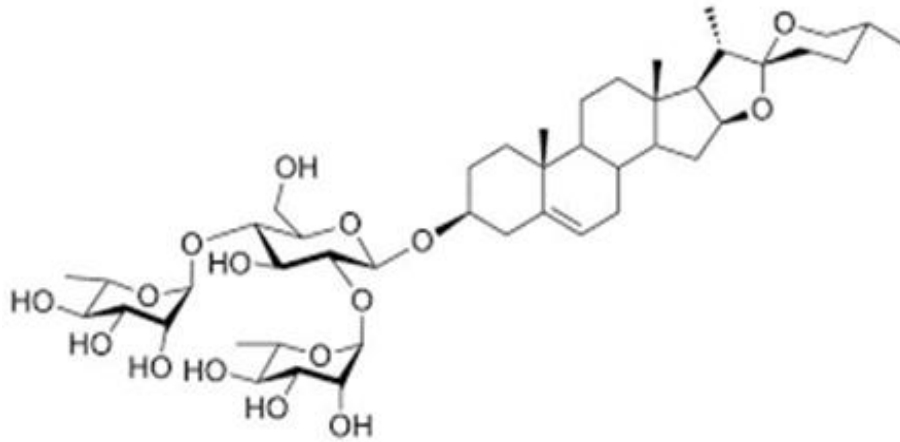


Figura 5. Estructura de la dioscina

Diosgenina

La diosgenina, una saponina esteroide natural, se encuentra en abundancia en las leguminosas. Esta saponina es un precursor de varios fármacos esteroides sintéticos que se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica (Raju & Rao, 2012). El efecto anticancerígeno de la diosgenina se ha estudiado en varias líneas celulares tumorales y se evidenció que esta bioactividad depende tanto del tipo de célula como de la concentración. La diosgenina tiene actividad antiproliferativa en el cáncer de próstata (20 μM), carcinoma de colon (20 μM), carcinoma escamoso (40 μM), carcinoma hepatocelular (30 μM), cáncer gástrico (10 μM), cáncer de pulmón (47 μM), cáncer de mama (26 μM) y leucemia mieloide crónica humana (20 μM) (Jesus, et al., 2016).

La diosgenina también cuenta con investigaciones en las cuales se determina la ruta de apoptosis que induce dicha saponina. Resultados de estas investigaciones, se determinó que la ruta de apoptosis que la diosgenina induce es, al igual que la dioscina, la intrínseca y se puede observar en células de cáncer cervicouterino HeLa (Huo, et al., 2004), en la línea HepG2 proveniente de cáncer de hígado (Kim, et al., 2012), en cáncer de laringe y melanoma en las líneas HEP-2 y M4Beu respectivamente (Cecile, et al., 2004).

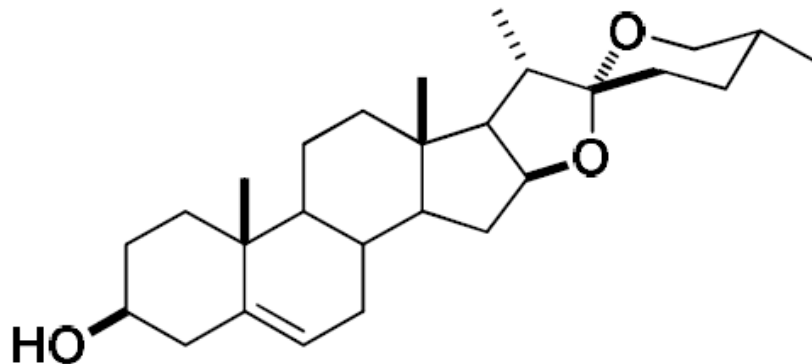


Figura 6. Estructura de la diosgenina.

Diosgenina-3-glu

La diosgenina-3-glu es una saponina esteroide monodesmosídica, sintetizada a partir de la Diosgenina, por la adición de una glucosa en el carbono tres de la estructura esteroide. Se ha reportado que induce a la apoptosis de células tumorales de cáncer cervicouterino en las líneas HeLa, CaSki y ViBo (Martínez-Mata, 2013). Además, se demostró que, en las líneas de cáncer de pulmón, SK-LU-1, y cáncer de mama, MDA-MB-231, logra inhibir la proliferación de las células además de inducir la muerte por apoptosis a concentraciones de 43.3 μM y 34.6 μM respectivamente (Luna-Cabañas, 2019).

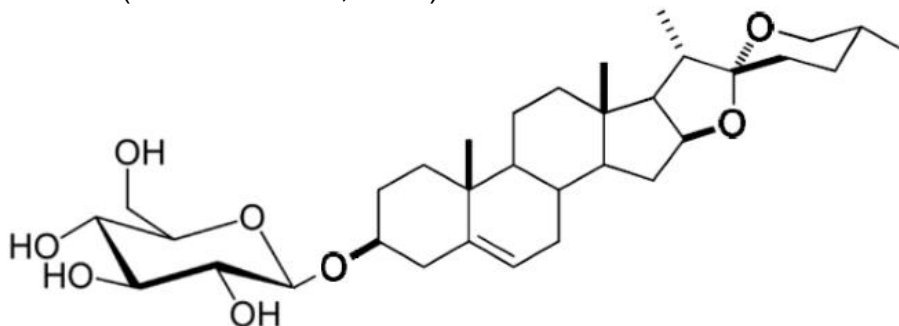


Figura 7. Estructura de la diosgenina-3-glu

Hidroclorhidrato de 2-amino-2-deoxi- β -d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11)

Es una saponina esteroideal que deriva de la diosgenina, esta saponina presenta una modificación ya que cuenta con una glucosamina hidrocloreada. Esta saponina de reciente descubrimiento y por lo tanto no hay mucha información acerca de ella aparte de su síntesis (Fernández-Herrera, et al., 2012) y de su capacidad antitumoral. Se ha reportado su capacidad antiproliferativa en diferentes líneas celulares provenientes de diversos tipos de cáncer, algunos de estos resultados los podemos observar en la línea SK-LU-1 proveniente de cáncer de pulmón (Zamora López, 2017), además en células MDA-MB-231 de cáncer de mama (López Durán, 2017) y por último en células tumorales de cáncer cervicouterino en las líneas HeLa, CaSki y ViBo (Aveitua Villeda, 2014).

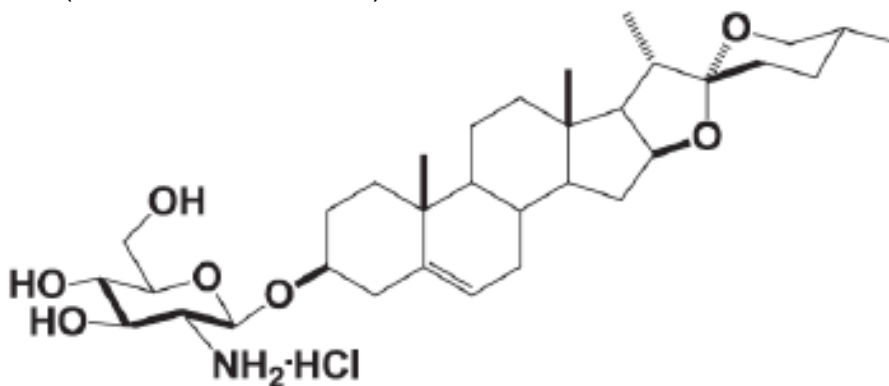


Figura 8. Estructura del MF-11

Glucosamina

Se ha demostrado que este azúcar presenta propiedades que puede resultar útiles para tratamientos contra el cáncer ya que en diferentes trabajos se reportan los efectos que tiene contra diferentes tipos de cáncer. Se ha demostrado que inhibe la proliferación de las células malignas al retener su ciclo celular en la fase G1 en líneas de cáncer de próstata DU145 y cáncer de mama MDA-MB-231 desde concentraciones de 0.5 mM sin afectar la proliferación de los fibroblastos (Oh, et al., 2007). Por otro lado, la glucosamina presenta la propiedad de inhibir la proliferación e induce la muerte por apoptosis a partir de concentraciones de 0.5 mM en la línea ALVA41 de cáncer de próstata (Liu, et al., 2011). También se ha demostrado que la glucosamina tiene la capacidad de inhibir la proliferación y de detener el ciclo celular en la transición entre la fase G1 y S con concentraciones de 1 mM en las líneas de cáncer de células renales 786-O y Caki-1 (Wang, et al., 2017). Aunado a esto, de igual manera se ha investigado un compuesto que presenta una pequeña modificación, la glucosamina hidrociorada, misma que presenta particularidad de inhibir la proliferación en la línea de carcinoma oral de células escamosas YD-8 con concentraciones de 1 mM a la par de propiciar una muerte por apoptosis por actividad de la caspasa-3, además de detectar un aumento del citocromo C en el citoplasma (Jung, et al., 2012).

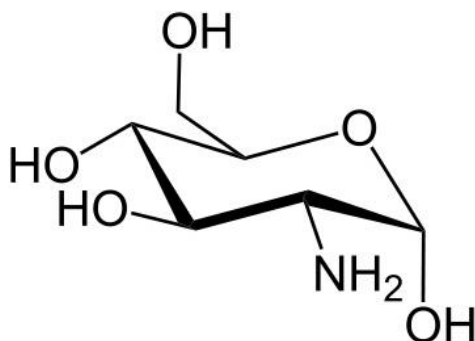


Figura 9. Estructura de la glucosamina

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las terapias actualmente utilizadas para erradicar el cáncer no han sido del todo benéficas, ya que suelen ser costosas, tienen efectos secundarios graves que deterioran notablemente la calidad de vida de los pacientes, muestran poca o nula acción selectiva, es decir, afectan tanto a las células tumorales como a las normales, en muchos casos presentan cierto grado de citotoxicidad en el organismo y son ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad. La investigación basada en compuestos de origen natural y/o vegetal propuestos como nuevas terapias alternativas orientadas hacia la prevención y tratamiento del cáncer van cada día en aumento y, dentro de este grupo de compuestos se encuentran las saponinas esteroides, a las cuales se les han atribuido efectos citotóxicos, anticancerígenos,

antioxidantes e inductores de apoptosis. Por tal motivo en el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto gliconjugado MF-11, así como la ruta de inducción de apoptosis que este compuesto induce sobre células tumorales.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el carcinoma de mama, pulmón y cervical, se encuentran dentro de los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población, siendo el cáncer de mama la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y el de pulmón en hombres en todo el mundo. Desafortunadamente los tratamientos utilizados para combatir esta enfermedad son altamente agresivos y muestran poca selectividad por lo que es necesario obtener compuestos de origen vegetal, que presenten la característica de ser selectivos e inductores de muerte apoptótica, para así ser utilizados como agentes terapéuticos más eficientes.

HIPÓTESIS

Se sabe que, las saponinas esteroidales como la diosgenina y algunos de sus derivados pueden presentar actividad antiproliferativa y apoptótica en algunos tipos de cáncer, se ha descrito también que la adición de azúcares en su estructura puede potenciar su actividad apoptótica. Por otro lado, se ha descubierto que en algunas saponinas esteroidales la ruta responsable de su actividad apoptótica es la intrínseca, por lo que se espera que el compuesto hidroclorehidrato de 2-deoxi-2-amino- β -d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) derivado de la Diosgenina, presente actividad inductora de apoptosis por la ruta intrínseca en células tumorales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la ruta de apoptosis inducida por el compuesto Hidroclorehidrato de 2-deoxi-2-amino- β -d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y cervical, mediante la identificación de las caspasas -3,-8 y -9 activas, así como proteínas de la familia Bcl-2 por inmunofluorescencia y citometría de flujo.

Objetivos particulares

- Confirmar la actividad antiproliferativa del compuesto MF-11 en cultivos de células MDA-MB-231 (mama) SK-LU-1 (pulmón) y CaSki (cervical), definida como la concentración de compuesto a la cual se observa una inhibición de la proliferación celular del 50% (IC₅₀), por medio de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la inducción de necrosis del compuesto MF-11 en cultivos de células tumorales, por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.

- Evaluar la actividad inductora de apoptosis del compuesto MF-11 en cultivos de células tumorales mediante el análisis morfológico por microscopía de contraste de fases, por tinción nuclear con el fluorocromo DAPI y la detección de la caspasa-3 activa por microscopía de fluorescencia.
- Determinar la ruta de inducción de apoptosis mediante la inmunodetección de la caspasa -8 y -9 activas, Bax, Bid y Bcl-2 por microscopía de epifluorescencia
- Determinar la ruta de inducción de apoptosis mediante la inmunodetección de la caspasa -8 y -9 activas por citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODO

Cultivo de células tumorales

Las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD) y se sembraron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) en un volumen de 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con rojo fenol suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) al 5% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 °C.

Preparación de los compuestos

El compuesto Hidroclorhidrato de 2-deoxi-2-amino-β-D-glucopiranosido de diosgenilo se obtuvo del Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez. Se preparó una solución stock con 1 mg de este compuesto que se disolvió en 400 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) en tubos cónicos tipo eppendorf de 600 μl (Corning, USA) y se almacenó a temperatura ambiente.

Determinación de la actividad antiproliferativa a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta

Las células tumorales MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki se sembraron en placas de plástico estériles de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 10,000 células/pozo en 100 μl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente se retiró el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) y las células fueron tratadas con el compuesto en diferentes concentraciones (1.5-100 μg/ml)

Cada ensayo presentó dos controles principales, el control testigo al cual únicamente se le cambió el medio por medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) fresco; el control restante contenía el vehículo utilizado para preparar la solución stock del compuesto, dimetilsulfóxido (DMSO). 24 horas después del estímulo, se evaluó la inhibición del crecimiento celular inducida por el compuesto analizado mediante la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al*, 1989, para la cual el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) fue retirado de la placa y las células fueron fijadas con 50 μl/pozo de una solución de glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada y la placa se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Posteriormente se retiró el glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA), y se lavó con agua destilada dejándola secar al aire. Se continuó con la tinción de las células con 50 μl/pozo de una solución de cristal violeta (Sigma-Chemical Co.) al 0.1% en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 minutos en agitación. Se retiró el colorante y se lavó con agua destilada para eliminar los excesos de tinción y se dejó secar al aire. Posteriormente

se añadieron 50 µl/pozo de ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% para solubilizar el colorante incorporado en el núcleo de las células durante 20 minutos. Finalmente, la lectura se realizó en un lector de placas de ELISA (ChroMate, USA) a una longitud de onda de 600 nm. Se elaboraron gráficas concentración-efecto por regresión lineal para obtener la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

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

Se realizaron cultivos de la línea celular MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki en placas estériles de 96 pozos (Corning, USA), en las cuales se sembraron 10,000 células/pozo en 100 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y fueron incubadas (incubadora NuAire, USA) por 24 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente se retiró el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) y las células fueron tratadas de la siguiente manera: Un control basal, únicamente con medio de cultivo, el cual se incubó bajo las mismas condiciones con el fin de utilizarlo como blanco en la reacción colorimétrica y al que solo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco.

Un control positivo, en el cual las células fueron lisadas por 1 hora con 100 µl de una solución al 0.1% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) en RPMI 1640. Un control para dimetilsulfóxido (DMSO) con la concentración empleada para preparar la IC₅₀ correspondiente a la línea celular. Finalmente, el tratamiento del compuesto con la concentración requerida para obtener la IC₅₀ correspondiente. A las 24 horas de tratamiento, los sobrenadantes de los cultivos celulares se recolectaron de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml (Corning, USA) y se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA) a 2,000 rpm durante 5 min. Posteriormente se traspararon 50 µl/pozo de cada uno de los sobrenadantes a una placa de 96 pozos (Corning, USA) para su evaluación. La actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo se determinó con el kit Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA), del cual adicionaron 50 µl/pozo de la mezcla de reacción. Se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 20 min. Posteriormente se evaluaron los datos a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas de ELISA (ChroMate, USA). Los datos fueron analizados con una comparación relativa al control y al control positivo tratado con tritón X-100. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

Evaluación de la morfología celular por microscopia con tinción de DAPI y muerte celular mediante la expresión de caspasa-3, -8, -9 Bid, Bax y Bcl-2 por inmunocitoquímica

Se sembraron células de la línea tumoral MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki en placas estériles de 96 pozos de pared negra (Corning, USA) a una densidad de 10,000 células/pozo con un volumen de 100 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron dentro de una

incubadora (NuAire, USA) por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Pasadas las 24 horas se les retiró el medio de cultivo y fueron tratadas con la concentración correspondiente de las IC₅₀ confirmadas, se contó con un control testigo, cambiándole el medio de cultivo por medio fresco, un control del vehículo y un control positivo con 40 µg/ ml de Camptotecina (Sigma-Aldrich, USA), por ml de medio. 24 horas después al estímulo las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% con glutaraldehído al 2.5% durante una hora. Pasado ese tiempo se lavaron 3 veces con PBS (por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline). Posteriormente se permearon con Tritón X-100 0.5% durante 5 minutos y se volvieron a lavar 5 veces más con PBS. A continuación, se agregó anticuerpo primario: anticaspasa-3 activa, caspasa -8, -9 Bid, Bax y Bcl-2 respectivamente (1:1000 en PBS) (Sigma-Aldrich, USA) por separado durante toda la noche a 4 °C. Las muestras se lavaron con PBS y posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario: anti-IgG acoplada a FITC (1:1000 en PBS) (Sigma-Aldrich, USA) bajo condiciones de oscuridad durante 2 horas, se lavaron 3 veces las muestras con PBS, para después añadir 3 µl a una concentración de 3 µg/ml del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA) durante un minuto e inmediatamente después las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Japón). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

Determinación de la ruta de inducción de muerte celular por apoptosis mediante la expresión de caspasas -8 y -9 por citometría de flujo

Las células fueron sembradas en placas estériles de 6 pozos (Corning, USA) a una densidad de 300,000 células/pozo en un volumen de 2,500 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Transcurridas las 24 horas las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: Un control testigo, el cual solo se le cambio el medio de cultivo por medio fresco. Un control de células tratadas con la máxima cantidad de volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para obtener la concentración de la IC₅₀. Un control positivo tratado con 40 µg/ml de Camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) por ml de medio de cultivo. Y por último el tratamiento con la IC₅₀ correspondiente. Después de 24 horas, se recuperó el medio y se despegaron las células pasándolas a tubos de citometría. Se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA), a 1,500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células fijadas con 1,000 µl de metanol al 50% en PBS, manteniéndolas a 4° C durante 40 minutos. Se lavaron tres veces con PBS filtrado centrifugando (centrífuga; Dinac, USA), a 1,500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendió el botón celular en 50 µl de anticuerpo primario policlonal de conejo anticaspasa-8 y anticaspasa-9 (1:1000 ml de PBS filtrado) de manera independiente; y se dejaron por 24 horas a 4 °C. Pasadas las 24 horas se lavaron tres veces con PBS filtrado y se resuspendió el botón en 50 µl de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo

FIT-C (1:1000 en PBS) IgG anti conejo (J.T. Baker, MEX) además, las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 2 horas a una temperatura de 37 °C. Finalmente las muestras se lavaron 2 veces con PBS filtrado y fueron analizadas en un citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA). Los datos se procesaron en el programa estadístico Flowing Software 2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

Análisis estadístico

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

RESULTADOS

Actividad antiproliferativa en células tumorales

Para evaluar la actividad antiproliferativa del compuesto MF-11 en células de cáncer de mama, pulmón y cervicouterino, cultivos celulares de las líneas MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto y así se obtuvo la concentración necesaria para disminuir la proliferación celular en un 50% (IC₅₀ calculada) (Figura 10, Tabla 1).

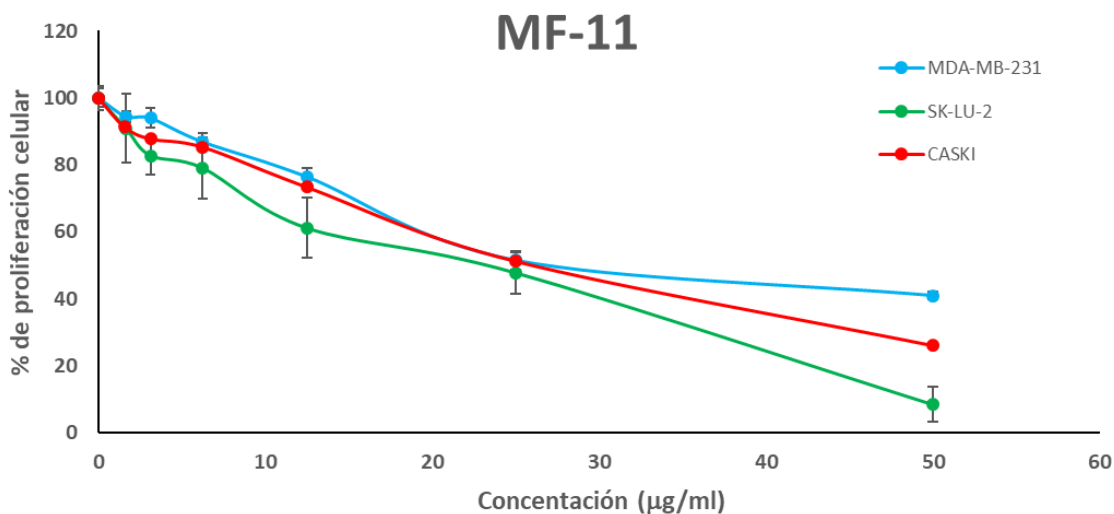


Figura 10. Efecto antiproliferativo del compuesto MF-11 sobre las líneas celulares MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki. En placas de 96 pozos se sembraron 10,000 células durante 24h y posteriormente se estimularon con el compuesto MF-11 a diferentes concentraciones que van desde 1.57 a 50 µg/ml. Se cuantificó el número celular mediante la técnica de cristal violeta. Los valores son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANDEVA ($p \leq 0.05$ vs control)

Línea celular	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
MDA-MB-231	25.91	42.35
Sk-Lu-1	24.05	39.31
CaSki	25.45	41.60

Tabla 1. Valores calculados de la IC₅₀ del compuesto MF-11 para las líneas celulares MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki.

Los resultados obtenidos establecen que el MF-11 afecta la proliferación celular de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la concentración, es decir, conforme se incrementa la concentración, la densidad celular disminuye. Los valores de cada IC₅₀ son mostrados en la tabla 1.

Efecto necrótico en células tumorales

Una vez demostrado que el MF-11 afecta negativamente la proliferación celular, se procedió a determinar si la causa de esta disminución en el número celular era producto de una muerte por necrosis. Para esto, las células de las tres líneas celulares fueron tratadas con la IC₅₀ respectiva durante 24 h y se evaluó la actividad

de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

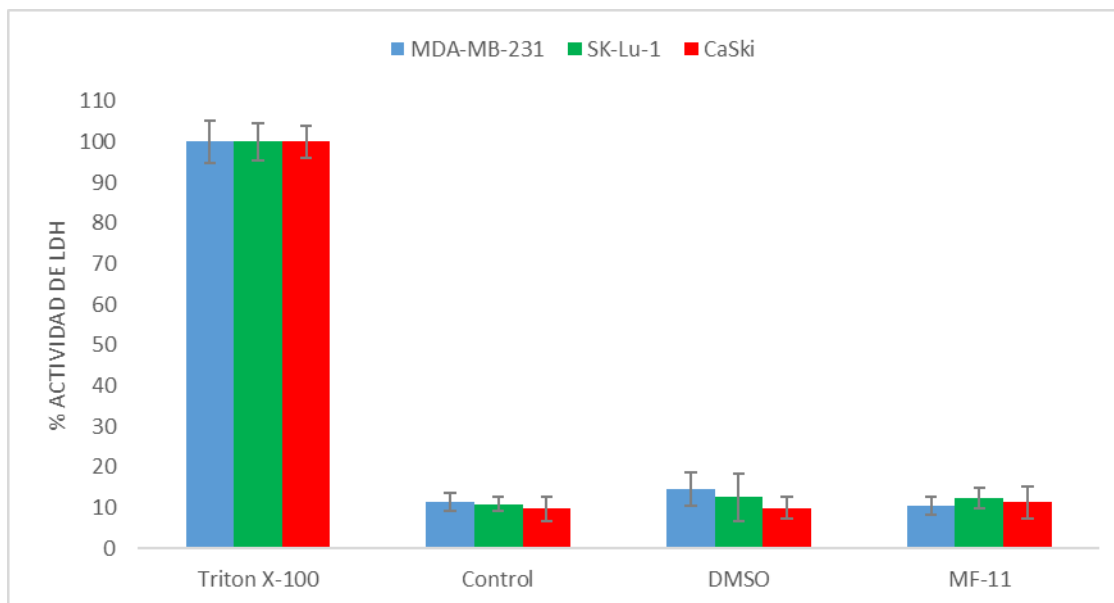


Figura 11. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes de los cultivos celulares de las líneas celulares MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki estimuladas con la IC_{50} respectiva para cada línea celular. Todas las condiciones fueron comparadas con un control positivo de células lisadas con Tritón X-100. Los valores son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba ANDEVA ($p \leq 0.05$ vs control)

Como se muestra en la Figura 11, el MF-11 no produce una muerte por necrosis en las líneas celulares MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki ya que no existe diferencia significativa entre los cultivos con las IC_{50} y el cultivo control, dando a entender que la necrosis no está relacionada con la disminución del número celular ocasionada por el MF-11. Por lo tanto, se analizará si la apoptosis es la responsable de esta disminución.

Actividad apoptótica en células tumorales

Con la intención de establecer que la disminución del número celular que ocasiona el MF-11 es producto de una muerte por apoptosis, cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki fueron tratados con las IC_{50} correspondientes y las características morfológicas propias de células apoptóticas (contracción celular, pérdida de proyecciones citoplasmáticas, condensación de cromatina nuclear, fragmentación del DNA, etc.) fueron observadas mediante microscopia de contraste de fases (CF) y fluorescencia, además de realizar una inmunodetección de la caspasa-3 activa en las células, determinadas por epifluorescencia (Figuras 12-14)

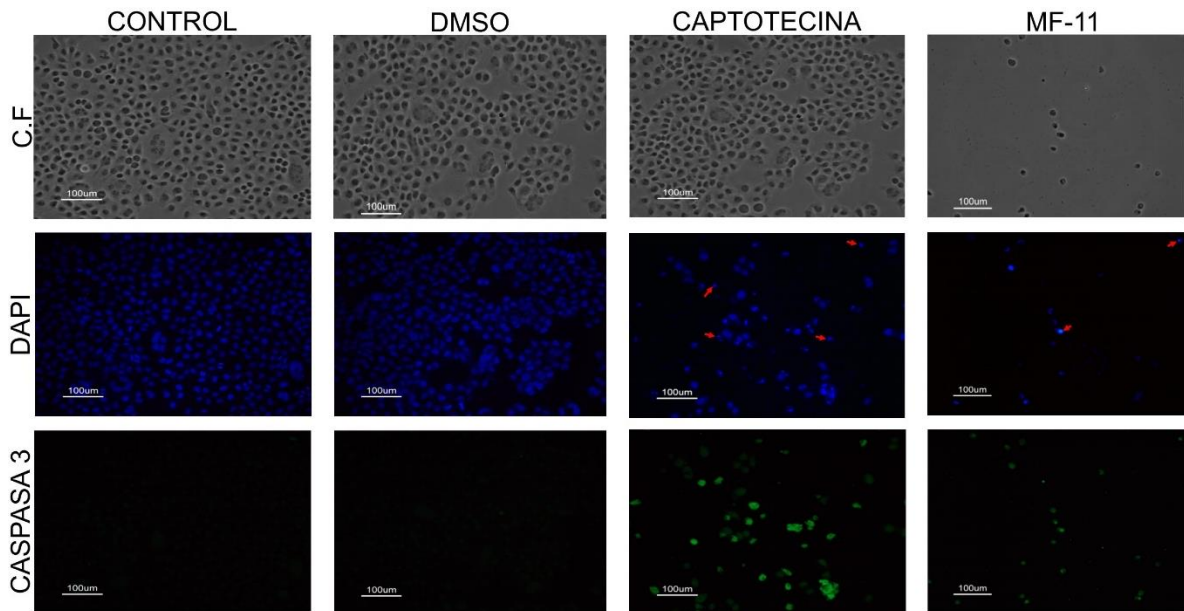


Figura 12. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en células SK-LU-1. Se logra observar, mediante la tinción con el fluorocromo DAPI, principalmente compactación de la cromátida (señalado con flechas rojas). Además de la presencia de la caspasa-3 activa característica dentro del proceso de la apoptosis.

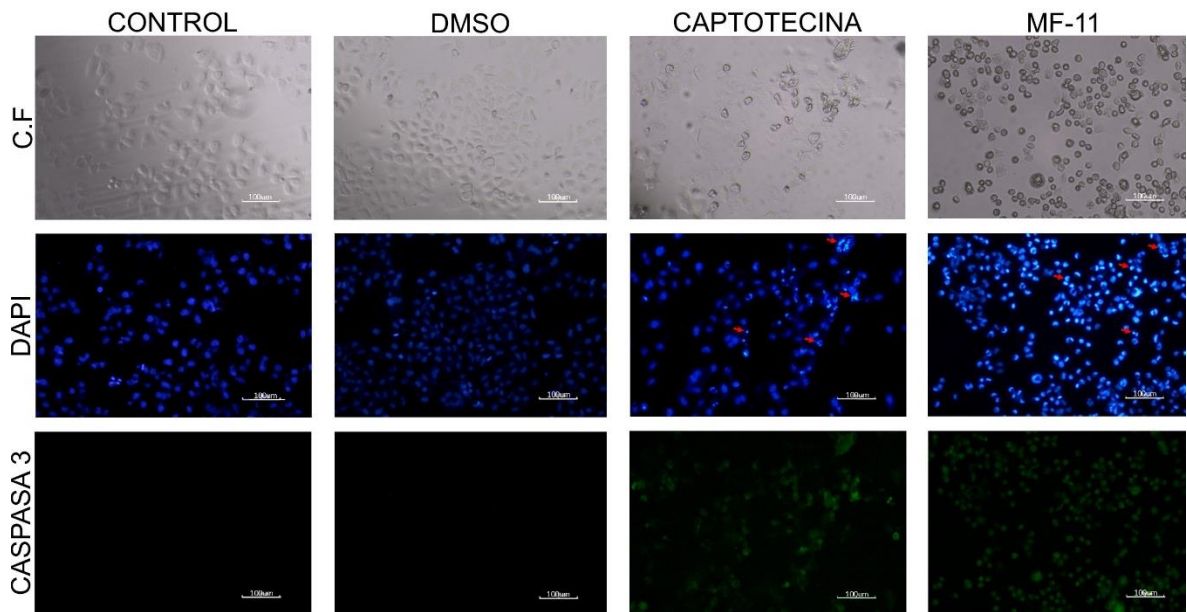


Figura 13. Efecto del MF-11 tras 24 horas de tratamiento en células CaSki. Se puede apreciar una evidente pérdida de la morfología característica de estas células, aunado a esto se presenta una compactación en la cromátida (señalado con flechas rojas) además de la presencia de la caspasa-3 activa dentro de las células.

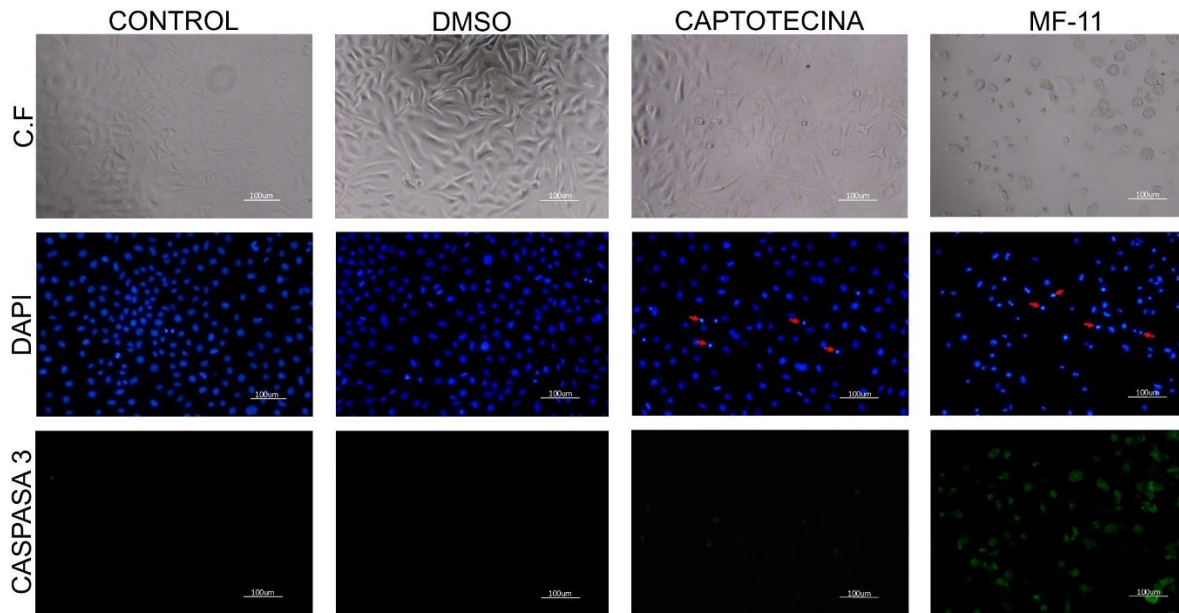


Figura 14. Efecto del MF-11 tras 24 de tratamiento en células MDA-MB-231. Se logra observar la aparición de la morfología apoptótica en las células además de la presencia de la caspasa-3 activa (las flechas rojas señalan la compactación de la cromátida)

Como se logra apreciar en las imágenes observadas con contraste de fases, las células del control y DMSO se encuentran adheridas, con proyecciones citoplasmáticas y citoplasma abundante; mientras que las imágenes teñidas con DAPI, nos muestra que contienen núcleos homogéneos, redondos y bien delimitados, y en lo que respecta a la caspasa-3 activa no se observa marca en ninguna de estas dos condiciones. Sin embargo, las células que fueron estimuladas con el MF-11 se encuentran contraídas y con menor cantidad de citoplasma, además de presentar una pérdida de adherencia y una forma redondeada; en cuanto a su núcleo (tinción DAPI), se observa una fuerte compactación y en algunos casos fragmentación de la cromatina; y en lo que concierne a la caspasa-3 activa, hay una presencia alta en estas condiciones, indicando que el MF-11 induce a las células tumorales de las tres líneas celulares a una muerte apoptótica.

Evaluación de la ruta de inducción de apoptosis

Una vez comprobado que el MF-11 provoca la muerte por apoptosis en las células MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki, lo siguiente fue establecer la ruta apoptótica por la cual este tipo de muerte celular se está llevando a cabo. Para esto se evaluó la presencia de las caspasa-8 y -9, ambas en su forma activa, en cultivos de células tratadas con el MF-11 en concentraciones correspondientes a la IC₅₀ de cada línea celular. Estos resultados fueron obtenidos en un microscopio de epifluorescencia mediante inmunocitoquímica (Figuras 15-20)

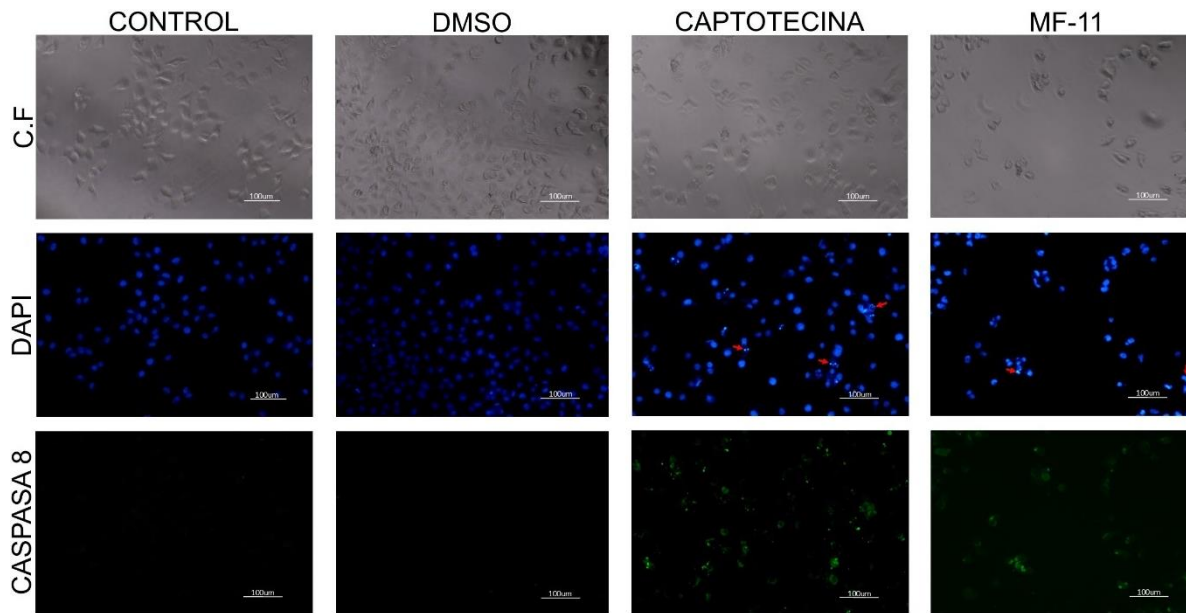


Figura 15. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en células SK-LU-1. Se logra apreciar un cambio en su morfología, además una compactación y fragmentación del ADN (señalado con flechas rojas); por último, se logra observar la presencia de caspasa-8.

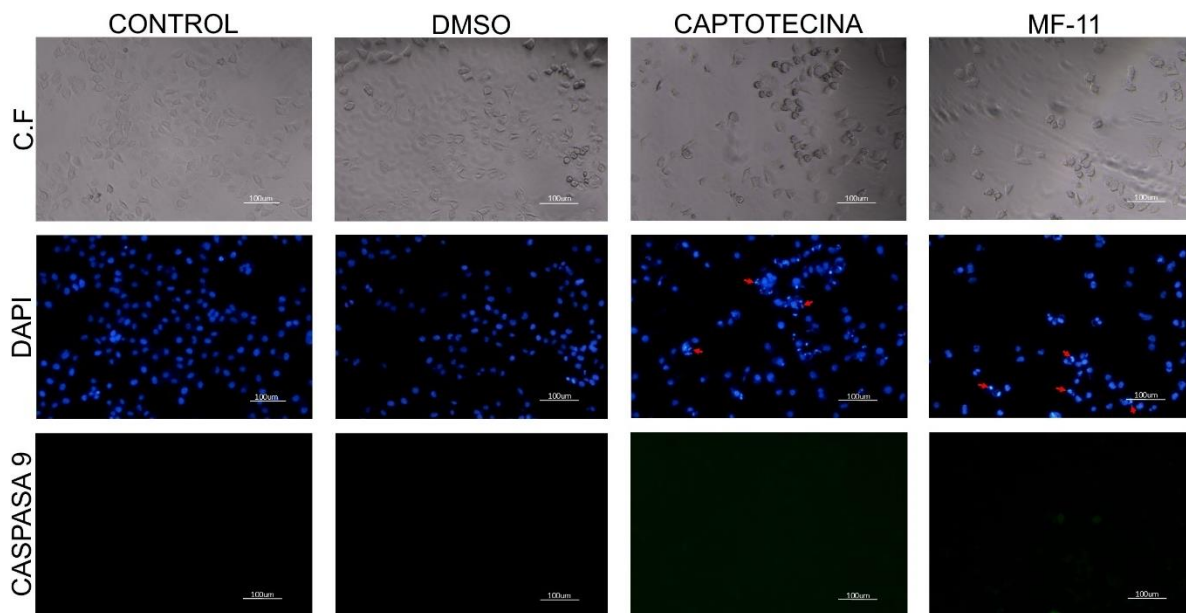


Figura 16. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en células SK-LU-1. Podemos observar que el compuesto ocasiona una pérdida de la morfología celular, aunado a una compactación y fragmentación de la cromátida (señalado con flechas rojas). Hay muy poca presencia de caspasa-9.

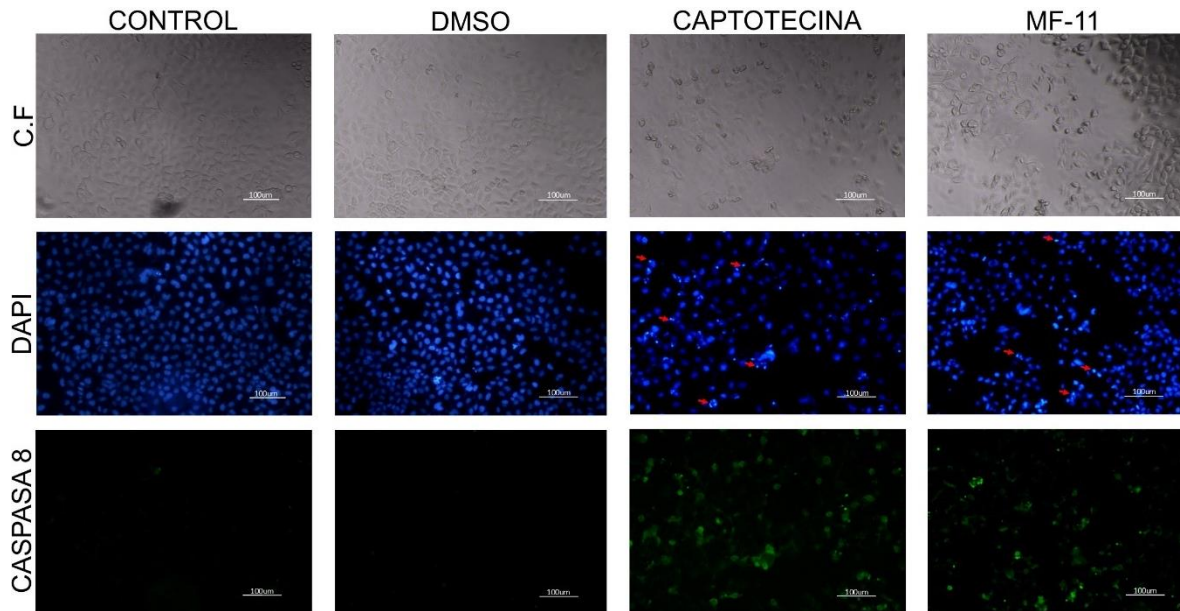


Figura 17. Efecto del MF-11 tras 24 horas de tratamiento en células CaSki. Se logra apreciar un cambio en su morfología y pérdida de adhesión, además una compactación y fragmentación del ADN (señalado con flechas rojas); por ultimo se logra observar activación de caspasa-8.

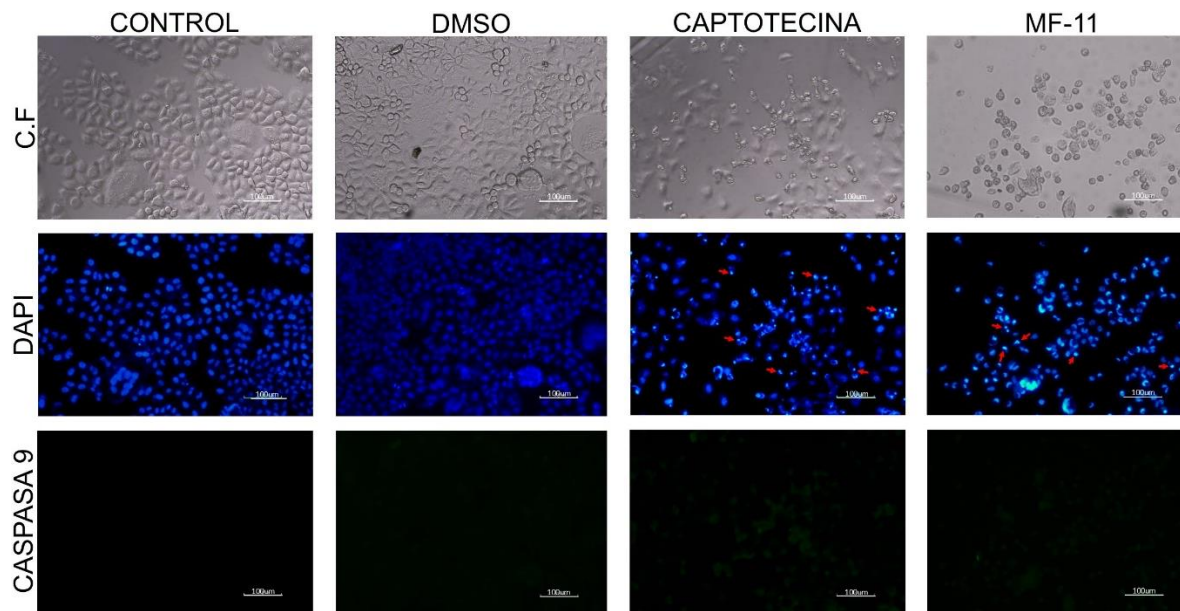


Figura 18. Efecto del MF-11 tras 24 horas de tratamiento en células CaSki. Las células presentan una pérdida de adherencia y de su morfología, además de la compactación y fragmentación de la cromátida (señalado con flechas rojas); y no hay mucha presencia de la caspasa-9.

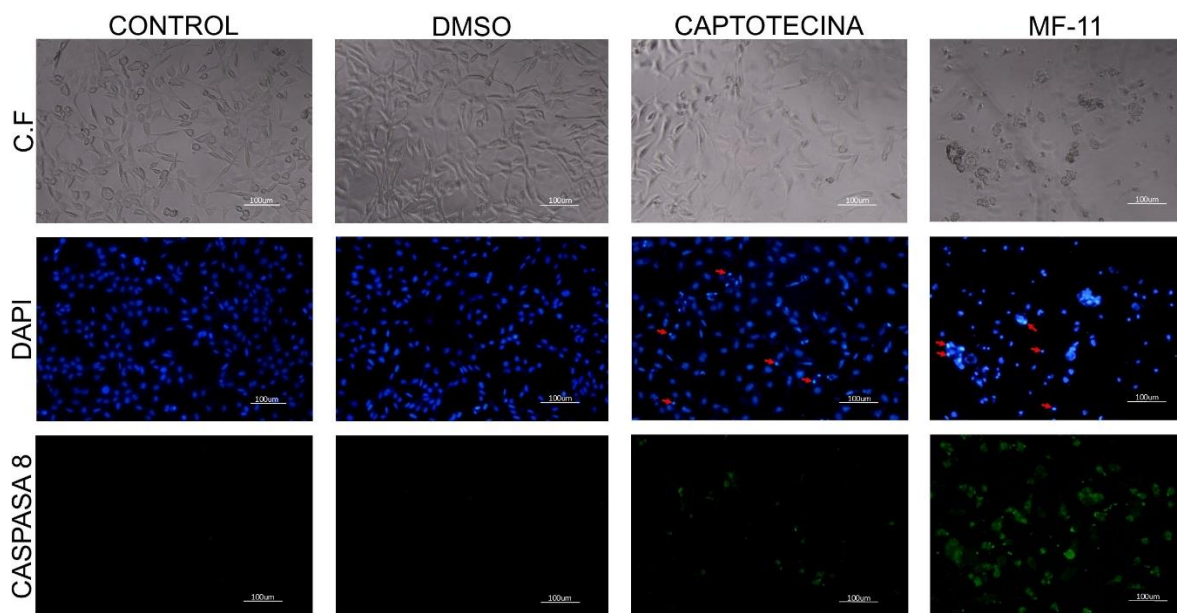


Figura 19. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en la línea celular MDA-MB-231. Se puede observar que las células muestran un cambio en su morfología típica, además presentan compactación y fragmentación de la cromátida (señalado con flechas rojas) y la activación de la caspasa-8.

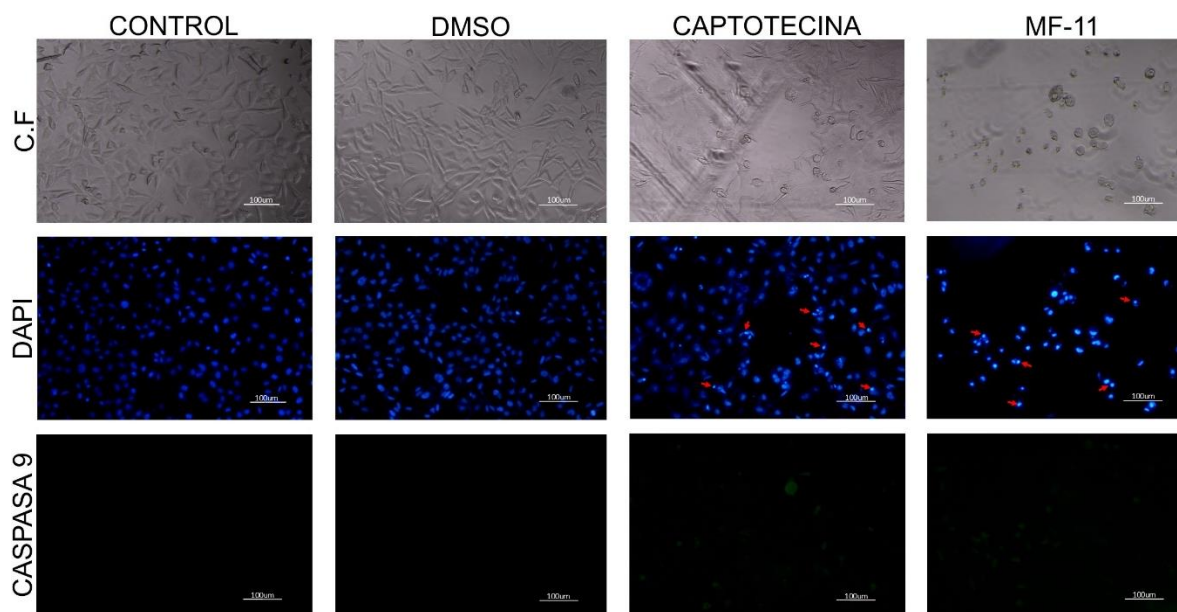


Figura 20. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en la línea celular MDA-MB-231. Las células pierden adherencia y sufren cambios morfológicos, su cromátida se encuentra compactada y fragmentada (señalado con flechas rojas), y principalmente una activación de la caspasa-9 baja.

Los resultados muestran que el MF-11 logra activar ambas caspasas, no obstante, la caspasa que se logra apreciar claramente y que se encuentra en mayor cantidad es la caspasa-8 activa y por lo mismo se deduce que el compuesto MF-11 lleva a

cabo el proceso de apoptosis por medio de la ruta que se caracteriza por la participación de esta caspasa, la ruta extrínseca.

Quantificación de las caspasa -8 y -9 activas

Dado que la microscopia no permite cuantificar la cantidad de caspasas presentes en las células tratadas, se procedió a cuantificar la presencia de las caspasa -8 y -9 activas en las tres líneas celulares mediante citometría de flujo (Figuras 21-23)

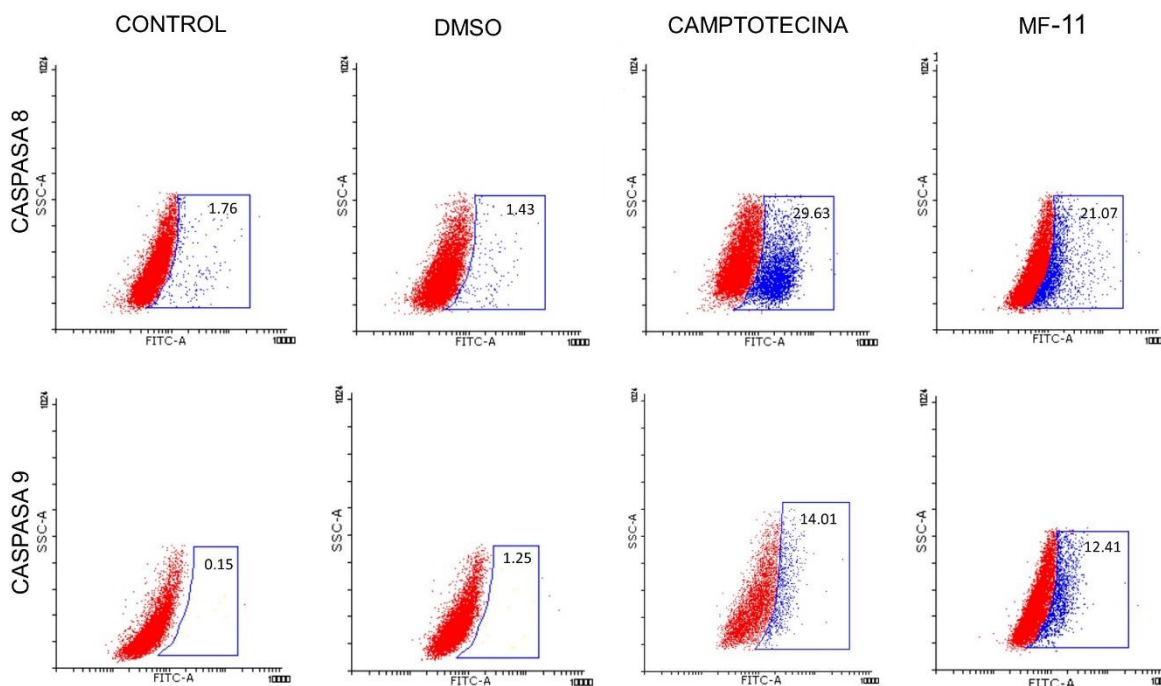


Figura 21. Detección de la forma activa de las caspasas-8 y -9 en cultivos celulares correspondientes a la línea celular SK-LU-1 tratadas con la concentración del MF-11 correspondiente a la IC₅₀ durante 24 horas

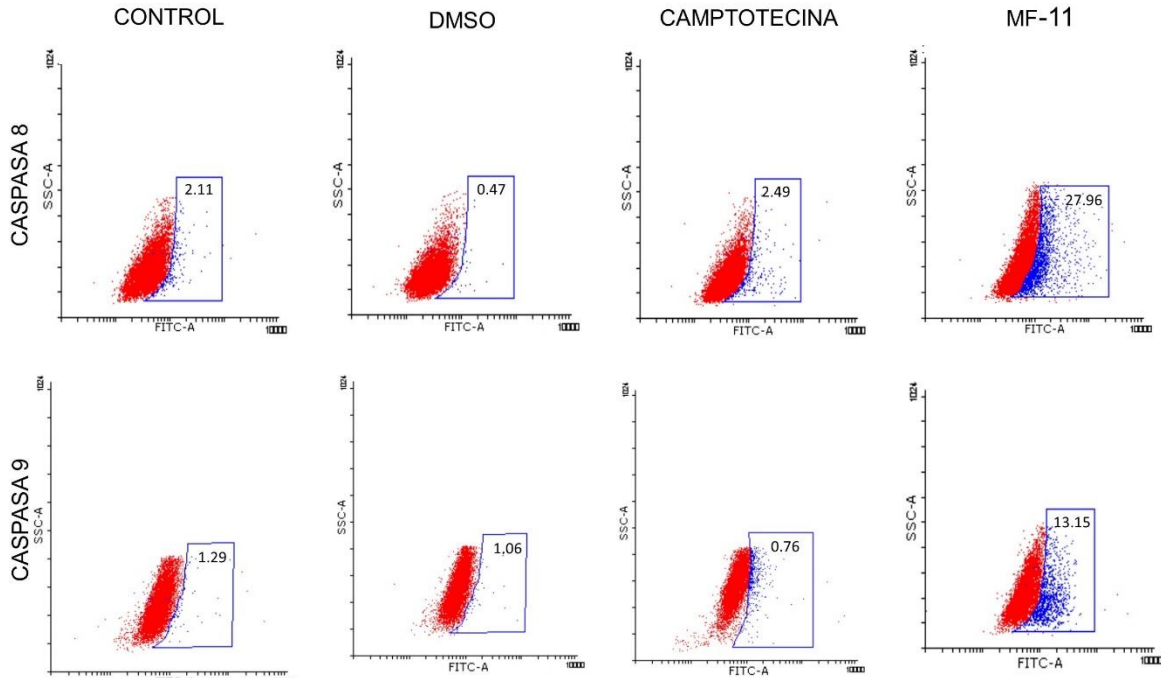


Figura 22.. Evaluación de la caspasa-8 y caspasa-9 en su forma activa en cultivos celulares de cáncer cervicouterino pertenecientes a la línea celular CaSki. Los cultivos fueron estimulados con la concentración correspondiente a la IC₅₀ durante 24 horas.

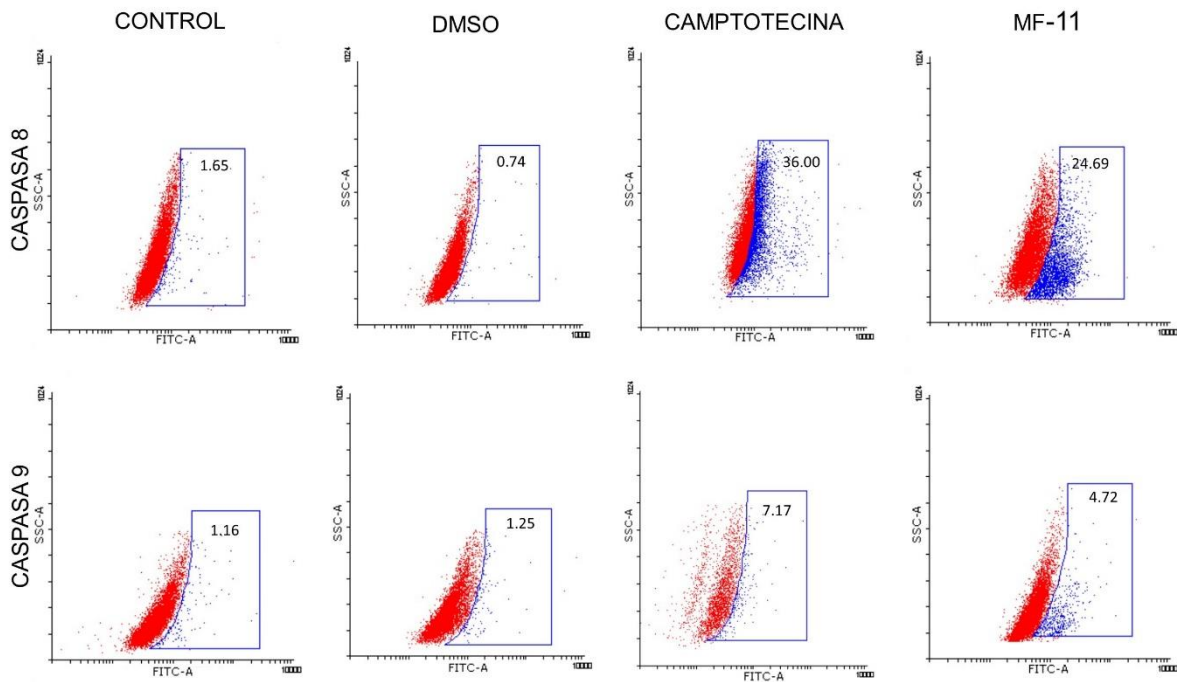


Figura 23. Evaluación de las caspasas -8 y -9 activas en cultivos celulares de cáncer de mama pertenecientes a la línea celular MDA-MB-231 tratadas durante 24 horas con el compuesto MF-11 con la concentración correspondiente a la IC₅₀.

Los resultados permiten corroborar lo que se demostraba con la microscopia, el MF-11 logra que la presencia de la caspasa-8 activa este por encima de la caspasa-9 activa.

Evaluación de proteínas de la familia Bcl-2

Ya que se observó que la ruta extrínseca se está llevando a cabo, se procedió a corroborar esta activación evaluando tres proteínas de la familia de Bcl-2, dos de éstas se caracterizan por intervenir en el proceso de apoptosis. Por un lado, se encuentra la proteína BID, misma que estrictamente forma parte de la ruta extrínseca, y por el otro BAX, que es la encargada de generar poros en la membrana mitocondrial durante la ruta intrínseca. En contraparte, la última proteína evaluada fue una anti-apoptótica, Bcl-2 misma que se caracteriza por no permitir la formación de los poros en la membrana mitocondrial. Para esto, cultivos de células Sk-Lu-1, CaSki y MDA-MB-231 fueron tratadas con el MF-11 en concentraciones correspondientes a la IC₅₀ de cada línea celular por 24h y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo primario y secundario de manera independiente durante 24 y 2 horas respectivamente, por último, estas muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia. (Figuras 24-32)

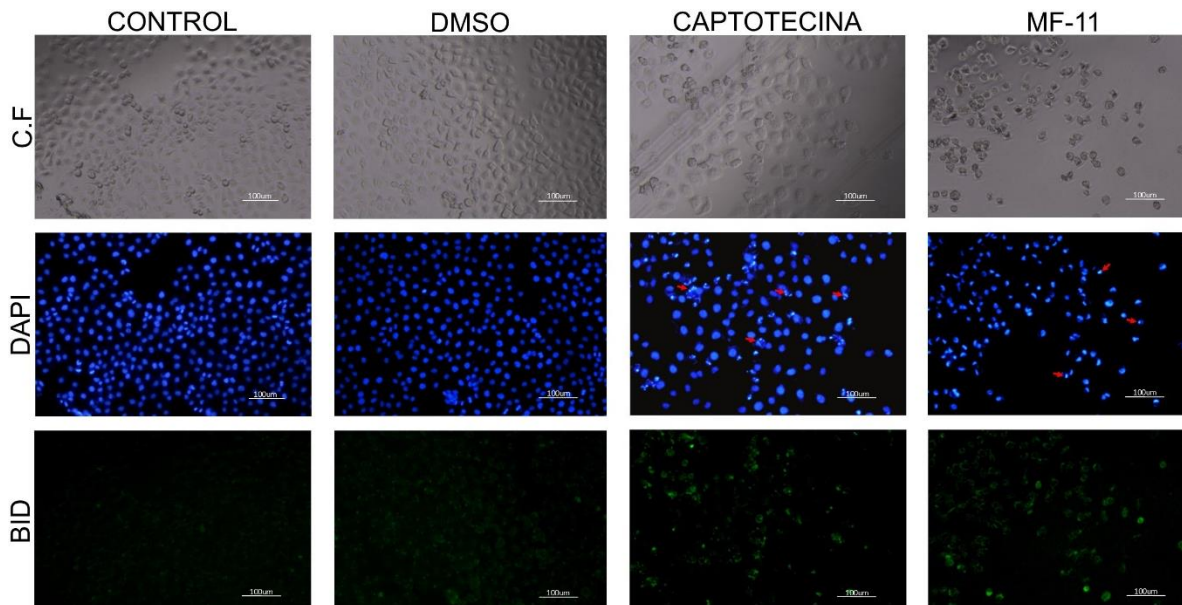


Figura 24. Efecto del MF-11 tras 24h de tratamiento en células SK-LU-1. Además de los efectos que produce el MF-11 en la morfología celular y en la cromátida ya mencionados con anterioridad, se observa que el compuesto ocasiona un aumento en la presencia de la proteína BID.

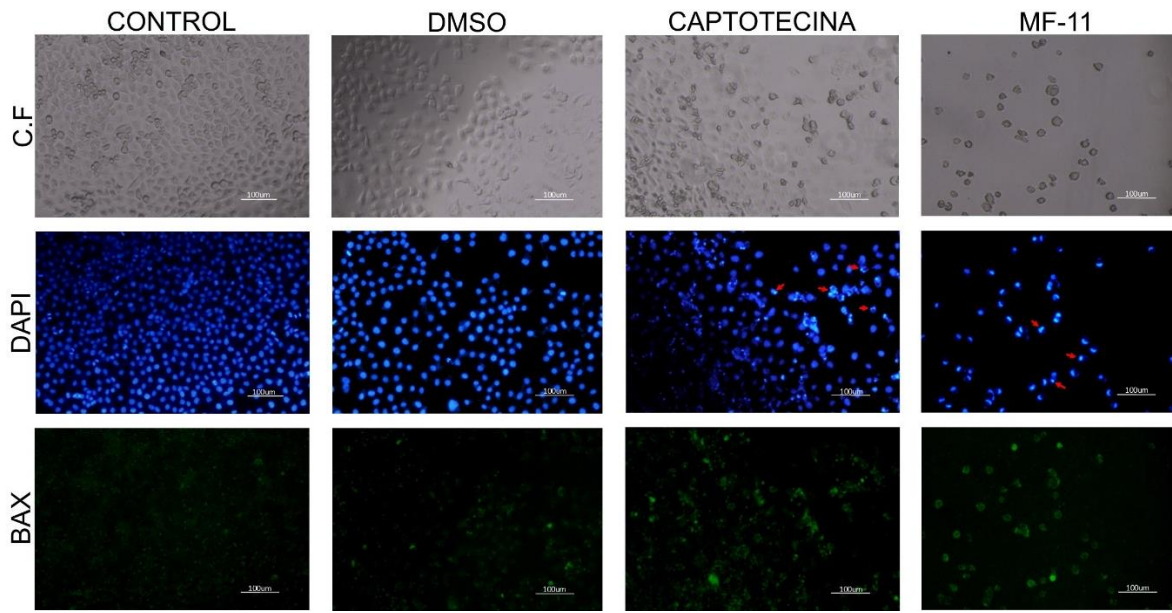


Figura 25. Efecto del MF-11 tras 24h de tratamiento en células SK-LU-1. Aunado a los cambios que produce en las células mencionados anteriormente, el MF-11 es responsable del aumento en la proteína BAX.

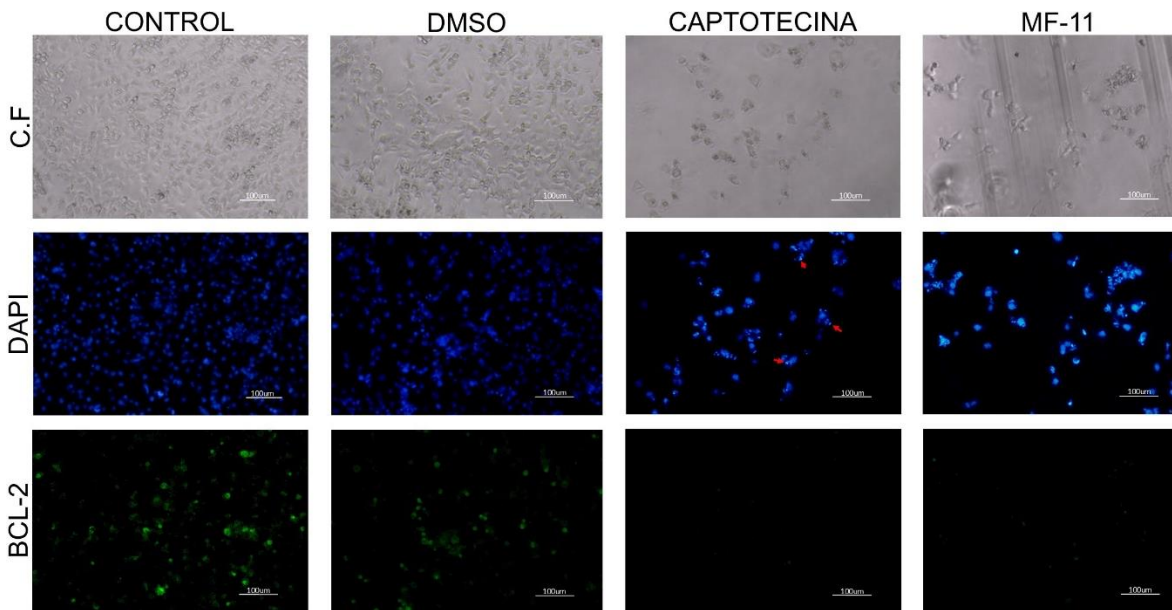


Figura 26. Efecto del MF-11 tras 24h de tratamiento en células SK-LU-1. Además de los efectos que produce el MF-11 en la morfología celular y en la cromátida, se observa que el compuesto ocasiona una disminución en la concentración de la proteína Bcl-2.

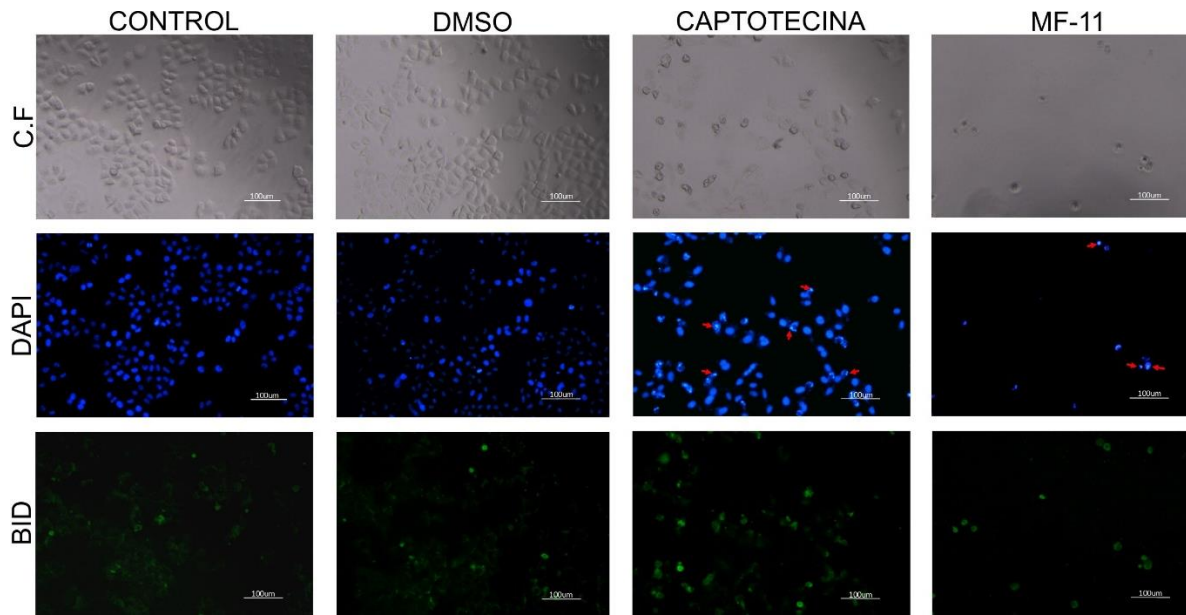


Figura 27. Efecto del MF-11 tras 24h de tratamiento en células CaSki. El MF-11 además de elevar la presencia de la proteína proapoptótica BID, ocasiona los cambios en la morfología y cromátida ya mencionados.

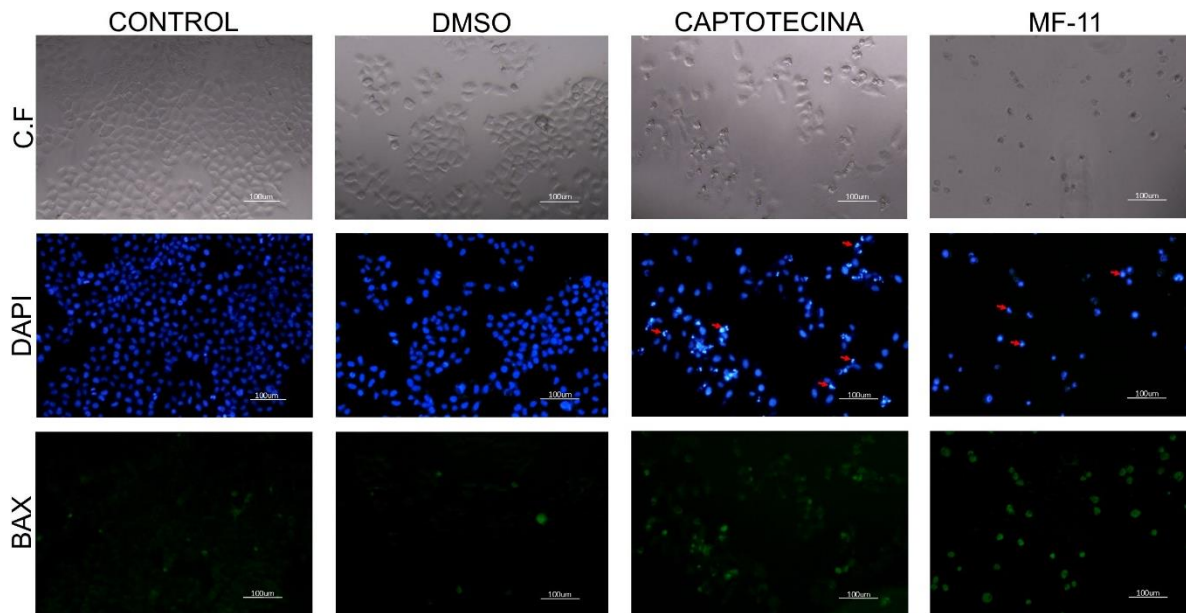


Figura 28. Efecto del MF-11 tras 24h de tratamiento en células CaSki. Las células muestran los cambios característicos ocasionados por el compuesto, además del aumento en la presencia de la proteína proapoptótica BAX.

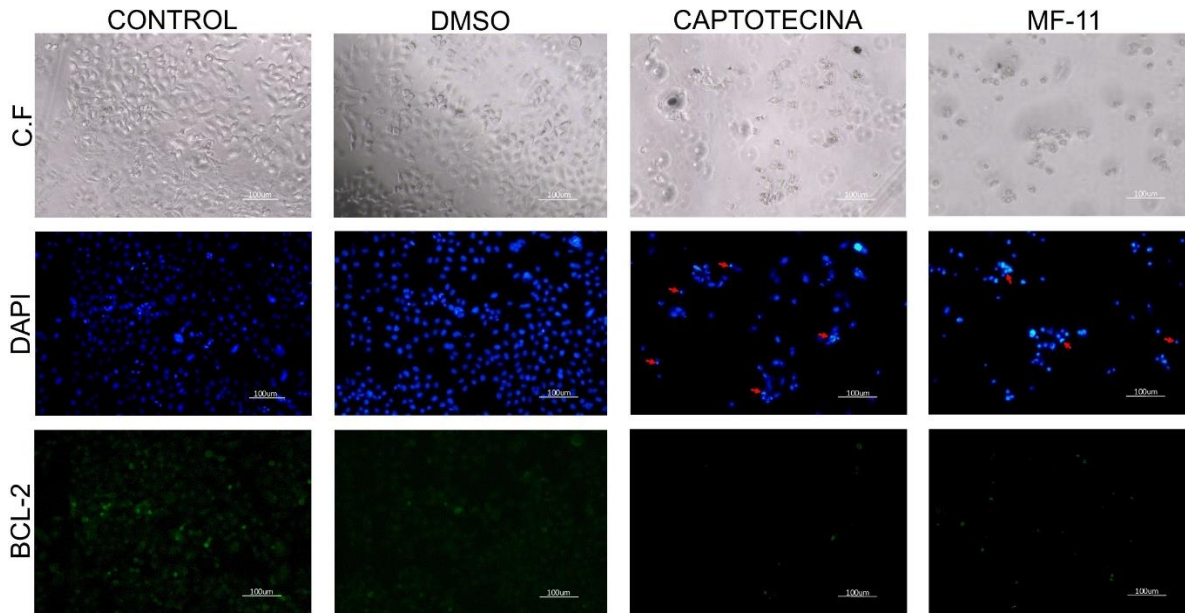


Figura 29. Efecto del MF-11 tras 24h de tratamiento en células CaSki. Las células muestran los cambios característicos ocasionados por el compuesto, además de la disminución en la presencia de la proteína Bcl-2.

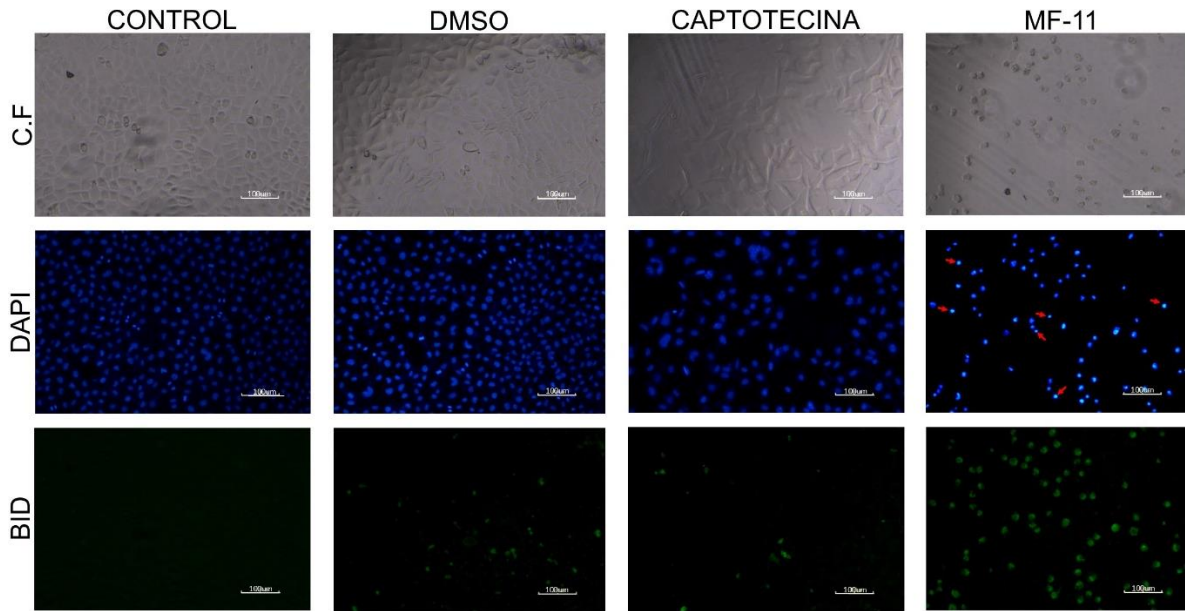


Figura 30. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en la línea celular MDA-MB-231. Las células presentan los cambios ya mencionados anteriormente junto con el aumento en la presencia de la proteína BID.

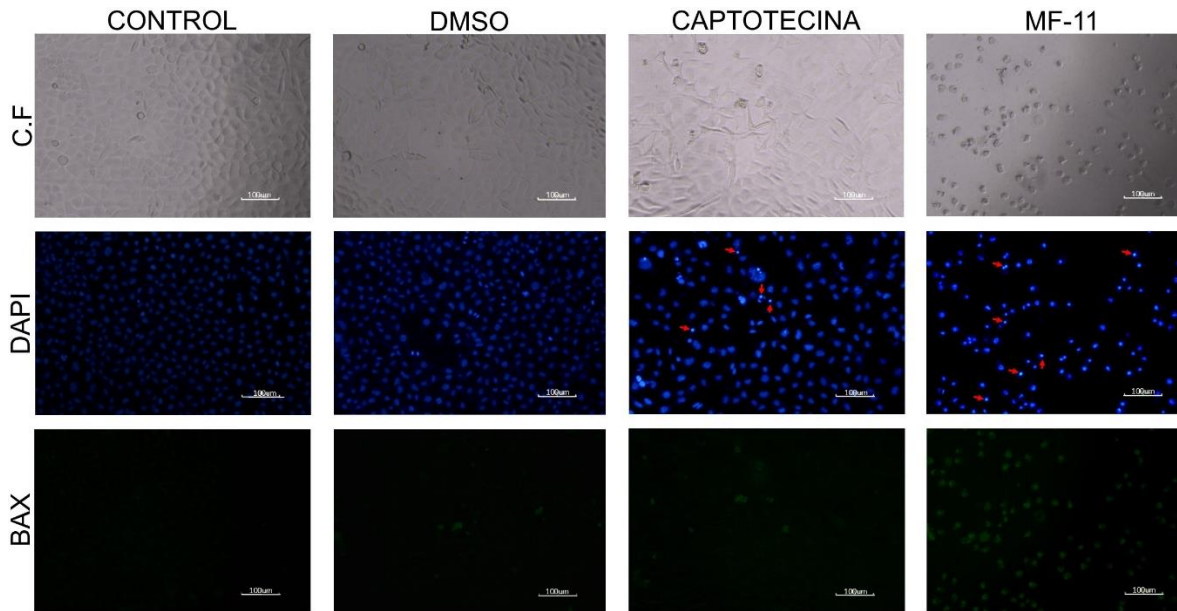


Figura 31. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en la línea celular MDA-MB-231. El MF-11 ocasiona los cambios ya mencionados en resultados anteriores además del aumento en la presencia de la proteína BAX.

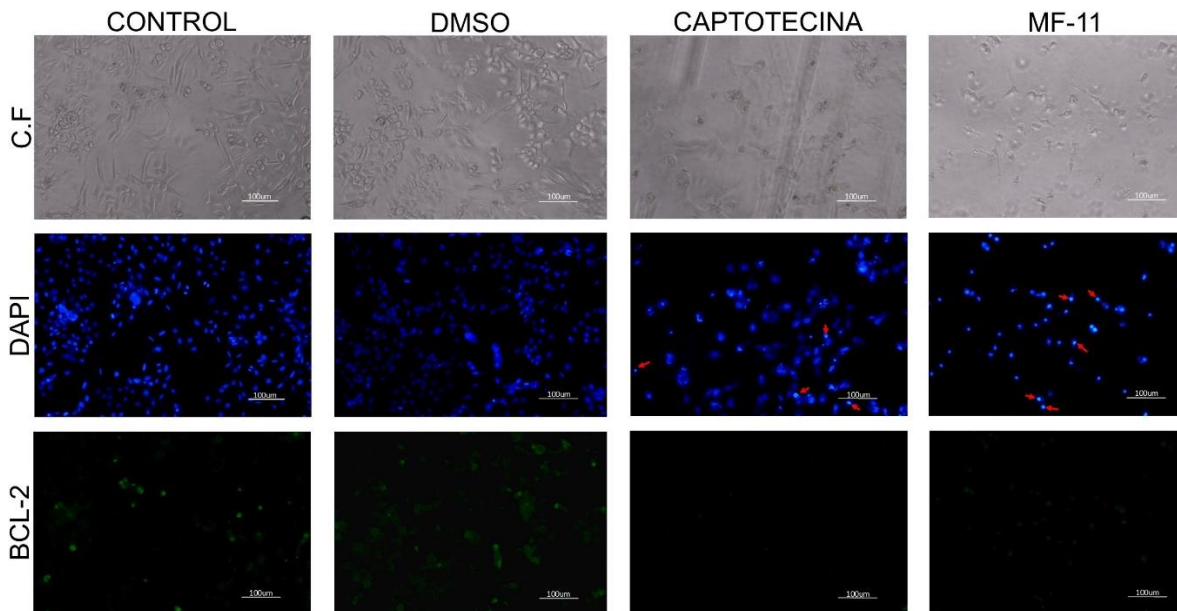


Figura 32. Efecto del MF-11 después de 24 horas de su aplicación en la línea celular MDA-MB-231. Las células presentan cambios morfológicos apoptóticos además de la disminución en la proteína Bcl-2.

Los resultados nos permiten corroborar que la ruta por la cual se está llevando a cabo la apoptosis es la extrínseca, esto porque se observa en los cultivos celulares que fueron estimulados con el MF-11 un aumento de la concentración de la proteína BID misma que es activada únicamente por la caspasa-8 interviniendo en la ruta extrínseca. También, mediante la presencia de BID, se pueden explicar el aumento de la proteína BAX misma que está involucrada en los mecanismos necesarios para

la activación de la caspasa-9, explicando así la presencia de esta en los cultivos tratados.

En lo que respecta a la proteína Bcl-2, se observa una disminución provocada por el MF-11. Por esta razón se garantiza que la célula morirá por apoptosis ya que las proteínas encargadas de la inhibir este tipo de muerte no se encuentran presentes en las células.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se evalúa el compuesto MF-11 y los resultados que se obtuvieron, se demuestra que el MF-11 tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células de cáncer de pulmón SK-LU-1, cáncer cervicouterino CaSki y cáncer de mama MDA-MB-231 en donde las IC₅₀ fueron de 24.05 µg/ml, 25.45 µg/ml y 25.91 µg/ml respectivamente. Aunado a esto, se demostró que las diferentes concentraciones del MF-11 no producen una muerte necrótica resultado así favorable para su consumo ya que no producirá algún efecto secundario.

Por otra parte, se evaluó la caspasa-3 activa, para determinar si el MF-11 provoca una muerte apoptótica. Lo que se observó fue una clara presencia de la caspasa-3 activa en los cultivos tratados con el compuesto, mientras que en las condiciones del control y DMSO no se encontraba presente. Demostrando así que, en cultivos celulares de cáncer de pulmón, cervicouterino y de mama el MF-11 tiene la capacidad de provocar que la célula lleve a cabo la apoptosis reflejado en la disminución del número celular.

Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en estudios anteriores dentro de nuestro grupo de trabajo, donde el MF-11 fue evaluado en cáncer de pulmón (Zamora López, 2017), en cáncer cervicouterino (Aveitua Villeda, 2014) y en cáncer de mama (López Durán, 2017) cuyos resultados indican que el compuesto tiene actividad antiproliferativa con IC₅₀ de 20 µg/ml en células SK-LU-1, 25 µg/ml en CaSki y de 24.98 µg/ml en MDA-MB-231.

Una vez confirmado que el MF-11 produce una muerte apoptótica en células de cáncer de pulmón, cervicouterino y de mama, lo siguiente que se evaluó fue la ruta por la cual la apoptosis se está llevando a cabo.

Aunque en los últimos años las investigaciones acerca del potencial anticancerígeno que presentan las saponinas ha ido en aumento, pocas son las investigaciones dedicadas a la determinación de la ruta por la cual se está activando la apoptosis. Dentro de las saponinas que ya se ha establecido la manera con la que se lleva a cabo la apoptosis en diferentes tipos de cáncer se encuentra la dioscina y la diosgenina. Para la primera se ha reportado que la vía que se activa es la intrínseca en cáncer cervicouterino (Cai, et al., 2002), cáncer de esófago (Wang, et al., 2012), cáncer gástrico (Gao, et al., 2011; Hu, et al., 2013) y en leucemia (Liu, et al., 2004). Para el siguiente caso, la diosgenina tiene un efecto

similar ya que también la vía que interviene es la intrínseca esto en cáncer cervicouterino (Huo, et al., 2004), cáncer de hígado (Kim, et al., 2012), cáncer de laringe y melanoma (Cecile, et al., 2004). Sin embargo, el MF-11 rompe con esta tendencia de la ruta intrínseca, ya que los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que activa la ruta extrínseca ya que la caspasa-8 se encuentra en mayor proporción que la caspasa-9 y esto se demuestra cualitativamente mediante la microscopia de epifluorescencia y cuantitativamente por citometría de flujo dando resultados 27.96% y 13.15% en SK-LU-1, 21.01% y 12.41% en CaSki y 24.69% y 4.72% en MDA-MB-231 (el primer porcentaje pertenece a la caspasa-8 mientras que el segundo a la caspasa-9).

Por otra parte, la evaluación de dos proteínas proapoptóticas las cuales fueron BID y BAX demuestra que el MF-11 logra que la concentración de estas dos proteínas se vea aumentada en los cultivos de células de cáncer de pulmón, cáncer cervicouterino y cáncer de mama de las líneas celulares Sk-Lu-1, CaSki y MDA-MB-231, corroborando que se está llevando a cabo la apoptosis. Estos resultados nos permiten explicar la presencia de ambas caspasas en los cultivos celulares, ya que BID es activada por la caspasa-8 pasando a su forma truncada (tBID) translocándose a la membrana externa de la mitocondria activando así a BAX (Korsmeyer, et al., 2000; Wei, et al., 2000; Degli Esposti, 2002; Kantari & Walczak, 2011; Palacios, et al., 2011; Shubach, et al., 2015). En contraparte, BAX una vez activada se encarga de formar poros en la membrana externa de la mitocondria liberando diferentes proteínas del espacio intermembrana para formar el apoptosoma y este a su vez activa la caspasa-9 (Dewson & Kluck, 2009; Westphal, et al., 2011; Westphal, et al., 2014; Peña-Blanco & García-Sáez, 2018).

En lo que respecta a la proteína Bcl-2, el hecho de que el MF-11 presente la capacidad de disminuir la concentración de esta proteína es de gran importancia ya que es común encontrar una sobreexpresión de esta en diferentes tipos de cáncer en donde se le atribuye principalmente la resistencia a la apoptosis y por lo tanto controlar la expresión de esta proteína tiene un interés terapéutico. Entre los cánceres que presentan estas características se encuentran el cáncer de pulmón (Loprevite, et al., 1997; Daniel & Smythe, 2004; Zhang, et al., 2015; Sun, et al., 2017), cáncer de mama (Emi, et al., 2005; Čečka, et al., 2008; Merino, et al., 2016; Eom, et al., 2016) y el cáncer cervicouterino (Crawford, et al., 1998; Dimitrakakis, et al., 2000; Leisching, et al., 2015)

Por lo tanto, los resultados confirman que la ruta principal de apoptosis que activa el MF-11 es la extrínseca, debido a la presencia de la caspasa-8, posteriormente esta caspasa se encarga de pasar de BID a tBID ocasionando su translocación a la mitocondria en donde activaría a BAX, lo que en las fotografías se observa como el aumento de estas dos proteínas, logrando así la liberación del citocromo c y la posterior activación de la caspasa-9, demostrado en la presencia de esta caspasa, y finalizando en la activación de la caspasa-3 que es la responsable de la

fragmentación y compactación de la cromátida, y de la morfología característica de la apoptosis en general.

Por último, el hecho de que la ruta extrínseca sea la encargada de llevar a cabo la muerte por apoptosis en estas células es un factor importante ya que en esta ruta no se hace presente la proteína p53 misma que se encuentra mutada lo que le impide realizar sus funciones de manera correcta en diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de pulmón (Iggo, et al., 1990; Loprevite, et al., 1997; Serrano, 2007; Mogi & Kuwano, 2011) y el cáncer de mama (Quintela Senraa, et al., 2001; Gasco, et al., 2002; Hui, et al., 2006; Huszno & Grzybowska, 2018; Duffy, et al., 2018). Por otro lado, se encuentra el caso del cáncer cervicouterino que, aunque se active la misma ruta que los casos anteriores, las condiciones de la proteína p53 son muy diferentes debido a que ésta no se encuentra dentro de la célula porque el VPH presente en la línea celular CaSki se encarga de degradarla (Gariglio, 1998; Hietanen, et al., 2000; Bae, et al., 2003; Zaldívar Lelo de Larrea, et al., 2012; Garima, et al., 2016).

CONCLUSIONES

- El compuesto MF-11 presenta actividad antiproliferativa en células cancerígenas en las líneas MDA- MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki con IC₅₀ de 25.91 µg/ml 24.05 µg/ml y 25.45 µg/ml respectivamente.
- Las IC₅₀ del compuesto MF-11 no inducen efecto necrótico las líneas celulares MDA-MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki.
- El MF-11 induce una muerte celular por apoptosis en las líneas celulares MDA- MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki provenientes de diferentes tipos de cáncer mediante la activación de la caspasa-3.
- La ruta de apoptosis que se ve activada por el compuesto MF-11 es la extrínseca debido a la alta presencia de caspasa-8 activa.
- El compuesto MF-11 puede aumentar las concentraciones de las proteínas BID y BAX en las líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y cervicouterino.
- El M-11 puede disminuir la concentración de la proteína Bcl-2 en las líneas celulares MDA- MB-231, Sk-Lu-1 y CaSki.

PERSPECTIVAS

- Comprobar cuantitativamente el aumento de las proteínas BID y BAX en las tres líneas celulares.
- Evaluar la presencia de BID en su forma truncada.
- Evaluar la presencia de las proteínas antiapoptóticas en la membrana mitocondrial.
- Comprobar cuantitativamente la disminución de la concentración de la proteína Bcl-2 en las tres líneas celulares.
- Evaluar el receptor de muerte al se une el compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, M. E. R. & López, M. R., 2010. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular.. *Iatreia*, 23(2), pp. 166-177.

Alberts, B. & Bray, D., 2006. *Introducción a la biología celular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Amorín Kajatt, E., 2013. Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, Volumen 30, pp. 89-92.

Arévalo, B., Raúl, A., Arévalo Salazar, D. E. & Villarroel Subieta, C. J., 2017. El cáncer de cuello uterino. *Revista Médica La Paz*, 23(2), pp. 45-56.

Arrieta, O. y otros, 2013. Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Revista de Investigación Clínica*, 65(S1), pp. 5-84.

Ashe, P. C. & Berry, M. D., 2003. Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(2), pp. 199-214.

Ashkenazi, A., 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(3-4), pp. 325-331.

Aveitua Villeda, N., 2014. *Actividad antiproliferativa y apoptótica del compuesto clorohidrato de 2-deoxi-2-amino-beta-d-glucopiranosido diosgenilo (mf-11) sobre líneas celulares de cáncer cérvicouterino*, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Bachran, C. y otros, 2008. Saponins in Tumor Therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Volumen 8, pp. 575-584.

Bae, S. M. y otros, 2003. Cell-specific growth inhibition of human cervical cancer cell by recombinant adenovirus p53 in vitro and in vivo. *Cancer Research and Treatment*, 35(3), pp. 1981-1990.

Barrio, P. R. & Mejía, Y. A., 2014. Cáncer de pulmón. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(67), pp. 3983-3994.

Belkacemi, L., 2018. Exploiting the Extrinsic and the Intrinsic Apoptotic Pathways for Cancer Therapeutics. *J Cancer Cure*, 1(1), p. 1004.

Borunda, A., 2013. *Biología molecular*. México: McGraw Hill Mexico.

Brandan, M. E. & Villaseñor, Y., 2006. Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México. *Cancerología*, 1(3), pp. 147-162.

Buenrostro, B. A. O. y otros, 2011. El cáncer cérvico-uterino: Implicaciones de la edad de inicio de vida sexual y el Papilomavirus humano. *Revista Fuente Año*, 3(8), pp. 34-38.

Buenrostro, B. A. O. y otros, 2011. El cáncer cérvico-uterino: Implicaciones de la edad de inicio de vida sexual y el Papilomavirus humano. *Revista Fuente Año*, 3(8), pp. 34-38.

- Cai, J., Liu, M., Wang, Z. & Ju, Y., 2002. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells.. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(2), pp. 193-196.
- Cecile, C., Bertrand, L., Faraj, T. & Jean-Louis, B., 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*, 14(3), pp. 188-196.
- Čečka, F. H. H. y otros, 2008. Expression of bcl-2 in breast cancer: correlation with clinicopathological characteristics and survival. *Acta Medica*, 51(2), pp. 107-112.
- Choudhury, J. D. y otros, 2012. A review on apoptosis and its different pathway. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, Volumen 3, pp. 848-861.
- Crawford, R. A. y otros, 1998. Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British journal of cancer*, 78(2), pp. 210-214.
- Cuervo Millan, F. & Carrillo Bayona, J., 2004. Neoplasias pulmonares broncogénicas. *Revista Colombiana de Neumología*, 16(1), pp. 50-67.
- Daniel, J. C. & Smythe, W. R., 2004. The role of Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*, 16(1), pp. 19-27.
- De Toro, G., 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas Hispanoamericanas de patología*, Volumen 1, pp. 1-6.
- de Vinuesa Calvo, G. G., 2017. Clasificación Anatomopatológica. *Revista Española de Patología Torácica*, 29(2), pp. 13-24.
- de Vries, E. G., Gietema, J. A. & de Jong, S., 2006. Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications. *Clinical cancer research*, 12(8), pp. 2090-2093.
- Degli Esposti, M., 2002. The roles of Bid. *Apoptosis*, 7(5), pp. 433-440.
- Desai, S. D., Desai, D. G. & Kaur, H., 2009. Saponins and their Biological Activities. *Pharma Times*, 41(3), pp. 13-16.
- Dewson, G. & Kluck, R. M., 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of cell science*, 122(16), pp. 2801-2808.
- Dimitrakakis, C. y otros, 2000. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecologic oncology*, 77(1), pp. 129-136.
- Duffy, M. J., Synnott, N. C. & Crown, J., 2018. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast cancer research and treatment*, 170(2), pp. 213-219.
- Elena, G. A., 2002. Mecanismos de muerte celular: Apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*, 60(6), pp. 391-401.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp. 495-516.

- Emi, M. y otros, 2005. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Breast cancer research*, 7(6), pp. R940-R952.
- Eom, Y. H. y otros, 2016. BCL2 as a subtype-specific prognostic marker for breast cancer. *Journal of breast cancer*, 19(3), pp. 525-260.
- Escobar-Sánchez, M., Luis, S.-S. & Sandoval-Ramírez, J., 2015. Steroidal Saponins and Cell Death in Cancer. En: T. M. Ntuli, ed. *Cell Death. Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. s.l.:IntechOpen, pp. 331-351.
- Expósito, F. N. y otros, 2013. Cáncer de pulmón no microcítico. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(31), pp. 1811-1824.
- Fan, y otros, 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11), pp. 719-727.
- Fernández-Herrera, M. A. y otros, 2012. Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates. *European journal of medicinal chemistry*, Volumen 54, pp. 721-727.
- Figuroa, M. D. S. R. A. L. S., Hernández, P. C. O., Sánchez, M. Á. M. & Mendiola, V. L. R., 2008. Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecología y Obstetricia de México*, 76(11), pp. 667-672.
- Fulda, S. & Debatin, K. M., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), pp. 4798-4811.
- Gao, L. L. y otros, 2011. Paris chinensis dioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells.. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 17(19), pp. 4389-4395.
- Gariglio, P., 1998. Cáncer cévico-uterino. Influencia de los genes celulares y de los virales. Implicaciones en el desarrollo de vacunas. *Gaceta Médica de México*, 134(3), pp. 297-310.
- Garima, y otros, 2016. The role of p53 gene in cervical carcinogenesis. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 66(1), pp. 383-388.
- Gasco, M., Shami, S. & Crook, T., 2002. The p53 pathway in breast cancer. *Breast cancer research*, 4(2), pp. 70-76.
- Grasso, S. y otros, 2012. Cell death and cancer, novel therapeutic strategies. En: *Apoptosis and Medicine*. s.l.:IntechOpen.
- Güçlü-Üstündag, Ö. & Mazza, G., 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(231), pp. 231-258.
- Gupta, S., 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life sciences*, 69(25-26), pp. 2957-2964.
- Guzmán-Santos, K. y otros, 2012. Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *Archivos de medicina*, 8(1), pp. 1-8.
- Hengartner, M. O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), pp. 770-776.

- Hietanen, S. y otros, 2000. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules.. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), pp. 8501-8506.
- Hockenbery, D., 1995. Defining apoptosis. *The American journal of pathology*, 164(1), pp. 16-19.
- Hui, L. y otros, 2006. Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene*, 25(55), pp. 7305-7310.
- Hu, M. y otros, 2013. Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways.. *Journal of Applied Toxicology*, 33(8), pp. 712-722.
- Huo, R. y otros, 2004. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(8), pp. 1077-1082.
- Huszno, J. & Grzybowska, E., 2018. P53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. *Oncology letters*, 16(1), pp. 34-40.
- Iggo, R. y otros, 1990. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *The Lancet*, 335(8691), pp. 675-679.
- INEGI, 2015. *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL...DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE)*. [En línea]
Available at: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
[Último acceso: 09 Septiembre 2018].
- Iracheta, M. L., 2007. El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 101(2), pp. 1-33.
- Jesus, M., Martins, A. P. J., Gallardo, E. & Silvestre, S., 2016. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Volumen 2016, pp. 1-16.
- Jung, C. W. y otros, 2012. Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 α .. *Toxicology in Vitro*, 56(1), pp. 42-50.
- Jutinico, A., Mantilla, A. & Sánchez, R., 2015. Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con Chlamydia trachomatis. *NOVA*, 13(24), pp. 83-92.
- Kantari, C. & Walczak, H., 2011. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *iochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), pp. 558-563.
- Kim, D. S. y otros, 2012. Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volumen 2012, pp. 1-8.
- Korsmeyer, S. J. y otros, 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation*, 7(12), pp. 1166-1173.

- Lawen, A., 2003. Apoptosis—an introduction. *Bioessays*, 25(9), pp. 888-896.
- Leisching, G., Loos, B., Botha, M. & Engelbrecht, A. M., 2015. Bcl-2 confers survival in cisplatin treated cervical cancer cells: circumventing cisplatin dose-dependent toxicity and resistance. *Journal of translational medicine*, 13(1), pp. 1-8.
- Liu, B. Q. y otros, 2011. Glucosamine induces cell death via proteasome inhibition in human ALVA41 prostate cancer cell. *Experimental & molecular medicine*, 43(9), pp. 487-493.
- Liu, M.-J. y otros, 2004. The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(7), pp. 1059-1065.
- Lizarbe, M., 2007. EL SUICIDIO Y LA MUERTE CELULAR. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, pp. 1-33.
- Lodish, H., 2005. *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- López Durán, B. S., 2017. *Evaluación de la actividad antiproliferativa y necrótica del 2-deoxi-2-acetamino-β-D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el clorhidrato de 2-deoxi-2-amino-β-D-glicopiranosido de diosgenilo (MF-11) en células de cáncer de mama MDA-MB-231*, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Loprevite, M. y otros, 1997. Analysis of K-ras, p53, bcl-2 and Rb expression. *International journal of oncology*, 11(6), pp. 1203-1208.
- Lowe, S. W. & Lin, A. W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), pp. 485-495.
- Luna-Cabañas, M. I., 2019. *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)*, México: UNAM.
- Manzo-Merino, J., Jiménez-Lima, R. & Cruz-Gregorio, A., 2014. Biología molecular del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(4), pp. 18-24.
- Martínez MartínezPinillo, A. y otros, 2010. Análisis de los principales factores de riesgo relacionados con el cáncer cérvico uterino en mujeres menores de 30 años. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 36(1), pp. 52-65.
- Martínez-Mata, S. I., 2013. *Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina-3-glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y ViBo*, México: UNAM.
- Martín, M., Herrero, A. & Echavarría, I., 2015. El cáncer de mama. *Arbor*, 191(773), p. 234.
- Merino, D., Lok, S. W., Visvader, J. E. & Lindeman, G. J., 2016. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, 35(1), pp. 1877-1887.
- Moctezuma Velasco, C. R. & Zarco, M. P., 2009. Cáncer de pulmón. *Anales de Radiología*, 8(1).
- Moghimpour, E. & Handali, S., 2015. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 5(3), pp. 207-220.

- Mogi, A. & Kuwano, H., 2011. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *BioMed Research International*, pp. 1-9.
- Moses, T., Papadopoulou, K. & Osbourn, A., 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives.. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), pp. 439-462.
- Nair, P. L. M., Petersen, S. & Ashkenazi, A., 2014. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *In Methods in enzymology*, Volumen 55, pp. 99-128.
- Oh, H. J. y otros, 2007. D-Glucosamine inhibits proliferation of human cancer cells through inhibition of p70S6K. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(4), p. 840–845.
- OMS, 2018. *Cáncer*. [En línea]
Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
[Último acceso: 08 Septiembre 2018].
- Orengo, D. J., 2012. *Fundamentos de biología molecular*. Barcelona: Editorial UOC.
- Palacios, E., Miró, M. & Boticario, C., 2011. Muerte celular y cáncer: las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, 15(2), pp. 191-215.
- Peña-Blanco, A. & García-Sáez, A. J., 2018. Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), pp. 416-431.
- Pérez-Montiel, D. y otros, 2014. Patología del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(4), pp. 33-38.
- Prolla, C. M. D. y otros, 2015. Conocimiento del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público. *Revista latino-americana de enfermagem*, 23(1), pp. 90-97.
- Quintela Senraa, D., López Sáez, J., Varela, S. & A., 2001. La proteína p53 y el cáncer de mama. Revisión crítica. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 14(2), pp. 71-77.
- Raju, J. & Rao, C. V., 2012. Diosgenin, a Steroid Saponin Constituent of Yams and Fenugreek: Emerging Evidence for Applications in Medicine. En: I. Rasooli, ed. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. s.l.:s.n., pp. 125-142.
- Ramírez-García, M., Márquez, H., Barranco, G. & López, J., 2014. Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Residente*, 9(3), pp. 84-94.
- Rang, H. & Dale, M., 2008. *Farmacología*. Barcelona: Elsevier España.
- Reed, J. C., 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), pp. 1415-1430..
- Resano, P. & Anta, Y., 2014. Cáncer de pulmón. *Medicine*, 11(67), pp. 3983-3994.
- Ross, M. H. & Pawlina, W., 2007. *Histología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

- Salvatierra, A., Algar, F. & Cerezo, F., 2005. Cáncer de pulmón. Actualización. Estadificación.. En: J. G. Soto Campos, ed. *Manual de diagnóstico y terapéutica en Neumología*. Madrid: Ergon, pp. 535-544.
- Serrano, P. I., 2007. Carcinogénesis pulmonar. *Revista de patología respiratoria*, 10(1), pp. 50-54.
- Shubach, A., Galindo, A. & Mora, R., 2015. Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*, 13(24), pp. 83-92.
- Song, X., Wang, Z., Liang, H. & Zhang, W., 2017. Dioscin Induces Gallbladder Cancer Apoptosis by Inhibiting ROS-Mediated PI3K/AKT Signalling. *International Journal of Biological Sciences*, 13(6), pp. 782-793.
- Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V. M., 2000. Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*, 69(1), pp. 217-245.
- Sun, P. L., Sasano, H. & Gao, H., 2017. Bcl-2 family in non-small cell lung cancer: its prognostic and therapeutic implications. *Pathology international*, 67(3), pp. 121-130.
- Taleisnik, S., 2006. *Receptores celulares y la transducción de señales*. Córdoba: Encuentro Grupo Editor.
- Thakur, M., Melzig, M., Fuchs, H. & Weng, A., 2011. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy*, Volumen 1, pp. 19-29.
- Vicuña, N. C. y otros, 2009. Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología*, 8(1), pp. 61-79.
- Wang, L. S. y otros, 2017. Anti-proliferative potential of Glucosamine in renal cancer cells via inducing cell cycle arrest at G0/G1 phase. *BMC urology*, 17(1), p. 38.
- Wang, Z. y otros, 2012. Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins.. *Cancer Biology & Therapy*, 13(3), pp. 138-147.
- Wei, M. C. y otros, 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development*, 14(16), pp. 2060-2071.
- Welsch, U. & Sobotta, J., 2008. *Histología*. Madrid: Médica Panamericana.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E. & Kluck, R. M., 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), pp. 521-531.
- Westphal, D., Kluck, R. M. & Dewson, G., 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 21(2), pp. 196-205.
- Xu, X.-H., Li, T. & Fong, C. M. V., 2016. Saponins from Chinese Medicines as Anticancer Agents. *Molecules*, 21(1326), pp. 1-27.
- Zaldívar Lelo de Larrea, G. y otros, 2012. Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 77(4), pp. 315-321.

Zaldívar Lelo de Larrea, G. y otros, 2012. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 77(4), pp. 315-321.

Zamora López, A. K., 2017. *Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los derivados de diosgenina : 2-deoxi-2-acetamino-β-d-glicopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino-β-d-glucopiranosido de diosgenilo (MF-11), en la línea tumoral de cáncer de pulmón SK-LU-1*, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Zhang, J. y otros, 2015. Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: A meta-analysis and systemic review. *Oncotargets and therapy*, Volumen 8, p. 3361–3369.

APÉNDICE

Preparación de reactivos

Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42g
NaHCO ₃ (SIGMA, USA)	2g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 μm . Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de bovino (SNB), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana de poro de 0.22 μm . Se almacena a 4°C.

Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de bovina (SNB) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57° C durante 30 minutos. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml para su mejor uso y manipulación.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

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

Los reactivos se disuelven en 800 L de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 1N y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se filtra por medio de filtros de membrana con poros con diámetro de 42 μm , la solución se esteriliza a una presión de 1.29 kg/cm² y temperatura de 120° c durante 20 minutos. Se almacena a 4° C hasta el momento de su uso.

Solución cristal violeta (0.1%)

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

Hidróxido de sodio (NaOH) (SIGMA, USA)	1.98g
Ácido fórmico (SIGMA, USA)	2.14g
Cristal violeta (SIGMA, USA)	0.5g

Glutaraldehído (1.1%)

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

Solución de ácido acético (10%)

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

Camptotecina

Se disuelven 5 mg de camptotecina en 1 ml de DMSO se almacena a temperatura ambiente.

Paraformaldehído/glutaraldehído

Se calienta en baño maría a 60° C 20 ml de PBS y agregar 0.8 g de paraformaldehído, una vez disuelto, se coloca la solución en hielo. A la solución fría se le agrega 0.8 ml de glutaraldehído y se mezcla. Se almacena a 4° C hasta su uso.