



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad De Investigación En Diferenciación Celular Y Cáncer

Laboratorio de Investigación Formativa VII

**Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la Diosgenina 3 Glu  
en líneas celulares tumorales de mama JC, 4T1 Y MDA-MB-231**

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

Presenta

Paredes Lara Edwing Alfonso

Director de Tesis

Dr. Luis Sánchez Sánchez

CDMX, 2023





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.

**“Visto a la luz de la evolución, la biología es, quizás, la ciencia más satisfactoria e inspiradora.”**

**Theodosius Dobzhansky**

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de Tesis se llevó acabo con apoyo de los proyectos PAPIIT IN219221 e IN215922, dentro de las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, Laboratorio 6, 2do Piso, en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, bajo la dirección del Dr. Luis Sánchez Sánchez.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo, conocimientos, consejos y tiempo compartidos que ayudaron y enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Hugo López Muñoz por compartir su conocimiento, experiencias y consejos que ayudaron a enriquecer mi trabajo.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por compartir su conocimiento.

A la Dra. Maria Luisa Escobar Sanchez por su asesoría que ayudaro a enriquecer mi trabajo.

Un reconocimiento especial a los sinodales:

- M. en C. Gerardo Díaz Vázquez
- Dr. Luis Sánchez Sánchez
- Dr. Hugo López Muñoz
- Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández
- Dra. Maria Luisa Escobar Sánchez

Por sus aportaciones y observaciones en el presente trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, porque con su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mi depositaron.

Especialmente a mi madre Adela Lara Hernández ya que con su ejemplo de dedicación, esfuerzo y perseverancia hizo esto posible, te agradezco por siempre estar a mi lado motivándome y apoyándome para cumplir mis sueños y metas.

A mis hermanos por siempre motivarme a continuar

A esos amigos que se volvieron familia y a lo largo de la vida han estado presentes apoyándome y motivándome (Airi, Erik, Diego, Antonio)

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
<b>La célula</b> .....	8
<b>Ciclo celular</b> .....	10
<b>Muerte celular</b> .....	13
<b>Apoptosis</b> .....	14
<b>Necrosis</b> .....	18
<b>Cáncer</b> .....	19
<b>Cáncer de mama</b> .....	20
<b>Detección</b> .....	25
<b>Tratamiento</b> .....	28
<b>Efectos secundarios</b> .....	30
<b>Estadificación</b> .....	31
<b>Productos naturales</b> .....	40
<b>Saponinas</b> .....	40
<b>Planteamiento del problema</b> .....	50
<b>Justificación</b> .....	51
<b>Hipótesis</b> .....	52
<b>Objetivos</b> .....	53
<b>General</b> .....	53
<b>Particulares</b> .....	53
<b>Diseño experimental</b> .....	54
<b>Preparación del compuesto</b> .....	54
<b>Cultivo de líneas celulares</b> .....	54
<b>Determinación de la concentración requerida para la inhibición del 50% de la población (IC<sub>50</sub>) de células tumorales</b> .....	55
<b>Determinación de la muerte celular por necrosis en células tumorales mediante la detección de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa).</b> .....	55
<b>Efecto de la Diosgenina-3-Glu en la morfología celular y condensación de la cromatina en células tumorales por medio de la tinción con el fluorocromo DAPI y detección de caspasa 3 activa por marcaje con FITC en células tratadas con Diosgenina-3-Glu.</b> .....	56
<b>Resultados</b> .....	57

<b>Actividad antiproliferativa de la Diosgenina-3-Glu en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1.....</b>	<b>57</b>
<b>Actividad Necrótica de la Diosgenina-3-Glu en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1.....</b>	<b>60</b>
<b>Efecto de la Diosgenina 3 Glu en células tumorales MDA-MB-231, JC y 4T1 .....</b>	<b>62</b>
<b>Análisis de resultados .....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>70</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>71</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>78</b>

## Resumen

El término Cáncer se aplica a más de un centenar de enfermedades diferentes entre las que figuran tumores malignos en distintas partes del cuerpo. Es un proceso que se caracteriza por la multiplicación descontrolada de las células y que puede diseminarse en cualquier parte del organismo. Un rasgo común a todas las formas de cáncer es la inoperancia de los mecanismos que regulan normalmente el crecimiento, la proliferación y la muerte celular.

Actualmente, es una de las enfermedades con mayor relevancia debido a su alta tasa de mortalidad. En México es la tercera causa de muerte sólo después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus (INEGI, 2021).

Existen varias estrategias de tratamiento para cáncer, entre las cuales se encuentran las terapias clásicas que incluyen la extirpación de la masa tumoral, principalmente mediante cirugía y los tratamientos químicos y físicos, como la quimioterapia y la radioterapia (Mitra *et al.*, 2015), sin embargo, para cánceres metastásicos los regímenes de quimioterapia actualmente disponibles pueden dar lugar a varios problemas críticos, que incluyen una efectividad insuficiente y efectos adversos graves (Ren *et al.*, 2016). Es por ello que continúa la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser utilizados como quimioterapéuticos y que generen menos efectos adversos.

Los compuestos derivados de plantas han estado a la vanguardia como una fuente importante de terapias contra el cáncer desempeñando un papel vital en la prevención y el tratamiento del cáncer debido a su disponibilidad y una toxicidad relativamente baja (Gali-Muhtasib *et al.*, 2015).

El cáncer es un problema de salud cada vez mayor en todo el mundo, se han realizado progresos significativos para comprender los efectos antitumorales de las saponinas esteroideas en los últimos años, según los hallazgos reportados las saponinas esteroideas ejercen diversas actividades antitumorales cómo inhibir la proliferación, inducir apoptosis y autofagia y regulan el microambiente tumoral a



través de múltiples vías de señalización relacionadas. Los estudios sobre las propiedades biológicas de las saponinas han incrementado la última década lo cual está relacionado con el hecho de que muchas de las plantas ricas en estos metabolitos son utilizadas por diversas poblaciones como medicina tradicional en el tratamiento de diferentes enfermedades en forma de ungüentos, cocimientos, complementos alimenticios etcétera (Sparg, 2004).

La Diosgenina 3 Glu es una saponina esteroidal sintetizada a partir de la Diosgenina agregándole una glucosa en el carbono 3 en la estructura esteroidal. Ha mostrado actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa CaSki y ViBo (Martínez, 2013).

En el presente estudio se evalúa el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la Diosgenina 3 Glu en la línea celular de humano MDA-MB-231 y en las líneas celulares murinas JC y 4T1. La actividad antiproliferativa de la Diosgenina 3 Glu fue determinada en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1, mediante tinción con cristal violeta, obteniendo unas IC<sub>50</sub> de 8.2, 4.8 y 9 µg/mL respectivamente. La actividad necrótica fu evaluada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares a atreves de la cuantificación de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH), considerada un indicador de necrosis. Los resultados obtenidos mostraron baja o nula actividad de la enzima (LDH) en las tres líneas celulares. La actividad apoptótica fue evaluada mediante la determinación de la caspasa 3 activa en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1 por microscopia de fluorescencia, donde el marcaje muestra presencia de caspasa 3 para las tres líneas celulares.

## **Introducción**

### **La célula**

Todos los seres vivos estamos compuestos por una o varias células (Figura. 1), desde las bacterias que habitan nuestra flora intestinal, hasta el animal más grande

que habita nuestro planeta “la ballena azul”. Cada uno de nosotros es un mundo habitado y conformado por billones de células de diferentes poblaciones celulares que conforman los distintos tejidos que a su vez constituyen órganos y éstos componen los sistemas que permiten que nuestro cuerpo funcione, por esto la célula es considerada la unidad estructural, anatómica y funcional de los organismos (Curtis et al 2011), capaz de llevar a cabo todas las funciones vitales y mantener su propia estructura (Oñate, 2010) o bien la unidad básica de la vida (Martínez & Torres, 2018).

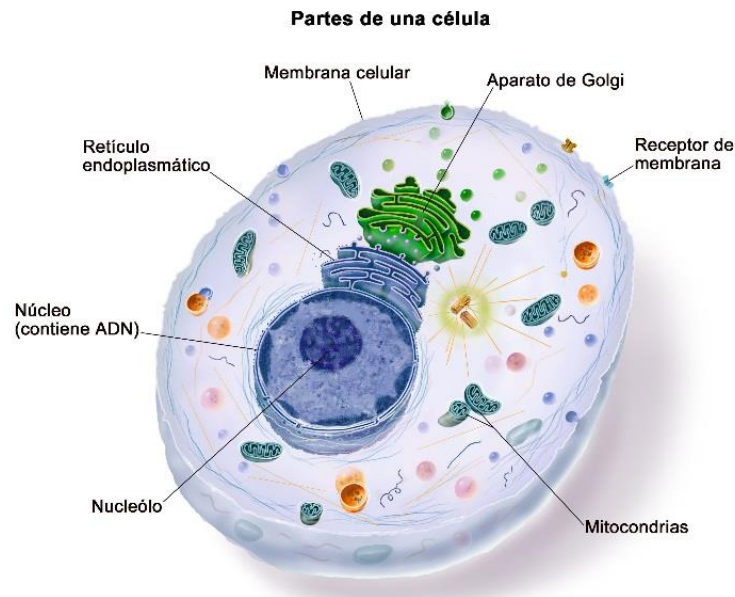


Fig. 1 Esquema de una parte de la célula

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/celula>.

La célula lleva a cabo diversas funciones a lo largo de su vida como; nutrición, relaciones intra y extracelulares y la reproducción, sin embargo, existen procesos encargados de regular la homeostasis y desarrollo de los organismos, del cual destaca el ciclo celular (Hickman *et al.*, 2000).

## Ciclo celular

El ciclo celular representa el mecanismo fundamental subyacente a la reproducción de todos los seres vivos y se divide en etapas a través de las cuales la célula pasa de una división celular a la siguiente (Figura 2). Estos acontecimientos se realizan mediante una secuencia ordenada de procesos en los que la célula duplica su contenido genético para llevar a cabo la división celular y la producción de dos células hijas, cada una con cromosomas idénticos a los de la madre (Díaz, 2003).

El ciclo celular se divide en cuatro fases diferentes: la fase G1 (Gap, espacio) la cual es una fase intermedia entre la fase M y la fase S, la fase S es donde se asegura que el material genético se duplique correctamente, la fase G2 se considera un intermedio previo a la fase M donde se reparte el material genético entre dos núcleos, así como el contenido celular, para formar dos células, a este proceso se le conoce como citocinesis (Jiménez *et al.*, 2003). Las células también pueden encontrarse en un estado de reposo fuera del ciclo celular denominada fase G0 donde las células realizan todas las funciones requeridas para su supervivencia, hasta que reciban un estímulo que las haga entrar en el ciclo celular en la fase G1 (López, 2013).

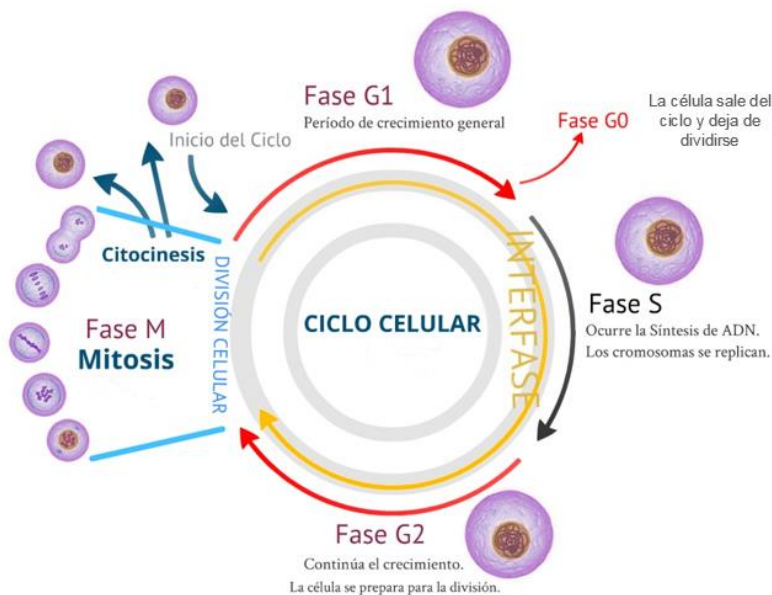


Fig. 2. Ciclo Celular. <https://i1.wp.com/www.acercaciencia.com/wp-content/uploads/2012/10/Ciclo-celular.jpg?fit=992%2C759&ssl=1>

La transición de una fase del ciclo celular a otra ocurre de manera ordenada y está regulada por diferentes proteínas celulares (Vermeulen *et al.*, 2003). (Figura 3). De éstas destacan las enzimas fosforilizantes denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus subunidades activadoras, las ciclinas (Quezada, 2007). El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que forman entre ambas (CDK-ciclina) (Figura 3). Las formas activas de los complejos CDK-ciclina esta constituidas de dos proteínas (una cinasa y una ciclina). Las cinasas son enzimas que realizan la fosforilación de proteínas que es de gran importancia para la regulación del ciclo celular. (Peralta *et al.*, 1997)

La fase G1 o gap 1 es un periodo de alta actividad bioquímica en donde la célula aumenta el material enzimático, replica sus organelos y aumenta el número de otras moléculas y estructuras citoplasmáticas. Algunas de las estructuras sintetizadas por la célula son microtúbulos, microfilamentos y ribosomas, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático se renuevan y aumentan de tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos (Lomanto *et al.*, 2010). La fase de síntesis (S) da comienzo cuando la célula ha adquirido el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado y se tiene suficiente ATP, el proceso clave de la fase S es la duplicación de la molécula de ADN, sin embargo, durante este proceso también se sintetizan histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras de las proteínas asociadas al ADN (ADN polimerasas, ligasas, topoisomerasas) (Recolin *et al.*, 2014).

Durante la fase G2 o gap 2 ocurre la preparación para la división celular o bien mitosis, donde la célula comienza a ensamblar estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto equitativo de cromosomas o cariocinesis que serán heredados en la fase M a cada célula hija y la citocinesis, el resto del contenido celular se distribuye para formar dos células funcionales (Cooper *et al.*, 2007).

La fase G<sub>0</sub> se refiere a las células que llevan a cabo todo su proceso metabólico pero que no se reproducen, por lo que se mantienen en estado de reposo fuera del ciclo (Alberts *et al.*, 2006). En esta fase la célula no avanza a través de las otras fases del ciclo porque no lo requiere o porque no es necesario, algunos ejemplos celulares detenidas en G<sub>0</sub> son: las células nerviosas y las células hepáticas; en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Díaz, 2003).

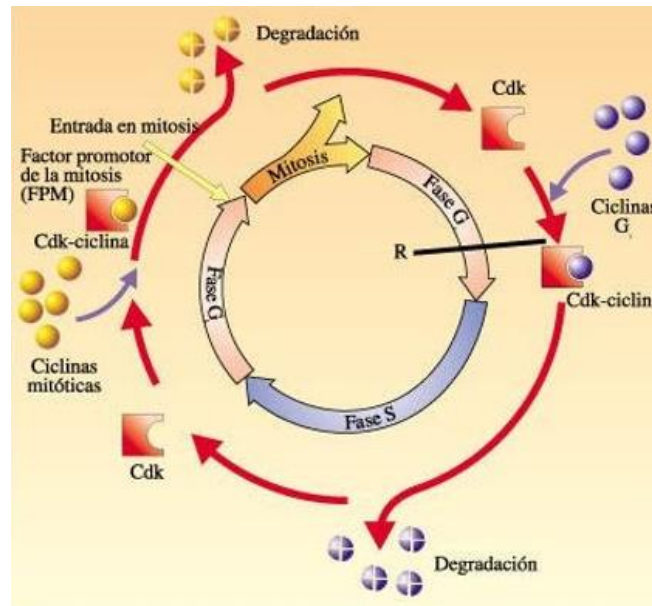


Fig. 3. Ciclo Celular.

[https://1.bp.blogspot.com/\\_nZqQMbHLG0s/TURM4rYa1dI/AAAAAAAAAQ8/01mquGhVN2A/s1600/reg\\_ciclo\\_cel1.bmp](https://1.bp.blogspot.com/_nZqQMbHLG0s/TURM4rYa1dI/AAAAAAAAAQ8/01mquGhVN2A/s1600/reg_ciclo_cel1.bmp)

Normalmente la progresión del ciclo celular es continua, sin embargo, si existe algún daño en la célula, la mayoría de éstas cuentan con la capacidad de detener el proceso en alguna fase del ciclo y reanudarlo cuando dicho daño haya sido reparado. Cuando esto no es así y el daño es irreparable, la célula puede inducir un proceso de muerte. Los puntos de regulación de mayor importancia dentro del ciclo celular se encuentran en la transición de G<sub>1</sub>-S, G<sub>2</sub>-M y metafase-anafase

(Shackelford *et al.*, 1999). Cuando el daño es irreparable, la célula puede inducir un proceso denominado muerte celular.

## **Muerte celular**

El número de células en los diferentes tejidos, Así como el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los organismos no solo depende de la producción de las células, sino también de los mecanismos para destruirás, está determinado por un balance homeostático entre la proliferación de células nuevas y la muerte de células agotadas o seniles (Alberts *et al.*, 2015). Aunque ésta también puede ocurrir como consecuencia de una agresión celular aguda o de un programa de suicidio codificado internamente (Ross, 2007).

Durante cientos de años incluso antes de que el concepto célula fuera completamente entendido, se había observado la muerte celular; en el tránsito claramente anómalo de los tejidos gangrenosos tras un daño severo o en los procesos descritos por Galeno a finales del siglo II d.C., en los que alude a ciertas estructuras efímeras, cuya desaparición pareciera programada desde el nacimiento. Sin embargo, estos dos procesos no parecían coincidir en ningún punto. Fue hasta 1972, cuando Kerr, Willie y Currie utilizaron los términos necrosis y apoptosis para unificar ambos conceptos y, a su vez, diferenciar la muerte celular accidental de la regulada.

El concepto de muerte celular natural se remonta a 1842, cuando Karl Vogt demostró que la muerte celular elimina la notocorda del sapo partera durante la metamorfosis, lo que permite la formación de vértebras.

Actualmente se sabe que todas las células que componen a los seres vivos están intrínsecamente programadas para autodestruirse (Ameisen, 2002).

La muerte celular se requiere para la adecuada formación y correcta escultura del embrión. Además, durante la edad adulta también juega un papel primordial, pues

la eliminación de células anormales, infectadas o innecesarias, es imprescindible como defensa ante daños externos e internos (por ejemplo, infecciones y mutaciones), en la diferenciación celular y en el control de la cantidad de células en el ambiente (Fuchs & Steller, 2011).

Tomando en cuenta las diferencias morfológicas, cambios químicos y moleculares de las células muertas, se describen principalmente dos tipos de muerte celular que se encuentran bien caracterizados: apoptosis y necrosis (Stephen & Bolsover, 2004).

## Apoptosis

Tipo de muerte celular caracterizada por ser altamente regulada y poseer características morfológicas precisas, como el encogimiento celular, la formación de vesículas en la membrana, la condensación de la cromatina y la degradación del ADN (Figura 4), sin afectar la permeabilidad de la membrana plasmática (Elmore *et al.*, 2007).

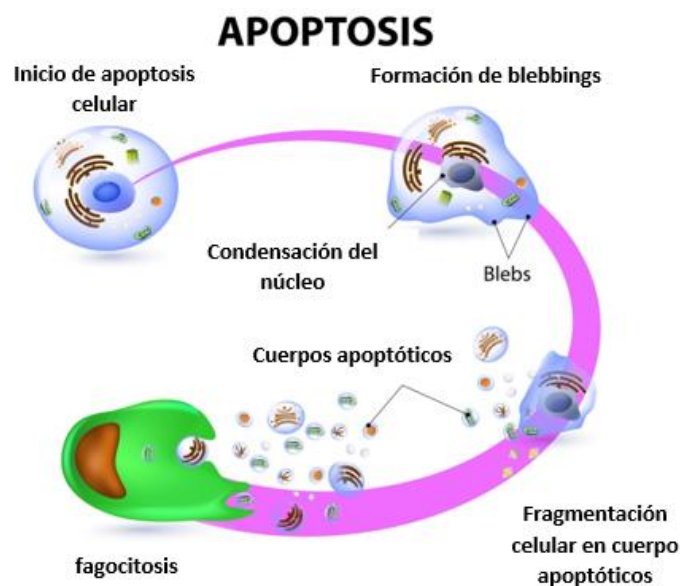


Fig. 4 Fases de la muerte celular por Apoptosis.

[https://www.misistemainmune.es/wp-content/uploads/2017/05/Fotolia\\_71744424\\_Subscription\\_Monthly\\_M.jpg](https://www.misistemainmune.es/wp-content/uploads/2017/05/Fotolia_71744424_Subscription_Monthly_M.jpg)

La apoptosis es un proceso de muerte celular altamente regulado, una decisión racional y activa tomada para sacrificar células específicas para obtener los mayores beneficios del organismo, es un proceso fisiológico normal que se realiza rutinariamente en organismos multicelulares (Kerr. 2002). Es el tipo de muerte celular más destacado y mejor estudiado durante el desarrollo (Yi CH & Yuan J. 2009) (Jacobson *et al.*, 1997). Este proceso conservado, que puede desencadenarse tanto intrínsecamente (por ejemplo, por daño del ADN) como extrínsecamente (por ejemplo, por abstinencia del factor de crecimiento, hormonas esteroides, ligadura de receptores de muerte), culmina en la activación de caspasas, una clase de cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos en prácticamente todas las células.

Las caspasas son esenciales para llevar a cabo el mecanismo de apoptosis, ya que éstas son las iniciadoras (caspasa -2, -8, -9 y -10, principalmente responsables del inicio de la vía apoptótica) y los ejecutores (caspasa -3, -6 y -7, responsable de la división definitiva de los componentes celulares) de la muerte celular (Pistrutto *et al.*, 2016).

#### Mecanismo de apoptosis

Hay dos vías de señalización molecular clave que conducen a la muerte celular apoptótica (Figura 5). La primera es la vía intrínseca, que se activa desde el interior de la célula por miembros de la familia de proteínas de leucemia/linfoma 2 de células B (BCL-2) y señales mitocondriales corriente abajo. La segunda es la vía extrínseca, que se activa desde el exterior de la célula mediante ligandos proapoptóticos que interactúan con receptores de muerte (DR) de la superficie celular especializados. Ambas vías activan la cascada enzimática de caspasas, que lleva a cabo numerosos eventos proteolíticos que median el programa de muerte celular



apoptótica. Las drogas y las medidas terapéuticas diseñadas en base a la comprensión actual de la apoptosis se han empleado durante mucho tiempo. Los inductores de apoptosis se han utilizado clínicamente para eliminar las células mórbidas y, por lo tanto, tratar enfermedades, como el cáncer.

#### Vía intrínseca

Como su nombre lo indica, esta vía comienza en el interior de la célula debido a estrés, hipoxia, daño genético, etc., mediante un balance de señales pro y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. La mitocondria es un organelo que alberga una gran cantidad de proteínas pro-apoptóticas, donde la principal es el Cit-C, requerido para la activación de la caspasa-9 (García & Vecino, 2003).

El Cit-C se localiza en el espacio intermembranal mitocondrial (D'Herde *et al.*, 2000); al existir un estímulo, una proteína de la familia BH3 se une a Bcl-2 inhibiéndolo. De esa manera, miembros de la familia Bcl-2, Bax y Bak son activadas y ocasionan la generación de un poro en la membrana mitocondrial, causando una pérdida de potencial de membrana y la desestabilización de la membrana mitocondrial, liberándose el Cit-C (García & Vecino, 2003). En el citosol, el Cit-C se une a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1) y ATP, formando un apoptósoma. Una vez formado el apoptósoma, se recluta y activa la pro-C9 (autoproteólisis), la cual actúa como holoenzima que procesa a otras caspasas ejecutoras (Malet, 2005), como la caspasa-3, que desencadena la última parte de la apoptosis.

#### Vía extrínseca

Como su nombre lo indica, esta vía se activa por la unión de proteínas extracelulares de señalización (ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte); siendo los más conocidos el receptor TNF (TNFR), y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y FasL, respectivamente (Sosa *et al.*, 2012). Establece contacto en el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Se han identificado diversos receptores con estas características incluyendo Fas, TNFaR, DR3, DR4 y DR5 con sus respectivos sustratos. Los ligandos de los receptores de muerte inician la señalización a través

de la oligomerización con el receptor, que resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la activación de la cascada de caspasas. La unión de Fas-L induce la trimerización de Fas que recluta a la caspasa-8 (iniciadora) por la vía de la proteína adaptadora FADD. Entonces, la caspasa-8 se oligomeriza y se activa por autocatálisis. En su forma activa la caspasa-8 estimula la apoptosis a través de dos cascadas de señalización paralelas: puede escindir y activar directamente la caspasa-3 o escindir Bid, una proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2, llevando a una señalización por la vía mitocondrial o intrínseca. TNF- $\alpha$  y DR-3L pueden enviar señales pro o antiapoptótica. TNFaR y DR3 promueve la apoptosis por medio de las proteínas adaptadoras TRADD/FADD y la activación de caspasa 8. La interacción de TNF- $\alpha$  y TNFaR puede activar la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B a través de NIK/IKK. La activación de NF- $\kappa$ B induce la expresión de genes de supervivencia como Bcl-2 y FLIP, también puede inhibir directamente la activación de la caspasa 8. Fas-L y TNF- $\alpha$  también pueden activar JNK vía ADK1/MKK7. La activación de JNK puede conducir a la inhibición de Bcl-2 por fosforilación

El reclutamiento de caspasas ejecutoras desencadena una cascada de caspasas que dará lugar a la muerte celular. Así mismo, estas caspasas, pueden activar a proteínas de la familia Bcl-2, como Bid, que, de igual manera, tiene función proapoptótica, permitiendo un cambio a la mitocondria para que ésta libere al Cit-c al citosol. Generando de esta manera la activación de la caspasa 9 (García y Vecino, 2003).

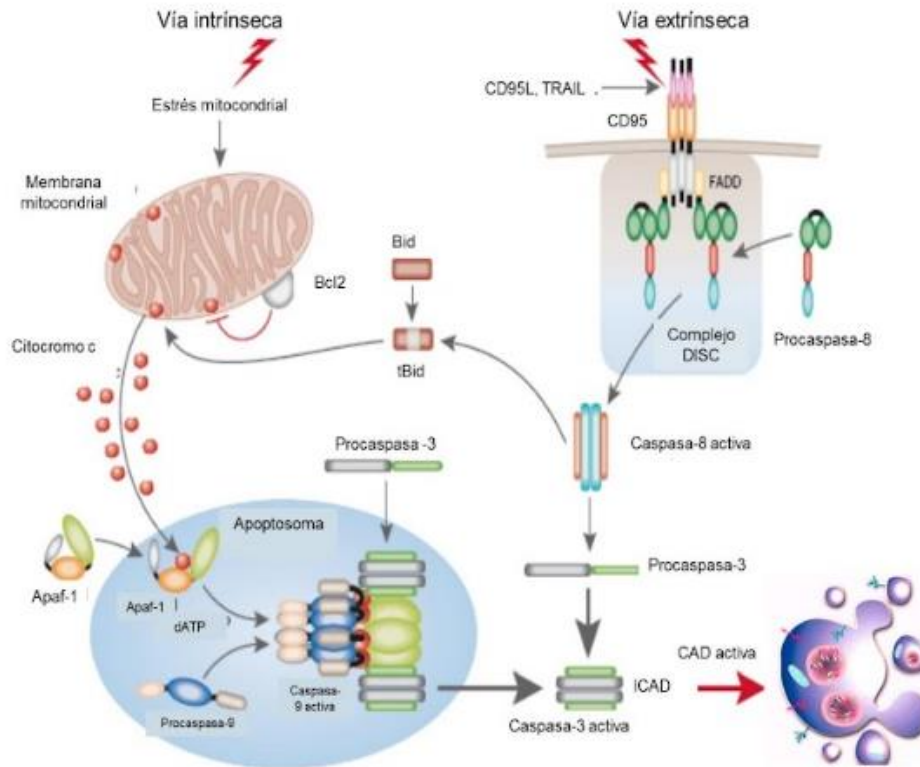


Fig. 5. Mecanismos de activación de las caspasas “vía intrínseca” y “vía extrínseca” (MacFarlane y Williams, 2004).

## Necrosis

La necrosis es un proceso de muerte violenta y patológica de células o tejidos del organismo (Lizarbe, 2007). Iniciado por agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como lo es la isquemia, hipoxía, traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos, infecciones o el desarrollo de enfermedades autoinmunes; por lo cual este tipo de muerte es comúnmente asociada a la pérdida de células por patologías humanas, que resultan en una pérdida de la homeostasis celular (Alberts *et al.*, 2006). El proceso básico de la necrosis se caracteriza por hinchazón celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido intracelular (Figura 6) (Vanden *et al.*, 2014).

## NECROSIS

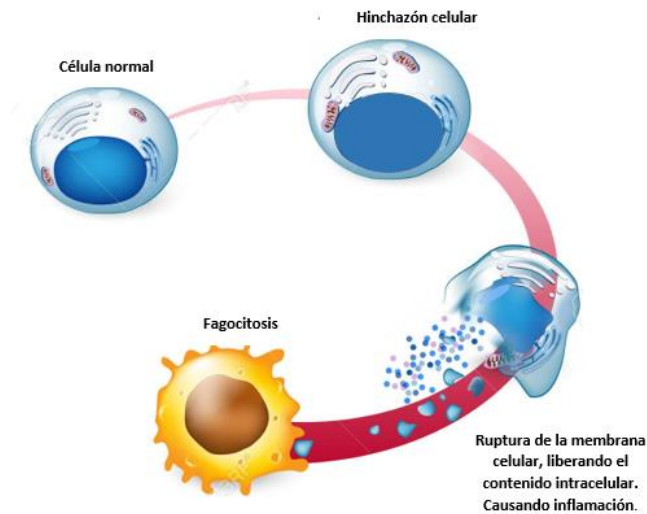


Fig 6. Fases de la muerte celular por Necrosis.

<https://previews.123rf.com/images/designua/designua1701/designua170100003/68527754-necrosis-muerte-celular-patol%C3%B3gica-lesi%C3%B3n-de-la-c%C3%A9lula-que-da-lugar-a-la-muerte-prematura-de-las-c%C3%A9l.jpg>

## Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación descontrolados de células (OMS, 2018). Derivado de una falla en la regulación del mecanismo de control del ciclo celular, como la activación o desactivación, la disminución o el aumento en la expresión o la mutación de las proteínas que controlan el ciclo celular ocasiona una proliferación celular excesiva y como consecuencia, la aparición de un proceso maligno denominado cáncer (López, 2003). Actualmente, es una de las enfermedades con mayor relevancia debido a su alta tasa de mortalidad. En México es la tercera causa de muerte con un número estimado de muertes en 2020 de

90,222 personas (GLOBOCAN, 2020). Sólo después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus (INEGI, 2018). Y a nivel mundial un número de muertes estimado de 9,958,133 personas en 2020 (GLOBOCAN, 2020). Siendo una enfermedad de gran magnitud, considerada como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo.

## Cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o los lobulillos, el cáncer de mama puede originarse en diferentes partes del seno (Figura 7). La mayoría de los cánceres de seno comienza en los conductos que llevan la leche hacia el pezón: cánceres ductales (Figura 8), pero también pueden originarse en las glándulas que producen leche: cánceres lobulillares (Figura 9) (ASC, 2004). Las células cancerosas pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos a todo el cuerpo invadiendo a otros tejidos.

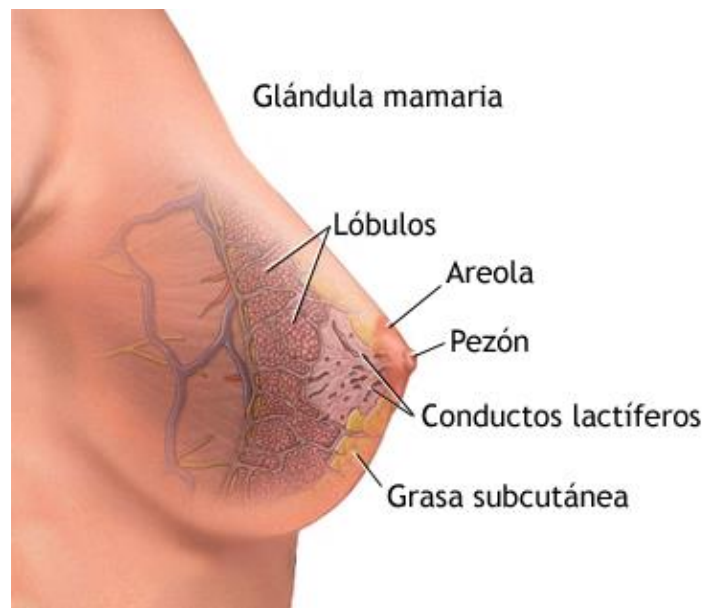


Fig. 7. Estructura anatómica de la mama.

<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000913.htm>

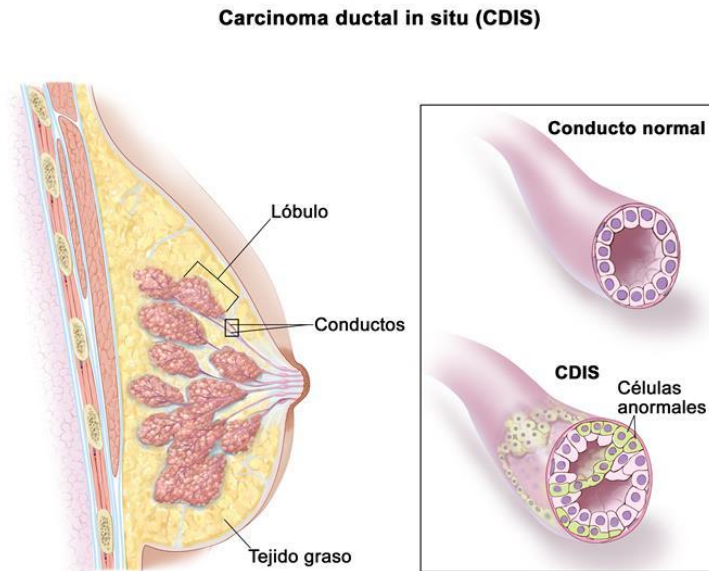


Fig. 8. Estructura de los conductos ductales normales y anormales.

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/carcinoma-ductal-infiltrante>

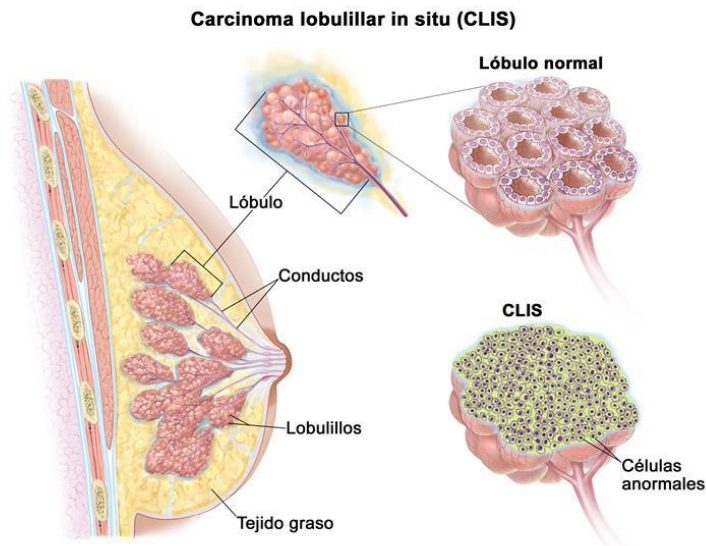


Fig. 9. estructura de lobulillos normales y anormales.

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/carcinoma-lobulillar-in-situ>

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. En los últimos 25 años la incidencia de cáncer de mama está aumentando en el mundo en desarrollo debido a la mayor esperanza de vida, el aumento de la urbanización y la adopción de modos de vida occidentales (OMS, 2020).

La incidencia y mortalidad por cáncer de mama varía significativamente de un país a otro. Observándose que en países desarrollados como Estados Unidos, Inglaterra y España su incidencia se incrementó de 1973 a 2004 aproximadamente 0.94 a 4% por año sobre todo en mujeres mayores de 55 años, con diagnósticos más tempranos y más localizados lo que ha permitido una disminución de la mortalidad e incremento de la sobrevida (ACR, *Practice guideline of the performance of diagnostic Mammography* 2006).

En países subdesarrollados como los de América Latina este cáncer es más frecuente en mujeres mayores de 40-75 años. En nuestro país actualmente el

carcinoma mamario es la neoplasia maligna invasora más común y es la causa más frecuente de muerte por enfermedad maligna en la mujer, constituyendo el 20 a 25 % de todos los casos de cáncer en la mujer y contribuyendo con un 15-20% de la mortalidad por cáncer. De acuerdo con el registro histopatológico de neoplasias malignas, el número de nuevos casos que se presentaron en México en el 2004 fue de 13,895 (RHNM, 2004). Siendo los estados con mayor frecuencia: Ciudad de México, Jalisco, Nuevo León, Veracruz y Estado de México, con mayor índice de mortalidad al producir 14 muertes al día con un promedio de 45 años y diagnosticándose el 55% de los casos en etapas avanzadas (INEGI, 2021).

Factores de riesgo:

El cáncer de mama es uno de los principales problemas de salud entre las mujeres debido a su alta tasa de mortalidad e incidencia. La tasa de supervivencia a cinco años en el cáncer de mama metastásico es inferior al 30 %, incluso con quimioterapia adyuvante (Riggio, 2021). La incidencia de cáncer de mama es más común en los países de altos ingresos que en los países de bajos ingresos, lo que refleja la asociación con la globalización, los estudios epidemiológicos correlacionaron diferentes factores para el desarrollo o la progresión del riesgo de cáncer de mama (Sun, 2017). Los factores de riesgo, incluida la edad tardía para el matrimonio, el primer parto y la menopausia (Tabla 1), están fuertemente asociados con el desarrollo de la enfermedad. (Gold, 2011). Un estudio estimó el riesgo del 7.0 % (intervalo de confianza del 95 % en mujeres que se casaron a los 30 años o más, en relación con las mujeres que se casaron antes (~20 años), mientras que el riesgo correspondiente fue del 1.4 %. (Intervalo de confianza del 95 % cuando la edad para contraer matrimonio era inferior a 30 años pero la edad para el primer parto era 30 o más (Hinyard, 2016). La edad tardía en el matrimonio y el parto conduce a una falta de diferenciación del tejido mamario, una mayor exposición a mutágenos no estrogénicos y genotoxicidad por estrógeno (Dey, 2009).



<b>Factores de riesgo</b>	<b>Consecuencias</b>
Pubertad temprana	En la pubertad, las células mamarias indiferenciadas y proliferativas aumentan rápidamente y una mayor exposición a los cambios hormonales aumenta la susceptibilidad a los mutágenos.
Menarquia temprana	En la menarquia, las células mamarias tienden a crecer y dividirse, lo que aumenta el riesgo de cáncer de mama.
Edad de matrimonio tardía	Prolongar la exposición a la hormona estrógeno
Edad de nacimiento del niño tardío	Falta de diferenciación del tejido mamario y exposición prolongada a la hormona estrógeno
Fracaso de la lactancia	Falta de diferenciación del tejido mamario, más susceptible a los mutágenos no estrogénicos y al estrógeno.
Edad de la menopausia tardía	Inicio tardío de involución mamaria y exposición prolongada a estrógenos y progesterona
Falta de actividad física	Reducción de la exposición a las hormonas sexuales debido al aumento del número de ciclos anovulatorios
Dieta alta en grasas	El colesterol activa la señalización de estrógenos y la proliferación celular
Obesidad	Aumento de los niveles de citocinas y quimiocinas inflamatorias
Consumo de alcohol	Aumentar la hormona estrógeno

<b>Factores de riesgo</b>	<b>Consecuencias</b>
De fumar	Inducir mutaciones genéticas como la mutación del gen p53 y aductos de ADN
TRH	Prolongar la exposición a la hormona estrógeno
Anticonceptivo	Los anticonceptivos contienen progesterona y estrógeno.
Historia familiar	Mutaciones del gen BRCA1/2
Tóxicos ambientales	Los contaminantes pueden alterar la señalización endocrina

Tabla 1. Descripción y consecuencias para el desarrollo de cáncer de mama de los diversos factores de riesgo. (Kashyap, 2022).

Recientemente, los datos de GLOBOCAN 2020 de la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) reportaron la peor incidencia y prevalencia de cáncer de mama en 185 países de los que destacan: Brasil, México, Colombia, Perú, Venezuela y Argentina (Cantado, 2020)

## **Detección**

Para detectar y diagnosticar el cáncer de mama, se utilizan las siguientes pruebas o procedimientos;

Examen físico y antecedentes: examen del cuerpo para revisar los signos generales de salud, incluso verificar si hay signos de enfermedad, como masas o cualquier otra cosa que parezca anormal. También se anotan los antecedentes de los hábitos

de salud del paciente y los antecedentes médicos de sus enfermedades y tratamientos anteriores (NIH, 2022).

Examen clínico de la mama (ECM): examen de la mama realizado por un médico u otro profesional de la salud. El médico palpará cuidadosamente las mamas y el área de las axilas para detectar masas o cualquier otra cosa que parezca poco habitual (Torres et al., 2011).

Mamograma: Un mamograma es una imagen del interior de la mama. La mamografía permite encontrar tumores que son muy pequeños al tacto. También, a veces, permite encontrar un carcinoma ductal in situ (CDIS). En el CDIS, las células anormales revisten el conducto de la mama, y en algunas mujeres se puede convertir en cáncer invasivo (NIH, 2022).

Ecografía: procedimiento para el que se hacen rebotar ondas de sonido de alta energía (ultrasonido) en los tejidos u órganos internos para producir ecos. Los ecos forman una imagen de los tejidos del cuerpo llamada ecograma (Torres et al., 2011).

IRM (imágenes por resonancia magnética): La imagen por resonancia magnética (IRM) es un procedimiento para el que se usa un imán, ondas de radio y una computadora a fin de crear una serie de imágenes detalladas de áreas del interior del cuerpo. Este procedimiento también se llama imágenes por resonancia magnética nuclear (IRMN). La IRM no utiliza rayos X y la mujer no se expone a radiación (NIH, 2022).

Estudios bioquímicos de la sangre: procedimiento por el que se examina una muestra de sangre para medir las cantidades de ciertas sustancias que los órganos y tejidos del cuerpo liberan en esta. Una cantidad no habitual (mayor o menor que la normal) de una sustancia puede ser signo de enfermedad (NIH, 2022).

Biopsia: extracción de células o tejidos en las que un patólogo las observa al microscopio y verifica si hay signos de cáncer. Si se encuentra un bulto en la mama, se puede realizar una biopsia (NIH, 2022).

Si se encuentra cáncer, se llevan a cabo pruebas para estudiar las células cancerosas. Las decisiones sobre cuál es el mejor tratamiento se toman de acuerdo con el resultado de estas pruebas (NCI, 2021).

Las pruebas proveen información sobre los siguientes aspectos:

1. La rapidez con que crece el cáncer.
2. La probabilidad de que el cáncer se disemine por todo el cuerpo.
3. La eficacia de ciertos tratamientos.
4. La probabilidad de que el cáncer vuelva.

Las pruebas son las siguientes:

Prueba de receptores de estrógeno y progesterona: prueba que se usa para medir la cantidad de receptores de estrógeno y progesterona (hormonas) en el tejido canceroso. Si se encuentra más receptores de estrógeno y progesterona de lo normal, el cáncer se conoce como receptor de estrógeno positivo o receptor de progesterona positivo, o ambos. Este tipo de cáncer crece más rápido. Los resultados de las pruebas indican si el tratamiento que impide la acción de estrógeno y progesterona puede detener el crecimiento del cáncer (NIH, 2022).

Prueba del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu): prueba de laboratorio para medir cuántos genes HER2/neu hay y cuánta proteína HER2/neu se elabora en una muestra de tejido. Si hay más genes HER2/neu o concentraciones más elevadas de proteína HER2/neu que lo normal, el cáncer se conoce como positivo al HER2. Este tipo de cáncer puede crecer más rápido y es más probable que se disemine hasta otras partes del cuerpo (NIH, 2022).

Pruebas multigénicas: pruebas en las que se estudian muestras de tejidos para observar la actividad de varios genes a la vez. Estas pruebas pueden ayudar a pronosticar si el cáncer se va a diseminar a otras partes del cuerpo o si va a recidivar (volver) (NIH, 2022).

Hay muchos tipos de pruebas multigénicas. Las siguientes se han estudiado en ensayos clínicos:

Oncotype DX : esta prueba ayuda a predecir si el cáncer de mama en estadio I o el cáncer de mama en estadio II que tiene receptores de estrógeno positivos y ganglios linfáticos negativos se diseminarán hasta otras partes del cuerpo. Si el riesgo de diseminación futura del cáncer es alto, se puede administrar quimioterapia para reducir el riesgo (NIH, 2022).

MammaPrint: Es una prueba genómica que permite analizar la actividad de ciertos genes en el cáncer de mama, esta prueba ayuda a predecir si un cáncer de mama en estadio I o en estadio II con ganglios negativos, se diseminará hasta otras partes del cuerpo. Si el riesgo de diseminación futura es alto, se puede administrar quimioterapia para reducir el riesgo (NIH, 2022).

Según estas pruebas, el cáncer de mama se describe como uno de los tipos siguientes:

Receptor hormonal positivo (receptor de estrógeno o receptor de progesterona positivo) o receptor hormonal negativo (receptor de estrógeno o receptor de progesterona negativo) (NIH, 2022).

Positivo o Negativo al HER2/neu.

Triple negativo (receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2/neu negativos).

Esta información facilita la decisión del médico sobre los tratamientos que tendrán el mejor efecto para el cáncer a tratar (NIH, 2022).

## **Tratamiento**

Hay diferentes tipos de tratamiento para las pacientes de cáncer de mama. Estos tratamientos pueden clasificarse en grupos, con base en su funcionamiento (IMSS, 2015.):

Terapia local o sistémica:

1.- La terapia local: tiene la intención de tratar al tumor en donde se localiza, sin afectar el resto del cuerpo. La radioterapia y la cirugía son ejemplos.

Cirugía: La mayoría de las pacientes de cáncer de mama se someten a cirugía en la que los médicos extirpan el cáncer de la mama. Las opciones de cirugía dependerán de la posibilidad de conservar la mama y el estadio del tumor (Torres *et al.*, 2011).

Radioterapia: Es un tratamiento para el cáncer para el que se usan rayos de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan. El tratamiento con radioterapia está indicado en todos los pacientes que hayan sido sometidos a cirugía conservadora (Arce *et al.*, 2011).

2.- La terapia sistémica se refiere a los fármacos que pueden ser recibidos vía oral o por vía intravenosa. Por ejemplo: quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida (Torres *et al.*, 2011).

Quimioterapia: La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer para el que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación (Torres *et al.*, 2011).

Terapia con hormonas: Este es un tratamiento para el cáncer por el que se extraen hormonas o se bloquea su acción, y se impide el crecimiento de las células cancerosas (Torres *et al.*, 2011).

Terapia dirigida: Es un tipo de tratamiento donde se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas sin dañar las células normales (Torres *et al.*, 2011).

## Efectos secundarios

En la actualidad, se usan muchas clases de medicamentos quimioterapéuticos para combatir el cáncer, ya sea por sí solos o en combinación con otros medicamentos o tratamientos. Estos medicamentos son muy diferentes en su composición química (de lo que están hechos), cómo se recetan y se administran, lo eficaces que son en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, y los efectos secundarios que podrían causar (Torres *et al.*, 2011).

Cada vez que se forma cualquier célula nueva, pasa por un proceso denominado ciclo celular. Los medicamentos de quimioterapia atacan a las células en diferentes fases del ciclo celular. Ya que estos están hechos para destruir las células de rápido crecimiento como lo son las células cancerosas, lo cual permite a los medicamentos de quimioterapia atacarlas con más facilidad, pero, como estos medicamentos no presentan selectividad y circulan por todo el cuerpo, pueden afectar tanto a células cancerosas y a células sanas. la causa de los efectos secundarios es el daño que se ocasiona al tejido sano (INFOCANCER, 2019).

Estos efectos secundarios dependen del medicamento que se utiliza, pero dentro de ellos destacan: insuficiencia cardiaca, coágulos de sangre, menopausia prematura, anemia, pérdida del cabello, cambios en el apetito, estreñimiento, diarrea, fatiga, infecciones, cambios en el sistema nervioso y dolor, así como náuseas y vómitos (NIH, 2022). En ocasiones es necesario controlar los efectos secundarios con medicamentos, métodos de apoyo o cambios en el programa del tratamiento (Torres *et al.*, 2011).

## Estadificación

Como en el resto de tumores, todos los tipos de cáncer de mama se clasifican en estadios según la extensión de la enfermedad. Un cáncer de mama en estadio I es un cáncer de mama en una etapa inicial y un estadio IV es un cáncer de mama avanzado que se ha extendido a otras partes del cuerpo, proceso llamado metástasis.

El sistema de clasificación TNM se basa en el tamaño del tumor (T) y su extensión a los ganglios linfáticos regionales (N) o a otras partes del cuerpo (M).

### **Estadio 0 o carcinoma *in situ*:**

**Carcinoma lobulillar *in situ*:** lesión en la que hay células anormales en el revestimiento del lobulillo. Raramente se convierte en cáncer invasor, pero aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama tanto en la mama de la lesión como en la contraria (Donepudi et al., 2014).

**Carcinoma ductal *in situ* o carcinoma intraductal:** lesión en la que hay células anómalas en el revestimiento de un conducto. No es una lesión invasiva, pero si se deja evolucionar, puede convertirse en un carcinoma infiltrante o invasor (Donepudi et al., 2014).

### **Estadio I**



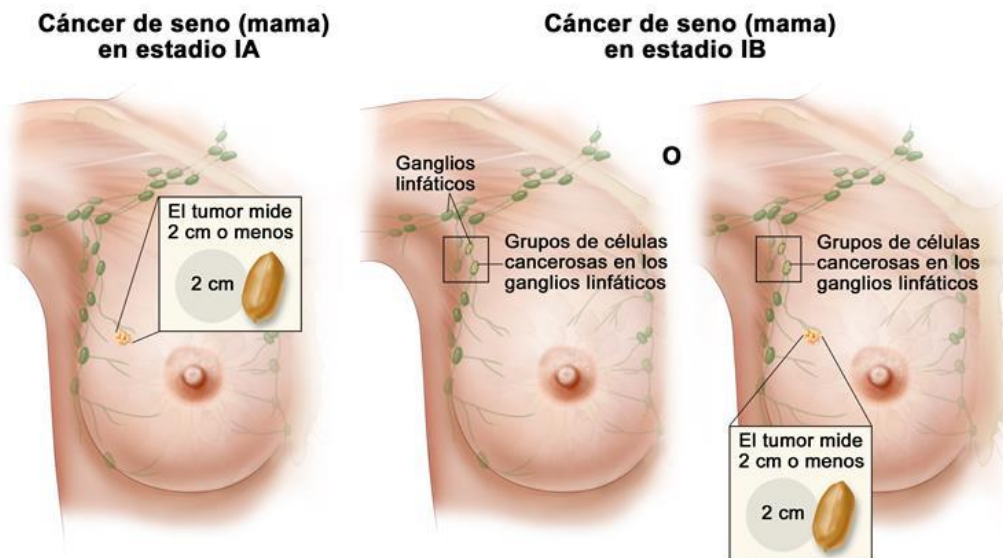


Fig. 10. cáncer de mama en estadio IA y IB.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de seno (mama) en estadio I (Figura 10). En el estadio IA, el tumor mide 2 cm o menos y no se ha diseminado fuera de la mama. En el estadio IB, no se encuentra tumor en la mama o este mide 2 cm o menos. Se encuentran grupos pequeños de células cancerosas en los ganglios linfáticos (mayores de 0.2 mm, pero menores de 2 mm) (BREASTCANCER, 2022)

En el estadio I, el cáncer ya se formó. El estadio I se divide en los estadios IA y IB.

- En el estadio IA, el tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer no se diseminó fuera de la mama.
- En el estadio IB se encuentran pequeños racimos de células de cáncer en la mama (mayores de 0.2 milímetros, pero no mayores de dos milímetros) en los ganglios linfáticos y se presenta una de las siguientes situaciones:
  - No se encuentra un tumor en la mama

- El tumor mide dos centímetros o menos

## Estadio II

El estadio II, se divide en los estadios IIA (Figura 11) y IIB (Figura 12) (BREASTCANCER, 2022).

- En el estadio IIA:
  - No se encuentra tumor en la mama, o el tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer (que mide más de dos milímetros) se encuentra en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentra durante una biopsia de ganglio linfático centinela)
  - El tumor mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros. El cáncer no se diseminó a los ganglios linfáticos.

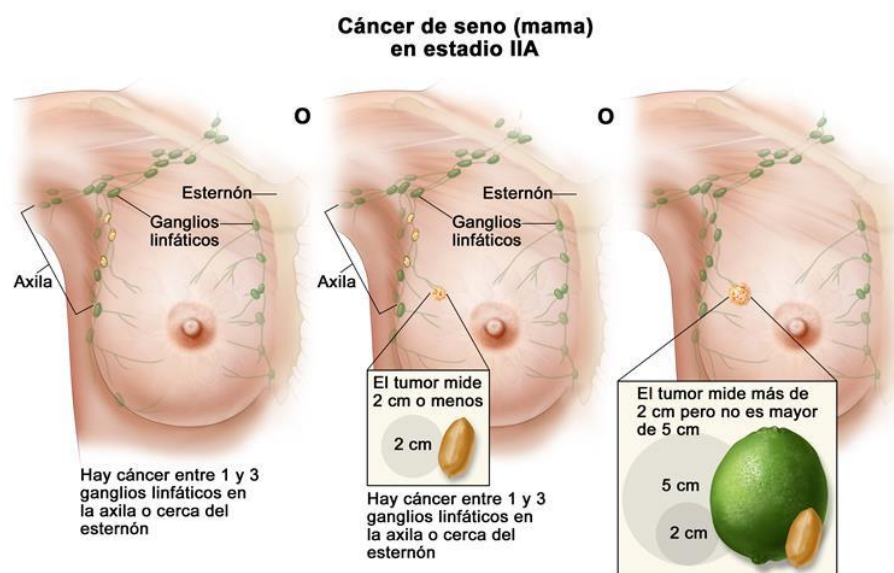


Fig. 11. cáncer de mama en estadio IIA.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de seno (mama) en estadio IIA. No hay tumores en la mama, pero se encuentra cáncer entre 1 a 3 ganglios linfáticos en la axila o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (dibujo de la izquierda Figura 11) o el tumor mide 2 cm o menos y se encuentra cáncer entre 1 a 3 ganglios linfáticos en la axila o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (dibujo del centro Figura 11) o el tumor mide más de 2 cm, pero menos de 5 cm, y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos (dibujo de la derecha Figura 11) (BREASTCANCER, 2022).

- En el estadio IIB, el tumor tiene una de las siguientes características:
  - Mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros. Se encuentran pequeños racimos de células de cáncer de mama en los ganglios linfáticos (mayores de 0.2 milímetros, pero no mayores de dos milímetros)
  - Mide más de dos centímetros, pero menos de cinco centímetros. El cáncer se diseminó a 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentran durante una biopsia de ganglio linfático centinela)
  - Mide más de cinco centímetros, pero no se diseminó a los ganglios linfáticos.

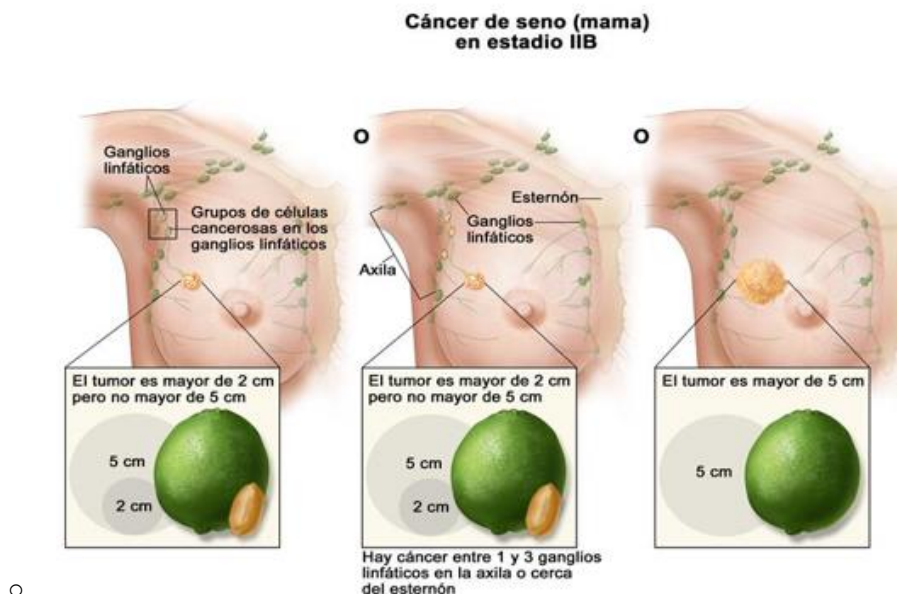


Fig. 12. cáncer de mama estadio IIB.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de seno (mama) en estadio IIB (Figura 12). El tumor mide más de 2 cm, pero no más de 5 cm y se encuentran grupos pequeños de células cancerosas (mayores de 0,2 mm, pero menores de 2 mm) en los ganglios linfáticos (dibujo de la izquierda Fig. 12) o el tumor mide más de 2 cm, pero no más de 5 cm y el cáncer se encuentra en 1 a 3 ganglios linfáticos de la axila o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (dibujo del medio Figura 12) o el tumor mide más de 5 cm, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos (dibujo de la derecha Figura 12) (BREASTCANCER, 2022).

**Estadio III o Localmente avanzado. A su vez se divide en:**

**Estadio IIIA**

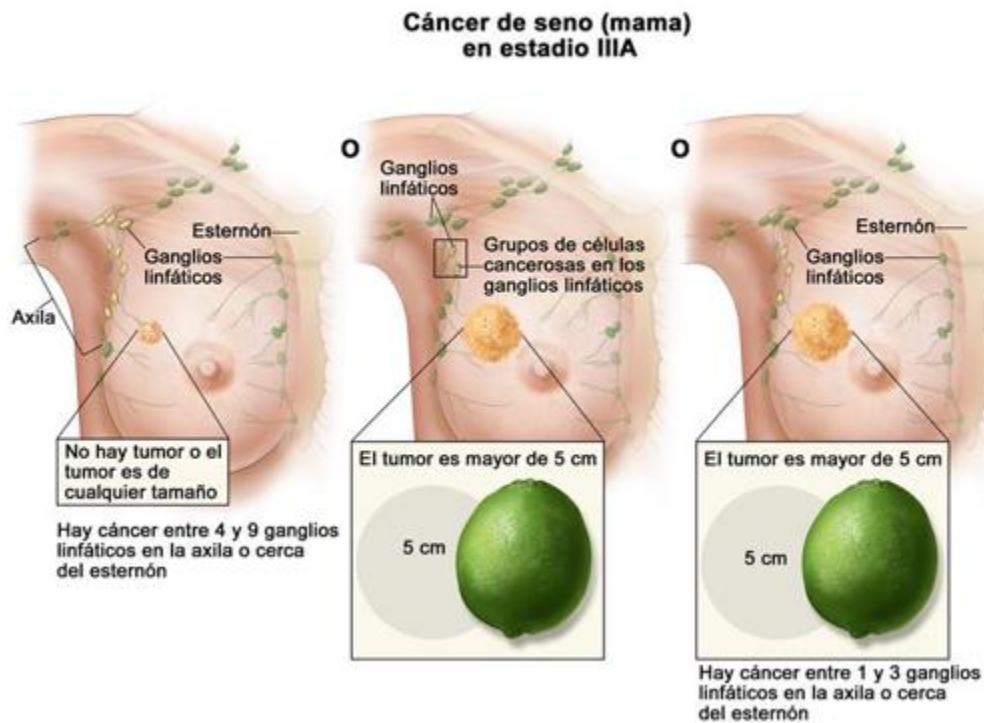


Fig. 13. cáncer de mama estadio IIIA.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de seno (mama) en estadio IIIA (Figura 13). No se encuentra tumor en la mama o el tumor puede ser de cualquier tamaño y se encuentra cáncer en 4 a 9 ganglios linfáticos de la axila, o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (dibujo de la izquierda Figura 13) o el tumor mide más de 5 cm y se encuentran grupos pequeños de células cancerosas (que miden más de 0.2 mm, pero no más de 2 mm) en los ganglios linfáticos (dibujo del medio Figura 13) o el tumor mide más de 5 cm y se encuentra cáncer en 1 a 3 ganglios linfáticos de la axila o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (dibujo de la derecha Figura 13) (BREASTCANCER, 2022).

En el estadio IIIA:

No se encuentra tumor en la mama o el tumor puede ser de cualquier tamaño. Se encuentra cáncer en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentran durante pruebas con imágenes o un examen físico) (BREASTCANCER, 2022).

- El tumor mide más de cinco centímetros. Se encuentran pequeños racimos de células de cáncer de mama (miden más de 0,2 milímetros, pero menos de dos milímetros) en los ganglios linfáticos (BREASTCANCER, 2022).
- El tumor mide más de cinco centímetros. El cáncer se diseminó a 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentran durante una biopsia de ganglio linfático centinela)(BREASTCANCER, 2022).

### **Estadio IIIB**

### Cáncer de seno (mama) en estadio IIIB

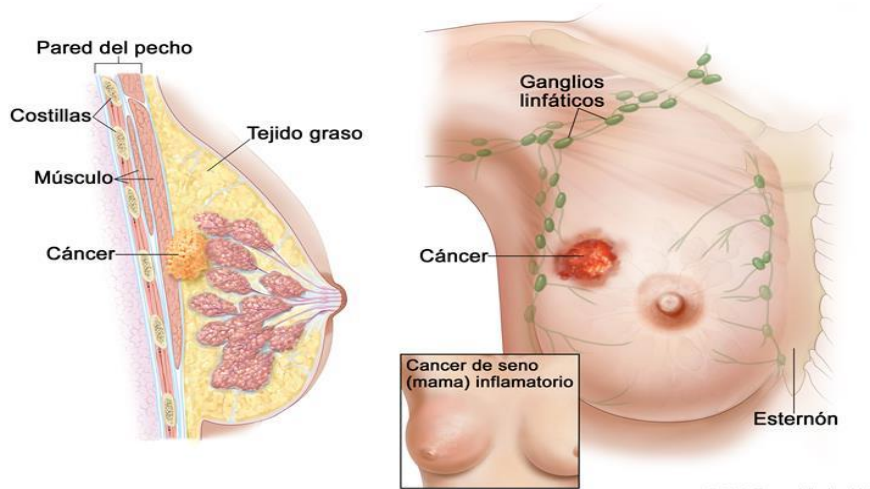


Fig. 14. cáncer de mama estadio IIIB.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de seno (mama) en estadio IIIB (Figura 14). El tumor puede ser de cualquier tamaño y el cáncer se diseminó a la pared del pecho o a la piel de la mama y causó hinchazón o una úlcera. El cáncer se pudo diseminar hasta nueve ganglios linfáticos de la axila o a los ganglios linfáticos cerca del esternón. El cáncer que se diseminó a la piel de la mama puede ser cáncer de seno (mama) inflamatorio.

En el estadio IIIB, el tumor puede tener cualquier tamaño y el cáncer se diseminó a la pared torácica o la piel de la mama, y produjo inflamación o una úlcera. El cáncer también se puede haber diseminado a:

- No más de nueve ganglios linfáticos axilares
- Ganglios linfáticos cerca del esternón.

El cáncer que se diseminó hasta la piel de la mama se llama cáncer de mama inflamatorio (BREASTCANCER, 2022).



## Estadio IIIC

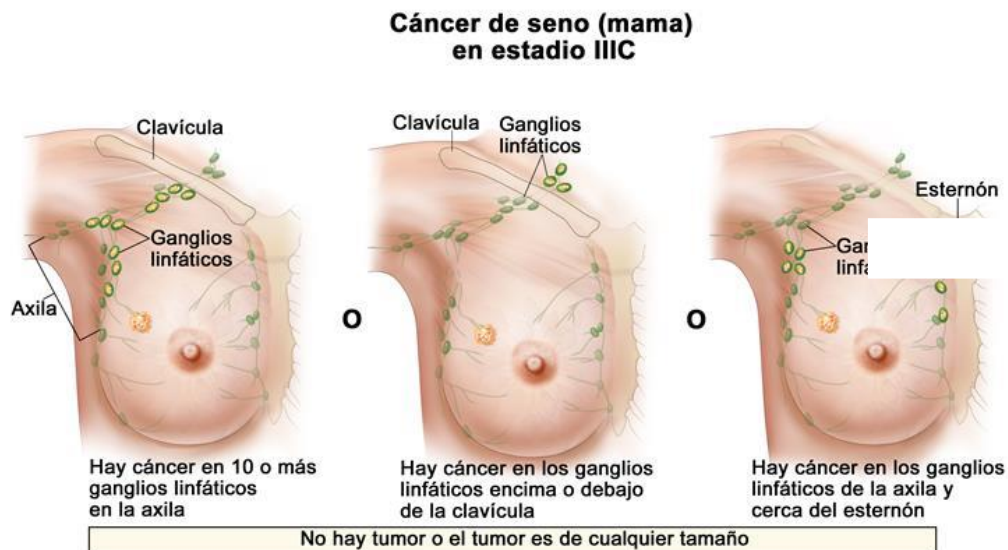


Fig. 15. cáncer de mama estadio IIIC.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de seno (mama) en estadio III C (Figura 15). No se encuentra tumor en la mama o el tumor puede ser de cualquier tamaño, y se pudo diseminar a la pared del pecho o a la piel de la mama y causar hinchazón o una úlcera. Además, el cáncer se diseminó a 10 o más ganglios linfáticos de la axila (dibujo de la izquierda Figura 15) o a los ganglios linfáticos encima o debajo de la clavícula (dibujo del medio Figura 15) o a los ganglios linfáticos de la axila y a los ganglios linfáticos cerca del esternón (dibujo de la derecha Figura 15). El cáncer que se diseminó a la piel de la mama puede ser cáncer de seno (mama) inflamatorio.

En el estadio IIIC, no se encuentra un tumor en la mama o el tumor puede tener cualquier tamaño. El cáncer se puede diseminar a la piel de la mama y causar inflamación o una úlcera, o se diseminó hasta la pared torácica. El cáncer también se diseminó a:

- Diez o más ganglios linfáticos axilares
- Ganglios linfáticos por encima o debajo de la clavícula
- Ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos cerca del esternón.

## Estadio IV

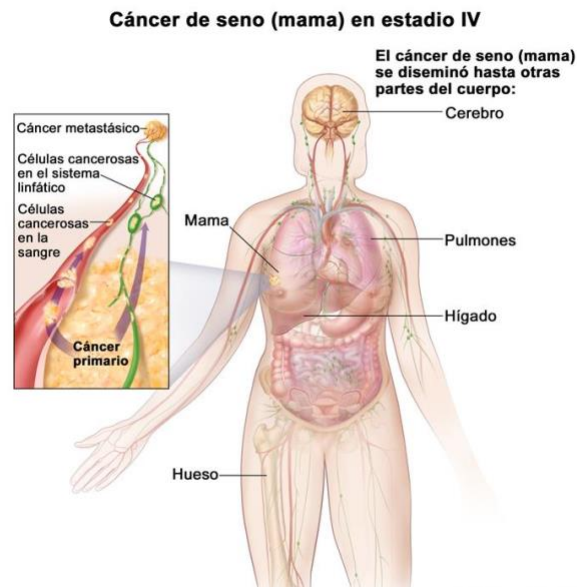


Fig. 16. cáncer de mama estadio IV.

[http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer\\_Types\\_Spanish/breast\\_200013S\\_1\\_02.html](http://www.cancerhelpessentiahealth.org/Cancer_Types_Spanish/breast_200013S_1_02.html)

Cáncer de mama en estadio IV (Figura 16). En esta etapa el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo; como el cerebro, el pulmón, el hígado o el hueso.

**Cáncer inflamatorio de mama:** El tumor se ha diseminado hasta la piel de la mama que aparece enrojecida, hinchada y caliente. Esto se produce porque las células tumorales bloquean los vasos linfáticos de la piel. A veces puede tener una



aparición de hoyos que se compara con la “piel de naranja”. Puede estar en estadio IIIB, IIIC o IV.

## **Productos naturales**

Los productos naturales han sido la fuente más representativa en la obtención de agentes terapéuticos para diversas enfermedades, de las que destaca el cáncer, su enorme contribución se reconoce en el descubrimiento de nuevas moléculas citotóxicas con diversos mecanismos de acción (Muñoz, 2016). Esto a partir de los mecanismos de defensa de las plantas, que por lo general se basan en la capacidad de generar sustancias químicas que poseen un efecto citotóxico y sus características únicas, tales como, la selección evolutiva, de poseer actividad biológica, las convierten en una fuente inestimable de nuevas sustancias con actividad antitumoral. Siendo así como la lista de medicamentos contra el cáncer a partir de productos naturales ha aumentado en los últimos años.

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son sintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, servir como modelos para la preparación de sustancias inactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico. En un estudio reciente se ha analizado el origen de los nuevos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2008. De este estudio se desprende que un 57.7% corresponden a productos naturales y sus derivados. (Gutiérrez *et al.*, 2009).

## **Saponinas**

Las saponinas son producto de defensa de los vegetales contra sus patógenos, especialmente hongos, y se encuentran sobre todo en las zonas más externas de las plantas (Mostacero, 2002).

Estas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénica y saponinas esteroidales respectivamente (Guerra, 2005, López, 2001, Marston, 1995).

- Los glicósidos son moléculas que surgen de la unión de un azúcares con esteroides, alcaloides o terpenos, presentan propiedades detergentes y actúan como protección contra herbívoros. Incluyen a moléculas como saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (Rodney *et al.*, 2000).
- En México se cuenta con una enorme diversidad de plantas que no han sido estudiadas y que ofrecen una gran fuente de estos metabolitos (Díaz *et al.*, 2001).

### **saponinas triterpenoides**

Las saponinas triterpenoides pertenecen a un largo grupo de compuestos que contienen una configuración de cuatro a cinco anillos o 30 carbonos con varios oxígenos unidos (Figura 17). Los triterpenos son ensamblados a partir del isopreno (C5) a través de la vía del mevalonato citosólico para formar un compuesto de treinta carbonos. Todas las moléculas triterpénicas se derivan del dammarano y se subdividen en pentacíclicas y tetracíclicas. Las saponinas triterpénicas pentacíclicas conservan la estructura básica del oleano o del ursano. Las saponinas triterpénicas tetracíclicas conservan la estructura básica del dammarano, con 3 anillos de 6 carbonos y uno de 5 (Siller, 2012, Marston, 1995).

### **Saponinas esteroidales**

Las saponinas esteroidales, en comparación con las saponinas triterpenoides están menos distribuidas en la naturaleza y se encuentran en muchas familias monocotiledóneas. Se sintetizan también por la ruta del ácido mevalónico. Este tipo de saponinas se subdividen en dos grupos principales: los derivados del espirostanos y derivados del furostanol (Marston, 1995, López Luengo, 2001).

Los derivados del espirostanos son estructuras haxacíclicas de 27 carbonos que derivan del ciclopentanohidrofenantreno con dos ciclos de 5 y 6 miembros y una cadena lateral en la posición 17 (Madland, 2013).

Los derivados del furostanol poseen un ciclo menos que el espirostanos pero también tienen un esqueleto de 27 carbonos (Figura 17); es decir, son aquellas saponinas en donde el anillo F está abierto y se consideran precursores biosintéticos de las saponinas derivadas del espirostanos (Siller Juarez, 2012).

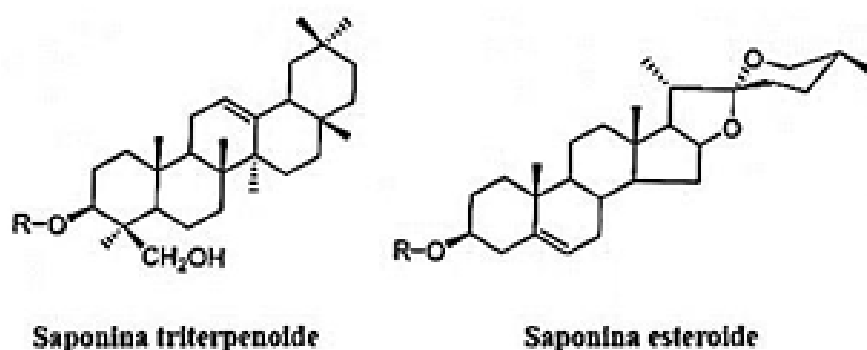


Fig. 17. Estructura de las saponinas triterpenoide y esteroidal.

Tomado de Giraud, M & Ugarie M (junio 2010).

## Clasificación de las sapogeninas

Las sapogeninas (aglicón) constituyen la porción lipofílica o no azucarada de la saponina obtenida por hidrólisis y pueden ser de naturaleza triterpénica o esteroidea (Rojas Crisanchó, 2010).

Las sapogeninas esteroidales poseen el esqueleto base tetracíclico característico de los esteroides, con la particularidad de que la cadena que se origina a partir de C-17; puede adoptar varias configuraciones (Agrawl 1985, Lic. Santos Morell, 2004) y en función de éstas se clasifican en:

Sapogeninas espiroestánicas: la cadena lateral forma dos anillos adicionales (E y F) que están contenidos en planos perpendiculares entre sí. En estas el átomo de carbono común a los dos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura cetálica) por lo que a esta "cadena" lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica (Guerra de León, 2005).

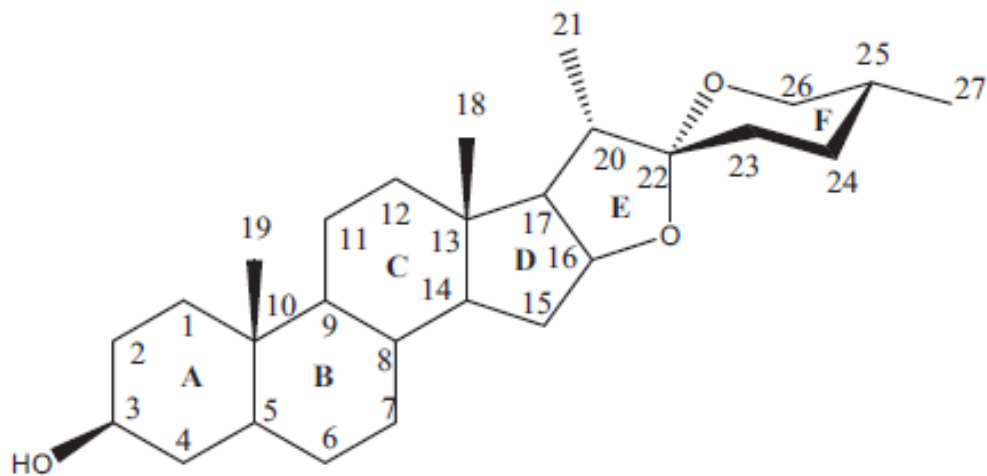


Fig. 18. Ejemplo de saponina espiroestánica.

- Saponinas furoestánicas: similares a las espiroestánicas, pero con el anillo F abierto.

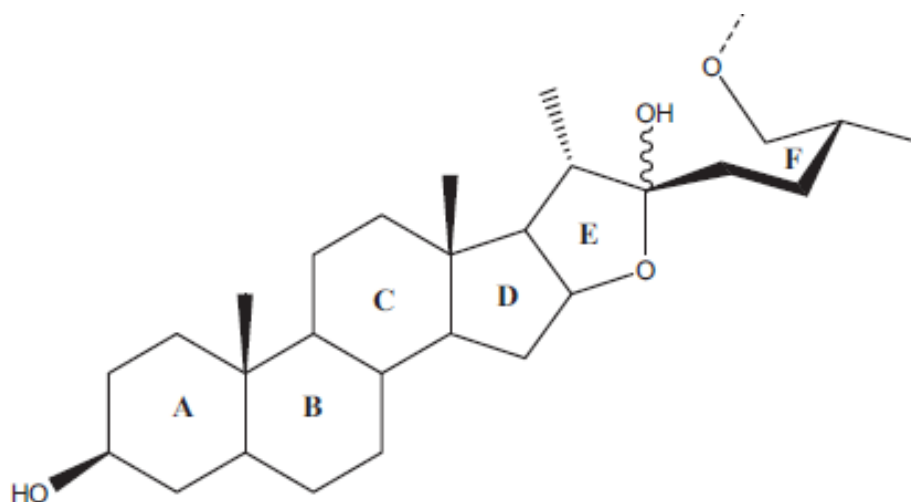


Fig. 19. Ejemplo de saponina furostánica.

- Saponinas furoespirostánicas. Los anillos E y F tiene cinco miembros cada uno.

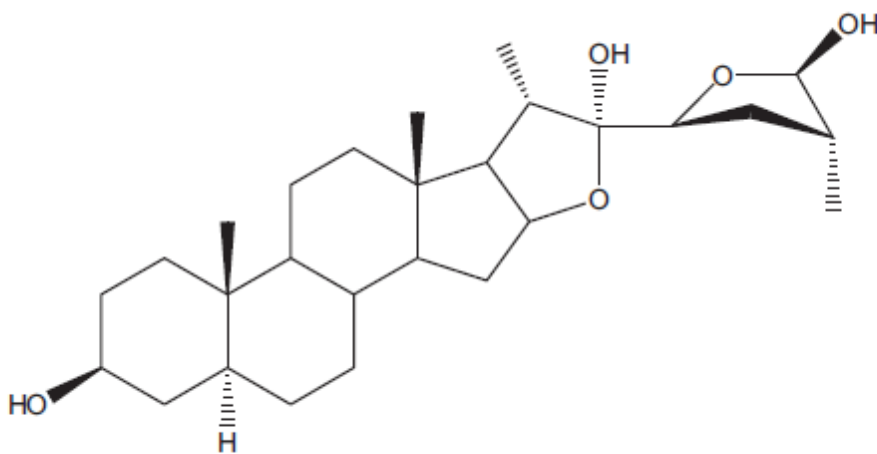


Fig. 20. Ejemplo de saponina furoespirostánica.

Son rasgos estructurales comunes de estos compuestos, poseer los metilos 18 y 19, dirigidos hacia la cara  $\beta\alpha\Delta$  de la molécula y fusión "cis" entre los anillos B-C y C-D (Marston, 1995).

Los anillos A y B se pueden unir de forma “*trans*” o “*cis*” y en función de esto las saponinas pertenecen a la serie 5  $\alpha$  (serie del colestano) y 5  $\beta$  (serie del coprostano) respectivamente. También es frecuente encontrar una insaturación entre los carbonos 5 y 6, en estos casos los compuestos pertenecen a la serie  $\Delta^5$  (Santos, 2004).

Depende de la cantidad de uniones a restos de azúcares que presenta al aglicón que las saponinas puedan ser clasificadas como monodesmosidas, bidesmosidas o tridesmosidas (del griego desmos = cadena). Estas cadenas de azúcares pueden estar formadas por la combinación de monosacáridos como glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ácidos urónicos y en raros casos apiosa (Marston, 1995).

El cáncer es un problema de salud cada vez mayor en todo el mundo, se han realizado progresos significativos para comprender los efectos antitumorales de las saponinas esteroideas en los últimos años, según los hallazgos reportados las saponinas esteroideas ejercen diversas actividades antitumorales como inhibir la proliferación, inducir apoptosis y autofagia y regulan el microambiente tumoral a través de múltiples vías de señalización relacionadas (GLOBOCAN, 2020). Los estudios sobre las propiedades biológicas de las saponinas han incrementado la última década lo cual está relacionado con el hecho de que muchas de las plantas ricas en estos metabolitos son utilizadas por diversas poblaciones como medicina folklórica en el tratamiento de diferentes enfermedades en forma de ungüentos, cocimientos, complementos alimenticios etcétera (Sparg, 2004). Algunas saponinas que destacan en estos estudios son las saponinas esteroideas Dioscina, Diosgenina y la Diosgenina 3 Glu, esta última evaluada en el presente trabajo.

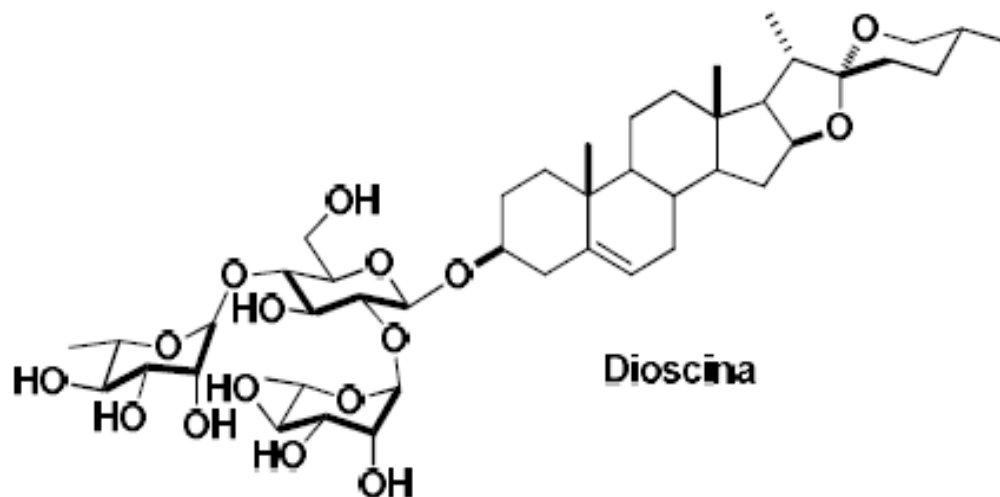


Fig. 21. Estructura molecular de la saponina esteroïdal Dioscina. (cortesía del laboratorio de síntesis de productos naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Es una saponina esteroïdal que ha sido aislada de *Discorea Rizoma*, la cual ha demostrado tener potencial anticancerígeno en varios tipos de cáncer (Xu, 2016) incluyendo: leucemia humana K562 y HL60, cáncer de pulmón A549, NCI-H446, NCI-H46076 y H1299, cáncer de esófago KYSE51, carcinoma hepatocelular Huh7 y HepG2, cáncer gástrico SGC-7901, cáncer de colon HCT-116, LoVo, Caco-2, SW620 y LS, carcinoma epitelial de cérvix HeLa, cáncer de ovario SKOV3, cáncer de próstata LNCap y cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-4 y T47D (Kim, 2014)

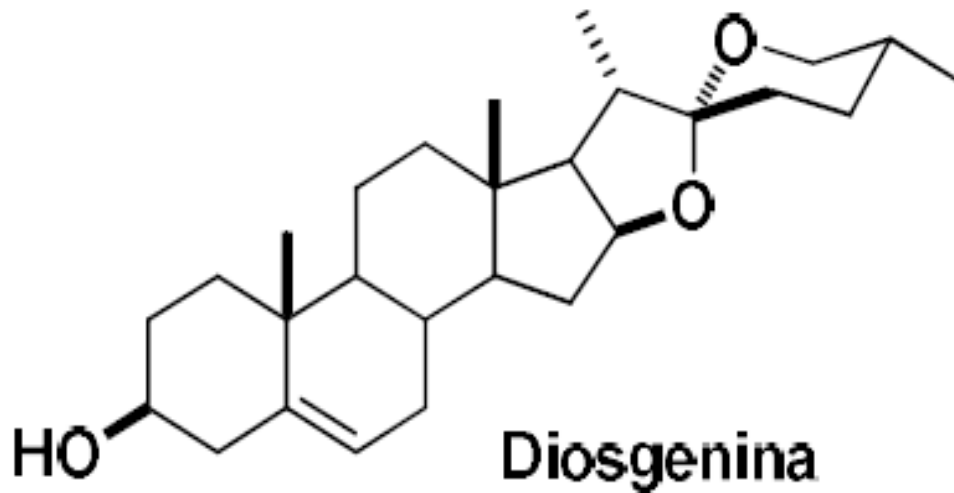


Fig. 22. Estructura molecular de la saponina esteroideal Diosgenina. (cortesía del laboratorio de síntesis de productos naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

La Diosgenina es una saponina esteroideal, obtenida a partir de la hidrólisis de la Dioscina, que ha demostrado tener una actividad antitumoral en diferentes líneas celulares (Jesús M, 2016) como: cáncer de próstata PC-3 y DU-145, carcinoma de colon HCT-116 y HT-29 eritroleucemia HEL, carcinoma de células escamosas A431, Hep2 y RPMI 2650, carcinoma hepatocelular HepG2 y HCC, cáncer gástrico BGC-823, cáncer de pulmón A549 y cáncer de mama MCF-7. Adicionalmente se sabe que la Diosgenina causa el arresto del ciclo celular, la inducción de apoptosis por la activación de p53 y la activación de caspasa-3. Además de la inhibición *in vitro* de la proliferación de células cancerosas inducida por Diosgenina, un componente bioactivo, varios estudios han demostrado que la Diosgenina es un potente inhibidor del crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de cáncer en roedores (Sethi, 2018).



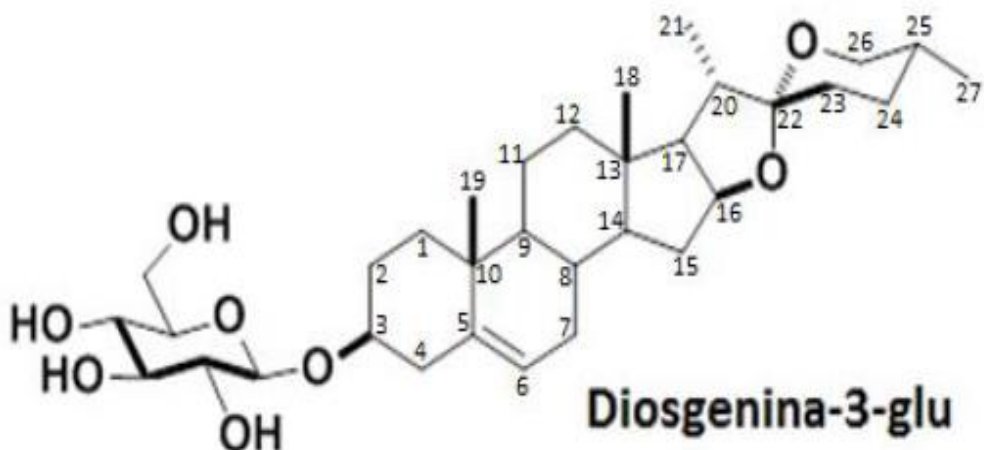


Fig. 23. Estructura molecular de la saponina esteroideal Diosgenina 3 Glu. (cortesía del laboratorio de síntesis de productos naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

La Diosgenina-3-Glu (B-D-glucopiranosido de (25R)-spirost-5-en-33-ilo) es una saponina esteroideal monodesmosídica, sintetizada a partir de la Diosgenina por la adición de una glucosa en el carbono tres de la estructura esteroide. En cuanto a su potencial actividad citotóxica, un estudio mostró en sus resultados de citomorfología que la Diosgenina-3-Glu indujo la multinucleación en las células HL-60, NB4 y K562, lo que indica que podría inducir una parada mitótica en estas células de leucemia. En particular, encontraron algunas células apoptóticas con mayor volumen celular en células HL-60 tratadas con 10  $\mu\text{M}$  del compuesto, lo que indica la aparición de apoptosis después de la detención mitótica. Se demostró que también podría causar los efectos citotóxicos en estas células; por ejemplo, la  $\text{IC}_{50}$  que se determinó mediante el ensayo MTT en células K562, fue de aproximadamente 7.5  $\mu\text{M}$  (Liu, 2004). Además de la apoptosis, las células que experimentan una catástrofe mitótica, que se asocia con la segregación anormal de los cromosomas y la citocinesis aberrante, lo que resulta en células de tamaño anormal y contenido de ADN. Esta forma de muerte celular se ha definido como pérdida de integridad reproductiva después de una entrada inapropiada en la mitosis

y se caracteriza con frecuencia por la aparición de células que contienen fragmentos multinucleares o "micronúcleos". Los resultados no mostraron condensación de cromatina o condensación y fragmentación citoplasmática, lo que indica que los remanentes nucleares se estaban sometiendo a una cariólisis (disolución nuclear) (Liu, 2004). Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que la Diosgenina posee actividad antiproliferativa en cáncer de cérvix CaSki, HeLa, ViBo, así como en la línea celular de cáncer de pulmón SK-LU-1. También se observó que tiene la capacidad de inducir la activación de caspasa-3, así como la fragmentación del ADN sobre estas líneas celulares (Martinez, 2013).

## **Planteamiento del problema**

En el ámbito mundial, el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población y la más frecuente entre las mujeres. En México se ubica como la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer (GLOBOCAN, 2020).

Hoy en día existen diferentes tratamientos para combatir esta enfermedad, sin embargo, se sabe que estos son altamente agresivos y los principales fármacos utilizados presentan actividad citotóxica y nula selectividad, lo cual genera la necesidad de buscar nuevas alternativas para su tratamiento. Por lo cual en la actualidad se están adoptando alternativas novedosas para combatir el inicio y la progresión de los cánceres humanos. Siendo de gran interés el encontrar compuestos de origen natural que tengan actividad antitumoral y que sean selectivos para su uso en tratamientos contra el cáncer.

## **Justificación**

Actualmente el cáncer es una enfermedad considerada como uno de los problemas de mayor importancia en el área de la salud, ya que éste es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la tercera en México. Los tratamientos se caracterizan por ser poco exitosos en pacientes con la enfermedad avanzada, además de generar considerables efectos colaterales debido a su acción citotóxica y baja selectividad. Por lo que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que pudieran presentar actividad antiproliferativa sobre las células tumorales y selectividad sobre células no tumorales, candidatos a estas opciones terapéuticas son compuestos naturales o seminaturales, como lo es la Diosgenina-3-Glu una saponina esteroideal.

## Hipótesis

Se ha demostrado que algunas saponinas poseen un efecto antiproliferativo e inductor de muerte celular *in vitro*, por lo que se espera que la saponina Diosgenina-3-Glu (derivado de la Diosgenina) presente estos efectos en la línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-231 y en las líneas celulares de cáncer de mama murina JC Y 4T1.

## Objetivos

### General

- Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la Diosgenina-3-Glu en líneas celulares 4T1, MDA-MB-231 y JC.

### Particulares

- Determinar la concentración requerida de la Diosgenina-3-Glu para inducir el decremento del 50% de la población celular en las líneas celulares JC, 4T1 y MDA-MB 231, a través de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica de la Diosgenina-3-Glu en líneas celulares JC, 4T1 y MDA-MB 231, a través de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de estos cultivos.
- Evaluar la actividad apoptótica de la Diosgenina-3-Glu en líneas celulares JC, 4T1 y MDA-MB 231, a través de la observación de características morfológicas celulares, típicas de las células apoptóticas, mediante la tinción con el fluorocromo DAPI, así como la detección de caspasa-3 activa observada por microscopia de fluorescencia.

## Diseño experimental

### Preparación del compuesto

El compuesto fue suministrado por el laboratorio de síntesis de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

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

Se realizó una serie de diluciones de la solución stock en medio de cultivo RPMI 1640 (Microlan, MEX) al 5% SFB para obtener una concentración final de 10 g/10uL en proporción 1:1 en tubos cónicos tipo *ependorf* de 600 µl (Corning, USA) y se almacenaron a temperatura ambiente.

### Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1, fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC Rockville, MD) y fueron sembradas 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 fetal bovino (FBS; Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para la realización de los ensayos se utilizarón cultivos de células tumorales a un 70 % de saturación (fase de crecimiento exponencial).

## **Determinación de la concentración requerida para la inhibición del 50% de la población (IC<sub>50</sub>) de células tumorales**

Las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1, se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 6000 células por pozo con 100  $\mu$ L de RPMI con 5% de Suero Neonato Bovino (SNB), las cuales se incubaron a 37 °C, al 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio y se trataron 6 repeticiones con las siguientes condiciones: un control testigo al cual sólo se le adicionó medio de cultivo, un control del vehículo empleado en la solubilización del compuesto, dimetilsulfóxido (DMSO)-Etanol (EtOH) 1:3 (J.T. Baker, USA). a la concentración de 5  $\mu$ g/mL, y diferentes concentraciones del compuesto Diosgenina-3-Glu disuelto en medio de cultivo. Después de 24 de horas de tratamiento se evaluó la actividad antiproliferativa a través de la incorporación de cristal violeta, se retiró el medio y se fijaron las células con 70  $\mu$ L/pozo de glutaraldehído al 1.1% durante 20 minutos en agitación constante, cumplido el tiempo se retiró el fijador y se lavó con agua, dejando secar al aire. Posteriormente, se añadieron 70  $\mu$ L/pozo de cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6, manteniéndose por 20 minutos en agitación constante, pasados los 20 minutos, se retiró el exceso de colorante y se lavó exhaustivamente con agua corriente y se dejó secar al aire. Se agregaron 70  $\mu$ L/ pozo de ácido acético al 10% por 20 minutos y se midió su absorbancia a 600nm por espectrofotometría en un lector de placas (Chromate Manager). Los datos obtenidos se analizaron en Excel graficando una curva dosis respuesta y calculando la IC<sub>50</sub>.

## **Determinación de la muerte celular por necrosis en células tumorales mediante la detección de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa).**

Transcurridas las 24 horas de tratamiento, se recuperó el sobrenadante y se colocó en una placa de fondo cónico. Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 rpm



durante 5 minutos, se recuperaron 40  $\mu$ L del sobrenadante centrifugado y se colocó en una placa de 96 pozos de fondo plano, se le adicionaron 40  $\mu$ L del reactivo de LDH y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Chromate Manager). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado en Microsoft Office Excel 2010, haciendo una comparación con el control positivo tratado con tritón X-100.

### **Efecto de la Diosgenina-3-Glu en la morfología celular y condensación de la cromatina en células tumorales por medio de la tinción con el fluorocromo DAPI y detección de caspasa 3 activa por marcaje con FITC en células tratadas con Diosgenina-3-Glu.**

Las células se trataron con la concentración de IC<sub>50</sub> respectiva durante 24 horas, considerando un control testigo, un control vehículo dimetilsulfóxido (DMSO)-Etanol (EtOH) 1:3 (J.T. Baker, USA). y un control positivo (10  $\mu$ L/mL de colchicina solubilizada en medio). Pasadas las 24 horas, las células se fijaron durante 15 minutos con 50  $\mu$ l de paraformaldehído. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS y enseguida las células se permearon con una solución de tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 minutos a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con PBS y se le adicionó 30  $\mu$ l del anticuerpo primario policlonal de conejo anti-caspasa-3 activa humana (Sigma, USA) 1:200 en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente las muestras se lavaron tres veces con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo, anticuerpo desarrollado en cabra anti-conejo acoplado a FITC (Sigma, USA), 1:200 en PBS y se mantuvo en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionó 10  $\mu$ l por muestra del fluorocromo DAPI (Sigma, USA) durante 1 minuto a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados con PBS durante 3 minutos cada uno, finalmente las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E600 (Nikon, USA).

## Resultados

### Actividad antiproliferativa de la Diosgenina-3-Glu en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1.

Con la intención de establecer si la Diosgenina-3-Glu presenta actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales, cultivos de las células tumorales de mama MDA-MB-231, JC y 4T1 fueron estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto durante 24 h y su actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento en la densidad celular del 50% (IC<sub>50</sub>) (Fig. 24-26, Tabla 2).

Tabla 2. Concentración requerida de Diosgenina-3-Glu para disminuir la densidad celular en un 50 % (IC <sub>50</sub> ).		
MDA-MB-231	8.2 µg/mL	14.1 µM
JC	4.8 µg/mL	8.3 µM
4T1	9.0 µg/mL	15.5 µM

Efecto de la Diosgenina-3-Glu sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1. 6000 células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas a diferentes concentraciones del compuesto por 24 horas, posteriormente el número celular fue evaluado a través de la técnica de incorporación de cristal violeta (Figuras 24-26).

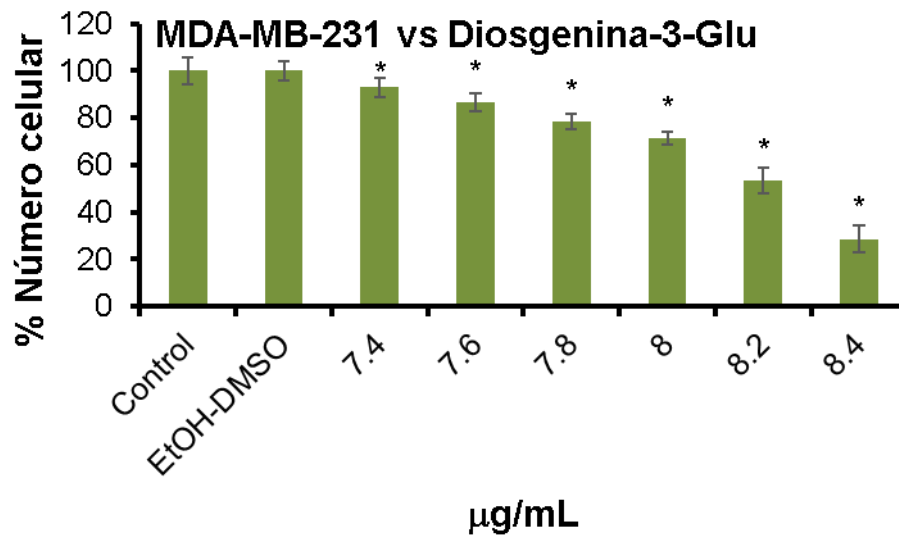


Fig 24. Actividad antiproliferativa que presenta la Diosgenina-3-Glu en la línea celular MDA-MB-231. El número celular fue obtenido mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Los datos fueron obtenidos de tres ensayos independientes, donde cada condición fue obtenida por el promedio de 6 repeticiones. Las barras representan la SD. Se realizó un análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba Tukey  $p < 0.05$  vs control.

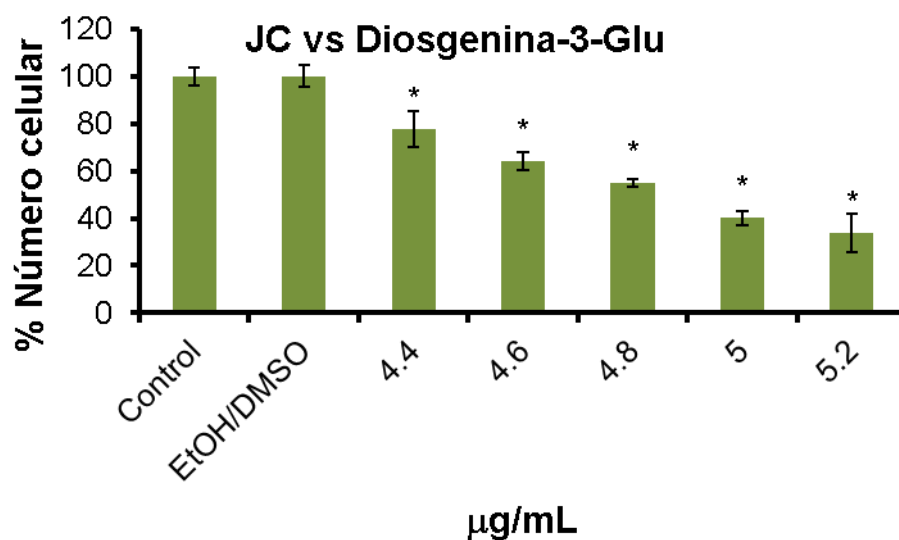


Fig 25. Actividad antiproliferativa que presenta la Diosgenina-3-Glu en la línea celular JC. El número celular fue obtenido mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Los datos fueron obtenidos de tres ensayos independientes, donde cada condición fue obtenida por el promedio de 6 repeticiones. Las barras representan la SD. Se realizó un análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba Tukey  $p < 0.05$  vs control.

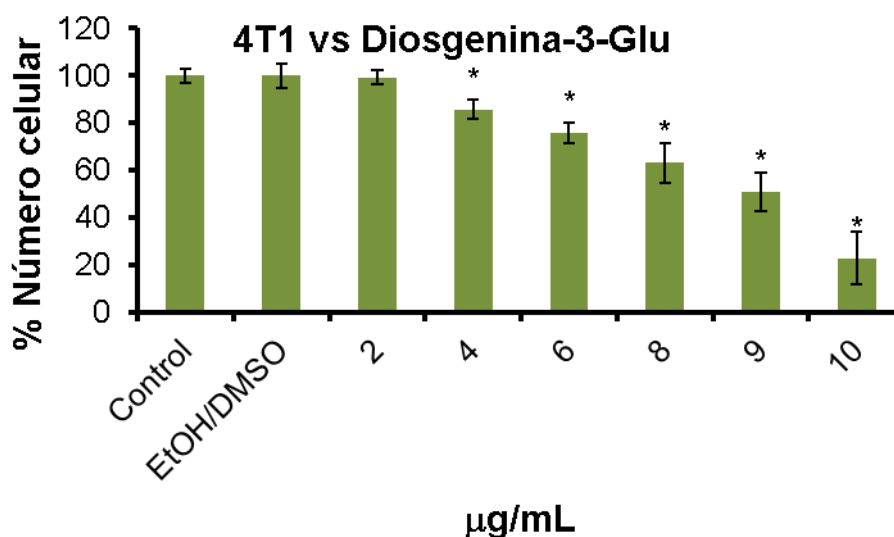


Fig 26. Actividad antiproliferativa que presenta la Diosgenina-3-Glu en la línea celular 4T1. El número celular fue obtenido mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Los datos fueron obtenidos de tres ensayos independientes, donde cada condición fue obtenida por el promedio de 6 repeticiones. Las barras representan la SD. Se realizó un análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba Tukey  $p < 0.05$  vs control.

Los resultados obtenidos, muestran la actividad antiproliferativa que presenta la Diosgenina-3-Glu en las tres líneas celulares tumorales, afectando su potencial

proliferativo de manera dependiente de la dosis, con valores de IC<sub>50</sub> mostrados en la Tabla 2.

### Actividad Necrótica de la Diosgenina-3-Glu en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1.

Para establecer que la disminución del número celular observado en las diferentes líneas celulares tumorales tratadas con la Diosgenina-3-Glu, es debido a la inducción de una muerte necrótica, cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1 fueron tratadas con el compuesto a las concentraciones de sus respectivas IC<sub>50</sub> y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de estos cultivos fue evaluada y considerada como indicador de la pérdida de integridad de la membrana celular, un evento característico de una muerte por necrosis (Figuras 27-29).

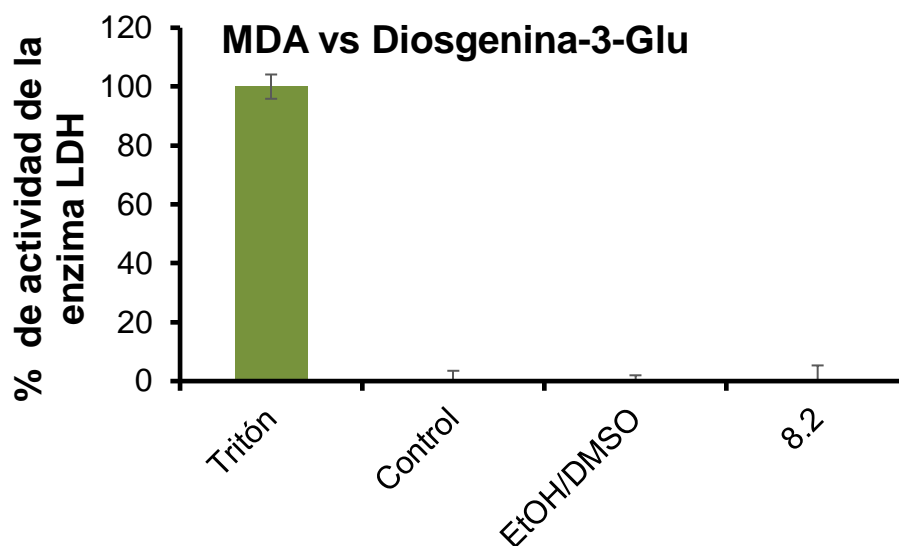


Fig 27. Evaluación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos de la línea celular MDA- MB-231 tratada con la Diosgenina-3-Glu, expresada en porcentaje comparado con un control positivo de

células lisadas con tritón X-100. Resultados de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con una  $p < 0.05$  muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

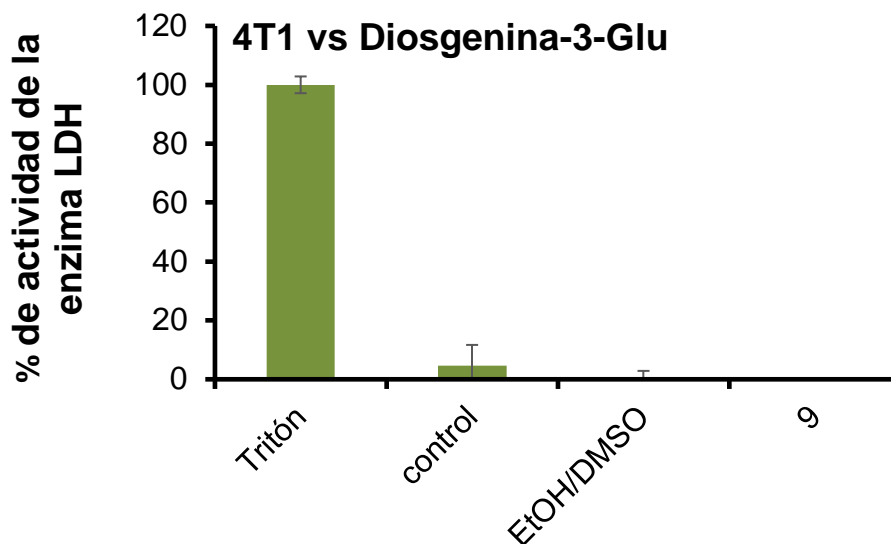


Fig 28. Porcentaje de actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos de la línea celular 4T1 tratada con la Diosgenina-3-Glu, expresada en porcentaje comparado con un control positivo de células lisadas con tritón X-100. Resultados de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con una  $p < 0.05$  muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

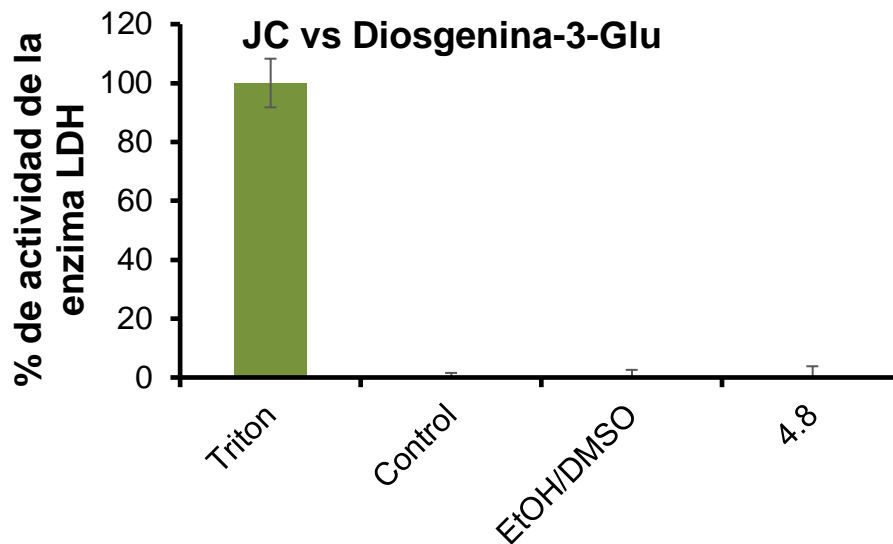


Fig. 29. Porcentaje de actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos de la línea celular JC tratada con la Diosgenina-3-Glu, expresada en porcentaje comparado con un control positivo de células lisadas con tritón X-100. Resultados de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con una  $p < 0.05$  muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Como se puede observar en las figuras 27, 28 y 29, los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares tratados con la Diosgenina 3 Glu, no presentaron actividad de la enzima LDH de manera significativa, indicando que este compuesto es de baja o nula actividad necrótica en las líneas celulares MDA-MB-231, JC y 4T1.

### Efecto de la Diosgenina 3 Glu en células tumorales MDA-MB-231, JC y 4T1

Una vez obtenida la  $IC_{50}$  y considerando que la Diosgenina-3-Glu no produce una muerte celular tipo necrótica, se realizó un análisis de la morfología celular y nuclear, así como la inmunodetección de la caspasa-3 activa a nivel microscopía de contraste de fases y de epifluorescencia en las tres líneas celulares de cáncer mama mda-mb-231, JC y 4T1.

Para ello las imágenes se contrastaron con una población control, a la cual sólo se le hizo cambio del medio de cultivo durante el estímulo, en las imágenes del contraste de fases (CF) se pueden observar células adheridas a la placa de cultivo con una morfología estrellada, prolongaciones citoplasmáticas bien definidas y núcleos grandes con respecto al citoplasma. Adicionalmente, las imágenes teñidas con DAPI evidenciaron que la cromatina se encuentra laxa y sin ningún tipo de fragmentación. El segundo control experimental muestra las células que fueron estimuladas con la misma concentración de vehículo (EtOH/DMSO 3:1) en el cual se disolvió el compuesto, estas células mostraron una morfología similar a la del control experimental tanto en contraste de fases como con la tinción de DAPI. Lo anterior permite descartar algún tipo de efecto del vehículo sobre las células. El tercer tratamiento muestra un control positivo a apoptosis (Colchicina) en el que se observa una disminución del número celular, contracción de las prolongaciones citoplasmáticas, las células pasan de tener una forma estrellada a una forma redondeada, pérdida de la adherencia y presencia de caspasa-3 activa; el último tratamiento muestra el efecto del compuesto Diosgenina-3-Glu, en esta condición las células muestran una disminución del número celular, contracción de las prolongaciones citoplasmáticas, pérdida de la morfología estrellada hacia una redondeada, pérdida de la adherencia así como presencia de caspasa-3 activa. En las células teñidas con DAPI se observa compactación y fragmentación de la cromatina.



## MDA-MB-231 vs Diosgenina-3-Glu

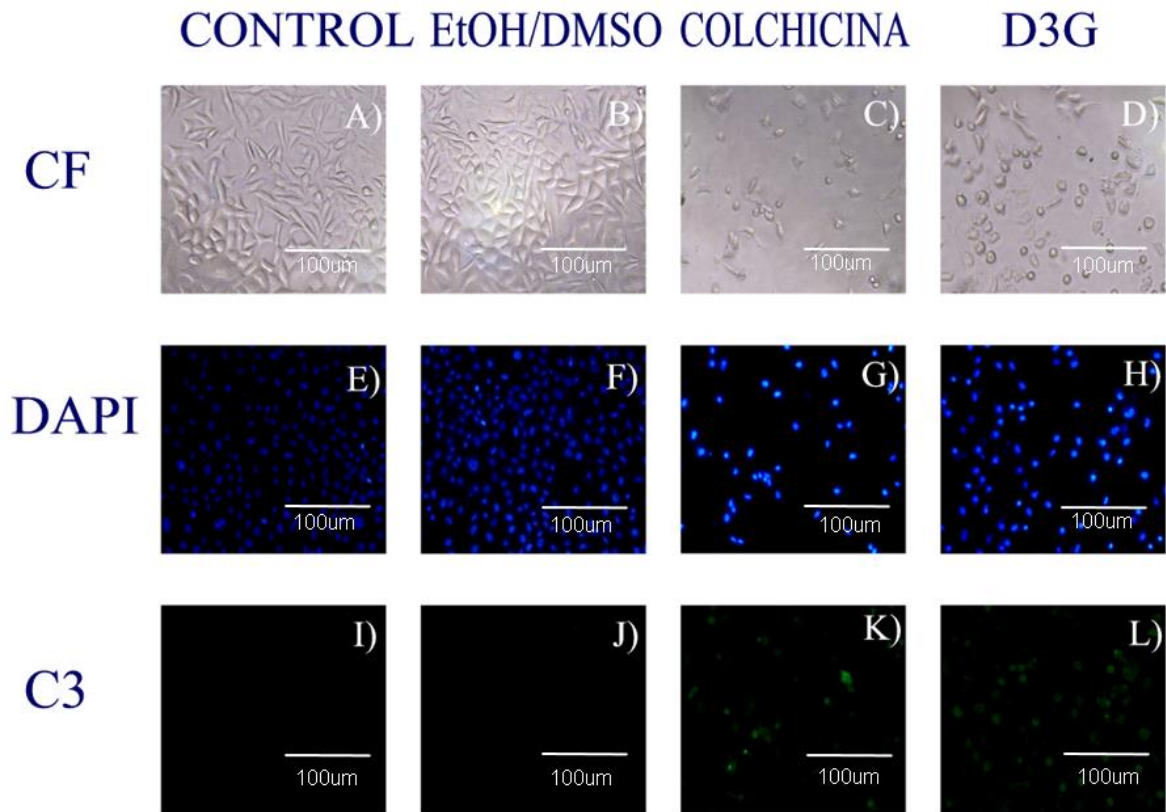


Fig. 30. Efecto de la Diosgenina-3-Glu sobre cultivo de las células MDA-MB-231. Se observa células sin tratamiento (A, E y I) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa, células tratadas con EtOH/DMSO (Vehículo del compuesto) (B, F y J) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa, células tratadas con un control positivo (Colchicina) (C, G y K) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 y células tratadas con el compuesto (Diosgenina-3-Glu) (D, H y L) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa.

## JC vs Diosgenina-3-Glu

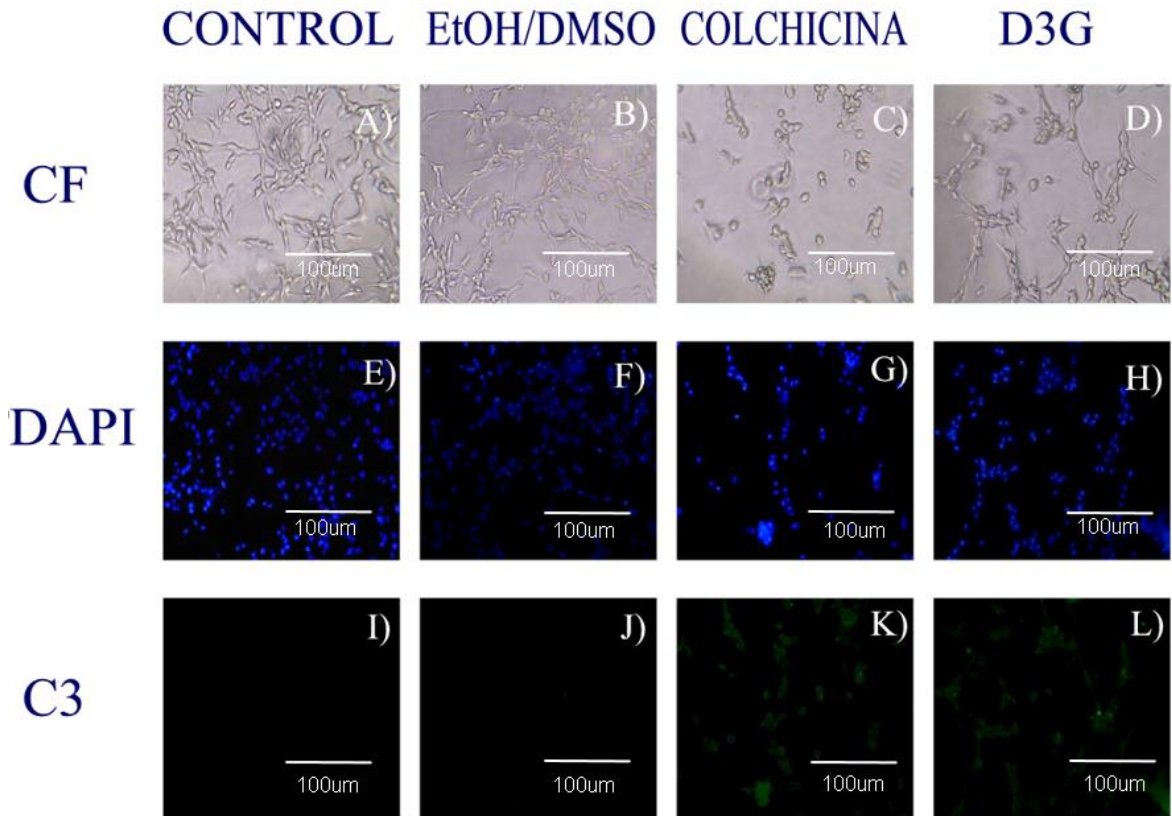


Fig. 31. Efecto de la Diosgenina-3-Glu sobre cultivo de las células JC. Se observa células sin tratamiento (A, E y I) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa, células tratadas con EtOH/DMSO (Vehículo del compuesto) (B, F y J) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa, células tratadas con un control positivo (Colchicina) (C, G y K) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 y células tratadas con el compuesto (Diosgenina-3-Glu) (D, H y L) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa.

## 4T1 vs Diosgenina-3-Glu

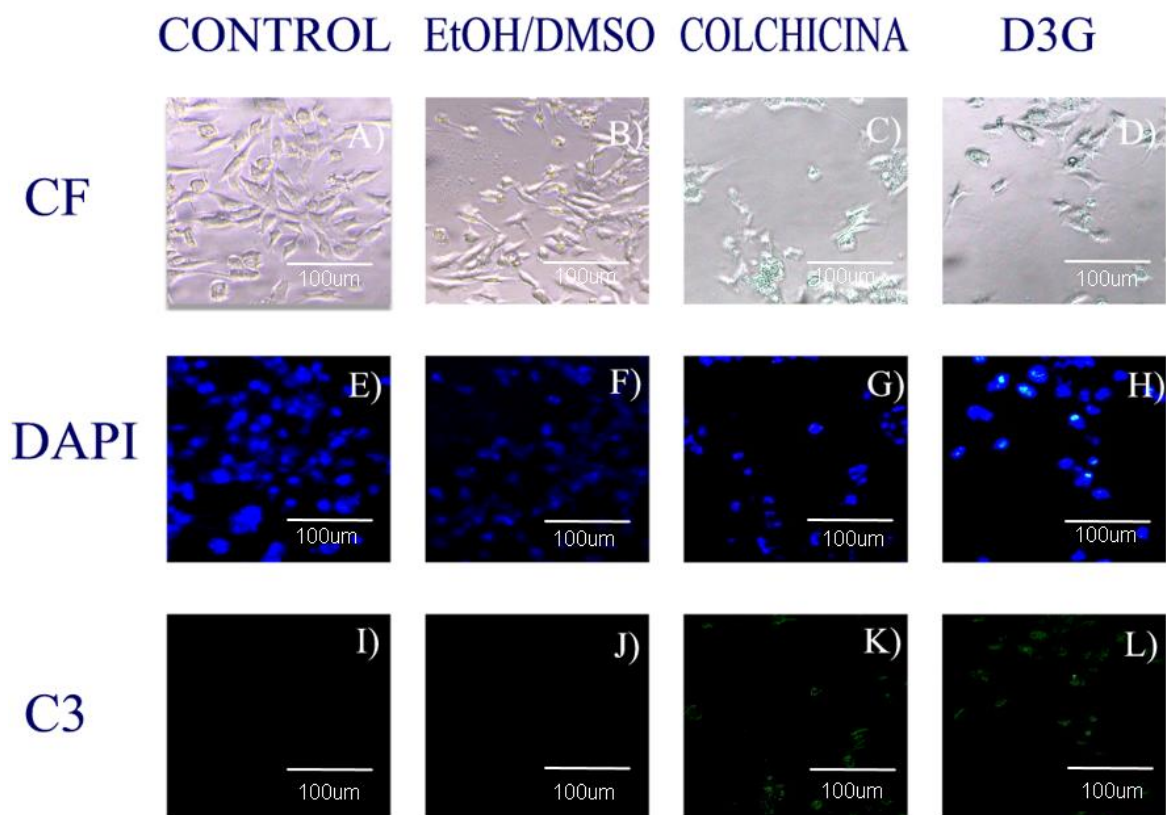


Fig. 32. Efecto de la Diosgenina-3-Glu sobre cultivo de las células JC. Se observa células sin tratamiento (A, E y I) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa, células tratadas con EtOH/DMSO (Vehículo del compuesto) (B, F y J) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa, células tratadas con un control positivo (Colchicina) (C, G y K) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 y células tratadas con el compuesto (Diosgenina-3-Glu) (D, H y L) en contraste de fases, DAPI e inmuno detección de Caspasa 3 activa.

Las figuras 30, 31 y 32 muestran imágenes del contraste de fases (CF) (A, E y I) respectivamente, donde se pueden observar en los controles, células con una morfología extendida, prolongaciones citoplasmáticas bien definidas, núcleos

grandes y adheridas a la placa de cultivo, adicionalmente observamos las imágenes teñidas con DAPI (Figuras 30, 31 y 32) (B, F y J) respectivamente, donde la cromatina se encuentra laxa y sin ningún tipo de fragmentación. De igual manera, en las células EtOH/DMSO (Figuras 30, 31 y 32) se observan células con una morfología similar a la del control, descartando así algún tipo de efecto del vehículo sobre la morfología de las células ; el control positivo para apoptosis (Colchicina) (Figuras 30, 31 y 32) (C, G y K) respectivamente, se observa contracción de las prolongaciones citoplasmáticas, las células pasan de tener una forma extendida a una forma redondeada y hay pérdida de la adherencia; por último en el efecto del compuesto Diosgenina-3-Glu (Figuras 30, 31 y 32) (D, H y L) respectivamente, se aprecia la contracción celular, así como, de las prolongaciones citoplasmáticas, pérdida de la morfología hacia una redondeada así como la pérdida de la adherencia, en la tinción con DAPI se observa compactación y fragmentación de la cromatina.

## **Discusión**

Hoy en día las principales terapias contra el cáncer son la cirugía, radioterapia y la quimioterapia, las cuales hasta el día de hoy no han sido exitosas en la eliminación total de la enfermedad (Sánchez *et al.*, 2016), además de ser ineficientes en estadios avanzados. Actualmente el 75% de los quimioterapéuticos que son usados hoy en día están relacionados a productos naturales, ya sea porque se han obtenido directamente de una fuente natural, de una síntesis química de una estructura natural o bien se han hecho modificaciones químicas a la estructura del compuesto natural. La investigación del tratamiento de cáncer es fundamental para mejorar los efectos para los pacientes afectados por la enfermedad. Estos programas incluyen la formulación de tratamientos más eficaces y menos tóxicos. Los estudios sobre las propiedades biológicas de las saponinas se han incrementado en la última década. Según los hallazgos reportados, las saponinas esteroides tienen una gran relevancia ya que ejercen diversas actividades antitumorales, inhibición de la

proliferación mediante la detención en alguna de las fases del ciclo celular e inducción de apoptosis en células tumorales (Raju *et al.*, 2007). Por otro lado, se sabe que modificaciones en el número, tipo y posición de los restos glicosilados de las saponinas influye en la respuesta biológica (Man, 2010). En el caso particular de la Diosgenina-3-Glu, esta saponina es un compuesto de reciente síntesis y con escasa información antitumoral (Fernández, 2012). Al respecto, los resultados obtenidos en este trabajo establecen que es un compuesto con actividad antiproliferativa, de baja actividad necrótica y con actividad inductora de apoptosis en células tumorales. Durante los últimos años se han descrito la actividad antiproliferativa de diversas moléculas de origen natural y/o derivados de las mismas, sin embargo, no todos reportan información con respecto al tipo de muerte celular que los compuestos llevan a cabo y/o mecanismo bioquímico que explique el decaimiento de la población celular. Siendo esta información de gran importancia, debido a que los principales quimioterapéuticos presentan alta actividad necrótica, generando múltiples efectos secundarios como lo son, náuseas, vómito y dolor (INFOCANCER 2023).

Con la finalidad de explicar el efecto antiproliferativo de la Diosgenina-3-Glu, en el presente trabajo se evaluó la muerte celular apoptótica y necrótica siendo los dos tipos de muerte que se diferencian por sus características morfológicas y bioquímicas.

Nuestros resultados arrojaron que la muerte necrótica, determinada a través de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como indicador de la pérdida de la integridad de la membrana, la cual es una característica distintiva de este tipo de muerte, la prueba estadística ANOVA indica que no existe diferencia entre los tratamientos (control, vehículo, IC<sub>50</sub>) por lo que es posible afirmar que el compuesto Diosgenina-3-Glu no ocasiona una muerte de tipo necrótico en las líneas MDA-MB-231, JC y 4T1. Estos resultados indican que la disminución en el número celular observado en los cultivos celulares tratados con la saponina es debido a un proceso diferente al proceso necrótico, lo que es relevante ya que la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos aplicados para el tratamiento del cáncer presentan actividad fuertemente necrótica, dependiente de la dosis, que da como

consecuencia fuertes efectos colaterales asociados a esta actividad necrótica. De igual manera este hecho sugiere que la Diosgenina-3-Glu podría ser más tolerable y que los efectos colaterales relacionados con la muerte necrótica serían significativamente menores en comparación con los quimioterapéuticos tradicionales. El hecho de que nuestros resultados mostraran que la Diosgenina-3-Glu induce a las células tumorales de mama MDA-MB-231, JC y 4T1 a expresar características morfológicas apoptóticas, así como la presencia de la caspasa 3 activa, indica que esta saponina induce a las células tumorales a una muerte apoptótica. Resultado que es de suma relevancia ya que las células tumorales al ser eliminadas mediante este tipo de muerte, sugiere que el proceso de eliminación celular no activará una respuesta inmune exacerbada, la cual es una de las causas principales que generan fuertes efectos colaterales. Por otro lado, comparando el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de la diosgenina-3-Glu con la Diosgenina, se ha descrito que las  $IC_{50}$  de la Diosgenina para las líneas celulares MDA-MB-231 y JC es de 3.5 y 3  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (García, 2017), valores que son significativamente menores que los obtenidos para la Diosgenina-3-Glu, indicando que la adición de una glucosa en el carbono 3 del esqueleto esteroide de la Diosgenina no mejora la actividad antiproliferativa de ésta, por el contrario, se requiere más compuesto de Diosgenina-3-Glu para realizar la misma actividad antiproliferativa de la Diosgenina. De igual manera, se ha descrito que la Diosgenina presenta actividad apoptótica, sin embargo, no es claro si la actividad apoptótica presente en la Diosgenina presenta la misma magnitud que la Diosgenina-3-Glu, por lo que sería relevante establecer si la glucosa añadida al carbono 3 de la Diosgenina mejora la actividad apoptótica de esta saponina. En general, se ha descrito que las saponinas presentan actividad antiproliferativa, de baja actividad citotóxica y son inductoras de muerte celular apoptótica, propiedades que las hace dignas candidatas para ser estudiadas como agentes antitumorales con potencial terapéutico.

## Conclusiones

La Diosgenina-3-Glu presenta actividad antiproliferativa contra las líneas tumorales MDA-MB-231, JC y 4T1 con valores de IC<sub>50</sub> de 8.2, 4.8 y 9 µg/mL respectivamente.

La Diosgenina-3-Glu no induce muerte necrótica en las líneas celulares tumorales MDA-MB-231, JC y 4T1 en sus concentraciones de inhibición del 50% (IC50).

La Diosgenina-3-Glu en sus concentraciones de inhibición del 50% induce muerte apoptótica con la participación de la caspasa-3 activa.

## Referencias

1. ACR-Practice guideline of the performance of diagnostic Mammography, (2006).
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2006). *Biología Molecular de la célula*. Quinta edición. Garland Science. United States of America:1-2 pp.
3. Agrawal, P. K. J., D. C.; Gupta, R. K.; Thnakur, R. S (1985). Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry*, 24p.
4. American Cancer Society (ASC) (2016). Cáncer de pulmón microcítico (células pequeñas). Recuperado de: <https://www.cancer.org/es.html>
5. Cárdenas S.J., Bargalló R.E., Erazo V.A., Maffs M.E., Poitevin C.A. (2003). Consejo Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Recuperado de; <http://www.consejocancermamario.com/documentos/FOLLETO-CONSENSO-DE-CANCER-DE-MAMA-6aRev2015c.PDF>.
6. Cohen G.M., (1997). Caspases: los verdugos de la apoptosis. *Biochem. J.* 326 (Pt 1), 1–16 10.1042 / bj3260001.
7. Cooper G.M., Hausman R.E., (2007). *THE CELL*. 4ta Ed. United States of America: Sinauer associates; 848 p.
8. Díaz L., Cala O., Pinto C., Lizcano A., Cornejo V. (2003). El ciclo celular. *Med UNAB*. 16(6):21-29 pp.
9. Díaz, B. Baldomero, E. Hernández y M. Lotina, B. (2001). Metabolitos Secundarios De Las Plantas Como Posibles Agentes Herbicidas. Bermen, I y Lora, H. *Avances En Bioquímica y Biología Molecular De Plantas*, México D. F. Facultad De Química UNAM. pp. 111-135.
10. Donegan, W.L. & Spratt, J. S. (1982). *Cáncer de mama*. 2º edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
11. Fuchs, Y. y Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4): pp. 742-58.



12. Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(6), 329–344. Doi: 10.1038/nrm3999
13. García, M., y Vecino, E. (2003). Vías de la señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Arch Soc Esp Oftalmol.*, 78(7), ISSN:0365-6691
14. Guerra de León, J. O. M., Alfredo; Simonet, Ana María; Macías, Francisco Antonio; Nogueiras, Clara, Gomez, Alicia; Escario, Jose A (2008). Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Biología Tropical*, 56, 7.
15. -Guerra de León, J. O. (2005). *Compuestos con actividad antiparasitaria del Agave Brittoniana T.* Doctorado, Universidad de Cádiz, Universidad de La Habana, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
16. Hickman C.P, Roberts L.S., Parson A. (2000). Principios integrales de zoología. 10 Ed. España: Mcgraw Hill: 936 p.
17. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI, (2000).
18. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>.
19. Jiménez L.f., Merchant H. (2003). *Biología celular y molecular*. 1ra Ed. México: Pearson Educación; 912p.
20. Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., Zaguia, A., Koundal, S., & Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *BioMed research international*, 2022, 9605439. Recuperado de: <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>
21. Kerr J.F., (2002). Historia de los eventos que condujeron a la formulación del concepto de apoptosis. *Toxicología* 181–182, 471–474 10.1016 / S0300-483X (02) 00457-2.
22. Lic. Santos Morell, T. L. 2004. *La Portulaca olerácea. L* [Online]. 2016].

23. Liu, M.-J. (2004). The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.*, 1059—1065.
24. Lizarbe I.M.A., (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista de la real academia de las ciencias exactas, Físicas y Naturales.* 101 (2):1-33.
25. Lomanto L.D., Ortiz Ó.L., Bretón C.O., Gomez Ál., Mesa V.M. (2010). El ciclo celular. *MedUNAB.* 6(16):21-9.
26. López R. (2013). La regulación del ciclo celular y cáncer. *Revista especializada en ciencias de la salud.* 6(1): 40-4.
27. -López Luengo, M. T. 2001. Saponósidos. *Doyma Farm.* junio 2001 ed.
28. Madland, E. (2013). *Extraction, Isolation and Structure Elucidation of Saponins from Herniaria incana.* Dostorado, Norwegian University of Science and Technology.
29. Malet, G. (2005). Identificación de moduladores del apoptosomamediante química combinatoria. Universidad de Valencia. España
30. Maresman, G. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Invest. Clin.*, 52(3), 274-290.
31. Marston, H. (1995). *Chemistry and pharmacology of natural products, USA,* Press Syndicate of the University of Cambridge The Pitt Building.
32. Mitra, A.K., Agrahari, V., Mandal, A., Cholkar, K., Natarajan, C., Shah, S., Joseph, M., My Trinh, H., Vaishya, R, Pal, D. (2015). Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *J Control Release.* 219: 248–268 pp.
33. Mostacero, L. M., F; Gamarra, O (2002). *Taxonomía de las fanerogamas útiles del Perú,* Trujillo, Editorial Normas Legales.
34. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *AGING,* Vol. 8 No.4: 603-619 pp.
35. Quezada M.A. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *UAM. Cd de México.* 5(12):5-10.

36. Raju, J. and Mehta, R. (2008). Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin, *Nutrition and Cancer*, 61:1, 27-35.
37. Registro Histopatológico Nacional de México (RHNM) Secretaría de Salud, (2004). Disponible en: [www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01.htm](http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01.htm)
38. Rencolín B., Van der Lann S., Tsanov N., Maiorano D. (2014). Molecular Mechanisms of DNA Replication Checkpoint Activation. *Genes*. 5(1):147-175pp.
39. Ren, Y., Yu, J. & Kinghorn, A.D. (2016). Development of Anticancer Agents from Plant-derived Sesquiterpene Lactones. *Curr Med Chem*. 2016; 23(23): 2397–2420 pp.
40. Riggio AI, Varley KE. Welm AI. (2021). Los misterios persistentes de la recurrencia metastásica en el cáncer de mama. Recuperado de: <https://www.nature.com/articles/s41416-020-01161-4> .
41. Rodney, C., Kutchan T. y Lewis N. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). Buchan, B., Griseem W. y Jones, R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp. 1251-1267. Rockville, EUA. American Society Plant Physiologist.
42. Rojas Cristancho, L. R. P. M., MARINELA. (2010). *Evaluación del efecto de las saponinas presentes en el bagazo del fique sobre la producción de metano*. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander.
43. Salazar Montes, A. M., Sandoval Rodríguez, A. S., & Armendáriz Borunda, J. S. (2013). *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (1a. ed.--). México D.F.: McGraw Hill.
44. Sánchez L, Hernández MG, Escobar ML, López H, Zenteno E, Fernández MA, et al. (2016). Antiproliferative, Cytotoxic, and Apoptotic Activity of Steroidal Oximes in Cervicouterine cell lines. *Molecules*. 21(11).
45. Sethi, G. (2018). Pro-Apoptotic and Anti-Cancer Properties of Diosgenin: A Comprehensive and Critical Review. *Nutrients*, 64p.
46. Siller Juárez, (2012). *Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del Agave Lechuguilla Torrey (guishe) y su aplicación potencial*. Tesis de Grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

47. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Cáncer de Mama. Recuperado de: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>
48. Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*. Vol 94. 219-243 pp.
49. SPARG, S. G. L., M.E.; Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J.Ethnopharmacol*, 219, 94pp.
50. Tao, X., Xu, L., Yin, L., Han, X., Qi, Y., Xu, Y., ... Peng, J. (2017). Dioscina induce la apoptosis de las células de cáncer de próstata a través de la activación del receptor de estrógeno- $\beta$ . *Muerte y enfermedad celular*, 8 (8), e2989. doi: 10.1038 / cdis.2017.391.
51. Tortora, G.J. & Derrickson, B. (2018). *Principios de Anatomía y Fisiología*. 15ª edición. Ciudad de México: Médica panamericana.
52. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. (2014). Necrosis regulada: la red en expansión de vías de muerte celular no apoptóticas. *Nature Rev Mol Cell Biol* 15: 135–47.
53. Vermeulen K., Dirk R., Van Bockstaele y Zwi N. Berman. (2003). The cell cycle: a review of regulation, desregulation and therapeutic targets in cáncer. Faculty of Medicine, Laboratory of Experimental Hematology, University of Antwerp, Antwerp University Hospital, Edegem, Belgium. 36: 131-149.
54. Wang XW y Harris CC (1997) gen supresor de tumores p53: pistas sobre carcinogénesis molecular. *J. Cell. Physiol* 173, 247–255 10.1002 / (SICI) 1097-4652 173: 2% 3c247: AID-JCP30% 3e3.0.CO; 2-A.
55. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992. doi:10.1042/BSR20180992.
56. Yi, C. H., & Yuan, J. (2009). The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Developmental cell*, 16(1), 21–34. doi:10.1016/j.devcel.2008.12.012
57. Yi CH, Yuan J. Las funciones Jekyll y Hyde de las caspasas. *Dev Cell*. 2009; 16 : 21–34.

58. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. (1997). Muerte celular programada en el desarrollo animal. una revisión histórica que se centra en la función de la apoptosis en el desarrollo animal. *88*: 347–54.
59. mama (Sun Y.-S., Zhao Z., Yang Z.-N., et al. (2017). Factores de riesgo y prevención del cáncer de mama. *Revista internacional de ciencias biológicas* . 13 (11): pág. 1387.
60. Gold E.B., (2011). El momento de la edad en que ocurre la menopausia natural. *Clínicas de Obstetricia y Ginecología* .38 (3): pág. 425.
61. Hinyard L., Wirth LS, Clancy JM, Schwartz T. (2017). El efecto del estado civil en los resultados relacionados con el cáncer de mama en mujeres menores de 65 años: un análisis de la base de datos SEER. *mama* 23 :13–17. doi: 10.1016/j.mama.2016.12.008.
62. Dey S., Boffetta P., Mathews A., Brennan P., Soliman A., Mathew A. (2009). Factores de riesgo según el estado del receptor de estrógeno de pacientes con cáncer de mama en Trivandrum, sur de la India. *Revista internacional de cáncer* .125.
63. Cantado H., Ferlay J., Siegel RL, et al. (2021). Estadísticas mundiales de cáncer 2020: estimaciones de GLOBOCAN de incidencia y mortalidad en todo el mundo para 36 cánceres en 185 países. *CA: una revista de cáncer para médicos* . 71 (3):209–249.
64. Instituto Nacional del Cancer (NCI), (2022). recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/deteccion-seno-pdq>.
65. IMSS, (2015). Instituto Mexicano del Seguro Social. <http://www.imms.gob.mx/sapud-en-linea-cancer-mama>
66. INFOCANCER, (2023). SECRETARIA DE SALUD. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA. <http://infocancer.org.mx/efectos-secundarios-del-tratamiento-con463i0html>
67. NIH, (2019). National Cancer Institute. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>

68. Torres G, Marie F, Ortega C, Magaña L, Uscanga SR, Lazcano E, (2011).  
Detección temprana y manejo integral del cáncer de mama: manual para  
personal de medicina y enfermería en el primer nivel de atención, México:  
Instituto Nacional de Salud Pública 116p.

## **Apéndice**

### **Medio de cultivo**

RPMI-1640 (GIBCO, USA) 10.42 g

NaHCO<sub>3</sub> (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 ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

#### **Desactivación del suero**

Una botella de suero de neonato de ternera (NCS) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml. para su mejor uso y manipulación. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

### **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 1L de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 µm, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

Cloruro de sodio (SIGMA, USA) 8.00 g

Cloruro de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA) 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

### **Verseno**

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

EDTA (SIGMA, USA) 0.4 g

NaCl (SIGMA, USA) 8 g

KCl (SIGMA, USA) 0.4 g

Tris (SIGMA, USA) 3.04 g

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

### **Solución Tripsina**

Ésta solución se empleó para despegar las células MDA-MB-231 y 4T1, es preparada al 0.05% en Verseno.



### **Solución cristal violeta (0.1%)**

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

NaOH (SIGMA, USA) 3.96 g

Ácido Fórmico (SIGMA, USA) 4.28 ml

Cristal violeta (SIGMA, USA) 1g

### **Colorante Cristal Violeta**

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

### **Glutaraldehído**

A 157mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 99.843 ml de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4 °C.

### **Solución de ácido acético (10 %)**

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

bidestilada.

### **Paraformaldehído (2%)**

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