



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Efecto de la daidzeína sobre la citotoxicidad en la línea
celular HeLa de cáncer cervicouterino**

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JAIME DOMÍNGUEZ CÓRDOVA

DIRECTORA: DRA. NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES

CODIRECTORA: DRA. JUANA ENRÍQUEZ JIMÉNEZ

AGOSTO 2023



Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por brindarme sus instalaciones, equipos, reactivos y apoyo económico a través de una beca, para la realización de esta tesis.

A la Doctora Juana Enríquez Jiménez y al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ por brindarme los reactivos necesarios para completar mi investigación, además de la guía y soporte teórico a lo largo de la tesis.

A la Doctora Nayeli Rodríguez Fuentes, por ser una excelente directora y mentora que me guio en cada uno de mis ensayos, y no solo me ayudo a concretar esta tesis si no que me permitió expandir mi experiencia en la investigación y divulgación científica, no solo brindándome el apoyo económico, teórico y material si no que me pudo brindar una de las mejores experiencias como estudiante y ser humano.

Agradecimientos a título personal o dedicatoria

A mi familia, gracias a mi madre que siempre vio la manera de apoyarme, guiarme y brindarme todo lo que estuviera a su alcance para mi desarrollo y crecimiento personal y profesional, a mi padre que sin su ayuda no hubiera sido posible muchos de mis proyectos personales y académicos, a mis hermanas Monse y Alma quienes siempre han sido mi modelo a seguir siendo la definición de éxito y responsabilidad, por sus consejos, compañía y guía que siempre me brindaron incondicionalmente, a mis mascotas Scrapy, Luna y Poncho que aun no pudiendo leer, deseo expresar el agradecimiento por su compañía a lo largo de toda mi vida y por ser la definición más pura de amor incondicional.

A mis amigos por ser mi soporte emocional en momentos donde no sabía qué hacer, por escucharme y apoyarme en todo mi proceso académico y personal, a Luis por ser una de las personas más dulces y comprensivas que además de brindarme su amor me dio su tiempo y atención en todo momento, a mi prima Yuritzí que sin haber sido por su ayuda este proyecto no hubiera sido posible además de ser un gran ser humano y gran modelo para mí como bióloga ha sido un gran ser de luz, a mis docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme todas herramientas teóricas y prácticas que me ayudaron a crecer como futuro biólogo.

Al equipo de biomateriales por recibirme no solo como compañeros si no como buenas amistades y brindarme experiencias muy gratas que llevo conmigo, destacando Noemi, Cielo y Abreu por enseñarme y auxiliarme en todos mis ensayos, a Vanessa y José Luis por ayudarme con todas las dudas que fueron surgiendo y hacer más grata mi estadía.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1.INTRODUCCIÓN	7
1.1. Cáncer.....	10
1.2. Cáncer cervicouterino.....	11
1.3. Tratamientos contra el cáncer.....	12
1.4. Los fitoestrógenos.....	13
1.5. Daidzeína	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. La daidzeína y su potencial anticancerígeno	15
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4.HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos específicos	20
6.MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. Diseño experimental.....	22
6.2. Preparación del Suero Fetal Bovino (SFB) libre de hormonas esteroides	22
6.3. Cultivo y mantenimiento de células HeLa	23
6.3. Estudio de citotoxicidad sobre la línea celular HeLa	23
6.4. Evaluación de los cambios morfológicos inducidos por la daidzeína en células HeLa.....	24
7.RESULTADOS	27
7.1. Efecto citotóxico de la daidzeína sobre las células HeLa	27

7.2. Efecto citotóxico de la daidzeína sobre las células HeLa expuestas a estradiol.....	28
7.3. Cambios morfológicos de las células HeLa tratadas con daidzeína	29
7.4. Cambios morfológicos de las células HeLa tratadas con daidzeína combinada con estradiol	30
8.DISCUSIÓN	33
9. PERSPECTIVAS.....	35
10.CONCLUSIONES.....	36
11.BIBLIOGRAFÍA.	37
12.ANEXOS	45
12.1. Validación estadística de los datos de citotoxicidad.....	45

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es una enfermedad estrógeno dependiente caracterizada por la presencia de formaciones neoplásicas de las células del cérvix uterino. El conocimiento sobre los estrógenos tiene un papel relevante en la génesis del cáncer cérvico uterino, ha permitido el desarrollo e implementación de estrategias farmacológicas anti estrogénicas dirigidas a interferir los efectos neoplásicos de los estrogénicos o desactivar las vías de señalización de los estrógenos en el tratamiento del cáncer cérvico-uterino. Una estrategia no hormonal alternativa es el uso de fitoestrógenos, los cuales son compuestos de origen vegetal que poseen actividad del tipo estrogénica. Estudios han demostrado que tales compuestos exhiben efectos estrogénicos débiles e inclusive anti estrogénicos en diferentes tejidos reproductivos con susceptibilidad de desarrollar cáncer. Tomando como base estos hechos, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos citotóxicos de la daidzeína, un fitoestrógeno presente en el grano de la soya, en las células cancerosas de cérvix-uterino humano HeLa. La citotoxicidad se estableció en términos de los cambios en la proliferación de las células HeLa determinados mediante el uso del método colorimétrico con alamar blue y los cambios morfológicos de las células determinados mediante la técnica de tinción citológica con cristal violeta. Las células Hela se incubaron con concentraciones crecientes (25, 50 y 100 μM) de daidzeína durante 24, 48 y 72 h en la presencia o ausencia de 10 nM de estradiol.

Los resultados demostraron que el tratamiento de daidzeína sola, en una alta concentración (100 nM) durante 48 h, indujo un efecto citotóxico sobre las células HeLa al inhibir la proliferaron celular. El tratamiento con 100 μM de daidzeína y 10 nM de estradiol incubado a 48 h potenció el efecto citotóxico en términos de la inhibición de la proliferación de las células HeLa, alcanzando valores de 32.4% comparado con las células HeLa incubadas con el vehículo solo, sugiriendo que daidzeína antagoniza el efecto estimulador sobre la proliferación inducido por el estradiol. En general, los datos presentados en este estudio indican que el efecto citotóxico del fitoestrógeno derivado de la soya, la daidzeína, juega un papel importante en las células cancerosas de cérvix uterino humano.

1.INTRODUCCIÓN

La Sociedad Americana de Cáncer, define el cáncer, como un grupo de enfermedades, en las cuales las células presentan una división y propagación descontrolada en el organismo (Society, 2022). De acuerdo con el informe de Sung y colaboradores (2021), 20.44% de la población mundial padece algún tipo de cáncer, y 10.65% de las muertes en el mundo son a causa de esta enfermedad, de las cuales 7.3% son por causa del cáncer cérvico uterino [Figura 1].

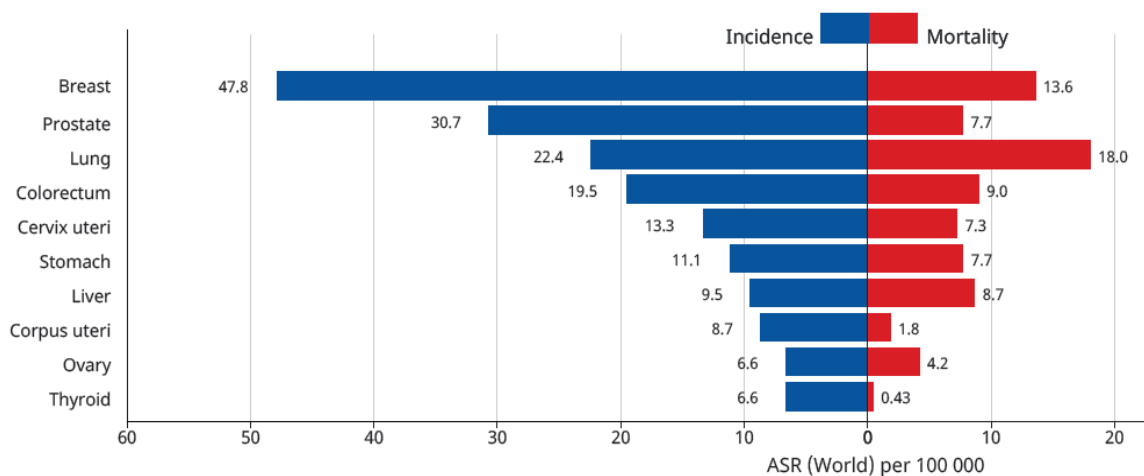


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los cánceres a nivel mundial. Se muestran la incidencia (azul) y la mortalidad (rojo) para distintos tipos de cáncer, respecto a la edad por cada 100,000 personas ASR (age standardized rate), (Sung *et al.*, 2021).

En México, estimaciones del INEGI realizadas en el 2020 informan que el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en mujeres, con un estimado de 9 mil 439 nuevos casos y 4 mil 335 muertes. Una tasa de incidencia de 12.6 y de mortalidad de 5.7 por 100 mil mujeres. En 2021, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) detectó mil 155 nuevos casos y mil 59 defunciones con una tasa de incidencia de 2.26 por 100 mil y una tasa de mortalidad de 5.23 por 100 mil. Destaca el estado de Chiapas con la tasa de mortalidad de 11.91, la más alta del país [Figura 2] (The Global Cancer Observatory, 2021).

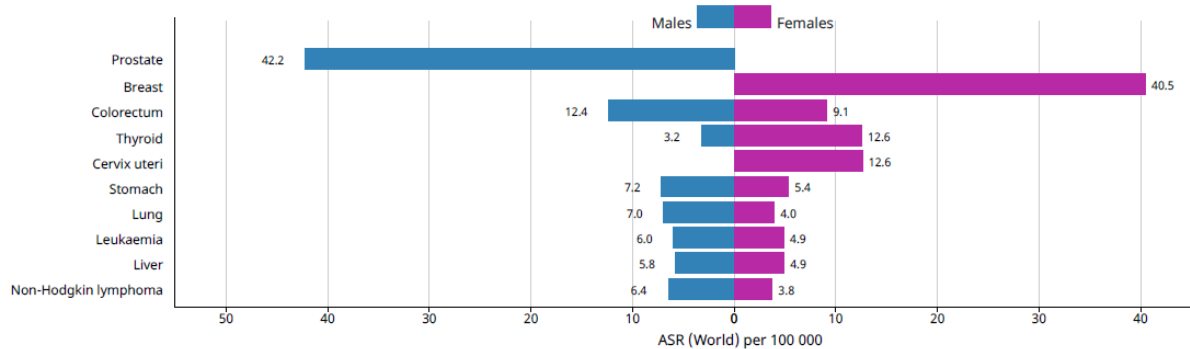


Figura 2. Incidencia de cánceres en México por sexo. Se muestra la incidencia de diversos tipos de cáncer en la población masculina (azul) y femenina (rosa), respecto a la edad estándar por cada 100,000 personas, ASR (age standardized rate), (The Global Cancer Observatory, 2021).

Actualmente existen diferentes estrategias de tratamiento para enfrentar el cáncer cervicouterino, una de ellas es el uso farmacológico de moduladores selectivos de los receptores de estrógenos subtipos alfa o beta, como el tamoxifen, empleado en el tratamiento contra el cáncer de la glándula mamaria, que bloquea selectivamente los receptores de estrógenos alfa de la glándula mamaria, sin afectar los presentes en otros órganos (Dávila & Garrán, 2005; Jordan, 2003; Karn *et al.*, 2010; BTA, 2020). Aunque, este tipo de compuestos sintéticos ha resultado ser una estrategia no hormonal efectiva contra del cáncer de tejidos susceptibles, el uso de elevadas dosis y particularmente largos periodos de tratamiento se ha asociado con efectos secundarios adversos como la inflamación uterina, alteraciones del ciclo menstrual, que incluyen aumento del flujo menstrual y la formación de adenocarcinomas en el endometrio (Kloos *et al.*, 2002), que deterioran aún más la condición de salud de la mujer con cáncer.

Un tratamiento alternativo con menos efectos secundarios negativos para la salud de la mujer es el uso de compuestos de origen vegetal con débil actividad estrogénica y posible actividad anti estrogénica como son los fitoestrógenos. Los fitoestrógenos son biomoléculas activas que tienen una estructura química similar a la de los estrógenos humanos con capacidad de inducir o estimular acciones del tipo estrogénico e inclusive ejercer efectos anti estrogénicos (Sirotkin & Harrath, 2014). Estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con genisteína o

daidzeína, dos fitoestrógenos abundantes en el grano de la soya, tienen un impacto positivo en la salud de la mujer al protegerla contra diferentes enfermedades como osteoporosis, hipertensión y aterosclerosis. Otros estudios han mostrado que el equol, el cual se forma en la microbiota intestinal de la mujer, como un producto del metabolismo de la daidzeína, influye de manera positiva sobre la salud de mujer (Rafii, 2015).

Estudios experimentales han demostrado que la daidzeína se une a los receptores de estrógenos y ejerce efectos del tipo estrógeno agonista y/o antagonistas (Vitale *et al.*, 2013). Además, el estudio reciente de Gundogdu *et al.* ha mostrado que el tratamiento con daidzeína inhibe el estrés oxidativo que ocurre en las células cancerosas (Atiq *et al.*, 2019). Otros estudios han demostrado que la daidzeína induce efectos citotóxicos en células cancerosas de diferentes tejidos como es la glándula mamaria, la próstata, el páncreas y el colon al activar procesos proapoptóticos que evaden las células cancerígenas (Gundogdu *et al.*, 2020). Sin embargo, el papel y los efectos que la daidzeína tiene en las células cancerosas de cérvix uterino aún no se conocen. El presente estudio está dirigido a investigar si el fitoestrógeno daidzeína afecta las células cancerosas del cuello del útero, el cérvix, y es capaz de inducir efectos citotóxicos, usando como modelo experimental a la línea celular HeLa de cáncer cervicouterino humano.

1.1. **Cáncer.**

El cáncer es una enfermedad provocada por la desregulación de la proliferación de las células de un cierto tejido, que resulta en la neoformación de tumores o carcinomas. Tales masas tumorales neoplásicas influyen negativamente la función del propio órgano, así como tejidos adyacentes y alejados del sitio inicial, a través de las formaciones cancerosas metastásicas [Figura 3] (De la Garza Salazar & Juárez Sánchez, 2013).

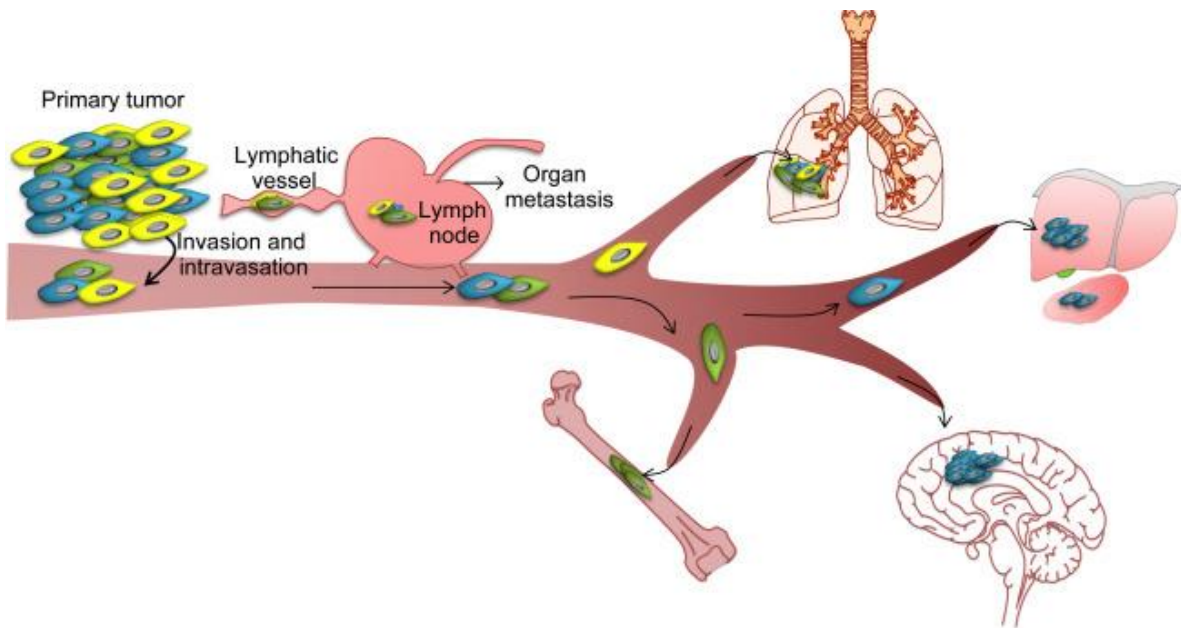


Figura 3. Esquema del evento de metástasis en un tumor primario. (Ahmad, 2017).

El cáncer es un padecimiento que afecta a la sociedad desde hace muchos años, prácticamente el vivir con cáncer altera directamente la calidad de vida. Cella y Tulsy (1993) han argumentado que el vivir con cáncer altera toda la fisiología del organismo, por lo que el tratamiento para este tipo de padecimientos debe ser inmediato para que la calidad de vida del individuo no disminuya drásticamente. Existen muchos tipos de cáncer, ya que se puede desarrollar en cualquier parte del cuerpo y denominándose de acuerdo a la parte corporal en el que se origina. El origen del cáncer es multifactorial y uno de los factores de riesgo de gran relevancia son ciertas hormonas esteroides, como los estrógenos, un grupo de hormonas sexuales femeninas, que se sabe que son carcinógenos humanos.

Aunque estas hormonas tienen funciones fisiológicas esenciales tanto en mujeres como en hombres, también han sido asociadas con un mayor riesgo de ciertos cánceres como es el cáncer de mama o de cérvix uterino, ovario o próstata (Carroll & Brown, 2006; Bardin *et al.*, 2004; Boulle, *et al.*, 2004). La exposición por largo tiempo o las concentraciones elevadas de estas hormonas están relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar este tipo de cánceres. De los estrógenos humanos, el estradiol, que es el estrógeno de mayor potencia biológica, promueve la hiperplasia de las células cancerosas al estimular su división celular, a través de su interacción con los receptores intracelulares de los estrógenos (RE) presentes en el tejido. Los tejidos que son sensibles a la acción de los estrógenos humanos contienen dos poblaciones diferentes de RE que son los subtipos α y β , los cuales activan diferentes genes sensibles al estrógeno y participan en la regulación de diferentes funciones celulares.

La activación de los RE α estimula la proliferación celular, mientras que los RE β activan la apoptosis. Bardin *et al.* (2004), demostraron que las células cancerosas de cérvix uterino y de otros cánceres que son también dependientes de estrógenos expresan bajos niveles de Er β , producidos por factores epigenéticos. Tal alteración condiciona a que las células cancerosas respondan a la acción del estradiol con una elevada actividad proliferativa (Bardin, Hoffmann, *et al.*, 2004).

1.2. Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino es una enfermedad generada por la alteración en el ciclo celular de los tejidos presentes en el cérvix o cuello del útero [Figura 4], lo más común es presenciar esta alteración en el tejido epitelial (Traut & Papanicolaou, 1943). Las células de este tipo de cáncer dependen de la acción de los estrógenos (estrone, estriol y estradiol), por lo que una exposición por largos periodos de tiempo y altas concentraciones de estas hormonas, debido a alteraciones hormonales, puede ser un factor de riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino. Otro factor de riesgo de cáncer cervicouterino es el aumento de peso. Las mujeres con obesidad presentan importantes alteraciones en los niveles de hormonas

estrogénicas por lo que están en un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino (Henley *et al.*, 2018).

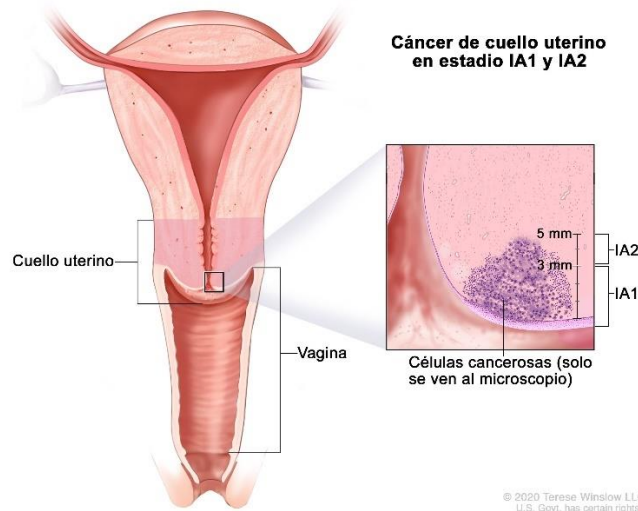


Figura 4. Esquema del cáncer cervicouterino en un estadio primario (IA1 y IA2). (Ahmad, 2017).

1.3. Tratamientos contra el cáncer.

Las terapias más comunes que recibe un individuo que padece cáncer van desde tratamientos farmacéuticos, quimioterapias, hormoterapias, radioterapias o cirugía, lo cual dependerá de la evolución del cáncer (De Cáceres *et al.*, 2007) no obstante, la quimioterapia, sigue siendo uno de los procedimientos más accesibles y funcionales hasta hoy en día. Por otro lado, la radioterapia es de las terapias más agresivas contra el cáncer, en contraste con la hormoterapia, que emplea fármacos u hormonas que regulan la fisiología del organismo a nivel metabólico. Un ejemplo de este tipo de terapia es el uso del tamoxifeno, un fármaco el cual funge la función de modulador de los receptores de estrógeno evitando la unión entre los estrógenos y RE (Hannoun-Levi, 2005).

Sin embargo, gracias a la innovación e investigación científica, se han encontrado nuevas alternativas para prevenir o tratar el cáncer desde vías más naturales, a través de la quimio-prevención. De acuerdo con Wattenberg, en 1985, la quimio-prevención se refiere a un tratamiento preventivo para el desarrollo de algún

posible carcinoma, esta prevención está enfocada en la modificación de los hábitos humanos que pueden estar favoreciendo la generación de algún cáncer, como las dietas y rutinas diarias (Wattenberg, 1985). Por ello, se ha sugerido la ingesta de ciertos alimentos, como la cúrcuma, uvas, soya, entre otros alimentos ricos en fitoestrógenos, como acción preventiva e inclusive terapéutica contra el cáncer. Esta sugerencia se debe a que se ha demostrado que fitoestrógenos como la curcumina, el resveratrol y la genisteína pueden generar una disminución en el índice de carcinogénesis en modelos de ratas e incluso un efecto citotóxico y apoptótico en células cancerosas (Murakami & Ohigashi, 2007).

1.4. Los fitoestrógenos.

Los fitoestrógenos son compuestos biológicamente activos que se producen de forma natural en las plantas con un efecto estrogénico débil. De acuerdo con su naturaleza química, se dividen en distintos grupos: isoflavonas, flavonoides, estilbenos y lignanos (Dixon, 2004). Se encuentran en plantas de la familia de las leguminosas, especialmente en las semillas de soya, pero también las contienen plantas de las familias de las solanáceas, gramíneas y rosáceas (Hajirahimkhan *et al.*, 2013).

A pesar de que existen cuatro clases principales, destacan las isoflavonas, ya que en el momento actual son las que ofrecen mayores perspectivas terapéuticas siendo la soya una fuente rica de dos isoflavonas la genisteína y daidzeína. Estos compuestos son dos fitoestrógenos con débil actividad estrogénica, ampliamente estudiados por su potencial anti estrogénico en el tratamiento contra el cáncer.

Diversos estudios han demostrado que la genisteína y la daidzeína se unen a ambos subtipos de ER α y ER β y son capaces de activar diferentes procesos celulares. La unión de la genisteína con los ER α promueve la división celular, mientras que su interacción con los ER β activa la apoptosis celular (Rietjens *et al.*, 2013). La daidzeína, otra isoflavona de la soya (Liggins *et al.*, 2000), es de particular interés, ya que se ha mostrado que este fitoestrógeno puede ser un potencial agente anticancerígeno debido a su capacidad citotóxica, al disminuir la proliferación de las células cancerosas y promover su apoptosis (Gercel-Taylor *et*

al., 2004). Además, otros estudios han demostrado que tanto la genisteína como la daidzeína tienen efectos anti proliferativos en tumores no dependientes de hormonas de hígado y leucemias (Mousavi & Adlercreutz, 1993; Barnes, 1997; Gercel-Taylor *et al.*, 2004). [Figura 5].

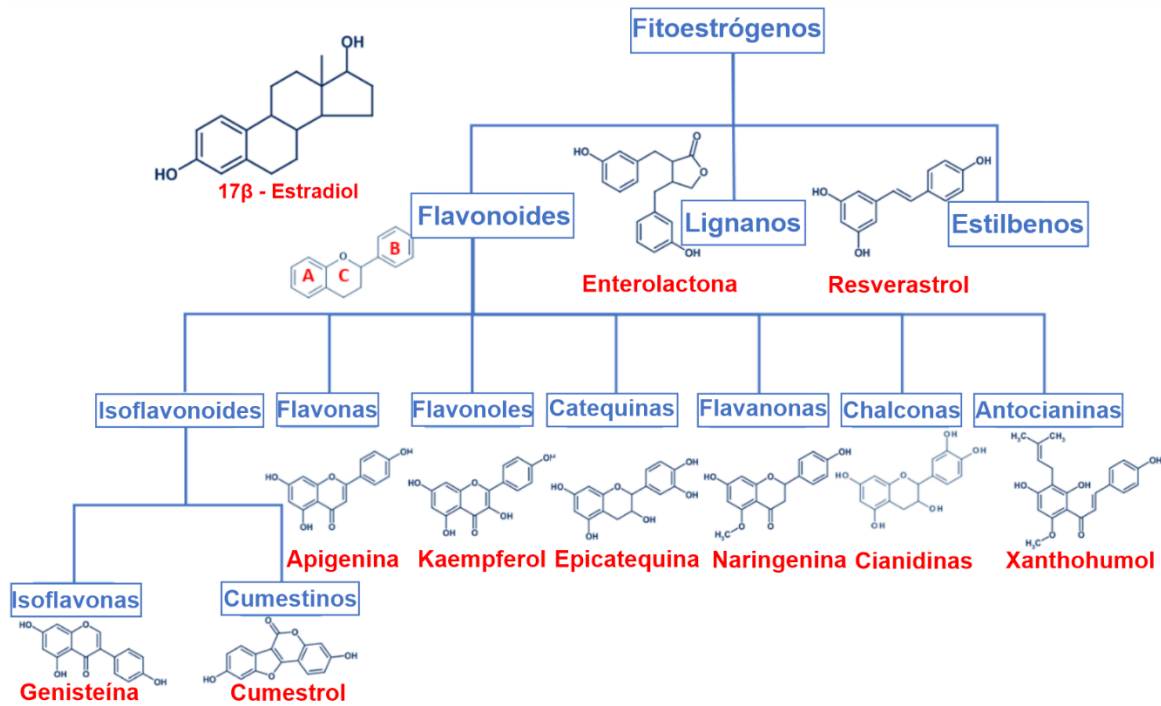


Figura 5. Clasificación de los fitoestrógenos de acuerdo a su estructura química. (Torrens-Mas & Roca, 2020).

1.5. Daidzeína

La daidzeína, también conocida como 4',7-dihidroxi-isoflavona [Figura 6], es una isoflavona, perteneciente al grupo de los estrógenos no esteroideos (Sun *et al.*, 2016). La daidzeína es de los menos estudiados, debido a que se encuentra en menor cantidad que la genisteína en el grano de la soja. Estudios han demostrado que la daidzeína actúa como un agente citotóxico en diferentes tipos de cánceres dependientes de estrógeno humano.

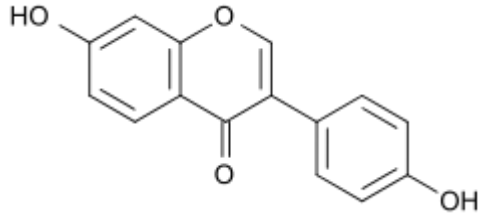


Figura 6. Estructura química de la daidzeína (4', 7-dihidroxi-isoflavona).

La daidzeína, aunque tiene una estructura molecular similar a la de los estrógenos humanos, tiene baja afinidad por los sitios de unión de los receptores intracelulares de estrógenos y ejerce efectos, aunque débiles, que son similares a los estrógenos humanos, los cuales pueden ser del tipo agonista y/o antagonista esto debido a su similitud química que tiene con los estrógenos (estrona, estriol y estradiol) [Figura 7].

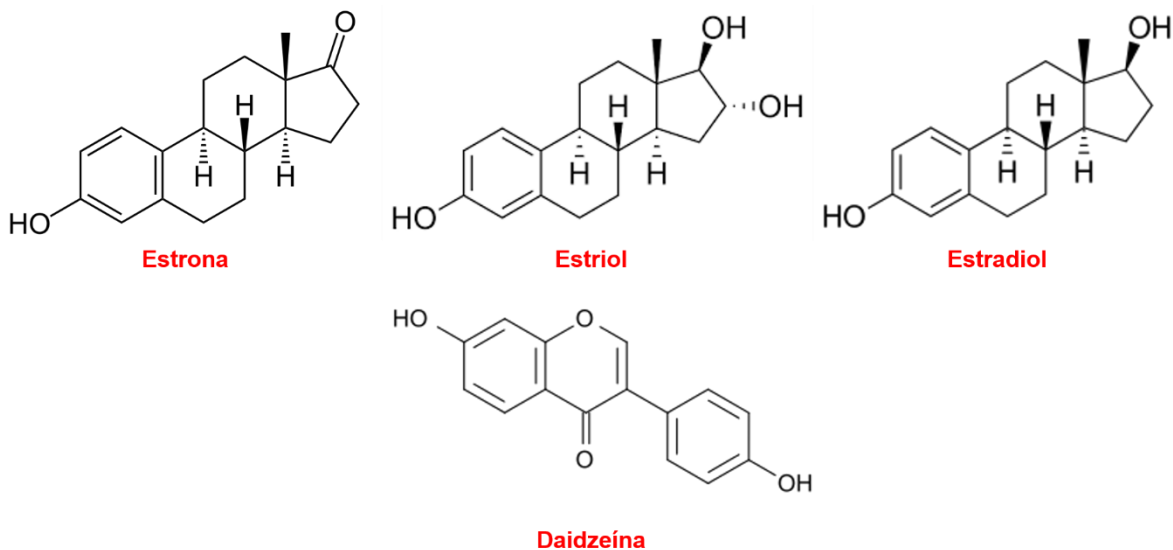


Figura 7. Comparación entre las estructuras químicas de la daidzeína (4', 7-dihidroxi-isoflavona) y los estrógenos humanos (estrona, estriol y estradiol).

2. ANTECEDENTES

2.1. La daidzeína y su potencial anticancerígeno

La función de la daidzeína como un agente citotóxico en cánceres dependientes de la acción de los estrógenos se debe principalmente a la notable inhibición de la

proliferación celular (Vitale *et al.*, 2013). Interesantemente, el efecto citotóxico de la daidzeína también se presenta en células de cánceres no estrógeno dependientes como son la leucemia y el cáncer hepático. Un estudio demostró que la administración de daidzeína en elevadas concentraciones (200 a 600 μM) induce apoptosis en las células SK-HEP-1 de cáncer de hígado, observándose el mayor efecto anti proliferativo a una dosis de 400 μM , mientras que administrada en mayores concentraciones de 600 μM afectó las células hepáticas normales (Park *et al.*, 2013). El estudio de Choi y Kim (2008), demostró que concentraciones bajas de 1 – 100 μM de daidzeína indujeron el arresto de la división celular en las fases G1, G2 y M, además de la inhibición de la proliferación en células MCF-7 y MDA-MB-453 de cáncer de mama. Además del efecto citotóxico sobre las células cancerosas, la daidzeína, tiene efectos antioxidantes sobre células sanas. Tales observaciones sugieren que daidzeína protege a las células sanas de alteraciones en la cromatina provocadas por la acción de radicales libres de oxígeno (Alshehri *et al.*, 2021).

Estudios realizados en modelos de ratas, que fueron expuestas a dietas ricas en daidzeína, describen que esta biomolécula puede ser absorbida directamente por el intestino, y su interacción en la fisiología del organismo tiene como resultado la disminución en la expresión de ciertas oncoproteínas, así como interleucinas proinflamatorias, demostrando que es un fitoestrógeno competente como quimiopreventivo. Por otra parte, se ha demostrado que la daidzeína tiene un efecto citotóxico en las líneas celulares de cáncer cervicouterino y en modelos de ratas, presentando un elevado índice de expresión de factores como TNF (tumoral necrotic factor) >50% a la misma vez que reduce la expresión de proteínas como c-fos <20%, disminuyendo la proliferación de las células cancerosas y evitando el aumento o aparición de un carcinoma (Lian *et al.*, 2001).

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha observado que la daidzeína puede tener algún efecto quimiopreventivo, sin embargo, este efecto es dosis dependiente, ya que se ha demostrado que a bajas dosis (5 mg/kg), la daidzeína tiene una función proliferativa, promoviendo el crecimiento celular, y anti oxidativa protegiendo a las

células sanas de cualquier daño causado por radicales libres, sin embargo, si este fitoquímico se administra en elevadas cantidades (25 mg/kg) puede generar un evento apoptótico reduciendo el porcentaje de proliferación celular (Choi & Kim, 2009). Además de la concentración de la daidzeína, es importante mencionar que sus efectos dependen del tipo celular que se esté evaluando.

La daidzeína tiene un efecto que puede ser controlado por las concentraciones en las que se administra, las cuales abarcan de 100 a 600 μM como ha sido reportado previamente para líneas celulares de cáncer como la MCF-7 y MDA-MB-453 (cáncer de mama), las cuales han mostrado ser sensibles a este fitofármaco, ya que promueven un porcentaje de citotoxicidad elevado con respecto a línea celular MCF-7 presentando valores de 34.88 – 49.22%, generando una disminución del índice de formación de colonias, así como un aumento de los niveles de apoptosis por vías mitocondriales (10—30%) a partir de concentraciones en el rango de 100 μM (Jin *et al.*, 2010). El cáncer cervicouterino también ha mostrado sensibilidad a daidzeína, como ha sido demostrado en cultivos *in vitro* de tejido cervical proveniente del útero de pacientes con cáncer dependiente y no dependiente de estrógenos. Estos estudios demostraron que la daidzeína tiene un efecto en ambos escenarios, sin embargo, en el caso de cánceres dependientes de estrógenos la sensibilidad se observó a concentraciones de 6.14 – 100 μM de daidzeína, mientras que, para el cáncer no dependiente de estrógenos, se observó que dosis superiores de 100 μM son necesarias para observar un resultado significativo. Este comportamiento se ha atribuido a que la daidzeína puede generar eventos de citotoxicidad a través del arresto en las fases G1, G2 y M del ciclo celular, además de participar como factor de transcripción promotor de la apoptosis (Guo *et al.*, 2004). En modelos de cáncer hepático, se ha demostrado que el efecto citotóxico de la daidzeína se observa a concentraciones de 0.1 – 50 μM , siendo las concentraciones mayores a 10 μM donde se ha observado un efecto significativo en los índices de citotoxicidad que fue de 80% respecto a las células no expuestas (Zhang *et al.*, 1999).

Estos hallazgos parecen indicar que los cánceres no dependientes de estrógenos necesitan dosis más elevadas de fitoestrógenos como en este caso la daidzeína, mientras que las dosis bajas, menores a 100 μM , son suficientes para alterar la dinámica celular en los cultivos de cáncer estrógeno dependiente; esto puede deberse a que la daidzeína podría fungir como un factor de transcripción para activar vías apoptóticas, uniéndose a los receptores de estrógenos α y β para promover juntos como un factor de transcripción para diversas proteínas como BAX y generar un evento apoptótico mitocondrial (Choi & Kim, 2013).

Un protocolo en fase clínica, consistió en proporcionar alimentos ricos en fitoestrógenos a mujeres con cáncer de mama en una etapa primaria, las voluntarias debían ingerir un muffin con fitoestrógeno (lignano) diario por 32 días (un muffin sin fitoestrógeno fue administrado al grupo placebo). Esta investigación demostró que el índice de apoptosis incrementó de 0.88% hasta un 1.55%, mientras que la proliferación y crecimiento de las células cancerosas disminuyeron cerca del 5%, por otro lado, el grupo placebo tuvo un efecto totalmente opuesto, siendo esto una respuesta bastante prometedora para el empleo de los fitoestrógenos como terapia anticáncer (Thompson *et al.*, 2005).

Otro estudio *in vivo* sobre el efecto anticancerígeno de fitoestrógenos demostró que la daidzeína inhibe el crecimiento de tumores. Este estudio se realizó en un modelo de cáncer de mama, el cual se obtuvo induciendo a ratas con líneas celulares MCF-7, las ratas fueron divididas en diferentes grupos y cada uno de estos fue tratado con diferentes cantidades de daidzeína. Se observó que este fitoestrógeno pudo inhibir el crecimiento del carcinoma en concentraciones de 2.7 $\mu\text{mol/kg}$ (Liu *et al.*, 2012). Además, la daidzeína ha demostrado ser un prometedor agente para tratar los efectos del cáncer por su actividad antioxidante, por lo que se ha integrado a las dietas quimiopreventivas de cáncer dependientes de estrógenos como el cáncer de mama (Sathyamoorthy & Wang, 1997) [Tabla 1].

Tabla 1. Modelos de *In vivo* e *In vitro* en estudios relacionados a la daidzeína y su efecto en el cáncer.

Modelo	Dosis	Efectos	Referencia
Células HL-60 (Leucemia)	> 10 µg/mL	Inhibición de las células causadas a un arresto celular en la fase G1.	(Jing <i>et al.</i> , 1993)
Células SK-HEP-1 (Cáncer hepático)	200, 400, 600 µM	Efecto negativo en la viabilidad celular, causando inestabilidad nuclear, etc.	(Park <i>et al.</i> , 2013)
Células MCF-7 y MDA-MB-453 (Cáncer de mama)	1 – 100 µM	Efecto negativo en la viabilidad celular.	(Choi & Kim., 2008)
Ratas	10–20 mg/kg	Reducción en el crecimiento y tamaño del carcinoma.	(Lian <i>et al.</i> , 2001).
Ratas	5 – 25 mg/kg	Aumento de marcadores moleculares relacionados a procesos apoptóticos	(Choi & Kim, 2009)
Células HeLa (Cáncer cervicouterino)	6.14 – 100 µM	Reducción en la viabilidad celular, y presencia de arresto celular en la fase G1, G2 y M.	(Guo <i>et al.</i> , 2004)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino es un padecimiento altamente letal, que afecta millones de mujeres en el mundo y a pesar de que existe un gran número de estrategias para el tratamiento de este tipo de cáncer que incluyen fármacos oncológicos, quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia y/o cirugía, las pacientes experimentan efectos negativos secundarios que deterioran aún más su estado, afectando su calidad de vida. En la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas contra el cáncer cervicouterino, el uso de compuestos de origen vegetal con actividad similar a los estrógenos llamados fitoestrógenos, como es la daidzeína ha sido de gran interés debido a su potencial citotóxico en células cancerosas presentes en el hígado y en leucemias. Tomando en cuenta estos hallazgos y el hecho de que la daidzeína actúa como un débil agonista de los receptores de estrógenos se planteó la posibilidad de que este fitoestrógeno afecte las células cancerosas de cánceres que son estrógenos dependientes o sensibles, ejerciendo un efecto citotóxico. En el presente trabajo se planteó la pregunta ¿La daidzeína tendrá efectos citotóxicos en células de cánceres estrógeno-dependientes, como el cervicouterino?

4. HIPÓTESIS

La daidzeína será capaz de afectar el potencial proliferativo de las células cancerosas estrógeno-dependientes o sensibles del cérvix uterino, ejerciendo su efecto citotóxico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Determinar el efecto citotóxico del fitoestrógeno daidzeína sobre las células HeLa de cáncer cérvico uterino humano.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto citotóxico de la daidzeína sola y en combinación con el estradiol, a diferentes tiempos de exposición, sobre la proliferación de las células HeLa.

- Determinar los cambios morfológicos en las células HeLa expuestas a la daidzeína sola o en combinación con el estradiol a diferentes tiempos de exposición.

6.MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental

Se trabajó con daidzeína, un fitoestrógeno obtenido de la soya (*Glycine max*) donado por la Dra. Juana Enríquez, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ; el material y la línea celular HeLa fueron aportados por la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes del Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY. Para alcanzar los objetivos de este estudio se planteó un modelo trifactorial de efectos fijos (Díaz, 2009) teniendo como factor principal la concentración del fitofármaco empleando las siguientes concentraciones: 25 μM , 50 μM , 100 μM . Se consideraron dos grupos controles, los cuales fueron uno negativo, con una concentración nula de daidzeína y uno positivo para citotoxicidad, donde se adicionaron 10 μL de DMSO como agente citotóxico (Marlen *et al.*, 2014), como segundo factor se encuentran dos niveles siendo unos con 0 nM de estradiol y otro con 10 nM de estradiol, por ultimo el tercer factor siendo el tiempo de exposicion con el tratamiendo siendo 3 niveles 24, 48 y 72 h.

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado, los datos obtenidos se analizaron por medio de un ANOVA multifactorial de 3 vías, con un $\alpha = 0.05$ posteriormente, los datos fueron analizados con la prueba estadística Post- Hoc Tukey con un $\alpha = 0.05$ utilizando el software R (4.1.3). Los datos fueron graficados por el software STATISTICA (8.0).

6.2. Preparación del Suero Fetal Bovino (SFB) libre de hormonas esteroideas

Para eliminar los estrógenos endógenos presentes en el suero fetal bovino (SFB), éste se depletó de estrógenos de acuerdo a un procedimiento previamente reportado (Darbre *et al.*, 1983). Para ello, se usó una suspensión compuesta de 250 mg de carbón activado y 25 mg de dextran 70 en 5 mL de solución salina, en una parrilla de agitación constante por 8 h a una temperatura de 5 °C. Pasada la agitación, la mezcla se pasó a un tubo cónico de 15 mL para ser centrifugado a 1200 rpm por 10 min a 5 °C, el sobrenadante se descartó y el botón se disolvió en 5 mL de SFB. La mezcla del carbón, dextran y el SFB se vertieron en un vaso de

precipitados de 15 mL y se agitó de manera continua durante 24 h a 5 °C. Pasado el tiempo, se centrifugo a 1200 rpm por 10 min a 5 °C y el sobrenadante se filtró por una membrana de celulosa de 0.22 µm de diámetro de poro para retirar todo lo posible agente contaminante y restos del carbón activado y dextran 70. Este procedimiento se realizó en una cabina de bioseguridad tipo IIA, (Air Science, AHA-143-BA-A, MID., USA.).

6.3. Cultivo y mantenimiento de células HeLa

Este proceso se inició descongelando la línea celular HeLa siguiendo el protocolo base, el cual consiste en descongelar los viales de las células en un baño térmico a una temperatura de 37 °C. Una vez descongeladas las células, se centrifugaron a 25 °C durante 10 min a 1200 rpm. El botón celular se recuperó y resuspendió en medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado con 1% de SFB depletado de estrógenos y 1% de una solución de antibiótico y antimicótico (penicilina-estreptomicina 1x y anfotericina B 1%) (Gercel-Taylor *et al.*, 2004).

Las células se sembraron en botellas de cultivo T-25 y se incubaron a 37 °C en una atmosfera de 5% CO₂ en aire y se permitió que las células alcanzarán 80 – 90% de confluencia. El medio se recambio por medio fresco cada tercer día.

6.4. Estudio de citotoxicidad sobre la línea celular HeLa

Las células HeLa se sembraron en una densidad de 3000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos y se incubaron a 37 °C, en una atmosfera de 5% CO₂ durante 24 h para permitir la adherencia de las células. Al final de este periodo, las células se incubaron con diferentes concentraciones (25 µM, 50 µM y 100 µM) de daidzeína durante 24, 48 y 72 h. Experimentos en paralelo se realizaron con células HeLa incubadas con 25 µM, 50 µM o 100 µM de daidzeína en presencia de 10 nM de estradiol por 24, 48 y 72 h [Figura 8]. Al termino de cada periodo, se adicionó 30 µL del reactivo CellTiter Blue (alamar Blue) y se incubaron por 6 h adicionales. Finalmente, alícuotas de 100 µL se colectaron del medio de cultivo y se determinó la densidad del color generado a 570 nm en un lector de placas (BioTek, Cytation 3, MID., USA.), como ha sido reportado previamente (Martin-Pat *et al.*, 2020).

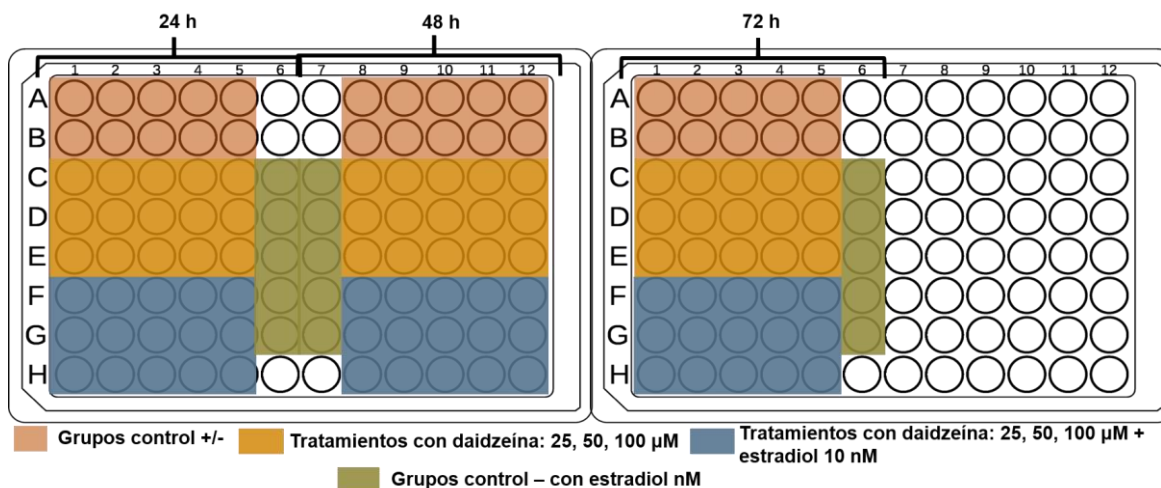


Figura 8. Diseño experimental en una placa de 96 pozos.

La citotoxicidad celular se determinó con la siguiente fórmula modificando la original que era para obtener el valor porcentual de la viabilidad celular (Veciana Galindo *et al.*, 2014):

$$C\% = -1 \left[\left(\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control sin estímulo}} \right) \times 100 \right] + 100$$

6.5. Evaluación de los cambios morfológicos inducidos por la daidzeína en células HeLa.

Los cambios morfológicos en las células HeLa de cáncer cervicouterino expuestas a daidzeína, fueron teñidas con cristal violeta como ha sido previamente reportado (Feoktistova *et al.*, 2016). En breve, el medio de cultivo se removió y se lavaron las células con 100 µL de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, Phosphate-buffered saline) agitando manualmente de manera oscilatoria. Se retiró la solución PBS y se adicionó 100 µL de etanol al 70% y se incubó a 25 °C por 5 min. Posteriormente se retiró el alcohol y el excedente se retiró por evaporación a 25 °C durante 25 min, luego se adicionó 50 µL de la solución 25 mg/mL de colorante cristal violeta y se incubó por 5 min. Finalmente, se retiró el colorante y el excedente con lavados de agua destilada [Figura 9].

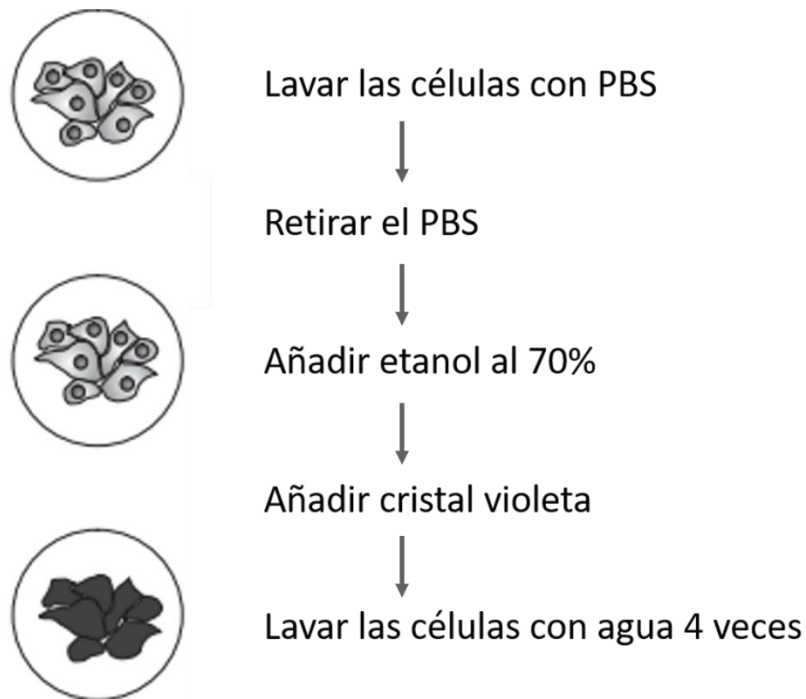


Figura 9. Metodología de la tinción con cristal violeta. Esta tinción citológica permite la visualización de la morfología de las células, (Feoktistova *et al.*, 2016).

Una vez ya terminado el proceso de tinción cada uno de los tratamientos fueron observados en un microscopio invertido de alto contraste (LABOMED, TCM 400, MID., USA.) tomando como punto de enfoque la parte central de cada uno de los pozos para poder ser capturados en formato de imagen PNG por la cámara integrada del microscopio (LABOMED, IVU 5000, MID., USA.) y siendo procesadas cada una de las fotografías por el software ProRes CapturePRO (2.8.8.5). Las imágenes fueron capturadas en dos aumentos principales para su evaluación morfológica (10x y 40x) teniendo como referencia principal de morfotipo al grupo control negativo, y evaluando los detalles morfológicos respecto a la tabla presente en la ISO 10993-5 para la evaluación de citotoxicidad [figura 10].

Grados de citotoxicidad	Reactividad	Células redondas	Gránulos intra-citoplasmáticos	Lisis celular	Cambios morfológicos	Inhibición del crecimiento	Capas celulares dañadas
G0	Ninguna	X	X	X	X	X	X
G1	Escasa	20 %	X	Escasa	X	Escasa	X
G2	Leve	50 %	X	Escasa	X	50 %	X
G3	Moderada	70 %	si	70 %	si	> 50 %	si
G4	Severa	100 %	si	100%	si	> 90%	si

Figura 10. Características para la evaluación de citotóxica respecto a la evaluación morfológica de muestras celulares de acuerdo a la ISO10993-5.

7.RESULTADOS

7.1. Efecto citotóxico de la daidzeína sobre las células HeLa

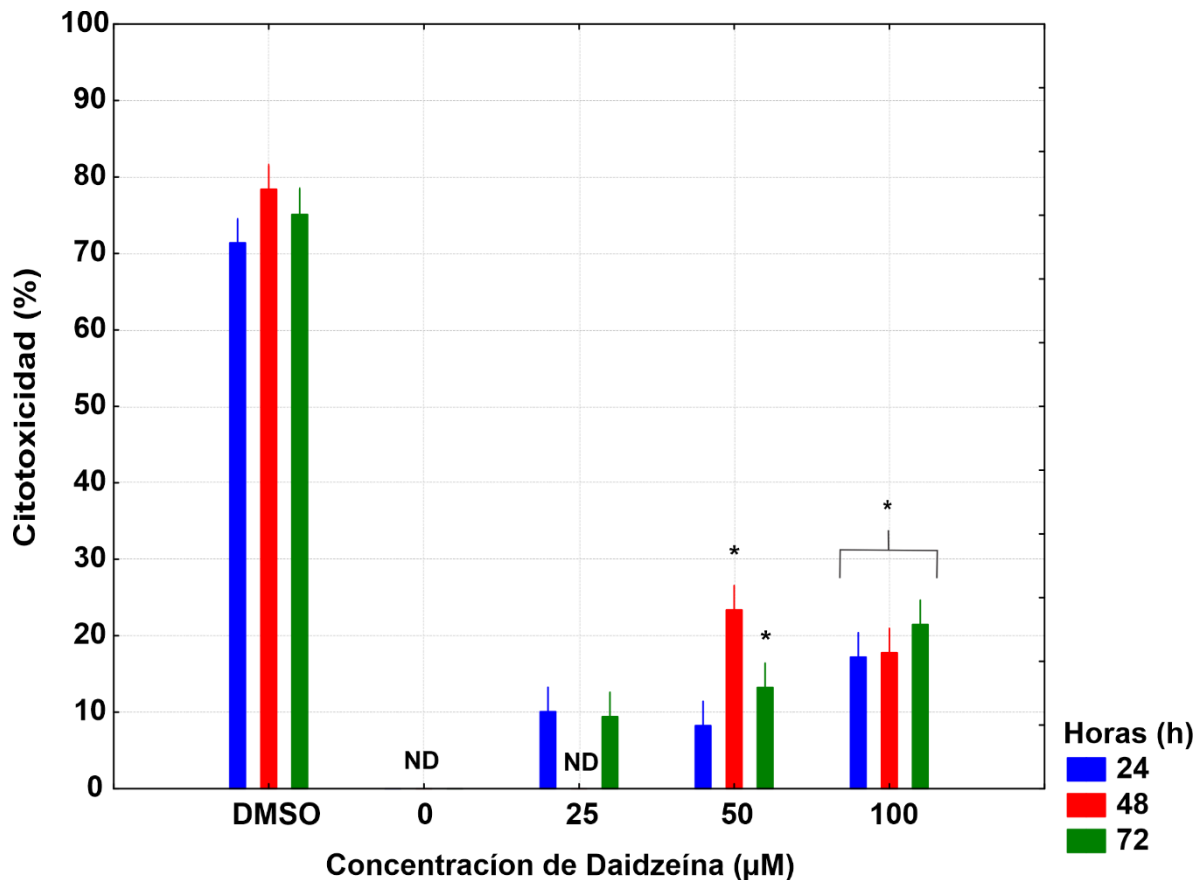
Los efectos citotóxicos de la daidzeína sobre los cultivos celulares de células HeLa en presencia o ausencia de estradiol se determinaron por espectrofotometría, a partir de la absorbancia de cada muestra se calculó el porcentaje de citotoxicidad respecto al control (células incubadas solo con el medio de cultivo), los resultados se muestran en la tabla 2. Para validar la prueba estadística se analizaron las diferentes variables para conocer su comportamiento, los datos de este análisis se encuentran en el anexo.

Tabla 2. Citotoxicidad de la daidzeína sobre células HeLa.

	Concentración de Daidzeína	24 h	48 h	72 h
		Promedio (%)	Promedio (%)	Promedio (%)
SIN ESTRADIOL	DMSO	71.4 ± 3.3	78.4 ± 1.5	75.1 ± 0.4
	0 µM	0	0	0
	25 µM	10.1 ± 6.7	0	9.4 ± 6.5
	50 µM	8.2 ± 3.9	23.4 ± 5.7	13.2 ± 6.3
	100 µM	17.2 ± 2.8	17.8 ± 3.0	21.5 ± 5.1
CON ESTRADIOL (10 nM)	DMSO	71.4 ± 3.3	78.4 ± 1.5	75.1 ± 0.4
	0 µM	0	0	0
	25 µM	13.5 ± 6.7	0	26.9 ± 5.3
	50 µM	6.1 ± 4.3	6.1 ± 4.0	6.7 ± 3.4
	100 µM	21.2 ± 2.8	32.4 ± 1.7	24.5 ± 5.9

A partir de los valores de porcentaje de citotoxicidad se obtuvieron diversas gráficas para evaluar el efecto de la daidzeína sobre los cultivos celulares. En la gráfica 1, los resultados demuestran que la daidzeína tiene un efecto citotóxico sobre las células HeLa que fue dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento, alcanzando $21.5 \pm 5.1\%$ de citotoxicidad en las células incubadas durante 72 h con la elevada concentración de 100 µM de daidzeína sin estradiol. Interesantemente el tratamiento de las células con 50 µM de daidzeína durante 48 h produjo un mayor efecto citotóxico que alcanzo el valor máximo de $23.4 \pm 5.7\%$. El tratamiento de las células HeLa con la baja concentración de 25 µM de

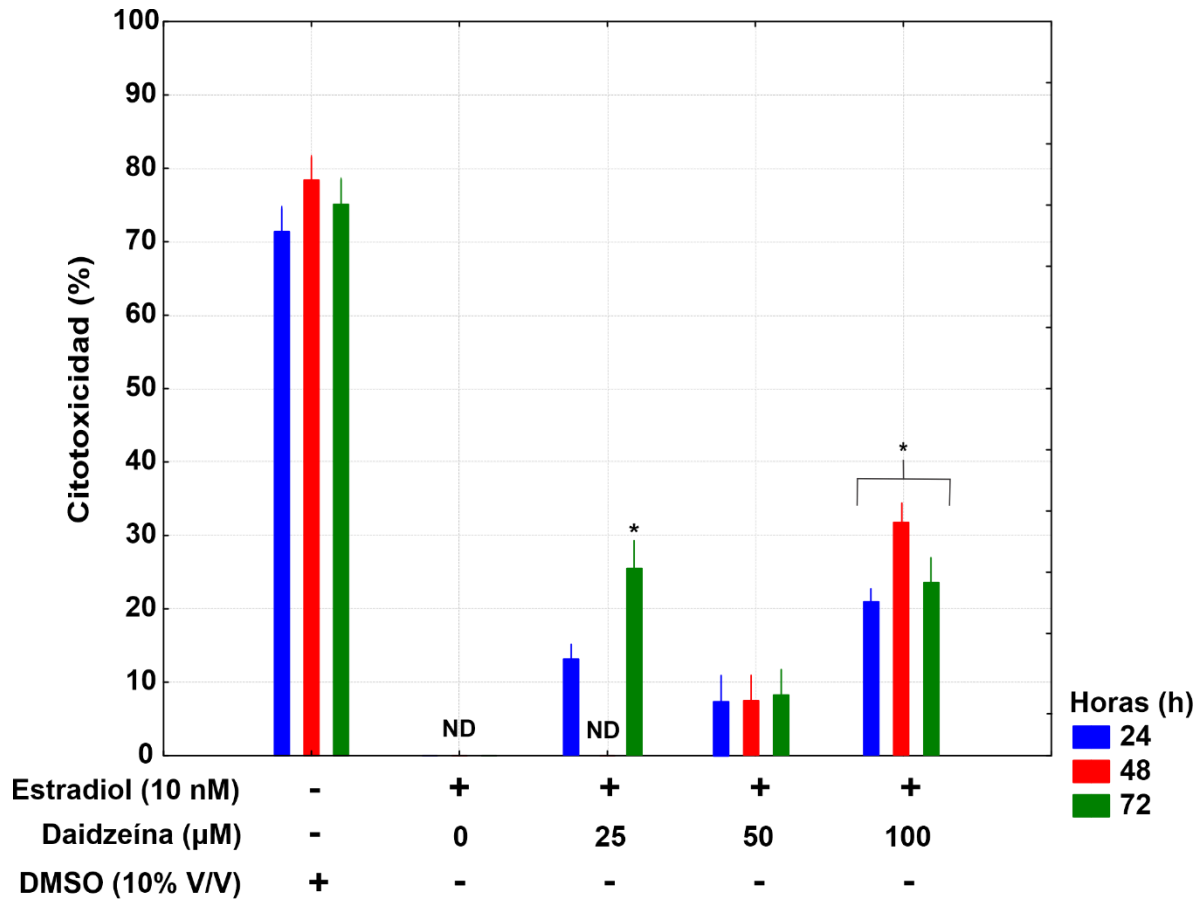
daidzeína, no indujo ningún efecto citotóxico, ni aun por largos periodos de tratamiento (72 h).



Grafica 1. Efecto de la daidzeína en diferentes tiempos de exposición. * $p < 0.05$. Todos los tratamientos fueron significativamente diferentes respecto al tratamiento con 0 µM de daidzeína, ND: No detectado.

7.2. Efecto citotóxico de la daidzeína sobre las células HeLa expuestas a estradiol

El efecto citotóxico de las células HeLa tratadas con diferentes concentraciones de daidzeína en combinación con 10 nM de estradiol durante 24, 48 y 72 h se muestra en la gráfica 2. Los resultados demuestran que la daidzeína contrarrestó e inhibió el efecto proliferativo del estradiol e indujo citotoxicidad en las células. El efecto citotóxico inducido por daidzeína fue evidente en la máxima concentración de 100 nM del fitoestrógeno, después de 24 h de exposición ($32.4 \pm 1.7\%$).



Grafica 2. Efecto de la daidzeína en combinación con el estradiol en diferentes tiempos de exposición. * $p < 0.05$. Todos los tratamientos fueron significativamente diferentes respecto al tratamiento con 0 μM de daidzeína, ND: No detectado.

7.3. Cambios morfológicos de las células HeLa tratadas con daidzeína

Los cambios morfológicos de las células HeLa tratadas con concentraciones crecientes de daidzeína durante diferentes periodos de tiempo se muestran en la figura 9. Los resultados demuestran, cambios negativos en el número de células HeLa y una disminución evidente del contacto célula-célula. Los efectos fueron dependientes de la concentración de la daidzeína y del tiempo de tratamiento. Las células expuestas al fitoestrógeno mostraron numerosos gránulos intracelulares y retracción de proyecciones celulares (filopodios), indicativo de citotoxicidad moderada (G3) de acuerdo a la Norma ISO 10993-5.

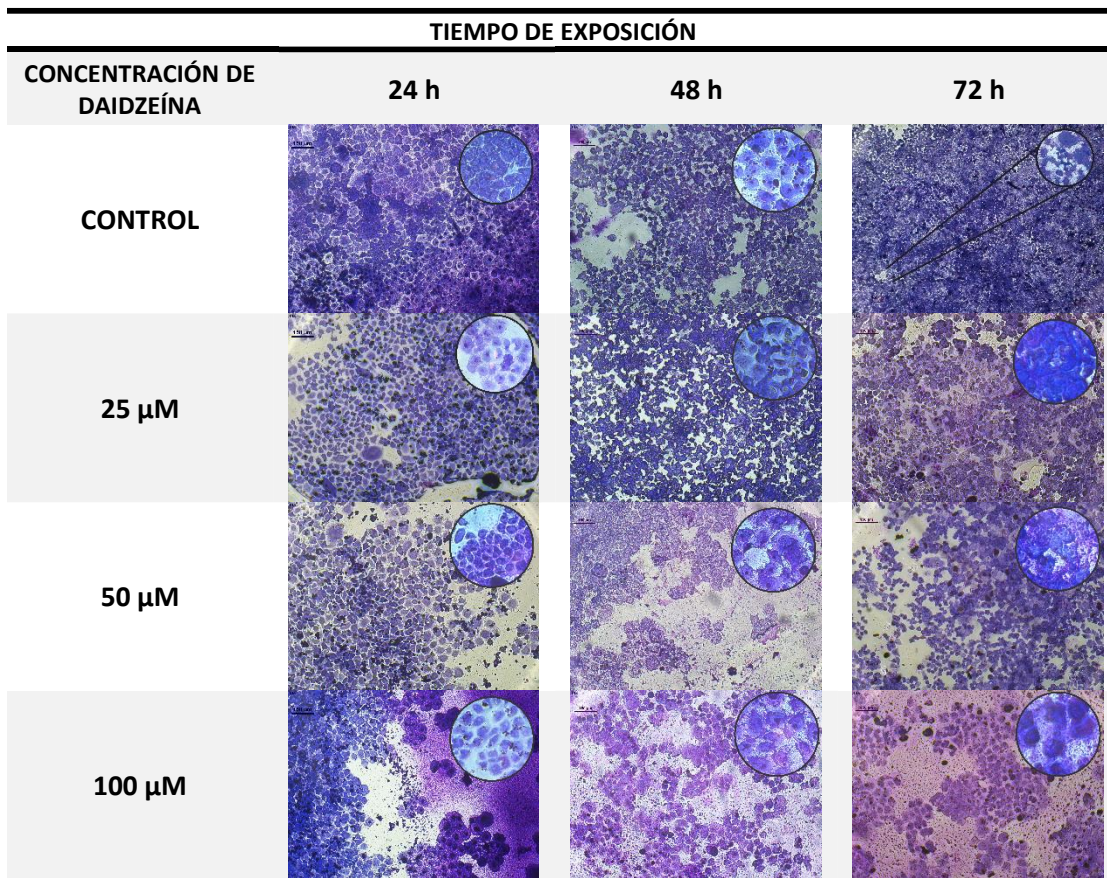


Figura 9. Morfología celular en función de la presencia de daidzeína. Comparación microscópica de los tratamientos con 25, 50 y 100 μM de daidzeína en tres diferentes tiempos (24, 48 y 72 h), teñidos con cristal violeta. Inserto: aumento de 10X y 40X en una forma circular ubicada en la parte superior derecha.

7.4. Cambios morfológicos de las células HeLa tratadas con daidzeína combinada con estradiol

En la figura 10 se muestran los cambios morfológicos de las células HeLa tratadas con concentraciones crecientes de daidzeína en combinación con 10 nM de estradiol. Las imágenes muestran cambios en la población de las células HeLa tratadas con estradiol, observándose la disminución en la densidad celular y la pérdida del contacto célula-célula. Tales cambios fueron dependientes de la concentración de daidzeína y del tiempo del tratamiento, indicando que el fitoestrógeno es capaz de antagonizar o inhibir el efecto proliferativo del estradiol e

inducir efectos citotóxicos en las células tratadas con estradiol, impidiendo su proliferación.

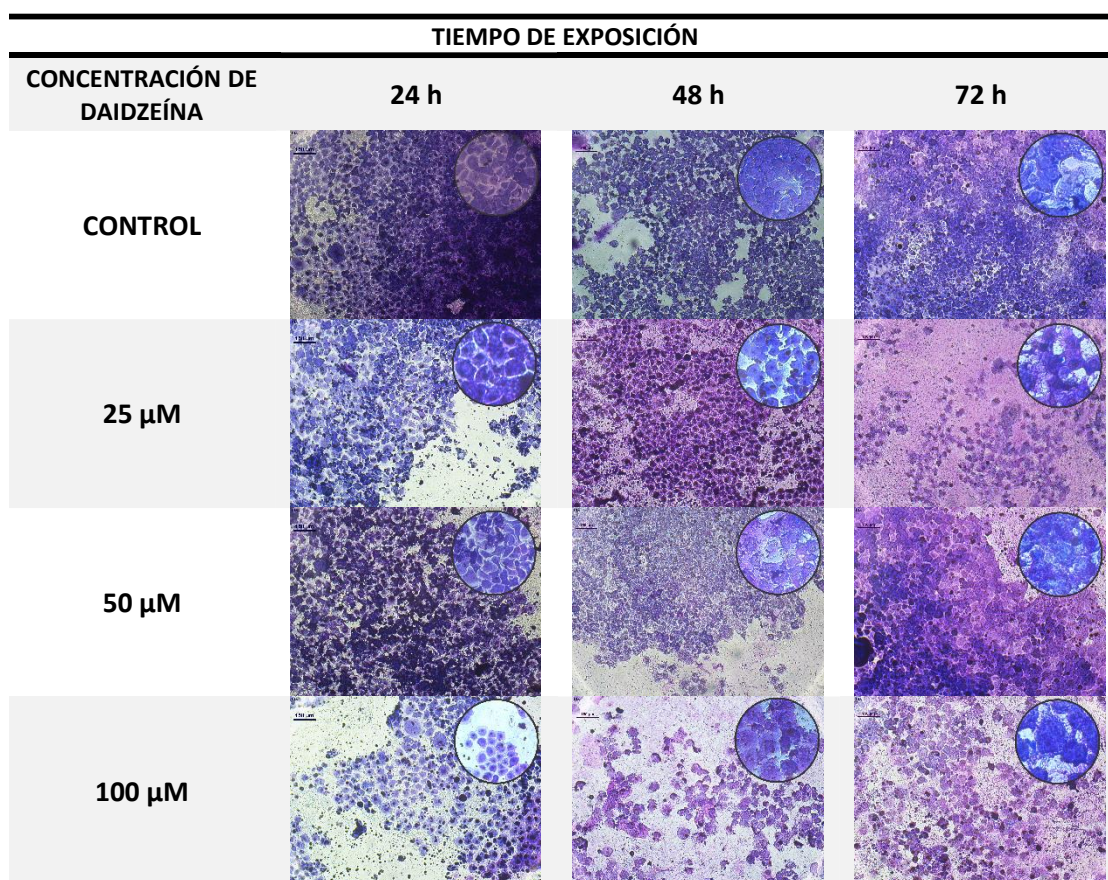


Figura 10. Morfología celular en función de la presencia de daidzeína con estradiol. Comparación microscópica de los tratamientos con 25, 50 y 100 µM de daidzeína con estradiol en tres diferentes tiempos (24, 48 y 72 h), teñidos con cristal violeta. Inserto captura en un aumento de 10X y 40X en una forma circular ubicada en la parte superior derecha.

Adicionalmente, para poder apreciar a mayor detalle el efecto cuantitativo (citotoxicidad por alamar blue) y el efecto cualitativo y morfológico de la daidzeína sobre la línea celular HeLa (cristal violeta), se observaron a un mayor aumento las células expuestas a 25 µM de daidzeína sin estradiol a 24 y 48 h [Figura 11], con lo cual se demostró que, aunque no hay presencia de citotoxicidad en el tratamiento de 48 h la morfología celular se vio comprometida, mostrando células más compactas en tamaño y con presencia de pequeños gránulos intracelulares,

infiriendo que este mismo efecto podría haber sido el causante de la muerte celular observable a las siguientes 24 h.

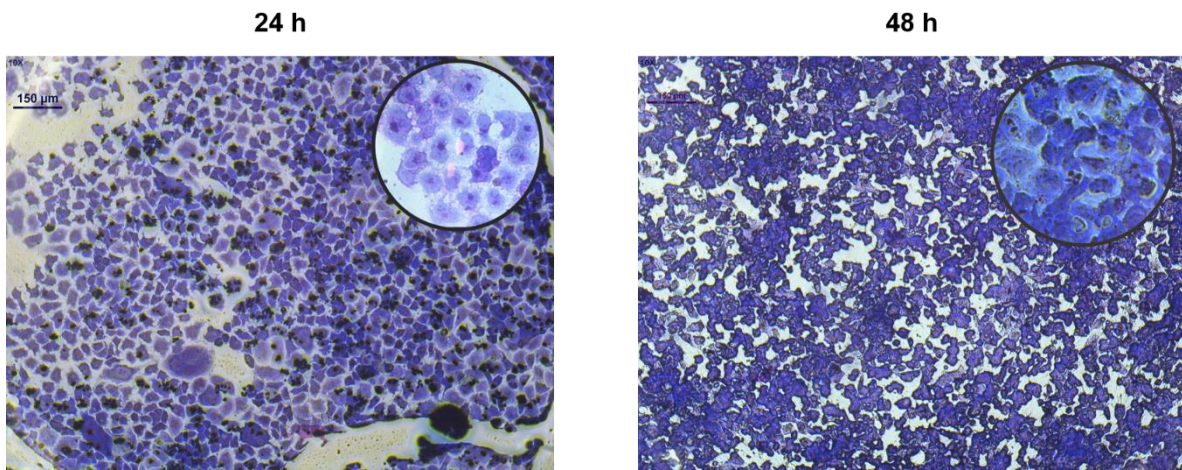


Figura 11. Tratamiento de células HeLa con 25 μM de daidzeína sin estradiol en dos diferentes tiempos de exposición (24 y 48 h).

8.DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que la daidzeína tiene un efecto citotóxico en las células de cáncer cervicouterino. Tales observaciones están en línea con los resultados del estudio de Jin *et al.*, que demuestran que el tratamiento con una concentración de 100 μM de daidzeína induce la apoptosis en las células de cáncer mamario estrógeno dependiente MCF-7 alrededor del 30% siendo el valor más alto representando (Jin *et al.*, 2010).

Cuando la daidzeína se combinó con estradiol, se observó un efecto sinérgico sobre la línea celular de cáncer HeLa, mostrando un mayor incremento en la citotoxicidad respecto a los cultivos sin estradiol. Este comportamiento es congruente con estudios previamente reportados, en los que se ha descrito que esteroides como el estradiol pueden llegar a mediar la regulación y la expresión de receptores de estrógeno α y β (Sato *et al.*, 2004), en este sentido, la dinámica entre el RE α/β y el fitoestrógeno regulan el ciclo celular, lo que podría explicar que a altas concentraciones de daidzeína, se observara un mayor efecto citotóxico en células ER positivas como ha sido reportado (Guo *et al.*, 2004).

De manera interesante, cuando las células fueron incubadas con daidzeína y estradiol, se observó una alta citotoxicidad a 25 μM y 100 μM (30%), sin embargo, en la concentración de 50 μM con estradiol, a todos los tiempos analizados (24, 48 y 72 h) se observó una citotoxicidad menor (10%), este comportamiento ha sido previamente reportado en experimentos *in vivo* en ratas, en los cuales se demostró que la administración de 0.066 mg/kg de daidzeína y 0.33 mg/kg de estradiol, estimuló la división celular, llegando a la hipertrofia en tejido uterino en los roedores (Gaete *et al.*, 2012). Además, estudios realizados por Mahfoudi, y cols. sugieren que este comportamiento irregular respecto al efecto citotóxico que tiene la daidzeína ante las células HeLa (alta citotoxicidad a concentraciones bajas y altas, y baja citotoxicidad a concentraciones medias) puede deberse a que la línea celular utilizada en el presente trabajo de tesis sea positiva para ER α y β , por lo que exhibirá una dinámica de viabilidad para las células que tienen la interacción estrógenos-ER α y de apoptosis para las que tienen la unión

estrógenos–Er β (Mahfoudi *et al.*, 1995). En este sentido, las células ER positivas pudieran estar acelerando su metabolismo celular a concentraciones medias de daidzeína (50 μ M) por lo que elevan su viabilidad y en consecuencia, disminuyen su apoptosis. Este comportamiento ha sido considerado como un indicador pro-apoptótico de la síntesis de la proteína BAX como ha sido previamente reportado (Singh *et al.*, 2008).

Llegando al análisis del efecto citotóxico de la daidzeína y de acuerdo a la ISO 10993-5, solo los tratamientos que presentaron una citotoxicidad celular >30% son considerados como citotóxicos, por lo que solo el tratamiento de 100 μ M de daidzeína con estradiol (10 nM) a 48 h de exposición puede considerarse citotóxico con la línea celular HeLa de cáncer cervicouterino con una citotoxicidad de 32.4%, esto se debe ya que gracias a la modulación que puede presentar la daidzeína con el estradiol generan un efecto sinérgico en la unión a los receptores de estrógeno presentes en las células HeLa, por lo que en una exposición más prolongada puede llevar acabo la unión de estos compuestos a los receptores generando una activación prolongada de las vías de señalización relacionadas con la inducción de apoptosis, o muerte celular programada, mismas vías pueden ser ejemplificadas con la activación de genes como BAX, BCL-2 y CASP9 los cuales están presentes en concentraciones de 100 μ M de daidzeína (Jin *et al.*, 2010).

Por otro lado la exposición combinada de células cancerosas cervicouterinas a la daidzeína y el estradiol condujeron a una mayor alteración en la forma y el tamaño celular en comparación con la exposición a cada compuesto por separado, esto se debe a la modulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta entre los receptores de estrógeno Er α y ER β dichos receptores implicados en la expresión de genes que conllevan a la división celular o apoptosis, sin embargo esto mismo podría contribuir a alteraciones en la morfología celular observadas en estas células, ya que podrían verse afectados por parte de redes genéticas, genes como ACTg1 relacionados a la actina o genes RHO relacionados a la organización del citoesqueleto (Iqbal, *et al.* 2020), (Nwannenna, *et al.* 1995).

9. PERSPECTIVAS

Se recomienda evaluar las células en concentraciones mayores de daidzeína, con la finalidad de averiguar si existe un mejor desempeño del fitoquímico (daidzeína), además, resultaría conveniente evaluar el efecto de la daidzeína en cultivos de células sanas del mismo tejido (cuello uterino) para saber el efecto que tiene el mismo fitoestrógeno en un tejido sano y poder encontrar una concentración media que afecte negativamente el cáncer sin alterar las células sanas adyacentes de un organismo.

10.CONCLUSIONES

Existe una correlación directa respecto a la citotoxicidad celular y la concentración de daidzeína, siendo que a mayor concentración del fitoestrógeno la citotoxicidad se vio aumentada. Adicionalmente, la incorporación de un estrógeno humano, como el estradiol, promovió un mayor aumento en la citotoxicidad celular. Del mismo modo, el tiempo de exposición a la daidzeína con o sin estradiol, afecto positivamente la citotoxicidad, pues a mayores tiempos de exposición del fitofármaco, se induce la citotoxicidad celular. La co-exposición a la daidzeína y el estradiol produjo cambios morfológicos evidentes en las células cancerosas cervicouterinas, incluyendo alteraciones en la forma, tamaño, lo que podría indicar una interferencia en la proliferación y la adhesión celular. La combinación de la daidzeína y el estradiol parece desencadenar respuestas a nivel genético y de señalización que afectan directamente la morfología celular, añadiendo un aspecto adicional a la inhibición del crecimiento observada.

De manera interesante, la combinación de estos compuestos ha demostrado generar un efecto citotóxico mayor al 30%, lo cual podría tener implicaciones terapéuticas. Además, los cambios morfológicos inducidos por esta combinación apuntan a una interacción compleja que afecta directamente la biología celular de las células HeLa. Aunque se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes, estos hallazgos respaldan la posibilidad de utilizar la daidzeína en combinación con el estradiol como una estrategia potencial en el tratamiento y manejo del cáncer cervicouterino.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahmad, A. (2017). Introduction to cancer metastasis. In: Academic Press.
- Alshehri, M. M., Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Jara, E. L., Salazar, L. A., Kregiel, D., . . . Cho, W. C. (2021). Therapeutic Potential of Isoflavones with an Emphasis on Daidzein. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 6331630.
<https://doi.org/10.1155/2021/6331630>
- Atiq, A., Shal, B., Naveed, M., Khan, A., Ali, J., Zeeshan, S., . . . Khan, S. (2019). Daidzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. *European journal of pharmacology*, 843, 292-306.
- Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F., & Pujol, P. (2004). Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11(3), 537-551. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00800>
- Bardin, A., Hoffmann, P., Boulle, N., Katsaros, D., Vignon, F., Pujol, P., & Lazennec, G. (2004). Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*, 64(16), 5861-5869.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0552>
- Barnes, S. (1997). The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 46(2-3), 169-179.
<https://doi.org/10.1023/a:1005956326155>
- BTA, B. T. d. A. (2020). *Nuevas terapias en oncología: revisión descriptiva*. Boletín Terapéutico de Andalucía (BTA). Retrieved 31 Agosto from https://cadime.es/images/documentos_archivos_web/BTA/2020/CADIME_BTA_2020_35_03.pdf
- Carroll, J. S., & Brown, M. (2006). Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*, 20(8), 1707-1714.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0334>
- Cassidy, A. (2003). Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *International Journal for Vitamin Nutrition Research*, 73(2), 120-126.

- Cella, D. F., & Tulskey, D. S. (1993). Quality of life in cancer: definition, purpose, and method of measurement. *Cancer Invest*, 11(3), 327-336.
<https://doi.org/10.3109/07357909309024860>
- Choi, E. J., & Kim, G. H. (2008). Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. *Phytomedicine*, 15(9), 683-690.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.04.006>
- Choi, E. J., & Kim, G. H. (2009). Hepatoprotective effects of daidzein against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced oxidative stress in mice. *Int J Mol Med*, 23(5), 659-664. <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000177>
- Choi, E. J., & Kim, G. H. (2013). Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ERalpha/c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 7(3), 781-784. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1283>
- Darbre, P., Yates, J., Curtis, S., & King, R. J. (1983). Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res*, 43(1), 349-354.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6847777>
- Dávila, J. T., & Garrán, A. D. T. J. G. y. O. d. M. (2005). Selective estrogen receptors modulators (SERMs): biochemistry, pharmacology, and clinical use in gynecology. 73(08), 424-435.
- De Cáceres, M., Ruiz, F., Germà, J., & Carlota, C. (2007). *Manual para el paciente oncológico y su familia*. Sociedad Española Oncologica Medica.
- De la Garza Salazar, J. G., & Juárez Sánchez, P. (2013). *El cáncer* (1 ed., Vol. 1). Universidad Autonoma de Nuevo León
- Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos* (2 ed., Vol. 1). Universidad de Antioquia.
- Dixon, R. A. (2004). Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 225-261.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141729>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), pdb prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

- Gaete, L., Tchernitchin, A. N., Bustamante, R., Villena, J., Lemus, I., Gidekel, M., . . . Astorga, P. (2012). Daidzein-estrogen interaction in the rat uterus and its effect on human breast cancer cell growth. *J Med Food*, *15*(12), 1081-1090. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0322>
- Gercel-Taylor, C., Feitelson, A. K., & Taylor, D. D. (2004). Inhibitory effect of genistein and daidzein on ovarian cancer cell growth. *Anticancer Res*, *24*(2B), 795-800. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161029>
- Gundogdu, G., Dodurga, Y., Cetin, M., Secme, M., & Cicek, B. (2020). The cytotoxic and genotoxic effects of daidzein on MIA PaCa-2 human pancreatic carcinoma cells and HT-29 human colon cancer cells. *Drug Chem Toxicol*, *43*(6), 581-587. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1527849>
- Guo, J. M., Kang, G. Z., Xiao, B. X., Liu, D. H., & Zhang, S. (2004). Effect of daidzein on cell growth, cell cycle, and telomerase activity of human cervical cancer in vitro. *Int J Gynecol Cancer*, *14*(5), 882-888. <https://doi.org/10.1111/j.1048-891X.2004.14525.x>
- Hajirahimkhan, A., Dietz, B. M., & Bolton, J. L. (2013). Botanical modulation of menopausal symptoms: mechanisms of action? *Planta Med*, *79*(7), 538-553. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328187>
- Hannoun-Levi, J. M. (2005). [Treatment of breast and uterus cancer: physiological and psychological impact on sexual function]. *Cancer Radiother*, *9*(3), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2004.11.005> (Traitement du cancer du sein et de l'uterus: impact physiologique et psychologique sur la fonction sexuelle.)
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., . . . Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, *5*(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Henley, S. J., Miller, J. W., Dowling, N. F., Benard, V. B., & Richardson, L. C. (2018). Uterine Cancer Incidence and Mortality - United States, 1999-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *67*(48), 1333-1338. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6748a1>

- INEGI. (2021). Características de las defunciones registradas en México. 48.
https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSocio/demo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf
- INMUJERES. (2017). Cáncer de mama y cérvico-uterino. 3.
http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/cama_cacu.pdf
- Iqbal, J., Tan, Z. N., Li, M. X., Chen, H. B., Ma, B., Zhou, X., & Ma, X. M. (2020). Estradiol alters hippocampal gene expression during the estrous cycle. *Endocrine research*, 45(2), 84-101.
<https://doi.org/10.1080/07435800.2019.1674868>
- Jin, S., Zhang, Q. Y., Kang, X. M., Wang, J. X., & Zhao, W. H. (2010). Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol*, 21(2), 263-268. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp499>
- Jing, Y., Nakaya, K., & Han, R. (1993). Differentiation of promyelocytic leukemia cells HL-60 induced by daidzein in vitro and in vivo. *Anticancer Res*, 13(4), 1049-1054. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8352524>
- Jordan, V. C. (2003). Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature reviews Drug discovery*, 2(3), 205-213.
- Karn, A., Jha, A., Shrestha, S., Acharya, B., Poudel, S., & Bhandari, R. (2010). Tamoxifen for breast cancer. *Survival*, 11, 12.
- Kloos, I., Delaloge, S., Pautier, P., Di Palma, M., Goupil, A., Duvillard, P., . . . Lhomme, C. (2002). Tamoxifen-related uterine carcinosarcomas occur under/after prolonged treatment: report of five cases and review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*, 12(5), 496-500.
<https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2002.01134.x>
- Lian, Z., Niwa, K., Tagami, K., Hashimoto, M., Gao, J., Yokoyama, Y., . . . Tamaya, T. (2001). Preventive effects of isoflavones, genistein and daidzein, on estradiol-17beta-related endometrial carcinogenesis in mice. *Jpn J Cancer Res*, 92(7), 726-734. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01154.x>
- Liggins, J., Bluck, L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., & Bingham, S. A. (2000). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J Nutr Biochem*, 11(6), 326-331. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(00\)00085-1](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(00)00085-1)

- Liu, X., Suzuki, N., Santosh Laxmi, Y. R., Okamoto, Y., & Shibutani, S. (2012). Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents. *Life Sci*, 91(11-12), 415-419. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.022>
- Mahfoudi, A., Roulet, E., Dauvois, S., Parker, M. G., & Wahli, W. (1995). Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10), 4206-4210. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4206>
- Marlen, S., Sibylle, A., Andr, S., Barbara, N., Birgit, P., Volker, B., & Dagmar-Ulrike, R. (2014). Effects of extracts from *Linum usitatissimum* on cell vitality, proliferation and cytotoxicity in human breast cancer cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(5), 237-245. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5221>
- Martin-Pat, G. E., Rodriguez-Fuentes, N., Cervantes-Uc, J. M., Rosales-Ibanez, R., Carrillo-Escalante, H. J., Ku-Gonzalez, A. F., . . . Hernandez-Sanchez, F. (2020). Effect of different exposure times on physicochemical, mechanical and biological properties of PGS scaffolds treated with plasma of iodine-doped polypyrrole. *J Biomater Appl*, 35(4-5), 485-499. <https://doi.org/10.1177/0885328220941466>
- Mousavi, Y., & Adlercreutz, H. (1993). Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, 58(7), 301-304. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(93\)90088-5](https://doi.org/10.1016/0039-128x(93)90088-5)
- Murakami, A., & Ohigashi, H. (2007). Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*, 121(11), 2357-2363. <https://doi.org/10.1002/ijc.23161>
- Nwannenna, A. I., Lundh, T. J.-O., ..., & Björnhag, G. (1995). Clinical Changes in Ovariectomized Ewes Exposed to Phytoestrogens and 17 β -Estradiol Implants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1), 92-97. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43838>
- Park, H. J., Jeon, Y. K., You, D. H., & Nam, M. J. (2013). Daidzein causes cytochrome c-mediated apoptosis via the Bcl-2 family in human hepatic

- cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 60, 542-549.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.022>
- Rafii, F. (2015). The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol. *Metabolites*, 5(1), 56-73.
<https://doi.org/10.3390/metabo5010056>
- Rietjens, I. M., Sotoca, A. M., Vervoort, J., & Louisse, J. (2013). Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Mol Nutr Food Res*, 57(1), 100-113.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201200439>
- Sathyamoorthy, N., & Wang, T. T. (1997). Differential effects of dietary phytoestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Cancer*, 33(14), 2384-2389. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00303-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00303-1)
- Sato, H., Nishida, S., Tomoyori, H., Sato, M., Ikeda, I., & Imaizumi, K. (2004). Oxysterol regulation of estrogen receptor alpha-mediated gene expression in a transcriptional activation assay system using HeLa cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(8), 1790-1793. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1790>
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., & Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem*, 56(13), 4855-4873. <https://doi.org/10.1021/jf0735073>
- Sirotkin, A. V., & Harrath, A. H. (2014). Phytoestrogens and their effects. *European journal of pharmacology*, 741, 230-236.
- Society, A. C. (2022). *Key Statistics for Endometrial Cancer*. Retrieved 05 Marzo from <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/about/key-statistics.html#:~:text=The%20American%20Cancer%20Society%20estimates,cancers%20of%20the%20uterine%20body>
- Sun, M.-Y., Ye, Y., Xiao, L., Rahman, K., Xia, W., & Zhang, H. (2016). Daidzein: A review of pharmacological effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 13(3), 117-132. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v13i3.15>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. J. C. a. c. j. f. c. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN

- estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *71*(3), 209-249.
- LLC, T. W. (2020). Cáncer de cuello uterino en estadios IA1 y IA2. In (Vol. 3000x2400). Instituto Nacional del Cáncer.
- The Global Cancer Observatory, G. (2021). Mexico - Global Cancer Observatory. 2. Retrieved Enero 5, from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>
- Thompson, L. U., Chen, J. M., Li, T., Strasser-Weippl, K., & Goss, P. E. (2005). Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res*, *11*(10), 3828-3835. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2326>
- Torrens-Mas, M., & Roca, P. (2020). Phytoestrogens for Cancer Prevention and Treatment. *Biology (Basel)*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/biology9120427>.{Torrens-Mas, 2020 #60}
- Traut, H. F., & Papanicolaou, G. N. (1943). Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Cal West Med*, *59*(2), 121-122. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18746585>
- Veciana Galindo, C., Cortes Castell, E., Torro Montell, L., Sirvent Segura, E., Rizo Baeza, M. M., & Gil Guillen, V. (2014). Assessment of cytotoxicity and biosafety of polyphenolic extracts from olive pits. *Nutr Hosp*, *29*(6), 1388-1393. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7141> (Evaluacion de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas.)
- Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, *38*(1), 15-25. <https://doi.org/10.1007/s13318-012-0112-y>
- Wattenberg, L. W. (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*, *45*(1), 1-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3880665>
- Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and

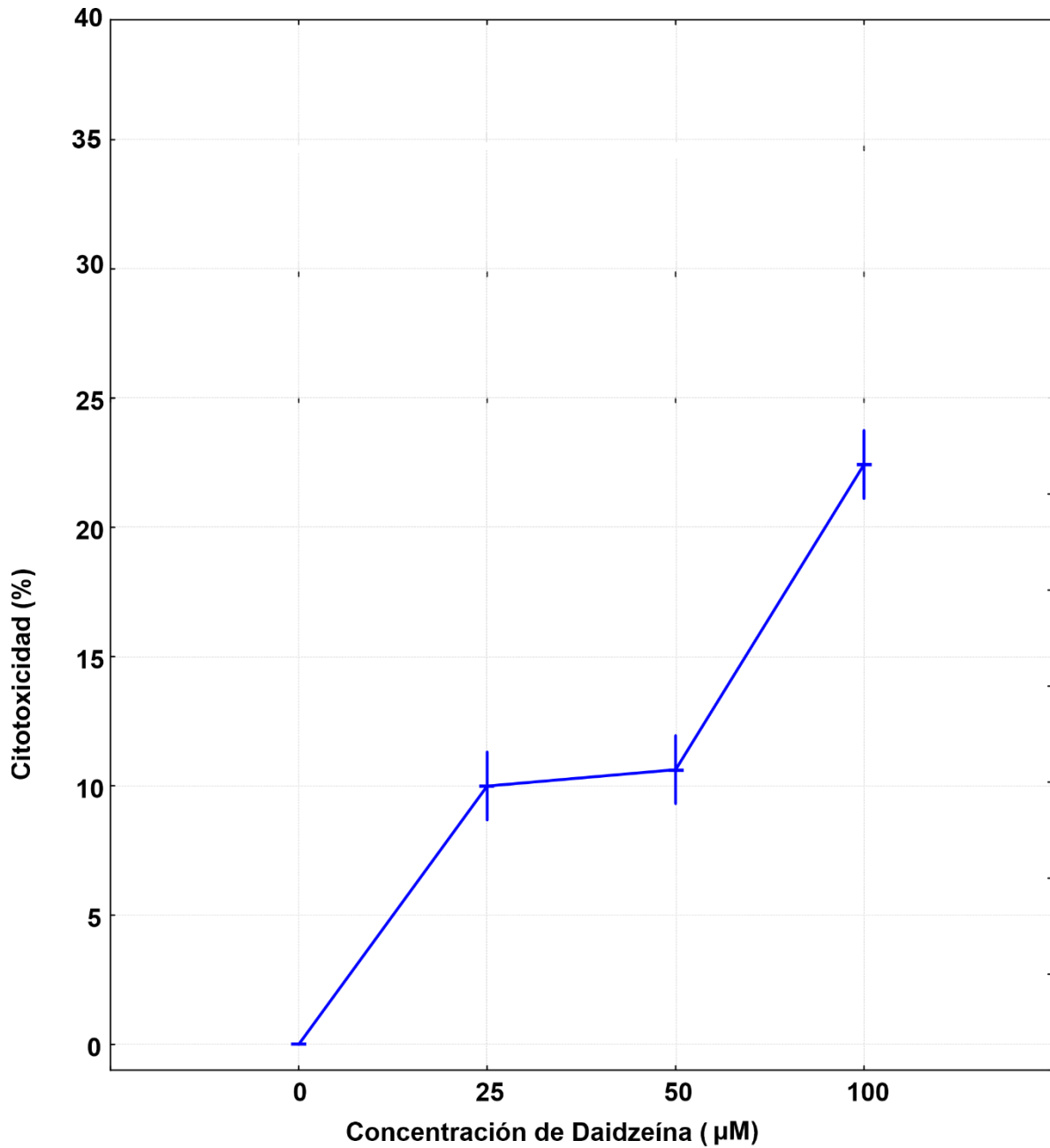
activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr*, 129(2), 399-405. <https://doi.org/10.1093/jn/129.2.399>

12.ANEXOS

12.1. Validación estadística de los datos de citotoxicidad

Los datos obtenidos del análisis de espectrofotometría fueron analizados en el software estadístico R, los datos fueron ejecutados en un análisis de normalidad (Shapiro-Wilk) para conocer el comportamiento de los mismos. Con este análisis se observó que los datos se ajustan a una campana gaussiana por lo que se definieron como normales, por lo que se optó por analizar los datos en ANOVA multifactorial con 95 grados de libertad y 0.05 de α .

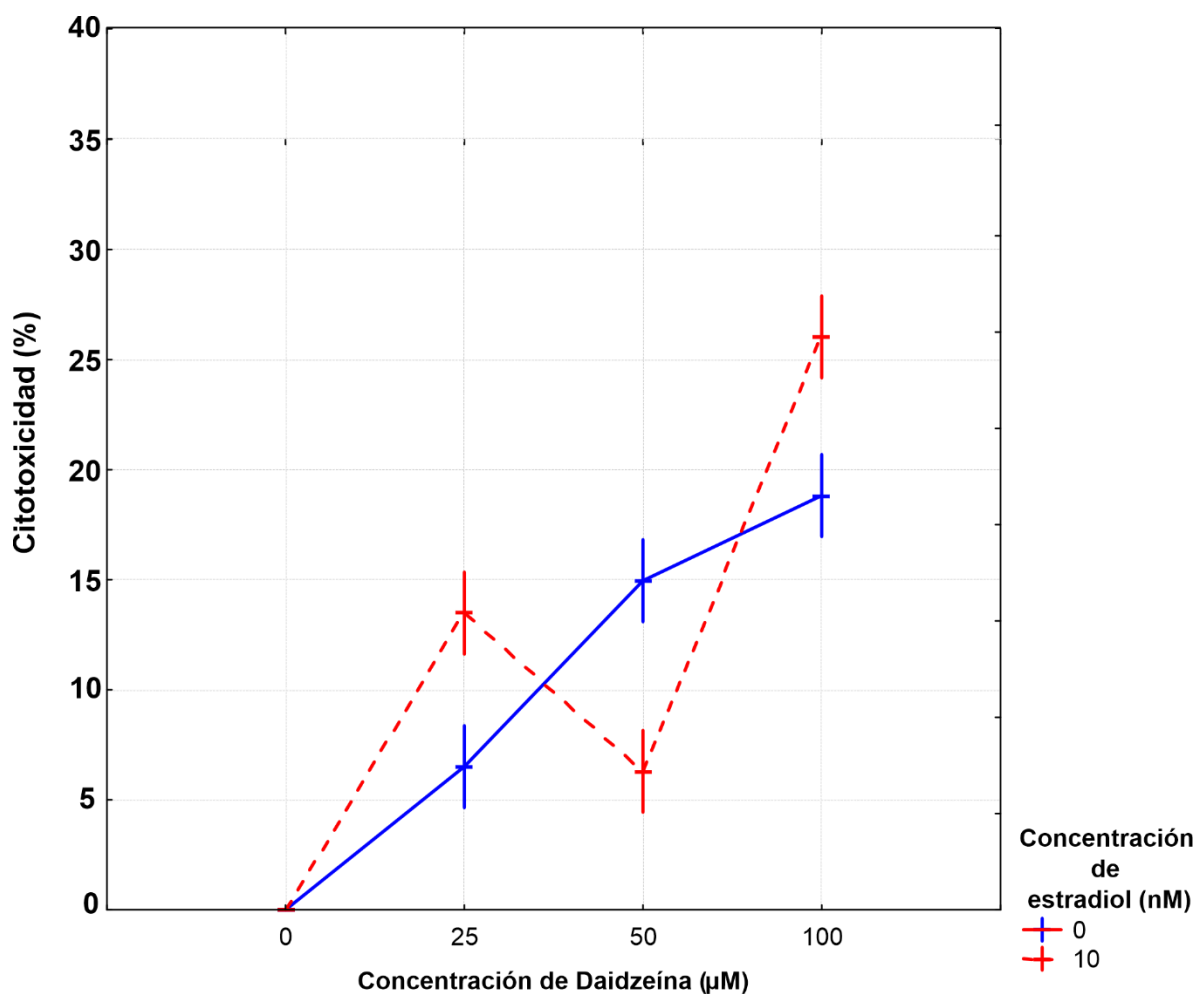
En el análisis de los datos se obtuvieron diferentes graficas principales para comprender como es que la daidzeína afecta la citotoxicidad celular (grafica 3), observando que hay una correlación directa entre la concentración de daidzeína y la citotoxicidad celular siendo que a mayor concentración del fitoestrógeno se ve aumentada hasta un 22.5%.



Grafica 3. Efecto de la daidzeína en diferentes concentraciones vs la citotoxicidad. Los datos fueron analizados en un ANOVA multifactorial, el cual considera el efecto de la concentración de daidzeína independientemente del tiempo de exposición y de la ausencia o presencia de estradiol, Se utilizó un intervalo de confianza de 95%.

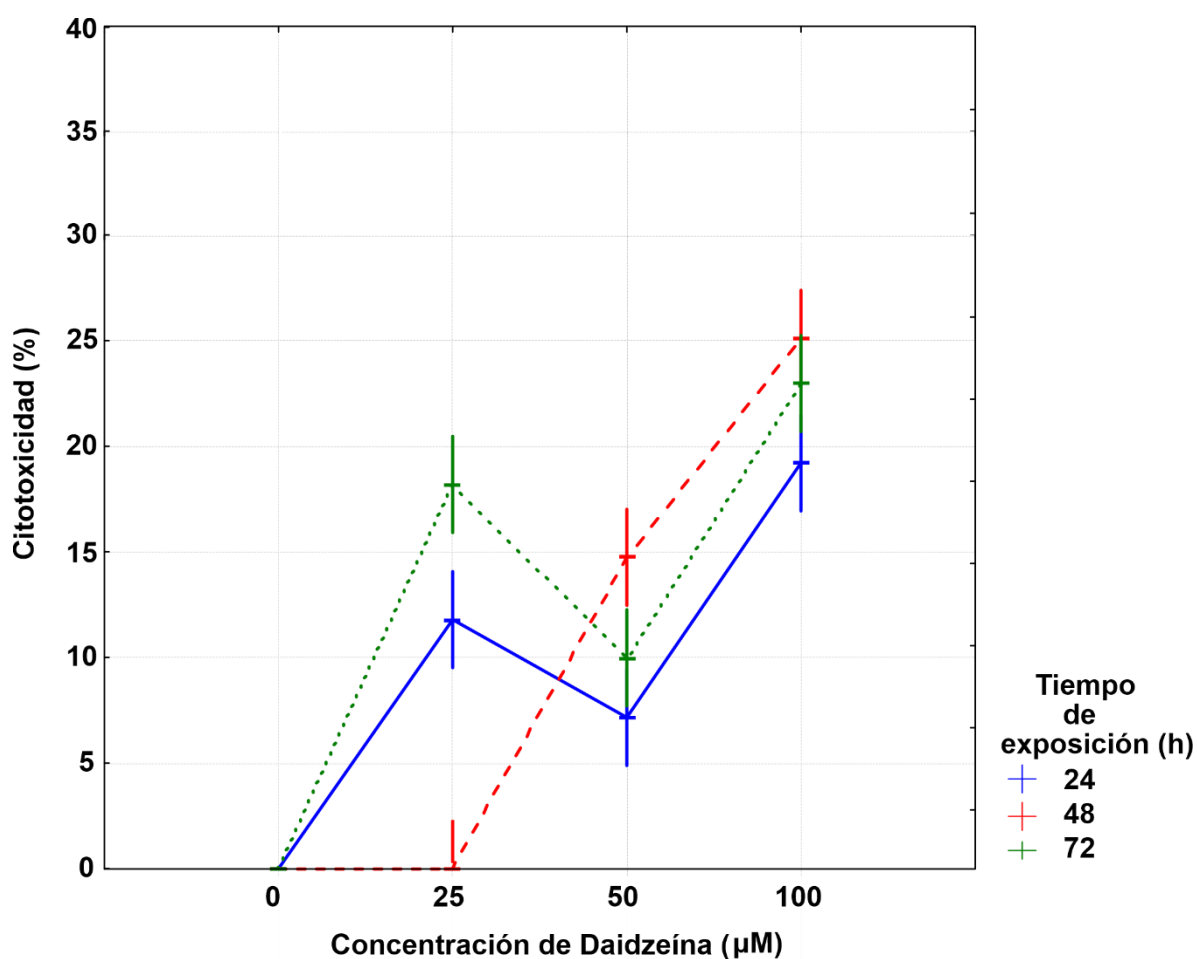
Posteriormente, para analizar si el efecto de la daidzeína sobre la citotoxicidad celular, se debía a un comportamiento sinérgico con el estradiol, se procedió a analizar el efecto de la daidzeína en combinación con el estradiol. La grafica 4, muestra que entre cada uno de los tratamientos hay diferencia significativa al

momento en que se combina la daidzeína con el estradiol. A concentraciones de 25 μM y 100 μM , se observa un aumento de la citotoxicidad celular de 7.5% y 18% para los cultivos con daidzeína sin estradiol, y del 14% y 26% para los tratamientos de daidzeína con estradiol, lo que pareciera indicar que la daidzeína tiene un efecto sinérgico con el estradiol en el aumento de la citotoxicidad. Por otro lado, a concentraciones de 50 μM (con estradiol) se observó que la daidzeína-estradiol disminuye la citotoxicidad aumentando la proliferación de las células lo que pareciera indicar que la daidzeína está funcionando como promotor para el crecimiento celular.



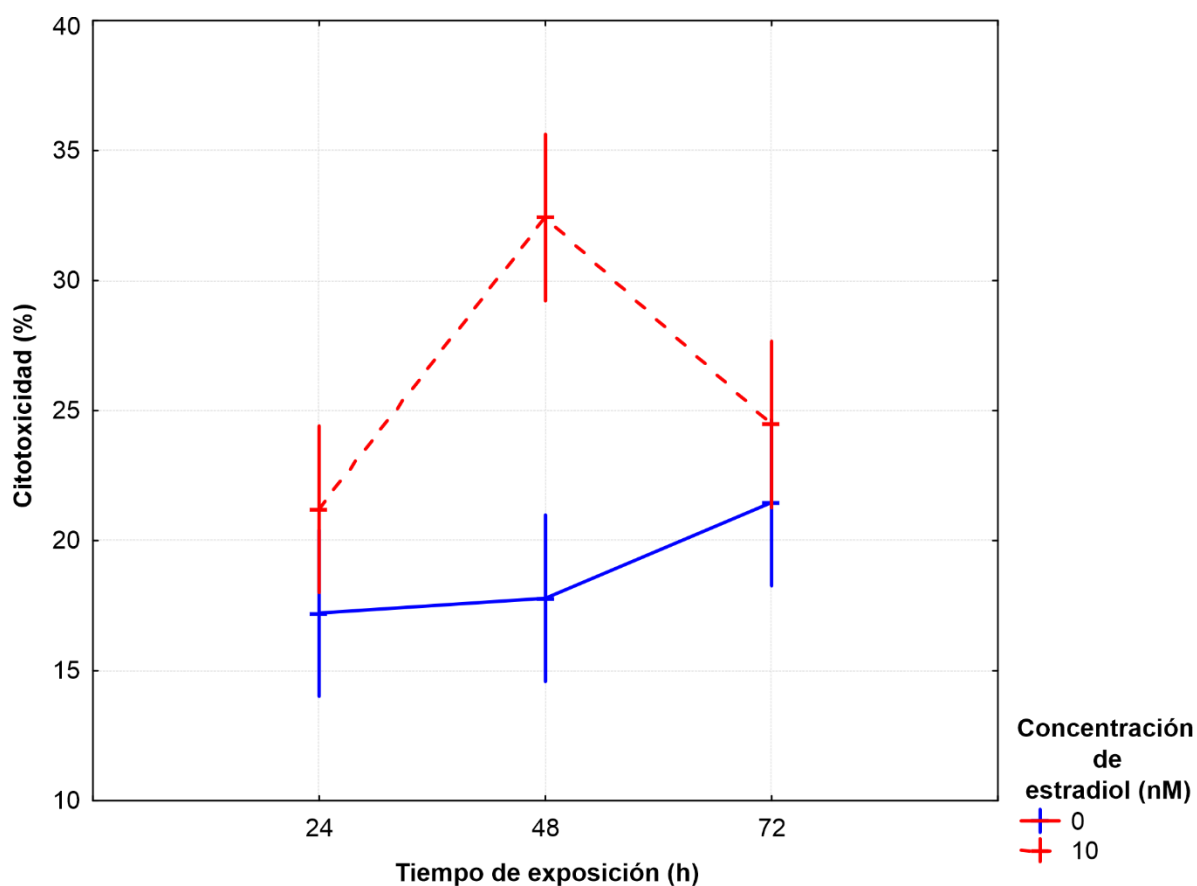
Grafica 4. Efecto de la daidzeína en diferentes concentraciones en combinación con el estradiol. Se utilizó un intervalo de confianza de 95%.

Posteriormente se examinó el comportamiento de la daidzeína, a diferentes tiempos de exposición (grafica 5), apreciando que los tratamientos más efectivos fueron concentraciones de 100 μM , en los tres diferentes tiempos aumentando la citotoxicidad hasta un 19%, 22.5% y 25% a las 24, 48 y 72 h respectivamente. En contraste, la exposición de 48 h a una concentración de 25 μM , presentó una citotoxicidad nula superior respecto a las células no expuestas, por lo que presenta un comportamiento negativo de la citotoxicidad celular. Por otro lado, los tratamientos de 24 y 72 h de exposición a una concentración de 25 μM de daidzeína, aumentaron la citotoxicidad hasta un 12% y 17.5% respectivamente.



Grafica 5. Efecto de la daidzeína en diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de exposición. A: tratamientos significativos respecto al tratamiento con 0 μM . Se utilizó un intervalo de confianza de 95%.

Así mismo, se graficó el tratamiento con 100 μM de daidzeína que fue la condición que mantuvo una citotoxicidad celular por arriba del 15% [grafica 6]. Esta condición promovió un comportamiento positivo respecto a la citotoxicidad celular en los grupos sin estradiol, mientras que los tratamientos con estradiol presentaron una mayor citotoxicidad hasta un 32% (48 h). Estos resultados sugieren que la daidzeína por si sola puede tener un efecto negativo en la proliferación celular de células cancerígenas, sin embargo, cuando se combina con un estrógeno como el estradiol, se crea una dinámica más compleja que promueve un incremento en la citotoxicidad en comparación con las células no expuestas.



Grafica 6. Efecto de la daidzeína a la máxima concentración respecto al tiempo de exposición. Se utilizó una concentración de 100 μM evaluada en tres diferentes tiempos de exposición con presencia de estradiol (línea roja) a una concentración de 10 nM y sin estradiol (línea Azul).