



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA

***ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA DIOSGENINA EN
TUMORES INDUCIDOS POR LA LÍNEA CELULAR JC
EN RATONES BALB/C***

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

PRESENTA

Sergio García Sánchez

DIRECTOR DE TESIS

DR. Luis Sánchez Sánchez

Ciudad de México, Octubre 2017



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).





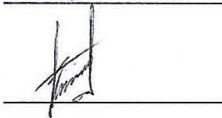
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 "ZARAGOZA"
 DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **GARCÍA SÁNCHEZ SERGIO**, con número de cuenta **413005577**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de octubre de 2017** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. BENNY WEISS STEIDER 
- VOCAL** Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ 
- SECRETARIO** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ 
- SUPLENTE** M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ 
- SUPLENTE** M. en C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ 

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antitumoral de la Diosgenina en tumores inducidos por la línea celular JC en ratones BALB/C.**

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 28 de septiembre de 2017


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

Agradecimientos

Al Dr. Luis Sánchez por brindarme la oportunidad, los conocimientos y los recursos que ayudaron a mi formación profesional.

Al M. en C. Vicente Hernández por compartir sus conocimientos y consejos que fueron indispensables para la realización de este trabajo.

Al Dr. Hugo López por su invaluable conocimiento que ayudo a enriquecer mi trabajo.

A la Dra. Luisa Escobar por sus asesoría y contribuciones que ayudaron a la realización de este trabajo.

Al Dr. Benny Weiss y a la M. en C. Reynalda Roldán cuyas observaciones contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

Este trabajo fue desarrollado bajo el financiamiento del proyecto PAPIT IN220917 y de los proyectos CONACYT 258156, 258881 y 253979.

Dedicatoria

A mi madre, quien con su ejemplo de dedicación y esfuerzo hizo esto posible, siempre te estaré agradecido por brindarme el apoyo y la motivación para alcanzar mis metas.

A mis hermanos Víctor y Gustavo por alentarme a continuar en cada momento.

A los hermanos que yo elegí por el apoyo y tantos buenos momentos.

Índice

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
LA CÉLULA	2
MUERTE CELULAR	4
NECROSIS	5
APOPTOSIS	7
DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA APOPTOSIS Y NECROSIS EN SECCIONES DE TEJIDO TEÑIDAS CON HEMATOXILINA/EOSINA (H&E)	9
CÁNCER	10
PÉRDIDA DE PESO ASOCIADA AL CÁNCER	10
CÁNCER DE MAMA	11
FACTORES DE RIESGO	12
DETECCIÓN	13
TRATAMIENTO	15
EFECTOS SECUNDARIOS	17
PRODUCTOS NATURALES	18
SAPONINAS Y SAPOGENINAS	18
DIOSGENINA	20
ANTECEDENTES	20
TOXICOLOGÍA	21
EXCRECIÓN RENAL	22
EXCRECIÓN BILIAR	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
DISEÑO EXPERIMENTAL	28
DETERMINACIÓN DE IC50	28
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LDH	28
DETECCIÓN DE LA CASPASA 3 ACTIVA	29
INOCULACIÓN DE TUMORES	29
INCLUSIÓN	30
PROTOCOLO DE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA	30
INMUNOLocalIZACIÓN DE CASPASA 3 ACTIVA	30
ENSAYO ENZIMÁTICO DE TUNEL	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
RESULTADOS	32
ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA	32
ACTIVIDAD NECRÓTICA EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA	33
ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA	34
EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	36
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS CITADAS	49
APÉNDICE	52

Resumen

Las células cancerosas se pueden multiplicar en ausencia de al menos algunos de los factores estimuladores de crecimiento necesarios para la proliferación de las células normales y son resistentes a señales que normalmente programan la muerte celular (Lodish *et al*, 2005). En particular, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en el ámbito mundial representando el 25% de los casos de cáncer en mujeres. Es también la principal causa de muerte por tumor maligno a nivel nacional con un 30.9% en mujeres mayores de 20 años (INEGI, 2017). Las terapias que se aplican actualmente no son eficientes en estados avanzados de esta enfermedad, por lo que surge la necesidad de explorar el efecto antitumoral de compuestos de origen natural. Entre los compuestos naturales descritos, las saponinas esteroideas han llamado la atención por sus diversas actividades biológicas, destacando la actividad antitumoral. La Dioscina y su aglicona Diosgenina, tienen actividad antiproliferativa y apoptótica en diversas líneas celulares tumorales, así como *in vivo*. Durante la última década, se han llevado a cabo una serie de estudios preclínicos para, comprender el papel de la Diosgenina como agente quimiopreventivo/terapéutico contra varios cánceres. Sin embargo, en estudios en cáncer de mama aún no está claro el papel de esta saponina. En el presente estudio se evalúa el efecto antiproliferativo y apoptótico de la Diosgenina en las líneas celulares de humano MDA-MB-231, MCF-7 y la línea celular murina JC. La actividad antiproliferativa de la Diosgenina fue determinada en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC, mediante tinción con cristal violeta, obteniendo unas IC50s en 3.5, 4.0 y 3.0 µg/ml respectivamente. La actividad necrótica fue evaluada en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares a través de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactatodeshidrogenasa (LDH), considerada un indicador de necrosis. Los resultados mostraron baja o nula actividad de la enzima LDH en las tres líneas celulares. La actividad apoptótica fue evaluada determinando la caspasa 3 activa en las células MDA-MB-231, MCF-7 y JC, donde se observó positividad a caspasa 3 activa en un 4.82, 5.87 y 8.5 % respectivamente, demostrándose que la Diosgenina afecta negativamente la proliferación de células tumorales de mama tanto de humano como murina induciendo muerte celular apoptótica. Así mismo fue evaluada la actividad antitumoral *in vivo*, en ratones hembras de la cepa BALB/C inducidos con 1×10^6 células tumorales JC, a los cuales se les administró vía sonda gástrica 400 mg de Diosgenina por kilogramo de peso del ratón, cada 72 h durante 27 días. Se tomaron medidas de peso de cada individuo, el tamaño del tumor se tomó en su diámetro mayor y menor, el volumen tumoral se determinó usando la fórmula $D \cdot d^2 \cdot \pi / 6$ (D=diámetro mayor, d=diámetro menor). La inducción de tumores fue de un 100 % en los grupos tratados como en los controles. La administración de Diosgenina no provocó cambios en el peso de los individuos tratados ni en los tejidos hepático y renal. Sin embargo, si se presentó una disminución en el tamaño de los tumores así como en su velocidad de crecimiento con respecto al grupo control, determinándose que la administración de Diosgenina, redujo el volumen de crecimiento a un 41.1%, y la velocidad de crecimiento se afectó disminuyendo en un 72%. Los tumores fueron preparados para análisis por histología y se determinó que los tumores tratados con Diosgenina presentaron alteraciones características de muerte celular por apoptosis, lo que fue confirmado por la detección de caspasa 3 activa y la fragmentación del ADN mediante inmunohistoquímica con el ensayo enzimático de TUNEL respectivamente.

Marco teórico

La célula

El término célula agrupa a las células procariotas y a las células eucariotas. Por definición la célula es la unidad más pequeña capaz de manifestar las propiedades del ser vivo. Sintetiza la mayoría de sus constituyentes, utilizando elementos del medio extracelular, crece y se multiplica. Está limitada por la membrana plasmática, que encierra un cierto número de orgánulos. La célula eucariota, contiene un núcleo, orgánulo limitado por una envoltura que encierra el material genético. Las células eucariotas poseen además del núcleo, varios orgánulos característicos y específicos: retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias, endosomas, lisosomas, peroxisomas, citoesqueleto y centrosoma (Figura1) (Maillet, 2003).

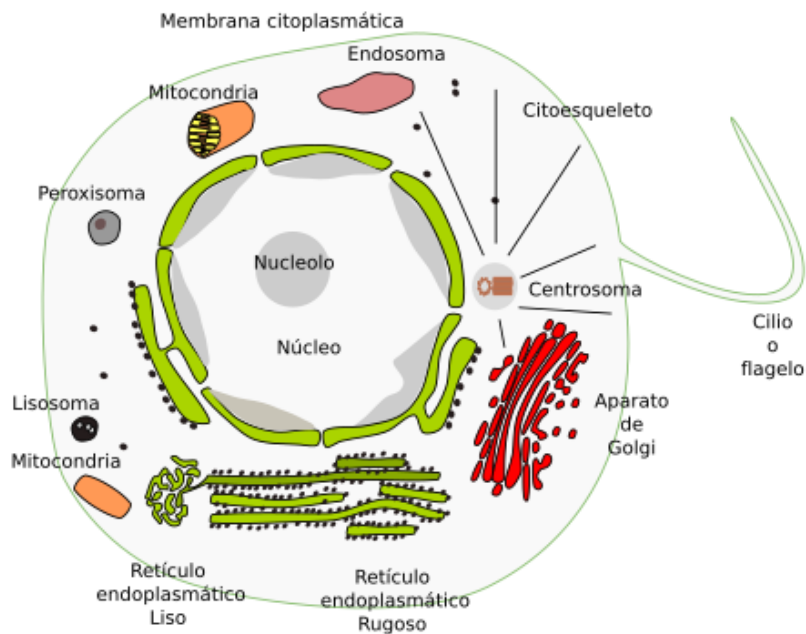


Figura 1.- Características principales de células eucariotas Tomado: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>.

Las células, se generan por división celular, un proceso en el cual el contenido de una célula “madre” se distribuye dentro de dos células “hijas”. En una población de células en división, cada célula pasa por una serie de etapas que constituyen el ciclo celular (Karp, 2013).

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los que duplica su contenido genético (ADN) y luego se divide en dos. Además de duplicar su genoma, las células también duplican sus orgánulos y macromoléculas; de lo contrario, las células hijas se volverían más pequeñas con cada división. Para mantener su tamaño, las células en división tienen que coordinar su crecimiento con su división (Alberts *et al*, 2007). El ciclo celular se divide en cuatro fases principales, en la fase G_1 las células sintetizan ARN y proteínas, para prepararse para la síntesis de ADN y la replicación de los cromosomas durante la fase S. Después de avanzar por la fase G_2 , las células empiezan el proceso de mitosis, también llamado fase M, que concluye con la división celular. En los organismos multicelulares la mayoría de las células diferenciadas “salen” del ciclo celular y sobreviven durante días, semanas o en algunos casos incluso durante toda la vida del organismo sin dividirse de nuevo. Estas células postmitóticas por lo general salen del ciclo celular en G_1 e ingresan en un estado denominado G_0 (Figura 2). Algunas de estas células en G_0 pueden volver al ciclo celular y reanudar su replicación (Lodish *et al*, 2005). La tendencia de las células háticas a dividirse después de una hepatectomía parcial puede considerarse un ejemplo de estimulación de células en G_0 que vuelven entrar en el ciclo celular (Pitot, 1981); este reingreso es regulado, lo que proporciona un control de la proliferación celular. En los organismos multicelulares, el control del ciclo celular durante el desarrollo y el crecimiento es crítico para determinar el tamaño y la forma de cada tejido. La replicación celular es controlada por una red compleja de vías de señalización que integran señales extracelulares e intracelulares (Lodish *et al*, 2005).

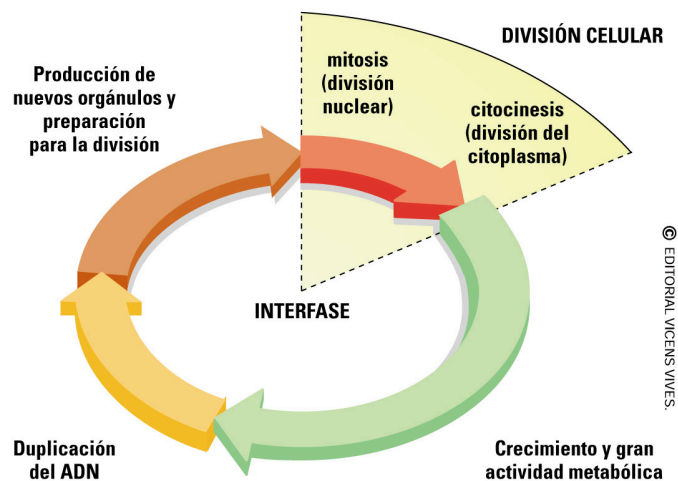


Figura 2.- Las fases del ciclo celular en las células eucariontes. Tomada de [http:// www.vicensvives.com.mx](http://www.vicensvives.com.mx)

La progresión del ciclo celular está controlada por múltiples factores de crecimiento, los cuales determinan el comportamiento de la célula, incluyendo la decisión de crecer, diferenciarse o morir. Todos estos factores actúan en el ciclo afectando las proteínas que lo regulan. Entre las proteínas

reguladoras positivas más importantes se encuentran las ciclinas, que constituyen la subunidad reguladora de otras proteínas relacionadas conocidas como proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estos complejos Ciclina-CDK son los reguladores clave para la transición de una fase a otra en el ciclo celular (Figura 3). Además de los genes de las ciclinas, existen otro grupo de genes de respuesta temprana, que tienen un papel muy importante en las fases tempranas del ciclo celular, y que son activados por los factores de crecimiento. Las proteínas supresoras de tumores como la proveniente del gen del retinoblastoma RB y la proteína p53, que actúan en la fase G1 regulándola de manera importante. La proteína RB tiene como función principal inhibir la transición de la fase G1 a S (Figura 3). Su actividad depende de su estado de fosforilación: si RB no está fosforilada (estado activo), se encuentra unida al factor de transcripción E2F evitando su translocación al núcleo y la activación de genes necesarios para la síntesis del ADN; y si es fosforilada, por complejos ciclina-CDK, el E2F se libera y se produce proliferación celular (López, 2003). En algunas circunstancias, como cuando el daño del ADN es extenso, p53 también activa la expresión de genes que conducen al proceso de muerte celular (Lodish *et al*, 2005).

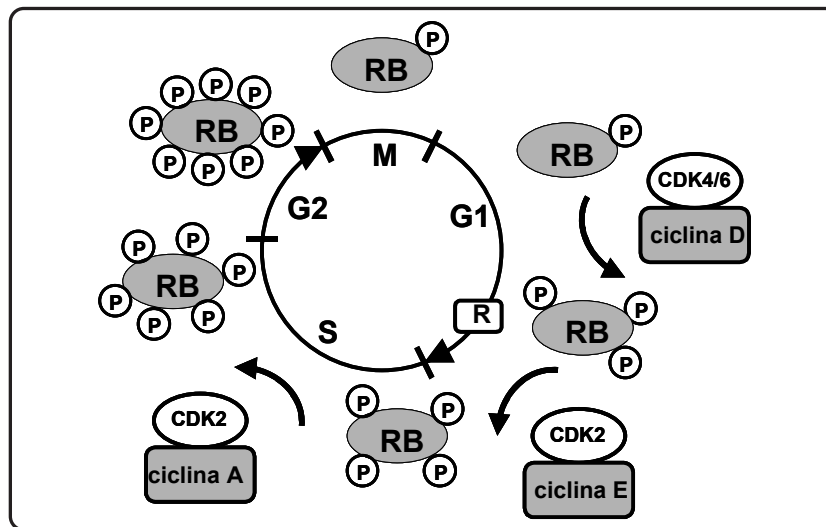


Figura 3.-La participación de los complejos ciclina-CDK en el control del ciclo celular, el complejo ciclina-CDK se encarga de la fosforilación de la proteína RB. Si el complejo la fosforila, la célula prolifera porque libera al factor de transcripción E2F el cual se transloca al núcleo y activa genes necesarios para la proliferación celular. Tomada de www.bogler.net/lab/p53cellcycle.html.

Muerte celular

El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites constantes; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. El recambio celular en los tejidos de un organismo se fundamenta en el mantenimiento de un

equilibrio (homeostasis) entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular, cambios metabólicos y de expresión génica, a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte (Lizarbe, 2007). Las interacciones celulares regulan la muerte celular en dos formas fundamentales. Primero, en los organismos multicelulares la mayoría de las células, si no todas, requieren señales para mantenerse vivas. En ausencia de señales de supervivencia, denominados factores tróficos, las células activan un programa de suicidio “apoptosis”. Segundo, en algunos contextos de desarrollo, incluido el sistema inmunitario, señales específicas inducen un programa de asesinato celular “necrosis” (Figura 4) (Lodish *et al*, 2005).

Necrosis

La necrosis de las células individuales y las células contiguas es irreversible y más a menudo resulta del daño celular agudo: insuficiencia metabólica de la célula, que coincide con el rápido agotamiento de ATP (Elmore, 2016). El proceso básico de necrosis implica pérdida de la integridad de la membrana celular, lo que permite una afluencia de iones extracelulares y fluido, con el resultante hinchamiento de la célula y sus orgánulos. Otro mecanismo celular de necrosis implica el compromiso de las membranas de orgánulos, que permite a las enzimas proteolíticas escapar de los lisosomas, entrar en el citosol, lo que resulta en la digestión no regulada de los componentes celulares y la destrucción de la célula. Por microscopía electrónica, la célula necrótica exhibe algunas de las características morfológicas comunes, tales como un citoplasma cada vez más translúcido, hinchazón de los orgánulos, la dilatación de la membrana nuclear y la condensación de la cromatina en parches pequeños e irregulares circunscritas, y el aumento de volumen de la célula (Vandenabeele *et al*, 2010). Este volumen celular aumentado finalmente dará lugar a disrupción de la membrana plasmática, con fuga no controlada de componentes celulares en el citosol y en el espacio intersticial y el posterior reclutamiento de células inflamatorias (Shen *et al*, 2013). La necrosis puede ocurrir en cualquier tejido y se caracteriza por la pérdida de integridad celular en una sola célula o en células contiguas y es generalmente asociado con los restos celulares y la inflamación (Ziegler y Groscurth, 2004). El patrón puede variar, dependiendo de la naturaleza de la agresión y el tejido (de una sola célula, focal, multifocal, difuso, centrolobulillar, zonal, etc.). En general, “necrosis, de una sola célula” describe células individuales, no contiguas en un tejido que se caracterizan por la hinchazón nuclear y el citoplasma pálido. Esto es en contraste a la célula más pequeña, encogida hipereosinófila apoptótica. Las células necróticas también pueden mostrar disolución nuclear (cariolisis) y/o

fragmentos nucleares (cariorrhexis). Cierta grado de condensación nuclear (picnosis) puede estar presente, aunque menos de lo que ocurre con la apoptosis. Escombros celulares adyacentes y la inflamación, (neutrófilos, macrófagos, etc.), también pueden estar presentes si se ha producido la ruptura de la membrana celular (Elmore, 2016). Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (Berek y Hacker, 2010). Los cambios tempranos incluyen aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células en la vecindad. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar (Sánchez y Diosdado, 2003).

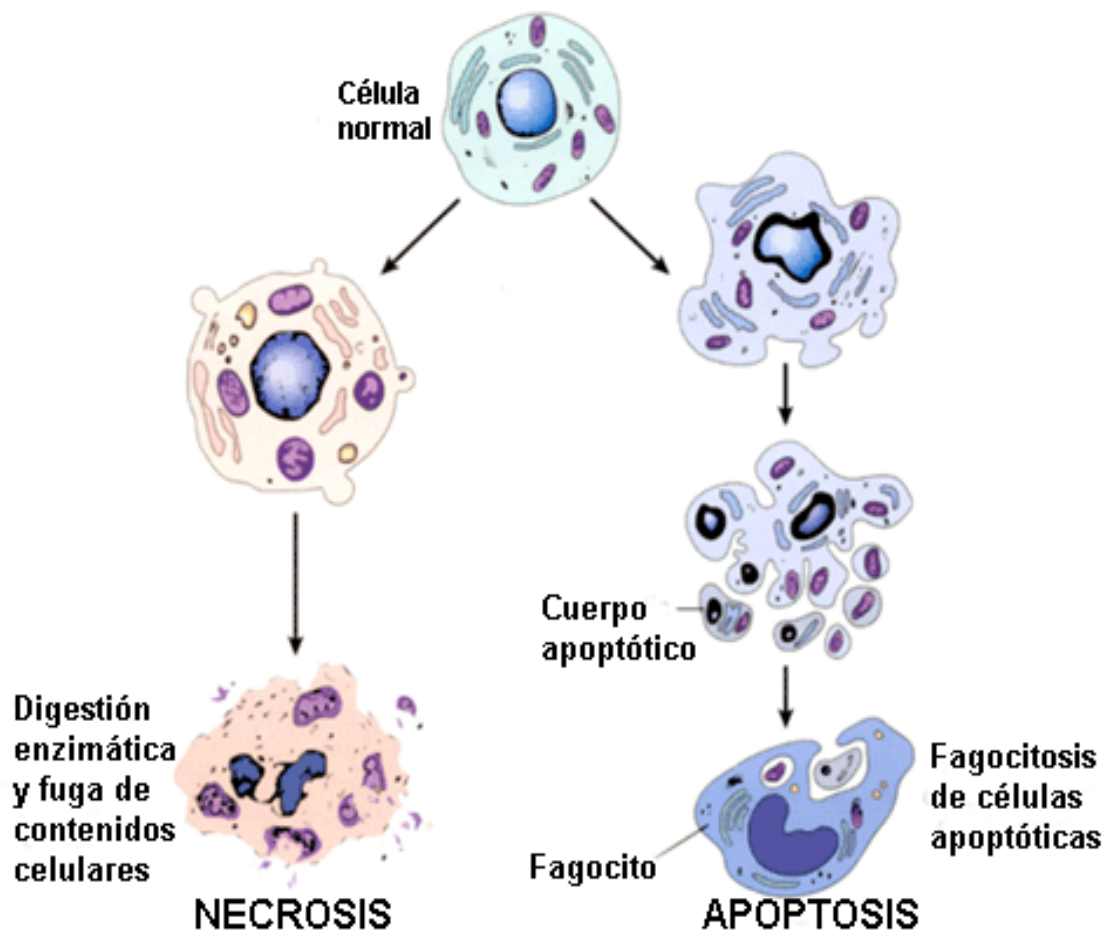


Figura 4. Esquema comparativo de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y por necrosis. Tomado de <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-5.-bases-celulares-del-envejecimiento/5.4-la-muerte-celular-necrosis-y-adoptosis>.

Apoptosis

La apoptosis, descrita como “muerte celular programada”, fue descrita por primera vez por Kerr, es un proceso de muerte celular que está mediada por un programa controlado genéticamente, que requiere energía (Kerr *et al*, 1972). Las tres principales vías de la apoptosis son 1) la funcionalidad de las mitocondrias (mitocondrial o vía intrínseca), 2) la transducción directa de la señal a través de proteínas adaptadoras (receptores de muerte o de la vía extrínseca) y 3) la ruta perforina/granzima (Figura 5) (Elmore, 2007). Una de las características clave de la apoptosis es la escisión de las proteínas del citoesqueleto por proteasas-aspartato específicas, lo que resulta en el colapso de los componentes subcelulares. Esto puede ser visto histológicamente como condensación citoplasmática, nuclear y fragmentación nuclear. Es importante destacar que, para las tres vías, la integridad de la membrana plasmática persiste hasta tarde en el proceso. Esto impide la liberación de los componentes celulares en el citosol y por lo tanto la falta de inflamación. Eventualmente las células apoptóticas y fragmentos (cuerpos apoptóticos) exteriorizan la fosfatidilserina en la membrana celular, lo que resulta en el reclutamiento y engullimiento por los macrófagos (Elmore, 2016).

Los mecanismos de la apoptosis son muy complejos y sofisticados, involucran una cascada dependiente de la energía de eventos moleculares (Elmore, 2007). La vía intrínseca se caracteriza por aumento de la permeabilidad de la mitocondria, la liberación de citocromo c, la formación de un complejo multiproteico llamado el “apoptosoma” y la iniciación de la cascada de caspasas a través de la caspasa 9. La vía extrínseca implica ligandos pro-apoptóticos (es decir, FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, etc.), la unión con los receptores de muerte transmembranales (miembros de la superfamilia del gen receptor del factor de necrosis tumoral), la transducción de señales intracelulares, la unión de proteínas adaptadoras, la iniciación induce a la muerte de señalización de la formación del complejo señalización inductor de muerte (DISC), y luego de la cascada de caspasas a través de la caspasa 8. La vía perforina/granzima está implicada en la citotoxicidad mediada por células T y se caracteriza por la secreción de la transmembranal perforina, molécula formadora de poros, la liberación exófito de gránulos citoplásmicos que contienen proteasas de serina (granzimas) a través del poro y en la célula diana, y entonces o bien la iniciación de la cascada de caspasas a través de la caspasa 10, la iniciación directa de la caspasa 3, o una caspasa escisión de ADN independiente a través de un complejo SET (nucleosoma proteína de ensamblaje SET, Ape1, PP32, HMG2). Factores que determinan qué ruta apoptótica se activan, incluyen la etapa del ciclo celular, el tipo y la magnitud de los estímulos, y, para las células inmunes, la etapa de la activación celular. Diferentes vías apoptóticas pueden ocurrir simultáneamente (Elmore, 2016). A diferencia de la necrosis, la apoptosis puede ser, en determinadas circunstancias, reversible. Un ejemplo es la reversibilidad de la apoptosis inducida por p53. La p53 es una proteína supresora de tumores, se activa mediante una variedad de

estímulos celulares tales como el ADN dañado, el agotamiento de nucleótidos, hipoxia y choque térmico. Se ha descrito que las células apoptóticas inducida por p53 pueden ser rescatados de las primeras etapas del proceso apoptótico. La reparación del ADN ha demostrado ser activado en etapas tempranas en la apoptosis inducida por p53 y podría modular el proceso de muerte celular si se eliminó el estímulo apoptótico (Geske *et al*, 2001).

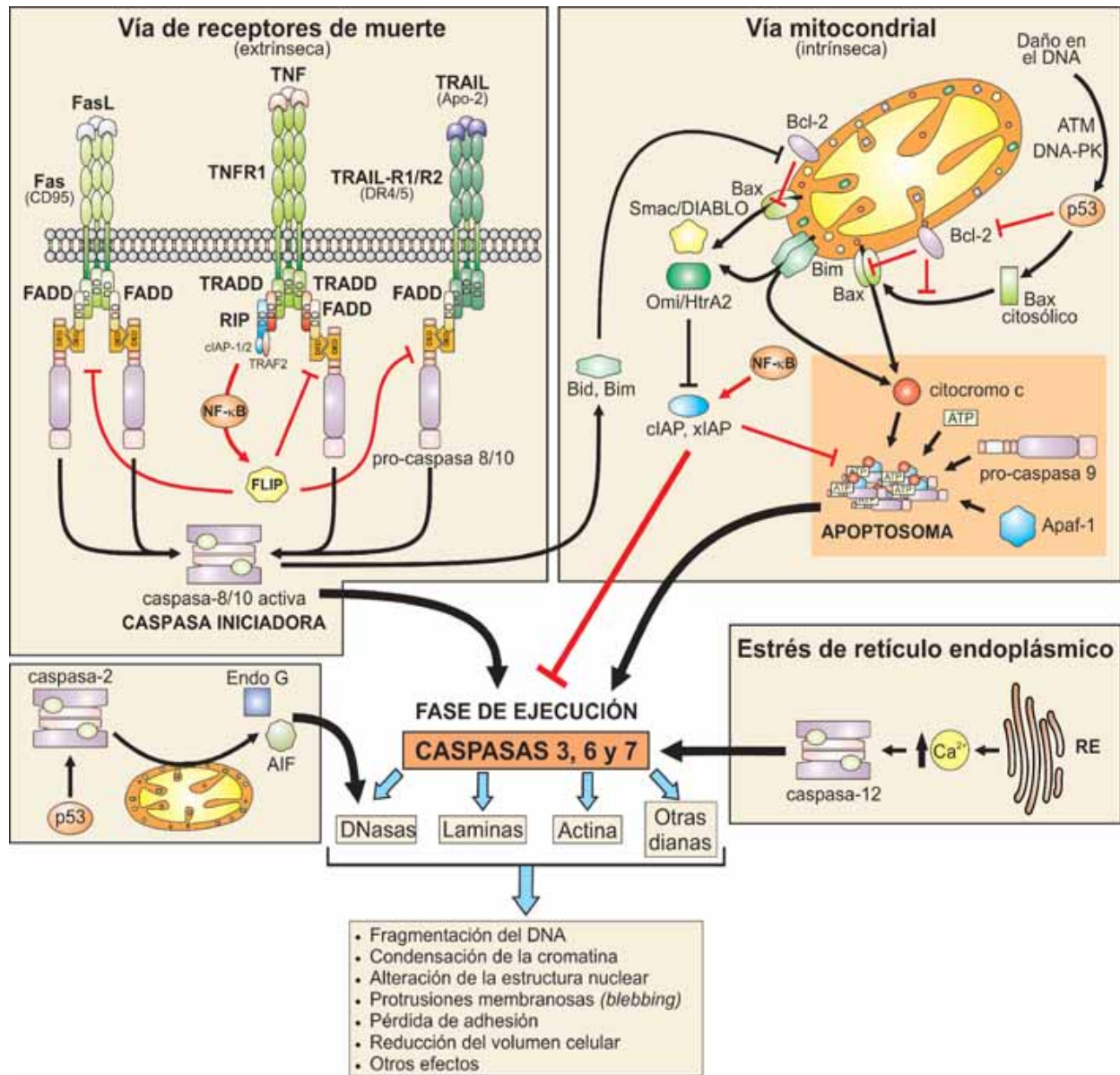


Figura 5.- Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis. Dependiendo del tipo de estímulo apoptótico, se pueden activar distintas rutas iniciadoras de la cascada de señales del programa de apoptosis. La vía extrínseca, vía mitocondrial o intrínseca y el estrés de retículo endoplásmico en la que se altera la homeostasis de calcio. Tomado y modificado Lizarbe, 2007.

Descripción de las características morfológicas de la apoptosis y necrosis en secciones de tejido teñidas con Hematoxilina/Eosina (H&E)

En general, las células apoptóticas se producen, como células individuales no contiguas o pequeños grupos de células solas o dispersos dentro de una sección de tejido (Elmore *et al*, 2014). Sin embargo, la inducción experimental puede resultar en apoptosis masiva de todas o la mayoría de las células. La célula apoptótica clásica es más pequeña que las células circundantes con un pequeño núcleo picnótico (debido a la condensación de la cromatina) y, dependiendo del tipo de célula, citoplasma hipereosinofílico (debido a la condensación citoplasmática). El núcleo también puede ser fragmentado (cariorrhexis). Fragmentos de células apoptóticas, llamados “cuerpos apoptóticos”, se forman por la reorganización y desintegración del citoesqueleto, mediada por la inducción de la caspasa 3 (Elmore, 2007; Taylor *et al*, 2008). Cuerpos apoptóticos tienen ya sea un fragmento nuclear picnótico con o sin el citoplasma asociado o citoplasma solo. Macrófagos con cuerpos teñibles, que son macrófagos que contienen uno o más cuerpos apoptóticos citoplasmáticos, también pueden estar presentes. Es importante recordar que los macrófagos no pueden ser vistos en todos los tejidos, como el hígado. Pueden ser un hallazgo normal en algunos tejidos, comúnmente en la corteza timo y centros germinales de los ganglios linfáticos y el bazo. También pueden estar presentes en las regiones de células T de todos los órganos linfoides, como resultado del tratamiento, y en neoplasias linfoides (efecto “cielo estrellado”). Debido a que la membrana celular de una célula apoptótica no se vea comprometida, generalmente no hay inflamación asociada con la apoptosis. Sin embargo, una célula apoptótica ocasional puede estar asociada con focos inflamatorios (Elmore *et al*, 2014). A veces puede ser difícil distinguir la apoptosis de la necrosis utilizando la morfología celular en portaobjetos teñidos con H&E. Si es importante para distinguir qué proceso (apoptosis o necrosis) es el que está ocurriendo, a continuación, una variedad de pruebas adicionales, se pueden realizar (Krysko *et al*, 2008). Hay una variedad de ensayos de caspasa incluyendo aquellos que se dirigen a caspasas iniciadoras (8 vía extrínseca, 9 vía intrínseca, 10 vía perforina/granzima), los que se dirigen a las caspasas efectoras (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14) y un kit de policaspasas (Kaufmann *et al*, 2008). Las pruebas para la actividad de caspasa se pueden realizar en tejidos embebidos en parafina fijados con formalina, tejidos congelados y células cultivadas (células enteras o lisados de células).

Las pruebas más comúnmente utilizadas incluyen la caspasa 3, un efector clave en la vía de la apoptosis, y la de ensayo enzimático del Marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL por sus siglas en inglés) que etiqueta e identifica roturas de la doble hebra de ADN (Elmore, 2016).

Cáncer

El ciclo celular se regula por una competencia y un balance entre reguladores negativos y positivos de la proliferación, que determina cuando una célula prolifera, se diferencia o muere. El ciclo celular se regula de manera positiva para producir la proliferación celular, y de manera negativa para inhibirla. Entre las principales moléculas que regulan positivamente el ciclo celular se encuentran las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las ciclinas y los protooncogenes; reguladores negativos donde participan las proteínas supresoras de tumores y las proteínas inhibidoras de las CDK, entre otras. Una falla en la regulación del mecanismo de control del ciclo celular, como la activación o desactivación, la disminución o el aumento en la expresión o la mutación de las proteínas que controlan el ciclo celular ocasiona una proliferación celular excesiva y como consecuencia, la aparición de un proceso maligno o cáncer (López, 2003).

El cáncer se debe a fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular. Durante el desarrollo normal de organismos, intrincados sistemas de control genéticos regulan el balance entre el nacimiento y la muerte celular en respuesta a señales de crecimiento, inhibición y muerte. Las pérdidas de regulación celular que dan origen a la mayoría o a todos los tipos de cáncer se deben a daños genéticos (Lodish *et al*, 2005). El potencial oncogénico se lleva a cabo mediante dos mecanismos: 1) la degradación defectuosa de los reguladores positivos del ciclo; protooncogenes y 2) el aumento en la degradación de los reguladores negativos; genes supresores de tumores (López, 2003). Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan (Alberts *et al*, 2007). De acuerdo a su origen existen dos grandes grupos de neoplasias malignas; a los derivados del tejido epitelial se les denomina carcinomas, en contraparte a las neoplasias malignas derivadas del tejido conectivo se les denomina sarcoma. Existen otras neoplasias malignas que no encajan en la categoría del tejido epitelial ni en la del tejido conectivo. A estos tumores se les agrupa de acuerdo a su tejido de origen y se mencionan a continuación: linfomas derivados de tejido linfoide sólido y leucemias derivados de elementos hematopoyéticos que circulan en la sangre (Medina, 2009).

Pérdida de peso asociada al cáncer

La caquexia se define como la pérdida de peso y el desgaste progresivo del músculo esquelético y de la grasa, los pacientes con caquexia avanzada se caracterizan por anorexia, saciedad temprana, pérdida de peso severa, debilidad, anemia y edemas. Se ha estimado que la mitad de la población con cáncer sufre caquexia; la prevalencia se incrementa de 50% a más de 80% en etapas avanzadas o terminales, siendo en más de 20% de los pacientes la principal causa de muerte. Al tiempo del

diagnóstico, 80% de los enfermos con cáncer gastrointestinal y 60% de los individuos con tumores malignos primarios de otros sitios, tienen pérdida de peso sustancial (Sosa, 2008).

La caquexia es un estado debilitante de pérdida involuntaria de peso que se caracteriza por el hipercatabolismo de las fuentes de carbono del cuerpo, proteínas y lípidos, para la conversión en energía (Zaki *et al*, 2004). Los mecanismos patogénicos del síndrome de caquexia asociado a cáncer tienen un complejo origen multicausal. Por un lado, existen alteraciones metabólicas que incrementan el gasto energético basal y por otro, existen diversos factores que promueven la pérdida sustancial de apetito, entre los cuales se encuentran las interacciones huésped-tumor, donde las citocinas tienen un papel primordial en el balance energético y control del apetito; las lesiones inducidas por tratamientos radioterápicos o quimioterápicos en la mucosa del tubo digestivo (erosiones, ulceraciones, mucositis, estomatitis); los ayunos o semiayunos prolongados; el dolor y las alteraciones del tránsito intestinal provocadas por resecciones del tubo digestivo (Sosa *et al*, 2008).

Cáncer de mama

La mama está compuesta por glándulas que se llaman lobulillos que pueden producir leche; también presentan unos tubos delgados llamados conductos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón. El tejido de la mama también contiene grasa, tejido conjuntivo, ganglios linfáticos y vasos sanguíneos (Figura 6). El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que empieza en las células de los conductos. El cáncer de mama también puede empezar en las células de los lobulillos y en otros tejidos de la mama. El carcinoma ductal *in situ* es una afección por la que se encuentran células anormales en el revestimiento de los conductos, pero que no se diseminaron fuera del conducto. El cáncer de mama que se diseminó desde donde empezó en los conductos o lobulillos a los tejidos circundantes se llama cáncer de mama invasivo. En el caso del cáncer de mama inflamatorio, la mama está enrojecida e hinchada, y se siente caliente porque las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos de la piel (NIH, 2016).

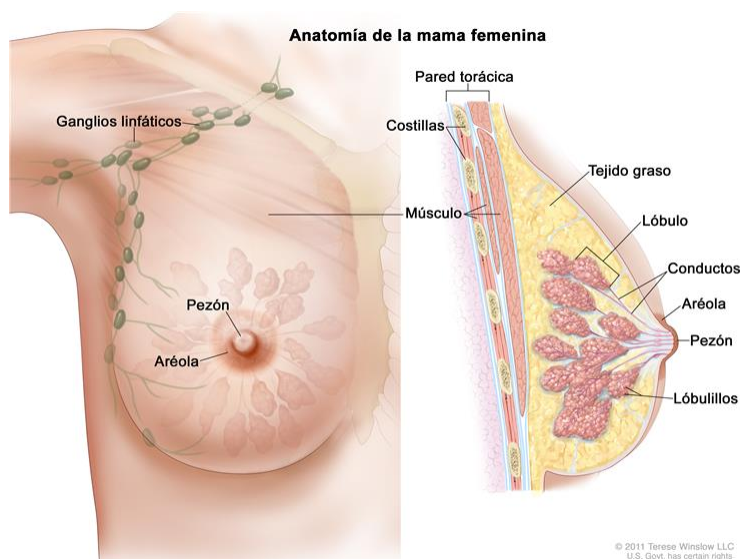


Figura 6.- Anatomía de la mama femenina. Tomado de <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR710874-750.jpg>

En el ámbito mundial, el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población y la más frecuente entre las mujeres con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente, representando el 25% de los casos de cáncer en mujeres. Es también la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer en países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados, después del cáncer de pulmón (Globocan, 2012).

En México durante el 2014 se observó que en las mujeres, el cáncer de mama es el tipo de cuyas tasas de morbilidad hospitalaria muestran los mayores incrementos con la edad (hasta los 64 años de edad), al pasar de 7.43 en el grupo de 20 a 29 años (por cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad) a 218.24 (en el grupo de 60 a 64 años de edad), confirmándose como el tumor maligno de mayor impacto en su salud, y siendo esta última tasa la más alta de todas las de morbilidad hospitalaria por principales tumores malignos entre las mujeres mayores de 20 años de edad (INEGI, 2017)

En el año 2013, se registraron 5,405 defunciones en mujeres con una tasa de 16.3 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de mama son Coahuila 24.2%, Sonora 22.6% y Nuevo León 22.4 % (SECRETARIA DE SALUD, 2015).

Factores de riesgo

La edad avanzada es el factor de riesgo más importante para el cáncer de mama, otros factores de riesgo para este cáncer son; antecedentes familiares, mutaciones de la línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* y otros genes que predisponen al cáncer de mama, ingesta de alcohol, densidad del tejido mamario (mamográfico), estrógeno (endógeno), antecedentes menstruales (menarquía

prematura o menopausia tardía), edad avanzada en el momento del primer parto, antecedentes de tratamiento hormonal, terapia de remplazo hormonal (TRH) combinada de estrógeno más progesterona, obesidad, antecedentes personales de cáncer de mama, antecedentes personales de formas proliferativas de enfermedad mamaria benigna, exposición de la mama o el tórax a la radiación (NIH, 2016).

Detección

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

- **Examen físico y antecedentes:** examen del cuerpo para revisar los signos generales de salud, incluso verificar si hay signos de enfermedad, como masas o cualquier otra cosa que parezca anormal. También se anotan los antecedentes de los hábitos de salud del paciente y los antecedentes médicos de sus enfermedades y tratamientos anteriores.
- **Examen clínico de la mama (ECM):** examen de la mama realizado por un médico u otro profesional de la salud. El médico palpará cuidadosamente las mamas y el área de las axilas para detectar masas o cualquier otra cosa que parezca poco habitual.
- **Mamograma:** radiografía de la mama.
- **Ecografía:** procedimiento para el que se hacen rebotar ondas de sonido de alta energía (ultrasonido) en los tejidos u órganos internos para producir ecos. Los ecos forman una imagen de los tejidos del cuerpo llamada ecograma.
- **IRM (imágenes por resonancia magnética):** procedimiento para el que se usa un imán, ondas de radio y una computadora para crear una serie de imágenes detalladas de ambas mamas. Este procedimiento también se llama imágenes por resonancia magnética nuclear (IRMN).
- **Estudios bioquímicos de la sangre:** procedimiento por el que se examina una muestra de sangre para medir las cantidades de ciertas sustancias que los órganos y tejidos del cuerpo liberan en esta. Una cantidad no habitual (mayor o menor que la normal) de una sustancia puede ser signo de enfermedad.
- **Biopsia:** extracción de células o tejidos en las que un patólogo las observa al microscopio y verifica si hay signos de cáncer. Si se encuentra un bulto en la mama, se puede realizar una biopsia.

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

Las pruebas proveen información sobre los siguientes aspectos:

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

Las pruebas son las siguientes:

- **Prueba de receptores de estrógeno y progesterona:** prueba que se usa para medir la cantidad de receptores de estrógeno y progesterona (hormonas) en el tejido canceroso. Si se encuentra más receptores de estrógeno y progesterona de lo normal, el cáncer se conoce como receptor de estrógeno positivo o receptor de progesterona positivo, o ambos. Este tipo de cáncer crece más rápido. Los resultados de las pruebas indican si el tratamiento que impide la acción de estrógeno y progesterona puede detener el crecimiento del cáncer.
- **Prueba del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu):** prueba de laboratorio para medir cuántos genes HER2/neu hay y cuánta proteína HER2/neu se elabora en una muestra de tejido. Si hay más genes HER2/neu o concentraciones más elevadas de proteína HER2/neu que lo normal, el cáncer se conoce como positivo al HER2. Este tipo de cáncer puede crecer más rápido y es más probable que se disemine hasta otras partes del cuerpo.
- **Pruebas multigénicas:** pruebas en las que se estudian muestras de tejidos para observar la actividad de varios genes a la vez. Estas pruebas pueden ayudar a pronosticar si el cáncer se va a diseminar a otras partes del cuerpo o si va a recidivar (volver).

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

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

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

- **Receptor hormonal positivo** (receptor de estrógeno o receptor de progesterona positivo) o receptor hormonal negativo (receptor de estrógeno o receptor de progesterona negativo).
- **Positivo o Negativo** al HER2/neu.
- **Triple negativo** (receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2/neu negativos).

Esta información facilita la decisión del médico sobre los tratamientos que tendrán el mejor efecto para el cáncer a tratar (NIH, 2017).

Tratamiento

Hay diferentes tipos de tratamiento para las pacientes de cáncer de mama. Se usan cinco tipos de tratamiento estándar (Tabla 1) (SECRETARIA DE SALUD, 2009):

Cirugía: La mayoría de las pacientes de cáncer de mama se someten a cirugía a fin de extirpar el cáncer de la mama.

Radioterapia: Es un tratamiento para el cáncer para el que se usan rayos de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan.

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

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

Terapia dirigida: Es un tipo de tratamiento donde se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas sin dañar las células normales.

Los estadios del cáncer de mama se basan en los resultados de las pruebas que se le hacen al tumor y a los ganglios linfáticos que se extirpan durante la cirugía y en otras pruebas. Para el cáncer de mama se usan los siguientes estadios;

Estadio 0 (carcinoma *in situ*): es una afección no invasiva en la que se encuentran células anormales en el revestimiento de un conducto de la mama.

Estadio I: En el estadio I, el cáncer ya se formó. El estadio I se divide en los estadios **IA** y **IB**. En el estadio **IA**, el tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer no se diseminó fuera de la mama.

En el estadio **IB** se encuentran pequeños racimos de células de cáncer de mama (mayores de 0.2 milímetros, pero no mayores de 2 milímetros) en los ganglios linfáticos.

Estadio II: En el estadio IIA: No se encuentra tumor en la mama, o el tumor mide 2 centímetros o menos. El cáncer (que mide más de 2 milímetros) se encuentra en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentra durante una biopsia de ganglio linfático centinela).

Estadio III: este estadio se subdivide en los estadios **IIIA**, **IIIB** y **IIIC**

Estadio IIIA: En este estadio no se encuentra tumor en la mama o el tumor puede ser de cualquier tamaño. Se encuentra cáncer en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentran durante pruebas con imágenes o un examen físico); o el tumor mide más de cinco centímetros. Se encuentran pequeños racimos de células de cáncer de mama (miden más de 0.2 milímetros pero menos de 2 milímetros) en los ganglios linfáticos; o el tumor mide más de cinco centímetros. El cáncer se diseminó a 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, a los ganglios linfáticos cerca del esternón (se encuentran durante una biopsia de ganglio linfático centinela).

Estadio IIIB: El tumor en este estadio puede tener cualquier tamaño y el cáncer se diseminó a la pared torácica o la piel de la mama, y produjo inflamación o una úlcera. El cáncer también se puede haber diseminado a, no más de nueve ganglios linfáticos axilares, a los ganglios linfáticos cerca del esternón.

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

axilares, ganglios linfáticos por encima o debajo de la clavícula, ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos cerca del esternón.

Estadio IV: En el estadio IV el cáncer se diseminó a otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia a los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro (NIH, 2016).

Estadio	Cirugía	Radioterapia	Quimioterapia	Terapia hormonal	Terapia dirigida
Estadio 0	X				
Estadio IA	X	X		X	
Estadio IB	X	X		X	
Estadio IIA	X	X		X	
Estadio IIIA	X		X	X	
Estadio IIIB	X		X	X	
Estadio IIIC	X		X	X	X
Estadio IV			X	X	X

Tabla 1.- Tratamientos sugeridos/estadio tumoral (SECRETARIA DE SALUD, 2009).

Efectos secundarios

Los medicamentos de quimioterapia están hechos para destruir las células de rápido crecimiento, pero, como estos medicamentos circulan por todo el cuerpo, pueden afectar a las células sanas y normales, así como a las células cancerosas. La causa de los efectos secundarios es el daño ocasionado al tejido sano. (INFOCANCER, 2015).

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del medicamento que se utiliza, pero pueden incluir los siguientes; insuficiencia cardiaca, coágulos de sangre, menopausia prematura, un segundo cáncer como leucemia, anemia, cambios en el apetito, estreñimiento, diarrea, fatiga, síntomas parecidos a la gripe, retención de líquidos, pérdida de cabello, infecciones, esterilidad, cambios en la boca y garganta, náuseas y vómitos, cambios en el sistema nervioso y dolor (NIH, 2016).

Productos naturales

Los productos naturales han sido la fuente más representativa en la obtención de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer, y su enorme contribución se reconoce en el descubrimiento de nuevas moléculas citotóxicas con variados mecanismos de acción (Muños, 2016).

Los mecanismos de defensa de las plantas, a menudo se basan en su capacidad de generar sustancias químicas que posean un efecto citotóxico y sus características únicas, tales como, la selección evolutiva, de poseer actividad biológica, las convierten en una fuente inestimable de nuevas sustancias con actividad antitumoral. Es así como la lista de medicamentos contra el cáncer que han proporcionado los productos naturales incluye a fármacos de gran éxito como la doxorubicina, paclitaxel, vinblastina, etopósido, irinotecan, gemcitabina, metotrexato; y fitofármacos como el polifenon E, que es una mezcla estandarizada de los polifenoles epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG), galato de epigalocatequina (EGCG) y galato de galocatequina (GCG), preparada de las hojas del árbol de té *Camellia sinensis* (Theaceae). Muchos de estos fármacos son utilizados actualmente para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer; sin embargo, aún quedan problemas por superar como son los altos costos, la resistencia y la toxicidad de algunos medicamentos (Dobbelstein, 2014).

En los años 2007 y 2008 salieron al mercado 55 nuevos medicamentos derivados de productos naturales, de los cuales, 16 fueron aislados de fuentes naturales y 39 derivados de estructuras químicas obtenidas de ellas. De hecho, si de los 206 medicamentos aprobados para tratar el cáncer entre los años de 1940 y 2007 se excluyen los que tienen principios activos de alto peso molecular, quedarían 175 medicamentos, de los cuales 131 (aproximadamente el 75%) tienen que ver con productos naturales, bien sea porque se obtienen directamente de una fuente natural, o se obtienen por síntesis química de una estructura natural, o se hacen pequeñas modificaciones químicas a compuestos obtenidos de una fuente natural (Newman, 2007).

La mayoría de medicamentos utilizados para tratar el cáncer son poco selectivos y presentan altos niveles de resistencia y toxicidad, afectando considerablemente el pronóstico de vida en pacientes con esta enfermedad (Muños, 2016).

Saponinas y sapogeninas

Las saponinas son fitoquímicos estructural y funcionalmente diversos, que están distribuidos ampliamente en las plantas. Son un grupo complejo y químicamente variado de compuestos que

consisten en agliconas triterpenoides o esteroideas ligadas a uno o más restos de glúcidos (Figura 7) (Moses, 2014). La definición típica de las saponinas está basada en sus características generales, muchas saponinas tienen propiedades detergentes, forman espumas estables en agua, presentan actividad hemolítica, tienen un sabor amargo y son tóxicas para los peces. Tales atributos no son comunes para todas las saponinas, frecuentemente han sido utilizadas estas características para clasificar los productos naturales. Sin embargo, debido a las numerosas excepciones, las saponinas son ahora mejor definidas en base a su estructura molecular, llamándolas glucósidos triterpenoides o esteroideas. La porción aglicona o sin sacáridos de la saponina es llamada genina o sapogenina (Hostettmann y Marston, 2005).

Las saponinas esteroideas se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliaceae, Agavaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias Solanaceae y Scrofulariaceae (Hostettmann, 1991). Todas las saponinas tienen en común la fijación a una o más cadenas de azúcar a la parte aglicona (Hostettmann y Marston, 1995).

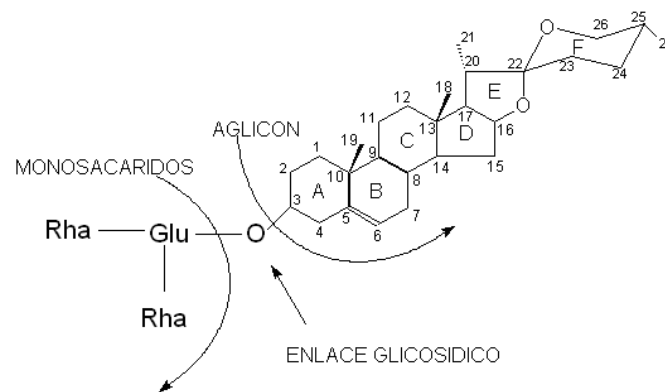


Figura 7.- Estructura general de las saponinas, Fuente: Orestes y Nogueiras, 2008.

Se ha demostrado que las saponinas, de diversas fuentes, tienen actividad hipocolesterolémica, anticoagulante, hepatoprotectora, hipoglucémica, inmunomoduladora, neuroprotectora, antiinflamatoria y antioxidante (Rao, 2000).

Algunas saponinas exhiben actividades antimetastásicas, antiangiogénicas y antiinflamatorias, resultando en amplias perspectivas de aplicación de estos compuestos. Además, se ha demostrado que algunas saponinas revierten la multirresistencia a fármacos y mejoran la eficacia de la quimioterapia (Xu, 2016).

Por hidrólisis ácida suave a las saponinas se escinden en los azúcares y las geninas o aglucones que, en este caso, se llaman sapogeninas. Existen muchas sapogeninas que difieren en el número y la posición de sus sustituyentes. Las sapogeninas esteroideas tienen una cadena lateral de 8 carbonos, análoga a la del colesterol, la cual forma dos anillos, uno pentagonal y otro hexagonal, cada uno con un eslabón de oxígeno y situados en planos distintos. Las sapogeninas tienen actividad hipocolesterolémica, anticoagulante, hepatoprotectora, hipoglucémica, inmunomoduladora, neuroprotectora, antioxidante, antimetástasis, antiangiogénesis y antiinflamatoria (Primo, 2007).

Diosgenina

Estructuralmente, la Diosgenina (25R)-espirostan-5-en-3β-ol es una saponina de espirostanol. La Diosgenina es estructuralmente similar al colesterol y otros esteroides (Figura 8) (Raju, 2012). La Diosgenina, una sapogenina esteroide natural que se encuentra abundantemente en leguminosas y en raíces comestibles, es un precursor bien conocido de varios fármacos esteroideos sintéticos que se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica. Durante la última década, se han llevado a cabo una serie de estudios preclínicos y mecanicistas para comprender el papel de la Diosgenina como agente quimiopreventivo/terapéutico contra varios cánceres (Djerassi *et al*, 1952). En comparación con las sapogeninas relacionadas estructuralmente, la hecogenina y la tigogenina, sólo la diosgenina causó un paro del ciclo celular asociado con fuerte apoptosis *in vitro* (Corbiere *et al*, 2003).

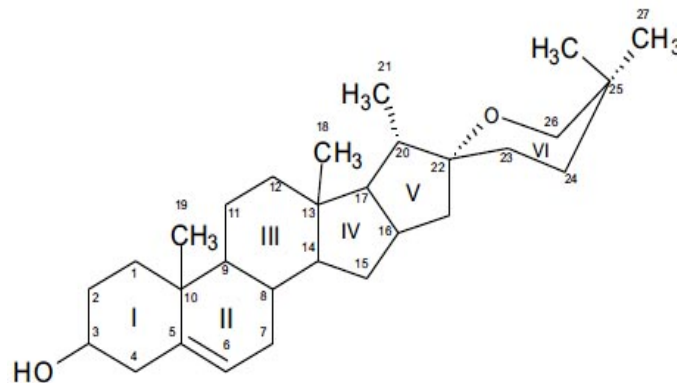


Figura. 8.- Estructura química de la Diosgenina, Fuente: Holger *et al*, 2012.

Antecedentes

Se ha informado que Diosgenina induce la detención del ciclo celular en células de osteosarcoma (Corbiere, 2003) en células KBM-5 (Shishodia, 2005) y células de cáncer de mama MCF-7 a una concentración de hasta 50 μmol (Chiang, 2007). Además, la Diosgenina (a concentraciones que varían de 10 a 60 μmol) conduce o induce independientemente la apoptosis a través de las vías extrínseca o intrínseca, vías de muerte que convergen en caspasa 3 (Cailleteau, 2009), caspasa

efectora en el proceso de muerte apoptótica. Un estudio reciente ha demostrado que 5 μmol de Diosgenina suprime la actividad telomerasa en células de cáncer de pulmón A549, que puede ser responsable de la inducción de la apoptosis celular (Chen, 2015).

La eficacia de la Diosgenina contra la carcinogénesis de colon asociada a inflamación inducida por sulfato de sodio (DSS)-AOM/Dextrano en ratones ICR, la Diosgenina a dosis de 20, 100 y 500 mg/kg de peso corporal en la dieta redujo las úlceras inducidas por AOM/DSS a 53%, 46% y 40%, respectivamente, en comparación con el control, aunque la Diosgenina no alteró la incidencia de tumores de colon (adenoma + adenocarcinoma), redujo significativamente la multiplicidad tumoral en las tres dosis ensayadas (Miyoshi *et al*, 2011).

La Diosgenina en dosis (10 mg/kg de peso corporal administrada intratumoralmente) inhibe significativamente el crecimiento de xenoinjertos tumorales tanto de MCF-7 como de MDA-231 en comparación con los controles tratados con vehículo, sin toxicidad para ninguno de los órganos vitales en ratones desnudos (Srinivasan *et al*, 2009). Se ha reportado que la administración oral de Diosgenina a una dosis de 200 $\mu\text{g/ml}$, inhibió significativamente el crecimiento de tumores de adenocarcinoma de pulmón LA795 en ratones T739 consanguíneos en un 33.94% (Yan *et al*, 2009).

Estudios de toxicología utilizando modelos experimentales relevantes, han establecido que incluso a una concentración superior de 3.5% (peso/peso), la Diosgenina era segura y no causaba toxicidad sistémica, genotoxicidad o actividad estrogénica (Qin *et al*, 2009), se ha informado que los extractos etanólicos de *Dioscorea sp.* que contenía 28.34% (peso/peso) no causó ningún signo de toxicidad aguda en ratones a una dosis superior de 562.5 mg/kg/d. No se observó toxicidad aguda renal o hepática asociada con la administración de extractos de *Dioscorea villosa* a una dosis oral de 0.79 g/kg/d (Wojcikowski *et al*, 2008).

Toxicología

Según el concepto actual, un tóxico es una sustancia que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, y como la vida, es una continua sucesión de equilibrios dinámicos, los tóxicos son los agentes químicos, o físicos, capaces de alterar alguno de estos equilibrios. De acuerdo con esto, cualquier sustancia puede actuar como tóxico, ya que tanto los productos exógenos como los propios productos constituyentes del organismo, cuando se encuentran en él, en excesivas proporciones, pueden producir trastornos tóxicos. Dichos compuestos se denominan xenobióticos (Repetto, 1997).

Los mecanismos tóxicos que lesionan la arquitectura celular pueden consistir en alteraciones más o menos profundas de las estructuras proteicas que conducen a destrucción total de la célula

(causticación, necrosis), o solamente de la membrana celular, lo que originará la salida de su contenido. Una afectación más selectiva puede lesionar sólo estructuras u organelos subcelulares, como el retículo endoplásmico, las mitocondrias, los ribosomas, los lisosomas, que respectivamente darán lugar a trastornos en las futuras actividades metabólicas y energéticas (disminución de ATP, junto con incremento de lactato y consecuente incremento de la acidez intracelular), en la síntesis de proteínas o a sucesivas destrucciones tisulares al liberarse las enzimas productoras de lisis, que se hallan almacenadas en los lisosomas (proteasas, lipasas, etc.).

Se utilizan dos términos para designar la muerte celular, necrosis y apoptosis; la primera se usa en situaciones patológicas, y la segunda para el recambio celular fisiológico, que elimina las células dañadas, precancerosas o en número excesivo (como un antónimo de mitosis); pero se ha visto que la apoptosis también puede inducirse por xenobióticos (Repetto, 1997).

Una sustancia externa llegada al ser vivo puede seguir varios caminos: a) puede ser eliminada sin sufrir alteración alguna; b) puede experimentar transformaciones que hagan más fácil su eliminación; c) puede experimentar modificaciones estructurales que aumenten, disminuyan o cambien su cualidad tóxica (Repetto, 1997). La eliminación de sustancias tóxicas del cuerpo es claramente un determinante muy importante de sus efectos biológicos. La vía de excreción más importante para la mayoría de los compuestos no gaseosos o no volátiles es a través de los riñones en la orina. Otras vías son la secreción en la bilis, la expiración a través de los pulmones de sustancias volátiles y gaseosas, y la secreción en el tracto gastrointestinal, o en fluidos tales como leche, saliva, sudor, lágrimas y semen (Timbrell, 2008).

Excreción renal

La estructura del riñón facilita la eliminación de compuestos del torrente sanguíneo. La unidad básica del riñón, el nefrón, permite que la mayoría de las moléculas pequeñas pasen de la sangre en el glomérulo al ultrafiltrado tubular, ayudado por grandes poros en los capilares y la presión hidrostática de la sangre (Timbrell, 2008).

Al ser el riñón el principal órgano excretor de sustancias tóxicas, es de esperar que resulte afectado por ellas, no ya en el momento y lugar de la filtración y de la secreción, sino también durante la resorción (en el tubo contorneado distal), que supone una concentración del producto sobre los niveles plasmáticos. Unas veces el tóxico sólo potenciará o pondrá en evidencia un trastorno renal preexistente; otras veces inducirá alteraciones que serán asiento de posteriores nefropatías y, en otros casos, se producirán lesiones directas sobre la nefrona. Al ser el riñón un órgano muy vascularizado, puede experimentar intensas poliarteritis generalizadas consecuentes a la

sedimentación de inmunocomplejos en la pared arterial. Histológicamente, se trata de un proceso inflamatorio acompañado con necrosis (Repetto, 1997).

Excreción biliar

El hígado es el órgano que normalmente sirve de indicador de las alteraciones metabólicas inducidas por los tóxicos. La producción de bilis se produce en el hígado, donde es secretada por los hepatocitos en el canaliculo, desemboca en el conducto biliar y finalmente en el intestino después del almacenamiento en la vesícula biliar. En consecuencia, los compuestos que se excretan en la bilis se suelen eliminar en las heces. La secreción en la bilis puede ser una vía principal de excreción (Timbrell, 2008).

El incremento del peso relativo del hígado, aunque puede producirse como respuesta fisiológica a un aumento de su función o por efecto de reguladores endocrinos del tipo de las hormonas tiroideas o glucocorticoides, suele ser consecuente a hipertrofia e hiperplasia por causa tóxica. Cuando la capacidad destoxicante del hígado queda superada, comienza a fallar la glucosa-6-fosfatasa hepática (índice de lesión microsómica) y se producen francos cambios histopatológicos. La forma citotóxica tiene tres formas de presentación, que pueden ser secuenciales o no: esteatosis, degeneración y necrosis. La esteatosis consiste en la acumulación citoplasmática de gotitas grasas; puede originarse por numerosas sustancias capaces de alterar los mecanismos de degradación de los triglicéridos o de las síntesis de las lipoproteínas encargadas de sacar las grasas del hepatocito. Se origina lo que se conoce como hígado graso. La degeneración estriba en una inflamación o balonización del hepatocito con hialinización (transparencia) de su contenido y aparición de cuerpos acidófilos. La necrosis supone la muerte celular y se puede producir por mecanismos de lipoperoxidación, alquilación, arilación o uniones covalentes de las macromoléculas biológicas (membrana plasmática, retículo endoplásmico, etc.) por el tóxico o sus metabolitos, o bien por reacciones inmunitarias. En estas últimas la necrosis es difusa o distribuida por todo el lobulillo; en otros casos aparece por zonas (central, intermedia o periférica) y a veces es puntual o focal. Esta selectividad topográfica parece deberse a la mayor capacidad del lugar para producir en cada caso el metabolito tóxico a causa de una actividad local especialmente intensa de las enzimas biotransformadoras (Repetto, 1997).

Planteamiento del problema

El cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortandad tanto a nivel mundial como nacional en la población femenina. Para combatir esta enfermedad existen diversas alternativas de tratamientos, sin embargo, estas son muy agresivas y poco selectivas, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. En la actualidad existe un fuerte interés en la búsqueda de compuestos de origen vegetal, con actividad antitumoral y con acción selectiva. Entre estos compuestos se encuentra la Diosgenina que actualmente se estudia como agente quimiopreventivo/terapéutico contra varios cánceres; es por esto que en el presente trabajo se pretende estudiar el efecto antitumoral de la Diosgenina en tumores inducidos por la línea celular murina de cáncer de mama JC, en hembras *BALB/C*, determinando inhibición del crecimiento tumoral, así como la inducción de muerte celular apoptótica.

Justificación

Actualmente el cáncer es considerado uno de los problemas más importantes en el área de la salud y en particular el cáncer de mama, ya que representan el primer lugar tanto a nivel mundial, así como nacional de incidencia y mortandad en la población femenina (Globocan, 2012). En México durante 2013, se observó que el principal tumor maligno por el que falleció la población femenina de mayores de 20 años es el cáncer de mama (29.5 %) (INEGI, 2016). La Diosgenina es una sapogenina a la que se está evaluando actualmente su potencial antitumoral en diversos modelos tumorales, sin embargo, en el cáncer de mama no es claro el papel antitumoral de esta sapogenina, por lo que es necesario determinar su actividad y aportar evidencia que fundamente su aplicación clínica.

Hipótesis

Se ha demostrado que la Diosgenina tiene efecto antiproliferativo e inductor de muerte celular apoptótica *in vitro*, además de inducir la reducción de tamaño tumoral *in vivo* en un modelo de cáncer de colon, por lo que se espera que en tumores inducidos con la línea celular de cáncer de mama murino JC en hembras de la cepa *BALB/C*, se observe una disminución de los tumores inducidos, así como muerte celular por apoptosis.

Objetivo general

Determinar la actividad antitumoral de la Diosgenina sobre tumores inducidos con la línea celular de cáncer de mama murino JC en hembras de la cepa *BALB/C*.

Objetivos particulares

- Establecer cultivos celulares de las líneas tumorales JC, MDA-MB-231 y MCF-7.
- Determinar la concentración requerida de Diosgenina para inducir un decremento del 50% de la población celular (IC50), en cultivos de las líneas celulares JC, MDA-MB-231 y MCF-7 mediante la técnica de cristal violeta.
- Evaluar el efecto necrótico de la Diosgenina en cultivos de las líneas celulares JC, MDA-MB-231 y MCF-7 mediante la medición de la actividad de la enzima LDH en sobrenadantes de estos cultivos.
- Evaluar el efecto apoptótico de la Diosgenina mediante la inmunodetección de la caspasa 3 activa en las líneas celulares JC, MDA y MCF-7.
- Inducir la formación de tumores en hembras de la cepa *BALB/C* inoculando 1×10^6 células JC en el costado ventral derecho.
- Evaluar la tasa de crecimiento de los tumores inducidos en hembras *BALB/C* tratados con Diosgenina en dosis de 400mg/kg de peso corporal de cada 72 h por un periodo 27 días.
- Evaluar la velocidad de crecimiento tumoral de los tumores inducidos en hembras *BALB/C* tratadas con Diosgenina.
- Determinar la muerte celular en cortes histológicos obtenidos de tumores inducidos en hembras *BALB/C* tratados con Diosgenina teñidos con Hematoxilina-Eosina
- Evaluar muerte celular apoptótica en cortes histológicos obtenidos de tumores inducidos en hembras *BALB/C* tratados con Diosgenina mediante la inmunodetección de la caspasa 3 activa.
- Evaluar muerte celular apoptótica en cortes histológicos obtenidos de tumores inducidos en hembras *BALB/C* tratados con Diosgenina mediante el ensayo enzimático de TUNEL.

Diseño experimental

Determinación de IC50

Para determinar la IC50 (concentración en la cual se disminuye en un 50% el número celular), se realizaron cultivos de las líneas MDA-MB-231, MCF-7 y JC en placas de 96 pozos (Corning, USA) de fondo plano (7,000 células/pozo), con medio de cultivo RPMI al 5 % SFB por 24 h, después de las 24 h de adhesión, se trataron los cultivos con cada una de las siguientes condiciones: Control testigo (células sin tratamiento, sólo se les reemplazo el medio de cultivo por medio fresco), Control (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de disolvente del compuesto), y una curva a las concentraciones del compuesto Diosgenina en un rango de 1-50 µg/ml, en todos los casos el volumen final de cada pozo fue de 100 µl. Transcurridas las 24 h de tratamiento, se evaluó el número celular utilizando la técnica de incorporación de cristal violeta, la cual brevemente consiste en fijar las células con glutaraldehído al 1 % (Sigma, USA) durante 15 min, cumplido el tiempo se retira el fijador y se enjuaga con agua desionizada dejando secar al aire, en seguida se adiciona el colorante cristal violeta (Sigma, USA) al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico, dejando por 15 min, se lava el exceso de colorante exhaustivamente y se dejó secar al aire para después adicionar ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % por 15 min. Posteriormente se procede a determinar la absorbancia a 590 nm por espectrofotometría en un lector de placas (ChroMate, USA), (Kueng *et al*, 1989). Los resultados fueron analizados por regresión lineal para determinar la concentración que abate el 50% de la población celular (IC50).

Actividad de la enzima LDH

El efecto citotóxico necrótico se determinó mediante la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se realizaron cultivos de las mencionadas líneas celulares en placas de 96 pozos de fondo plano (7,000 células/pozo), la placa de cultivo se cuenta con: Tratamiento (con la IC50 de Diosgenina correspondiente) y dos controles internos. Un control basal, es decir, medio de cultivo utilizado en los estímulos, el cual se incubó bajo las mismas condiciones, pero con la particularidad de que en dichos pozos no habrá células, esto para utilizarlo como un blanco en la reacción colorimétrica. El segundo, un control positivo, células con 24 h de adhesión y 24 h de proliferación, estas células serán lisadas con 10 µl de una solución al 10 % de Tritón X-100 en RPMI al 5 % SFB por 1 h. Cumplidas las 24 h de tratamiento con el compuesto, se recupera el medio de cultivo sobrenadante de cada una de las condiciones y se centrifuga (Roleo, Argentina) a 1500 rpm/5 min, se colocan 40 µl del medio centrifugado, con 40 µl de la mezcla del sustrato (kit "Cyto Tox 96" Promega, USA) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Posteriormente se procede a determinar la absorbancia a 490nm por espectrofotometría en un lector

de placas (ChroMate, USA). Los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

Detección de la caspasa 3 activa

Se cultivaron 20,000 células por pozo, en cajas de 24 pozos (Corning, USA), en un volumen de 500 μ l de RPMI al 5 % de SFB. Transcurridas las 24 h de adhesión las células se trataron con las siguientes condiciones: Control y Control sin Marca (células sin tratamiento, sólo se les remplazo el medio de cultivo por medio fresco), Control antiIgG (células sin tratamiento, con antiIgG) Control Positivo (células lisadas con una solución de Camptotecina 10 μ g/ml en una solución de mg/ml, Control Testigo (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de la mezcla Etanol-DMSO 1:3), Tratamiento (con la IC50 de Diosgenina correspondiente), Transcurridas las 24 h de tratamiento, se permearon las células con una solución de metanol 50 % por 1 h en refrigeración 4° C , al término del tiempo las células son lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS (pH 7.3) . Inmediatamente se añade el anticuerpo primario: anticaspasa 3 activa (SIGMA, USA) (1/500 en PBS) , durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda, las muestras son lavadas 3 veces con PBS. Posteriormente se aplica el anticuerpo secundario: antiIgG acoplada a FITC (SIGMA, USA) (1/500 en PBS) en cámara húmeda bajo condiciones de oscuridad durante 3 h, se lavan 3 veces las muestras con PBS. Posteriormente se procedió a determinar la actividad de la caspasa 3 por citometría de flujo FACSAria II. Los datos se analizaron utilizando el programa Flowing Software versión 2.5.1

Inoculación de tumores

Se obtuvieron ratones hembras de 6-10 semanas de la cepa *BAL/C* del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, se mantuvieron en condiciones reguladas de luz y oscuridad 12/12 h, alimento y agua a libre disposición. Se aclimataron a la manipulación durante 1 semana. El experimento se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 y el manual del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales CICUAE-FMVZ-UNAM para el manejo de animales de experimentación. Los ratones se asignaron aleatoriamente a 6 grupos (n=8/grupo): Grupo Control (ratones sin inoculación ni tratamiento), Control Vehículo (ratones sin inocular, y tratados con el excipiente del tratamiento, goma Ghatti 1%), Control Tratamiento (ratones sin inocular y tratados con Diosgenina en dosis 400 mg/kg de peso), Control Positivo (ratones inoculados sin tratamiento), Control Positivo Vehículo (ratones inoculados y tratados con el excipiente), Tratamiento (ratones inoculados y tratados con Diosgenina) a los ratones se les inyectó vía subcutánea 1×10^6 células de la línea tumoral JC suspendidas en 0.2 ml de una solución de PBS en el costado ventral derecho. Después de 3 días postinoculación, se inició el tratamiento cada 72 h

por sonda oral durante 27 días, posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical y se diseccionaron: hígado, riñones y tumores, los cuales se fijaron con paraformaldehído al 4% por 48 h.

Inclusión

Los órganos y tumores fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 48 h, después se lavaron durante 24 h a chorro de agua y fueron deshidratados con un tren de alcoholes en concentraciones de 30%, 40%, 50%.....100% durante 1 h cada uno, en ETOH-Xilol 1:1 por 30 min y Xilol 100% por 10 min por para su posterior inclusión con el siguiente procedimiento: Paraplast-Xilol 1:3 y Paraplast-Xilol 1:1 durante 1 h cada uno y su montaje en cubos plástico con Paraplast (Leica, USA) el cual fue fundido en la estufa (Thermo, USA) a 56° C, una vez incluidos se realizaron cortes de entre 5-7 micras, se montaron en portaobjetos cubiertos con Poli-L-Lisina, posteriormente se rehidrataron para su tinción con H&E e inmunohistoquímica, los cortes histológicos una vez teñidos y montados se les observó bajo microscopio óptico (Olympus, Japón).

Protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina

Se procedió a desparafinar los cortes en la estufa a 60° C durante 15 min para después rehidratarlos con un tren de alcoholes en concentraciones de 100%, 90%, 80%.....30% con pases rápidos de 5 s, posteriormente fueron sumergidos en Hematoxilina durante 10 min y se retiró el exceso de colorante a chorro de agua durante 10 min, para después hacerlos pasar por ETOH 70%-HCl 1%, NH₄OH 1%, agua destilada y ETOH 50% durante 5 s cada uno, inmediatamente después se sumergieron en Eosina alcohólica al 70% durante 30 s lavándose el exceso con un tren de alcoholes en concentraciones de 70%, 80%, 90%, 100%, ETOH-Xilol 1:1 y Xilol 100% con pases de 5 s, finalmente se procedió a su montaje agregando una gota de bálsamo de Canadá y colocando sobre ellos un cubreobjetos. Los cortes histológicos una vez teñidos y montados se les observó bajo microscopio óptico (Olympus, Japón).

Inmunolocalización de caspasa 3 activa.

Se procedió a desparafinar e hidratar los cortes montados, se realizó una recuperación antigénica en el microondas con buffer de citratos durante 3 min, en baño María, se dejaron enfriar durante 30 min, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min cada uno, posteriormente se incubaron con Glicina 100 mM (0.375 mg en 50 ml PBS) durante 1 h a temperatura ambiente, después se incubaron con anticaspasa 3 activa (SIGMA, USA) (1/100) en PBS-BSA-Tween durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, se realizaron 3 lavados con PBS durante 3 min cada uno, se incubaron nuevamente con anticuerpo secundario (MILLIPORE, GER) 1/200 en PBS durante 2 h a temperatura ambiente y protegido de la luz, se lavaron 3 veces con PBS durante 3 min cada uno, se tiñeron con DAPI

(Sigma, USA) durante 1 min, finalmente se lavaron 3 veces con PBS durante 3 min cada uno y se montaron con medio de montaje para preparaciones con fluorescencia (Vector Laboratories, USA). Las preparaciones se revelaron por microscopia de epifluorescencia (Nikon, Japón). Equipado con una cámara de alta resolución DXM1200F.

Ensayo enzimático de TUNEL

Se procedió a desparafinar los tejidos en estufa durante 10 min. a 60°C, se hidrataron con un tren de alcoholes, realizando una recuperación antigénica con proteinasa-K 20 µg/ml en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 2 min, se procedió a incubar con buffer de equilibrio 20 µl a temperatura ambiente, durante 20 min, inmediatamente después se incubaron con la mezcla enzimática durante 1 h a 37°C (33 µl de enzima TdT + 77 µl de buffer de reacción), se incubaron con buffer de paro (Chemicon international, USA) 1:34 en agua bidestilada (Chemicon international, USA) durante 10 min, se realizaron 3 lavados con PBS durante 1 min para después incubarlos con anticuerpo secundario anti-dig-rhodamina (Chemicon international, USA) (64 µl de buffer de bloqueo + 62 µg/ml de antidigoxigenina) (MILLIPORE, GER) 45 min a temperatura ambiente y protegido de la luz, se realizaron 3 lavados de 3 min con PBS, para después teñir con DAPI (Sigma, USA) durante 1 min, se lavaron 3 veces con PBS durante 3 min y se procedió a montar con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, USA). Las preparaciones se revelaron por microscopia de epifluorescencia (Nikon, Japón).

La detección de la fragmentación del ADN implica el marcaje del extremo 3' generado durante la fragmentación de la molécula, la reacción de la enzima Tdt agrega dNTP marcados con digoxigenina, los cuales son acoplados con antidigoxigenina marcada con rodamina.

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows. Seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Actividad antiproliferativa en células tumorales de Mama

Con el propósito de establecer el efecto antiproliferativo de la Diosgenina en células tumorales, cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC fueron estimulados con diferentes concentraciones del compuesto y la concentración requerida del fitoesteroide que induce un decremento del 50% en la densidad celular (IC50) fue determinada mediante la linearización de los datos y su cálculo de acuerdo a la ecuación de la recta, los cuales fueron corroborados de forma puntual. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (Figura 9). El Etanol-DMSO 1:3, se utilizó en todos los experimentos para comprobar que el efecto obtenido en las diferentes pruebas, es debido al compuesto y no al vehículo en el que el compuesto es disuelto.

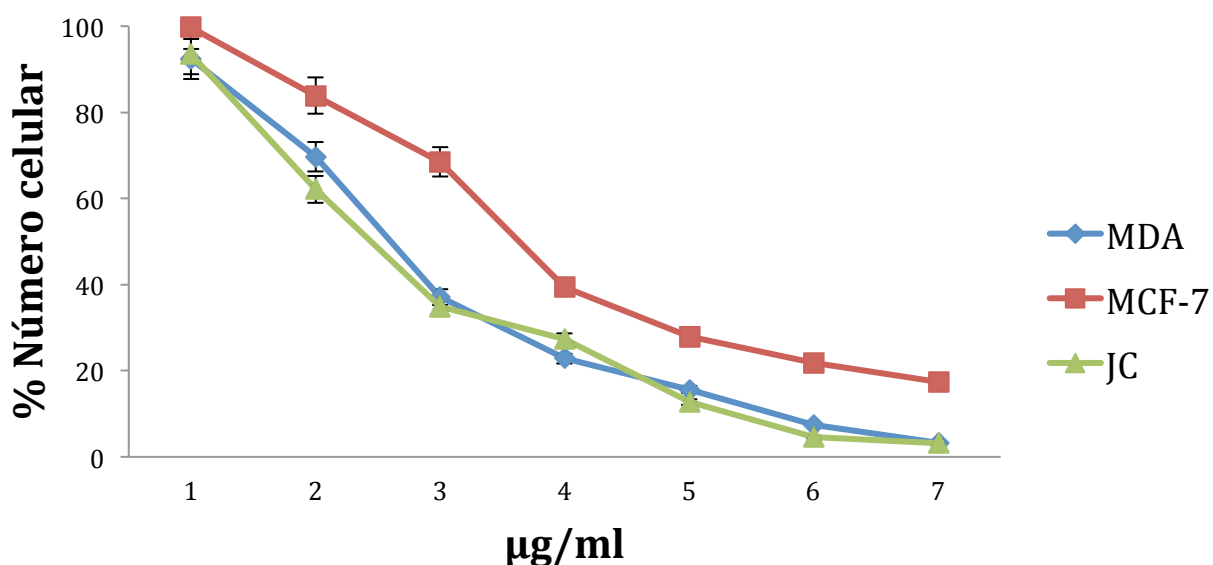


Figura 9.- Actividad antiproliferativa de la Diosgenina sobre cultivos de líneas celulares de mama. El número celular se determinó por la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos (Tabla 2), muestran que el potencial proliferativo de las líneas tumorales MDA-MB-231, MCF-7 y JC tratadas con la Diosgenina es afectado de manera dependiente de la concentración, con una IC50 de 3.5, 4.0 y 3.0 µg/ml respectivamente.

Linea celular	IC50 IC50 µg/ml (µM)
MDA-MB-231	3.5 (8.44)
MCF-7	4.0 (9.64)
JC	3.0 (7.23)

Tabla 2.- La tabla muestra la IC50 obtenida para las respectivas líneas celulares.

Actividad necrótica en células tumorales de Mama

Con la intención de establecer si el decremento del número celular se debe a un efecto citotóxico (necrótico) del esteroide, cultivos de las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC fueron tratados con Diosgenina a la concentración de 3.5, 4.0 y 3.0 µg/ml respectivamente por 24 h, la determinación de la actividad de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) fue evaluada como parámetro de pérdida de la integridad de la membrana plasmática, considerada como una característica primordial de una actividad de muerte necrótica (Figura 10).

Actividad de la enzima LDH

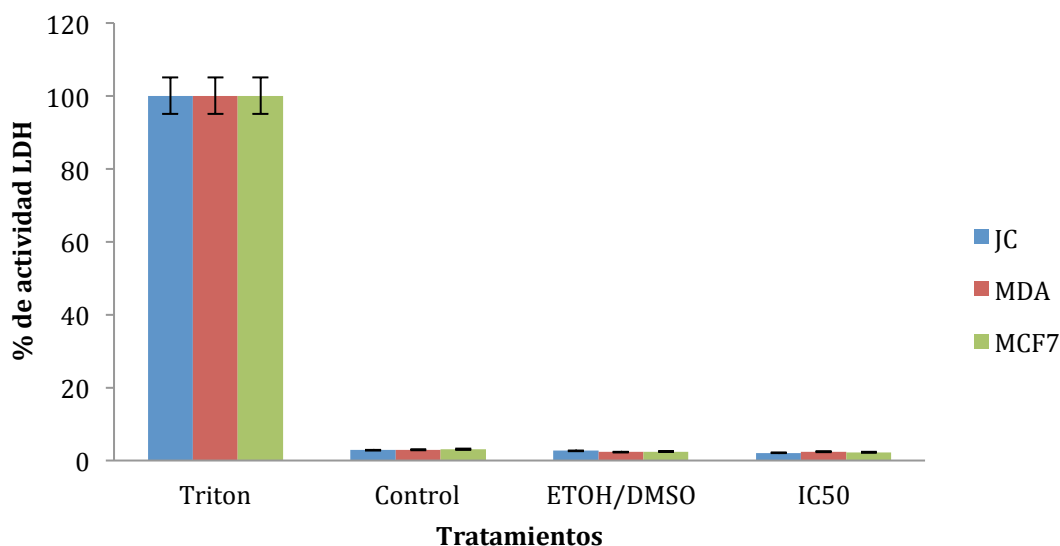


Figura 10.- Determinación de la actividad de la enzima citoplasmática lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares tratados con la Diosgenina. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (6,000 células por pozo), con 24 h de adherencia y tratadas por 24 h con la concentración de las IC₅₀ calculadas, 3.5, 4.0 y 3.0 µg/ml respectivamente, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la actividad de la enzima LDH. En el análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba de Tukey $p < 0.05$ no se encontró diferencia significativa con respecto al control. Este ensayo es representativo de al menos tres ensayos independientes con 3 repeticiones.

Los resultados mostrados en la Figura 9 muestran que las células tumorales tratadas con la Diosgenina no inducen actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares, indicando que la sapogenina no presenta una actividad necrótica en las líneas celulares de mama y que el decremento en el número celular observado se debe a un evento diferente a la muerte celular necrótica.

Actividad apoptótica en células tumorales de mama

Para determinar si la Diosgenina induce muerte por apoptosis en las células tumorales de Mama, los cultivos de MDA-MB-231, MCF-7 y JC se trataron con las IC50 calculadas para cada línea celular y la caspasa 3 activa fue inmunodetectada y cuantificada por citometría de flujo (Figura 11).

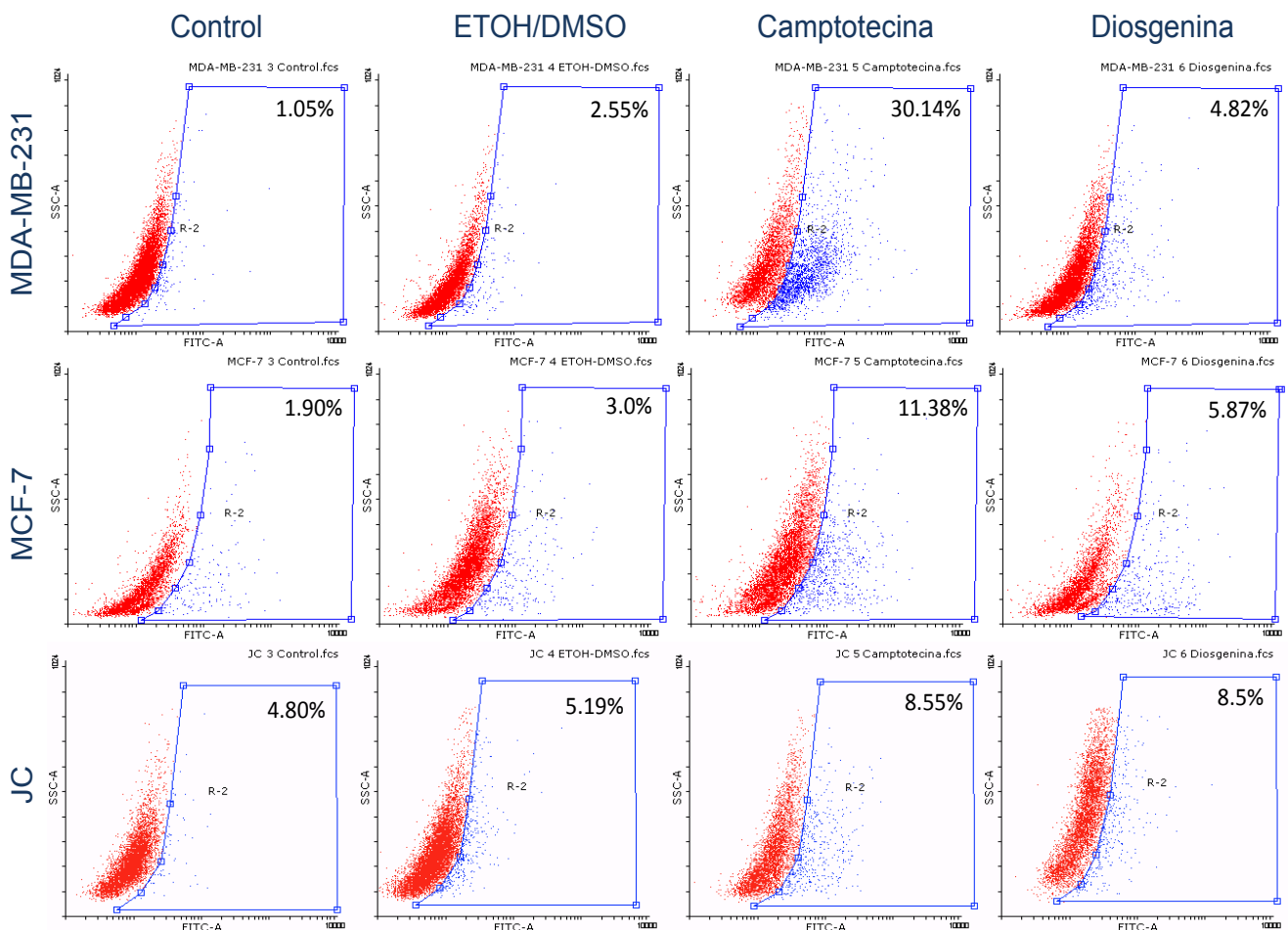


Figura 11.- Efecto de la Diosgenina sobre células tumorales MDA-MB-231, MCF-7 y JC. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (25,000 células/pozo) las células fueron tratadas con las IC50 obtenidas respectivamente de cada línea celular por 24 h y evaluadas por citometría de flujo.

Tratamiento	MDA-MD-231	MCF-7	JC
Control	1.05%	1.9%	4.8%
ETOH/DMSO	2.55%	3.0%	5.19%
Camptotecina	30.14%	11.38%	8.55%
Diosgenina	4.82%	5.87%	8.5%

Tabla 3.- La tabla muestra el porcentaje celular positivo a caspasa-3 activa. Se observa un incremento en la positividad en las 3 líneas celulares con respecto al Control y al vehículo.

Los resultados obtenidos revelan que la Diosgenina induce un bajo porcentaje de células positivas a la caspasa 3 activa, sugiriendo que la inducción a la muerte apoptótica requiere de más de 24 h.

Evaluación *in vivo*

Para la evaluación antitumoral de la Diosgenina *in vivo*, se utilizaron ratones hembras de la cepa *BALB/C*, las cuales fueron inoculadas en el costado derecho con 1×10^6 células de la línea tumoral de mama JC, por vía intradérmica. Después de tres días de haber sido inoculadas, el grupo tratado fue inducido con 400 mg de Diosgenina/kg de peso del ratón, cada tres días por 27 días, el peso de los ratones, el volumen del tumor y la velocidad de crecimiento del tumor fueron medidos cada tercer día durante 27 días y tomados como parámetros de actividad antitumoral. Con respecto a los resultados sobre el efecto de la Diosgenina en el peso corporal, la Diosgenina no provocó cambios significativos en el peso de los individuos tratados (Figura 12).

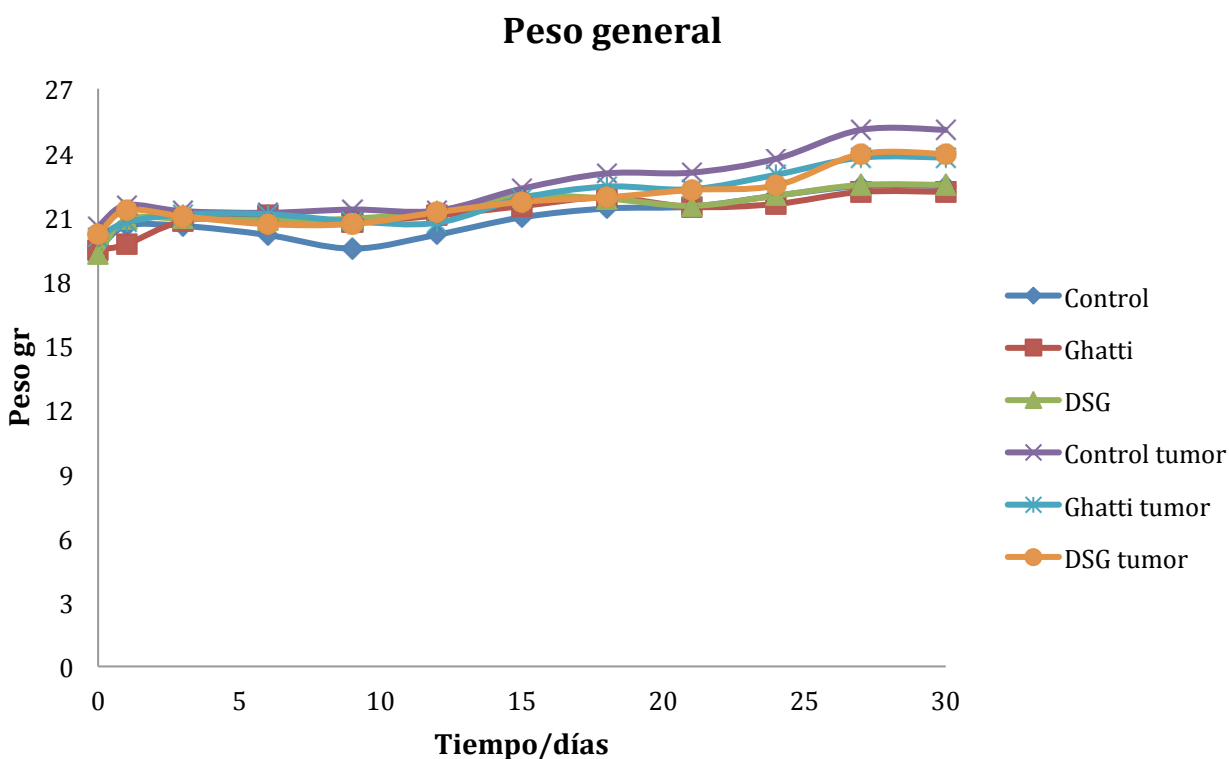


Figura 12.- El gráfico muestra el comportamiento en el aumento de peso de los seis grupos experimentales. Observándose que no hay diferencia significativa entre los grupos tratados y los grupos control. En el análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba de Tukey $p < 0.05$ no se encontró diferencia significativa con respecto al control.

Con respecto al volumen del tumor, nuestros resultados indican que la administración de Diosgenina en dosis de 400 mg/kg de peso redujo el volumen de crecimiento a un 41.1% en el grupo tratado con respecto al grupo control (Figura 13), sugiriendo que la Diosgenina ejerce un efecto antiproliferativo disminuyendo el crecimiento tumoral.

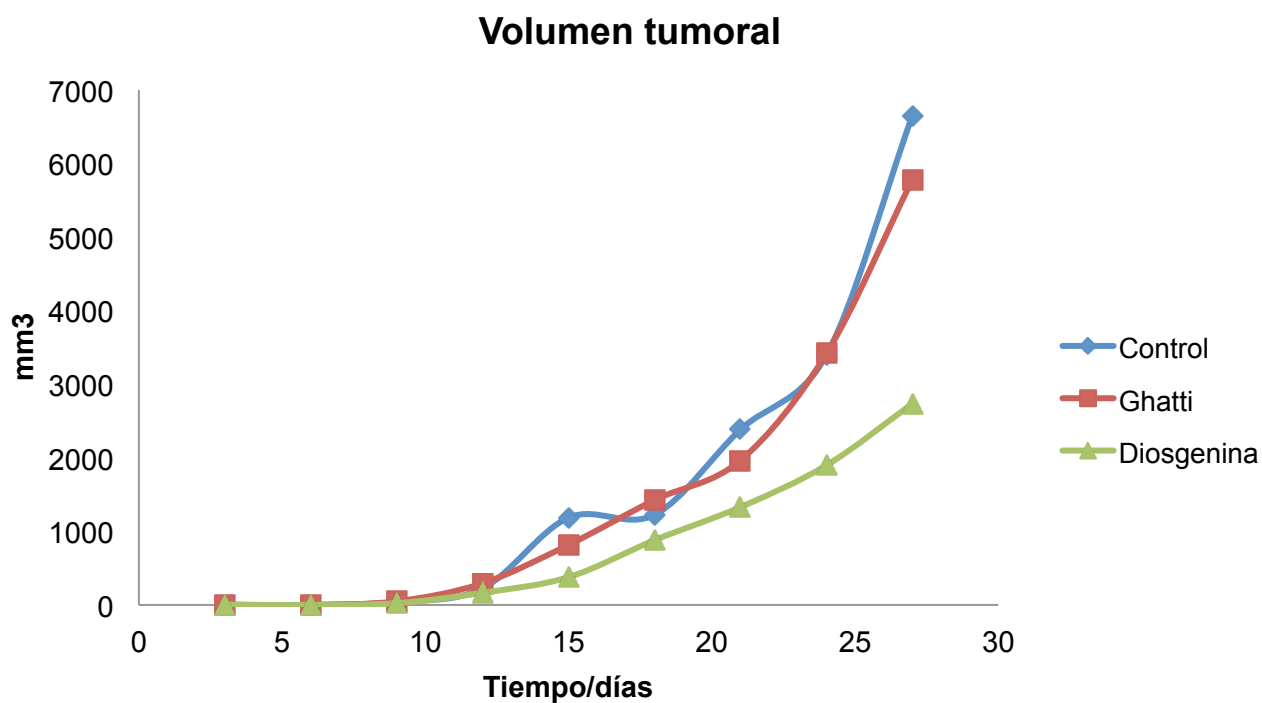


Figura 13.- El gráfico muestra el volumen de crecimiento tumoral celular en tres grupos experimentales . Ddeterminándose que la administración de Diosgenina en 400 mg/kg, redujo el volumen de crecimiento en un 41.1% en el grupo tratado en comparación con el grupo control. Calculado con la formula $(D \cdot d^2 \cdot \pi / 6)$. En el análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba de Tukey $p < 0.05$ se encontró diferencia significativa con respecto al control.

Para corroborar este efecto antiproliferativo de la Diosgenina en los ratones de la cepa BALB/C, la velocidad de crecimiento tumoral fue medida y se encontró que la velocidad de crecimiento tumoral se vio disminuida en el grupo tratado en comparación con los grupos control (Figura 14). El cálculo de esta velocidad indicó que la velocidad de crecimiento tumoral disminuyó en un 72%.

Velocidad de crecimiento tumoral

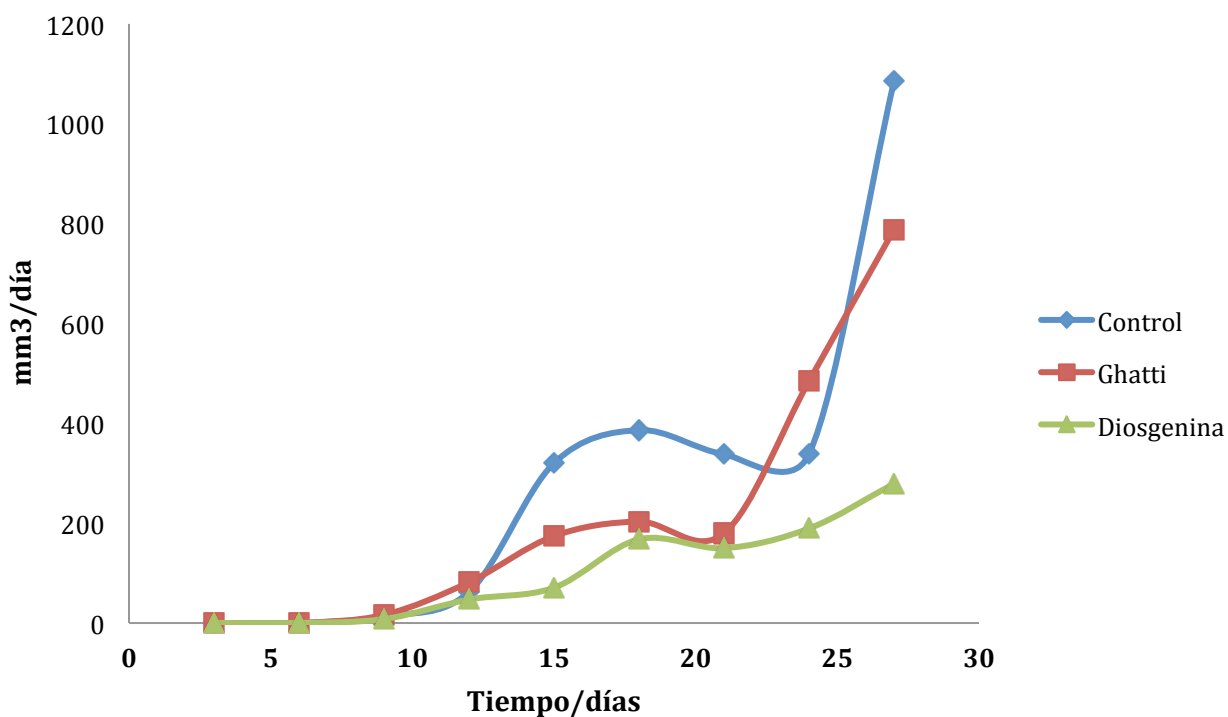


Figura 14.- El gráfico muestra el comportamiento de la velocidad de crecimiento tumoral en tres grupos experimentales, determinándose que la administración de Diosgenina en dosis de 400 mg/kg de peso corporal afectó la velocidad de crecimiento tumoral en el grupo tratado en un 72% con respecto al control. En el análisis estadístico ANDEVA seguido de una prueba de Tukey $p < 0.05$ se encontró diferencia significativa con respecto al control.

Una vez que se estableció que la Diosgenina presenta actividad antiproliferativa *in vivo*, los tumores fueron preparados para análisis por histología y los cortes fueron teñidos con Hematoxilina & Eosina (H&E). Los cortes de los tumores tratados con Diosgenina presentaron abundantes células con núcleos pequeños que indican una condensación de la cromatina así como escaso citoplasma que establece que las células sufrieron una contracción celular, las cuales son alteraciones características de muerte celular por apoptosis (Figura 15).

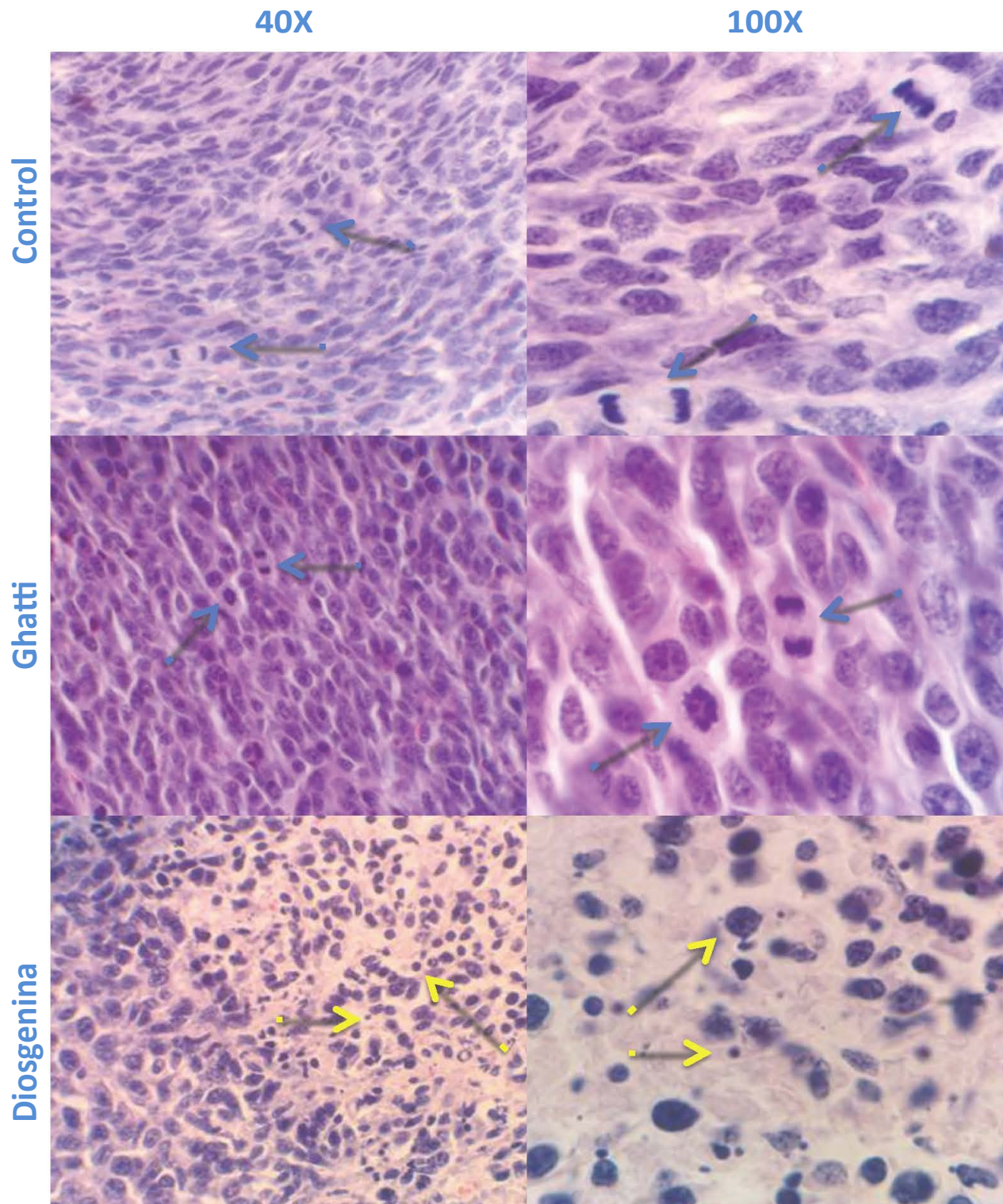


Figura 15.- Efecto de la Diosgenina en el crecimiento tumoral. A y B: Corte de tumor sin tratamiento (Control); C y D: Corte de tumor tratado con goma Ghatti; E y F : Corte de tumor tratado con 400 mg/kg-peso Diosgenina. En los controles se observa división celular (Flechas azules), en el grupo tratado con Diosgenina se observan alteraciones características de muerte celular; condensación y fragmentación nuclear, así como compactación citoplasmática (Flechas amarillas).

Una vez identificadas mediante el ensayo de tinción con H&E características de muerte celular apoptótica se prepararon cortes histológicos para ensayos inmunocitoquímicos enzimáticos de caspasa 3 activa y fragmentación del ADN (TUNEL), en los cuales se confirmó la detección de caspasa 3 activa y la presencia de ADN fragmentado, confirmando que en los tumores tratados con Diosgenina se está llevando a cabo un proceso de muerte celular apoptótica (Figuras 16,17, 18 y 19).

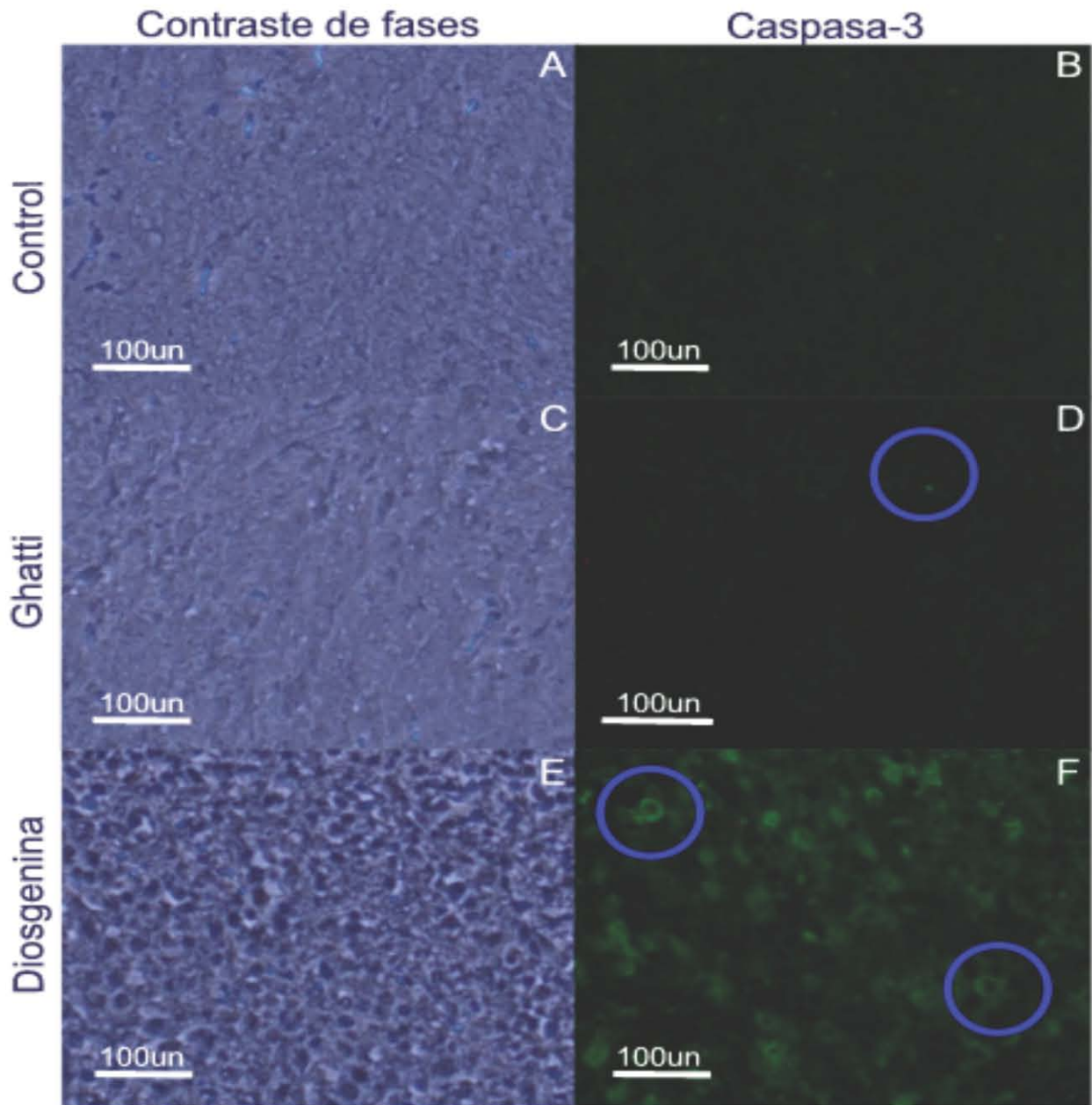


Figura 16.- Efecto de la Diosgenina en la activación de la caspasa 3 en cortes histológicos. A, C y E: Fotografías en contraste de fases; B, D y F : Fotografías de epifluorescencia marcadas con anticaspasa-3 activa. A y B : Corte de tumor sin tratamiento (Control); C y D: Corte de tumor tratado con goma Ghatti; E y F : Corte de tumor tratado con Diosgenina 400 mg/kg de peso corporal. La marca verde indica la presencia de la caspasa-3 activa.

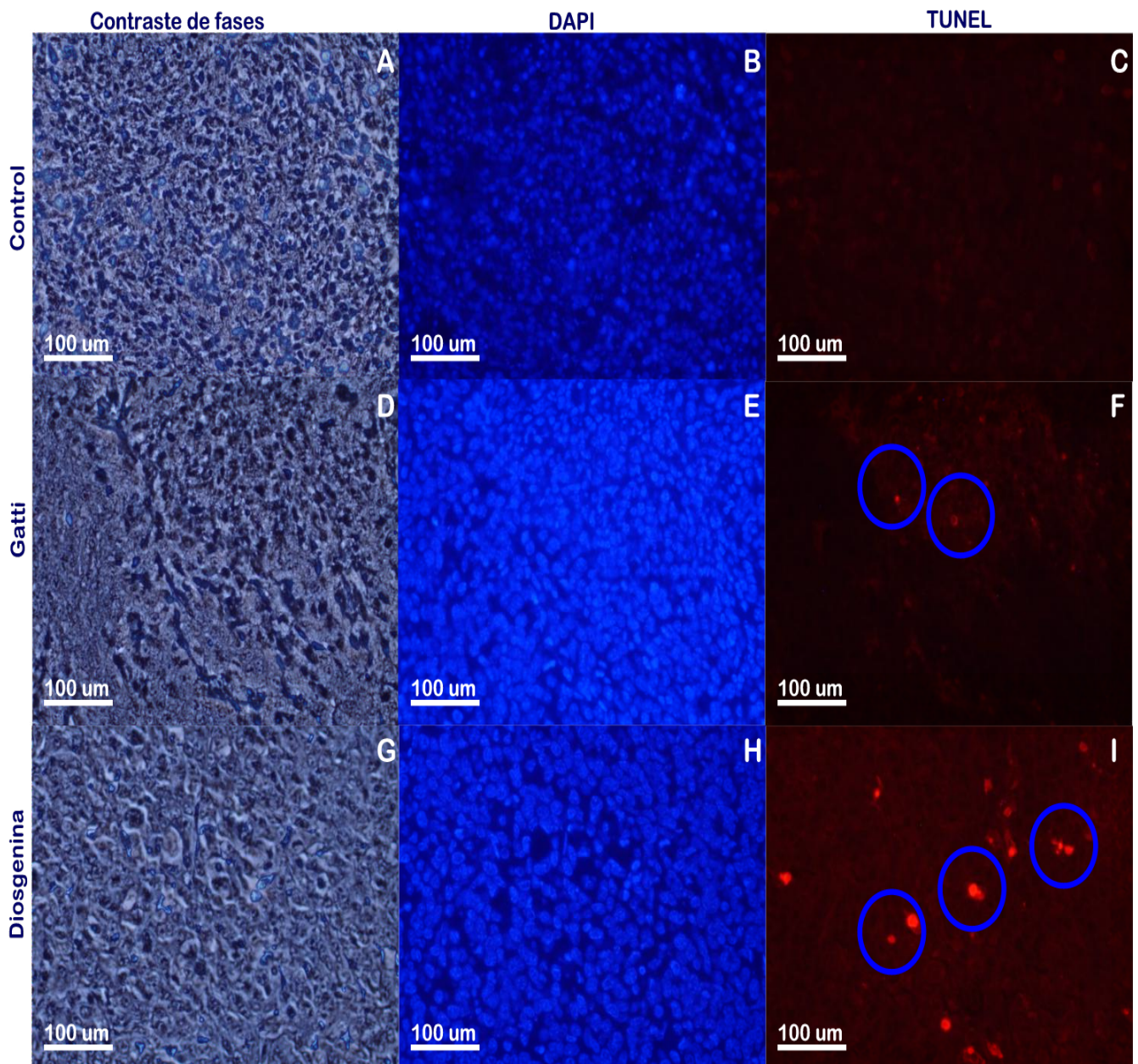


Figura 17.- Efecto de la Diosgenina en la fragmentación del ADN evaluado por medio de la técnica de túnel en cortes histológicos de tumores. A, D y G: Fotografías con contraste de fases; B, E y H: Fotografías con la tinción DAPI. C, F e I: TUNEL. A, B y C: Corte de tumor sin tratamiento (Control); D, E y F: Corte de tumor tratado con goma Gatti; G, H e I: Corte de tumor tratado con 400 mg/kg de ratón de Diosgenina. Las marcas rojas indican células con ADN fragmentado.

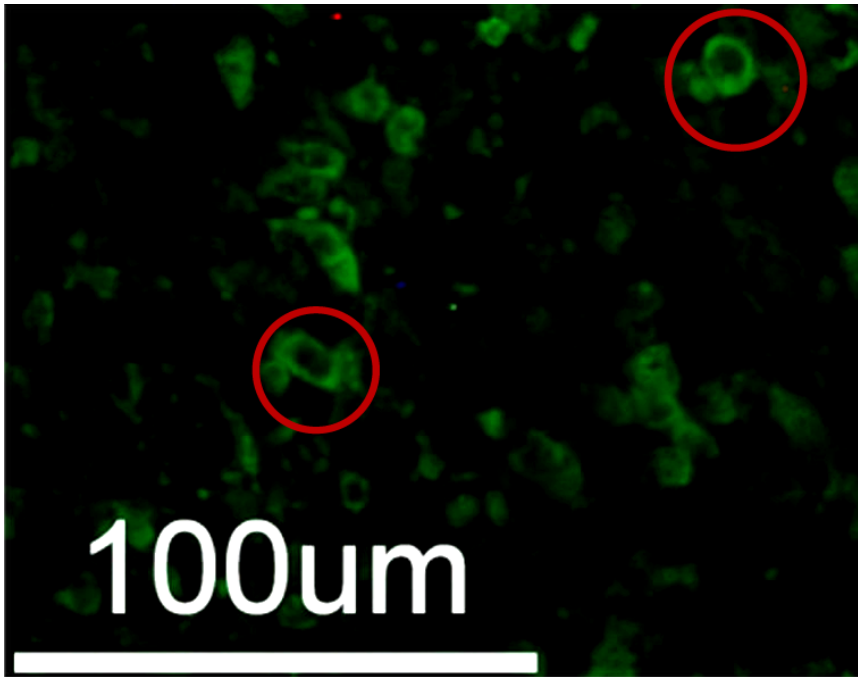


Figura 18.- Efecto de la Diosgenina en la activación de la caspasa 3 en cortes histológicos. Corte de tumor tratado con Diosgenina 400 mg/kg de peso corporal. La marca verde indica la presencia de la caspasa 3 activa.

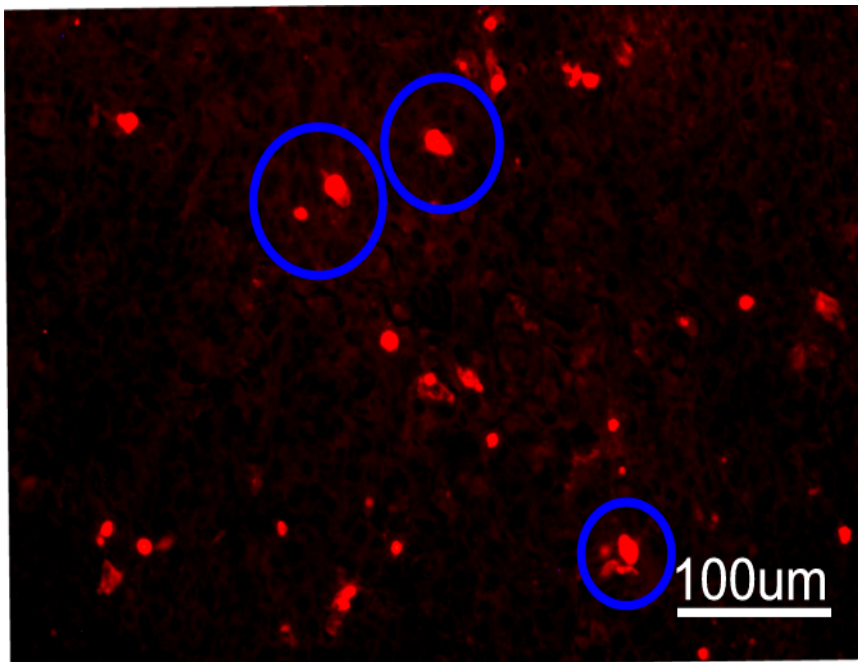


Figura 19.- Efecto de la Diosgenina en la fragmentación del ADN evaluado por medio de la técnica de túnel en cortes histológicos de tumores. Corte de tumor tratado con Diosgenina 400 mg/kg de peso corporal, las marcas rojas indican células con ADN fragmentado.

Una vez que se ha demostrado que la Diosgenina presenta actividad antitumoral en los ratones de la cepa BALB/C inducidos con las células tumorales de mama JC y que esta actividad antitumoral es llevada a cabo mediante la inducción de las células tumorales a una muerte por apoptosis, el tejido renal de los grupos Control, Ghatti y Diosgenina fueron preparados para análisis por histología con la tinción H&E (Figura 19) con la intención de establecer si la Diosgenina induce a células renales a una muerte necrótica como un efecto secundario de este compuesto. Al respecto, en los cortes histológicos se observaron glomerulos con características normales, células con núcleos bien definidos y de forma regular, indicando que en ninguno de los grupos hay evidencia de daño celular, sugiriendo que la Diosgenina no induce muerte necrótica en el tejido renal.

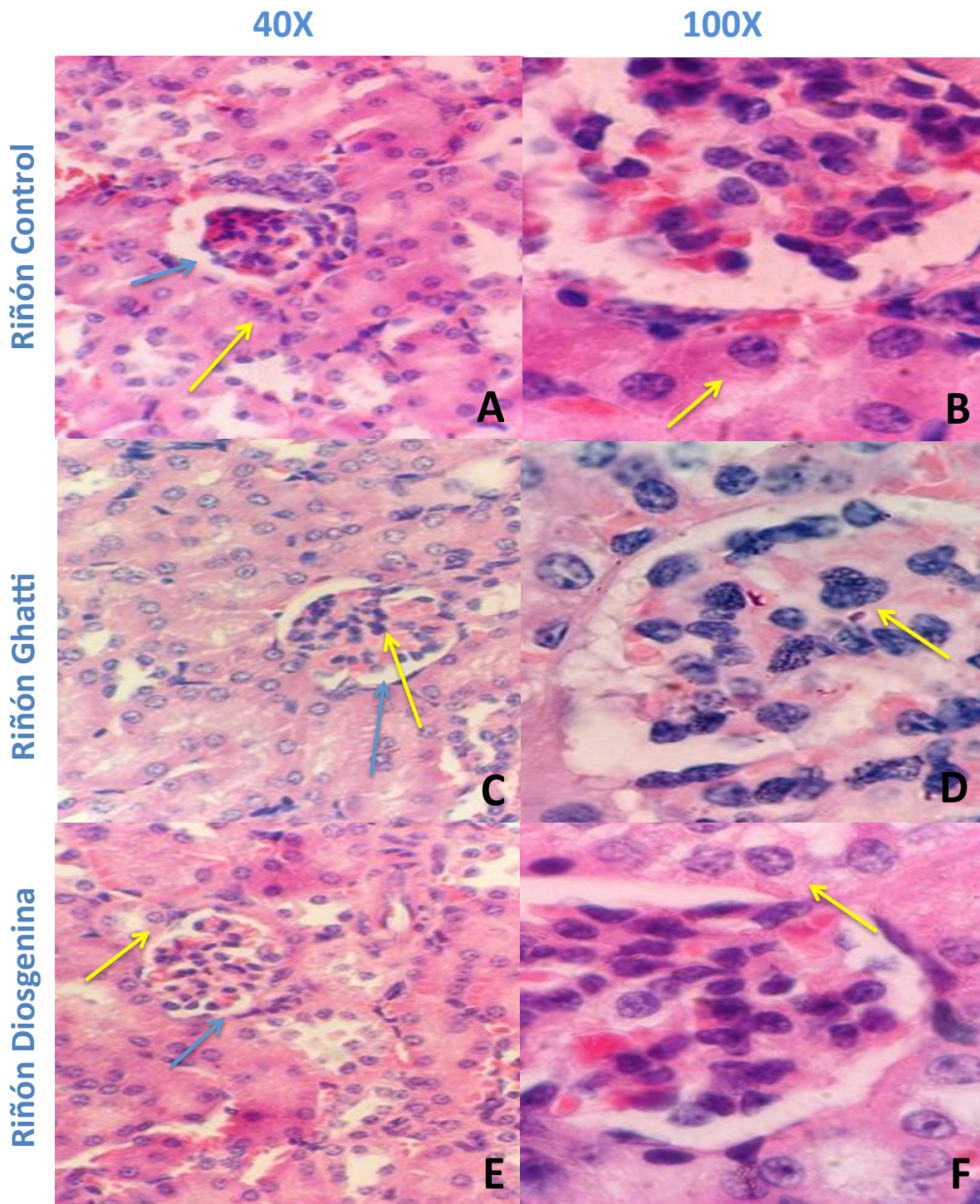


Figura19.- Fotografías de cortes histológicos de tejido renal teñidos con H&E; A y B grupo control, C y D grupo control con goma Ghatti, E y F grupo tratado con Diosgenina. En los tres grupos se observan los glomérulos bien definidos (flechas amarillas), así mismo se observan células con núcleos uniformes y bien definidos (flechas en azul)

De manera paralela al estudio del tejido renal, el tejido hepático de los grupos Control, Ghatti y Diosgenina fueron preparados para análisis por histología con la tinción H&E (figura 20), observándose células con núcleos uniformes y bien definidos, así mismo se observan los núcleos

definidos de las células endoteliales de los capilares, estableciendo que en ninguno de los grupos presenta evidencia de daño celular, indicando que la Diosgenina no ejerce efecto necrótico en el tejido hepático.

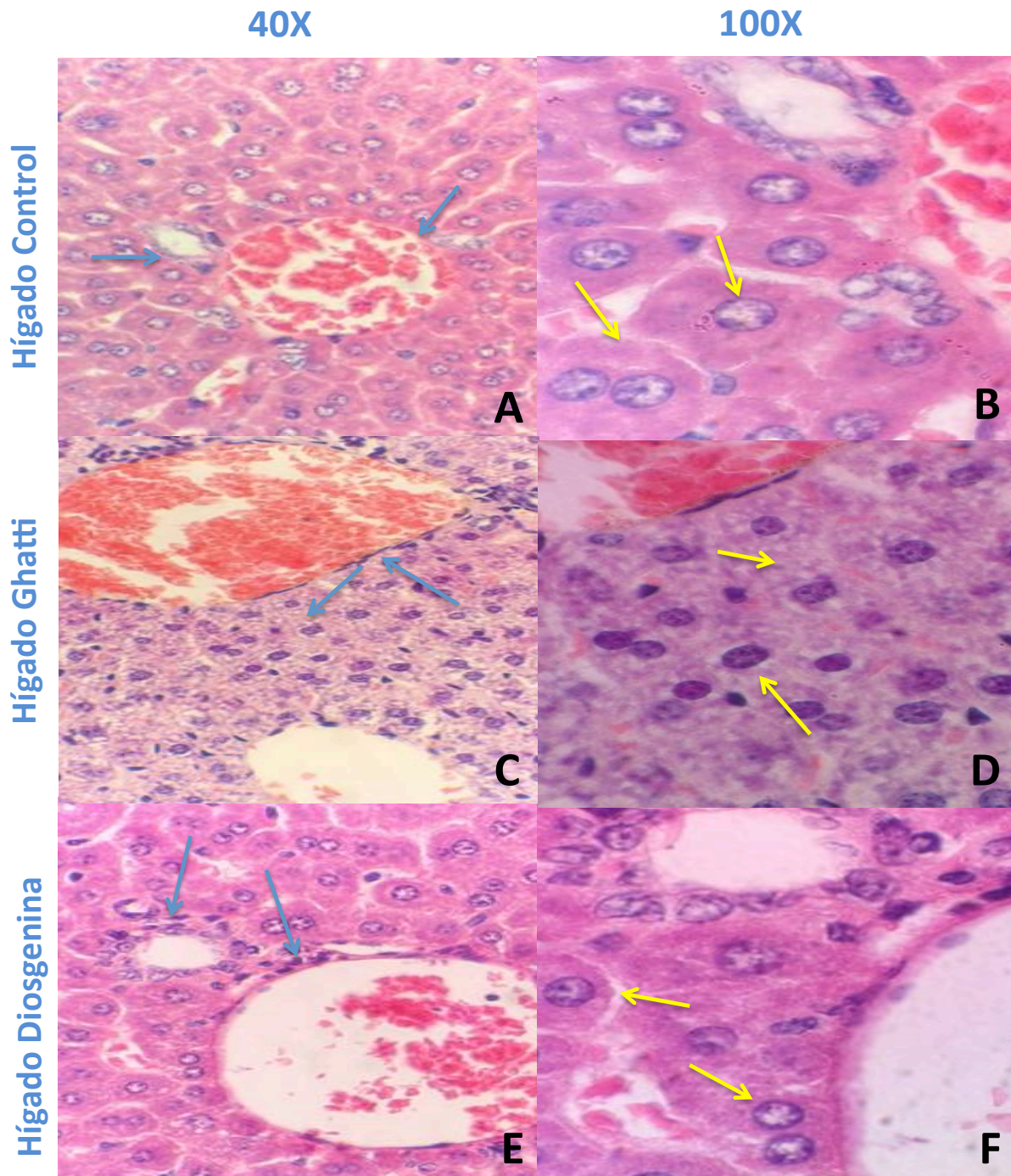


Figura 20.- Fotografías de cortes histológicos de tejido hepático teñidos con H&E; A y B; grupo Control, C y D grupo tratado con goma Ghatti, E y F grupo tratado con Diosgenina. Se observan células con núcleos uniformes y definidos sin la presencia de características aparentes de muerte celular apoptótica o necrótica (flechas amarillas) paredes de la vasos sanguíneos, sin alteraciones evidentes (flechas azules).

Discusión de resultados

Aproximadamente el 75 % de los quimioterapéuticos utilizados hoy en día tienen que ver con productos naturales, bien sea porque se obtienen directamente de una fuente natural, o se obtienen por síntesis química de una estructura natural, o se hacen pequeñas modificaciones químicas a compuestos obtenidos de una fuente natural. La mayoría de estos medicamentos utilizados para tratar el cáncer son poco selectivos y presentan altos niveles de resistencia y toxicidad, afectando considerablemente el pronóstico de vida en pacientes con esta enfermedad (Muños, 2016).

La exploración del efecto de las saponinas sugiere que el efecto antiproliferativo puede ser la base de nuevos compuestos terapéuticos, ya que se ha encontrado que disminuyen la proliferación en diversas líneas celulares de cáncer. Este efecto antiproliferativo es llevado a cabo mediante la detención en alguna de las fases del ciclo celular y/o mediante la inducción de muerte celular por apoptosis (Raju *et al*, 2007). Actualmente se ha reportado actividad antiproliferativa y apoptótica de la Diosgenina, una sapogenina esteroide, que ha demostrado tener actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer humano, como en la línea de osteosarcoma humano 1547 en la línea leucémica K562, en las líneas de CaCU: HeLa, CaSki y ViBo y en la línea tumoral murina de cáncer de colón CT26 (Corbiere, 2003).

Al respecto, se observó que la Diosgenina induce un decremento del número celular del 50 % en las líneas celulares tumorales de mama humanas MDA-MB-231 y MCF-7 conservando esta actividad en la línea celular murina JC a concentraciones de 3.5, 4.0 y 3.0 µg/ml respectivamente. Siendo estas dosis las mas bajas en contraparte con líneas celulares provenientes de diferentes tejidos. Lo que sugiere una mayor sensibilidad a este fitoesteroide de las líneas provenientes de líneas tumorales provenientes del tejido mamario.

Con respecto a la actividad citotóxica de las sapogeninas, estudios revelan que en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino se presenta una baja o nula actividad de la enzima LDH (Dávila, 2013), indicando que esta sapogenina presenta una baja actividad necrótica. Con respecto las líneas celulares de mama, la Diosgenina presentó una nula actividad de la enzima LDH, indicando que al igual que las líneas celulares de cáncer cervicouterino, esta sapogenina presenta nula o baja actividad necrótica. Estos resultados generan una fuerte relevancia de las sapogeninas si se les compara con los agentes quimioterapéuticos que actualmente se usan para el tratamiento contra el cáncer, ya que éstos son sumamente citotóxicos y los efectos colaterales están asociados a la actividad citotóxica, sugiriendo que las sapogeninas esteroides al tener una nula o baja actividad citotóxica en líneas provenientes de cáncer de mama sus efectos colaterales serían mínimos o nulos.

En lo que respecta a la actividad apoptótica de las saponinas, Trouillas *et al*, en 2005 reportó que la Diosgenina a una concentración de 40 μM induce una muerte apoptótica generando la fragmentación del ADN a las 24h, y que la Hecogenina a una concentración de 40 μM , inhibe en un 38% la proliferación, pero no induce muerte por apoptosis a las 24h en células de osteosarcoma 1547, sugiriendo que la actividad apoptótica podría no presentarse en todas las saponinas y/o saponinas. Al respecto, en nuestros resultados, la Diosgenina induce una expresión de la caspasa-3 activa en las líneas celulares humanas de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC murina, indicando que esta saponina induce a las células tumorales de mama a una muerte apoptótica, que junto con lo descrito anteriormente, indica que la Diosgenina podría tener este efecto antiproliferativo y apoptótico en líneas celulares de diferente tipo, lo cual indica que la Diosgenina podría ser aplicada a diferentes tipos de tumores.

Estudios tumorales *in vivo*, demuestran que en Xenoinjertos implantados con las líneas celulares humanas MCF-7, MDA-231 y PC-3 en ratones desnudos y tratados con Diosgenina (10 mg/kg intratumoralmente) mostraron una regresión significativa (Srinivasan *et al*, 2009; Srinivasan, *et al*, 2009), otro estudio ha reportado que la administración oral de Diosgenina a una dosis de 200 $\mu\text{g/ml}$, inhibió significativamente el crecimiento de tumores de adenocarcinoma de pulmón LA795 en ratones T739 consanguíneos en un 33.94% (Yan *et al*, 2009). En nuestros resultados, se demostró que la Diosgenina en dosis de 400mg/kg de peso corporal administrada cada 72 h induce un decremento en el volumen y la velocidad de crecimiento en los tumores implantados con la línea celular JC en hembras de ratón de la cepa *BALB/C*, induciendo a las células provenientes de los tumores a una muerte celular apoptótica, lo que se confirmó mediante la inmunodetección de la caspasa 3 activa y la fragmentación nuclear con el ensayo de TUNEL, resultados que estuvieron acorde con lo reportado por Yan *et al*, 2009.

Estudios de toxicología utilizando modelos experimentales relevantes, han establecido que incluso a una concentración superior de 3.5% (peso/peso), la Diosgenina era segura y no causaba toxicidad sistémica, genotoxicidad o actividad estrogénica (Qin *et al*, 2009), se ha informado que los extractos etanólicos de *Dioscorea sp.* que contenía 28.34% (peso/peso) no causó ningún signo de toxicidad aguda en ratones a una dosis superior de 562.5 mg/kg/d. No se observó toxicidad aguda renal o hepática asociada con la administración de extractos de *Dioscorea villosa* a una dosis oral de 0.79 g/kg/d (Wojcikowski *et al*, 2008). Cuando la capacidad destoxicante del hígado queda superada, comienza a fallar la glucosa-6-fosfatasa hepática (índice de lesión microsómica) y se producen francos cambios histopatológicos. La forma citotóxica tiene tres formas de presentación, que pueden ser secuenciales o no: esteatosis, degeneración y necrosis. Así mismo al ser el riñón el principal órgano excretor de sustancias tóxicas, es de esperar que resulte afectado por ellas, no ya en el

momento y lugar de la filtración y de la secreción, sino también durante la resorción (en el tubo contorneado distal), que supone una concentración del producto sobre los niveles plasmáticos. Unas veces la actividad citotóxica sólo potenciará o pondrá en evidencia un trastorno renal preexistente; otras veces inducirá alteraciones que serán asiento de posteriores nefropatías y, en otros casos, se producirán lesiones directas sobre la nefrona. Al ser el riñón un órgano muy vascularizado puede experimentar intensas poliarteritis generalizadas consecuentes a la sedimentación de inmunocomplejos en la pared arterial. Histológicamente, se trata de un proceso inflamatorio acompañado con necrosis (Repetto, 1997).

Al respecto, en nuestros resultados se demuestra que la Diosgenina no causa toxicidad renal o hepática en dosis de 400 mg/kg dado que no se observó inflamación evidente de los tejidos al comparar los tejidos de los grupos control con el grupo tratado al momento de la disección. Así mismo en cortes histológicos teñidos con H&E no se observó daño en cuanto a la morfología de los tejidos, arquitectura celular y las partes funcionales de éstos (glomérulo y hepatocito) observándose células de tamaño uniforme con núcleos definidos, sin evidenciar características morfológicas de muerte apoptótica o necrótica.

Estos resultados sugieren que la Diosgenina es candidato idóneo para seguir su evaluación , ya que el efecto antiproliferativo y proapoptótico demostrado en líneas celulares humanas se conserva en la línea celular murina tanto en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, que la hace un digno candidato para valorar su potencial terapéutico como posible agente contra el cáncer de mama con alta capacidad para inducir apoptosis, con poco o nulo efecto necrótico.

Conclusiones

- La Diosgenina afecta el potencial proliferativo en las células tumorales MDA-MB-231, MCF-7 y JC de manera dependiente de la dosis con una IC50 de 3.5, 4.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$.
- La Diosgenina no induce a una muerte por necrosis en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC en las IC50 de 3.5, 4.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
- La Diosgenina induce una baja expresión de la caspasa-3 en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC a 24 h.
- La Diosgenina a una concentración de 400mg/k de peso, no afecta el peso corporal de ratones BALB C inducidos con la línea tumoral de mama JC.
- La Diosgenina a una concentración de 400mg/k de peso afecta negativamente el volumen y la velocidad de crecimiento tumoral de ratones BALB/C inducidos con la línea tumoral de mama JC.
- La Diosgenina a una concentración de 400mg/k no causa toxicidad (necrosis) renal o hepática de ratones BALB C inducidos con la línea tumoral de mama JC.

Referencias Citadas

1. Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. 2007. *Biología molecular de la célula*. 5ta ed. Garland Ciencia Nueva York. 1539 pp.
2. Berek, J y Hacker, N. 2010. *Oncología ginecológica* 5ta ed. Editorial Lippincott. México. 912.
3. Cailleteau, C. Liagre, B. Beneytout, J. 2009. A proteomic approach to the identification of molecular targets in subsequent apoptosis of HEL cells after diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. *J Cell Biochem*; 107(4): 785-796.
4. Chen, Y. Tang, Y. Yu, S. Han, Y. Kou, J. Liu, B. Yu, B. 2015. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, , 13(8): 578-587.
5. Chiang, C. Way, T. Tsai, S. 2007. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation [J]. *Febs Lett*, 581(30): 5735-5742.
6. Corbiere, C. Liagre, B. Bianchi, A. 2003. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol*; 22(4): 899-906.
7. Djerassi, C. Rosenkranz, G. Pataki, J. Kaufmann, S. 1952. Steroids, Synthesis of allopregnane-3~, 11 beta, 17-, 20~, 21-pentol from cortisone and diosgenin. *J Biol Chem*. 194: 115-118.
8. Dobbstein, M. and Moll, U. 2014. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 13(3): 179-196.
9. Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35:495–516.
10. Elmore, S, Boyle, M. Boyle, H. Cora, C. Crabbs, T. Cummings, C. Gruebbel, M. Johnson, C. Malarkey, D. McInnes, F. Nolte, T. Shackelford, C. Ward, J. 2013. Proceedings of The National Toxicology Program Satellite Symposium. *Toxicol Pathol*. 2014; 42:12–44
11. Elmore, S. Dixon, D. Hailey, J. Harada, T. Herbert, R. Maronpot, R. Creasy, D. 2016. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicologic Pathology*, 44(2) .173–188.
12. Geske, F. Lieberman, R. Strange, R. Gerschenson. 2001. L. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differ.*;8:182–91.
13. Holger J. et al . 2012. Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género dioscorea. *Rev. Soc. Quím. Perú*, Lima, v. 78, n. 3, jul.
14. Hostettmann, K. Hostettmann, M. and Marston, A. 1991. Saponins. *Methods in plant biochemistry*, 7:435–471,.
15. Hostettmann, K and Marston, A. 1995. Saponins. Cambridge: Cambridge University Press.
16. Karp, G. 2013. *Biología celular y molecular conceptos y experimentos*. 6ª ed. McGraw-HILL Pag: 56.
17. Kaufmann, S. Lee, S. Meng, X. Loegering, D. Kottke, T. Henzing, A. Ruchaud, S. Samejima, K. Earnshaw, W. 2008. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. ;44:262–72
18. Kerr, J. Wyllie, A. Currie, A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239–57.
19. Krysko, D. Vanden Berghe, T. Parthoens, E. D'Herde, K. Vandenabeele, P. 2008. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol*. ;442:307–341.

20. Kueng, W. Silber, E. Eppenberger, U. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem.*182:16–19.
21. Lizarbe, M. 2007, El suicidio y la muerte celular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*Vol. 101, N°. 2,1-32.
22. Lodish, H. Berk, A. Matsudaira, P. Kaiser, C. Krieger, M. Scott, M. Zipursky, S. Darnell, J. 2005. *Biología celular y molecular*. 5ta. ed. Buenos Aires: Panamericana.
23. Lopéz, R. 2003. La regulación del ciclo celular y el cáncer. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 6(1): 40-44.
24. Maillet, M. 2003. *Biología celular*. Editorial Masson. Barcelona. Págs: 548.
25. Medina, E. 2009. *Fundamentos de oncología*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F., México. 611 .
26. Miyoshi, N. Nagasawa, T. Mabuchi, R. Yasui, Y. Wakabayashi, K. Tanaka,T. Ohshima, H. 2011 Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate- induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam sanyaku and its constituent diosgenin. *Cancer Prev Res.* 4(6):924-934.
27. Moses, T. Kalliope, K. Papadopoulou. Osbourn, A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivates. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 49:6, 439-462.
28. Muños, D. Cuca, L. 2016. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis *Revista Colombiana de Cancerología*;20:124-134.
29. Newman, D. Cragg, G. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.*;70(3):461-477.
30. Pitot, H. 1981. *Fundamentos de oncología*. Editorial Reverté. Barcelona.
31. Primo, E. 2007. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*, Volumen 2. Editorial Reverté. Barcelona.
32. Qin, Y. Wu, X. Huang, W. Gong, G. Li, D. He, Y. Zhao, Y. 2009. Acute toxicity and sub- chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. *J Ethnopharmacol.* 126(3): 543-650.
33. Raju, J. and Mehta, R. 2008. Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin, *Nutrition and Cancer*, 61:1, 27-35
34. Rao, A. and Gurfinkel, D. 2000.*Drug Metabolism and Drug Interactions*. Volume 17, Issue 1-4: 211–236.Repetto M. *Toxicología fundamental*. 1997. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. España.
35. Sánchez L. y Diosdado F. 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *TécPecu*, 41(1):49-62
36. Shen, H. Kreisel, D. Goldstein, D. 2013. Processes of sterile inflammation. *J Immunol.* ; 191:2857–63.Shishodia S, Aggarwal BB. 2005. Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, IκB kinase activation and NF-κB-regulated gene expression [J]. *Oncogene* 25(10): 1463-1473.
37. Sosa, R. Sánchez, K. Motola, D. Green, D. 2008. Síndrome de anorexia-caquexia en el paciente oncológico. *Gac Med Mex*; 144 (5)
38. Srinivasan, S. Koduru, S. Kumar, R. Venguswamy, G. Kyprianou, N. Damodaran, C. 2009. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 125(4): 961-967.
39. Xu, X. Li, T. Fong, C. Chen, X.; Chen, X. Wang, Y. Huang, M. Lu, J. 2016.Saponins from Chinese Medicines as Anticancer Agents. *Molecules*, 21, 1326.

40. Yan, L. Zhang, Y. Gao, W. Man, S. Wang Y. 2009 In vitro and in vivo anticancer activity of steroid saponins of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Exp Oncol.* 31(1): 27-32.
41. Taylor, R. Cullen, S. Martin, S. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* ;9:231–41.
42. Timbrell, A. 2008. Principles of biochemical toxicology. Fourth Edition. Informa Healthcare. New York. USA.
43. Vandenabeele, P. Galluzzi, L. Vanden Berghe, T. Kroemer, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* ;11:700–14
44. Wojcikowski, K. Wohlmuth, H. Johnson, D. Gobe, G. 2008. *Dioscorea villosa* (wild yam) induces chronic kidney injury via pro-fibrotic pathways. *Food Chem Toxicol.* 46(9): 3122-3131.
45. Zaki, M. Nemeth, J. and Trikha, M. 2004. CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int. J. Cancer,* 111: 592–595.
46. Ziegler, U. and Groscurth, P. 2004. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* ;19:124–8
47. American Cancer Society; 2017 [Citado el 29 de Enero 2016]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
48. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención, México; Secretaria de Salud, 2009. www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
49. INFOCANCER. 2015. SECRETARIA DE SALUD. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA. <http://infocancer.org.mx/efectos-secundarios-del-tratamiento-con463i0.html>
50. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. 2015. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER. <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
51. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER, 2016 http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
52. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. 2017. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
53. International Agency for Research on Cancer, Gobocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
54. NIH National Cancer Institute https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#section/_148.
55. Secretaria de Salud. Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013 - 2018 <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>

Apéndice

Medio de cultivo

- RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) 10.42 g

NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, EUA) 2.00 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada, y se suplementa con 1% de antibiótico bencilpenicilina. Se ajusta el pH a 7.2 con HCL 1N y se afora a 1000 ml con agua bidestilada. La solución se esteriliza por filtración al vacío a través de una membrana (Millipore) de poro de 22 μm. Se almacena a 4°C, al momento de su utilización se complementa con 5% de suero fetal bovino.

- DMEM

DMEM (Laboratorios Microlab) 13.42 g

NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, EUA) 3.70 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada, y se suplementa con 1% de antibiótico bencilpenicilina. Se ajusta el pH a 7.2 con HCL 1N y se afora a 1000 ml con agua bidestilada. La solución se esteriliza por filtración al vacío a través de una membrana (Millipore) de poro de 22 μm. Se almacena a 4°C, al momento de su utilización se complementa con 5% de suero fetal bovino.

Desactivación del suero

El suero fetal bovino (SFB) (Biowest, USA) es descongelado a temperatura ambiente, posteriormente es puesto a baño de agua a 56° C durante 30 min. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico estériles.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich, EUA) 8.0 g

Cloruro de Potasio (Sigma-Aldrich, EUA) 0.20 g

Fosfato monoácido de Sodio (Sigma-Aldrich, EUA) 2.16 g

Fosfato diácido de Potasio (Sigma-Aldrich, EUA) 0.20 g

Los constituyentes se diluyen en un volumen de 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1 N y se afora a 1000 ml. Se esteriliza usando filtro (Millipore) de poro de 0.22 mm y se almacena a 4 °C.

Solución salina de verseno

EDTA (Sigma-Aldrich, EUA)	0.40 g
NaCl (Sigma-Aldrich, EUA)	8.00 g
KCl (Sigma-Aldrich, EUA)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, EUA)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1,000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² durante 20 min. Se almacena a 4 °C.

Solución de tripsina

La solución es utilizada para desprender las células. Es preparada al 0.05% en verseno en condiciones estériles.

Solución de cristal violeta

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH: 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye muy bien y por último se filtra usando papel Whatman núm. 2. Se almacena a temperatura ambiente.

Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich, EUA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma-Aldrich, EUA)	1.0 g

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 μ M 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.

Solución de ácido acético

A 10 ml de ácido acético glacial (J. T. Baker, USA) se le agregan 90 ml de agua bidestilada.

Glutaraldehído

Este se prepara tomando 0.157 ml de glutaraldehído (70 % v/v) y se agregan 99.843 ml de agua bidestilada. Almacenar a 4 °C .