



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA

“Evaluación de la actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis del derivado diosgenínico: β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH), en cultivos de líneas celulares tumorales.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ANDREA LORENA ACOSTA RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **ACOSTA RODRÍGUEZ ANDREA LORENA**, con número de cuenta **309007476**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **04 de octubre de 2016** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE Biól. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de la actividad antiproliferativa, citotóxica e inductora de apoptosis del derivado diosgenínico: β -D Maltopiranosido de (25R)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH), en cultivos de líneas celulares tumorales.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, a 01 de agosto de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO BO
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo se llevó a cabo con apoyo de los proyectos PAPIIT IN220916, IN222114 y CONACyT 255881, 253979 y 2015-01-331 |, dentro de las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, bajo la dirección del M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre Roberto

A mis padres Consuelo y Eduardo por hacer de mi lo que soy ahora gracias a sus enseñanzas. Brindándome su apoyo y motivación necesaria para alcanzar mis metas.

A mi hermana por siempre ser mi apoyo incondicional, mi mejor amiga, mi ejemplo a seguir, por todos los momentos en los que me escuchas dándome la fuerza para seguir adelante y sobre todo por nunca dejarme sola.

A mi familia porque a pesar de la distancia siempre están al pendiente y me motivan a lograr lo que me proponga.

A mis amigos Alan, Ale, Brian, Ceci, Chapo, Chucho, Devi, Erick, Güemez, Iván, Karen, León, María José, Marlen, Mau, Mayén, Nati, Omar, Omar, Paola, Polet, Thelma y Ulises por tantos momentos, risas, fiestas, viajes, por su apoyo a lo largo de la carrera y sobre todo enseñarme que los amigos se convierten en hermanos.

A mi equipo de laboratorio: Ana por su gran amistad y estar conmigo en los momentos difíciles siempre con una sonrisa, Edson por su amistad, paciencia y compartir sus conocimientos, Emmanuel y Edgar por su compañía y amistad.

A Julio por compartir tantos momentos juntos.

A Mateo (QEPD) por su amistad y tantas risas.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por aceptarme en su equipo de laboratorio brindándome todo su apoyo, orientación, paciencia y sobre todo siempre con una excelente actitud.

Al. M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez por sus enseñanzas, paciencia, anécdotas y consejos.

Al Dr. Hugo López Muñoz por compartir sus conocimientos y asesoría en el laboratorio, así como el apoyo en resolver mis dudas.

A los miembros del jurado:

- **Dra. María de Lourdes Mora García**
- **M. en C. Luis Sánchez Sánchez**
- **Dr. Hugo López Muñoz**
- **M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez**
- **Biól. Reynalda Roldán Pérez**

Por apoyarme con sus aportaciones y observaciones permitiéndome concluir el presente trabajo satisfactoriamente.

ÍNDICE

RESUMEN.....	- 1 -
INTRODUCCIÓN	- 2 -
MARCO TEÓRICO	- 4 -
LA CÉLULA.....	- 4 -
CICLO CELULAR.....	- 4 -
MUERTE CELULAR	- 8 -
NECROSIS.....	- 8 -
APOPTOSIS “Muerte celular programada”	- 9 -
CASPASAS	- 10 -
EL CÁNCER.....	- 12 -
CÁNCER DE MAMA.....	- 13 -
CÁNCER CERVICOUTERINO	- 20 -
CÁNCER DE PULMON	- 25 -
ESTEROIDES Y CANCER.....	- 29 -
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	- 32 -
JUSTIFICACIÓN	- 33 -
HIPÓTESIS	- 34 -
OBJETIVO GENERAL	- 35 -
OBJETIVOS PARTICULARES.....	- 35 -
MATERIAL Y MÉTODO	- 36 -
RESULTADOS.....	- 42 -
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	- 58 -
CONCLUSIONES	- 61 -
PERSPECTIVAS	- 62 -
APÉNDICE	- 63 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 66 -

RESUMEN

En la actualidad el cáncer se encuentra entre las tres primeras causas de muerte a nivel mundial (INEGI, 2015). Para tratar esta enfermedad se utilizan tratamientos como quimioterapia y radioterapia, los cuales se sabe no presentan selectividad en cuanto a las células normales y tumorales, afectando seriamente la vida del paciente ya que en la etapa avanzada de la enfermedad son ineficientes. Por ello, se ha generado la necesidad de implementar nuevas terapias, especialmente aquellas que están basadas en compuestos de origen natural, con actividad antiproliferativa, de baja o nula actividad necrótica y de acción selectiva. Al respecto, las saponinas esteroidales han causado un fuerte interés debido a sus diversas actividades biológicas, incluyendo su actividad antitumoral. Por ello, en este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa y necrótica del compuesto diosgenínico β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH), en líneas tumorales de cáncer de mama (MDA-MB-231), cervicouterino (CaSki) y pulmón (Sk-LU-1). Los resultados obtenidos indicaron que esta saponina diosgenínica afecta el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, con una CI₅₀ de 36 μ g/ml en CaSki, 52 μ g/ml en Sk-LU-1 y 78 μ g/ml en MDA-MB-231. La nula o baja liberación de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de los cultivos celulares indica que el MD-OH no induce una muerte necrótica en las líneas tumorales. La observación de células con características morfológicas apoptóticas en los cultivos tratados y la detección de la Caspasa 3 activa, sugiere que el MD-OH induce a las células tumorales a una muerte apoptótica. Con respecto al efecto antiproliferativo y necrótico del MD-OH en células no tumorales (linfocitos humanos de sangre periférica), los resultados mostraron que el MD-OH afecta un porcentaje la proliferación de estas células, sin embargo, no lleva a los linfocitos a una muerte necrótica, por lo que se puede deducir que este compuesto presenta una acción antiproliferativa de acción selectiva, de baja o nula actividad necrótica, haciendo a este compuesto un digno candidato para ser estudiado en modelos *in vivo* y ser considerado un agente con potencial terapéutico.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las principales causas de muerte de la población femenina en México se encuentra el cáncer de mama y el de cérvix con 5 997 y 4 076 defunciones respectivamente, así como para la masculina el cáncer de pulmón causando 4 276 defunciones (INEGI, 2016).

El cáncer de mama es detectado por la aparición de pequeñas protuberancias en el seno, cambios en la textura de la piel, secreción, retracción del pezón y fruncimiento, este padecimiento debe de ser tratado de inmediato, ya que, si se ignoran estas señales, las células tumorales emigran a otros órganos, lo que se conoce como metástasis, ocasionando que los factores de riesgo como son los hereditarios o el estilo de vida favorezcan y se aceleren en el desarrollo del cáncer. Con respecto al cáncer cervicouterino, la mayoría de las veces es causado por el Virus del Papiloma Humano (VPH), un virus de transmisión sexual. Los principales indicadores de esta enfermedad son: sangrado vaginal anormal después de una relación sexual, flujo constante con olor fétido, periodos menstruales irregulares, entre otros. Este padecimiento es diagnosticado con la prueba de citología de Papanicolaou. Por su parte el cáncer de pulmón comienza con las células epiteliales que recubren los bronquios y sus síntomas abarcan tos persistente, esputo con sangre, dolor en el pecho, cambios en la voz, neumonía recurrente o bronquitis. Sus métodos de detección más comunes son los rayos X del pecho, broncoscopia y citología del esputo.

Para tratar estos padecimientos existen los tratamientos como la cirugía, la radiación y la quimioterapia, considerando a esta última eficaz en tumores tempranos y únicos, sin embargo, en pacientes terminales la quimioterapia resulta ser ineficiente, con efectos colaterales graves, fuertemente relacionados con su actividad necrótica, además de ser poco selectivos, generando la necesidad de desarrollar tratamientos alternos. Actualmente existe un fuerte interés por la búsqueda de compuestos de origen natural, de baja o nula actividad necrótica, inductores de muerte apoptótica y de acción selectiva. Al respecto, las

saponinas esteroideas han generado fuerte interés debido a su amplia actividad biológica, destacando su actividad antitumoral. Por ello, en el presente trabajo se determinó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del compuesto β -D Maltopiranosido de (25R)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH), derivado de la diosgenina; sapogenina esteroideal extraída de *Dioscorea composita*, conocida como barbasco. Actualmente se sabe que la diosgenina tiene actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares; como HeLa (cáncer cervicouterino), HEL y K562 (eritroleucemia); osteosarcoma 1547, hepatocarcinoma HepG2, C3A y HUH-7, cáncer de mama MCF-7 y otras. De igual manera se ha descrito que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo (Fernández, 2010).

MARCO TEÓRICO

LA CÉLULA

La célula es la unidad básica de la vida. Para su supervivencia, cada célula debe mantener unas condiciones internas que permitan el desarrollo de sus reacciones bioquímicas esenciales, a pesar de los cambios extracelulares. Por lo tanto, todas las células se caracterizan por la presencia de una membrana plasmática con permeabilidad selectiva que rodea una solución acuosa con gran concentración de elementos químicos (Manson *et al.*, 2003).

Las células regulan su medio interno, lo que les permite crecer, proliferar, dividirse y morir; los mecanismos de muerte pueden ser: necrosis o apoptosis y el mecanismo que les permite replicarse y dividirse es el ciclo celular; en el cual la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide (Alberts *et al.*, 2002).

CICLO CELULAR

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada (Lomanto *et al.*, 2003).

El ciclo celular se divide en varias fases: la interfase y mitosis. La interfase es donde se produce la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el crecimiento celular. La replicación de ADN nuclear sucede durante la fase de síntesis (fase S) de la interfase. El intervalo entre la fase M y S se conoce como G1 (gap 1), y el intervalo entre la fase S y M

como G2 (gap 2). Las fases G1 y G2 permiten el tiempo suficiente no sólo para el crecimiento celular sino también para asegurar un control correcto del desarrollo del ciclo celular, así como verificar la integridad del ADN que se incorpora antes de la división final de la célula (Fig.1) (Baynes y Dominiczak., 2008).

La fase G1 que sigue a la citocinesis y precede a la fase S es un período de actividad bioquímica intensa. La célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número; en consecuencia, la célula aumenta en tamaño. Las estructuras membranosas como el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas se derivan del retículo endoplásmico, el cual se renueva y aumenta de tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos. También hay replicación de mitocondrias y cloroplastos previamente existentes. (Lomanto *et al.*, 2003).

Fase S: La replicación del ADN comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado y se tiene el ATP necesario. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis debe generarse dos juegos o complementos de ADN idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. Durante la interfase el ADN asociado a las histonas constituye la cromatina, que se encuentra desenrollada en largas y delicadas hebras. EL ADN es una doble hélice que durante la replicación se abre y cada cadena es utilizada como molde para producción de una nueva doble cadena, que queda unida a la original y que sirve como guía. Por esta razón, la replicación del ADN se denomina conservativa. Estas dos dobles cadenas de ADN quedan unidas por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de cromátidas hermanas. El proceso clave de la replicación del ADN ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, momento en el cual las histonas y otras proteínas asociadas al ADN son sintetizadas (Lomanto *et al.*, 2003) (Karp, 2006).

Fase G2: En esta fase ocurre la preparación para la mitosis en la cual se producirá repartición equitativa del material genético; todos los organelos y la maquinaria necesaria esencial para la división de la célula progenitora en dos células hijas idénticas en contenido, aunque de menor tamaño, se adquieren en esta etapa. Durante este periodo la célula empieza a

ensamblar las estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto completo y equitativo de cromosomas a cada célula hija, lo cual se desarrollará durante la mitosis (Karp, 2006).

Mitosis denominada fase M, tiene una duración menor a una hora y está subdividida en varias fases. Aquí es donde los cromosomas duplicados se condensan, la membrana nuclear se desintegra y los cromosomas se segregan en cantidades equivalentes mediante estructuras de tubulina (huso mitótico). Posteriormente, el huso mitótico se desensambla y se forman dos núcleos con sus respectivos cromosomas. Finalmente, inicia la citocinesis o división celular para formar dos células hijas con la misma información genética (Alberts *et al.*, 2002).

Si al término de la fase M la célula no recibe los estímulos adecuados para iniciar el proceso de replicación y seguir a la fase G1, esta puede pasar a G0.

El estado G0 difiere de todos los estados que experimenta el ciclo celular. La ausencia de factores de crecimiento apropiados lleva a las células a una especie de latencia en el ciclo celular, en el cual el sistema de control no avanza a través de G1; ya sea porque es incapaz o porque no lo necesita; además, si se suprimen los nutrientes a la célula no podría proseguir con el ciclo (Lomanto *et al.*, 2003).

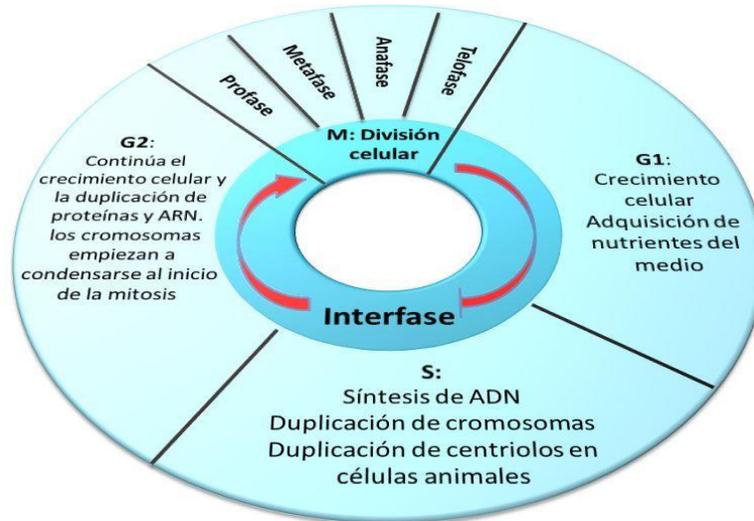


FIGURA 1. ETAPAS DE CICLO CELULAR. Tomada de <http://ciencias-naturales-para-septimo.webnode.es/lacelula/division-celular/>

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en los complejos proteicos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina) (Baynes y Dominiczak., 2008).

Las cinasas dependientes de ciclinas dirigen la transición de las células, de una fase a la siguiente. Estas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas de serina/treonina y por medio de fosforilaciones activan secuencialmente la maquinaria del ciclo celular. Existen diferentes tipos de CDK (CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 principalmente) aunque las concentraciones cambian a lo largo del ciclo, la actividad cinasa de cada una, se inicia en eventos particulares de cada fase (Ortega *et al.*, 2002).

En su estado monomérico las CDK son inactivas. Su principal forma de activación es la unión a subunidades reguladoras, llamadas ciclinas (ciclinas D, ciclina E, ciclina A y ciclina B). Las ciclinas D son sintetizadas en la fase G1. La ciclina E se sintetiza al final de la fase G1 alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase G1 a fase S y se degrada durante la fase S. La ciclina A se sintetiza al inicio de la fase S, alcanza su máxima expresión durante la

transición de la fase S a G2 y se degrada en la fase M (Alberts *et al.*, 2002). El daño irreparable de los componentes celulares como el ADN da como consecuencia que la célula active el mecanismo de muerte celular programada.

MUERTE CELULAR

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación (Lizarbe, 2007).

En los seres humanos, como en todos los demás organismos multicelulares, los ritmos de proliferación celular y muerte celular determinan la producción neta de células (Ross, 2007).

La muerte celular puede ser el producto de una lesión accidental o de mecanismos que causen la autodestrucción de las células (Ross, 2007). La necrosis y apoptosis son dos de las principales causas de muerte celular más estudiadas actualmente.

NECROSIS

La necrosis se ha definido como la serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria (Ramírez *et al.*, 2010). El proceso de necrosis es desencadenado por toxinas, hipoxia, severa agresión masiva y cualquier otra condición que genere la caída de ATP, esto crea cambios que, histológicamente, están representados por desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación de retículo endoplásmico y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana

citoplasmática. El ADN es partido en fragmentos irregulares al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es volcado al espacio extracelular, produciéndose la atracción de células inmunes en el área, lo que genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitos inmigrantes (Fig.2) (Elena, 2002).

APOPTOSIS “Muerte celular programada”

En 1972 se descubrió el proceso de apoptosis, siendo desencadenado por condiciones fisiológicas o patológicas sin pérdida de niveles de ATP, debido a que requiere energía para su realización. Existen dos vías principales que pueden llevar a la apoptosis: inducción positiva o externa por un ligando unido a los receptores específicos de la membrana plasmática y la inducción negativa o interna que ocurre por pérdida de la actividad supresora de mecanismos intracelulares. La inducción positiva involucra ligandos que por una porción intracelular del receptor transmiten al interior una señal; esa porción intracelular es llamada dominio de muerte. La inducción negativa se produce por la pérdida de la actividad supresora a cargo de una familia de proteínas específicas que se hallan relacionadas con la mitocondria, liberándose desde la misma Citocromo C que dispara la actividad de las proteasas, enzimas encargadas de ejecutar la apoptosis (Elena, 2002).

Histológicamente la apoptosis se caracteriza por la condensación o encogimiento de los componentes del citoplasma, con grandes brotes en la membrana celular y condensación de la cromatina que llevan a la formación de cuerpos apoptóticos. Este fenómeno se produce en células aisladas dentro de un tejido. El ADN es fragmentado en trozos de 185 pares de bases o múltiplos, mientras que la membrana celular permanece intacta. Luego el cuerpo apoptótico es fagocitado por células vecinas sin generar un proceso inflamatorio, ya que no se vuelca contenido intracelular al espacio extracelular (Fig.2) (Elena, 2002).

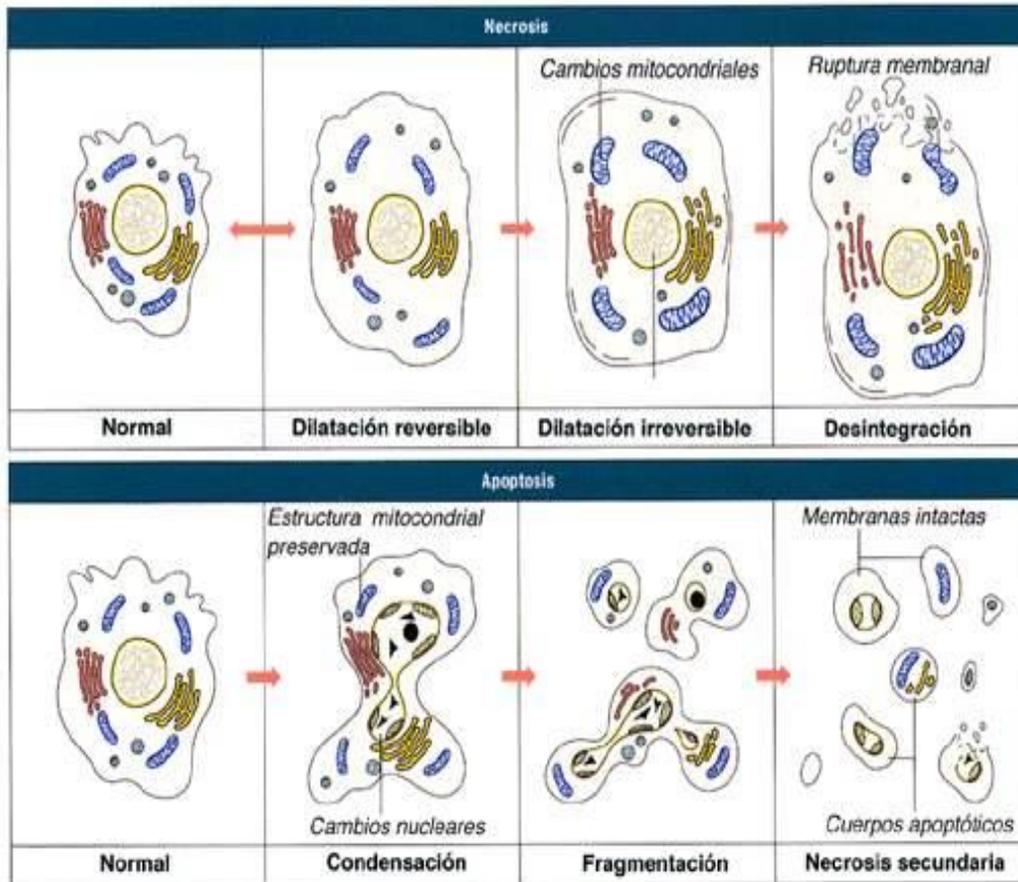


FIGURA 2. DIFERENCIAS MORFOLOGICAS ENTRE APOPTOSIS Y NECROSIS. Tomada de <http://retina.umh.es/docencia/confsvivos/temas/apoptosis/apoptosis.html>

CASPASAS

Las caspasas son proteasas dependientes de tioles (residuos de cisteína), caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas en la vecindad de residuos aspárticos. Su especificidad catalítica ha originado el término “Caspasa” en el que la “c” representa al residuo cisteína de la enzima y “aspasa” representa residuos aspárticos de la proteína sustrato (Dubin *et al.*, 2000).

Hay dos clases de caspasas, unas que rompen y activan exclusivamente otras caspasas (caspasas iniciadoras: 8,9 y 10) y otras que fracturan otras proteínas (caspasas efectoras: 3,

6 y 7) (Taleisnik, 2006). De estas últimas, la caspasa más prevalente en la célula es la caspasa 3, la cual es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con la caspasa 6 y 7. Éstas son, en último término, las que degradan una amplia gama de sustratos durante la apoptosis (Lizarbe, 2007).

La familia de enzimas implicadas en la apoptosis encierra dos aspectos, son cisteína proteasas y son específicas para escindir después del residuo aspártico. La mayoría de las caspasas son sintetizadas como precursores (procaspasas) encontrándose en las células en un estado inactivo llamada zimógeno. Para que el zimógeno pase a la forma de una enzima activa una parte del polipéptido debe ser removido por proteólisis. Una vez activada la caspasa iniciadora procesa y activa una o más caspasas en dirección descendente de la cadena de eventos (caspasas efectoras) que a su vez fracturan varias proteínas celulares conduciendo a la apoptosis (Taleisnik, 2006).

La activación de las caspasas que llevan apoptosis está determinada por una cascada de eventos sometidos a la regulación por proteínas pro- y antiapoptóticas que actúan a diversos niveles de las vías de señalización. Las cascadas activadoras de las caspasas que regulan la apoptosis pueden iniciarse desde receptores de superficie o ser inducidas por alteraciones de la integridad mitocondrial (Alfaro, 2000).

Las señales que desencadenan la apoptosis son captadas por receptores de la membrana plasmática. Son receptores de transmembrana que tiene una porción extracelular, que consiste en tres a seis dominios ricos en cisteína, una parte media que atraviesa la membrana plasmática, y una parte intracelular, dominio citoplasmático, que contiene una secuencia llamada dominio de muerte (DD), de ahí que reciban la denominación de receptores de muerte (Martínez, 2009).

Estos receptores pertenecen por su estructura a las familias TNF (tumor necrosis factor) y NGF (nerve growth factor). Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95, también llamado Fas o Apo1 y TNFR1, también llamado p55 o CD120a (Taleisnik, 2006).

Se sabe que la activación y ejecución de las caspasas es un paso fundamental para la apoptosis. Cuando hay un mal funcionamiento de la apoptosis se beneficia la aparición de diversas enfermedades entre ellas el cáncer.

EL CÁNCER

El cuerpo está compuesto por millones de células vivas. Las células normales del cuerpo crecen, se dividen en nuevas células y mueren de manera ordenada. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido al crecimiento sin control de las células anormales (Manson *et al.*, 2003).

El cáncer se desarrolla debido a una acumulación de mutaciones. La mayoría de los agentes identificados que se sabe que contribuyen a la etiología del cáncer, como por ejemplo la radiación ionizante y casi todas las sustancias químicas carcinógenas, producen mutaciones: esto significa que ocasiona cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN (Alberts *et al.*, 2002).

Las células tumorales presentan características que las distinguen de las normales: se reproducen de manera descontrolada, son capaces de invadir y colonizar tejidos, además de órganos distantes en lugares en donde normalmente no pueden crecer, proceso al que se le llama metástasis (Alberts *et al.*, 2002).

Muchos tipos diferentes de genes son cruciales para el desarrollo del cáncer; por lo tanto, se han utilizado varias estrategias para determinar cuáles son estos genes (Alberts *et al.*, 2002).

En algunos casos las mutaciones peligrosas son las que determinan que los genes afectados se activen en forma excesiva. Estas mutaciones ejercen un efecto dominante, se necesita una sola copia mutada del gen para producir problemas, y el gen mutante se denomina oncogén; por ende, la forma normal del gen se denomina protooncogén (Alberts *et al.*, 2002).

Las células cancerosas tienen una capacidad disminuida para responder a los estímulos que desencadenan la apoptosis. La mayoría de las células normales desarrollan una dependencia de factores ambientales específicos para mantener su viabilidad, por su parte las células tumorales desarrollan cierto grado de independencia de estos factores ambientales, aparentemente son inmortales en el sentido de que continúan dividiéndose de manera indefinida mientras las condiciones de nutrientes y de cultivo sean adecuadas para su sobrevivencia (Karp, 2006).

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo de célula a partir del cual se originan (Alberts *et al.*, 2002). En el primer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. El segundo grupo lo forman los sarcomas, los que proceden del tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo (Pardo, 1998). El tercer grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que revisten las cavidades y órganos, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas de estructura parecida a la piel se denominan como carcinomas de células escamosas, los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas; los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes como el cáncer cervicouterino (CaCu) (Pardo, 1998).

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células del seno, ésta es una enfermedad que tiene mayor incidencia en mujeres; actualmente ocupa la primera causa de muerte en México por cáncer (INEGI, 2016).

El seno femenino consiste principalmente en lobulillos (glándulas productoras de leche), conductos (tubos diminutos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón) y estroma

(tejido adiposo y tejido conectivo que rodean los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos). (Fig. 3)

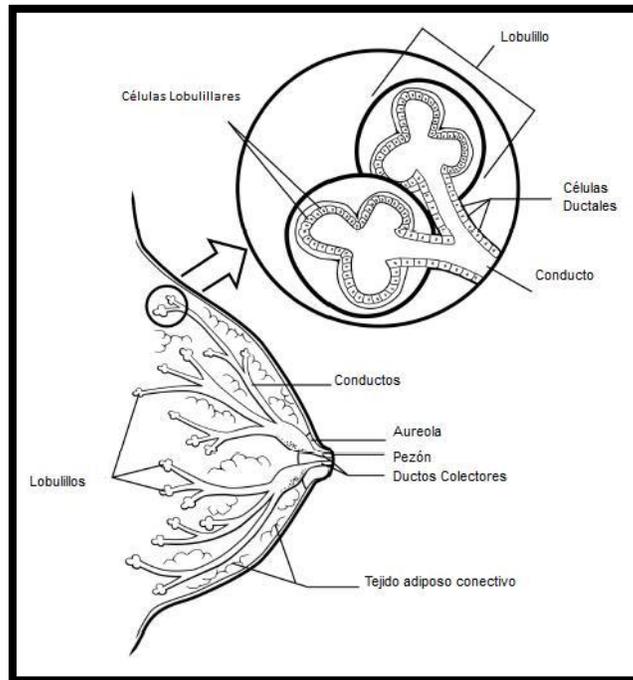


FIGURA 3. ANATOMÍA DEL SENO FEMENINO Tomada de <https://biotaetscientia.wordpress.com/tag/cancer/>

La mayoría de los cánceres de seno comienza en las células que recubren los conductos (cánceres ductales). Algunos cánceres de seno se originan en las células que recubren los lobulillos (cánceres lobulillares), mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos.

La mayoría de protuberancias o masas en el seno no son cancerosas, sino benignas (American Cancer Society, 2014).

Existen factores de riesgo que nos indican la posibilidad de padecer cáncer de mama como son los genéticos, el simple hecho de ser mujer y el envejecimiento, ya que en la mayoría este padecimiento ataca a mujeres de entre 30 y 55 años o más, terapias hormonales después de la menopausia, tener senos densos, consumo de bebidas alcohólicas, sobrepeso u obesidad, implantes de seno, entre otras.

No existe una manera segura de prevenir el cáncer de seno, pero existen algunas cosas que todas las mujeres pueden hacer que podrían reducir el riesgo, o en caso de que el cáncer suceda, podrían favorecer las probabilidades de detectar la enfermedad en sus etapas iniciales cuando es más tratable.

Existen varias medidas para detectar el cáncer en etapa oportuna como: pruebas genéticas, la quimioprevención, mastectomía preventiva, mamografías y realizar autoexamen periódicamente (American Cancer Society, 2014).

DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

❖ AUTOEXAMEN

La mujer debe conocer el aspecto natural de sus senos, mediante la observación y la palpación como se muestra en la Fig. 4, y notificar a su médico cualquier cambio nuevo relacionado con sus senos tan pronto sea encontrado.



FIGURA 4. EXAMEN DE AUTOEXPLORACIÓN PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE CÁNCER DE MAMA. TOMADA DE:

<http://mediaccess.mx/2012/10/>

❖ MAMOGRAMAS

Es una radiografía utilizada para diagnosticar alguna enfermedad del seno en mujeres que presentan síntomas. Un mamograma no puede demostrar que un área anormal es cáncer. Para confirmar si hay presencia de cáncer, se debe extraer una cantidad pequeña de tejido y examinarse con un microscopio (American Cancer Society, 2014).

❖ RESONANCIA MAGNÉTICA

Las imágenes por resonancia magnética (MRI) utilizan ondas de radio e imanes potentes en lugar de rayos X. Se absorbe la energía de las ondas radiales y luego se libera en un patrón formado por el tipo de tejido corporal y por ciertas enfermedades. Una computadora traduce el patrón en una imagen muy detallada de las partes del cuerpo. Para realizar una MRI del seno con el fin de detectar cáncer, se inyecta un líquido de contraste, llamado gadolinio, en una vena antes o durante el estudio para mostrar mejor los detalles.

❖ ECOGRAFIA (ULTRASONIDO DE LOS SENOS)

También conocida como sonografía o ultrasonido, utiliza ondas sonoras para delinear una parte del cuerpo. En esta prueba, se coloca un pequeño instrumento llamado transductor en la piel antes lubricado. Un transductor emite las ondas sonoras y detecta los ecos a medida que rebotan de los tejidos del cuerpo. Una computadora convierte los ecos en una imagen en blanco y negro que aparece en una pantalla. Este estudio no causa dolor ni expone a radiación.

❖ DUCTOGRAMA O GALACTOGRAMA.

A veces es útil para determinar la causa de la secreción del pezón. En esta prueba, se introduce un tubo plástico muy delgado en la abertura de un conducto del pezón por donde sale la secreción. Se inyecta una pequeña cantidad de medio de contraste, que delinea la forma del conducto en una imagen de radiografía y muestra si hay una masa en el interior del conducto.

❖ EXAMEN DE SECRECIÓN DEL PEZÓN

Si se presenta secreción en el pezón, se puede coleccionar una muestra del líquido y observarlo con un microscopio para ver si contiene células cancerosas. En general, si la secreción luce lechosa o de color verdoso claro es muy poco probable que se trate de cáncer. Si la secreción es roja o café rojizo, lo cual sugiere que contiene sangre, es probable que pudiera tratarse de un cáncer, aunque es más probable que se trate de una lesión, infección o tumor benigno.

❖ BIOPSIA

Se realiza cuando se encuentra en mamogramas, pruebas por imágenes o examen físico, una anomalía en un seno que pudiera ser cáncer. La biopsia es la única manera de indicar la presencia real de un cáncer. Durante una biopsia, se extrae una porción pequeña de tejido del área sospechosa para que sea examinada con un microscopio.

Para detectar en qué etapa se encuentra esta patología se considera la extensión del cáncer en el cuerpo, basándose si es invasivo o no, el tamaño del tumor, cuantos ganglios linfáticos están infectados y si está presente el proceso de metástasis (American Cancer Society, 2014).

Los tipos principales de tratamiento para el cáncer de seno son:

- TERAPIA HORMONAL

Se trata de un tratamiento contra el cáncer por el que se extraen las hormonas o se bloquea su acción, y se impide el crecimiento de las células cancerosas. Las hormonas son sustancias elaboradas por las glándulas del cuerpo que circulan por la corriente sanguínea. Algunas hormonas pueden hacer crecer ciertos cánceres. Si las pruebas muestran que las células cancerosas ofrecen sitios donde pueden adherirse las hormonas (receptores) se utilizan medicamentos, cirugía o radioterapia para reducir la producción de hormonas o impedir que funcionen. La hormona estrógeno, que hace crecer algunos cánceres de mama, es

elaborada en su mayor parte por los ovarios. El tratamiento para impedir que los ovarios elaboren estrógeno se llama ablación ovárica. La terapia hormonal con tamoxifeno a menudo se suministra a pacientes con estadios tempranos de cáncer de mama y a pacientes con cáncer metastático de mama (cáncer que se ha diseminado hasta otras partes del cuerpo). La terapia hormonal con tamoxifeno o estrógenos puede actuar sobre las células de todo el cuerpo y puede aumentar la posibilidad de padecer cáncer del endometrio. Las mujeres que toman tamoxifeno deben someterse a un examen pélvico todos los años para verificar si hay signos de cáncer. Todo sangrado vaginal que no sea sangrado menstrual debe comunicarse a un médico tan pronto como sea posible.

- CIRUGÍA

La mayoría de los pacientes con cáncer de mama se someten a cirugía a fin de extirpar el cáncer de la mama. Generalmente se extirpan algunos de los ganglios linfáticos de abajo del brazo y se observan bajo un microscopio para verificar si contienen células cancerosas. Cirugía conservadora de la mama, una operación para extirpar el cáncer, pero no la mama misma. Incluye los siguientes procedimientos:

- Lumpectomía: cirugía para extirpar el tumor (masa) y una pequeña cantidad de tejido normal alrededor del mismo.
- Mastectomía parcial: cirugía para extirpar la parte de la mama que tiene cáncer y algo del tejido normal que la rodea. Este procedimiento también se llama mastectomía segmentaria.

Los efectos secundarios de estas operaciones pueden incluir dolor, inflamación temporal, sensibilidad y tejido cicatricial rígido que se forma en el área de la cirugía.

- RADIOTERAPIA

Tratamiento para el cáncer en el que se usan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que proliferen. La radiación de seno a

menudo se administra después de la cirugía de conservación de seno para ayudar a reducir la probabilidad de que el cáncer regrese en el seno o en los ganglios adyacentes.

Hay dos tipos de radioterapia. La radioterapia externa usa una máquina fuera del cuerpo que envía radiación al área donde se encuentra el cáncer. La radioterapia interna usa una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, alambres o catéteres que se colocan directamente dentro del tumor o cerca del mismo. La forma en que se administra la radioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado.

- QUIMIOTERAPIA

Es un tratamiento del cáncer en el que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Cuando la quimioterapia se administra vía oral, intravenosa o intramuscular, los medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y afectan a células cancerosas de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en la columna vertebral, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administre la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando.

En la mayoría de los casos la quimioterapia es más eficaz cuando se usan combinaciones de más de un medicamento. Los medicamentos de quimioterapia que se emplean con más frecuencia contra el cáncer de seno en etapa inicial incluyen: Adriamycin®, Ellence®, Taxol®, Taxotere®. Estos se pueden ocupar en combinación con otros medicamentos tal como el Cytosan®.

Los medicamentos de quimioterapia funcionan al atacar a células que se están dividiendo rápidamente, es por eso que atacan a las células cancerosas, sin embargo, otras células del cuerpo, como las que se encuentran en la médula ósea, el revestimiento de la boca y los intestinos, así como los folículos pilosos, también se dividen rápidamente. Estas células

también son propensas a verse afectadas por la quimioterapia, lo cual ocasiona los efectos secundarios.

Los efectos secundarios dependen de la cantidad administrada así como la duración del tratamiento, algunos de los posibles efectos son los siguientes:

- ❖ Pérdida del cabello
- ❖ Úlceras en la boca
- ❖ Pérdida o aumento de apetito
- ❖ Náuseas y vómitos
- ❖ Puede afectar las células productoras de sangre de la médula ósea, aumentando la posibilidad de infecciones, tendencia a presentar moretones o sangrado y cansancio.

CÁNCER CERVICOUTERINO

El CaCu es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, acontece en 10% de todos los cánceres, es la tercera neoplasia diagnosticada. Cada año alrededor de 500,000 casos nuevos son diagnosticados en todo el mundo. Se estima que produce alrededor de 231,000 muertes por año, 80% de las cuales ocurren en países en vías de desarrollo (Chavaro *et al.*, 2009).

El cérvix normal como se muestra en la Figura 5, se compone de diferentes tipos de células epiteliales, el canal cervical medio y el cérvix superior están compuestos por epitelio columnar secretor, originado embriológicamente de la invaginación de los conductos müllerianos. Existe un pequeño potencial neoplásico para este tipo de células. La vagina y el ectocérvix están compuestos de epitelio escamoso, estas células escamosas reemplazan a las células columnares müllerianas originales cuando se forma el canal uterovaginal (Chavaro *et al.*, 2009).

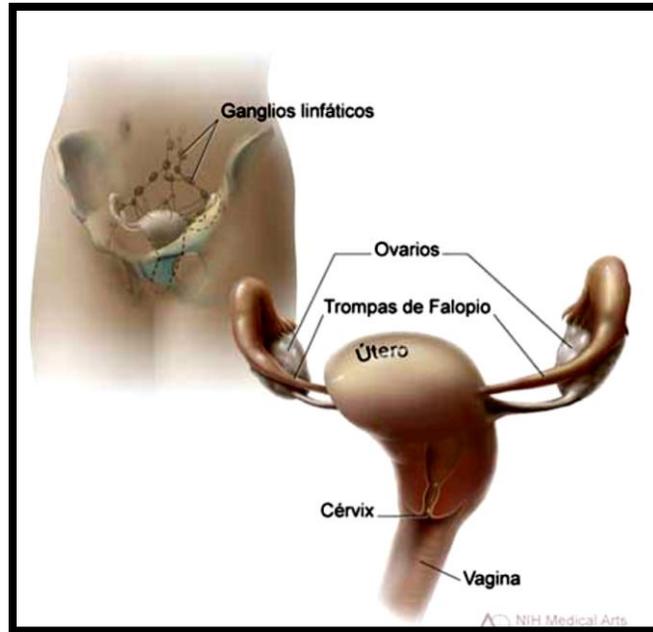


FIGURA 5. ESQUEMA ANATÓMICO QUE MUESTRA EL ÚTERO, EL CÉRVIX O CUELLO UTERINO DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA MUJER. (NATIONAL CÁNCER INSTITUTE, 2012)

Este tipo de cáncer, aparece en la unión del canal cervical y del ectocérvix, que es el sitio donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o más factores de riesgo, ya sean biológicos (mutaciones, virus, edad), socioculturales (escolaridad, hábitos de higiene), e incluso factores medioambientales a los que todos estamos expuestos. Las anomalías tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se diagnostican comúnmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad. Para que el NIC evolucione a CaCu invasor necesita de 8 a 20 años y en la mayoría de los casos se requiere de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren a la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos (Lazcano *et al.*, 1999) (American Cancer Society, 2014).

El factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % (Vázquez-Ortiz *et al.*, 2005) de los casos. Entre los VPH más incidentes se tienen principalmente a los tipos de 16 y 18 con un 50.8 % y 15.5 % respectivamente (Berumen-Campos, 2003). Los VPH han convivido con

la especie humana durante decenas de miles de años y sufren relativamente pocos cambios en su composición genética. Se ha identificado más de 100 tipos diferentes de VPH (Castellsagué, 2008). El VPH causa la producción de dos proteínas conocidas como E6 y E7, las cuales desactivan a algunos genes supresores de tumores. Esto podría permitir que las células que recubren el cuello uterino crezcan demasiado y desarrollen cambios en genes adicionales, lo que en algunos casos cause cáncer.

Los VPH, se han clasificado en virus de alto o bajo riesgo, de acuerdo a su potencial oncogénico que presentan para el desarrollo de lesiones cancerosas. Dentro de esta clasificación podemos encontrar ejemplos representativos de cada grupo en la siguiente tabla (Tabla 1) (Tjalma *et al.*, 2004).

Riesgo	Tipo de VPH
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Bajo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

TABLA 1. PRINCIPALES VPH DE ALTO Y BAJO RIESGO ONCOGÉNICO (Tjalma, et al, 2004)

La línea celular CaSki son células provenientes de carcinoma cervicouterino, establecidas a partir de células metastásicas en el mesenterio del intestino delgado, la línea es positiva a VPH 16 (ATCC, 2009).

El cáncer de cuello uterino en etapas tempranas es asintomático, los síntomas comienzan a presentarse cuando es invasivo y crece hacia el tejido adyacente. Cuando esto ocurre los síntomas más comunes son:

- ❖ Sangrado vaginal anormal, tal como sangrado después de una relación sexual, sangrado después de la menopausia o sangrado y manchado entre periodos menstruales.

-
- ❖ Secreción vaginal inusual (la secreción puede contener algo de sangre y se puede presentar entre periodos o después de la menopausia).
 - ❖ Dolor durante las relaciones sexuales.

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Una manera bien comprobada para la detección de cuello uterino consiste en realizarse la prueba de Papanicolaou y la prueba del virus del papiloma humano (VPH). Si se muestra algo extraño en estas pruebas es necesario realizar otras pruebas, para determinar si en realidad hay cáncer (American Cancer Society, 2014).

- **COLPOSCOPIA**

En esta prueba se coloca un espéculo en la vagina para ayudar al médico a observar el cuello uterino. El doctor usará el colposcopio para examinar el cuello uterino. Este instrumento que permanece fuera del cuerpo, tiene lentes de aumento como los binoculares. El colposcopio permite al doctor ver de cerca y claramente la superficie del cuello uterino. Esta prueba no causa efectos secundarios y se puede realizar incluso en el embarazo.

- **BIOPSIAS CERVICALES**

Se pueden realizar dos biopsias, una con ayuda de la colposcopia en la que se detecta el área anormal y la conización, se extrae del cuello uterino un fragmento de tejido en forma de cono. La base del cono está constituida por el exocérvix (la parte externa del cuello uterino), y la punta o ápice del cono está formada por el canal endocervical. El tejido que se extirpa en el cono incluye la zona de transformación (el límite entre el exocérvix y el endocérvix).

Los tres tratamientos principales del cáncer son: cirugía, radioterapia y quimioterapia y se aplican de forma separada o conjunta. Estas técnicas se usan para curar o prevenir que el tumor crezca y/o paliar los síntomas cuando la enfermedad está muy avanzada.

- CIRUGIA

La cirugía se usa para diagnosticar cáncer, determinar su estado y tratarlo. La biopsia es un tipo común de cirugía que ayuda en el diagnóstico. Consiste en tomar una muestra de tejido sospechoso de ser canceroso para que sea examinado por un especialista en un laboratorio.

- RADIOTERAPIA

La radioterapia usa ondas de alta energía para dañar o matar las células cancerosas y prevenir el crecimiento de éstas. Del mismo modo que la cirugía, la radioterapia es un tratamiento local para eliminar o erradicar tumores visibles.

Cuando se usa la radiación como tratamiento principal para el cáncer cervicouterino, la radioterapia externa usualmente se combina con quimioterapia. A menudo, se usa una dosis baja de un medicamento llamado cisplatino, aunque también se pueden usar otros medicamentos de quimioterapia. Los tratamientos de radiación se administran 5 días a la semana por 6 a 7 semanas.

Los efectos secundarios comunes de la radioterapia externa incluyen: cansancio, problemas estomacales, náuseas, vómitos y cambios en la piel.

- QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia hace referencia al uso de fármacos para matar a las células cancerosas. Puede ser administrada oralmente o intravenosa.

Los medicamentos que se utilizan con más frecuencia para tratar el cáncer de cuello uterino avanzado incluyen: Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel, Topotecán y Gemcitabina.

CÁNCER DE PULMON

Los dos pulmones, derecho e izquierdo, están situados en el tórax a ambos lados del mediastino y de los órganos que éste contiene. El volumen global del órgano no tiene mayor interés: el del pulmón derecho supera en un tercio a un sexto al del pulmón izquierdo. También se sabe que depende de la capacidad torácica y de la forma del tórax. Cada pulmón tiene la forma de un semicono con vértice superior y una base inferior.

Se pueden describir:

- Tres caras: costal, mediastínica y diafragmática
- Un vértice
- Dos bordes: anterior e inferior
- Una base o circunferencia, inferior.

Por último, cada pulmón está profundamente separado por las fisuras interlobulares, que lo dividen en partes desiguales, los lóbulos pulmonares. (Fig 6).

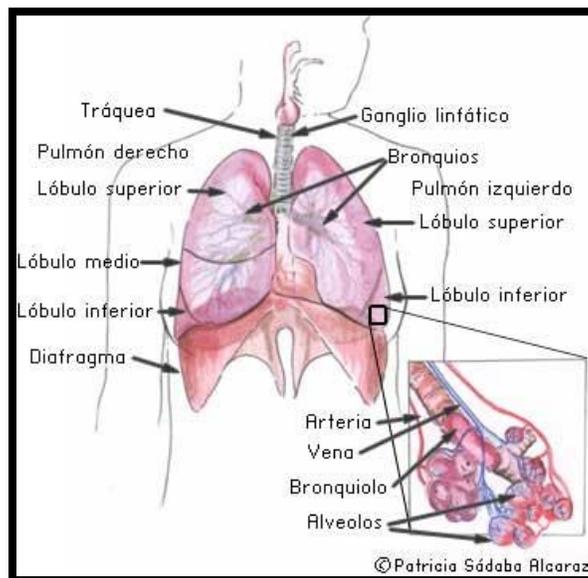


FIGURA 6. MORFOLOGÍA DE LOS PULMONES

El cáncer de pulmón comienza en las células que revisten los bronquios y en otras partes del pulmón, como los bronquiolos o los alvéolos.

Hay dos tipos principales de cáncer de pulmón:

- Cáncer de pulmón microcítico (células pequeñas)

Se denomina así por el tamaño de las células cancerosas cuando se observan con un microscopio; a menudo comienza en los bronquios, cerca del centro del tórax, suele crecer y propagarse rápidamente (American Cancer Society, 2014).

- Cáncer de pulmón no microcítico (células no pequeñas)
 - a) Carcinoma de células escamosas. - Estos cánceres comienzan en las versiones tempranas de las células escamosas, las cuales son células planas que cubren el interior de las vías respiratorias en los pulmones. A menudo están asociados con antecedentes de fumar y tienden a estar localizados en el centro de los pulmones, cerca del bronquio.
 - b) Adenocarcinoma.- Estos cánceres comienzan en las versiones tempranas de las células que normalmente segregarían sustancias, como moco. Por lo general, se encuentra en partes externas del pulmón, suele crecer más lentamente.
 - c) Carcinoma (indiferenciado) de células grandes.- Puede aparecer en cualquier parte del pulmón, y tiende a crecer y a propagarse rápidamente.

La sospecha de cáncer de pulmón surge habitualmente en una de las siguientes situaciones: una imagen sospechosa en la radiografía (Rx) de tórax realizada con motivo de determinados síntomas, o bien casualmente al realizar una Rx de tórax por otro motivo (American Cancer Society, 2014).

SÍNTOMAS

- Tos persistente
- Expectoraciones sanguinolentas
- Si el tumor está cerca de la pleura, podría ocasionar dolor en el pecho

A diferencia de los demás tipos de cáncer, en los que estos síntomas se retrasan, en las etapas tempranas del cáncer de pulmón el paciente puede experimentar fiebre, pérdida de peso y fatiga. Las localizaciones metastásicas más frecuentes del cáncer de pulmón son: glándulas adrenales, hueso, hígado, cerebro.

En México, el 7.2% de los pacientes con cáncer tienen tumores malignos en los pulmones, según estimaciones de Globocan. El cáncer de pulmón es el segundo más mortal para los hombres, con el 14% de las muertes por tumores malignos, después del de próstata, según el INEGI. (INEGI, 2016)

FACTORES DE RIESGO

Demográficos/Ambientales

- Edad Avanzada > 70 años
- Género masculino
- Tabaquismo: 90%
- Exposición ocupacional: 8%
- Contaminación: 2%

Biológicos

- Obesidad

Hereditarios

- Agregación familiar
- Síndromes alto riesgo: RB familiar (RB), Li-Fraumeumeni (p53)

La evidencia clínica de una lesión pulmonar sospechosa de cáncer conlleva a una evaluación multidisciplinaria de riesgo epidemiológico (edad, tabaquismo, exposición ocupacional, etc.) y radiológico (tamaño, forma, densidad, anormalidades asociadas) que lleva a tomar la decisión de la toma de biopsia o excisión de la lesión. Los estudios necesarios para determinar la estirpe histológica en tumores de localización periférica son:

-
- Broncoscopia con biopsia
 - Transbronquial
 - Lavado/cepillado bronquial
 - Toracoscopia con toma de biopsia/excisión
 - Toracotomía

En aquellas lesiones centrales se puede realizar la biopsia mediante broncoscopia. Actualmente, el 95% de los tumores pueden ser efectivamente diagnosticados y tipificados previos a la toracotomía.

TRATAMIENTO

El tratamiento quirúrgico, quimioterapia y radioterapia son las tres modalidades comúnmente usadas. (American Cancer Society, 2014)

- **TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

Las más frecuentemente usadas son la toracotomía lateral, idealmente conservadora de músculo, la posterolateral, la incisión transversal con esternotomía parcial en media concha de almeja, la cervicotorácica (para tumor de Pancoast) y la anterolateral. Resección anatómicas conservadoras son preferidas sobre neumonectomías.

- **QUIMIO-RADIOTERAPIA**

Los esquemas más usados en concomitancia previo a la cirugía son: Cisplatino + vinblastina. De manera secuencial también se puede administrar carbotaxol. En aquellos pacientes no candidatos a cisplatino se administra carbotaxol. En los pacientes con progresión de la enfermedad o metastásica la quimioterapia a base de platino prolonga la sobrevida (4-6 meses), mejora la sintomatología y provee una mejor calidad de vida contra aquellos que solo reciben medidas de soporte. Es importante el status funcional del paciente para la administración de cualquier y la histología tumoral. Cetuximab + Cisplatino/ vinorelvine es terapia de primera línea al igual que cetuximab (Vallejo, 2007).

ESTEROIDES Y CANCER

Debido a todos los efectos secundarios de los tratamientos que se tienen en contra del cáncer se ha tomado importancia por obtener compuestos naturales con los mismos beneficios, evitando o disminuyendo los efectos secundarios; es por esto que se toma cierto interés a los esteroides ya que se les han atribuido diferentes actividades biológicas, entre ellas la actividad antitumoral. (Schlaepfener *et al.*, 2010)

Los esteroides junto con los terpenoides son derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado perhidrociclopentanofenantreno, y son conocidos genéricamente como isoprenoides. Los esteroides no son verdaderos triterpenos, en el sentido de que su estructura no se apega al patrón C30; poseen esqueletos C27-C29 (o más pequeño), pero están correctamente clasificados dentro del grupo de los triterpenos verdaderos, ya que todos derivan del mismo precursor (Anaya, 2003).

Los derivados esteroideos se han manejado como agentes citotóxicos que mejoran la especificidad en el tratamiento del cáncer. El descubrimiento de estos nuevos agentes con propiedades anticancerígenas es en base a sustancias con estructura y citotoxicidad conocidas (Camoutsis *et al.*, 2005). Recientemente se ha encontrado que algunos compuestos esteroideos presentan actividad anticancerígena; sin embargo, aún no tienen el avance clínico necesario si se les compara con otros agentes de uso terapéutico.

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides, se encuentran las saponinas, que son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, poseen una compleja estructura anfifílica formada por un núcleo esterooidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. La especie humana ha aprendido a emplear en su provecho la amplia actividad biológica de las saponinas; además, muchas de ellas son muy utilizadas en síntesis para la obtención de compuestos de origen natural (Hostettmann *et al.*, 1995).

De la hidrólisis enzimática o química de las saponinas, se obtienen sapogeninas esteroidales, las cuales poseen 27 átomos de carbono y además del núcleo esteroideal presentan dos anillos más: los anillos E (tetrahydrofuránico) y F (tetrahidropiránico) (Tobari *et al.*, 2000).

Sin duda la más útil de todas las sapogeninas esteroides es la diosgenina (Anaya, 2003). La diosgenina fue aislada por primera vez en 1936 por Takeo Tsukamoto, a partir de *Dioscorea tokoro*. En la década de los cuarentas, Russell Marker encontró en México que la *Dioscorea composita*, conocida como barbasco, contiene de 7 a 9% de diosgenina; la diosgenina se ha utilizado también como material de partida para la obtención de diversos compuestos esteroidales de interés en síntesis parcial. Recientemente, se encontró que posee actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares; como HeLa (cáncer cervicouterino), HEL y K562 (eritroleucemia); osteosarcoma 1547, HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (cáncer de mama) y otras. Se determinó también que en ciertos casos es inductora de apoptosis y que actúa como agente quimiopreventivo. Debido a ello, se abrió un nuevo campo de estudio en el ámbito de las sapogeninas (Fernández, 2010).

Con el propósito de incrementar la actividad anticancerígena, algunos grupos de investigación sintetizaron análogos y derivados de la diosgenina efectuando modificaciones en la parte hidrofílica de la molécula (Fernández, 2010); entre los cuales destaca la síntesis del β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH), derivado de la diosgenina que se muestra en la figura 7.

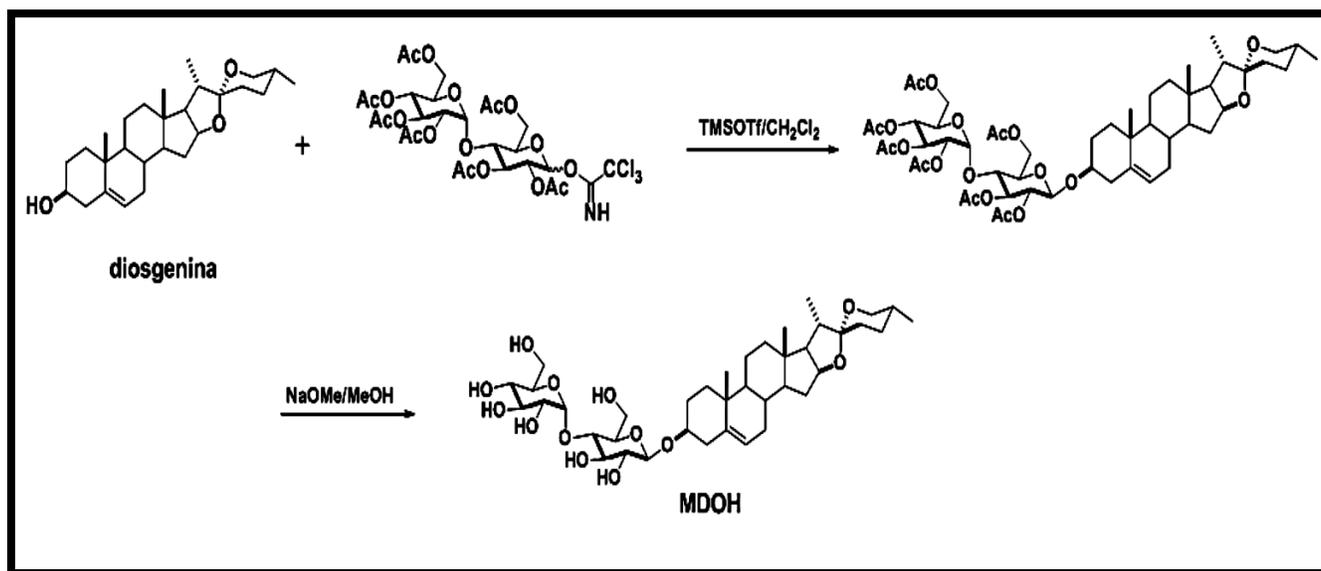


FIGURA 7. RUTA DE SINTESIS DEL β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH). Tomado de Fernández, 2010.

Sin embargo, este compuesto aún no se le ha determinado su actividad antitumoral, por lo que este trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del MD-OH *in vitro*, con la intención de establecer si esta sapogenina puede ser considerada como un agente con actividad antitumoral con posible aplicación terapéutica contra el cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tratamientos de quimioterapia que actualmente se utilizan para tratar el cáncer resultan ser muy agresivos para los pacientes terminales y poco eficientes. En la mayoría de los casos los fármacos por su alta citotoxicidad ocasionan efectos secundarios severos demeritando aún más la salud del paciente, generando la necesidad de implementar nuevas alternativas terapéuticas contra esta patología. Al respecto, actualmente ha surgido un fuerte interés en la búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa y no necrótica. Los fitoesteroides y en particular las saponinas esteroidales han llamado la atención de diferentes grupos de investigación, debido a sus diferentes actividades biológicas reportadas, destacando entre ellas, la actividad antitumoral.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es considerado una de las enfermedades más acuciantes y un problema de salud importante debido a su incidencia, así como a la tasa de mortalidad que presenta en nuestro país y en el mundo. El cáncer de mama, pulmón y cervicouterino (CaCu), se encuentran entre las neoplasias de mayor incidencia e índice de mortalidad en México y el mundo, donde a pesar de los avances tecnológicos, científicos y de las campañas de prevención y tratamientos, esta enfermedad no se ha logrado erradicar, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Es conocido que la sapogenina esteroidea diosgenina posee actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares como HeLa (cáncer cervicouterino), HEL y K562 (eritroleucemia); osteosarcoma 1547 HepG2, C3A y HUH-7 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (cáncer de mama) etc., así como inductora de apoptosis. Debido a que el compuesto β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH), es un derivado de la diosgenina genera la posibilidad de que potencie estas mismas características frente a líneas celulares de cáncer de mama, cervicouterino y de pulmón.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el compuesto esteroidal β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) derivado de la diosgenina, presenta actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de apoptosis en las líneas celulares provenientes del cáncer de mama, cervicouterino y de pulmón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar la actividad antiproliferativa del MD-OH en cultivos de células tumorales (MDA-MB-231, CaSki y SK-LU-1), expresada como la concentración requerida del compuesto para reducir en un 50% el número celular (CI50).
- 2) Determinar el efecto necrótico del MD-OH en los cultivos de células tumorales (MDA-MB-231, CaSki y SK-LU-1), mediante la detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares.
- 3) Establecer si el MD-OH induce a las líneas celulares (MDA-MB-231, CaSki y SK-LU-1) a expresar una morfología apoptótica, así como inducir un incremento de la caspasa 3 activa, mediante la técnica de tinción con DAPI y la detección por inmunocitoquímica cuantificada por citometría de flujo respectivamente.
- 4) Evaluar si el MD-OH a las concentraciones de CI50 determinadas para las líneas tumorales afectan el potencial proliferativo de células no tumorales (cultivos de linfocitos humanos, provenientes de sangre periférica) y si son inducidas a una muerte necrótica.

MATERIAL Y MÉTODO

Cultivo de las líneas tumorales de Cáncer de mama, CaCu y pulmón.

Las líneas celulares CaSki y Sk-LU-1 se sembraron en cajas de Petri de cristal de 100 mm (Pirex USA), con 10 ml de medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Gibco, USA) con rojo fenol suplementado con bencilpenicilina (Grünenthal, Mex) y al 5 % de suero de ternera neonata (STN, Gibco, USA) desactivado a 56 °C por 30 min (Apéndice A), la línea celular MDA-MB-231 con 10 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) con suero fetal bovino al 5% (SFB, Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en incubadora (Nuair USA). Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales en fase de crecimiento exponencial a una densidad celular del 70 % (Morgan y Darling, 1993). Para realizar los ensayos con los cultivos de las células CaSki y Sk-LU-1 se utilizó un control (Células en RPMI-1640 con 5 % de STN), un vehículo (Células en RPMI-1640 con 5 % de STN y 1 % de mezcla de Etanol-Dimetilsulfóxido 5:1) y los tratamientos (Células en RPMI-1640 con 5 % de STN y la concentración de MD-OH), para las células de MDA-MB-231 se utilizó un control (Células en D-MEM con 5% de SFB), un vehículo (Células en D-MEM con 5% de SFB y 1% de mezcla de Etanol-Dimetilsulfóxido 5:1) y los tratamientos (Células en D-MEM con 5% de SFB y la concentración de MD-OH).

Preparación del Stock del compuesto MD-OH

El stock consiste en pesar 1 mg del compuesto MD-OH y solubilizarlo en 100 µl de una mezcla de Etanol/DMSO proporción 5:1, manteniéndolo a temperatura ambiente. El compuesto MD-OH fue sintetizado en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de

compuestos Naturales a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Determinación de la proliferación celular de las líneas celulares de Cáncer de mama, CaCu y pulmón a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta

Se sembraron 7,500 células de las líneas celulares en cajas de 96 pozos (Corning. USA), con 100 µl de medio RPMI-1640 al 5 % de STN para CaSki y Sk-LU-1, para la línea MDA-MB-231 se utilizó D-MEM al 5% de SFB, durante 24 h y posteriormente los cultivos fueron tratados con 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 µg/ml del compuesto durante 24 h más. Se graficaron los resultados obtenidos y mediante la ecuación de la recta se calculó la CI50. La determinación del número celular se realizó por la técnica de incorporación del colorante cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al.*, (1989). Brevemente, esta técnica consiste en retirar el medio de cultivo de la placa de 96 pozos, e inmediatamente las células se fijan con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma- Aldrich. USA) (Apéndice D) por 20 min, al término del tiempo, se retira el fijador, se realizan dos lavados a la caja con agua destilada y se deja secar al aire, posteriormente se tiñen las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma- Aldrich. USA) (Apéndice F) por 20 min, posteriormente se retira el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada, nuevamente, se deja secar al aire. Por último, el colorante se solubiliza en ácido acético (J.T.Baker, Mex) al 10 % en agitación por 20 min (Apéndice C), para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector tipo ELISA (CHROMATE, USA). Los resultados de los grupos tratados fueron comparados con el respectivo control y fueron graficados.

Evaluación de muerte necrótica por liberación de LDH en células tumorales

El ensayo se realizó con el kit de LDH (BioVision, USA). En la placa de 96 pozos se siembran 7,500 células por pozo, se dejaron adherir durante 24 h, se aplicó la concentración de MD-OH correspondiente a la CI50 y se incubaron por 24 h más. Transcurrido el tiempo, se retiró

el medio de cultivo y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min, después se tomó 40 µl de sobrenadante y se transfirieron a una placa de 96 y se añadió 40 µl de mezcla de reacción (250 µl de solución catalítica y 11.25 µl de solución de marcado) a cada pozo y se incubó durante 20 min, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia en un lector de placas a una absorbancia de 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de muerte necrótica con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = [(muestra – control negativo) / (control alto – control negativo)]*100.

Efecto del compuesto MD-OH en la morfología y condensación de la cromatina de células tumorales a través de la tinción con el fluorocromo 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

Se sembraron 300,000 células de las líneas celulares en cuatro cajas de 2.5ml sobre cubreobjetos de 1x1 cm, se dejaron adherir por 24 h. Transcurrido el tiempo, se trataron las células con la concentración de MD-OH correspondiente a la CI50 dejándolas incubar por 24 h más. Al término, las células fueron fijadas y permeadas con Etanol al 70% durante 5 min. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS filtrado a través de un filtro de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 0.22 µm. Las preparaciones fueron escurridas ligeramente en un papel absorbente sin dejarlas secar. Enseguida se adiciono 5µl a una concentración de 3µg/ml de fluorocromo 4', 6-diamidino-2-fenilidol (DAPI; Sigma-Aldrich, E.U.A) formando un domo sobre cada cubreobjeto y se dejó 30 s en placa de hielo en oscuridad. A continuación, fueron lavadas las muestras con PBS filtrado y se montaron con medio de montaje (Vector Laboratories, E.U.A) sobre portaobjetos, para evitar la salida del medio de montaje, las muestras (cubreobjetos) fueron selladas con resina acrílica. Después de ser etiquetadas como corresponde, se guardaron en oscuridad a -20°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia. Se tomaron fotografías de alta definición, para su análisis.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares

Se sembraron 30,000 células de cada línea celular por pozo en placas de 24 pozos, para CaSki y Sk-LU-1 se utilizó un volumen de 500 µl de RPMI-1640 al 5 % de STN y para la línea MDA-MB-231 se utilizó un volumen de 500 µl de D-MEM al 5% de SFB. Al paso de 24 h las células fueron tratadas con la CI50 de MD-OH en medio de cultivo correspondiente, durante 24 h y se procedió a realizar la detección de la caspasa 3 por citometría de flujo. El procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera: las células son cosechadas y fijadas a las 24 h de cultivo con metanol al 50 % en PBS filtrado durante 1 h a 4 °C, al término del tiempo se lavan cuidadosamente 2 veces con PBS filtrado, pH 7.3. Inmediatamente se adiciona el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en conejo (SIGMA) 1:250 en PBS filtrado durante 24 h a 4 °C. Al término del tiempo, las muestras son lavadas 2 veces con PBS filtrado. Posteriormente se aplica el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS filtrado (Invitrogen, USA), mantenido en incubación durante 2 h, después se lavan las muestras 2 veces con PBS filtrado y se llevan a un volumen de 500 µl de PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo marca FACS Aria II y finalmente se procesan los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Evaluación de las CI50 obtenidas para las líneas tumorales sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas

Se obtuvo sangre de un donador aparentemente sano. En tubos cónicos de vidrio se colocó histopaque en una relación 1:1 con los ml de sangre, se centrifuga inicialmente a 300 rpm durante 5 min incrementando 300 rpm cada 5 min hasta llegar a 1500 rpm y se deja 30 min. Se desecha el suero y se obtiene el anillo de linfocitos, cada anillo recuperado se coloca en tubos de 15 ml agregándole 5 ml de RPMI sin suero (para evitar el exceso de histopaque), se realizan dos lavados con 5 ml de RPMI sin suero, centrifugándolo a 1500 rpm por 5 min. En una caja Petri de 10 ml de vidrio se agregan los anillos recuperados en 10 ml de RPMI al 5% SFB dejando incubar durante 10 min. Pasado los 10 min se recuperan las células en

suspensión en un tubo de 15 ml de vidrio, se centrifuga a 1500 rpm por 5 min, decantar y agregar 5ml de RPMI sin suero y se realiza el conteo. Se separan 2 millones 1 y 1 para los dos controles (sin carboxifluoresceína y sin fitohemaglutinina) y (sin carboxifluoresceína y con fitohemaglutinina), a las células restantes se les marca con carboxifluoresceína.

Resuspender en 5 ml de RPMI sin suero y agregar la carboxifluoresceína (10 μ L/1ml) y se deja 15 min para que se incorpore. Se realizan dos lavados con 5 ml de RPMI al 5% SFB centrifugando a 1500 rpm por 5 min. Resuspender el botón con RPMI al 20% SFB en una relación 1 millón de linfocitos/ ml. Agregar la fitohemaglutinina (20 μ l/ml) y dejar activar de 20 a 30 min. Se separan 3 millones (con carboxifluoresceína y sin fitohemaglutinina) (con carboxifluoresceína y con fitohemaglutinina) y (con carboxifluoresceína y con fitohemaglutinina; fijado con paraformaldehído al 2%) Se agrega 1 millón de linfocitos/1ml de RPMI al 20% en un tubo cónico de 1.5 ml (según las condiciones) y aplicar el estímulo. Sembrar en una placa de 96 pozos; 200 000 células por pozo y se deja incubar por 72 h.

Transcurridas las 72 h se recupera cada condición en un tubo cónico de 1.5 ml, se centrifuga a 1500 rpm por 5 min, decantar y colocar 200 μ l de verseno durante 5 min, se centrifuga a 1500 rpm por 5 min, se decanta y se lleva a 500 μ l de PBS, se resuspende lentamente y se pasan a tubos de citometría para su lectura en el citómetro de flujo marca FACS Aria II y finalmente se procesan los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Evaluación de muerte necrótica por liberación de LDH en células linfocíticas

Se sembró en una placa de 96 pozos 200 000 linfocitos por pozo dejando incubar por 72 h. Transcurridas 71 h en un control positivo se colocó Tritón al 2% durante 1 h. Después de este tiempo se centrifugó la placa a 1500 rpm por 5 min a 20°C. Se recuperó 100 μ l del sobrenadante de 3 pozos por condición, y se transfirieron 40 μ l a una placa de 96 y se añaden 40 μ l de mezcla de reacción del kit de LDH (BioVision, USA) (250 μ l de solución catalítica y 11.25 μ l de solución de marcado) a cada pozo y se incubó durante 20 min, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia en un

lector de placas a una absorbancia de 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de muerte necrótica con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = [(muestra – control negativo) / (control alto – control negativo)]*100.

Análisis estadístico

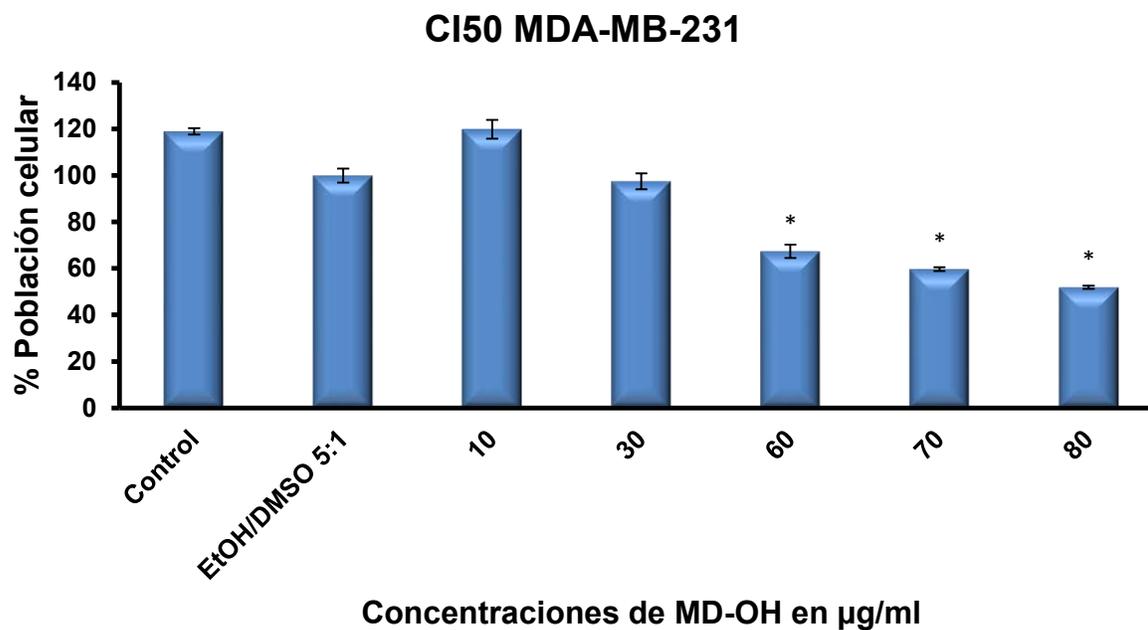
Los datos experimentales son presentados como la media S.D. de al menos tres experimentos independientes con seis repeticiones y son estadísticamente analizados usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparado contra el EtOH/DMSO 5:1. Utilizando el programa de Excell 2010.

RESULTADOS

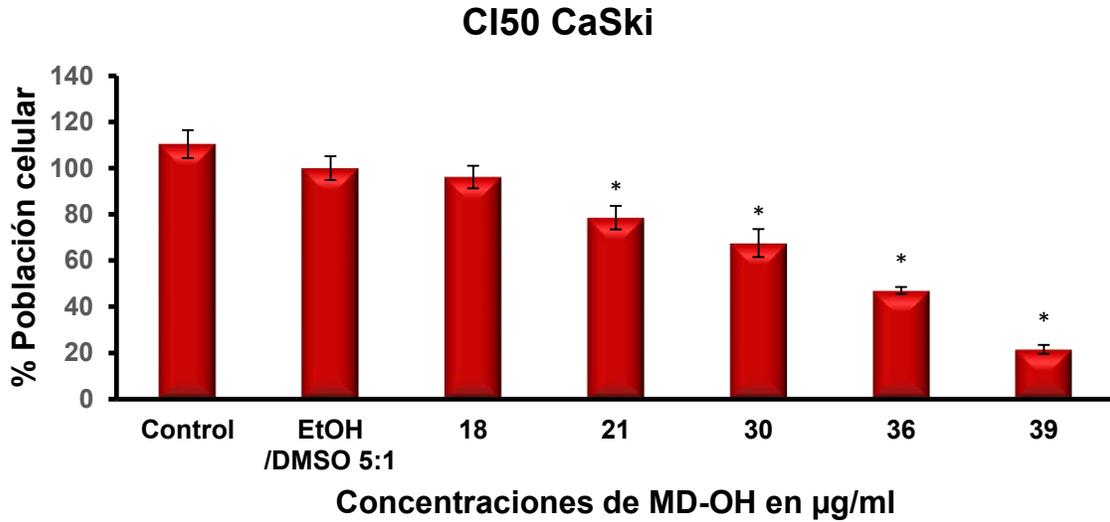
Actividad antiproliferativa del MD-OH en células tumorales

Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo del compuesto MD-OH en células tumorales, cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1 fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto y la actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% en el número celular (CI50) (Fig. 8).

A)



B)



C)

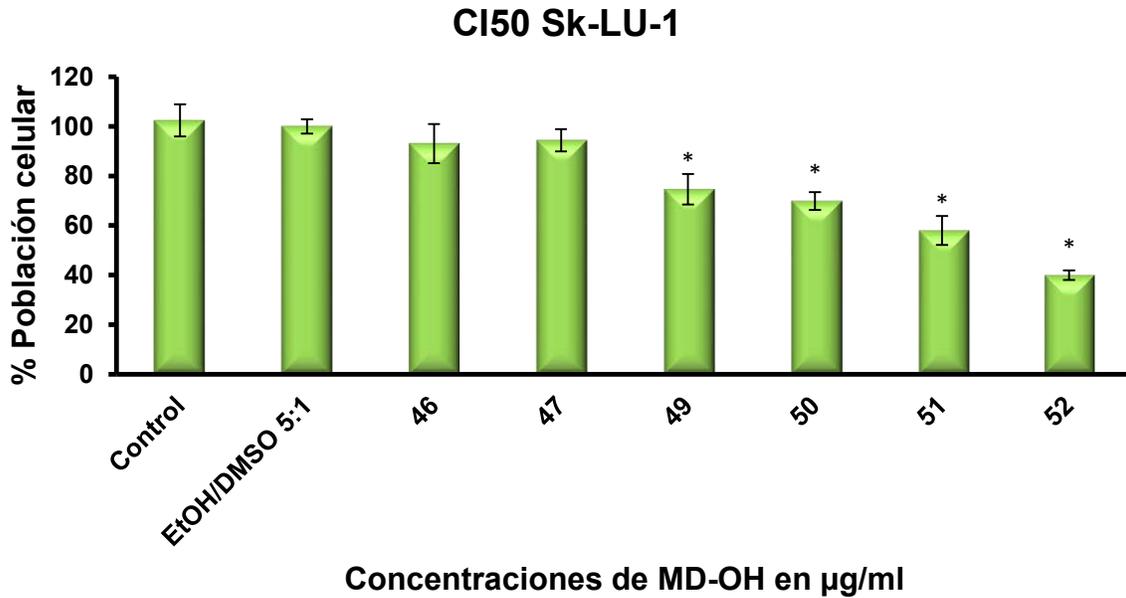


FIGURA 8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA (CI50) DE MD-OH SOBRE LAS LÍNEAS TUMORALES: A) MDA-MB-231 (CI50= 78µg/ml) DE CÁNCER DE MAMA, B) CASKI (CI50= 36µg/ml) DE CACU Y C) SK-LU-1 (CI50= 52µg/ml) DE CÁNCER DE PULMÓN. LA BARRA I INDICA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y * INDICA QUE ESTADÍSTICAMENTE EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES OBTENIDOS. ANDEVA, SEGUIDA DE UNA PRUEBA DE TUKEY (* p < 0.05 VS ETOH/DMSO 5:1).

Línea celular	CI50 (µg/ml)	CI50 (µmol/l)
MDA-MB-231	78 µg/ml	309
CaSki	36 µg/ml	143
Sk-LU-1	52 µg/ml	204

TABLA 2. CONCENTRACIÓN REQUERIDA DEL COMPUESTO DIOSGENÍNICO MD-OH PARA INDUCIR UN DECREMENTO DEL 50% EN EL NÚMERO CÉLULAR EN LAS LÍNEAS TUMORALES MDA-MB-231, CASKI Y SK-LU-1, EXPRESADA EN µg/ml Y/O µmol/l.

Los resultados obtenidos en la Figura 8 establecen que el compuesto MD-OH afecta el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis con una CI50 de 36, 78 y 52 µg/ml para las células CaSki, MDA-MB-231 y Sk-LU-1 respectivamente. (Tabla 2)

Una vez obtenidas las CI50 respectivamente, se procedió a confirmar estos resultados. (Fig. 9).

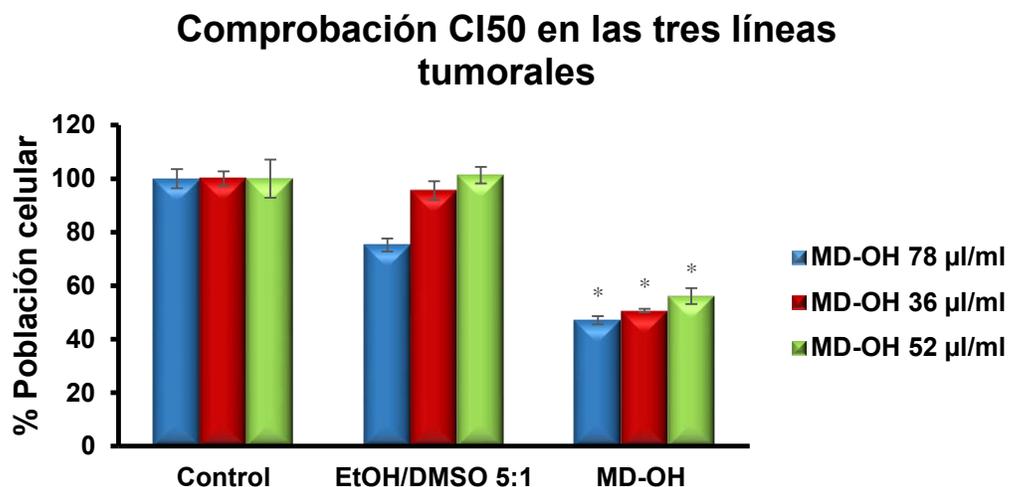


FIGURA 9. CONFIRMACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL MD-OH A LAS CONCENTRACIONES DE CI50 OBTENIDAS EN LAS LÍNEAS TUMORALES MDA-MB-231, CASKI Y SK.LU-1. LA BARRA I INDICA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y * INDICA QUE ESTADÍSTICAMENTE EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES OBTENIDOS. ANDEVA, SEGUIDA DE UNA PRUEBA DE TUKEY (* p < 0.05 VS ETOH/DMSO 5:1).

Actividad necrótica del MD-OH en células tumorales

Con la intención de establecer si el decremento en el número celular inducido por el MD-OH en las líneas tumorales es debido a una actividad necrótica, cultivos de células MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1 fueron tratados con el compuesto MD-OH a las concentraciones de sus CI50s respectivas y la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes de los cultivos celulares y tomada como un indicador de pérdida de la integridad de la membrana plasmática, la cual es una característica principal de muerte celular por necrosis. (Fig. 10)

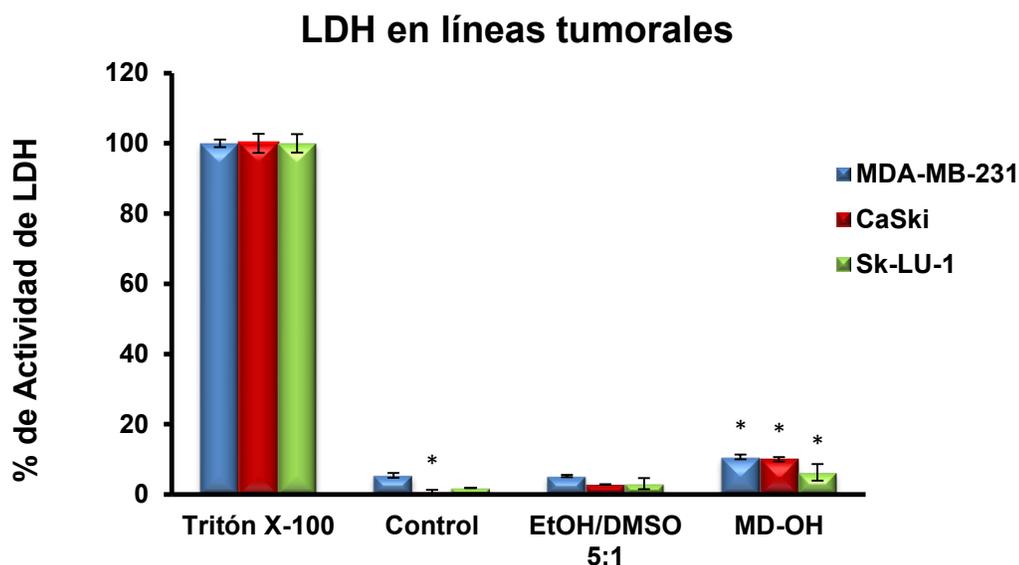


FIGURA 10. EVALUACIÓN DE EFECTO NECRÓTICO MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE LDH EN LAS LÍNEAS TUMORALES MDA-MB-231 (10.66%), CASKI (9.96%) Y SK-LU-1 (6.29%) EN COMPARACIÓN CON EL VEHÍCULO (EtOH/DMSO 5:1) LOS RESULTADOS MUESTRAN UN ENSAYO REPRESENTATIVO DE 3 PRUEBAS INDEPENDIENTES CON AL MENOS 3 REPETICIONES. LA BARRA I INDICA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y * INDICA QUE ESTADÍSTICAMENTE EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES OBTENIDOS. ANDEVA, SEGUIDA DE UNA PRUEBA DE TUKEY (* $p < 0.05$ VS ETOH/DMSO 5:1).

Los resultados mostrados en la Figura 10 indican que el compuesto MD-OH induce una baja actividad de la enzima LDH en las tres líneas (menor al 11%), determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares, indicando que el MD-OH es un compuesto de baja

actividad necrótica y el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

Actividad apoptótica del MD-OH en células tumorales

Ya descartada la muerte necrótica de los cultivos de células tumorales se prosigue a evaluar si el compuesto diosgenínico MD-OH afecta la morfología celular, así como la condensación de la cromatina (Figura 11 a, b y c).

C. F

MDA-MB-231

DAPI

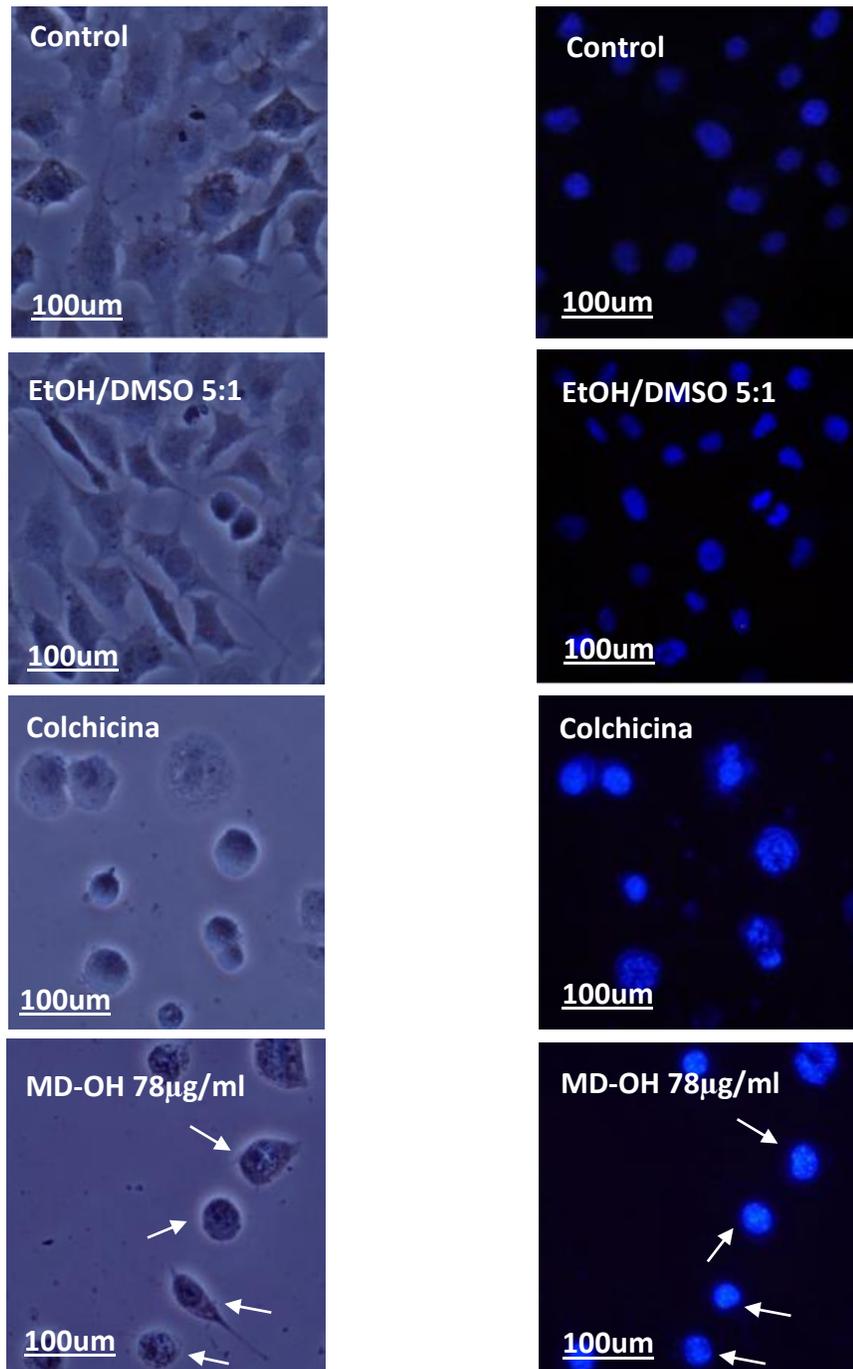


FIGURA 11 a). CÉLULAS MDA-MB-231 FUERON TRATADAS CON SU C150 CORRESPONDIENTE DEL COMPUESTO DIOSGENÍNICO MD-OH Y MARCADAS CON EL FLUOROCROMO DAPI, EVALUADAS A LAS 24H DEL ESTÍMULO. EL CONTRASTE DE FASES MUESTRA EL CAMBIO EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y EN LA TINCIÓN CON DAPI SE APRECIA LA COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA TRAS EL TRATAMIENTO CON EL MD-OH.

C. F

CaSki

DAPI

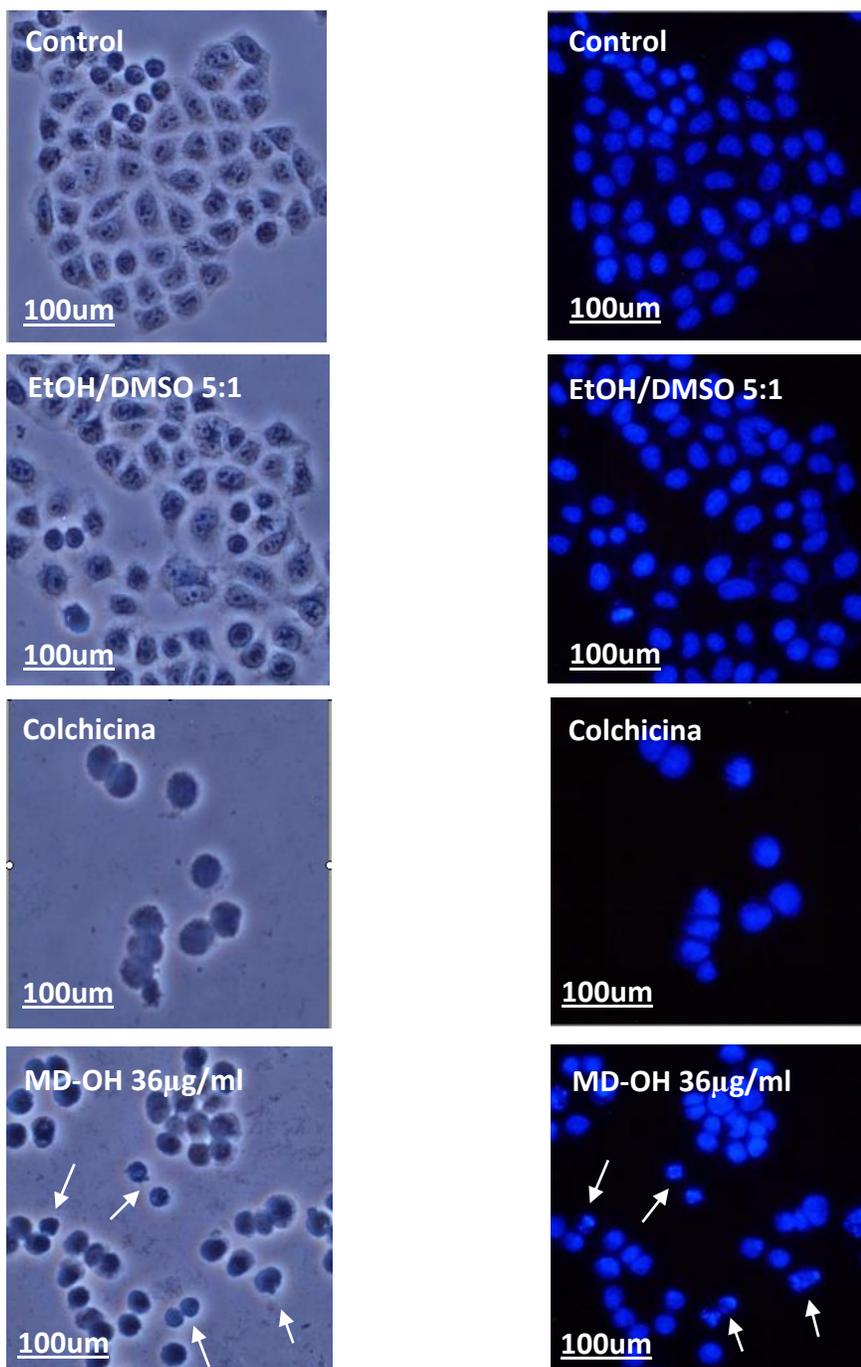


FIGURA 11 b). CÉLULAS CASKI FUERON TRATADAS CON SU CI50 CORRESPONDIENTE DEL COMPUESTO DIOSGENÍNICO MD-OH Y MARCADAS CON EL FLUOROCROMO DAPI, EVALUADAS A LAS 24H DEL ESTÍMULO. EL CONTRASTE DE FASES MUESTRA EL CAMBIO EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y EN LA TINCIÓN CON DAPI SE APRECIA LA COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA TRAS EL TRATAMIENTO CON EL MD-OH.

C. F

Sk-LU-1

DAPI

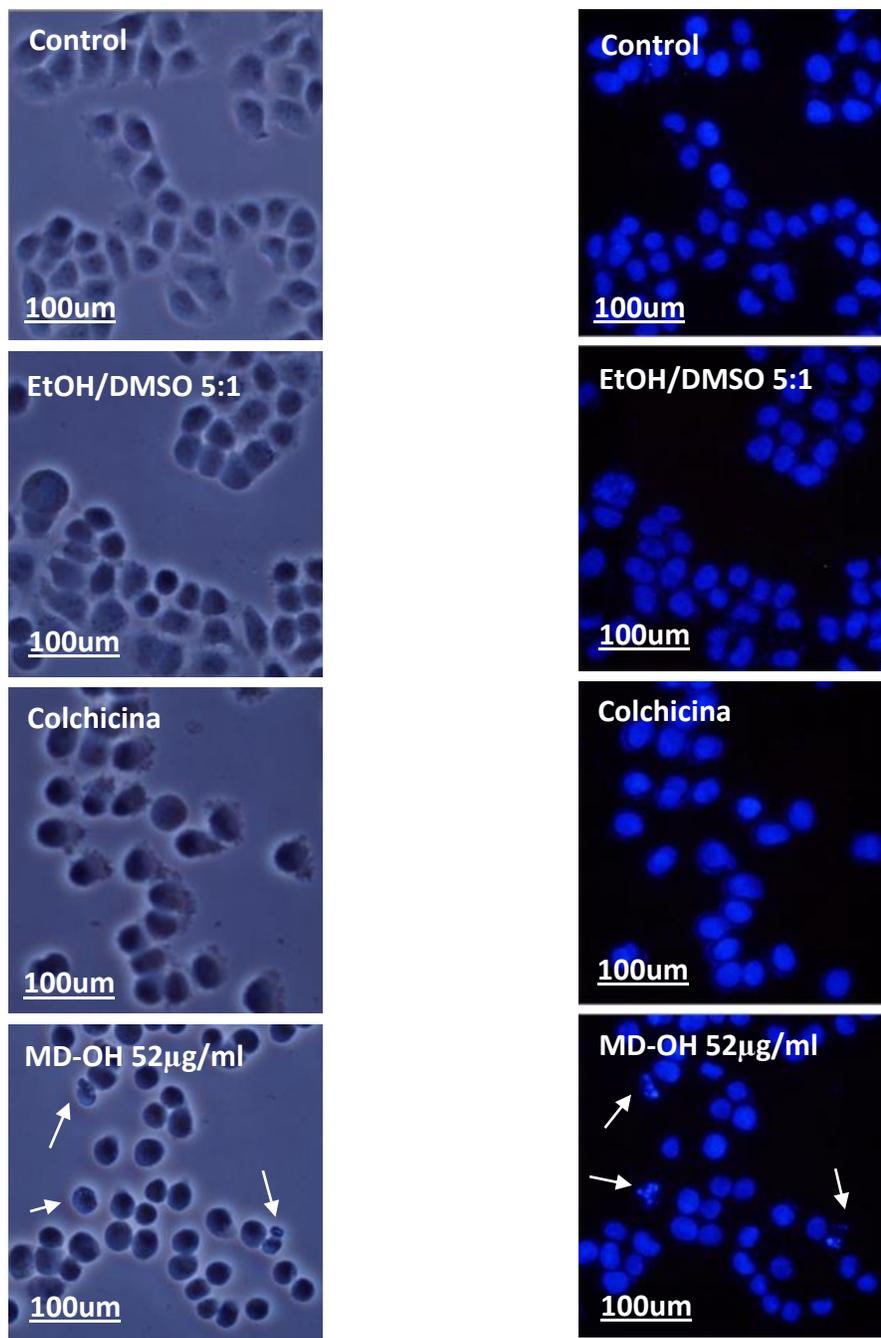


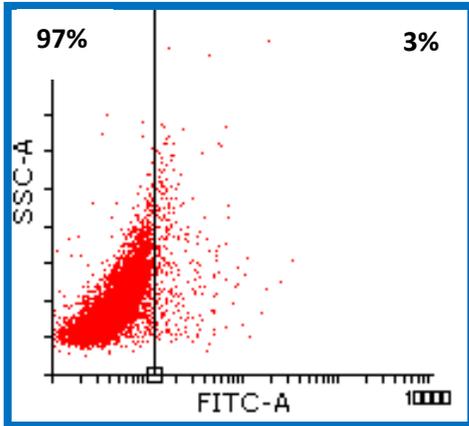
FIGURA 11 c). CÉLULAS SK-LU-1 FUERON TRATADAS CON SU CI50 CORRESPONDIENTE DEL COMPUESTO DIOSGENÍNICO MD-OH Y MARCADAS CON EL FLUOROCROMO DAPI, EVALUADAS A LAS 24H DEL ESTÍMULO. EL CONTRASTE DE FASES MUESTRA EL CAMBIO EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y EN LA TINCIÓN CON DAPI SE APRECIA LA COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA TRAS EL TRATAMIENTO CON EL MD-OH.

Las fotografías de la Figura 11 a, b y c muestran la compactación de la cromatina y la formación de algunos cuerpos apoptóticos a diferencia de los controles, los cuales mantienen su morfología poliédrica y citoplasma extendido, lo que sugiere que el compuesto diosgenínico MD-OH induce una muerte por apoptosis en las líneas tumorales MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1.

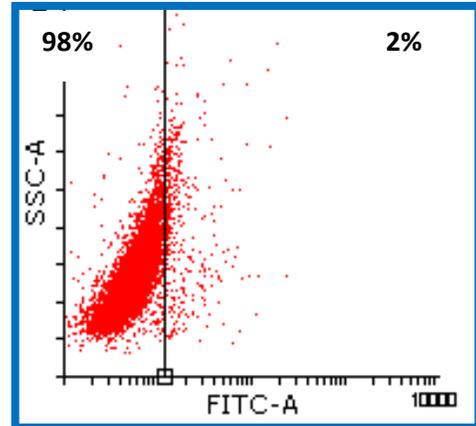
A pesar de observar características morfológicas propias de células apoptóticas en los cultivos de las tres líneas tumorales tratadas con el MD-OH, es necesario determinar un marcador bioquímico que nos permite establecer si el proceso apoptótico se llevó a cabo. Para ello, cultivos de células MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1 fueron tratadas con el MD-OH y la Caspasa 3 activa fue determinada por inmunocitoquímica y cuantificada por citometría de flujo (Figura 12 a, b y c).

Caspasa 3 activa en MDA-MB-231

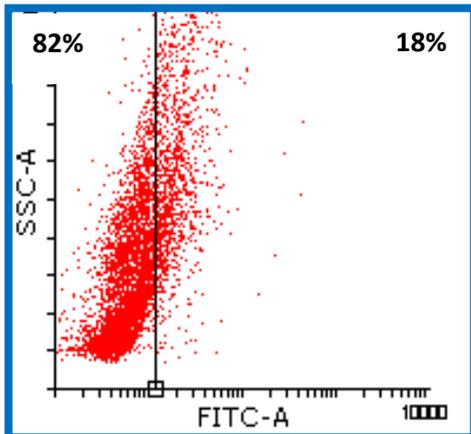
Control



EtOH/DMSO 5:1



MD-OH



Colchicina

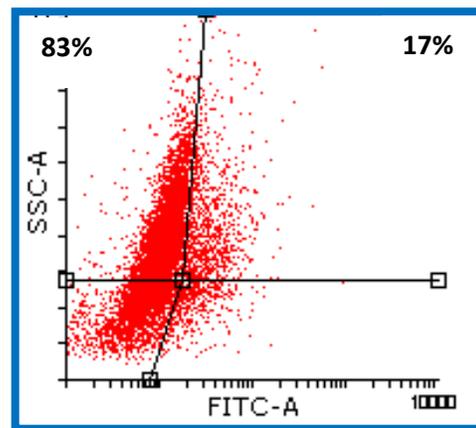
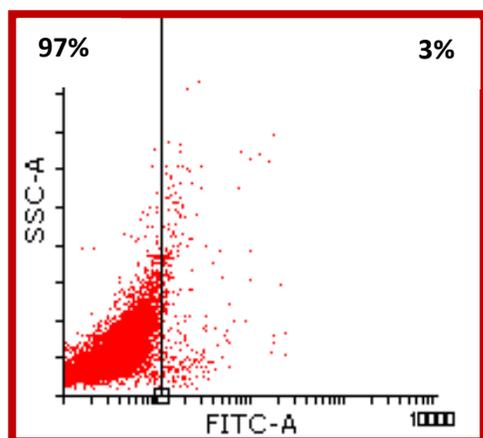


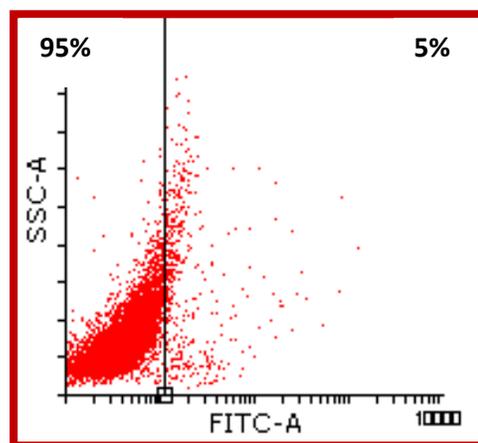
FIGURA 12 a). DETECCIÓN DE CASPASA 3 ACTIVA EN LAS LÍNEA TUMORAL MDA-MB-231 AL SER ESTIMULADA CON SU C150 CORRESPONDIENTE. LOS RESULTADOS MUESTRAN UN ENSAYO REPRESENTATIVO DE 3 PRUEBAS CON AL MENOS 3 REPETICIONES.

Caspasa 3 activa en CaSki

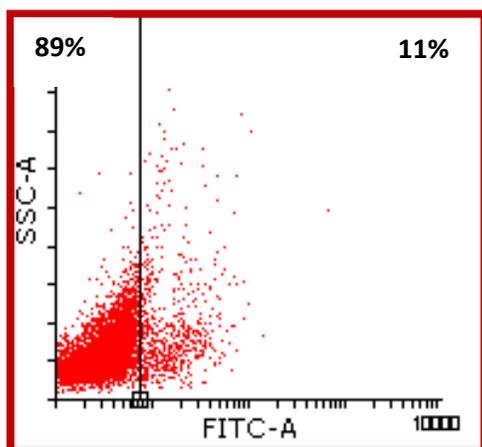
Control



EtOH/DMSO 5:1



MD-OH



Colchicina

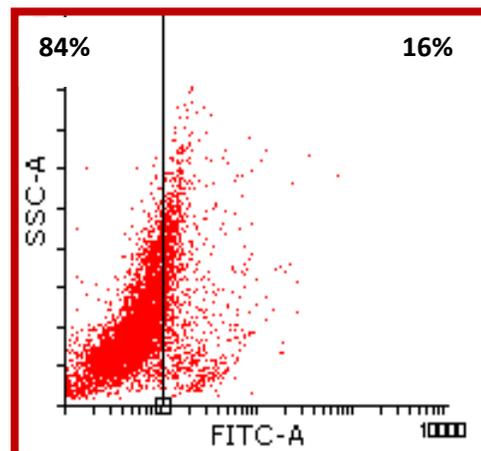
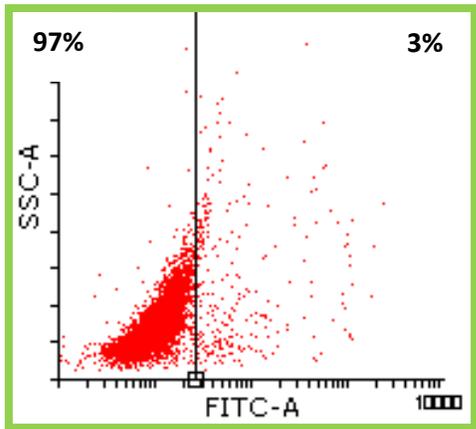


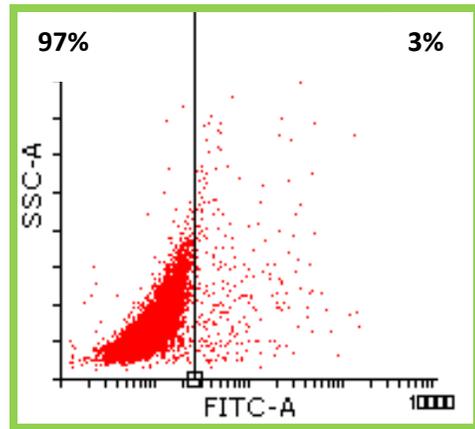
FIGURA 12 b). DETECCIÓN DE CASPASA 3 ACTIVA EN LAS LÍNEA TUMORAL CASKI AL SER ESTIMULADA CON SU C150 CORRESPONDIENTE. LOS RESULTADOS MUESTRAN UN ENSAYO REPRESENTATIVO DE 3 PRUEBAS CON AL MENOS 3 REPETICIONES.

Caspasa 3 activa en Sk-LU-1

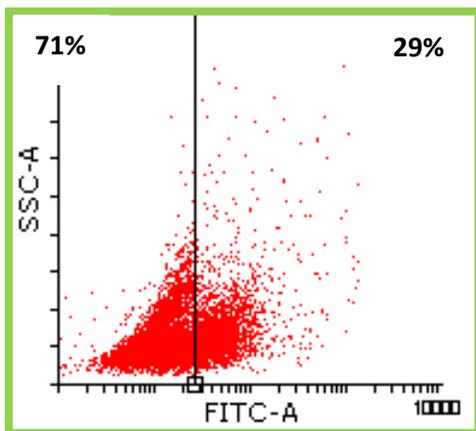
Control



EtOH/DMSO 5:1



MD-OH



Colchicina

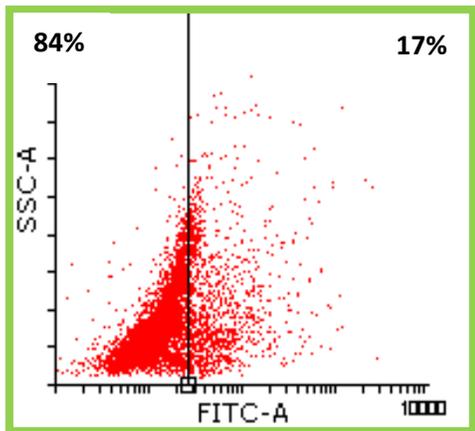


FIGURA 12 c). DETECCIÓN DE CASPASA 3 ACTIVA EN LAS LÍNEA TUMORAL SK-LU-1 AL SER ESTIMULADA CON SU C150 CORRESPONDIENTE. LOS RESULTADOS MUESTRAN UN ENSAYO REPRESENTATIVO DE 3 PRUEBAS CON AL MENOS 3 REPETICIONES.

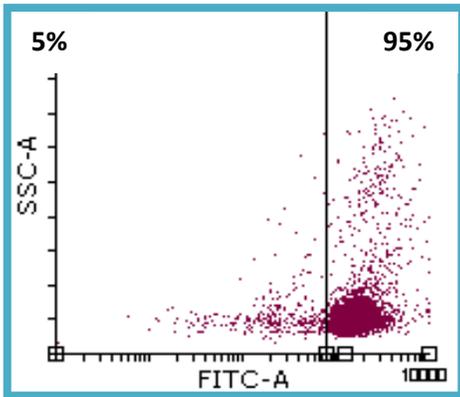
Los resultados obtenidos en la Figura 12, indican que los cultivos de las líneas tumorales MDA-MB-231, CaSki y Sk-Lu-1 al ser tratadas con el compuesto MD-OH expresan de un 11 a 29% de Caspasa 3 activa a 24 h, sugiriendo que se lleva a cabo un proceso apoptótico.

Efecto del MD-OH (CI50) en el potencial proliferativo de células linfocíticas

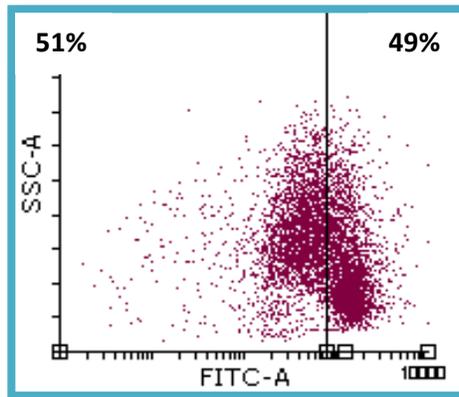
Con la intención de establecer si el efecto antiproliferativo del MD-OH es de acción selectiva, cultivos de linfocitos obtenidos de sangre periférica humana fueron marcados con carboxifluoresceína y estimulados con 36 µg/ml, 52 µg/ml y 78 µg/ml del MD-OH y la marca fluorescente fue cuantificada mediante citometría de flujo (Fig. 13).

Proliferación de Linfocitos humanos

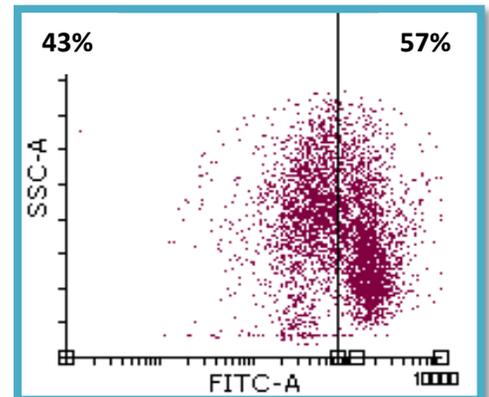
Sin Activar



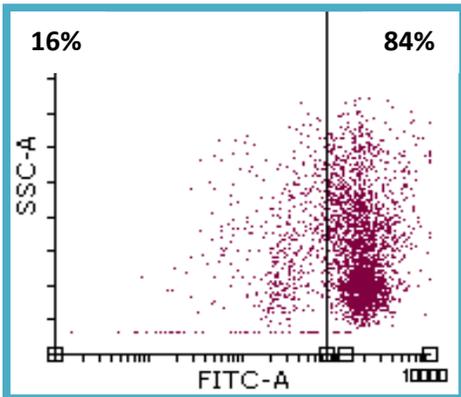
Activados



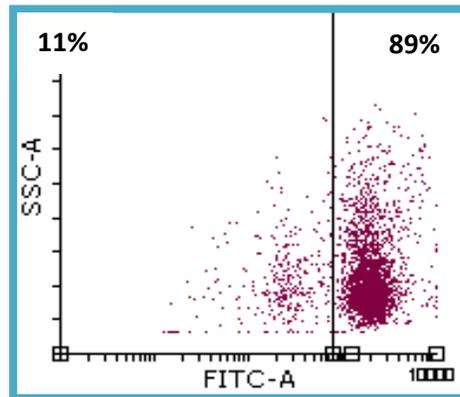
EtOH/DMSO 5:1



MD-OH 36 μ g/ml



MD-OH 52 μ g/ml



MD-OH 78 μ g/ml

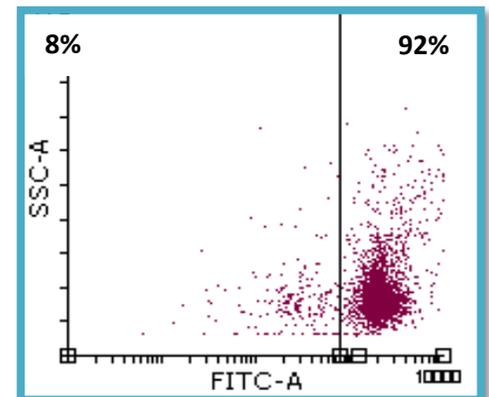


FIGURA 13. EFECTO DEL COMPUESTO DIOSGENINICO MD-OH EN LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS. LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS FUERON MARCADOS CON CARBOXIFLUORESCINA Y EVALUADOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO. LOS RESULTADOS MUESTRAN UN ENSAYO REPRESENTATIVO DE 3 PRUEBAS CON AL MENOS 3 REPETICIONES.

En la figura 13 se muestra el efecto del compuesto MD-OH sobre la proliferación de linfocitos humanos. En los linfocitos activados se obtuvo una proliferación del 51% tomando este porcentaje como el máximo de proliferación, por lo que el EtOH/DMSO 5:1 disminuyó la proliferación en un 8%. Mientras que los linfocitos estimulados con las diferentes CI50 del MD-OH muestran un considerable decremento del potencial proliferativo (43 a 35%), estableciendo que el MD-OH inhibe la proliferación de células linfocíticas normales.

Con el propósito de establecer si el efecto antiproliferativo inducido por el MD-OH en las células linfocíticas es debido a un efecto necrótico, cultivos de células linfocíticas fueron tratados con 36 $\mu\text{g/ml}$, 52 $\mu\text{g/ml}$ y 78 $\mu\text{g/ml}$ del MD-OH y la actividad de la enzima citoplasmática LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares fue cuantificada a las 72 h. (Figura 14)

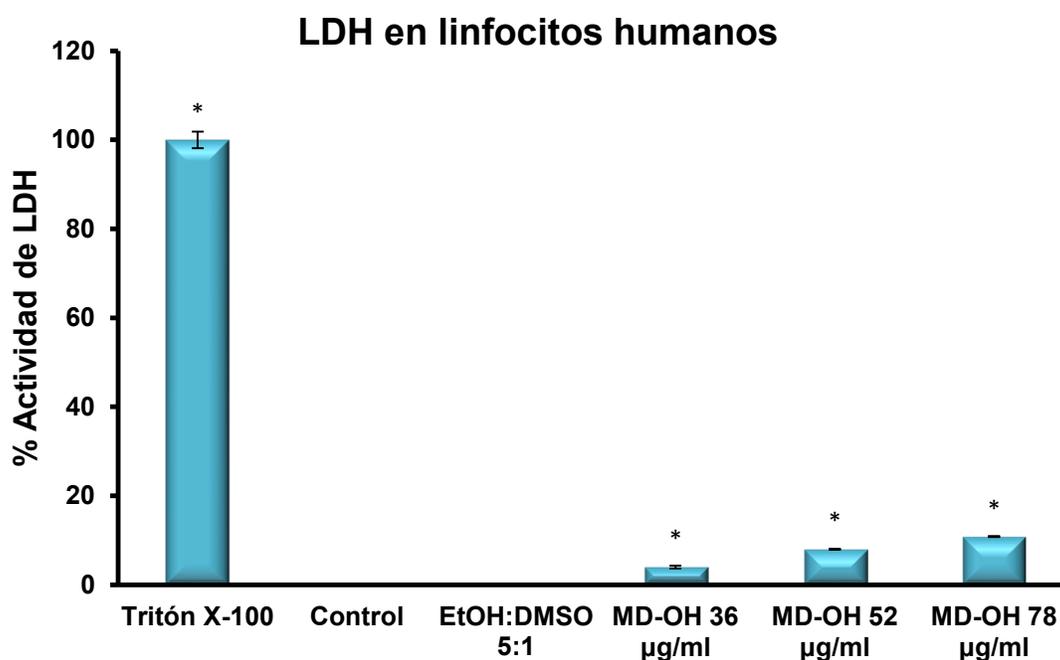


FIGURA 14. EFECTO NECRÓTICO DEL MD-OH EN CULTIVOS DE CÉLULAS LINFOCÍTICAS. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS CELULARES DE LINFOCITOS OBTENIDOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA ESTIMULADOS CON 36, 52 Y 78 $\mu\text{g/ml}$ POR 72 HORAS. EL TRITÓN X-100 FUE CONSIDERADO EL 100% DE ACTIVIDAD. LOS RESULTADOS MUESTRAN UN ENSAYO REPRESENTATIVO DE 3 PRUEBAS CON AL MENOS 3 REPETICIONES. LA BARRA I INDICA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y * INDICA QUE ESTADÍSTICAMENTE EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES OBTENIDOS. ANDEVA, SEGUIDA DE UNA PRUEBA DE TUKEY (* $p < 0.05$ VS ETOH/DMSO 5:1).

El gráfico de la Figura 14 muestra que el compuesto MD-OH induce una baja actividad de LDH (4 a 11%) en los sobrenadantes de los cultivos celulares, indicando que el decremento en la proliferación celular inducido por el MD-OH en los cultivos de células linfocíticas es debido a una causa diferente a la muerte por necrosis.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha descrito que los fármacos aplicados en las quimioterapias son ineficientes en pacientes con cáncer terminal, los cuales se caracterizan por su actividad antiproliferativa, su alto efecto necrótico y su baja selectividad, generando efectos secundarios graves en el paciente. La búsqueda de nuevos fármacos para combatir el cáncer ha llevado a evaluar compuestos de origen vegetal con la esperanza de ayudar a prevenir y curar esta enfermedad. En ese sentido se han realizado investigaciones en una diversidad de compuestos, entre éstos hay un particular interés en las saponinas esteroidales, a quienes se les ha atribuido una importante actividad biológica, como la acción antiproliferativa en líneas celulares de cáncer humano mediante la detención del ciclo celular y por inducción de muerte celular por apoptosis (Pérez, 2010). Dentro de la familia de las saponinas esteroidales la Dioscina, se caracteriza por presentar una estructura esteroideal (aglicona) a la cual está unida en el carbono 3 una glucosa y en ésta se encuentran unidos dos ramnosas. Esta saponina exhibe una actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer humano con un rango de CI50 que va de 0.5 a 10 μM . Por ejemplo, en la línea celular sw1990 de cáncer de páncreas la CI50 es de 0.5 μM , en la línea celular HeLa (cáncer cervical) la CI50 es de 4.4 μM . En la línea celular HL-60 (leucemia humana) se determinó una CI50 de 5 μM , mientras que para la línea celular K562 (leucemia humana) la CI50 está determinada en 10 μM (Cai, 2002), (Liu, 2004). Sin duda, este fitoesteroide es una de las saponinas con actividad antiproliferativa más potentes evaluadas hasta ahora, hecho que ha despertado la inquietud de establecer qué parte de la molécula es la causante de la actividad antiproliferativa, así como la magnitud de ésta. La gran complejidad de la estructura de las saponinas surge de la variabilidad de la estructura de la aglicona, la naturaleza de las cadenas laterales y la posición de unión de los azúcares en la región de la aglicona, principalmente las diferencias en la estructura de la saponina que incluyen el tipo, posición, y número de restos de azúcar unidos por un enlace glicosídico en diferentes posiciones de

los anillos, los cuales pueden influir en la respuesta biológica, especialmente para la actividad antitumoral (Podolak, 2010). Además, estudios recientes han mostrado que la fuerte actividad antiproliferativa de las saponinas es altamente dependiente de los restos glicosídicos y la pérdida de éstos producen una disminución en su actividad biológica (Yu W., 2002) (Morzycki, 2002). En este sentido, se han generado derivados de la saponina Dioscina, por ejemplo, cuando los sacáridos son removidos de esta saponina, se obtiene la Diosgenina (aglicona), de la cual existen varios estudios que han mostrado que también tiene actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer humano; sin embargo, su actividad es menor comparada con la Dioscina, ya que se requiere de mayor concentración de la Diosgenina para obtener el mismo efecto que la Dioscina. Actualmente se ha estudiado la relación de la actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica de derivados de la dioscina, con respecto a la presencia o ausencia de sus residuos glicosídicos, obteniendo que la diosgenina (aglicona de la dioscina), la cual carece de azúcares en su estructura presentó una actividad antiproliferativa basal en líneas celulares de cáncer cervicouterino, la cual fue menor con respecto a la actividad antiproliferativa mostrada por la dioscina en las mismas células, sugiriendo que la parte glicosídica presente en la dioscina sirve para incrementar la actividad antiproliferativa (López, 2013). Sin embargo, el estudio de la diosgenina-3-glu, un derivado de la dioscina que presenta la misma aglicona, la cual presenta una glucosa unida en el carbono 3 y del derivado diosgenina-di, el cual presenta una glucosa unida en el carbono 3 a la cual está unida una ramnosa, mostraron una actividad antiproliferativa menor que la dioscina, sugiriendo que los azúcares presentes en el carbono-3 de la aglicona pueden inducir un incremento o un decremento en la actividad antiproliferativa y de igual modo, el tipo de azúcar y/o su posición pueden contribuir de manera positiva o negativa en dicha actividad (González, 2013). Con respecto al MD-OH, nuestros resultados mostraron que al igual que las saponinas anteriormente citadas, el MD-OH conserva la actividad antiproliferativa. En cuanto a su relación estructura actividad, en la línea celular CaSki, el MD-OH presentó una actividad antiproliferativa menor que la presente en la dioscina (18 a 89 veces menor), mientras que con la diosgenina, la diosgenina 3-glu y la diosgenina-di, el MD-OH presentó una disminución en la actividad

antiproliferativa de 2.8, 1.6 y 1.1 menor respectivamente, indicando por un lado que la presencia de azúcares modula la actividad antiproliferativa presente en la dioscina y por el otro que la ramnosa unida a la glucosa es un azúcar importante para incrementar la actividad antiproliferativa de la dioscina. También, nuestros resultados establecen que la maltosa unida al carbono 3 de la diosgenina induce un mayor decremento en la actividad antiproliferativa de la diosgenina, sugiriendo que este tipo de azúcar no es favorable para potenciar la actividad antiproliferativa de estas saponinas. Con respecto a la actividad apoptótica, la dioscina, la diosgenina, la diosgenina-3-glu y la diosgenina-di mostraron una actividad apoptótica en células tumorales de CaCu dependientes de caspasa-3 activa, (González, 2013) (López, 2013), mientras que en el MD-OH la presencia de esta caspasa en las células CaSki (11%), en las células de mama y pulmón fue de 18 y 29% respectivamente, sugiriendo que la actividad antiproliferativa del MD-OH es llevada a cabo mediante la muerte celular necrótica en menor grado, por muerte apoptótica en un mayor grado y posiblemente mediante una muerte celular diferente a las antes mencionadas. Es importante resaltar que el MD-OH presentó baja actividad necrótica en células tumorales, así como en células no tumorales, indicando que este esteroide es de baja toxicidad, característica que lo hace relevante si lo comparamos con los compuestos quimioterapéuticos aplicados hoy en día contra el cáncer, los cuales son altamente necróticos. Con respecto a la acción selectiva, nuestros resultados muestran que el MD-OH inhibe la proliferación de células linfocíticas, indicando que un efecto colateral de este compuesto podría ser la disminución de la respuesta inmune. Es importante resaltar, que la baja actividad citotóxica del MD-OH en ambos tipos celulares (tumorales y no tumorales), genera la posibilidad de disminuir los efectos colaterales relacionados directamente con la actividad necrótica, que junto con su actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, hacen de este compuesto un digno candidato para ser evaluado como agente antitumoral con acción terapéutica.

CONCLUSIONES

- ▶ El compuesto β -D Maltopiranosido de (25*R*)-espirost-5-eno-3 β -ilo (MD-OH) induce una disminución de la densidad celular en cultivos de las líneas tumorales MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1 de manera dependiente de la dosis, con una CI50 de 78, 36 y 52 μ g/ml respectivamente.
- ▶ El MD-OH presenta una baja actividad necrótica (< al 11%) en las líneas tumorales MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1, así como en las células linfocíticas.
- ▶ El compuesto MD-OH induce a las células tumorales MDA-MB-231, CaSki y Sk-LU-1 a una muerte por apoptosis dependiente de la caspasa-3 activa.
- ▶ El compuesto MD-OH a concentraciones de 36, 52 y 78 μ g/ml afecta considerablemente el potencial proliferativo de las células linfocíticas humanas a 72h.

PERSPECTIVAS

A pesar de demostrar el compuesto MD-OH induce una muerte apoptótica a líneas tumorales provenientes de cáncer de mama, cervicouterino y de pulmón, sería conveniente ampliar este estudio, en más líneas celulares tumorales, tanto de estos cánceres como de otros tipos para tener un mayor conocimiento del comportamiento de este compuesto.

Así mismo por medio de otras técnicas se podría evaluar la muerte por apoptosis como el fraccionamiento de ADN (Alfaro, 2000) y el fraccionamiento de la enzima Poli ADP-Ribosa (PARP), fraccionada en estadios apoptóticos tardíos por parte de la caspasa 3 (ejecutora) (Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007). Se reporta que este sustrato es cortado en dos fragmentos de 89 y 24 kDa cada uno, que se pueden determinar por Western o inmunohistoquímicamente con el anticuerpo PARP-p89 (Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Huerta *et al.*, 2007) (Martínez, 2005).

La actividad antiproliferativa, no necrótica e inductora de apoptosis presente en el compuesto diosgenínico MD-OH hace de este compuesto un digno candidato para ser estudiado en modelos *in vivo* con la intención de evaluar su potencial terapéutico.

APÉNDICE

A) Medio de cultivo

RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; Gibco, E.U.A.) -----10.42 g

NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----2 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. Y se suplementa al 1% Estreptomicina/Penicilina. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 μm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino (SFB) o con suero de ternera neonatal (STN), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.22 μm.

Composición del RPMI-1640 (Gibco, E.U.A.)

SALES INORGÁNICAS	mg/l	L-triptofano	5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1	L-prolina	2
KCL	4	L-tirosina	28.33
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	L-serina	3
NaCl	6000	L-valina	2
NaHCO ₃	2000	L-treonina	2
Na ₂ HPO ₄	8	VITAMINAS	
AMINOÁCIDOS	mg/l	Biotina	0.200
L-arginina.HCL	2	panotenoato de calcio	0.250
L-asparigina.H ₂ O	5	cloruro de colina	3
L-ácido aspártico	2	ácido fólico	1
L-cistina	65.20	Inositol	3
L-ácido glutámico	2	nicotinamida	1
L-glutamina	3	ácido p-aminobenzóico	1
Glicina	1	piridoxina.HCL	1
L-histidina.HCL.H ₂ O	1	Riboflavin	0.200
Hidroxiprolina	2	tiamina.HCL	1
L-isoleucina	5	vitamina B12	0.005
L-leucina	5	OTROS COMPONENTES	
L-lisina.HCL	4	Glucose	2
L-metionina	1	Glutaciona	1
L-fenilalanina	1	rojo de fenol	5

Desactivación del suero

Tanto el SFB (suero fetal bovino; Hyclone, E.U.A.) como el STN (suero de ternera neonatal; Gibco, E.U.A.) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a un baño maría 57 °C durante 30 min.

Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico estériles para su mejor uso y manipulación.

B) 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 solubilizan en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	8.00 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	2.16 g
Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 1 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por calor húmedo, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

C) Solución de ácido acético (10%)

A 10 ml de ácido acético glacial (J. T. Baker) se llevan a un volumen de 90 ml con agua bidestilada.

D) Glutaraldehído

Esta solución la utilizamos para fijar las células. La tendencia a formar uniones cruzadas hace del glutaraldehído un fijador útil, además para mantener la integridad estructural de los tejidos. Se prepara tomando 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada. Se almacena a 4 °C.

E) Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes (CaSki) y funciona como agente quelante que atrae iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

Tris base (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	3.04 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	0.04 g
Etilen- diamen- tetra- acetico (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	0.40 g

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

F) Colorante cristal violeta (0.1%)

NaOH (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	3.96 g
Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A.) -----	1 g

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.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ American Cancer Society. (2014). Cáncer de seno (mama) [fecha de consulta: 9 de marzo de 2016] American Cancer Society. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002284-pdf.pdf>
- ❖ American Cancer Society. (2014). Prevención y detección temprana del cáncer de cuello uterino. [fecha de consulta: 9 de marzo de 2016] American Cancer Society. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002580-pdf.pdf>
- ❖ American Cancer Society. (2014). Prevención y detección temprana del cáncer de pulmón. [fecha de consulta: 9 de marzo de 2016] American Cancer Society. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/acspc-044386-pdf.pdf>
- ❖ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Raberts, K., Watson. (2002). *Molecular biology of the Cell*. 4a ed. Garland Publishing Inc. New York. Pág 1294.
- ❖ Alfaro E., Garcia C., Dueñas A., (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Rev. Inst Nal Cancerol (Mex). Vol. 46, Núm. 4. Oct-Dic. p 275- 280.
- ❖ Anaya, L. (2003). *Ecología Química*, UNAM. Plaza y Valdés editores. México. pp. 53-59.
- ❖ Baynes J. M. y Dominiczak M. H. (2008). *Bioquímica médica*. 2a edición. Editorial Elsevier. España, 703 pp.
- ❖ Berumen-Campos J. (2003). *Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix*. Gac. Méd. Méx. Vol.139, Suplemento No. 4

-
- ❖ Cai, J., Liu, M., Wang, Z., and Ju, Y. (2002). Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 25. pp.193-96.
 - ❖ Camoutsis, C., Trafalis, D. (2005). *On the formation of 4-[N, N-bis (2-chloroethyl) amino] phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity.* *Farmaco*, Vol. 60, Núm. 10. pp. 826-829.
 - ❖ Castellsagué, X. (2008). *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.* *GynecolOncol.* Vol. 110. pp. 4-7
 - ❖ Chavaro Vicuña N., Arroyo Hernández G., Felipe Alcázar L., Muruchi Garrón G., Pérez Zuñiga I., (2009). Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología México.* (en línea). [fecha de consulta: 10 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaradmex/arm-2009/arm091g.pdf>.
 - ❖ Dubin, Marta and Stoppani Andres O.M. (2000). Muerte Celular Programada y Apoptosis. Función de las mitocondrias. [en línea] *MEDICINA VOL 60, N° 3.* P. 375-386. [fecha de consulta: 9 de marzo de 2016]. Disponible en: http://www.medicinabuenaosaires.com/revistas/vol60-00/3/v60_n_3_p375_386.pdf
 - ❖ Elena A. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología.* [en línea]. (2002). N° 60. [fecha de consulta: 10 de agosto 2014]. Disponible en: http://www.bidi.uam.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=62:citar-recursos-electronicos-normas-apa&catid=38:como-citar-recursos&Itemid=65#2
 - ❖ Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516.
 - ❖ Fernández, H. M. (2010). *Síntesis de derivados esteroideos con actividad biológica: Anticancerígenos y Promotores del crecimiento vegetal.* "Tesis doctoral". Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. pág. 154
 - ❖ González Ballesteros Mauricio Misael. (2013). *Efecto antitumoral de la saponina esteroideal O-[α-L ramnopiranosil (1 →4)-β-D- glucopiranosido de (25R)-espirost-*

5-en-3 β -ilo (Diosgenina Di) en líneas celulares de cáncer cervicouterino.
Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

- ❖ Hostettmann, K., Marston, A. (1995). *Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press: New York.
- ❖ Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S. y Livingston, E. (2007). Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* 139: 143-156.
- ❖ INEGI (2016). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 9 de marzo de 2016. Disponible en: www.inegi.com
- ❖ Karp, G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. 4ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. Pág. 899.
- ❖ Kueng, K., E. Silfer, & V. Eppenberger. (1989). *Quantification of cells cultured on 96-well plates*. *Anal. Biochem.* Vol. 182. pp.16-19.
- ❖ Lazcano-Ponce, E., Moss, S., De Ruiz, P., Castro, J., & Avila, M. (1999). *Cervical cancer screening in developing countries. Why is it ineffective? The case of Mexico*. *Archives of Medical Research*.Vol. 30. pp. 240-250.
- ❖ Liu M. Wang Z. Ju Y. Zhou J. Wang Y. & Wong R. (2004). The Mitotic-Arresting and Apoptosis-Inducing Effects of Diosgenyl Saponins on Human Leukemia Cell Lines. *Biol Pharm Bull* 27: 1059-1065.
- ❖ Lizarbe M. (2007). *El suicidio y la muerte celular*. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101: 1-33.
- ❖ Lomanto Díaz L., Ortiz Cala L., Bretón Pinto C., Gómez Lizcano I., Mesa Cornejo V., (2003). El Ciclo Celular. *Med UNAB*. [en línea]. 16 de febrero de 2003. [fecha de consulta: 10 de agosto de 2014]. Disponible en: http://www.biologia.bio.br/curso/r616_ae_c1.pdf
- ❖ López Dávila, M. (2013). *Efecto antitumoral de los derivados Sapogenínicos provenientes de la Diosgenina*. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ❖ Manson A., Jones E., Morris L., (2003). *Lo esencial en célula y genética*. 2º Edición. Ed. ELSEVIER. Madrid, España. p. 3

-
- ❖ Martínez, T., Bénitez, D., Zafra, T. and Pastor, F. (2005). Método isotópico para la determinación de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP-1) en muestras biológicas. *Química Clínica*, [online] (24 (6). Available at: [http://file:///C:/Users/Andrea%20Acosta/Downloads/QC_2005_464-467%20\(2\).pdf](http://file:///C:/Users/Andrea%20Acosta/Downloads/QC_2005_464-467%20(2).pdf) [Accessed 6 Apr. 2016].
 - ❖ Morgan, S. J. and Darling, D. C. (1993). *Introduction to Basic Cell Culture: Animal Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. Pág.162
 - ❖ Morzycki J. & Wojtkielewicz A. (2002). Synthesis of a cholestane glycoside OSW-1 with potent cytostatic activity. *Carbohydr Res* 337:1269-1274.
 - ❖ Ortega S., Malumbres M. y Barbacid M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cáncer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602: 73-87.
 - ❖ Pardo, F. (1998). *Anatomía patología general y especial de las neoplasias*. Editorial Científico- Médico. España. p. 335
 - ❖ Pérez C. E. (2010). Efecto antiproliferativo y apoptótico de la saponina (20S-25R)-3 β , 16 β -diacetoxi-12,22-dioxo-5 α -colestano-26-ilo ξ -D-glucopiranosido (26-OH-He-Glu) en células provenientes de cáncer cervicouterino. Trabajo de grado, Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
 - ❖ Podolak Irma, Galanty Agnieszka, Sobolewska Danuta; (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev. Sep.* 9(3), 425-474
 - ❖ Ramírez Agudelo, María Elena; Rojas López, Mauricio; (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, Junio-Sin mes, 166-177.
 - ❖ Ross & Pawlina. (2007). *Texto y Atlas color de Biología Celular y Molecular*. 5^o Edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. p. 98-101
 - ❖ Schlaepfener, L. and Mendoza-Espinoza, J. (2010). Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, [online] (Vol 41 Num. 4), pp.18-27. Available at: https://www.researchgate.net/profile/Loraine_Schlaepfer2/publication/237036865_Las_plantas_medicinales_en_la_lucha_contra_el_cncer_relevancia_para

_Mxico/links/0a85e53a367224f7c3000000.pdf#page=18 [Accessed 6 Apr. 2016].

- ❖ Taleisnik Samuel. (2006). Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de Biología celular. 1° Edición. Ed. ENCUENTRO. Argentina. P. 254-264
- ❖ Tjalma W., Arbyn M., Paavonen J., Van W. y Bogers J. J. (2004). Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 14:751-761.
- ❖ Tobari, A., Teshima, M., Koyanagi, J., Kawase, M., Miyamae, H., Yoza, K., Takasaki, A., Nagamura, Y., Saito, S. (2000). *Eur. J. Med. Chem.* Vol. 35. pp. 511-527.
- ❖ Vallejo M.C., Hernanz R., Fernández E. (2007). Tratamiento radioterápico carcinoma no microcítico pulmón. *Rev. Patol Respir*, 10 (2), 110-117
- ❖ Vázquez-Ortíz G., Piña-Sanchez P., Hidalgo A., Lazos, M., Moreno, J., Alvarado, I., Cruz, F., Hernández, D., Pérez-Plascencia C., Salcedo, M. (2005). *Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados.* *Rev. Invest. Clin.* Vol. 57. pp. 434-441.
- ❖ Yu W. & Jin Z. (2002). Total Synthesis of An Antitumor Natural Product OSW-1. *J Am Chem Soc* 123:3369-3370.
- ❖ Zhivotovsky, B. y Orrenius, S. (2001). Current Concepts in Cell Death. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.1.1-18.1.18.