



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CELULAR Y CÁNCER

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Laboratorio No. 6, 2do piso, UMIEZ

**EFFECTO DEL COMPUESTO GLICOCONJUGADO  
ESTEROIDAL DIOSGENIN 2-ACETAMIDO-2-DEOXI- $\beta$ -D-  
GLUCOPIRANÓSIDO (MF-10) EN LA RUTA DE INDUCCIÓN  
DE APOPTOSIS EN DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER.**

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**MÉNDEZ VELÁZQUEZ JORGE ALBERTO**



**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Hugo López Muñoz

CDMX, 2020



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.

## **Agradecimientos**

A la Máxima Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por ser un excelente profesor, por todo el apoyo durante mi estadía en laboratorio y por siempre compartir sus conocimientos y pasión por la biología y la ciencia.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme estar en su equipo de trabajo, su disposición a aclarar mis dudas, y por todas las enseñanzas que permitieron la realización de este trabajo.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por siempre compartir sus conocimientos y su apoyo de la manera más amable y hacer más grato el tiempo de trabajo en el laboratorio.

A la Dra. María Del Carmen Lagunas Cruz, por el tiempo invertido en revisar este trabajo y las observaciones y correcciones que permitieron mejorarlo.

Al Dr. Alberto Monroy García, por revisar este trabajo y las observaciones y correcciones realizadas.

Al Dr. Fernando Flores Guzmán, por sus enseñanzas, consejos y su apoyo en las técnicas de laboratorio.

Esta tesis fue realizada con apoyo de los proyectos

CONACyT CIENCIA BÁSICA 255881 Y 258156

PAPIIT IN-226420 Y IN-216718

A mis padres, no hay forma de agradecerles lo suficiente todo lo que han hecho por mí, este logro es por ustedes. Gracias por cada consejo, palabras de ánimo, y la confianza puesta en mí, doy gracias a Dios por su vida porque sé que sin su apoyo esto no habría sido posible.

A mi familia por acompañarme en todo momento, gracias por los consejos y regaños que me permitieron concluir una nueva etapa.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Bety, Helena, Mónica, Conejo, Ulises, Uriel, Fer, Maya, Paloma, Aida y Ximena, por haberme acompañado en los buenos y no tan buenos momentos.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Marco teórico</b> .....	2
2.1. La célula.....	2
2.2. Ciclo celular.....	2
2.3. Muerte celular.....	4
2.3.1. Necrosis.....	5
2.3.2. Apoptosis.....	6
2.4. Vía intrínseca .....	8
2.5. Vía extrínseca .....	10
2.6. Caspasas .....	12
2.7. Cáncer.....	13
2.7.1. Cáncer de mama .....	16
2.7.2. Cáncer de pulmón.....	18
2.7.3. Cáncer cervicouterino.....	20
2.8. Saponinas .....	23
<b>3. Planteamiento del problema</b> .....	28
<b>4. Justificación</b> .....	29
<b>5. Hipótesis</b> .....	30
<b>6. Objetivos</b> .....	31
<b>7. Material y método</b> .....	32
<b>8. Resultados</b> .....	37
<b>9. Discusión</b> .....	53
<b>10. Conclusiones</b> .....	56
<b>11. Referencias</b> .....	57
<b>12. Apéndice</b> .....	65

## 1. Resumen

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento y diseminación incontrolada de células y que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. En el 2015 se reportó como la segunda causa de muerte en todo el mundo. Dentro de los cánceres más frecuentes se encuentra el pulmonar, el de mama y el cervicouterino y aunado a que las terapias actuales (cirugía, radio y quimioterapia) siguen siendo ineficaces en el tratamiento de éste, surge la necesidad de buscar tratamientos alternos. En ese sentido, se ha reportado que las saponinas esteroideas como la diosgenina y sus derivados son capaces de inducir muerte por apoptosis en diferentes tipos de cáncer, tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. Del mismo modo, el compuesto MF-10 (diosgenin 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopiranosido) una saponina glicoconjugada sintetizada por adición de una glucosamina acetilada en la estructura de la Diosgenina, ha mostrado propiedades anticancerígenas en líneas de cáncer cervicouterino, mama y de pulmón, sin embargo, aún no se determina la ruta apoptótica que induce la muerte celular. Por ello, en el presente trabajo se evaluó la ruta de inducción de apoptosis que induce el compuesto MF-10 en las líneas de cáncer cervicouterino, mama y de pulmón (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki) para esto, primero se determinó la actividad antiproliferativa del compuesto y se obtuvo la concentración que reduce en un 50% el número celular ( $IC_{50}$ ), con concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  de 20.47, 25.24 y de 51.72 para las líneas mencionadas respectivamente. Después se evaluó la actividad de la enzima LDH en los medios y se determinó que el compuesto no induce una muerte necrótica por lo que se evaluaron características que señalaran una muerte apoptótica. El análisis morfológico mostró una contracción celular, presencia de cuerpos apoptóticos, y una condensación y fragmentación de la cromatina con el fluorocromo DAPI, además de la presencia de la caspasa 3 activa. Posteriormente se evaluaron, por microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo, las caspasas 8 y 9 (encargadas de la ruta apoptótica extrínseca e intrínseca respectivamente), y mediante microscopía de epifluorescencia las proteínas proapoptóticas Bid y Bax, y la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los resultados mostraron para las líneas MDA-MB-231, SK-LU-1 y Caski una fuerte presencia de caspasa 8 con porcentajes de 58.9%, 32.37% y 31.96% respectivamente en comparación con la 9 (29.47%, 6.55% y 7.13% respectivamente), por lo que se sugiere que la vía apoptótica que induce el compuesto es la extrínseca. Además de observó un aumento en la presencia de las proteínas Bid y Bax y una disminución de Bcl-2. Esta información genera la necesidad de profundizar en el estudio de las saponinas esteroideas (y sus derivados) como posibles agentes terapéuticos contra el cáncer.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. La célula**

La célula es la unidad fundamental de la estructura y función de los seres vivos (Campbell & Reece, 2005); está formada por un núcleo, un citoplasma y una membrana plasmática que actúa como límite con el medio externo. (Mercade & Pascual, 2009). Los organismos superiores, como el humano, son comunidades de células que derivan del crecimiento y la división de una célula fundadora única: cada animal, vegetal u hongo es una colonia extensa de células individuales que cumplen funciones especializadas, coordinadas por sistemas complejos de comunicación (Alberts *et al.*, 2011).

Cada célula puede crecer, reproducirse, procesar información, responder a estímulos y llevar a cabo una amplia variedad de reacciones químicas. Una característica principal en los organismos y en las células es la capacidad de reproducirse. El tipo de reproducción más simple implica la división de una célula “progenitora” en dos células “hijas”. Esto ocurre como parte del ciclo celular (Lodish, 2005).

### **2.2. Ciclo celular**

El ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre. El control temporal preciso de los acontecimientos del ciclo celular asegura que la replicación de cromosomas y su segregación a las células hijas se produzca en el orden apropiado y con una fidelidad extraordinariamente alta. La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos multicelulares y la pérdida de control termina por conducir al cáncer (Lodish, 2005).

El ciclo celular inicia con células en reposo (fase G<sub>0</sub>), las cuales tienen que ser estimuladas por factores de crecimiento con el fin de entrar en el ciclo celular, lo que comienza con el primer período de crecimiento (fase G<sub>1</sub>) en el que se prepara para un período de síntesis de ADN (fase S). Hacia el final de G<sub>1</sub>, hay un punto de restricción (R), en que se repara el ADN en caso de estar dañado. De no haber daño, sigue adelante el ciclo. Una vez que se han duplicado sus cromosomas, la célula entra a un segundo período de crecimiento (fase G<sub>2</sub>), cuando se prepara para

dividirse en dos células hijas durante el período de la mitosis (fase M) (Fig. 1). Esta fase M se divide en una serie de pasos discretos que comienzan con la profase y luego pasan a través de la metafase, anafase, telofase y, finalmente, el proceso de la citocinesis, que divide la célula en dos iguales (Lagunas *et al.*, 2014).

Considerado únicamente desde el punto de vista metabólico, el ciclo celular podría definirse como una sucesión de interfase y mitosis; en la primera ocurren todos los procesos metabólicos y regulatorios necesarios para la ordenada progresión del ciclo, mientras que en la mitosis se dan fundamentalmente los arreglos estructurales, tanto citoplasmáticos como nucleares que permitirán la repartición exacta del material genético (Jiménez & Merchant, 2003).

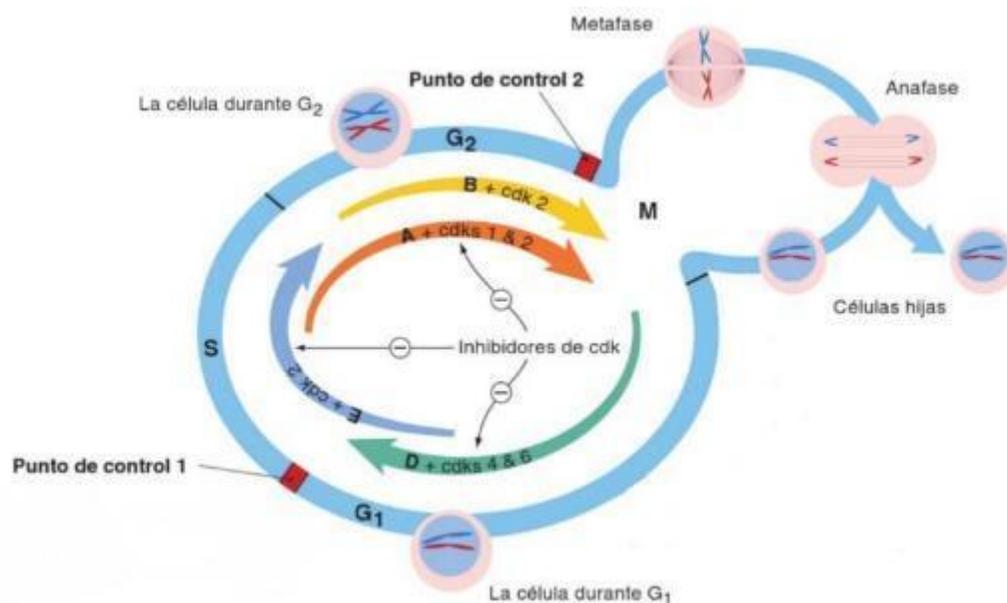


Figura 1. Diagrama esquemático del ciclo celular en el que se representan las funciones de los complejos ciclina/cdk. Imagen tomada y modificada. Fuente: (Dale *et al.*, 2008).

Los procesos básicos tales como la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo celular. El sistema de control del ciclo celular está basado en dos familias claves de proteínas. Las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las cuales sufren fosforilación sobre sus aminoácidos (serinas y treoninas), y las ciclinas (CDC), las cuales se unen a las CDK's y controlan sus reacciones de fosforilación. El ensamblaje cíclico entre estos dos compuestos, ciclinas y CDK, su activación y

desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular (Díaz *et al.*, 2011). Las ciclinas D y E forman complejos con quinasas (CDK4 y CDK6); la actividad de esos complejos es necesaria para la transición de la fase G1 a S. La actividad del complejo ciclina D/CDK es máxima en las etapas temprana e intermedia en G1. Por otro lado, la ciclina A se asocia con dos cinasas: CDK2 y CDK1 y contribuye a la transición de G1-S, y la transición G2-M respectivamente. La transición G2-M y la progresión de M son influidas principalmente, por el complejo ciclina B/CDC2 y ciclina B/CDK2 (Fragoso *et al.*, 2004). Durante el ciclo celular están los denominados “puntos de revisión” (en G1, antes de la síntesis de ADN en G2 antes de la mitosis, y en la mitosis durante la metafase; principalmente), que son mecanismos que detienen la progresión del ciclo en caso de que cualquier ADN cromosómico se dañe o si algún proceso no se llevó a cabo correctamente. Estos puntos están regulados por proteínas como las ATM (ataxia-telangiectasia mutada), ATR (ataxia-telangiectasia y Rad3), y las proteínas supresoras de tumores como lo son Rb (proteína del retinoblastoma) y P53. Estas proteínas funcionan como sensores que reconocen las anomalías celulares además de los daños al ADN y detienen el ciclo para que la célula repare el daño o en su defecto, si el daño es muy grande para repararlo, este mecanismo transmite una señal que conduce a la muerte de la célula dañada (Montes *et al.*, 2013).

### **2.3. Muerte celular**

Las células se hallan inmersas en un ciclo continuo de proliferación y muerte, el desequilibrio entre ambos mecanismos puede dar lugar a la aparición de diferentes enfermedades. Si la balanza se inclina hacia una mayor proliferación, pueden desarrollarse tumores o procesos cancerosos. La muerte celular es, pues, un fenómeno inherente a la vida y permite que aquellas células que no funcionan correctamente, ya sea debido a su envejecimiento, a lesiones fortuitas o a la intervención médica (quimioterapia o radioterapia en el tratamiento del cáncer) sean destruidas de una manera controlada (Ávila *et al.*, 2015).

El control de la muerte celular es fundamental, no solo por las repercusiones drásticas si no se realiza adecuadamente durante el desarrollo, sino también porque la falta o exceso de muerte celular puede conducir a trastornos en el organismo adulto. Así, por ejemplo, alteraciones que induzcan muerte fuera de tiempo o de lugar producen enfermedades como el Parkinson, mientras que una inhibición de la apoptosis puede ser crítica en el surgimiento del cáncer (Jiménez & Merchant, 2003).

Durante cientos de años se había observado la muerte celular; en el tránsito claramente anómalo de los tejidos gangrenosos tras un daño severo, o en los procesos descritos por Galeno a finales del siglo II d.C., que hablaban de estructuras efímeras, cuya desaparición pareciera programada desde el nacimiento. Sin embargo, no fue hasta 1972, cuando Kerr, Willie y Currie utilizaron los términos de necrosis y apoptosis para diferenciar la muerte celular accidental de la regulada (Martínez *et al.*, 2018).

### **2.3.1. Necrosis**

Se ha entendido la necrosis como una muerte celular no controlada que promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y puede favorecer la diseminación de patógenos en un hospedero susceptible (Ramírez & Rojas, 2010).

La necrosis es un proceso de muerte celular violento y patológico, iniciado por estímulos ambientales que resultaban en una rápida pérdida de la homeostasis celular (Martínez *et al.*, 2018). Se produce por radiación, calor, productos químicos, hipoxia e inflamación (D'Arcy, M. S., 2019) y cualquier otra condición que genere caída de ATP (Elena, G., 2002).

El agotamiento del ATP altera el flujo de iones y se liberan y activan las enzimas propias de cada tipo celular. Los procesos ulteriores de autólisis o heterólisis celulares dependen de cuál haya sido su función en la vida y de la variada composición celular de un tejido. Puede haber incremento del calcio intracelular e inducir daños al citoesqueleto. Inicialmente la célula se ve como una estructura homogénea, luego presenta espacios vacuolados y el tejido necrótico muestra patrones distintivos según que predomine el catabolismo o la desnaturalización de las proteínas (Ramírez & Rojas, 2010).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis se caracteriza por la pérdida temprana de la integridad de la membrana plasmática y los orgánulos (Hotchkiss *et al.*, 2009). Esto crea cambios que, histológicamente, están representados por desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática. El ADN es partido en fragmentos irregulares al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es volcado al espacio extracelular, produciéndose la atracción de células del sistema inmune en el área, lo que genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitos inmigrantes (Elena, G., 2002).

<b>APOPTOSIS</b>	<b>NECROSIS</b>
Muerte fisiológica. Proceso muy regulado y controlado.	Muerte no fisiológica; muerte accidental traumática. Proceso no regulado.
Proceso energéticamente activo y que requiere la biosíntesis de proteínas.	Proceso energéticamente pasivo.
Células individuales o pequeños grupos de células.	A menudo células contiguas
Contracción celular y convolución	Hinchazón celular
Picnosis y cariorrexis	Cariolisis, picnosis y cariorrexis
Membrana celular intacta	Membrana celular interrumpida
Citoplasma retenido en cuerpos apoptóticos	Citoplasma liberado
Sin inflamación	Inflamación generalmente presente

Cuadro 1. Comparación de las características morfológicas de la apoptosis y la necrosis. (Sosa *et al.*, 2017) (Elmore, S., 2007).

### **2.3.2. Apoptosis**

La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Conceptualmente la apoptosis puede ser considerada opuesta a la muerte celular por necrosis, en la que las células son sujetos pasivos irremediablemente abocados a morir. En este sentido, lo distintivo de la apoptosis radica en el control que ejercen las células sobre

su propio destino, cuando "deciden" seguir el camino apoptótico (Machacado & Concepción, 2012).

Las primeras descripciones de la muerte celular programada se realizaron observando por microscopía los cambios morfológicos que se producían en las células y, posteriormente, las alteraciones a nivel ultraestructural se describieron por microscopía electrónica (Lizarbe, 2007). La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos que definen el proceso. En la apoptosis se produce reducción del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, activación de caspasas, fragmentación del ADN, vesiculación de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos que finalmente serán fagocitados por macrófagos o por las propias células vecinas para su eliminación (Fig. 2). Es una muerte ordenada y que no provoca inflamación en tejidos circundantes (Palacios *et al.*, 2011).

Las alteraciones morfológicas descritas tienen lugar a la vez que se suceden una serie de cambios bioquímicos, principalmente, la activación de las caspasas, la fragmentación del ADN y otras proteínas y modificaciones en la membrana que permiten el reconocimiento por parte de las células fagocíticas. Las caspasas son un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las cisteína-proteasas, cuya función consiste en degradar otras proteínas (Ávila *et al.*, 2015). Otro grupo de proteínas importantes son la familia de Bcl-2, éstas son reguladoras críticas de la apoptosis, dentro de sus funciones se incluyen los pasos de muerte celular dependientes de la mitocondria. Se ha descrito que estas proteínas regulan directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo o inhibiendo el flujo de proteínas apoptóticas de estos organelos. Estas proteínas tipo poro  $\alpha$ -hélice incluyen proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W y posiblemente Bcl- B) y proteínas proapoptóticas (Bax, Bak y Bid) (Rojas *et al.*, 2009).

Debido a la importancia de este proceso, desde su origen, cada célula produce sus propias herramientas de autodestrucción. Dicha producción es controlada por las capacidades individuales de cada célula para recibir, procesar y generar señales que activen o inhiban algún elemento de la maquinaria letal. Con la enorme heterogeneidad celular de los organismos superiores, lo anterior supone numerosos caminos que la célula puede tomar para autodestruirse. Estas rutas son sumamente complejas y pueden converger o divergir en varios puntos del proceso o entre tipos celulares. Así, la muerte celular regulada puede activarse por estímulos intracelulares (como estrés o daño al DNA) o extracelulares (como la recepción de

señales letales) que desencadenan una serie de eventos que guían a la célula a su muerte, también son conocidas como ruta intrínseca y extrínseca, respectivamente (Martínez *et al.*, 2018).

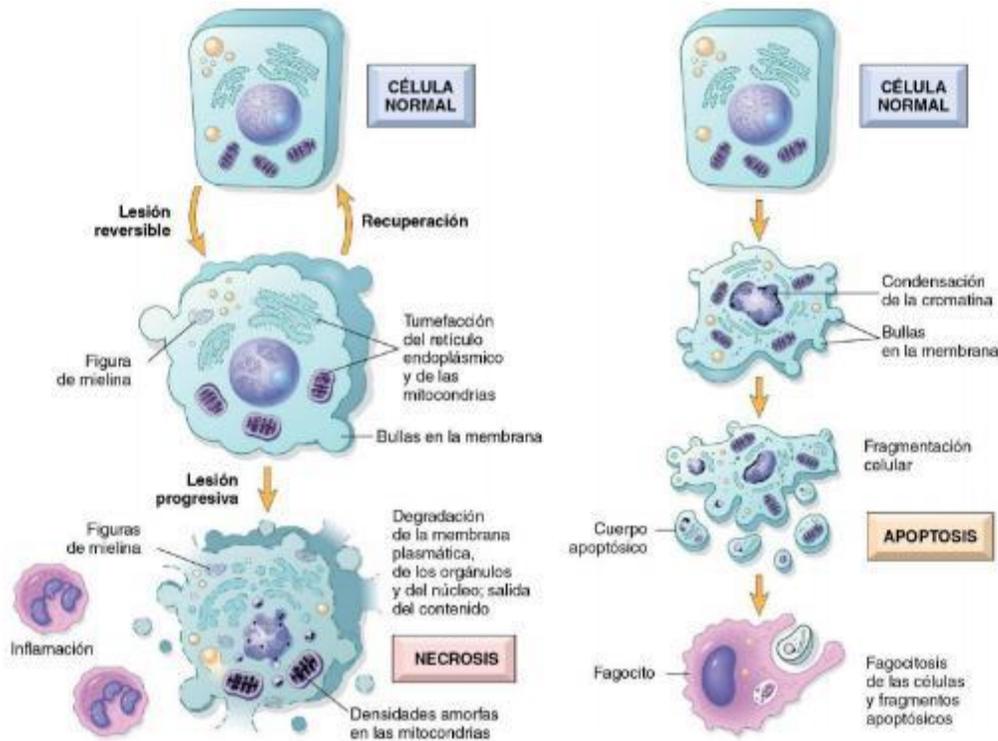


Figura 2. Características celulares de la necrosis (izquierda) y de la apoptosis (derecha). Imagen tomada de Kumar, V., *et al.*, (2018).

## 2.4. Vía intrínseca

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN. Esta vía es mediada en la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de las proteínas bien caracterizadas incluyen: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 (proteína A2 requerida para las altas temperaturas). Quizá la más importante de estas proteínas proapoptóticas sea el citocromo C, el cual se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de

caspasa 9, y a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa 3 (Rojas *et al.*, 2009). El papel crítico de control de esta vía corresponde a las proteínas de la familia Bcl-2 (Palacios *et al.*, 2011). La familia de proteínas Bcl-2 controla la muerte celular principalmente mediante interacciones de unión directa que regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) que conduce a la liberación irreversible de proteínas del espacio intermembrana, la posterior activación de la caspasa y la apoptosis (Kale *et al.*, 2018).

Las proteínas antiapoptóticas del Bcl-2 (como Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL) están generalmente integradas dentro de la membrana mitocondrial externa, pero hay casos de localizaciones citosólicas, endoplasmáticas y de membrana nuclear. Estas proteínas funcionan dentro de la vía apoptótica para unirse directamente e inhibir las proteínas proapoptóticas de Bcl-2. Los miembros proapoptóticos se dividen funcionalmente en dos clases: las moléculas efectoras (por ejemplo, Bax y Bak) que permeabilizan la membrana mitocondrial exterior creando el poro proteolípido responsable de la liberación del citocromo C y las proteínas como Bid, Bad, Bik, entre otras, que funcionan en distintas vías de estrés celular. La señalización combinada dentro de la familia de Bcl-2 dicta el destino inmediato de la célula afectada (inducir o no la permeabilización de la membrana externa mitocondrial) (MOMP). Lo que sigue siendo muy controvertido en el campo de la apoptosis es la naturaleza exacta de las interacciones proteína-proteína entre los miembros de la familia Bcl-2 que son los mediadores clave de la señal necesaria para activar la MOMP y la apoptosis (Chipuk & Green, 2008). Mediante estas interacciones se ha sabido que después de la exposición a estímulos estresantes, las señales apoptóticas pueden ser transmitidas a las mitocondrias por la proteína activadora proapoptótica como tBid (Bid/p15 truncado), que activan a Bax para inducir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOM). Estas interacciones proteína-proteína y proteína-membrana son críticas para la regulación de la apoptosis, ya que la MOMP conduce irreversiblemente a la muerte celular (Shamas *et al.*, 2015).

Cuando las células perciben un estímulo extracelular (citotóxico, radiación UV, rayos X), o alguna señal intracelular (por ejemplo, daño del ADN e inestabilidad nuclear), la membrana externa de la mitocondria sufre cambios en su potencial de membrana y en la transición de su permeabilidad desencadenando los procesos antes mencionados (Palacios *et al.*, 2011).



La apoptosis inducida a través de la activación de los receptores de muerte incluyendo Fas, TNF $\alpha$ R, DR3, DR4, y DR5 por sus respectivos ligandos inician la señalización a través de la oligomerización de los receptores, lo que a su vez resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras especializadas y la activación de cascadas de caspasas. La caspasa 8 se oligomeriza y se activa mediante autocatálisis (CST, 2020). La caspasa 8 activada estimula la apoptosis a través de dos cascadas paralelas: puede dividir y activar directamente la caspasa 3 (Fianco *et al.*, 2018) o alternativamente, puede actuar sobre Bid, una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2. Bid truncada (tBid) se traslada a las mitocondrias (CST, 2020), formando oligómeros grandes que se insertan en la membrana externa mitocondrial (Green & Llambi, 2015), induciendo, a través de las moléculas de Bak y Bax, la formación de apoptosomas por la liberación de citocromos (Kiraz *et al.*, 2016), que activa secuencialmente las caspasas 9 y 3. (CST, 2020).

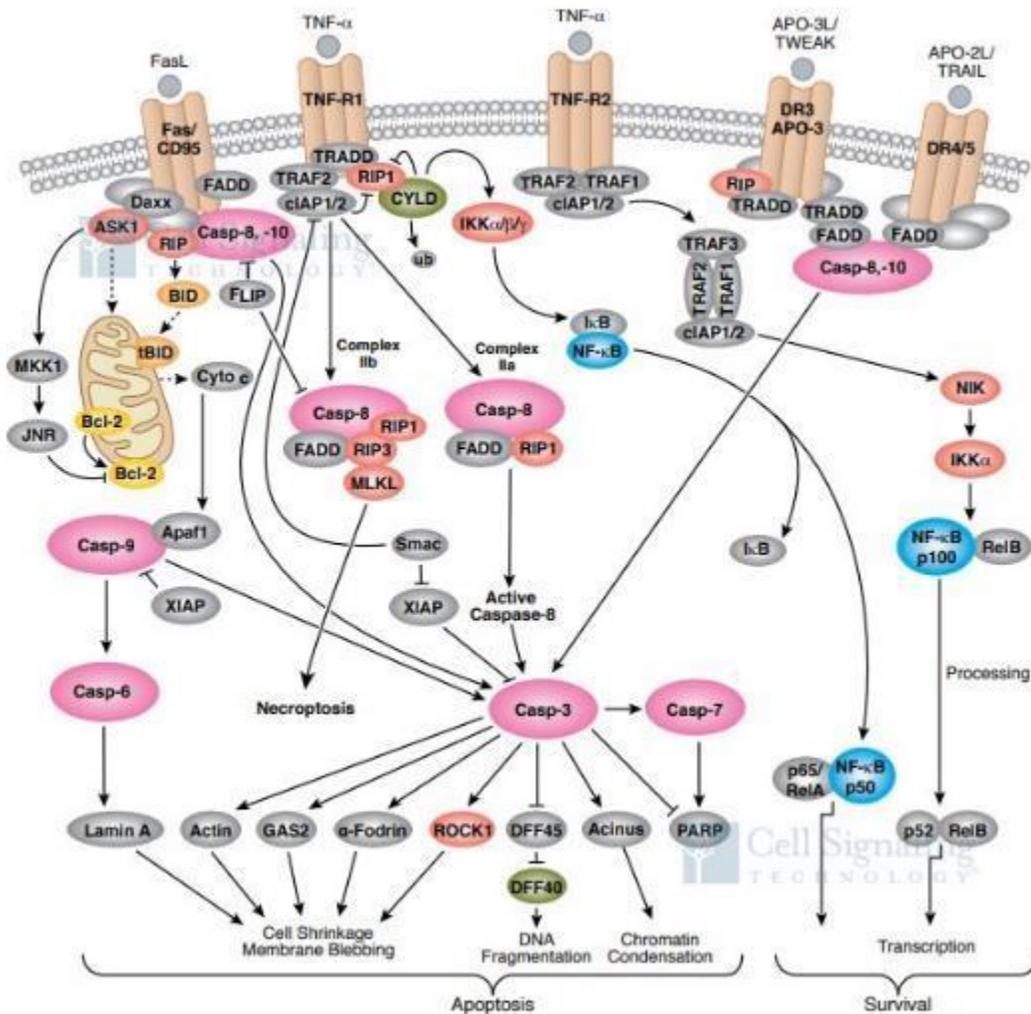


Figura 4. Ruta apoptótica extrínseca, desencadenada por los receptores de muerte. Imagen tomada de Cell Signaling Technology (CST, 2020).

## 2.6. Caspasas

La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es compleja. Se puede iniciar a través de distintas vías dependiendo del estímulo recibido por la célula. Una vez iniciada la señal, ésta se transmite a través de distintas proteínas adaptadoras. Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas, que cortan a la proteína diana detrás de un residuo de aspártico. El término caspasa se introduce como nombre trivial en 1996 para designar a los miembros de la familia de las proteasas ICE/CED3 y homogeneizar la nomenclatura. Las caspasas son las encargadas, en último término, de ejecutar el proceso de muerte celular y activan a otras enzimas que degradan múltiples proteínas, con el consiguiente desmantelamiento de la arquitectura celular (Lizarbe, 2007).

Las caspasas existen en las células normales como zimógenos inactivos análogos a los zimógenos que regulan la coagulación sanguínea. Cuando las células inician la apoptosis, las caspasas se activan a través de uno o dos cortes proteolíticos que cortan el péptido precursor en las subunidades grande y pequeña que constituyen la enzima activa (Jiménez & Merchant, 2003).

Las caspasas actúan en las mitocondrias, en el citosol y en el núcleo celular e incluyen distintos grupos: (a) mediadores de la inflamación (caspasa-1, 4 y 5); (b) efectores de la apoptosis (caspasa 3, 7 y 2); (c) activadoras de caspasas apoptóticas (caspasas 6, 8, 9 y 10) (Dubin, M., 2000). Como ya se mencionó, existen dos principales rutas apoptóticas. Una es la ruta por receptor de muerte y la otra es la ruta mitocondrial. La caspasa 8 y la caspasa 9 son activadas en estas dos vías, respectivamente, y estas dos vías convergen en la activación de la caspasa 3 (Cai *et al.*, 2002).

El mecanismo de la apoptosis es complejo e involucra muchas vías, los defectos pueden ocurrir en cualquier punto a lo largo de estas, lo que lleva a la transformación maligna de las células afectadas. Conocer este mecanismo es importante ya que juega un papel fundamental en la patogénesis de muchas enfermedades como es el cáncer (Wong, 2011).

## 2.7. Cáncer

Los mecanismos delicadamente ajustados que controlan procesos dedicados a la renovación y reparación celular pueden cometer errores y conducir a alteraciones catastróficas de la estructura corporal. La más importante de las enfermedades asociadas con la renovación tisular es el cáncer. Cuando una célula sufre una alteración genética que le permite sobrevivir y dividirse cuando no debería y producir células hijas que se comportan de la misma manera se pierde el control de una manera insidiosa y potencialmente devastadora. Esta catástrofe es el suceso que produce el cáncer (Alberts *et al.*, 2011).

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo (Muñoz, 2004). Las células cancerosas (y su progenie) se definen por dos propiedades heredables: 1) proliferan de forma incontrolada y 2) invaden y colonizan territorios que en condiciones normales pertenecen a otro tipo celular (Alberts *et al.*, 2011).

Normalmente, las células del sistema inmune son capaces de eliminar a estas células tumorales, en un proceso denominado inmunovigilancia tumoral. Sin embargo, algunas pueden adquirir nuevas capacidades que les permiten evadir estos mecanismos de control y se desarrolla una neoplasia (Sánchez, 2013). Las neoplasias son masas anormales de tejido que crecen de forma incontrolada, excesiva, autónoma e irreversible, superando a los tejidos normales en velocidad de crecimiento y que poseen rasgos funcionales y morfológicos diferentes a los de sus precursoras. Esta proliferación de células persiste incluso tras la desaparición del estímulo que la desencadenó. Las neoplasias malignas se agrupan por lo general en dos clasificaciones dependiendo del tejido en que se desarrollen, en sarcomas o carcinomas. (Ouchen, 2008).

El rol de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis fue puesto de manifiesto al descubrir en el genoma humano, genes homólogos a genes retrovirales relacionados previamente con el desarrollo de tumores. En células humanas normales estos genes se denominaron protooncogenes y se relacionan con el crecimiento y proliferación de las células normales. Cuando se encuentran mutados se denominan oncogenes y su mutación es de tipo dominante, es decir, sólo es necesario que uno de los alelos sufra una mutación para que la proteína que codifica, gane funcionalidad. Esto generalmente se traduce en aumento en la supervivencia y proliferación (Sánchez, 2013). Las mutaciones pueden ser

hereditarias o esporádicas, a nivel de nucleótido, pueden ser por sustitución, adición o deleción y alteran la fisiología celular induciendo a la transformación de la misma (Meza *et al.*, 2006).

Además de los diversos carcinógenos químicos y físicos (radiación ionizante, luz UV), varios agentes biológicos también pueden contribuir al desarrollo del cáncer; por ejemplo, virus, bacterias y parásitos pueden potenciar un proceso cancerígeno en humanos. Varios estudios se han dirigido a caracterizar las células cancerosas. La caracterización más significativa de las células cancerosas provino de Hanahan y Weinberg (Chakraborty & Rahman, 2012).

De acuerdo a Hanahan y Weinberg se propone un modelo que define las propiedades que adquiere y caracterizan a un tumor maligno, estas características o sellos son: potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invadir los tejidos, generar metástasis, evasión de la destrucción por el sistema inmune, inflamación, inestabilidad genómica y la desregulación del sistema energético celular (Fig. 5) (Hanahan & Weinberg, 2011).

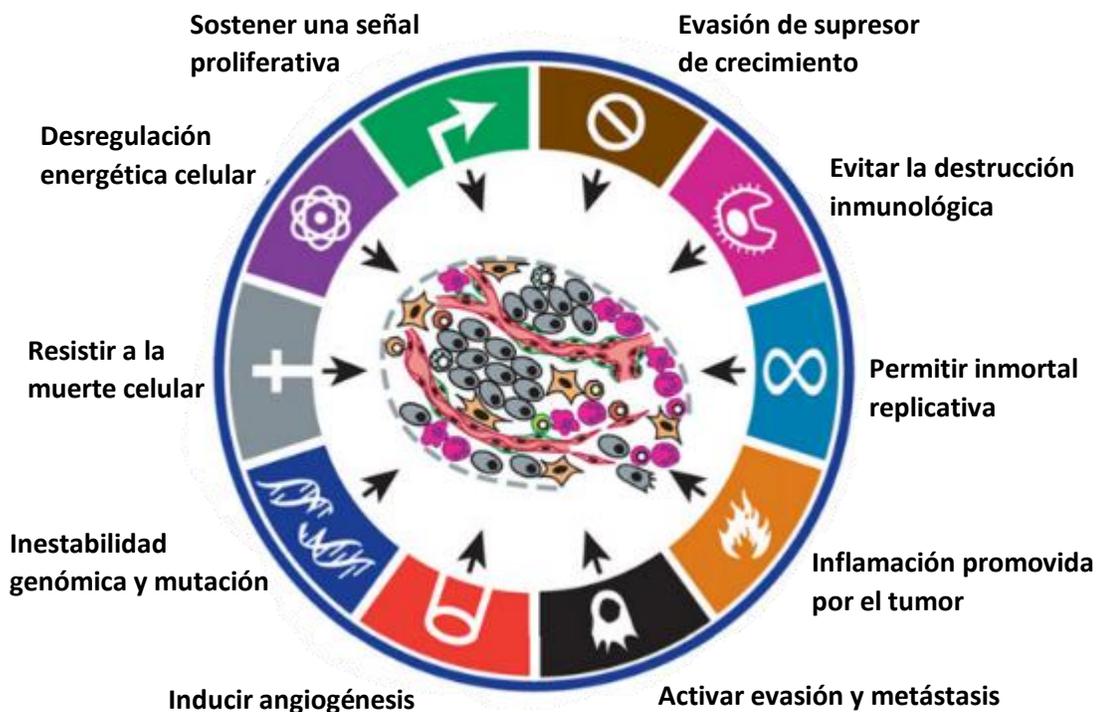


Figura 5. Características o sellos del cáncer. Imagen tomada y modificada de Hanahan & Weinberg (2011).

La creciente evidencia sugiere que, en muchos casos, las células cancerosas se originan a partir de una sola célula con características de células madre. Estos hallazgos deberían tener un profundo efecto en el tratamiento del cáncer. El tratamiento tradicional contra el cáncer se basa en el supuesto de que todas las células somáticas poseen un potencial maligno similar (Chakraborty & Rahman, 2012).

El manejo de los cánceres incluye prevención, vigilancia y detección temprana, tratamiento de enfermedades tempranas y avanzadas, y los problemas relacionados con la supervivencia a largo plazo después de la cura (Burney, I. A., & Al-Moundhri, M. S., 2008). La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son los tipos más comunes de tratamientos contra el cáncer disponibles en la actualidad (Arruebo *et al.*, 2011).

La radioterapia es un componente importante del tratamiento del cáncer y aproximadamente el 50% de todos los pacientes con cáncer reciben radioterapia durante el curso de la enfermedad; contribuye al 40% del tratamiento curativo para el cáncer. El objetivo principal de la radioterapia es privar a las células cancerosas de su potencial de multiplicación (división celular) (Baskar *et al.*, 2012). Por otro lado, también se han desarrollado una gran cantidad de quimioterapéuticos adicionales que se dirigen a la replicación del ADN, así como una variedad de otros objetivos biológicos dentro de la célula, como los microtúbulos necesarios para la división celular que finalmente conduce a la muerte de células cancerosas (Shewach & Kuchta, 2009).

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, y es responsable de aproximadamente 9.6 millones de muertes en 2018. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer. (WHO, 2020).

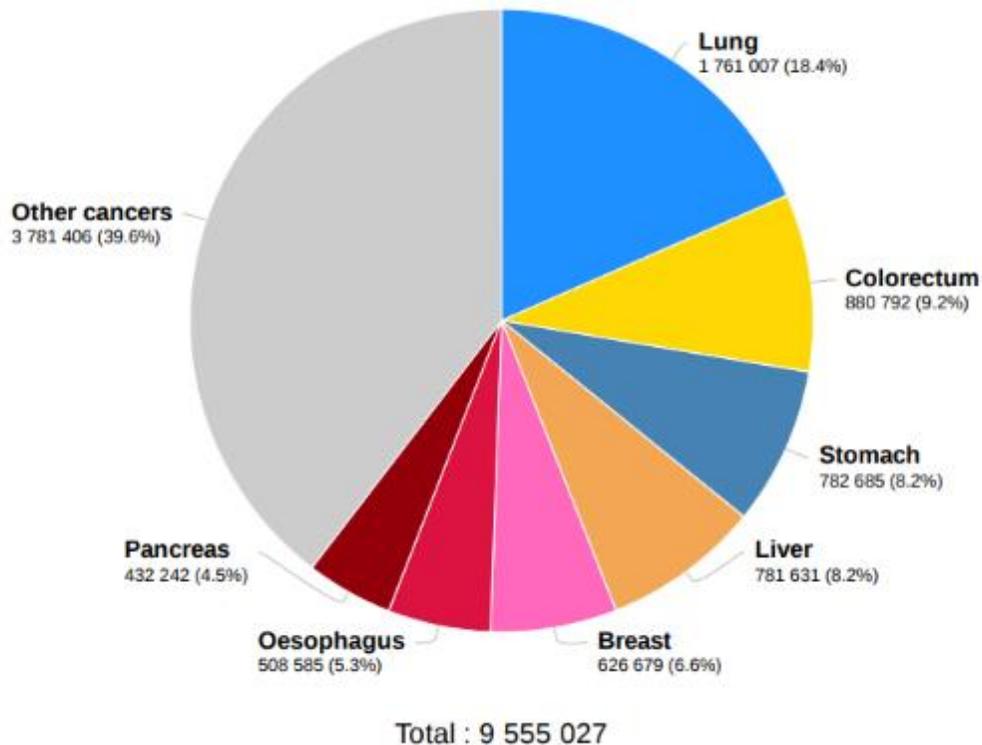


Figura 6. Número estimado de muertes en 2018, en todo el mundo, todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades. (WHO, 2020).

### 2.7.1. Cáncer de mama

La clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se divide en no invasores (in situ), invasores y otros (enfermedad de Paget del pezón). Aproximadamente 75-80% de los cánceres son invasivos o infiltrantes. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasor que representa el 70 al 80%, el segundo más común es el lobulillar invasor (5-10%), difícil de diagnosticar por su diseminación difusa. Otros tipos de cáncer menos comunes son el tubular, medular, mucinoso y papilar, entre otros. El carcinoma ductal in situ (CDIS) permanece confinado al sistema ductal de la mama sin penetrar la membrana basal, aproximadamente del 30 al 50% de las pacientes con CDIS desarrollará carcinoma ductal en un periodo de 10 años. El

carcinoma lobulillar in situ (CLIS) se origina del lobulillo terminal ductal, pudiéndose distribuir de forma difusa por la mama. Las mujeres con CLIS tienen un riesgo de hasta el 30% de desarrollar cáncer de mama invasor, más frecuentemente ductal, presentándose con la misma frecuencia en ambas mamas, por lo que se considera un factor de riesgo más que un precursor de cáncer de mama. (Castellanos *et al.*, 2009).

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial en la que los factores genéticos y ambientales contribuyen a su aparición. En un pequeño porcentaje de los casos, existe una mutación germinal en un gen de predisposición al cáncer de alta penetrancia, el cual es considerado un factor determinante para la aparición de la enfermedad. El cáncer de mama esporádico, que no está causado principalmente por una mutación heredada de alta penetrancia, representa más del 90% de los casos de cáncer de mama en todo el mundo. Los factores de riesgo establecidos para el cáncer de mama incluyen factores reproductivos (menarquia temprana, nuliparidad, edad mayor de 30 años en el primer embarazo, uso de anticonceptivos hormonales de alta dosis, menopausia tardía y terapia de reemplazo hormonal), aumento de la edad, alta densidad del tejido mamario y una historia familiar de cáncer. (Prolla *et al.*, 2015).

Algunos de los cánceres clasificados como hereditarios se asocian con un gen del cromosoma 17. Este gen, BRCA1, es mutado en familias con inicio temprano de cáncer de mama y de ovario. Entre un 50 a 85% de las mujeres con mutaciones de genes BRCA1 tendrán la posibilidad de desarrollar cáncer en el transcurso de sus vidas. Otros genes se asocian con un aumento en el riesgo de cáncer de mama y otros tipos de cáncer, tales como BRCA2, mutación ataxia-telangiectasia (ATM) y TP53, el gen supresor de tumor. Se han encontrado mutaciones de TP53 en aproximadamente el 1% de cánceres de mama en mujeres de menos de 40 años de edad (Gómez *et al.*, 2008).

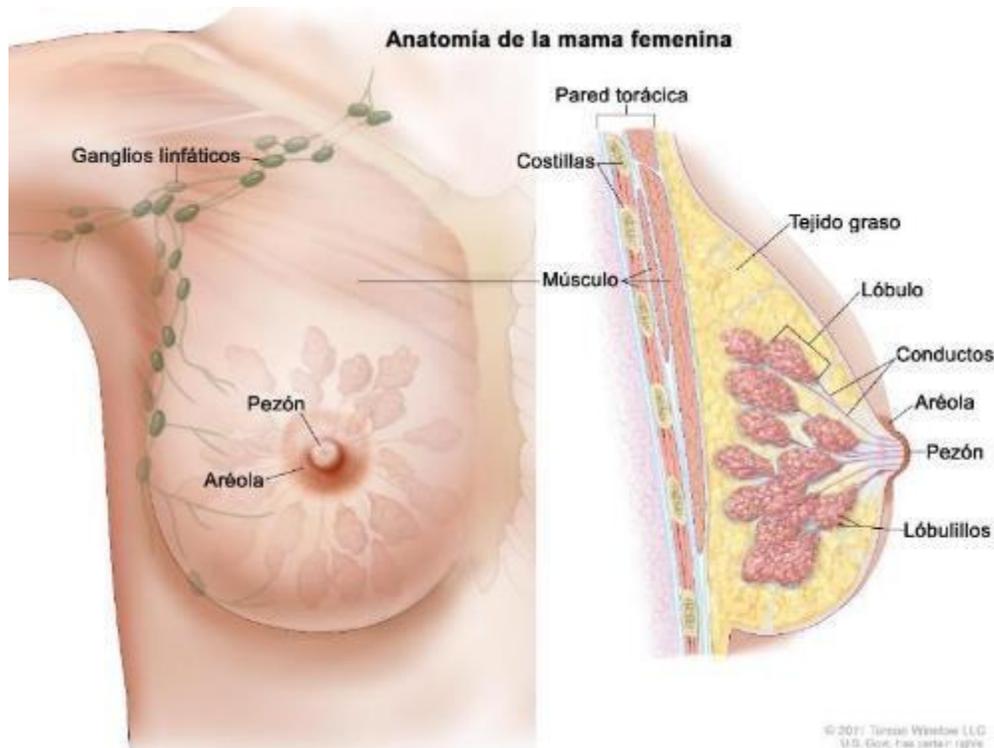


Figura 7. Anatomía de la mama femenina. Imagen tomada de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>

### 2.7.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se ha transformado de una enfermedad rara en un problema global y un problema de salud pública. Los factores etiológicos del cáncer de pulmón se vuelven más complejos junto con la industrialización, la urbanización y la contaminación ambiental en todo el mundo (Mao *et al.*, 2016).

El cáncer pulmonar es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, tanto en hombres como mujeres, causando más de 1.3 millones de muertes al año. La posibilidad de desarrollar un cáncer pulmonar en el transcurso de la vida se estima en 1 cada 13 hombres y 1 cada 16 mujeres (Clavero, R., 2013). En el 2004, la Organización Mundial de la Salud y la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón adoptaron la misma clasificación histológica del cáncer de pulmón, la cual establece dos grandes grupos: cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Amorín, K., 2013).

El cáncer de pulmón no microcítico (células no pequeñas) es el tipo de cáncer de pulmón más común. Alrededor del 85% de los cánceres de pulmón son de este tipo. El carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes son subtipos del cáncer de pulmón no microcítico (ACS, 2019).

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es el más común entre las neoplasias malignas y constituye el 80 % de todos los tumores de pulmón. Esta entidad representa la principal causa de muerte por cáncer en la mayoría de los países del mundo. La frecuencia más alta ocurre en edades comprendidas entre los 55 y 65 años (Yanes *et al.*, 2010).

Es también un tumor agresivo con una sobrevida global de aproximadamente 16% a 5 años. Lamentablemente cerca del 50% de los pacientes presenta metástasis al momento del diagnóstico, 20-30% tiene una enfermedad localmente avanzada y solo un 25% se presenta en etapas iniciales. Los principales tipos histológicos son el Adenocarcinoma (40%), el carcinoma escamoso (25%) y el de células grandes (10%), los que presentan cierta variabilidad en su comportamiento y pronóstico.

Al cáncer de pulmón microcítico también se le llama cáncer de células pequeñas. Alrededor del 10-15% de los cánceres de pulmón son de células pequeñas. Este tipo de cáncer tiende a propagarse rápidamente. (ACS, 2019).

Se relaciona también al consumo de cigarrillo. Se presenta generalmente en etapas avanzadas; aproximadamente dos tercios de los pacientes con CPCP tienen metástasis a distancia y el otro tercio compromiso nodal extenso en el hilio pulmonar, mediastino o supraclavicular, lo que determina su mal pronóstico general. Dependiendo de su extensión se clasifica generalmente como Enfermedad Extendida o Localizada (Clavero, R., 2013).

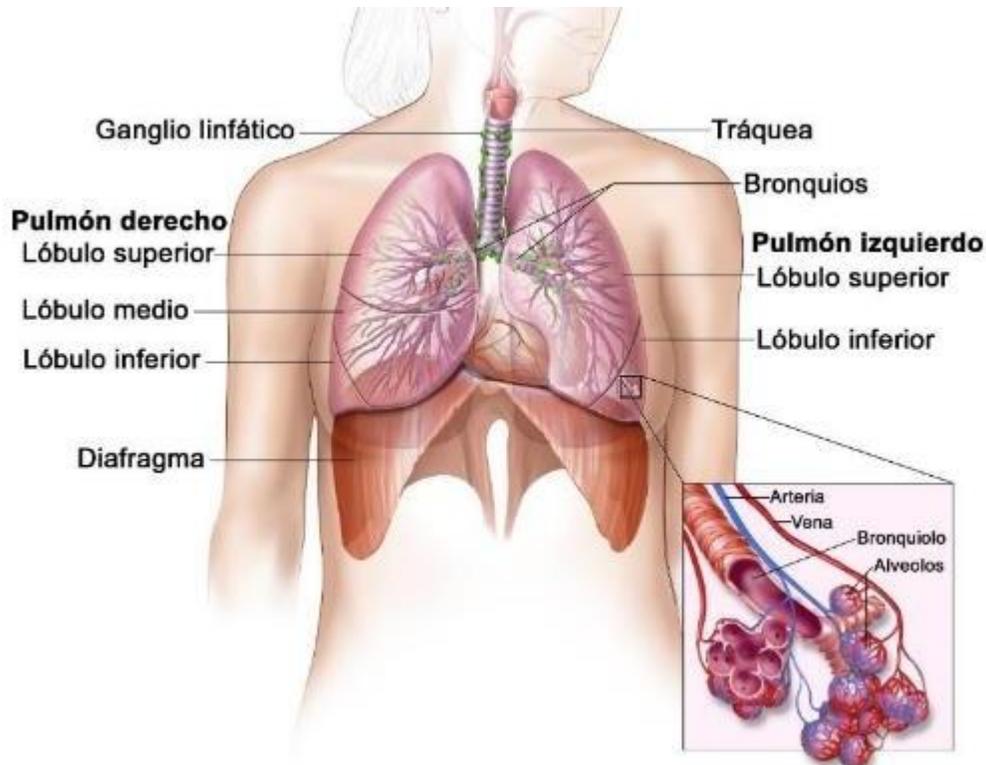


Figura 8. Anatomía del sistema respiratorio. Se observa la tráquea, ambos pulmones con los lóbulos y las vías respiratorias. Imagen tomada de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon>

### 2.7.3. Cáncer cervicouterino

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó más de 6 millones de casos de cáncer en todo el mundo en mujeres durante 2008; El 57.2% de esos casos ocurrieron en países menos desarrollados. (Hernández *et al.*, 2015). El cáncer cervicouterino (CCU) es el cuarto cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial. La carga que enfrentan los países de bajos y medianos ingresos es significativamente mayor que los países de altos ingresos (Vu *et al.*, 2018).

El CCU es una neoplasia maligna multifactorial, que se desarrolla generalmente en la zona de transformación de la unión escamo-columnar del cuello uterino (Fig. 9), a partir de lesiones precursoras después que ha ocurrido una infección por el virus del papiloma humano (VPH), en presencia de otros cofactores: genéticos, ambientales (Sanabria *et al.*, 2011).

Se han descrito diversos tipos de CCU: entre los que predominan el escamoso y sus variantes (90-95%), y el adenocarcinoma cervical (< 5%) La incidencia del

carcinoma de células escamosas ha disminuido por la introducción de técnicas como el Papanicolaou (Sanabria *et al.*, 2011).

La infección por el virus del papiloma humano ha sido reconocida como un factor etiológico para el desarrollo del CCU. Se han descrito más de 120 tipos de VPH y aproximadamente una tercera parte de ellos son capaces de infectar el epitelio del tracto genital. Otros tumores relacionados con el VPH son del canal anal, vagina, vulva, pene y oral, de tal manera que se ha estimado que el VPH es responsable del 5.2% de todos los cánceres en el mundo. Las mujeres son infectadas por alguno de estos virus poco tiempo después del inicio de la vida sexual activa, y la mayoría de las infecciones ocurren en mujeres menores de 25 años. Después de esa edad, la prevalencia disminuye rápidamente. En mujeres de edad media, las infecciones por VPH son transitorias, volviendo a observarse un incremento en las infecciones en mujeres de 30 años (Zaldívar *et al.*, 2012).

El epitelio escamoso estratificado que tapiza el cuello uterino brinda de la protección contra sustancias tóxicas e infecciones. En circunstancias normales, las capas superiores se destruyen y descaman continuamente, y la integridad del revestimiento se mantiene debido a la formación constante y ordenada de nuevas células en la capa basal. No obstante, en presencia de una infección persistente por el VPH y otros cofactores, las células escamosas metaplásicas de la zona de transformación adoptan un aspecto anormal, indicador de un tumor premaligno epidermoide cervicouterino (displasia). Estas últimas se multiplican de manera desordenada, características de la transformación cancerosa, y dan lugar al carcinoma epidermoide (WHO., 2007).

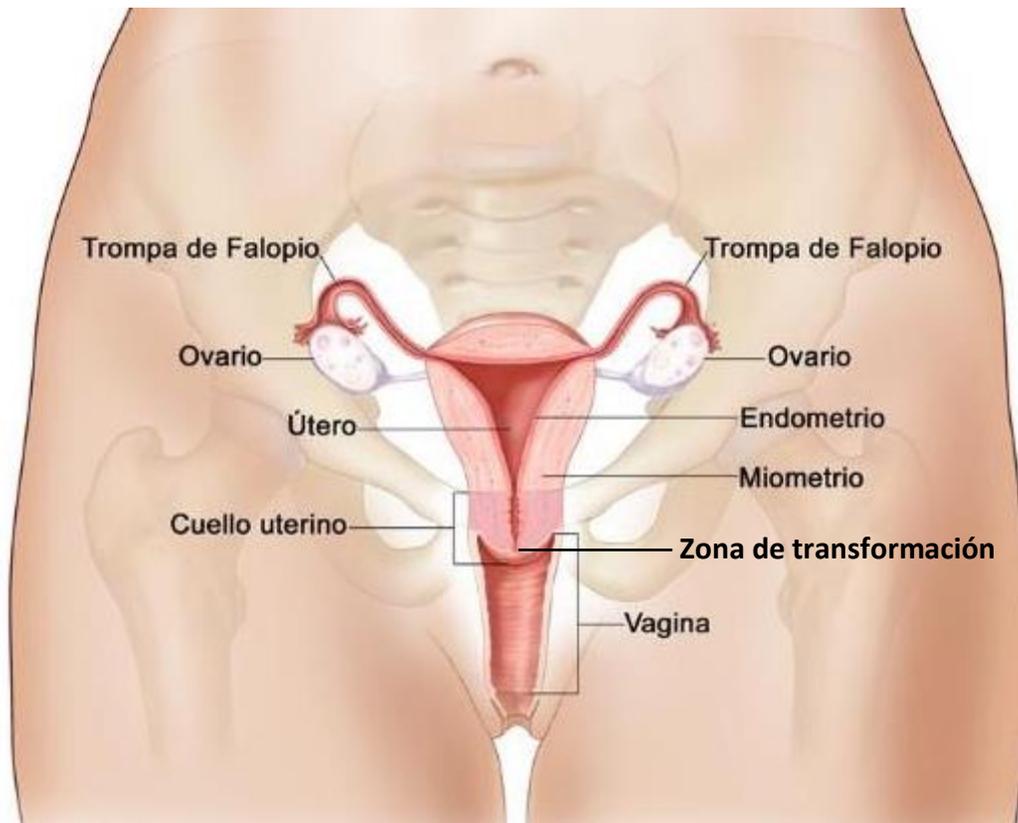


Figura 9. Anatomía del aparato reproductor femenino. Imagen tomada y modificada de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/significado-cambios-en-cuello-uterino.pdf>

La asociación entre el VPH y el CCU se considera causal. La naturaleza causal de esta asociación se basa en: 1) La detección regular de ADN viral en las células neoplásicas de los tumores; 2) La demostración de la expresión oncogénica viral (genes E6 y E7) en tejido tumoral pero no en tejido sano; 3) Las propiedades de transformación de los genes E6 y E7; 4) El requerimiento de la expresión de E6 y E7 (Fig. 10) para mantener el fenotipo maligno de líneas celulares de carcinoma cervical; 5) La interacción de las oncoproteínas virales con las proteínas reguladoras del crecimiento de las células hospedadoras; y 6) Los resultados de múltiples estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones, con distintos diseños, demuestran de forma coherente e inequívoca que las infecciones por ciertos tipos de VPH son el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (Rincón, *et al.*, 2016).

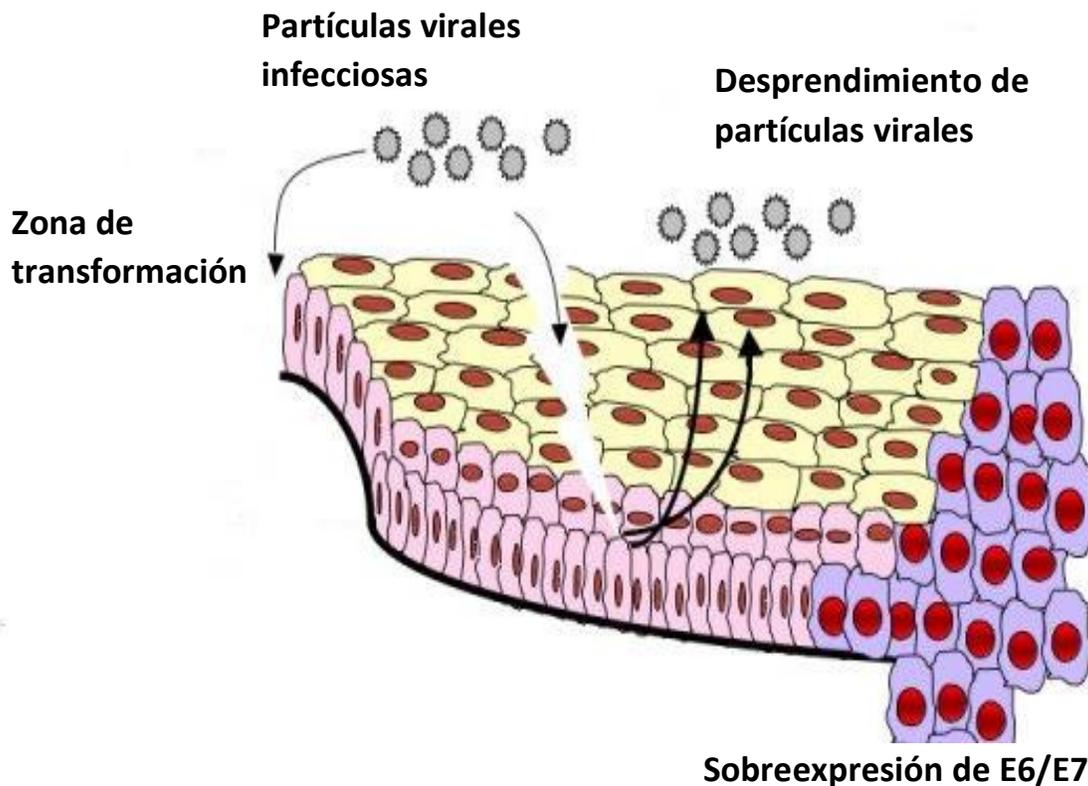


Figura 10. Ciclo viral del VPH y desarrollo del cáncer cervical. Imagen tomada y modificada de Pérez *et al.*, 2008.

## 2.8. Saponinas

Las saponinas son productos naturales de plantas ampliamente distribuidos con una gran diversidad estructural y funcional. Las saponinas se clasifican ampliamente como triterpenoides, esteroides o glicoalcaloides esteroideos, en función de la estructura de aglicona de la que derivan. Las saponinas son fitoquímicos diversos estructural y funcionalmente naturales que se distribuyen ampliamente en las plantas. Son un grupo complejo y químicamente variado de compuestos que consisten en agliconas triterpenoides o esteroidales unidas a restos oligosacáridos (Fig. 11) (Moses *et al.*, 2014).

Las saponinas por hidrólisis ácida o enzimática dan origen a una sustancia libre del o los azúcares formando así la sapogenina. Se ha reportado que un 88% de familias de plantas estudiadas contienen saponinas donde cumplen un papel en la

regulación del crecimiento, tienen propiedad alelopática, fungicida, entre otras (Romo de Vivar, 2006). Las saponinas esteroidales no están tan distribuidas como las triterpenoides en la naturaleza, abundan especialmente en las monocotiledóneas: *Dioscoraceae*, *Amarylidaceae*, *Agavaceae* y *Liliaceae*. Sin duda la más útil de todas las saponinas es la Diosgenina, que se encuentra en diversas especies de *Dioscorea*; este metabolito está disponible en grandes cantidades en los rizomas de estas plantas, y es utilizado como materia prima en la fabricación de cortisona y hormonas sexuales como la progesterona (Anaya L., 2003). También se han reportado saponinas provenientes de la soja con la capacidad de suprimir el crecimiento de HT-29 de cáncer de colon, saponinas aisladas de *Balanites aegyptica* con actividad citostática en la línea P-388 de leucemia linfocítica. De igual manera, una mezcla de saponinas esteroidales provenientes de esta especie ha tenido actividad anticancerígena contra A549 de cáncer pulmonar de células no pequeñas y U373 de glioblastoma (Ali *et al.*, 2012).

Debido a la gran variabilidad de sus estructuras, se tiene reportado que las saponinas presentan efectos antitumorales a través de diferentes vías. Además, es importante resaltar que hace falta el estudio de gran cantidad de saponinas, sus estructuras y la química relacionada con ellas, además de profundizar en los mecanismos de acción y las relaciones de función de estas estructuras a nivel molecular y celular (Man *et al.*, 2010). Las saponinas muestran diversas actividades biológicas, incluida la actividad antitumoral. Recientemente, la investigación intensiva se ha centrado en el desarrollo de saponinas para terapias de tumores. La saponina Dioscina es una de las saponinas esteroideas más comunes y muestra una potente actividad anticancerígena en varias células cancerosas humanas a través de vías inductoras de apoptosis. (Kaskiw *et al.*, 2009).

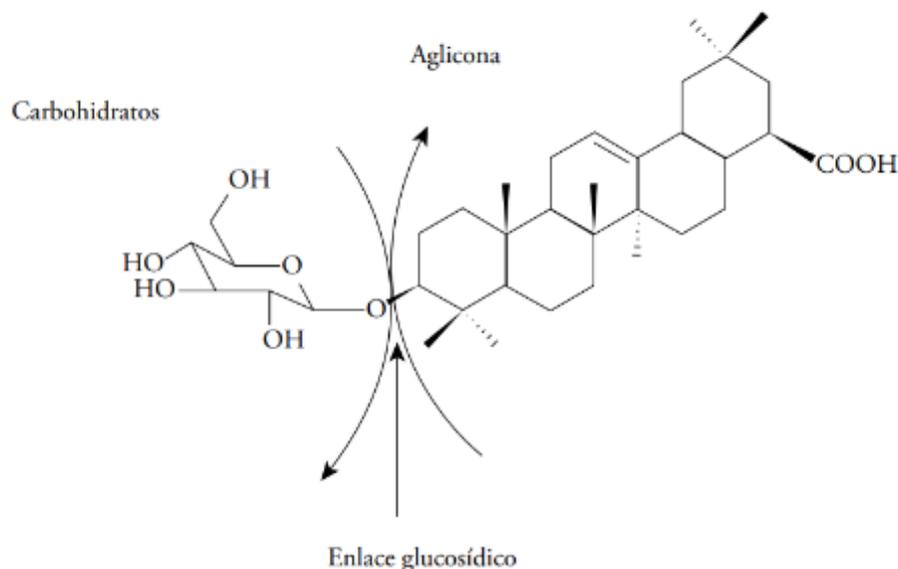


Figura 11. Estructura general de una saponina. Se indica el enlace glucosídico entre la aglicona y un glucósido. (Ahumada *et al.*, 2016).

Dioscina (Figura 12 A): Es una saponina esteroidea y el precursor de la Diosgenina, se ha encontrado que puede inducir la muerte por vía dependiente de caspasas e inhibir la invasión celular en la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama, por medio de la regulación en la expresión de GATA3 (Tao *et al.*, 2018). Además, ha mostrado una actividad anticancerígena al inducir apoptosis en la línea HepG2 de cáncer de hígado (Ying *et al.*, 2018), en líneas HeLa y SiHa de carcinoma cervical al activar la ruta mitocondrial (Zhao *et al.*, 2016), en células HT-29 de cáncer de colon (Li *et al.*, 2018) y en células Kyse510 de cáncer esófago (Wang *et al.*, 2012). Además de que indujo apoptosis a través de la vía dependiente de las mitocondrias, una disminución de factores antiapoptóticos como Bcl-2, un aumento de factores proapoptóticos como Bax, Bid y mayores actividades de caspasa 3 en modelos *in vitro* de glioma de rata c6 (Guntuku *et al.*, 2016).

Diosgenina (Figura 12 B): Es una saponina esteroidea que ha mostrado actividad anticancerígena al inducir apoptosis en diversas líneas celulares como en cáncer de mama en la línea Her-2 mediante una modulación de la fosforilación de Akt, mTOR y JNK (Gautam *et al.*, 2018), en carcinoma de células escamosas de la piel a través de la fragmentación del ADN, la activación de caspasas, y el aumento de Bax con respecto a Bcl-2 (Das *et al.*, 2012), también ha mostrado sensibilizar a HT-29 de cáncer de colon a una muerte inducida por TRAIL (Lepage *et al.*, 2011). De

igual manera ha demostrado tener actividad anticancerígena contra líneas de cáncer de mama (MDA-MB-231) a través de un aumento de Bax en relación a Bcl-2 (Srinivasan *et al.*, 2009). De igual manera en células HepG2 indujo apoptosis a través de la ruta mitocondrial y la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Kim *et al.*, 2012).

Diosgenina 3-glu (Figura 12 C): Es una saponina esteroidal sintetizada a partir de la Diosgenina agregándole una glucosa en el carbono 3 en la estructura esteroidal. Ha mostrado actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa Caski y ViBo (Martínez, 2013), cáncer de mama MDA-MB-231 y cáncer de pulmón SK-LU-1 (Luna, 2019).

MF-10 o Diosgenin 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (Figura 12 D): Se ha demostrado que la posición, número y el tipo de azúcar de una saponina influye en la actividad biológica de esta (Man *et al.*, 2010), con base en esta premisa, y buscando moléculas con mejor actividad antitumoral se sintetizó, con la adición de una amina acetilada a la glucosa de la Diosgenina 3-glu, el compuesto MF-10, el cual ha demostrado tener un efecto antiproliferativo en las líneas HeLa y Caski, de cáncer cervicouterino (Fernández *et al.*, 2012) y propiedades antiproliferativas, necróticas, y apoptóticas en las líneas de cáncer cervicouterino, mama y de pulmón (Caski, MDA-MB-231 y SK-LU) (Villar, 2016) (López, 2017) (Zamora, 2017).

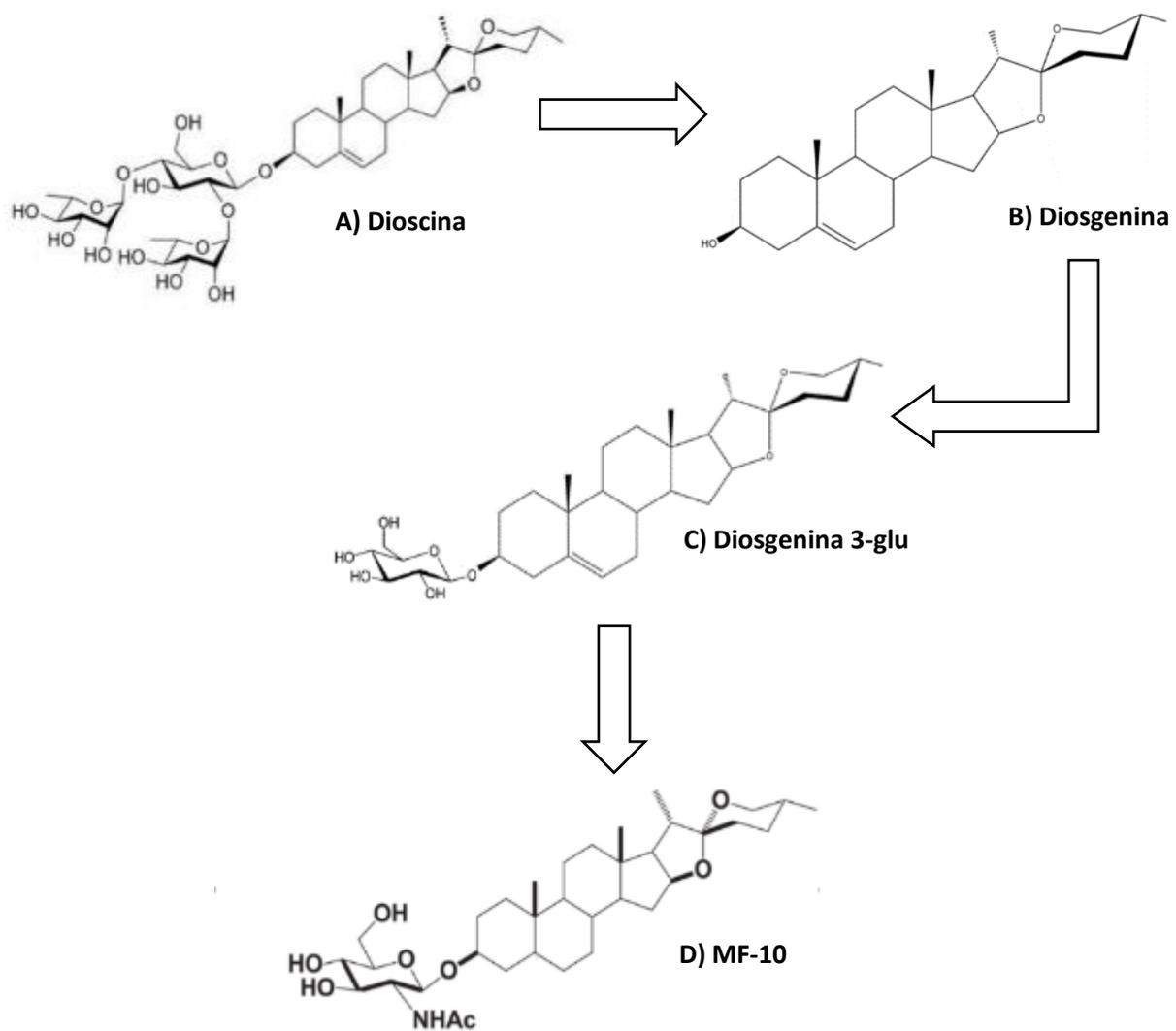


Figura 12. Estructura molecular de la Dioscina (A), Diosgenina (B), Diosgenina 3-glu (C) y MF-10 (D). (Cortesía del Laboratorio de Síntesis de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

### **3. Planteamiento del problema**

En la actualidad los tratamientos contra el cáncer (cirugía, radioterapia y quimioterapia) continúan siendo ineficientes, en especial en estadios avanzados de esta enfermedad, además de que presentan efectos adversos que reducen significativamente la calidad de vida de los pacientes. Se ha demostrado que algunos derivados de la Diosgenina poseen actividad antiproliferativa y apoptótica y que esta actividad puede verse incrementada al incluir o modificar azúcares en su estructura, tal es el caso del compuesto diosgenin 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (MF-10), que ha mostrado mejorar la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis que se ha reportado con la Diosgenina, pero aún se desconoce el mecanismo a través del cual se lleva a cabo este proceso, por lo que es importante continuar con el estudio de la ruta de inducción de apoptosis mediante la cual este compuesto lleva a cabo su efecto biológico en las células tumorales.

#### **4. Justificación**

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, dentro de los diferentes tipos de cáncer destacan el de mama, pulmón y cervical. El cáncer de mama es el de mayor incidencia en mujeres tanto a nivel mundial como en México, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar de incidencia de cáncer para hombres a nivel mundial y segundo lugar en México y el cáncer cervical se constituye como la segunda causa de muerte por enfermedades ginecológicas en el mundo.

Desafortunadamente los tratamientos convencionales empleados para combatir el cáncer, como son, la quimioterapia y la radioterapia resultan ser ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad además de exhibir poca selectividad entre células cancerosas y células sanas deteriorando notablemente la calidad de vida del paciente, por lo que es pertinente la búsqueda de tratamientos alternativos como el MF-10 para así ser empleados como agentes terapéuticos más eficientes.

## 5. Hipótesis

Se sabe que, las saponinas esteroideas como la Diosgenina y algunos de sus derivados pueden presentar actividad antiproliferativa y apoptótica en algunos tipos de cáncer y que la adición y/o modificación de azúcares a pesar de impedir la difusión de la molécula a través de la membrana, puede mejorar su actividad biológica, por lo que se espera que el compuesto diosgenin 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (MF-10) derivado de la Diosgenina, induzca a las células tumorales provenientes de cáncer de mama, pulmón y cervical a una muerte por apoptosis a través de la ruta extrínseca.

## 6. Objetivos

### 6.1. *Objetivo general.*

Analizar el efecto de compuesto diosgenin 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (MF-10) en la ruta de inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón, mama y cervicouterino.

### 6.2. *Objetivos particulares*

- Determinar la actividad antiproliferativa del compuesto MF-10 en cultivos de células MDA-MB-231 (mama) SK-LU-1 (pulmón) y CaSki (cervical), mediante la determinación de la ( $IC_{50}$ ), por medio de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica del compuesto MF-10 en cultivos de células tumorales, por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
- Determinar la actividad inductora de apoptosis del compuesto MF-10 en cultivos de células tumorales mediante el análisis morfológico por microscopía de contraste de fases, por tinción nuclear con el fluorocromo DAPI y la detección de la caspasa 3 activa por microscopía de epifluorescencia.
- Determinar la ruta de inducción de apoptosis mediante la inmunodetección de las caspasas 8, 9 y las proteínas Bax, Bid y Bcl-2 por microscopía de epifluorescencia.
- Cuantificar la presencia de las caspasas 8 y 9 en cultivos de células tumorales MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki por citometría de flujo.

## **7. Material y método**

### **7.1. Cultivo de células tumorales**

Las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD) y fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA) en un volumen de 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con rojo fenol suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) al 5% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) a una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para la realización de los ensayos se utilizaron cultivos de células tumorales a un 70 % de saturación (fase de crecimiento exponencial).

### **7.2. Preparación de los compuestos**

El compuesto diosgenin 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (MF-10) fue obtenido del Laboratorio de Síntesis y Modificación de compuestos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del Dr. Jesús Sandoval Ramírez. Se preparó una solución *stock* con 1 mg del compuesto y fue solubilizado en 100  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) en tubos cónicos tipo eppendorf de 600  $\mu$ l (Corning, USA) y se almacenaron a temperatura ambiente.

### **7.3. Determinación de la IC<sub>50</sub> a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta**

Partiendo de un cultivo previo, se eliminó el medio RPMI-1640 (Gibco, USA) de la caja de cultivo y se agregó 5 ml de verseno por 5 minutos para separar las células de la placa. Posteriormente se centrifugaron las células (centrífuga; Dinac, USA) a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron y contabilizaron por medio de un hematocitómetro para realizar las diluciones necesarias y obtener la cantidad de células por pozo deseada. Las células de las tres líneas celulares (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki) se sembraron en placas de plástico estériles de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 10,000 células/pozo en 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente

se retiró el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) y se trataron las células con los compuestos en diferentes concentraciones.

Se agregó en todos los experimentos un control interno con dimetilsulfóxido (DMSO) ya que fue el vehículo para preparar las soluciones *stock* de los compuestos evaluados en este estudio, y un control testigo al cual únicamente se le realizó cambio de medio por medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) fresco. 24 horas después del estímulo, se evaluó la inhibición del crecimiento celular inducida por los compuestos analizados usando la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng et al, 1989, para la cual se retiró el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) de la placa y se fijaron las células con 50  $\mu$ l/pozo de una solución de glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada manteniendo la placa bajo agitación durante 20 minutos. Una vez fijadas se retiró el glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA), se lavó 3 o 4 veces con agua destilada y se dejó secar al aire. A continuación, se tiñeron las células con 50  $\mu$ l/pozo de una solución de cristal violeta (Sigma-Chemical Co.) al 0.1% en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) y se mantuvo la placa en agitación durante 20 minutos para que la coloración fuera homogénea en todos los pocillos. Se retiró el colorante, se lavó 3 o 4 veces con agua destilada para eliminar los excesos de tinción y nuevamente se dejó secar al aire. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ l/pozo de ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10% para solubilizar el colorante incorporado en el núcleo de las células y se mantuvo bajo agitación durante 20 minutos. Finalmente se realizó la lectura en un lector de placas de ELISA (ChroMate, USA) a una longitud de onda de 600 nm. Con los datos obtenidos de las concentraciones probadas se elaboraron gráficas concentración-efecto por regresión lineal. Sobre las curvas obtenidas se estimó la concentración inhibitoria 50% (IC<sub>50</sub>), que se define como la concentración de los compuestos a la cual se abate el 50% de la población celular tratada respecto a las células control o no tratadas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con seis repeticiones cada uno.

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

Se realizaron cultivos de las tres líneas celulares (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki) en placas estériles de 96 pozos (Corning, USA), en las cuales se sembraron 10,000 células/pozo en 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se incubaron (incubadora NuAire, USA) por 24

horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente se retiró el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) y se realizaron los siguientes tratamientos: Un control basal, únicamente con medio de cultivo, el cual se incubó bajo las mismas condiciones con el fin de utilizarlo como blanco en la reacción colorimétrica y al que solo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco.

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

### **7.5. Análisis de la presencia de caspasas 3, 8, 9 y las proteínas Bid, Bax y Bcl-2 por microscopia de epifluorescencia**

Las células de las tres líneas celulares (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki) fueron sembradas en placas estériles de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 10,000 células/pozo con un volumen de 100 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron dentro de una incubadora (NuAire, USA) por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Transcurridas las 24 horas las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: un control testigo (células sin tratamiento, a las que sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco), un control para el vehículo (células tratadas con la máxima cantidad de volumen de DMSO utilizado para diluir los compuestos), un control positivo con Camptotecina (compuesto que induce a las

células a apoptosis) y el tratamiento (con la IC<sub>50</sub> correspondiente para el compuesto).

Después de 24 horas de tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 4% y glutaraldehído al 2.5% por 2 horas, posteriormente fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS filtrado. Se permearon las células con una solución de tritón X-100 (Gibco, USA) al 0.5 % en PBS durante 5 minutos a 4 °C, posteriormente se lavaron 3 veces (o hasta desaparecer la espuma) con PBS filtrado.

Terminado este punto se agregaron 30 µl/pozo de anticuerpo primario (1:1000 en PBS) desarrollado en conejo correspondiente para caspasa 3, 8, 9, Bid, Bax y Bcl-2 (por separado) (Sigma-Aldrich, USA) se dejó dos horas en agitación y posteriormente toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS con la finalidad de retirar el exceso de anticuerpo, al terminar los lavados se adicionaron 30 µl/pozo del anticuerpo secundario (α-Rabbit IgG-Fit-C) (Sigma-Aldrich, USA), se protegió de la luz con papel aluminio y se dejó incubar dos horas a temperatura ambiente en agitación. Pasado el tiempo correspondiente se retiró el exceso de anticuerpo y se realizaron otros 3 lavados.

Por último, se agregaron por pozo 50 µl de PBS y 3 µl del fluorocromo DAPI (Sigma-Aldrich, USA), se protegió de la luz y se dejó incubar por 1 minuto, después se hicieron 3 lavados con PBS y se agregaron 50 µl por pozo de PBS para ver al microscopio de epifluorescencia (Nikon, Japan).

### **7.6. Análisis de la presencia de caspasas 8 y 9 por citometría de flujo**

Las células de las tres líneas celulares (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki) se sembraron en placas estériles de 6 pozos (Corning, USA) a una densidad de 300,000 células/poro en un volumen de 2.5 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de suero neonato de ternera (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron en una incubadora (NuAire, USA) por 24 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Transcurridas las 24 horas las células fueron tratadas con las siguientes condiciones: Un control testigo, el cual son células sin tratamiento a las que solo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco. Un control de células tratadas con la máxima cantidad de volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para obtener la concentración de la IC<sub>50</sub>. Un control positivo tratado con Camptotecina (Sigma-Aldrich, USA). Los tratamientos con las IC<sub>50</sub> correspondientes. Después de 24 horas, se recuperó el medio y se despegaron las células pasándolas a tubos de citometría. Se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA), a 2,000 rpm durante 5

minutos. Se desechó el sobrenadante y se fijaron las células con 1 ml de metanol al 50% en PBS, dejándolo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron dos lavados con PBS filtrado centrifugando (centrífuga; Dinac, USA), a 2,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendió el botón celular en 50  $\mu$ l de anticuerpo primario (1:500 en PBS) desarrollado en conejo correspondiente para caspasas 8 y 9 (por separado); y se les dejó por 24 horas a 4 °C. Pasadas las 24 horas se realizaron 2 lavados con PBS filtrado y se resuspendió el botón en 50  $\mu$ l de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (1:500 en PBS) IgG anti conejo (J.T. Baker, MEX) manteniendo las muestras en oscuridad durante 2 horas a una temperatura de 37 °C. Finalmente se lavaron las muestras 2 veces con PBS filtrado y fueron analizadas en un citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA). Los datos fueron procesados en el programa estadístico Flowing Software 2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **7.7. Análisis estadístico**

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

## 8. Resultados

### 8.1. Actividad antiproliferativa del compuesto MF-10

Con el objetivo de analizar el efecto antiproliferativo del compuesto MF-10 en células de cáncer de mama, pulmón y cervical (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki), los cultivos celulares fueron estimulados con diferentes concentraciones del compuesto (Fig. 13) y se calculó la concentración que redujo en un 50% el número celular ( $IC_{50}$ ) (Fig. 14), las concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  obtenidas fueron de 20.47 para MDA-MB-231, 25.24 para SK-LU-1 y de 51.72 para CaSki (Cuadro 2).

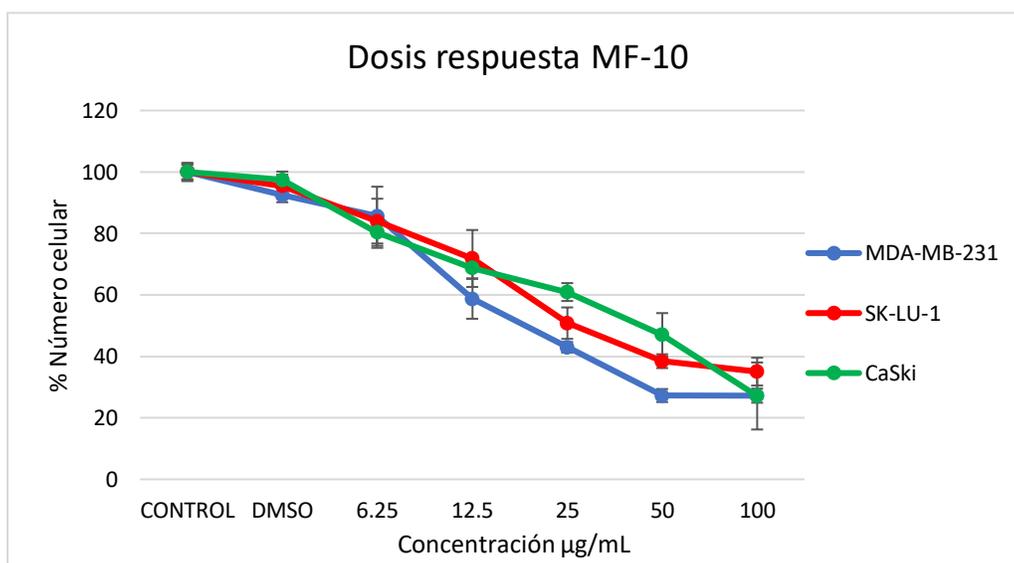


Figura 13. Efecto antiproliferativo del compuesto MF-10 en líneas de cáncer de mama, pulmón y cervical (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki, respectivamente). Las células fueron tratadas con diversas concentraciones del compuesto MF-10 y evaluadas a las 24 horas. Se usó la técnica de incorporación de cristal violeta para determinar el número celular. Los datos se obtuvieron de tres ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con  $p < 0.05$  vs control.

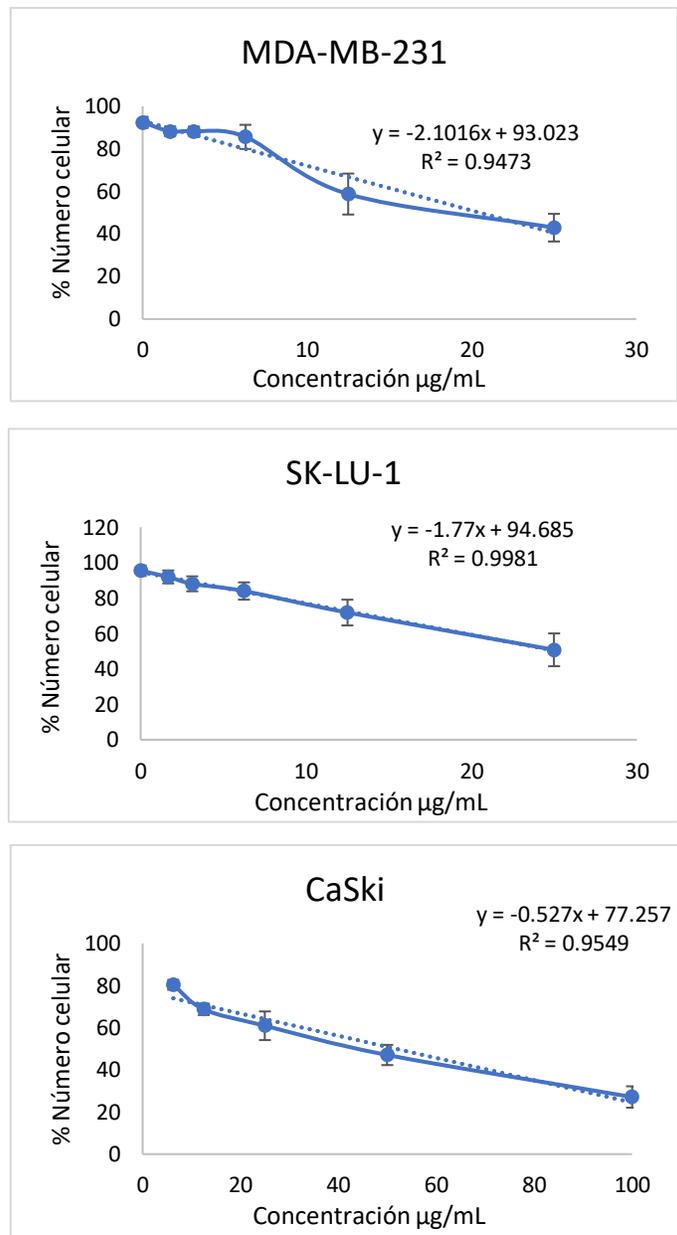


Figura 14. Actividad antiproliferativa del compuesto MF-10 sobre líneas tumorales (MDA-MB-231, SK-LU-1 Y CaSki, respectivamente). Se obtuvo la IC<sub>50</sub> mediante la linealización de los datos y la ecuación de la recta. Los datos se obtuvieron de tres ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con p<0.05 vs control.

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µM)
MDA-MB-231	20.47	32.24
SK-LU-1	25.24	39.76
CaSki	51.72	81.47

Cuadro 2. Concentración calculada del compuesto MF-10 que inhibe el 50% del número celular (IC<sub>50</sub>) en líneas tumorales. Los datos están expresados en µg/ml y µM.

## 8.2. Efecto necrótico del compuesto MF-10 en células tumorales

Una vez determinada la actividad antiproliferativa y obtenida la concentración inhibitoria del 50% del número celular ( $IC_{50}$ ), las 3 líneas celulares fueron estimuladas con las concentraciones correspondientes del compuesto MF-10 para determinar si el decremento en el número celular se debía a una muerte necrótica. Para determinar esto se realizó la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos (Fig. 15).

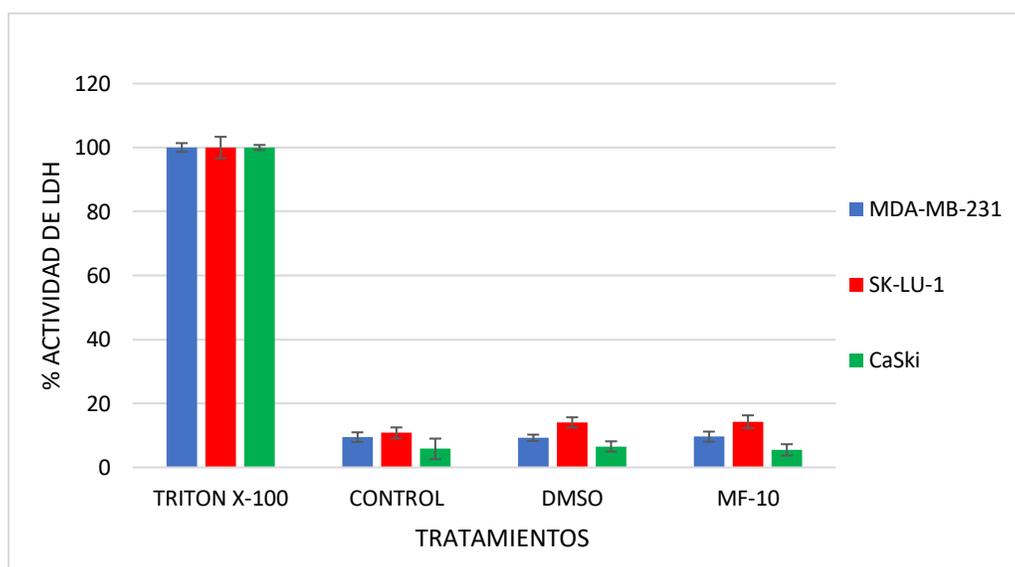


Figura 15. Evaluación del efecto necrótico de compuesto MF-10 por medio de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivos de células tumorales tratadas con la  $IC_{50}$  determinada para cada línea tumoral a las 24 horas, se tomó como 100% de actividad las células tratadas con Tritón X-100. Se observa el Control que son células a las que solo se les cambió el medio, el DMSO (vehículo en el que disuelve el compuesto) y el tratamiento con las  $IC_{50}$  correspondiente para cada línea. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición. Prueba ANDEVA con una  $p < 0.05$  muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Los resultados obtenidos (cuadro 3) mostraron una baja actividad de la enzima LDH en las 3 líneas celulares tratadas con MF-10 por lo que se descartó que el decremento en el número celular se debiera a una muerte necrótica.

Línea celular	Tritón X-100	Control	DMSO	MF-10
MDA-MB-231	100±1.37	9.45±1.51	9.25±0.99	9.61±1.58
SK-LU-1	100±3.34	10.79±1.70	14.06±1.59	14.26±2
CaSki	100±0.80	5.79±3.21	6.54±1.61	5.47±1.77

Cuadro 3. Valores de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en células tumorales que fueron estimuladas con el compuesto MF-10 comparadas con un control positivo de células tratadas con Tritón X-100.

### 8.3. Efecto apoptótico del compuesto MF-10 en células tumorales

Conociendo la  $IC_{50}$  del compuesto, y habiendo determinado que no induce una muerte necrótica, se evaluó el efecto apoptótico en las tres líneas celulares. Es conocido que una vez que una célula entra en un proceso de muerte apoptótica se producen cambios morfológicos, donde se produce un redondeamiento de la célula, una reducción de su volumen y una retracción de sus prolongaciones y en la membrana se producen ampollas (blebbing). En cuanto al núcleo existe una condensación y fragmentación de la cromatina. Con el propósito de establecer que el MF-10 induce este tipo de muerte, cultivos de las líneas celulares de cáncer MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki, fueron estimuladas con el compuesto MF-10 durante 24 h a la concentración de sus respectivas  $IC_{50}$ , posteriormente la morfología celular fue observada por contraste de fases y tinción con el fluorocromo DAPI en un microscopio de epifluorescencia y de igual manera la caspasa 3 activa fue inmunodetectada (Fig. 16, 17, 18).

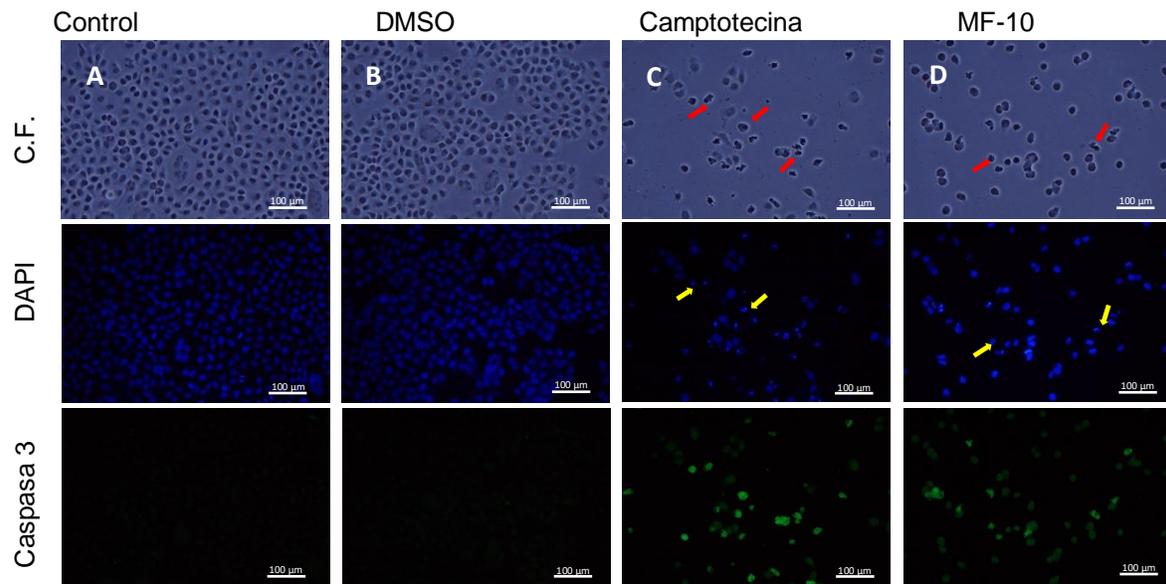


Figura 16. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 3 en células SK-LU-1 después de 24 horas del tratamiento con la  $IC_{50}$  del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes. (Flechas rojas muestran contracción celular y formación de cuerpos apoptóticos. Flechas amarillas muestran condensación de la cromatina y fragmentación del ADN).

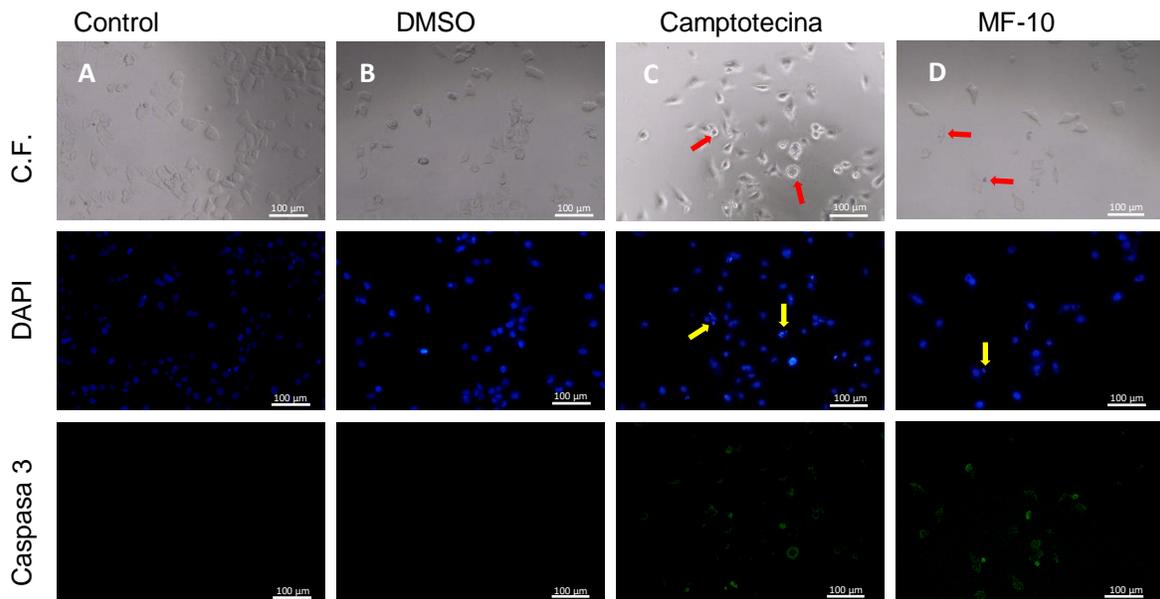


Figura 17. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 3 en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC<sub>50</sub> del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes. (Flechas rojas muestran contracción celular y formación de cuerpos apoptóticos. Flechas amarillas muestran condensación de la cromatina y fragmentación del ADN).

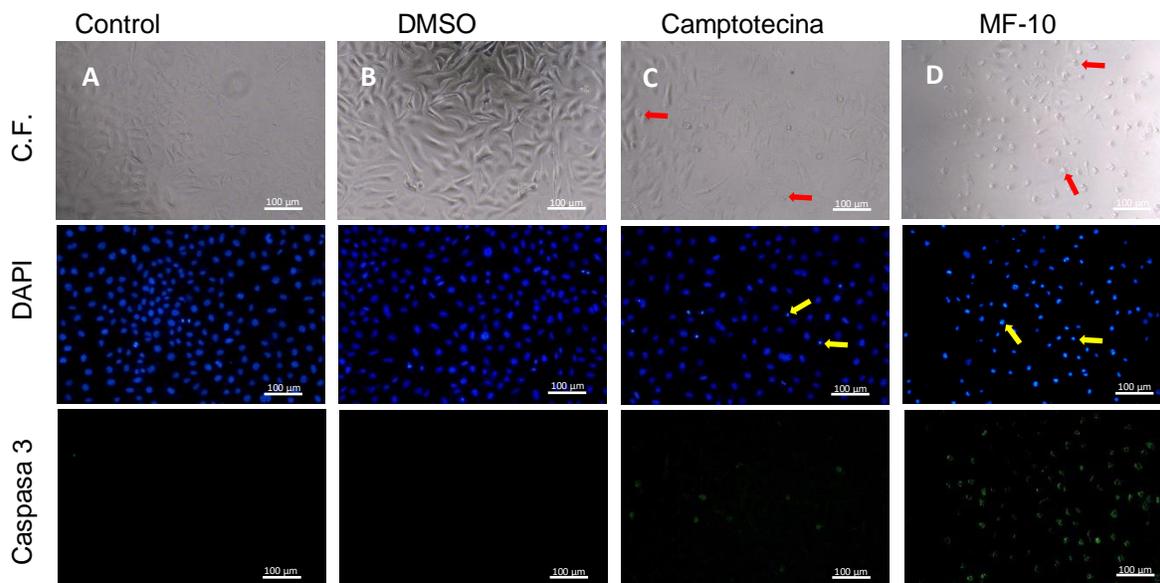


Figura 18. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 3 en células MDA-MB-231 después de 24 horas del tratamiento con la IC<sub>50</sub> del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes. (Flechas rojas muestran contracción celular y formación de cuerpos apoptóticos. Flechas amarillas muestran condensación de la cromatina y fragmentación del ADN).

Al observar el contraste de fases de las 3 líneas celulares (Fig. 16-18) se pudo observar que, en las células del control y DMSO, las células mantuvieron una morfología normal (forma poliédrica, abundante citoplasma, presencia de proyecciones citoplasmáticas) mientras que en el control positivo tratado con Camptotecina como en el tratamiento con MF-10, las células habían perdido su morfología típica y se encontraban redondeadas, con escaso citoplasma y con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas. Al analizar la morfología nuclear con el fluorocromo DAPI en el control y en el DMSO se vieron núcleos bien definidos y esféricos, mientras que en la Camptotecina y MF-10 se pudo ver condensación y en ciertos puntos fragmentación del ADN, además de la formación de cuerpos apoptóticos, mostrando signos evidentes de una muerte apoptótica. En cuanto a la presencia de la caspasa 3 activa, se pudo notar un aumento evidente de la presencia de esta en el control positivo y en el tratamiento con el compuesto MF-10 al compararlos con el control y el vehículo DMSO (Fig. 16, 17, 18), confirmando con esto que el compuesto MF-10 indujo a las células a una muerte apoptótica.

#### **8.4. Determinación de la ruta apoptótica del compuesto MF-10**

##### *8.4.1. Análisis por microscopía de epifluorescencia*

Una vez que se determinó que el compuesto estaba induciendo una muerte apoptótica fue imperativo buscar qué tipo de ruta estaba induciendo esta muerte. Se sabe que existen dos principales rutas de muerte apoptótica, la extrínseca e intrínseca y que las caspasas 8 y 9 son activadas en estas dos vías, respectivamente. Con el objetivo de determinar qué vía estaba induciendo el compuesto, las células tumorales fueron tratadas con el MF-10 a las concentraciones de sus respectivas  $IC_{50}$  y las caspasas 8 y 9, así como las proteínas Bax, Bid y Bcl-2 fueron inmunodetectadas y las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia para ver las células positivas a la marca (Figs. 19-33).

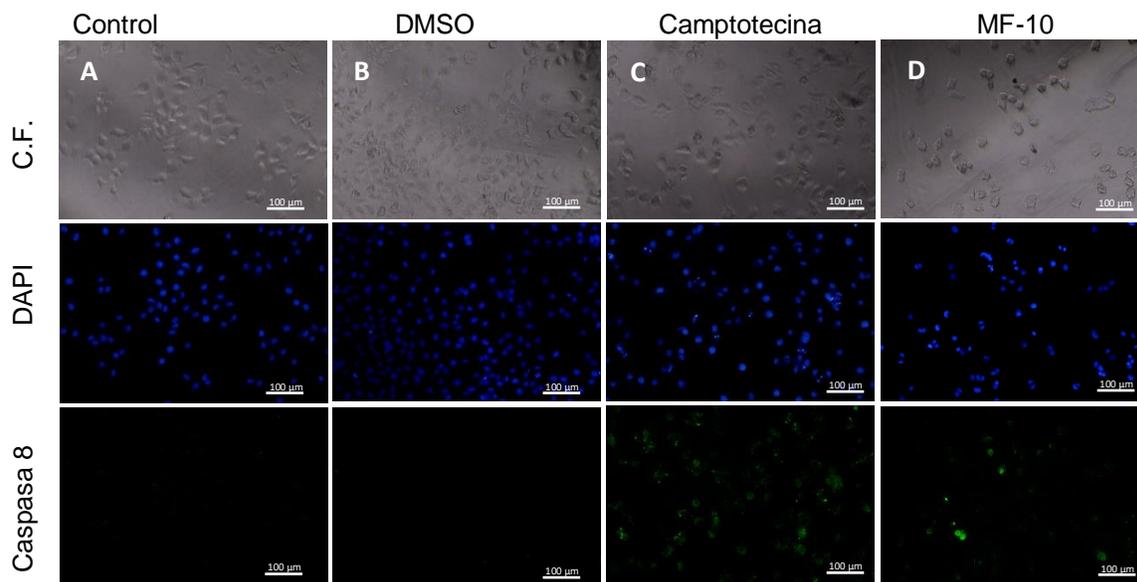


Figura 19. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 8 en células SK-LU-1 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

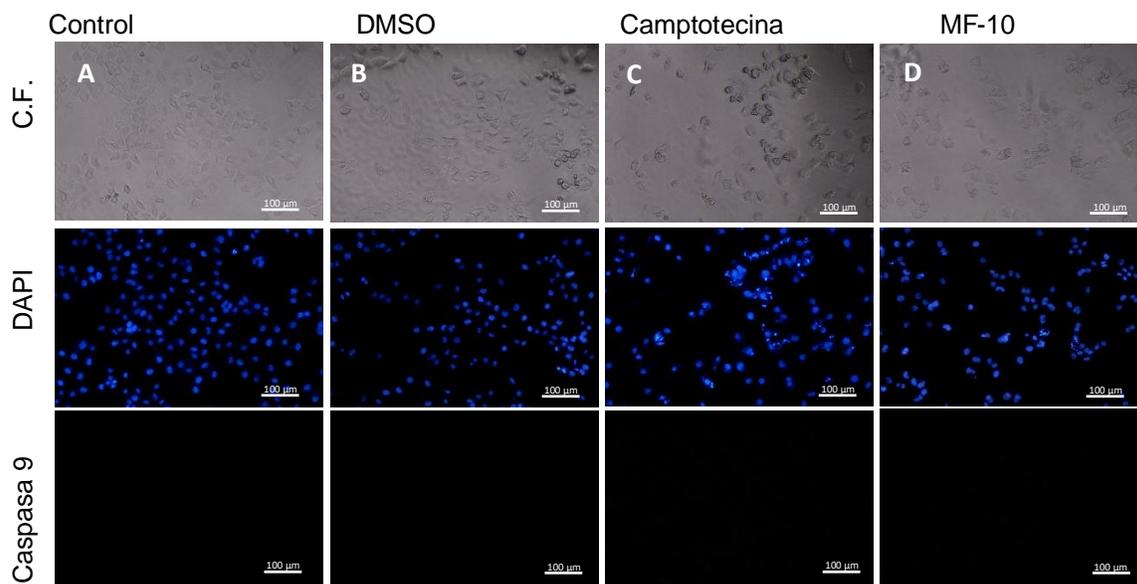


Figura 20. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 9 en células SK-LU-1 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

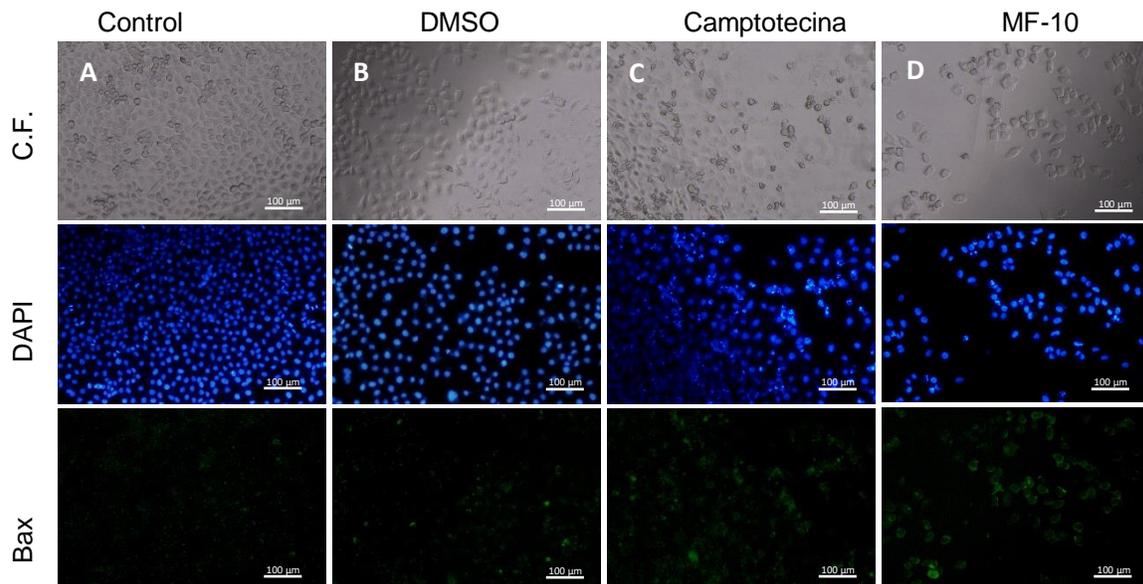


Figura 21. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica Bax en células SK-LU-1 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

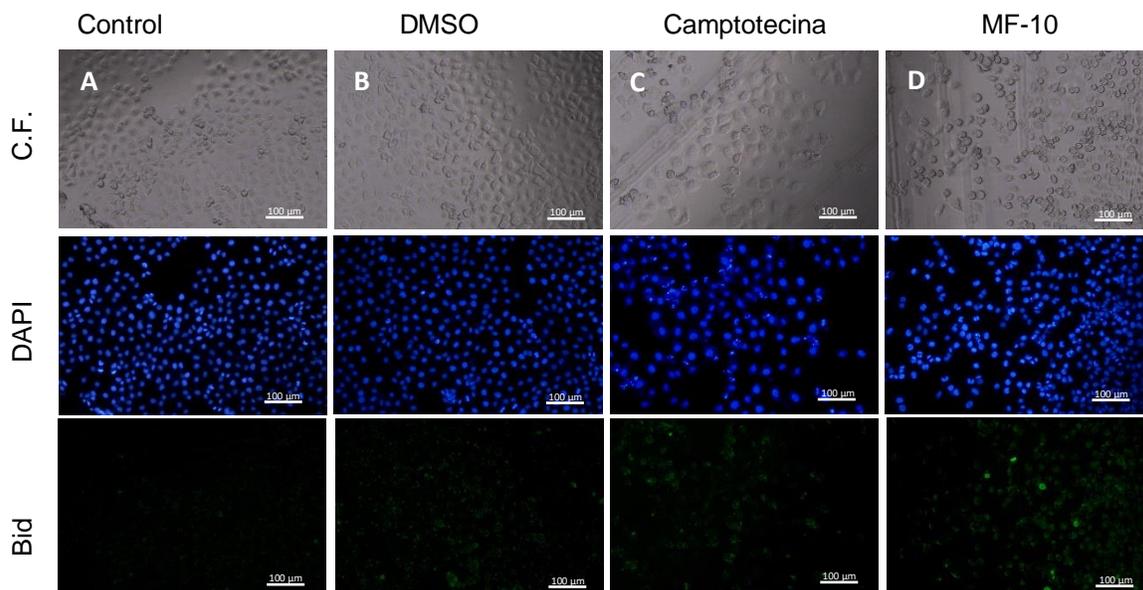


Figura 22. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica Bid en células SK-LU-1 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

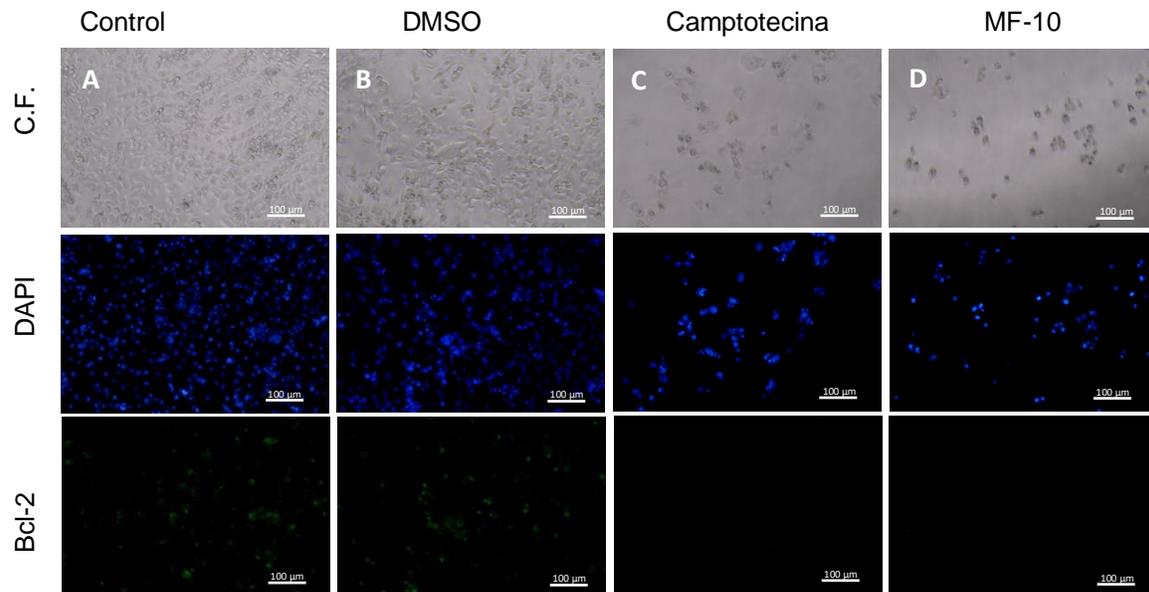


Figura 23. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica BCL-2 en células SK-LU-1 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

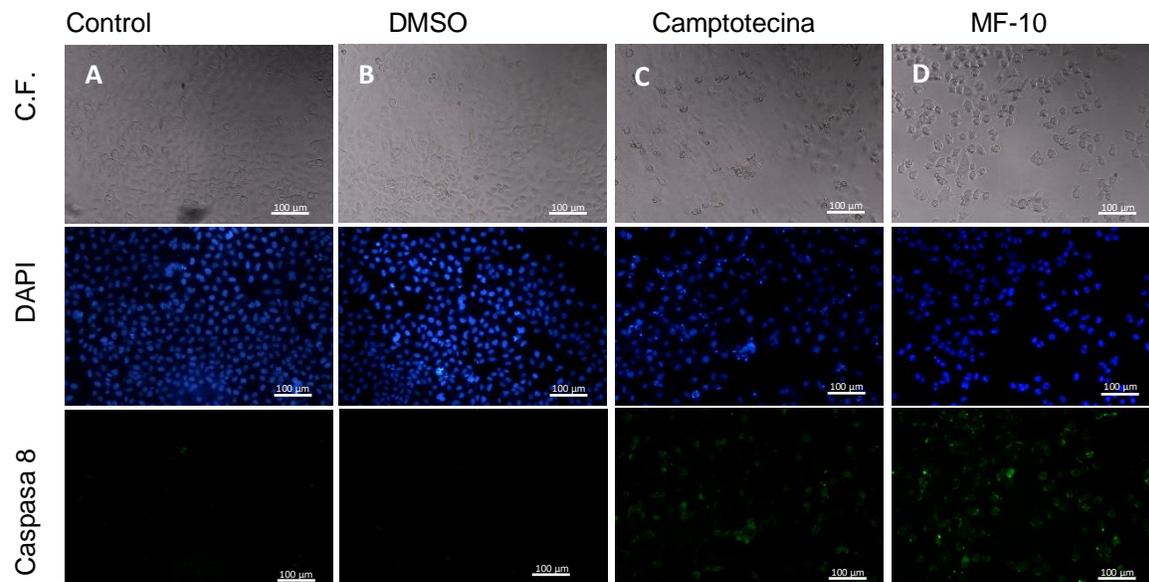


Figura 24. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 8 en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

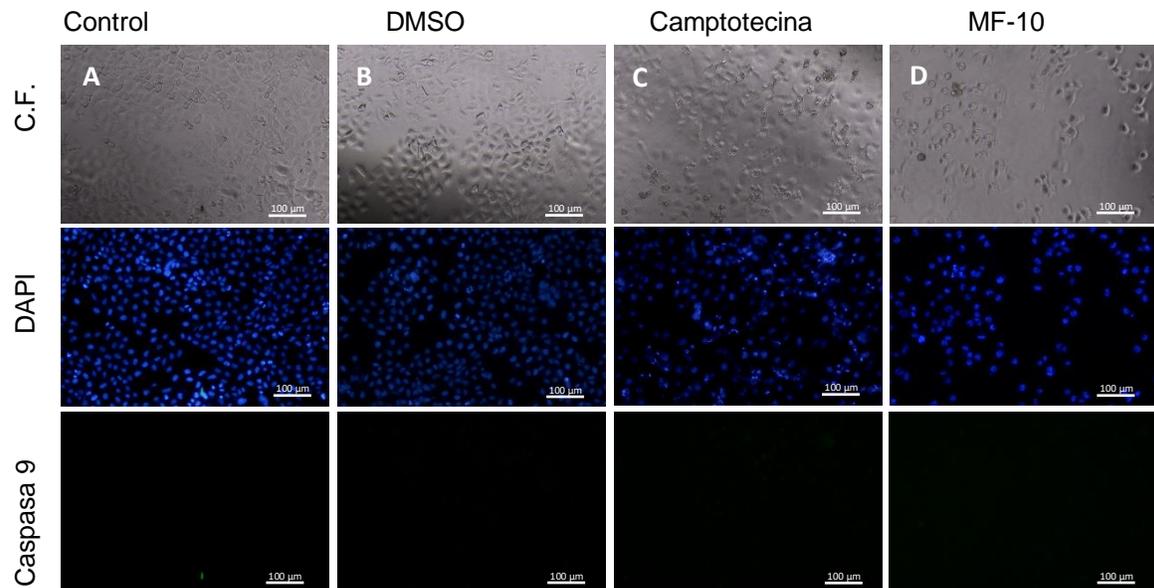


Figura 25. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 9 en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

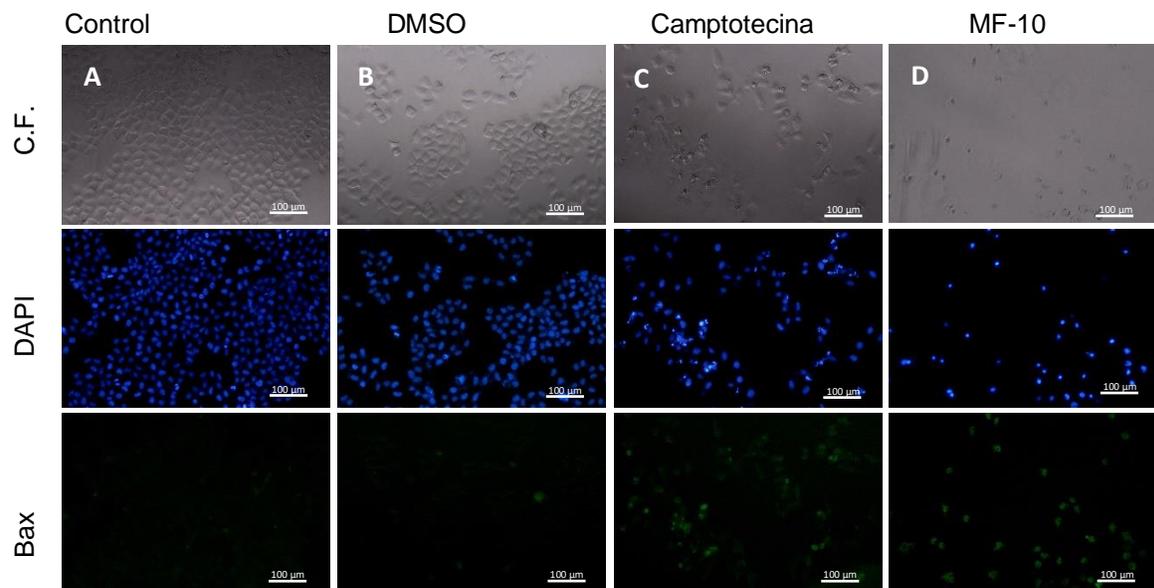


Figura 26. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica Bax en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

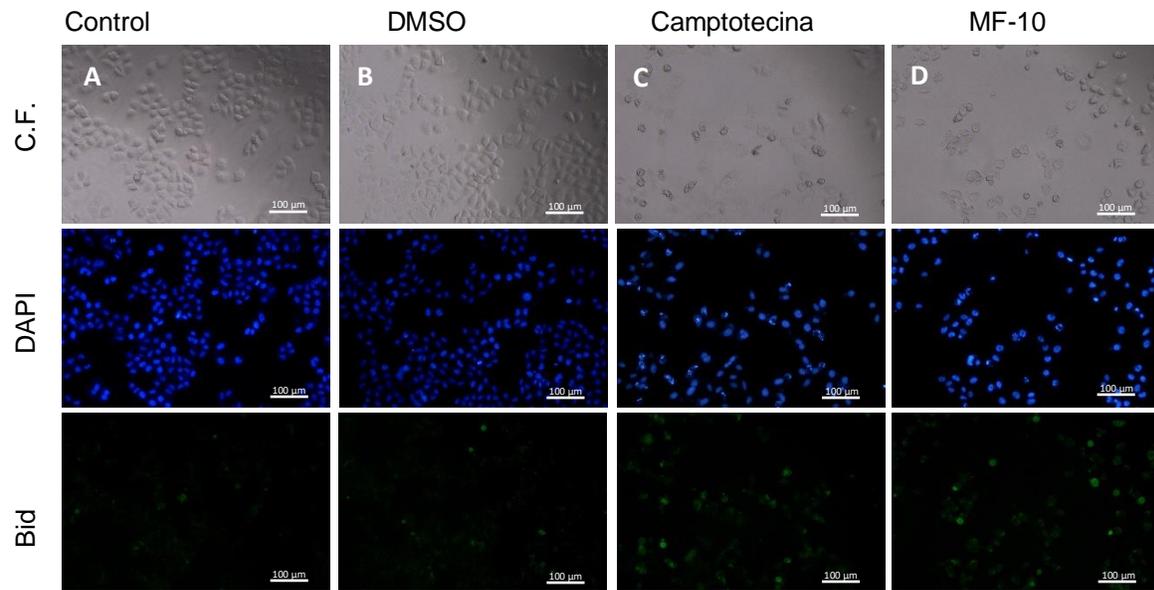


Figura 27. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica Bid en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC<sub>50</sub> del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

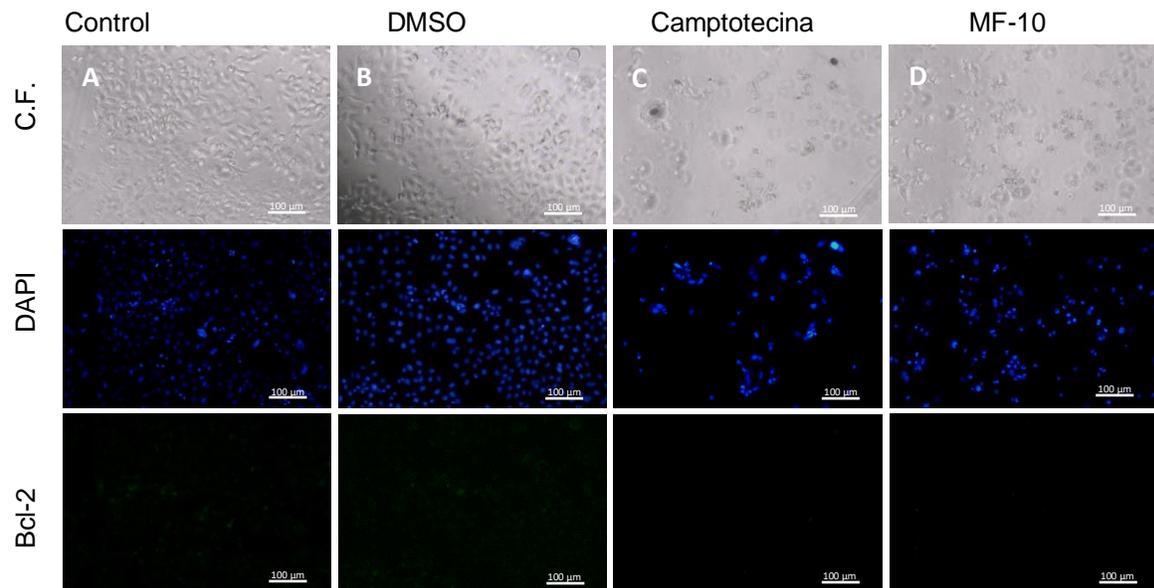


Figura 28. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica BCL-2 en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC<sub>50</sub> del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

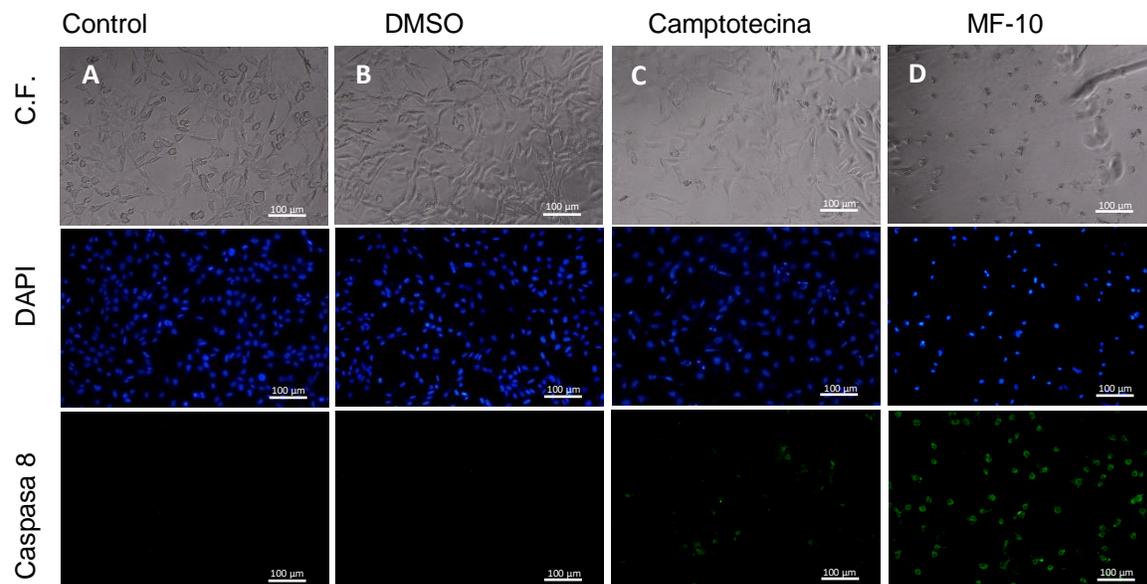


Figura 29. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 8 en células MDA-MB-231 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

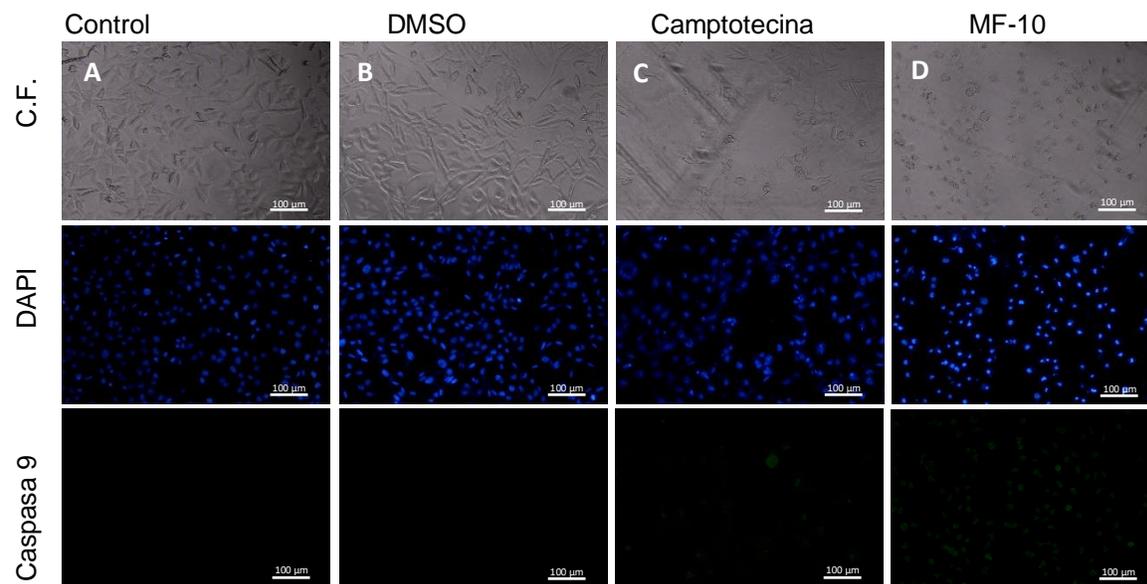


Figura 30. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de caspasa 9 en células MDA-MB-231 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

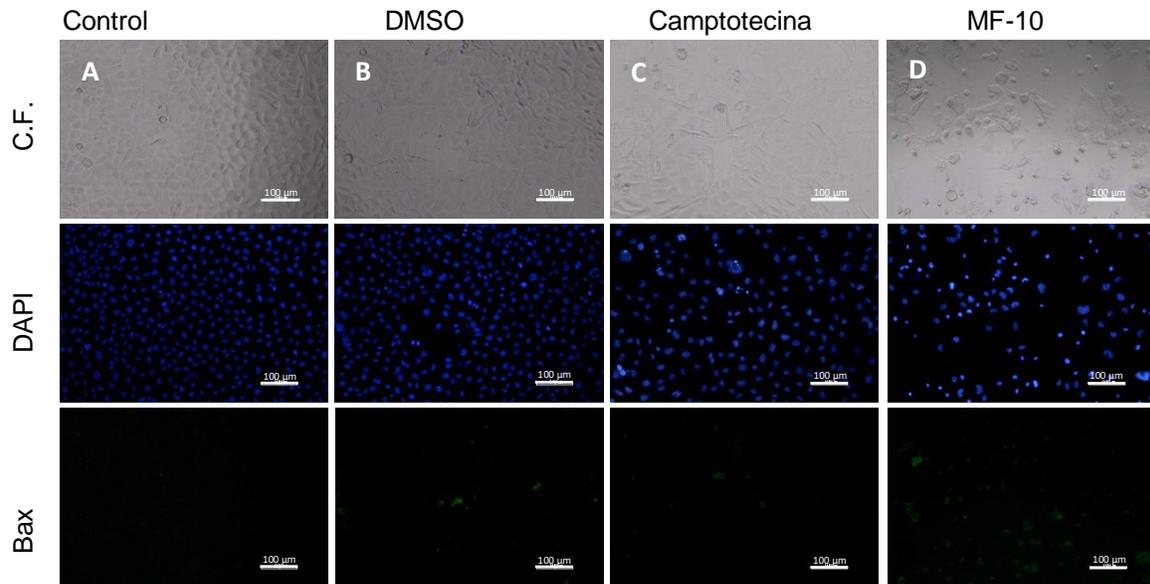


Figura 31. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica Bax en células MDA-MB-231 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

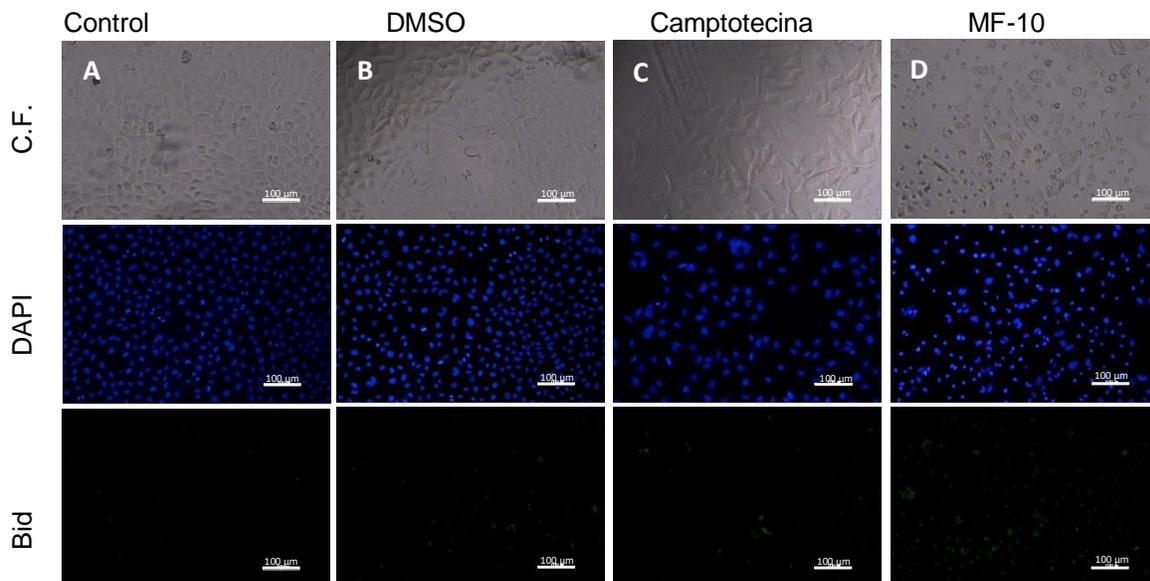


Figura 32. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica Bid en células CaSki después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

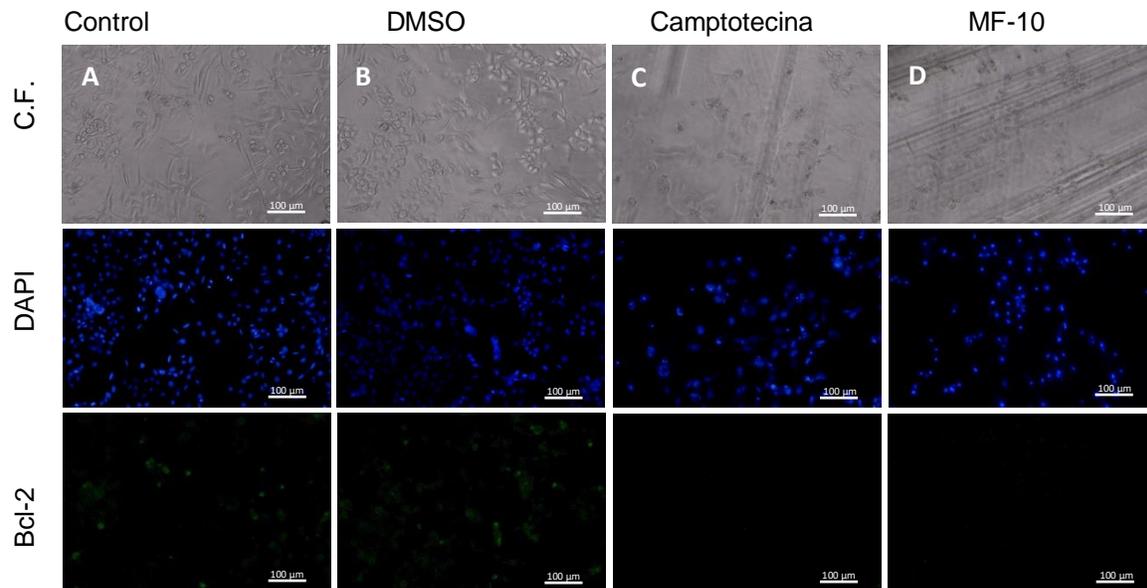


Figura 33. Efecto del MF-10 en la morfología nuclear y la presencia de la proteína proapoptótica BCL-2 en células MDA-MB-231 después de 24 horas del tratamiento con la IC50 del compuesto MF-10. Se tiene el control (A) al que solo se le cambió el medio, el DMSO (B), el control positivo con Camptotecina (C) y el tratamiento con MF-10 (D). Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

Los resultados obtenidos en las figuras 19-33, establecen que el MF-10 induce un incremento de la caspasa 8 y de las proteínas proapoptóticas Bax y Bid en las líneas celulares SK-LU-1 y CaSki y baja presencia de la caspasa 9 y decremento de la proteína antiapoptótica Bcl-2, mientras que en la línea celular MDA-MB-231 el MF-10 indujo un incremento de la caspasa 8 y 9 así como de las proteínas Bax y Bid y un decremento de Bcl-2, sugiriendo que el MF-10 activa la ruta apoptótica extrínseca en las células SK-LU-1 y CaSki, mientras que en las células MDA-MB-231, activa la ruta extrínseca e intrínseca.

#### 8.4.2. Cuantificación por citometría de flujo de las caspasas 8 y 9.

Para reafirmar lo que se observó en el microscopio de epifluorescencia, se llevó a cabo una cuantificación de las células positivas a las caspasas 8 y 9 (Figs. 34-36) por medio de un citómetro de flujo.

Los resultados mostrados en las figuras 34-36 confirman los resultados obtenidos en la microscopía (Figs. 19, 20, 24, 25, 29 y 30), que, en conjunto, sugieren que el MF-10 induce a las células tumorales SK-LU-1 y CaSki a una muerte apoptótica a través de la activación de la vía extrínseca, mientras que en las células MDA-MB-231 el MF-10 induce una muerte apoptótica activando tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca.

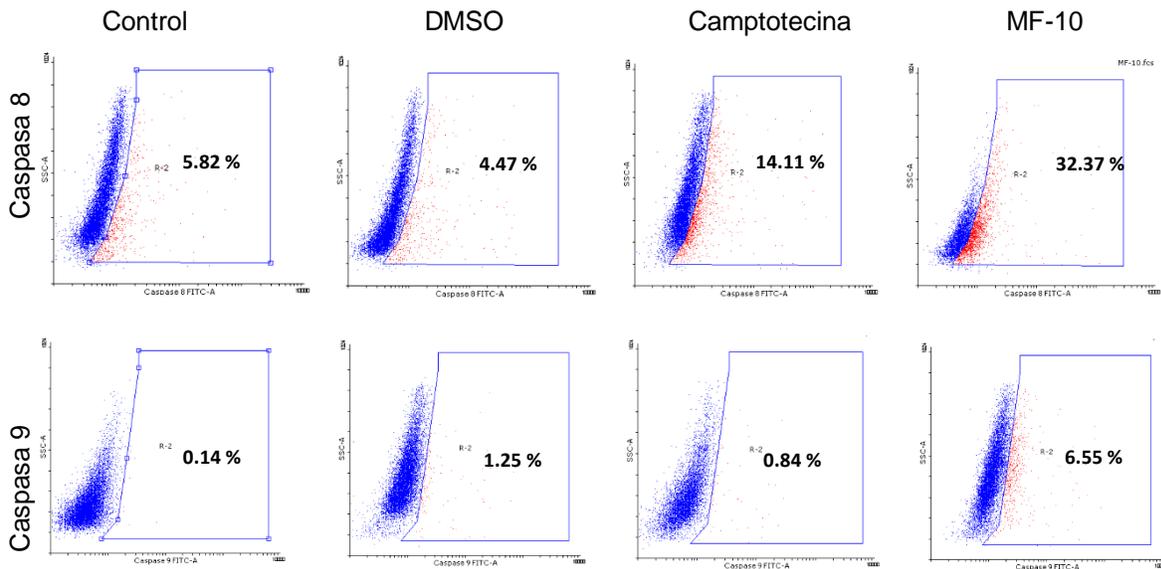


Figura 34. Cuantificación de las caspasas 8 y 9 en células de cáncer de SK-LU-1 24 horas después del tratamiento con MF-10. Se ve el control que son células a las que solo se les cambió el medio, el DMSO, células tratadas con camptotecina y el tratamiento con MF-10.

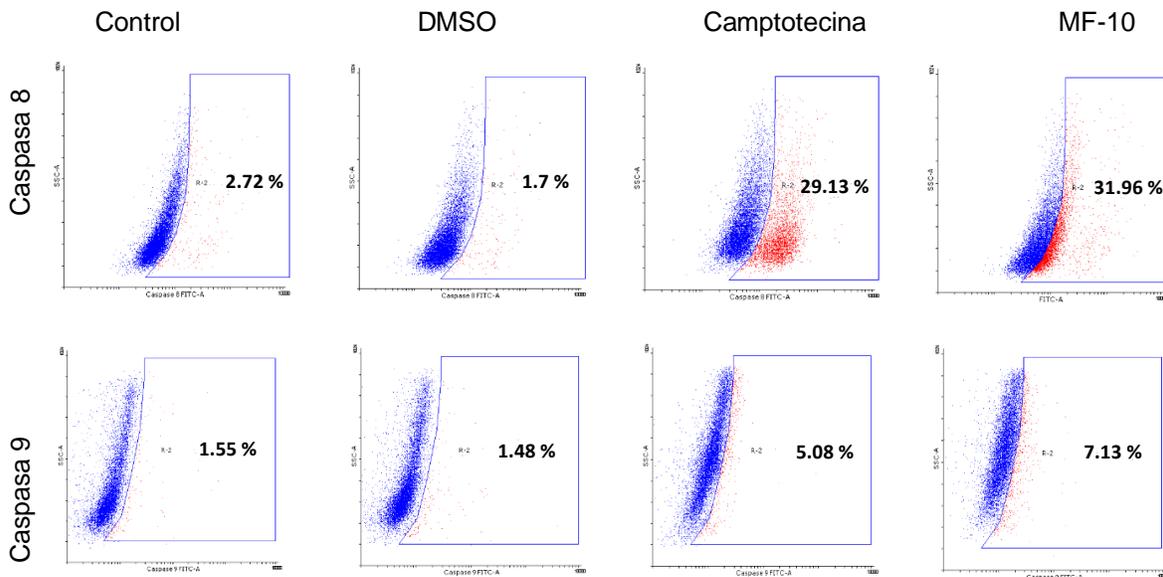


Figura 35. Cuantificación de las caspasas 8 y 9 en células de cáncer de CaSki 24 horas después del tratamiento con MF-10. Se ve el control que son células a las que solo se les cambió el medio, el DMSO, células tratadas con camptotecina y el tratamiento con MF-10.

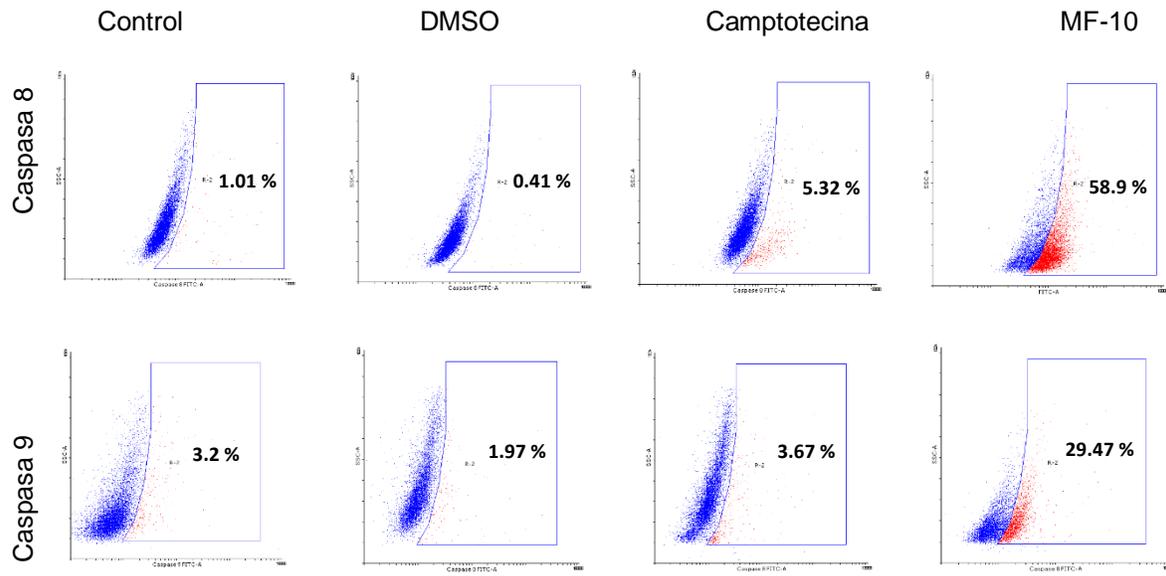


Figura 36. Cuantificación de las caspasas 8 y 9 en células de cáncer de MDA-MB-231 evaluadas 24 horas después del tratamiento con MF-10. Se ve el control que son células a las que solo se les cambió el medio, el DMSO, células tratadas con camptotecina y el tratamiento con MF-10.

## 9. Discusión

El cáncer es un problema de salud pública y aún en la actualidad no existe un tratamiento adecuado para esta enfermedad. Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente, en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. Con respecto a la quimioterapia, muchos agentes anticancerígenos en circulación afectan no solo el crecimiento tumoral sino también el de las células normales, empeorando la recuperación del paciente. Esto hace que la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos con menores efectos secundarios sea necesaria (Adesegun *et al.*, 2014). Es por ello que se han desarrollado muchos fármacos basados en productos naturales aislados de plantas terrestres con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas (Loraine & Mendoza, 2010).

En los últimos años, las saponinas esteroidales han atraído la atención científica por su diversidad estructural y sus importantes bioactividades, incluidas sus propiedades antitumorales, hemostáticas, y analgésicas (Zhu *et al.*, 2016). De igual manera se ha informado que ejercen una actividad antiproliferativa, antimetastásica y antiangiogénica mediante la inducción de la apoptosis, la detención del ciclo celular y por otras vías. También se ha informado que reducen los efectos secundarios de la radioterapia y la quimioterapia, lo que sugiere que las saponinas son una perspectiva prometedora para la investigación y el desarrollo de tratamientos contra el cáncer. (Tong *et al.*, 2012), (Xu *et al.*, 2016).

Debido a modificaciones en la estructura de la saponina como el tipo, la posición y el número de azúcares unidos en diferentes posiciones de los anillos de la saponina, entre otros, pueden influir en su actividad antitumoral (Man, S., 2010). Al respecto, nuestro grupo de trabajo sintetizó el MF-10. Este mostró actividad antiproliferativa de manera dosis dependiente en las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki con valores de  $IC_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$  de 20.47, 25.24 y 51.72 respectivamente (Cuadro 2), resultados similares a los reportados por Villar en 2016 que reportó una  $IC_{50}$  de 20  $\mu\text{g/ml}$  para MDA-MB-231, López en 2017 de 25  $\mu\text{g/ml}$  en SK-LU-1 y Zamora en 2017 con 50  $\mu\text{g/ml}$  para la línea Caski. Si se compara estos valores con lo reportado para la saponina Diosgenina, se observa que para ejercer la misma actividad antiproliferativa, se requiere de una concentración mayor de MF-10, ya que para la Diosgenina (que no presenta ningún azúcar unido) se reportan valores de  $IC_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$  de 7.4 para MDA-MB-231, 13.5 para SK-LU-1 y 12 para CaSki (Rosas, 2016). Sin embargo, si se compara con la Diosgenina 3-glu, con valores de  $IC_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$  de 20, 25 (Luna, 2019) y 22.56 (Martínez, 2013) respectivamente, se

observa que la actividad antiproliferativa de esta es similar al MF-10, excepto en la línea CaSki, donde el compuesto presenta un valor de  $IC_{50}$  mayor. Con estos resultados en conjunto se puede asumir que la adición de una amina acetilada a la estructura de la Diosgenina 3-glu no mejora la actividad antiproliferativa de esta. Es importante mencionar que la Dioscina (la cual presenta una glucosa unida en el carbono 3 del esteroide y dos ramnosas unidas a la glucosa), se le han reportado valores de actividad antiproliferativa de  $IC_{50}$  de 5.88 para MDA-MB-231 (Aumsuwan *et al.*, 2016) y de 1.73 para CaSki (Hernández *et al.*, 2020), (no hay ensayos en la línea SK-LU-1), sugiriendo que el número de azúcares, el tipo de azúcares o la posición de los azúcares podrían mejorar la actividad antiproliferativa de la Diosgenina.

Con respecto a la actividad citotóxica (necrótica), nuestros resultados establecen que el MF-10 no induce una muerte necrótica en ninguna de las 3 líneas (MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki), resultados que son congruentes con lo reportado para la Diosgenina (Rosas, 2016), Dioscina (Aumsuwan *et al.*, 2016) (Hernández *et al.*, 2020) y Diosgenina 3-glu (Luna, 2019) (Martínez, 2013), las cuales tampoco inducen muerte necrótica en ninguna de las líneas celulares trabajadas, sugiriendo que estas saponinas son compuestos de baja citotoxicidad, marcando una importante diferencia con los compuestos que actualmente se aplican para el tratamiento del cáncer, los cuales muchos son fuertemente citotóxicos. Con respecto a la amina acetilada presente en la glucosa unida en el carbono 3 de la Diosgenina, los resultados señalan que la presencia de la amina acetilada en la estructura del MF-10, en comparación con sus precursores, no mejora su actividad antiproliferativa, pero tampoco altera la actividad necrótica.

Con respecto a la actividad inductora de apoptosis en las líneas tumorales, nuestros resultados establecen que el MF-10 induce en las células tumorales a una muerte celular apoptótica, resultados que concuerdan con lo descrito para la Dioscina y la Diosgenina 3-glu (Hernández *et al.*, 2020), (Luna, 2019), (Martínez, 2013); en donde las dos saponinas mostraron inducir apoptosis con la participación de la caspasa 3 activa, sugiriendo que el MF-10 induce la eliminación de las células tumorales mediante el proceso apoptótico. Sin embargo, la Diosgenina, a pesar de inducir apoptosis no se vio un aumento considerable de células positivas a caspasa 3 (Rosas, 2016), sugiriendo que la modificación del azúcar influye en la actividad apoptótica del compuesto, como se vio en el MF-10 y la Diosgenina 3-glu donde hay mayor presencia de células positivas a caspasa 3 activa en comparación a la Diosgenina.

La diferencia en el porcentaje de células positivas a la caspasa 3 activa al ser tratadas con Diosgenina, Diosgenina 3-glu y el MF-10, sugiere que la glucosa unida al esteroide y la amina acetilada unida a la glucosa pueden mejorar la actividad apoptótica de la Diosgenina. Además, el incremento en el porcentaje de las caspasas 8 y 9 inducidas por el MF-10 en las tres líneas celulares, indica que la actividad apoptótica inducida por esta saponina es a través de la activación de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis, aunque es importante resaltar que el porcentaje registrado para la caspasa 8 en las tres líneas celulares es mayor en comparación con la caspasa 9, sugiriendo que la ruta extrínseca es la ruta principal o preferente por la que actúa este compuesto.

Estos resultados se apoyan en estudios previos donde evaluaron a la Dioscina, Diosgenina y Diosgenina 3-glu en la línea celular CaSki, estableciendo que estos compuestos activan ambas vías apoptóticas. Reportan que la Diosgenina presenta mayor porcentaje de células positivas para caspasa 8 que para caspasa 9, sin embargo, la actividad de la Diosgenina 3-glu mostró lo contrario con mayor número de células positivas para caspasa 9 en comparación con la caspasa 8 (Hernández *et al.*, 2020). Esto sugiere que la modificación en el glucósido de la saponina afecta directamente en la ruta apoptótica principal que induce, porque como ya se mencionó, el MF-10 (que está constituido por una amina acetilada en la glucosa de la Diosgenina 3-glu) indujo mayor presencia de caspasa 8 que de caspasa 9 siendo esta la actividad opuesta a la que presentó la Diosgenina 3-glu.

En el caso de otras líneas se reporta que la Dioscina activa la vía intrínseca en células HeLa (Cai, *et al.*, 2002), células HL-60 (Wang *et al.*, 2014), y en 3 líneas de cáncer de pulmón (Wei *et al.*, 2013). Por otra parte, la Diosgenina se reporta que activa tanto la caspasa 8 como la 9 en células HepG2 (Kim *et al.*, 2012), la caspasa 9, pero no la 8 en HeLa (Hou, *et al.*, 2004) y la activación de ambas caspasas en células de carcinoma hepatocelular (Li, *et al.*, 2015).

Con respecto a la cascada de señalización apoptótica y sabiendo que las dos vías se relacionan en la activación de la proteína Bid (activada por la caspasa 8) (Wu *et al.*, 2018), nuestros resultados sugieren que en las 3 líneas tumorales tratadas con MF-10 hubo un aumento de Bid (Fig. 22, 27, 32), al igual que Bax (Fig. 21, 26, 31), mientras que la concentración de Bcl-2 fue disminuida (Fig. 23, 28, 33). Esto sugiere que el compuesto, después de activar la ruta extrínseca, mediante la activación de Bid, puede estar activando la ruta intrínseca en un segundo término, como se aprecia de mejor manera en la línea MDA-MB-231.

Estos datos indican que la modificación que se realizó para obtener el MF-10 no modificó su acción con respecto a estas proteínas ya que este comportamiento también se observó en las otras saponinas. Se ha reportado que la Diosgenina induce apoptosis e inhibe Bcl-2 en células A549 (Mohammaad, *et al.*, 2013) y activa Bax y Bid e inhibe Bcl-2 en células HepG2 (Kim, *et al.*, 2012). De igual manera en la Dioscina se vio un aumento de Bax y disminución de Bcl-2 en células de carcinoma hepatocelular (Zhang, *et al.*, 2016) y en células LNCaP (Chen, *et al.*, 2014). De acuerdo a estos datos y los obtenidos en este trabajo se asume que las saponinas poseen la característica de regular a proteínas de la familia Bcl-2.

Estos resultados permiten considerar al compuesto MF-10, dada su actividad antitumoral, como un futuro terapéutico, por lo que es un buen candidato para ser estudiado en modelos *in vivo*.

## 10. Conclusiones

- El compuesto MF-10 presenta actividad antiproliferativa en las líneas tumorales MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki con IC<sub>50</sub> de 20.47, 25.24 y 51.72 µg/ml respectivamente.
- El MF-10 no presenta efecto necrótico en las líneas tumorales MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki.
- El MF-10 induce muerte apoptótica en las líneas tumorales MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki.
- El compuesto induce la activación de la caspasa 8 en las líneas tumorales SK-LU-1 y CaSki, y activa las caspasas 8 y 9 en la línea MDA-MB-231.
- El MF-10 induce la activación de las proteínas proapoptóticas Bid y Bax.
- El MF-10 produce una disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

## 11. Referencias

1. Adesegun, S. A., Coker, H. A. B., & Hamann, M. T. (2014). Anti-cancerous triterpenoid saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. *Journal of natural products*, 7, 155.
2. Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 438–469.
3. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., & Raff, M. (2011). *Introducción a la Biología Celular/Essential Cell Biology*. Editorial Medica Panamericana Sa de, CV.
4. Ali, R., Mirza, Z., Ashraf, G. M., Kamal, M. A., Ansari, S. A., Damanhour, G. A. & Sheikh, I. A. (2012). New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. *Anticancer research*, 32(7), 2999-3005.
5. American Cancer Society (ACS) [Internet]. [citado 9 enero de 2020]. Disponible en: <https://cancer.org/es/cancer-de-pulmon.html>
6. Amorín, K. E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30, 85-92.
7. Anaya Lang, A. L. (2003). *Ecología química*. Editorial Plaza y Valdés. México.
8. Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279-3330.
9. Aumsuwan, P., Khan, S. I., Khan, I. A., Ali, Z., Avula, B., Walker, L. A., Dasmahapatra, A. K. (2016). The anticancer potential of steroidal saponin, dioscin, isolated from wild yam (*Dioscorea villosa*) root extract in invasive human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 591, 98–110.
10. Ávila, M. O., Vega, A. F., & Alcázar, J. A. S. (2015). *Vida tras la muerte celular*. Investigación y ciencia.
11. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.

12. Burney, I. A., & Al-Moundhri, M. S. (2008). Major Advances in the Treatment of Cancer: What does a Non-Oncologist need to know? Sultan Qaboos University medical journal, 8(2), 137.
13. Cai, J., Liu, M., Wang., & Ju, Y. (2002). Apoptosis induced by Dioscin in Hela Cells. Pharmaceutical Society of Japan. 25(2) 193-196.
14. Campbell A, N., & Reece, J. B. (2005). Biología. Madrid España: Editorial Médica Panamericana.
15. Castellanos, S. H., Balboa, P. G., Calderón, I. L. T., Casas, M. Á. O. & Lamadrid, J. V. (2009). Cáncer de mama. In Anales de Radiología, México (VOL. 8, No. 1, pp. 117-126)
16. Cell Signaling Technology (CST) [Internet]. [citado 5 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.cellsignal.com>
17. Chakraborty, S., & Rahman, T. (2012). The difficulties in cancer treatment. *ecancermedicalscience*, 6.
18. Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends in cell biology*, 18(4), 157-164.
19. Clavero, R. M. C. (2013). Estado actual del tratamiento del cáncer pulmonar. *Revista Médica Clínica las Condes*, 24(4), 611-625
20. D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
21. Dale, M. M., Flower, R. J., Rang, H. P., & Ritter, J. M. (2008). *Rang y Dale: farmacología* (No. 615). Elsevier.
22. Das, S., Dey, K.K., Dey, G., Pal, I., Majumder, A., MaitiChoudhury, S., kundu, S.C., Mandal, M. (2012). Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma. e46641.
23. Díaz, B. E. A., Ortega, L. D. H., & Montes, A. M. S. (2011). Ciclo celular. *Biología molecular*.
24. Dubin, M. (2000). Muerte celular programada y apoptosis. *Funciones de las mitocondrias*. Buenos Aires. 60(3), 375-86.
25. Elena, G. A. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina*.
26. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
27. Fernández, M. A., López, H., Hernández., J. M. V., Sánchez, L., Escobar, M. L., Pinto, B. M. (2012). Synthesis and selective anticancer activity of steroidal glycoconjugates. *Eur J Med Chem*. 54:721-7.

28. Fianco, G., Contadini, C., Ferri, A., Cirotti, C., Stagni, V., & Barilà, D. (2018). Caspase-8: A Novel Target to Overcome Resistance to Chemotherapy in Glioblastoma. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3798.
29. Fragoso, L. R., Baltasar, E. H., & Esparza, J. A. R. (2004). El ciclo celular: Características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología aplicada*.
30. Gautam, S., Muthu, K. S., Sudha, W., Myruam, M., Frank, A., Alan, P. K, Anapam, B. (2018). Pro-apoptotic and anti-cancer properties of Diosgenin: a comprehensive and critical review. *Nutrients*, 10, 645.
31. Gómez, J. A., Altagracia, M., Kravzov, J., Cárdenas, R., & Poo, C. R. (2008). Cáncer de mama y las actuales alternativas de tratamiento. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3), 58-70
32. Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12).
33. Guntuku, L., Naidu, V. G. M., & Yerra, V. G. (2016). Mitochondrial dysfunction in gliomas: pharmacotherapeutic potential of natural compounds. *Current neuropharmacology*, 14(6), 567-583.
34. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
35. Hernández-Hernández, D. M., Apresa-García, T., & Patlán-Pérez, R. M. (2015). Epidemiological overview of uterine cervical cancer. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(S2), 154-161.
36. Hernández-Vázquez, J. M. V., López-Muñoz, H., Escobar-Sánchez, M. L., Flores-Guzmán, F., Weiss-Steider, B., Hilario-Martínez, J. C., Sánchez Sánchez, L. (2020). Apoptotic, necrotic, and antiproliferative activity of diosgenin and diosgenin glycosides on cervical cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 871, 172942.
37. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *The New England journal of medicine*, 361(16), 1570–1583.
38. Huo, R., Zhou, Q. L., Wang, B. X., Tashiro, S. I., Onodera, S., & Ikejima, T. (2004). Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 1077-1082.
39. Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [citado 13 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/significado-cambios-en-cuello-uterino.pdf>
40. Jiménez, L. F. & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. Pearson educación, México.

41. Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 65-80.
42. Kaskiw, M. J., Tassotto, M. L., Mok, M., Tokar, S. L., Pycko, R., Th'ng, J., & Jiang, Z. H. (2009). Structural analogues of diosgenyl saponins: synthesis and anticancer activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(22), 7670-7679.
43. Kim, D. S., Jeon, B. K., Lee, Y. E., Woo, W. H., & Mun, Y. J. (2012). Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
44. Kim, E. A., Jang, J. H., Lee, Y. H., Sung, E. G., Song, I. H., Kim, J. Y., & Lee, T. J. (2014). Dioscin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis*, 19(7), 1165-1175.
45. Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471–8486.
46. Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical biochemistry*, 182(1), 16-19.
47. Kumar, V., A. K. Abbas, & J. C. Aster. (2018). *Robbins patología humana*. Elsevier.
48. Lagunas, M. D. C., Mendiola, A. V., & Soto C.I. (2014). *Ciclo celular: Mecanismos de regulación*. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, Vol. 17.
49. Lepage, C., Leger, D.Y., Bertrand, J., Martin, F., Beneytout, J.L., Liagre, B. (2011). Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes trail-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* 301, 193-202.
50. Li, S., Cheng, B., Hou, L., Huang, L., Cui, Y., Xu, D., Shen, X., Li, S. (2018). Dioscin inhibits colon cancer cells growth by reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and p38 and JNK pathways. *Anti-cancer drug* 29, 234–242.
51. Li, Y., Wang, X., Cheng, S., Du, J., Deng, Z., Zhang, Y., & Ling, C. (2015). Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*, 33(2), 693-698.
52. Lizarbe, I. M.A. (2007). El suicidio y muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* Vol. 101
53. Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana, 5a ed. Buenos Aires.
54. López, D. B. S. (2017). Evaluación de la actividad antiproliferativa y necrótica del 2-deoxi-2-acetamido- $\beta$ -D glucopiranosido de diosgenilo (MF-10) y el clorhidrato de 2-deoxo-2-amino-  $\beta$ -D glucopiranosido de diosgenilo (MF-11) en células de cáncer de mama MDA-MB-23. [Tesis]. UNAM; [citado 20 enero de 2020].

55. Loraine, S. & Mendoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
56. Luna, C. M. (2019). Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la saponina esterooidal Diosgenina-3-Glu en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cáncer de pulmón (SK-LU-1). [Tesis]. UNAM; [citado 21 enero de 2020].
57. Machacado, J. P., & Concepción, A. E.L. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay*. 18(2), 138-153.
58. Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., & Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81(7), 703-714.
59. Mao, Y., Yang, D., He, J., & Krasna, M. J. (2016). Epidemiology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 25(3), 439-445.
60. Martínez, S. I. (2013). Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina 3-glu en líneas de cáncer cérvico uterino: HeLa, Caski y ViBo [Tesis]. UNAM; [citado 20 enero de 2020].
61. Martínez, T. A. C., Gómez, M. L. & Rodríguez, P. C. (2018). La muerte celular: un proceso indispensable para la vida. UANL.
62. Mercade, T. M., & Pascual, F. J. R. (2009). Comprender el cáncer. Editorial AMAT.
63. Meza, J.J., Montaña, L. A. & Aguayo, G. A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70.
64. Mohammad, R. Y., Somayyeh, G., Gholamreza, H., Majid, M., & Yousef, R. (2013). Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6945-6948
65. Montes, S. M. A., Rodríguez, S. S. A., Borunda, A. S. J. (2013). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Ed. McGrawHill Education. México.
66. Moses, T., Papadopoulou, K. K., & Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(6), 439-462.
67. Muñoz, A. (2004). *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice.
68. Ouchen, F. S. (2008). TEMA 14: Neoplasias. Definiciones. Nomenclatura. Características. Eusalud.
69. Palacios D. D. E., Miró, D. D. M., & Boticario, D. D. C. (2011). Muerte celular y cáncer: las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. Vol. 15.

70. Perez-Plasencia, C., Duenas-Gonzalez, A., & Alatorre-Tavera, B. (2008). Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *International Archives of Medicine*, 1(1), 10.
71. Prolla, C. M. D., Silva, P. S. D., Netto, C. B. O., Goldim, J. R., & Ashton, P. P. (2015). Conocimiento del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público. *Revista latinoamericana de enfermagem*, 23(1), 90-97.
72. Ramírez, A. M. E. & Rojas, L. M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. Universidad de Antioquia. Colombia.
73. Rincón, O. L., Pareja, L. R., Jaramillo, S., & Aristizábal, B. H. (2016). Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 58(3), 202-212.
74. Rojas, M., Salmen, S. & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la extensión Portuguesa*, 4(3), 92-106.
75. Romo de Vivar, A. (2006). Química de la Flora mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química, UNAM, México.
76. Rosas, P. A. (2016). Actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica de la saponina esteroidea Diosgenina, en cultivos de células tumorales y no tumorales. [Tesis]. UNAM; [citado 21 febrero de 2020].
77. Sanabria, N. J. G., Fernández, M. Z. C., Cruz, H. I.D.L.C., Pérez L. O., & Llanuch L. M. (2011). El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: Revisión bibliográfica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 15(4), 295-319.
78. Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Los Condes*. 24(4), 553-562.
79. Shamas-Din, A., Bindner, S., Chi, X., Leber, B., Andrews, D. W., & Fradin, C. (2015). Distinct lipid effects on tBid and Bim activation of membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochemical Journal*, 467(3), 495–505.
80. Shewach, D. S., & Kuchta, R. D. (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics.
81. Sosa, E. E. B., Gómez, L. R. E., Serrano, M. V., Sánchez, M. A. P. C., & Castillo, A. A. C. (2017) La muerte celular programada: mecanismos morfológicos y moleculares implicados.
82. Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., Venguswamy, G., Kyprianou, N., & Damodaran, C. (2009). Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 125(4), 961–967.

83. Tao, X., Yin, L., Xu, L., Peng, J. (2018). Dioscin: a diverse acting natural compound with therapeutic potential in metabolic diseases, cancer, inflammation and infections. College of Pharmacy. Dalian, China.
84. Tong, Q. Y., He, Y., Zhao, Q. B., Qing, Y., Huang, W., & Wu, X. H. (2012). Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright against cancer cells. *Steroids*, 77(12), 1219-1227.
85. Villar., V. C.C. (2016). Efecto antiproliferativo, citotóxico y apoptótico del 2-deoxi-2-acetamido- $\beta$ -D glucopiranosido de diosgenilo (MF-10) en células tumorales provenientes de cáncer cervicouterino. [Tesis]. UNAM; [citado 20 enero de 2020].
86. Vu, M., Yu, J., Awolude, O. A., & Chuang, L. (2018). Cervical cancer worldwide. *Current problems in cancer*, 42(5), 457-465.
87. Wang, Y., He, Q. Y., & Chiu, J. F. (2014). Dioscin induced activation of p38 MAPK and JNK via mitochondrial pathway in HL-60 cell line. *European journal of pharmacology*, 735, 52-58.
88. Wang, Z., Cheng, Y., Wang, N., Wang, D.M., Li, Y.W., Han, F., Shen, J.G., Yang, D.P., Guan, X.Y., Chen, J.P. (2012). Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins. *Canc. Biol. Ther.* 13, 138–147.
89. Wei, Y., Xu, Y., Han, X., Qi, Y., Xu, L., Xu, Y., & Peng, J. (2013). Anti-cancer effects of dioscin on three kinds of human lung cancer cell lines through inducing DNA damage and activating mitochondrial signal pathway. *Food and chemical toxicology*, 59, 118-128.
90. WHO. Cáncer [internet]. [Citado 7 de enero del 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
91. Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
92. World Health Organization (WHO). (2007). Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales. 1st ed. Suiza.
93. World Health Organization (WHO). [Internet]. [citado 7 de enero de 2020]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>
94. Wu, H., Medeiros, L. J., & Young, K. H. (2018). Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. *Blood reviews*, 32(1), 8-28.
95. Xu, X. H., Li, T., Fong, C. M. V., Chen, X., Chen, X. J., Wang, Y. T., & Lu, J. J. (2016). Saponins from Chinese medicines as anticancer agents. *Molecules*, 21(10), 1326.

96. Yanes Quesada, M. Á., Calderín Bouza, R., Nasiff Hadad, A., & Sánchez Ruiz, J. (2010). Conducta integral en el cáncer de pulmón no microcítico. *Revista Cubana de Medicina*, 49(4), 379-386.
97. Ying, S. Z., Yi, L. M., Kiran, T., Sayed., S. H., Jun, W., Qi, Z., Jian, G. Z., Zhao, J. W. (2018). Molecular mechanism and inhibitory targets of dioscin in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 143-154.
98. Zaldívar. L G., Martín, M. F., Sosa, F. C. F., Ávila, M. J., Lloret, R. M., Román, L. M. Vega, M. G. (2012). Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Revista Chilena de obstetricia y ginecología*, 77(4), 315-321.
99. Zamora, L. A. K. (2017). Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los derivados de Diosgenina: 2-deoxi-2-acetamido- $\beta$ -D glucopiranosido de diosgenilo (MF-10) y 2-deoxi-2-amino-  $\beta$ -D glucopiranosido de diosgenilo (MF-11), en la línea tumoral de cáncer de pulmón SK-LU-1. [Tesis]. UNAM; [citado 20 enero de 2020].
100. Zhang, G., Zeng, X., Zhang, R., Liu, J., Zhang, W., Zhao, Y., ... & Du, B. (2016). Dioscin suppresses hepatocellular carcinoma tumor growth by inducing apoptosis and regulation of TP53, BAX, BCL2 and cleaved CASP3. *Phytomedicine*, 23(12), 1329-1336.
101. Zhao, X., Tao, X., Xu, L., Yin, L., Qi, Y., Xu, Y., Han, X., Peng, J. (2016). Dioscin induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa and SiHa cells through ROS-mediated DNA damage and the mitochondrial signaling pathway. *Molecules* 21, 730–741.
102. Zhu, X., Jiang, H., Li, J., Xu, J., & Fei, Z. (2016). Anticancer effects of paris saponins by apoptosis and PI3K/AKT pathway in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 1435.

## 12. Apéndice

### Preparación de reactivos

#### *Medio de cultivo RPMI-1640*

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42g
NaHCO <sub>3</sub> (SIGMA, USA)	2g

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

#### *Desactivación del suero*

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

#### *Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)*

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

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

Los reactivos en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 1N y se afora a un volumen final de 1000mL. Esta solución se filtra por medio de filtros de membrana con diámetro de 42 µm, la solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm<sup>2</sup> y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

### *Verseno*

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

Etilen-diamen-tetra-acético EDTA (SIGMA, USA)	0.4g
Cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA, USA)	8g
Cloruro de potasio (KCl) (SIGMA, USA)	0.4g
Tris (SIGMA, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm<sup>2</sup> y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

### *Solución cristal violeta (0.1%)*

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

Hidróxido de sodio (NaOH) (SIGMA, USA)	1.98g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA)	2.14g
Cristal Violeta (SIGMA, USA)	0.5g

### *Glutaraldehído (1.1 %)*

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

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

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

### *Camptotecina*

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

*Paraformaldehído/glutaraldehído*

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