



# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**“Modulación de las proteínas de la familia de p53 en células de cáncer de mama al ser expuestas al [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acrilóil) - 2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona]”**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

**AUTORA:** Jaramillo Villavicencio, Estefany Viviana

**DIRECTORA:** Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Ph.D.

LOJA - ECUADOR

2016



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2016

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso.

### **DOCENTE DE LA TITULACIÓN.**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Modulación de las proteínas de la familia de p53 en células de cáncer de mama al ser expuestas al [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acrilóil) -2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona]” realizado por Jaramillo Villavicencio Estefany Viviana ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre de 2016

f: .....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Jaramillo Villavicencio Estefany Viviana declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Modulación de las proteínas de la familia de p53 en células de cáncer de mama al ser expuestas al [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acriloil) -2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona]” de la Titulación de Bioquímica y Farmacia siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autor.....

Cédula: 1104698210

## DEDICATORIA

*El presente trabajo de investigación va dedicado a mi querida madre NORMA, por todo el amor y apoyo que me brinda en cada paso, por ser mi ejemplo, mi orgullo y mi amiga.*

*A mi compañero de vida Santiago Andrés, por ser el soporte incondicional cada día.*

*A mis tías Greys y Carmita, por darme una mano cada vez que lo necesitaba.*

*A mi abuelita Elvita, por estar siempre dispuesta a ayudarme.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Titulación de Bioquímica y Farmacia por su formación académica.*

*A la Dra. Natalia Bailón, por acogerme en el laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología de la Sección Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica del Departamento de Ciencias de la Salud, por el apoyo brindado a lo largo de este trabajo de titulación, y por todos sus conocimientos impartidos.*

*A la Mgtr. María Isabel Ramirez y el Dr. Luis Guamán por compartir sus conocimientos para mi beneficio.*

*A mi adorada madre por estar en cada día de mi vida, por todo su apoyo y su amor. Por convertirme en una persona luchadora y enseñarme a vencer los obstáculos, por ser mi ejemplo y mi orgullo, ya que sin ella esto no se hubiese logrado.*

*A mis queridos hermanos Jenner y Luis por estar siempre pendientes.*

*A mis Tíos Jackson, Carmita y Greys, por confiar siempre en mis capacidades y por su apoyo para este logro.*

*A mi querido Santiago Andrés por estar cada día, por su entendimiento, amor y apoyo para que nunca me rinda.*

*A Gaby G. y Andrea J. por su amistad y por su colaboración en el laboratorio.*

*A mis compañeros de titulación por todos los momentos compartidos.*

*A tod@s ustedes muchas gracias por ser parte de este logro académico.*

*Estefany Viviana Jaramillo Villavicencio.*



<b>3.1 Molécula de estudio</b> .....	- 38 -
<b>3.2 Cultivo celular</b> .....	- 38 -
<b>3.3 Extracción y cuantificación de proteínas</b> .....	- 38 -
<b>3.4 Western Blot</b> .....	- 39 -
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS</b> .....	- 40 -
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN</b> .....	- 45 -
<b>CAPITULO VI CONCLUSIONES</b> .....	- 49 -
<b>BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	- 50 -
<b>ANEXOS:</b> .....	- 55 -

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 APOPTOSIS: Vía extrínseca, activación de receptores de muerte, caspasa 8 y 3.....	-14-
Figura 2 APOPTOSIS: Vía Intrínseca, sobreexpresión de Bax, activación de caspasa iniciadora 9.....	-15-
Figura 3. AUTOFAGIA: clasificación de autofagia, MacroA; MicroA y CMA.....	-17-
Figura 4. AUTOFAGIA: complejos proteicos mTOR, TORC1 Y TORC2.....	-18-
Figura 5. AUTOFAGIA: complejo mTOR y su implicación.....	-18-
Figura 6: AUTOFAGIA: mecanismo de regulación de autofagia por AMPk.....	-19-
Figura 7: AUTOFAGIA: Mecanismos moleculares de regulación y etapas de la autofagia.....	-20-
Figura 8: NECROPTOSIS: mecanismos de punto de control durante el proceso necroptótico.....	-21-
Figura 9: ESTRUCTURA DEL COMPUESTO: [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acriloil) -2-metil-2H-cromen 2-il) butan-2-ona].....	-26-
Figura 10: Expresión de proteínas reguladoras de apoptosis y autofagia.....	-33-
Figura 11: Expresión de proteínas de la familia de p53.....	-34-
Figura 12: Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y necroptosis.....	-35-
Figura 13: Expresión de proteínas nucleares.....	-37-

## ABREVIATURAS

**AMPK:** Proteína activadora de quinasas por AMP

**APC:** Adenomatous Polyposis Coli

**ATG:** Familia de Proteínas activadoras de autofagia

**BCL-2:** Linfoma 2 de las células B

**BCRA:** Gen de Cáncer de mama

**CDK:** Quinasas dependiente de ciclinas

**CDKN1A:** Quinasa dependiente de ciclina inhibidor 1A

**CMA:** Autofagia mediada por chaperonas

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**E2F:** Factor de transcripción 2

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico

**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas

**GTP:** Guanosín Tri Fosfato

**H2AX:** Familia de Histonas H2A, miembro X.

**HER2/neu:** Receptor 2 de Factor de Crecimiento Humano

**MAPK:** Proteína Quinasa Activada por Mitógenos

**MAPLC-3:** Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3

**MCF-7:** Línea celular de cáncer de mama

**mTOR:** Diana de rapamicina en células de mamífero

**p53:** Supresor de tumores

**p73:** Supresor de tumores

**PARP-1:** Poly-ADP-ribosa polimerasa 1

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PIK-3:** Fosfatidilinositol 3 quinasa

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno

**Ras:** Proteína G Señalizadora

**RB:** Proteína del retinoblastoma

**RIPA:** Buffer para extracción de proteínas e inmunoprecipitación

**RIPK:** Receptor de interacción de proteinkinasa

**RPMI:** Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SFB:** Suero fetal bovino

**TBS:** Tampón salino de Tris

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

## RESUMEN

El cáncer de mama es el crecimiento anormal de células del tejido glandular mamario, pudiendo penetrar tejidos sanos y producir metástasis. En Ecuador desde el 2007 hasta 2011, el promedio de casos nuevos en mujeres por año es 351, causando el 20% de muertes por cáncer a nivel nacional. Las especies naturales cumplen un rol importante en el descubrimiento de fármacos con propiedades antiproliferativas. La [(E)-4-(5-hidroxi-6-(3-(4-hidroxifenil)acrilil)-2-metil-2H-cromen-2-il)butan-2-ona], es una chalcona aislada de la especie *Azorella madreporica* la cual ha demostrado capacidad antineoplásica en líneas tumorales especialmente en MCF-7 de cáncer de mama. El objetivo planteado es determinar la activación de rutas implicadas en puntos de control de crecimiento y proliferación celular, regulación de ADN y muerte celular, inducidas a tratamiento por la molécula. Los resultados señalan que la molécula induce a las células tumorales a tomar vías de muerte necroptótica y autofágica; así como inhibición del ciclo celular y reparación del ADN. Atribuyéndole a la molécula su efectividad frente a las células de cáncer de mama, pudiendo ser un fitofármaco específico y efectivo.

**PALABRAS CLAVES:** Necroptosis, chalconas, p53, p73, autofagia.

## ABSTRACT

Breast cancer is defined as an abnormal growth of glandular breast cells; these cells can penetrate several healthy tissues and metastasize. In Ecuador from 2007 to 2011, the average number of new breast cancer cases is 351. It causes 20% of cancer-related deaths nationwide. Natural species play an important role in the discovery of new drugs with anti-proliferative properties. The compound, [(E)-4-(5-hydroxy-6-(3-(4-hydroxyphenyl) acryloyl)-2-methyl-2H-chromen-2-yl) butan-2-one], is a chalcone isolated from a *Azorella madreporica* species and has demonstrated anti-neoplastic effects on several tumor lines, including MCF-7 breast cancer cells. The objective of this study was to determine the effects of treatment on the activation of pathways that regulate cell growth, proliferation, DNA repair, and cell death. The results indicated that this compound induced breast tumor cell death necroptosis and autophagy pathways. It also inhibited cell cycle and DNA repair. By ascertaining the molecule's effects on breast cancer cells, specific and effective phytotherapies can be developed and applied.

**KEYWORDS:** necroptosis, chalcones, p53, p73, autophagy.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por ser una proliferación excesiva y diseminación de células anormales que pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pudiendo penetrar en varios tejidos y llevar hacia una metástasis. Según la OMS, en el 2012, los tipos de cáncer encontrados en hombres con mayor incidencia fueron: pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; mientras que en mujeres predominaron: mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (World Health Organization, 2012). El cáncer de mama se presenta como un crecimiento anormal de las células del tejido glandular mamario (Bravo, Cabrera, & Sigüencia, 2014). En el Ecuador, el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer en diagnosticarse en mujeres seguido del de cérvix, siendo juntos un principal problema de salud en mujeres mayores de 40 años. Según las estadísticas registradas de cáncer de mama en Ecuador, desde el año 2007 hasta 2011, el promedio de casos nuevos en mujeres por año es de 351, con una tasa de incidencia de 37.76 casos por 100.000 habitantes, causando el 20% de muertes por cáncer a nivel nacional (SOLCA-Guayaquil. Registro de Tumores, 2010). Para el desarrollo del cáncer existen factores de riesgo, predisposición genética y alteraciones a nivel molecular. Cuando en el ciclo celular existen proteínas alteradas se muestra un indicio de que los genes que las codifican se hallan mutados, causando un crecimiento y proliferación incontrolado de las células (America Cancer Society, 2014a). Los genes que intervienen en el desarrollo de un tumor pueden controlar la proliferación celular, apoptosis o encargarse de reparar el ADN dañado, según el proceso que se desencadene dentro de la célula existen dos tipos de genes reguladores: los oncogenes, que son los encargados de acelerar el crecimiento; y los genes supresores de tumor, que ejercen una función inhibitoria del crecimiento celular (Hyland, 2008).

En la actualidad, las investigaciones de vanguardia presentan progresos en cuanto al desarrollo de fármacos de origen natural teniendo como objetivo principal la terapia anticancerígena (Velazques, 2013). La medicina tradicional es de mucha importancia ya que posee un sin número de funciones biológicas que sirven como terapia o como modelos para sintetizar sustancias bioactivas. Hoy en día la síntesis orgánica junto con la química de productos naturales se encargan de desarrollar nuevas moléculas de bajo peso molecular con actividad farmacológica obteniendo alrededor del 60% de fármacos sintetizados a partir de extractos naturales (Ravelo & Braun, 2009).

El descubrimiento de fármacos de origen natural cumple un rol importante en todos los ámbitos de la salud; sin embargo, en la actualidad uno de los principales propósitos de la medicina tradicional es encontrar tratamientos específicos y eficaces contra el cáncer tomando en cuenta como dianas terapéuticas únicamente las células cancerosas y no las

células normales (Cueva, 2014), por lo que se requiere conocer los mecanismos del ciclo y muerte celular para crear tratamientos definidos y adaptados a nivel molecular (Velazques, 2013). Las chalconas son llamadas cetonas aromáticas las cuales se emplean en diversos ensayos biológicos ya que presentan importante actividad antifúngica, antiinflamatoria, antidepresiva y anticancerígena (Ramirez, Barajas, Pérez, Sáenz, & Silva, 2012).

Un género importante en cuanto al contenido de chalconas es el *Azorella* ya que tiene alrededor de 70 especies que crecen principalmente en América Central, oeste de América del Sur y en islas del Océano Antártico. Las especies son reconocidas por la producción de diterpenoides y esqueletos azorellane cuyas estructuras son importantes por sus actividad biológica como antiprotozoario, antiviral, espermicida, citotóxico, analgésico, antiinflamatorio, antituberculoso y antihiperlipémico (Molina-Salinas et al., 2010).

En el año 2015, San-Martín & Donoso describieron el aislamiento y caracterización de [(E) - 4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acrilóil) -2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona] (NChal) empleando la especie *Azorella madreporica* destacada por ser fuente de diterpenos activos que, tras ensayos biológicos, presentó actividad antiproliferativa, especialmente frente a cáncer de mama (San-Martín et al., 2015).

Es por ello que nuestro objetivo principal de estudio es determinar la activación de proteínas implicadas en el control del ciclo celular, tales como puntos de control de crecimiento y proliferación celular, regulación de ADN y muerte celular inducidas al tratamiento por la molécula en estudio, empleando para ello la extracción, cuantificación y análisis por Western Blot de proteínas de las células MCF-7 expuestas a NChal en dosis de 12.5, 18.75 y 37.5  $\mu$ M expuestas a 24 horas de tratamiento.

## **CAPÍTULO I FUNDAMENTO TEÓRICO**

## 1.1 Cáncer: definición y origen.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la palabra «Cáncer» es un término empleado para nombrar a un conjunto de enfermedades que dan un efecto negativo en el organismo, teniendo una estrecha relación entre «tumores malignos» o «neoplasias malignas» (World Health Organization, 2012). El cáncer se caracteriza por ser una proliferación excesiva y diseminación de células anormales que pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, luego las células cancerígenas pueden invadir tejidos circundantes y llevar hacia una metástasis. Según la OMS en el 2012 los tipos de cáncer encontrados en hombres con mayor frecuencia fueron los de: pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; mientras que en mujeres predominaron los de: mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.

El cáncer inicia en una célula, que luego se transforma de una célula normal a una célula cancerígena, este proceso requiere de múltiples fases y son el resultado de alteraciones entre factores genéticos del paciente que le confieren a las células capacidad para sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular (Meza, Montaña, & Aguayo, 2006) y agentes externos como: carcinógenos físicos, químicos o biológicos (World Health Organization, 2007) teniendo entre los carcinógenos físicos: rayos ultravioleta, rayos gamma, temperatura, entre otros; mientras que en los carcinógenos químicos: los peróxidos, sulfato de cobre, gas mostaza, así como los carcinógenos biológicos que principalmente son: virus o bacterias.

Para que las células se alteren y den origen a cierto tipo de cáncer se ven implicados varios factores que Hanahan & Weinberg en el año 2011 dan a conocer, teniendo las 10 principales características implicadas en la transformación de una célula normal a cancerosa (Bailón-Moscoso, Romero-Benavides, & Ostrosky-Wegman, 2014; Hanahan & Weinberg, 2011). Siendo estas:

- Señalización de proliferación sostenida
- Evasión a supresores de crecimiento
- Evasión de la respuesta inmune
- Inmortalidad replicativa
- Respuesta inflamatoria promotora de tumores
- Invasión y metástasis
- Angiogénesis inducida
- Inestabilidad y mutaciones del genoma

- Resistencia a la muerte celular
- Desregulación de la energía celular

La alta incidencia de cáncer a nivel mundial ha llevado a determinar los factores evitables de riesgo tanto de conducta como alimenticios, teniendo a: consumo de tabaco, exceso de peso, obesidad o inactividad física, consumo nocivo de alcohol, y virus del Papiloma Humano. Estos factores causan alrededor del 30% de muertes por cáncer a nivel mundial, siendo el más importante el consumo de tabaco, ya que es la causa de más del 20% de muertes por cáncer a nivel general y constituye el 70% de muertes debido a cáncer de pulmón (World Health Organization, 2007). Todos estos factores causales pueden ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo del cáncer (America Cancer Society, 2014a) .

## **1.2 Cáncer de mama.**

El cáncer de mama se presenta como un crecimiento anormal de las células del tejido glandular mamario, estas células cancerosas pueden penetrar en varios tejidos sanos y producir metástasis (Bravo et al., 2014). Esta patología provoca una proliferación excesiva y desordenamiento de las células del epitelio glandular y sus conductos. La enfermedad se presenta de manera compleja ya que es heterogénea y multifactorial por lo que intervienen para su desarrollo factores genéticos y no genéticos, el número de casos de esta neoplasia ha incrementado significativamente en los últimos años (García Cornejo, Gamarra Cabezas, & Layana, 2005). Existen varios factores de riesgo importantes para el desarrollo de ésta neoplasia, (America Cancer Society, 2014a; Bravo et al., 2014). Entre ellos están:

- Edad
- Raza
- Carcinógenos ambientales
- Familiares con antecedentes de cáncer de mama
- Alteraciones genéticas
- Sobrepeso
- Terapia hormonal post-menopausia
- Consumo de tabaco y alcohol
- Envejecimiento y estilo de vida.

Según la Sociedad Americana del Cáncer, se estima que el cáncer de mama representa la causa más común de muertes por cáncer en mujeres de todo el mundo, la tasa de mortalidad ha ido disminuyendo conforme aumentan los años, desde el año 2007 hasta el

2011 se redujo en un 3.2% en mujeres de raza blanca y un 2.4% en mujeres de raza negra, ambos grupos menores a los 50 años de edad; toda esta reducción de mortalidad se debe a la eficacia de detección y tratamiento temprano (American Cancer Society, 2015). Solamente en el año 2008 fueron diagnosticadas cerca de 1.384.000 mujeres con cáncer de mama a nivel mundial, correspondiente a una tasa de 42.3 casos nuevos por cada 100.000 habitantes, representando así el 23% de todos los cánceres de tipo invasivos para ese año. Estas cifras fueron relevantes en la mayoría de regiones del mundo a excepción de varios países de África, América Central, América del Sur y Asia (Youlten et al., 2012).

### **1.2.1 Cáncer de mama en Ecuador.**

En el Ecuador el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer en diagnosticarse en mujeres, seguido del de cérvix, siendo juntos un principal problema de salud en mujeres mayores de 40 años. Según las estadísticas registradas de cáncer de mama en Ecuador desde el año 2007 hasta el 2011, el promedio de casos nuevos en mujeres por año es de 351, con una tasa de incidencia de 37.76 casos por 100.000 habitantes, causando el 20% de muertes por cáncer a nivel nacional. Denotando principalmente que, en la ciudad de Guayaquil, en el año 2010 fueron registrados 145.8 casos en mujeres con edades que oscilan entre los 65 y 69 años (SOLCA-Guayaquil. Registro de Tumores, 2010).

Durante el periodo 1997-2006, en la ciudad de Loja, se registraron 204 casos de cáncer de mama en mujeres y 2 casos en hombres, representando una tasa de incidencia de 27.4 casos por cada 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 6.4 casos por 100.000 habitantes. Alrededor del 93% de los casos han sido verificados histológicamente, determinando que solo el 11% se han detectado en estadios tempranos y cerca del 45% en etapas 3 y 4 de la neoplasia (Montenegro, 2013).

### **1.3 Genética: oncogenes y genes supresores de tumores.**

El origen del cáncer no se debe a un único factor, sino a un conjunto de condiciones que conllevan a la transformación celular y al desarrollo de un tumor, siendo uno de estos factores de riesgo la predisposición genética y las alteraciones a nivel molecular. Estas variantes se ven inmersas en el desarrollo de una neoplasia.

Cuando en el ciclo celular existen proteínas alteradas se muestra un indicio de que los genes que las codifican se hallan mutados, causando un crecimiento y proliferación incontrolado de las células (America Cancer Society, 2014a). Los genes que intervienen en el desarrollo de un tumor pueden controlar la proliferación celular, la apoptosis que es la muerte programada

de la célula o encargarse de reparar el ADN dañado; según el proceso que se desate dentro de la célula, existen dos tipos de genes siendo estos: los oncogenes, que son los encargados de acelerar el crecimiento; y los genes supresores de tumor, que ejercen una función inhibitoria del crecimiento celular (Hyland, 2008).

Los oncogenes se encargan de controlar la proliferación celular y apoptosis. Estos genes comienzan siendo protooncogenes; pero, debido a que sufren mutaciones, se transforman en oncogenes que por ende se activan de manera constitutiva y permanente; la mutación que presentan mantiene una herencia dominante ya que, si uno de los dos alelos es el alterado ya producirá una afección (America Cancer Society, 2014b). Los oncogenes fueron conocidos por primera vez en los retrovirus oncogénicos (Hyland, 2008).

Los oncogenes se han podido clasificar de acuerdo a dos parámetros fundamentales:

- Lugar de acción: como la membrana, núcleo, matriz y citoplasma celular.
- Codificación y función de las proteínas como: factores de transcripción, proteínas G, factores antiapoptóticos, quinasas, factores de crecimiento y receptores.

### **1.3.1 Principales oncogenes**

- HER2/neu: este gen se encarga de codificar a un receptor tirosin quinasa que está relacionado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la importancia de este gen radica en que se encuentra expresado en la mayoría de los cánceres, especialmente con mayor frecuencia en cáncer de mama, la expresión de este gen produce un cuadro clínico agresivo y delicado para el paciente. El gen HER2/neu cuando se encuentra sobreexpresado, se debe a que las células tumorales acumulan múltiples copias del gen afectado produciendo un aumento de los niveles del receptor tirosin quinasa y bloqueando la actividad GTPasa (Hyland, 2008).
- Ras: los genes codificantes para las proteínas Ras conforman parte de la maquinaria de señalización crecimiento, proliferación y regularización células, las proteínas mantienen una función de GTPasa encontrándose principalmente en membranas celulares, endosomas y retículo endoplasmático. De las proteínas Ras existen isoformas como: H-ras. K-ras y N-ras (Hancock, 2003). Ras está en la capacidad de inducir cáncer por su actividad incrementada mediante la vía Ras-MAPK, esta proteína está implicada en la carcinogénesis debido a que es un regulador de la vía MAP (Rajasekharan & Raman, 2013), cuando esta vía se activa induce a la unión de factores de crecimiento al receptor de tirosin quinasa y por lo tanto se mantendrá siempre de

manera activa unida a GTP que da como resultado la proliferación celular (Hyland, 2008).

- Myc: este es un factor de transcripción que tiene como función acetilar las histonas que acortan el ADN y a su vez promueve la transcripción de genes que se encargan de la proliferación celular, este gen se encuentra constituido por una familia de protooncogenes que son: c-Myc, N-Myc, y L-Myc (Pérez & Peña, 2011) , cuando alguno de los genes de la familia Myc se encuentra sobreexpresado se asocia con un estadio del tumor avanzado (Hyland, 2008). El gen c-Myc fue el primero en ser estudiado y es el más importante en el desarrollo de la carcinogénesis, este gen permite el paso de las células de fase G<sub>0</sub> a fase G<sub>1</sub>, por lo que interviene en la activación de la maquinaria del ciclo celular, el gen además interviene en la producción de energía durante el ciclo celular en la glucólisis. Si existe una desregulación del gen induce directamente a la proliferación excesiva y por ende al desarrollo de cáncer (Pérez & Peña, 2011).

Los genes supresores de tumores en condiciones de normalidad se encargan de inhibir el crecimiento celular; controlando de esta manera la proliferación excesiva. Sin embargo, cuando existe alguna mutación en los genes supresores se lleva a cabo un descontrol celular promoviendo la carcinogénesis. Las mutaciones ocurridas en estos genes mantienen un efecto recesivo, es decir requieren que ambos alelos del gen se encuentren mutados para que conlleve a una alteración (Baker, Marc and Diaz, 2013). Los genes supresores más importantes codifican para las proteínas p53 y RB. Sin embargo a todos los genes se los puede clasificar en:

### **1.3.2 Genes codificantes para proteínas en el citoplasma:**

- Adenomatous Polyposis Coli (APC): codifica a una proteína de igual nombre que se encarga de regular negativamente a las  $\beta$ -cateninas que de manera activa inducen a la proliferación celular. Esta proteína se encuentra alterada en mayor proporción en cáncer de colon y estómago (Ríos & Hernández, 2001).
- Neurofibromina 1 (NF1): codifica a una proteína que inhibe a la proteína Ras mediante la hidrólisis de la GTP. Si esta proteína se pierde dará lugar a una activación constante de Ras por lo que induciría a la proliferación anormal (Hyland, 2008).

### **1.3.3 Genes codificantes para proteínas en el núcleo:**

- Retinoblastoma (Rb): codifica para la proteína Rb, cuya función es inhibir la progresión del ciclo celular entre las fases G<sub>1</sub> y S, en caso que Rb se encuentre mutado la

inhibición del ciclo se pierde y las células avanzarían directamente hacia la fase S promoviendo la proliferación descontrolada (Ríos & Hernández, 2001). La proteína Rb permanece unida a E2F para inhibir su función. E2F es un factor de transcripción que estimula la síntesis de Ciclina E- CDK2 que actúan en el progreso del ciclo celular. Las mutaciones relacionadas con Rb se presentan en la mayoría de casos de cáncer de mama, glioblastomas, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga (Hyland, 2008).

- p53: el gen codifica a la proteína de igual nombre. p53 se conoce como el guardián del genoma humano ya que es indispensable en la respuesta al daño del ADN. El gen se encuentra altamente conservado y está conformado por 11 exones y mantiene 21 polimorfismos diferentes en su región codificante. La proteína a su vez es un factor de transcripción y pesa alrededor de 53kDa (Berkers, Maddocks, Cheung, Mor, & Vousden, 2013) actúa como supresor tumoral por dos mecanismos; primero, p53 activa al gen inhibidor de CDKs denominado p21 que evita la fosforilación de Rb por inhibición de los complejos CDK-ciclina, de esta manera el factor E2F se inactiva e impide la progresión hacia la fase S del ciclo celular (Hyland, 2008). Segundo, p53 induce la apoptosis frente a señales de daño o alteración celular (Hanahan & Weinberg, 2011). Cuando las células evaden estos dos puntos de control se origina un descontrol celular y por ende la carcinogénesis. Por estos motivos la alteración de éste gen se encuentra en casi todos los tipos de cáncer (Ríos & Hernández, 2001).

#### **1.3.4 Otros genes implicados:**

*BCRA*: son supresores de tumor que evitan la proliferación celular excesiva y se clasifican en dos tipos: *BCRA1*, que se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición 21; y *BCRA2*, localizado en el brazo largo del cromosoma 13 en la posición 12.3 (García Cornejo et al., 2005). Las proteínas que son codificadas por estos genes mantienen funciones relacionadas, principalmente actúan como protectores genómicos ya que reparan el ADN, controlan la transcripción genética y son parte de puntos de control del ciclo celular (Hyland, 2008). Se alude que una mutación del gen *BCRA1* interviene en el desarrollo del cáncer de mama, mientras que el gen *BCRA2* se relaciona con cáncer de mama y ovario (Ríos & Hernández, 2001).

#### **1.4 Rutas de muerte celular y sus proteínas implicadas.**

Por otro lado, la muerte celular se define como el proceso a través del cual la célula muere y es destruida por lo que sus funciones vitales y reacciones químicas se detienen completamente (Maldonado, 2010). De acuerdo al tipo celular, su ciclo de vida es

dependiente, ya que ciertos tipos de células se mantienen en constante renovación, mientras que de otras su tiempo de vida es largo. Para que el organismo se mantenga en homeóstasis debe de existir un reemplazo constante de ciertas células por lo que mantendría un balance entre la proliferación y la muerte celular, cuando este proceso de regulación se pierde las células empiezan a proliferar de manera aumentada y por lo tanto conlleva a la carcinogénesis (Lizarbe Iracheta, 2007).

Existen dentro de la célula varias rutas implicadas en el proceso de muerte celular, entre las cuales están:

#### **1.4.1 Apoptosis: muerte celular programada.**

Conocida también como la muerte celular programada proviene del término griego *apo*; “a partir de” y *ptosis*; “caída” que hace referencia a “la caída de las hojas en el otoño”, este tipo de muerte ocurre de manera normal para beneficio del organismo ya que no produce inflamación y no afecta a las células vecinas (Guaman Ortiz, 2012). Por otro lado, se puede definir a la apoptosis como “*El conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una manera regulada en respuesta a una serie de acontecimientos patológicos y fisiológicos*” (Lizarbe Iracheta, 2007).

El proceso apoptótico se produce durante cuatro fases primordiales que son:

- *Inicio*: normalmente la apoptosis se activa cuando el organismo requiere una remodelación de estructuras o un espacio para nuevos tejidos, estos procesos se llevan a cabo en el desarrollo embrionario, ya que mediante apoptosis se eliminan principalmente las membranas encontradas entre los dedos y la cola embrionaria. A la vez, existen agentes externos que inducen tanto a la muerte celular por apoptosis como a la proliferación excesiva tales como: virus, bacterias, radiaciones y mutaciones; frente a ello la célula tiene la función de controlar la propagación celular induciéndose al suicidio (Guaman Ortiz, 2012).

- *Decisión*: una vez que la célula ha iniciado el proceso apoptótico debe resolver si desea vivir o morir mediante varios procesos de reparación con proteínas pro-apoptóticas. Una de estas proteínas es p53, que funciona como factor de transcripción y se activa cuando existe daño en el ADN, cuando p53 se encuentra elevado induce la transcripción de genes como p21/WAF1/Cip1 que son proteínas reguladas por ciclinas dependientes de cinasas CDK y por ende bloquean la progresión hacia la fase S del ciclo celular. Como finalidad de este bloqueo es mantener a la célula en fase G<sub>1</sub> y evitar la replicación de ADN alterado.

Por otro lado, si la célula es incapaz de reparar el ADN se induce a la muerte por activación de p53 (Jordán, 2003). Otra de las proteínas encargadas de la reparación celular es PARP-1 o también llamada poli (ADP ribosa) polimerasa-1, esta proteína se encarga de la detección de roturas de doble y simple cadena de ADN y estimula su reparación, sin embargo si ya no existe posibilidad de reparación induce directamente hacia la apoptosis (Jordán, 2003).

En caso que la maquinaria de reparación no sea efectiva la célula induce apoptosis mediante dos vías:

- Vía extrínseca (Figura 1): el sistema inmunológico produce ligandos citotóxicos que se expresan en la membrana y espacio extracelular (FasL: ligando Fas; TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral Alfa; y TRAIL: Ligando Inductor de Apoptosis relacionado con TNF), los cuales se unen a receptores de muerte (FasL: CD95L y FasR: CD95, APO-1) que son expresados en la superficie de las células dañadas, a estos receptores se incorporan las proteínas TRADD y FADD que se asocian con la activación de la muerte celular ya que cuando se encuentran libres permiten la dimerización y cambio de la conformación de la caspasa 8 (Caspasa activadora) y caspasa 3 produciendo apoptosis (Guaman Ortiz, 2012; Maldonado, 2010)

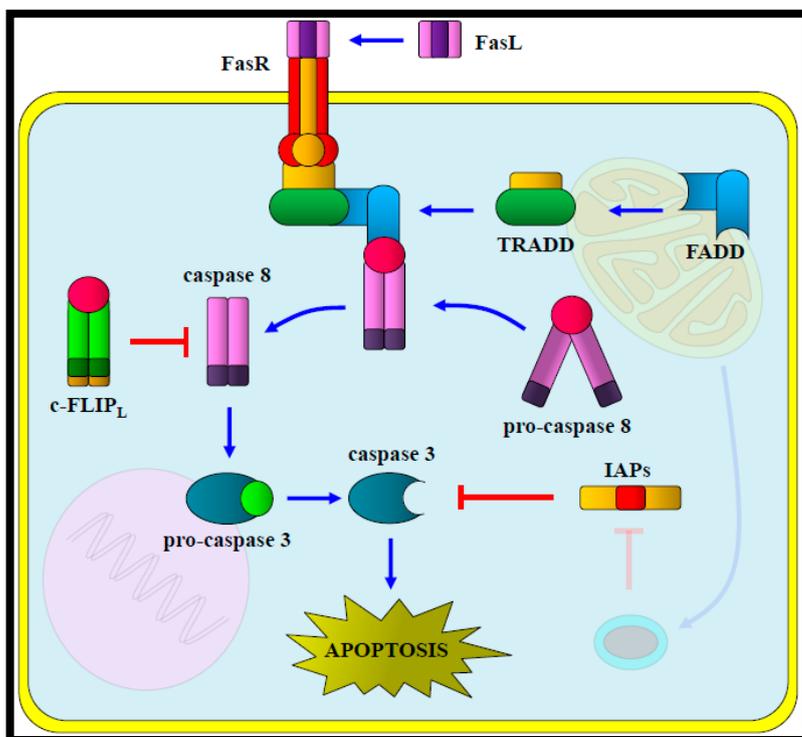


Figura 3 APOPTOSIS: Vía extrínseca, activación de receptores de muerte, caspasa 8 y 3.

Fuente: (Guaman Ortiz, 2012)

- Vía intrínseca (Figura 2): se conoce como una ruta mitocondrial ya que su desarrollo se da en esta organela, las proteínas de la familia de Bcl-2 constituyen un papel fundamental en esta vía. Cuando existe una sobreestimulación las proteínas Bax y Bak se polimerizan y se activan en la membrana externa de la mitocondria, a su vez estas proteínas se encuentran reguladas por Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> que son proteínas con función antiapoptóticas. Cuando se da la polimerización de Bax y Bak se forma un poro en las membranas de la mitocondria que junto con el citocromo C permitirá el paso de las proteínas hacia el citoplasma, cuando el citocromo C se encuentra circulante se ensambla a otra proteína llamada APAF1 que tiene como función reclutar a caspasa-9 (caspasa iniciadora) y se ejecuta la apoptosis de manera irreversible por activación de la caspasa-3 (Guaman Ortiz, 2012; Maldonado, 2010).

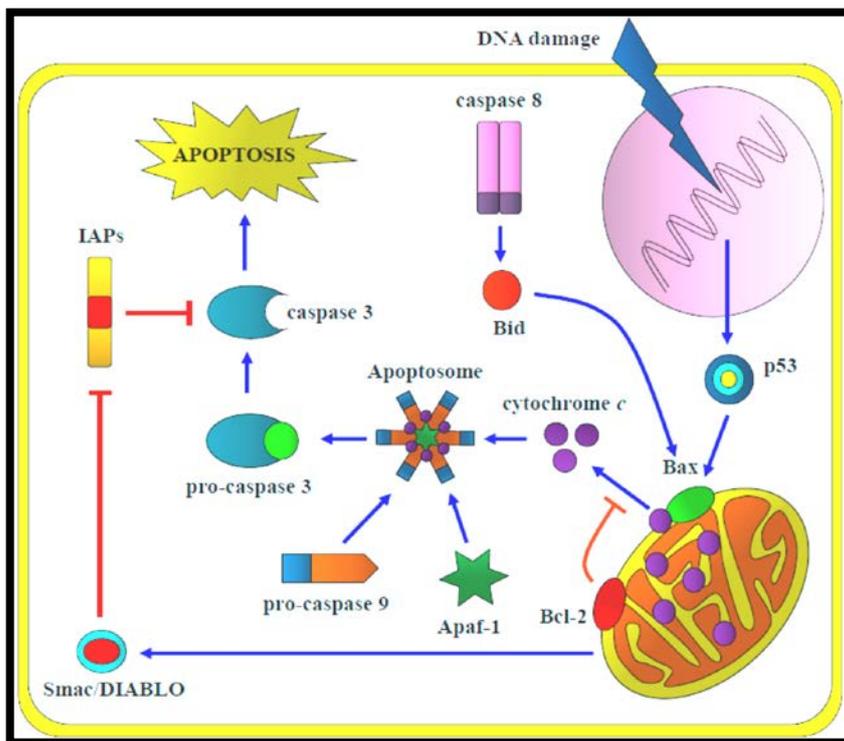


Figura 4 APOPTOSIS: Vía Intrínseca, sobreexpresión de Bax, activación de caspasa iniciadora 9. Fuente: (Guaman Ortiz, 2012).

- *Ejecución*: cuando la célula ha decidido morir se producen varios procesos bioquímicos que conllevan a la degradación de las proteínas y la cromatina (Jordán, 2003). Existe por lo tanto un debilitamiento de membrana por cambios de distribución de fosfolípidos los cuales forman protuberancias conocidas como burbujeo, por otro lado el citoplasma se

condensa y el volumen de la célula cambia, el núcleo reduce su tamaño por condensación de la cromatina y la membrana nuclear se desintegra. En el interior celular las proteínas se descomponen y la mitocondria deja de ser funcional. Por último, la célula forma los cuerpos apoptóticos que son partes del citoplasma y organelas rodeados por la membrana plasmática (Lizarbe Iracheta, 2007).

- *Depuración*: los cuerpos apoptóticos deben ser eliminados para no dejar rastros celulares, estos son reconocidos por los macrófagos o células cercanas y son descartados. Previo a que los macrófagos acudan a la eliminación, la célula apoptótica libera ciertas señales de reconocimiento, estas señales son lípidos como la fosfatidilserina que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática pero que su externalización permite que los macrófagos encuentren la célula y la fagociten (Guaman Ortiz, 2012; Lizarbe Iracheta, 2007).

#### **1.4.2 Autofagia.**

El término autofagia proviene de las raíces griegas *auto* (uno mismo) y *phagos* (comer) que significa proceso de auto-comer (Aredia, Guamán Ortiz, Giansanti, & Scovassi, 2012), este mecanismo es esencial para mantener la homeostasis celular ya que degrada los componentes celulares y limpia el citoplasma (Herrero, 2008). En caso de no tener nutrientes suficientes la célula estimula este proceso donde las estructuras del citoplasma se encierran y se fusionan dentro de endosomas y lisosomas (Moruno, 2010). Se han descrito tres tipos de autofagia: Micro-Autofagia (MicroA), Macro-Autofagia (MacroA) y Autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Aredia et al., 2012). La MicroA es un mecanismo donde se degradan proteínas y organelas mediante el lisosoma que se encarga de atrapar y degradar los diferentes blancos. En cambio, durante la MacroA existe una reubicación de las membranas donde las estructuras vacuolares junto con los lisosomas se fusionan, esta clasificación se la conoce comúnmente como “autofagia” donde se ve implicado un arresto de proteínas, organelas y citoplasma inmersas en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, el cual conforma una estructura membranosa capaz de fusionarse con el lisosoma permitiendo la liberación del contenido y permitiendo la degradación por medio de proteasas, teniendo como finalidad, liberar hacia el citoplasma, moléculas degradadas para la reutilización de componentes celulares. En la CMA existen proteínas facilitadoras que permiten formar un complejo con la chaperona Hsc70, la cual facilita la dirección del complejo hacia el lisosoma donde la proteína Lamp2A

lo recepta y adapta permitiendo que la proteína blanco ingrese al lisosoma para su degradación (Figura 3) (Criollo, 2009).

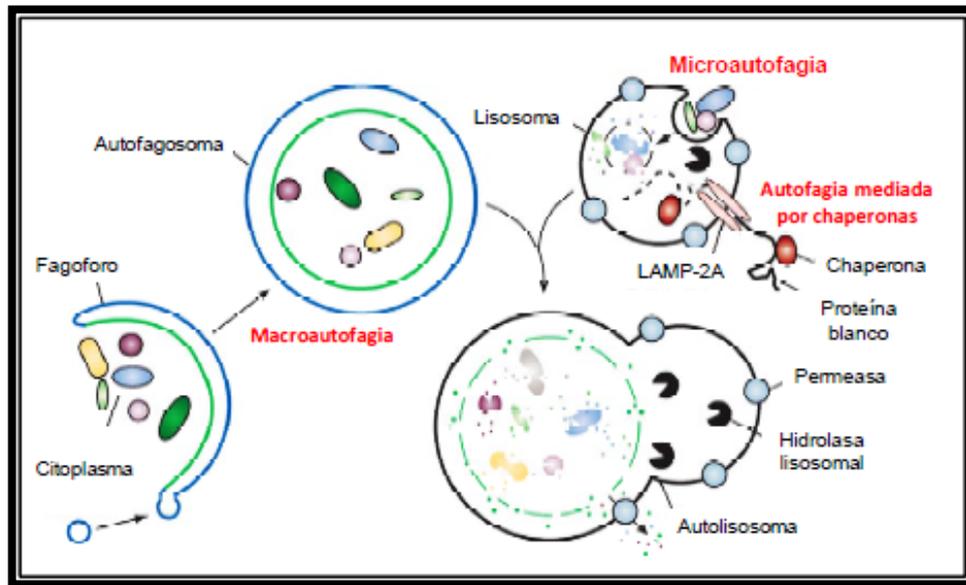


Figura 3. AUTOFAGIA: clasificación de autofagia, MacroA; MicroA y CMA.  
Fuente: (Criollo, 2009).

La autofagia surge en condiciones normales, conocida también como “autofagia basal”, mientras que cuando las células requieren de nutrientes y energía durante una carencia de sustentos, organelas dañados, escases de factores de crecimiento, estrés oncogénico o infecciones por patógenos se regula el proceso denominándose “autofagia inducida”. Por lo que este proceso le confiere a la célula vivir mediante el reciclaje cuando ha sido sometida a estrés celular (Criollo, 2009). Sin embargo si la gravedad del estrés celular es elevado, la autofagia interviene en los procesos de neurodegeneración, envejecimiento y cáncer. (Aredia et al., 2012; Su, Yang, Xu, Chen, & Yu, 2015).

Durante el proceso de regulación de la autofagia se involucran ciertas proteínas tales como:

- **mTOR**: es una serina/treonina quinasa que forma un complejo proteico a su vez con TORC1 y TORC2. TORC1 se encuentra formado por mTOR, mLST8 y Raptor, donde mTOR cumple la principal función durante la autofagia (Criollo, 2009). Mientras que TORC2 se encuentra mediando el crecimiento celular y está conformado por mTOR, Rictor, y mLST8/GβL (Herrero, 2008). mTOR funciona como sensor intracelular detectando niveles de estrés, nutrientes y energía celular que le permiten regular funciones fisiológicas, ciclo celular, metabolismo proteico, y transcripción de genes (Figura 4). mTOR en respuesta frente a factores de crecimiento y aminoácidos activa a

la quinasa p70<sup>S6K</sup> e inhibe a 4E-BP1 que es un inhibidor del factor eIF4. Mientras que para controlar la transcripción de genes se activa la vía STAT3, y por la inhibición de Rb permite la regulación de las Polimerasas I, II y III. Sin embargo, cuando mTOR se fosforila, 4E-BP1 se desintegra de eIF4E, permitiendo la traducción de proteínas (Figura 5) (Herrero, 2008).

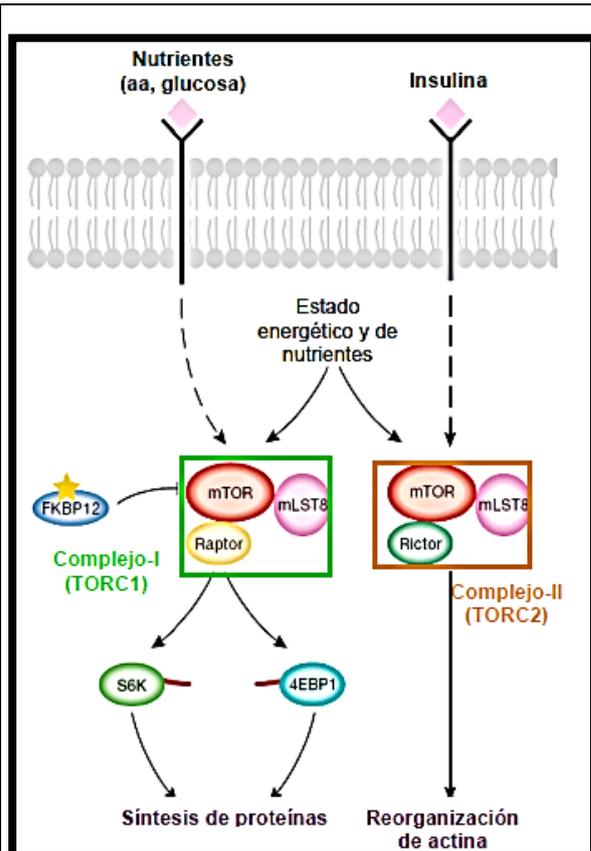


Figura 4. AUTOFAGIA: complejos proteicos mTOR, TORC1 Y TORC2.

Fuente: (Herrero, 2008).

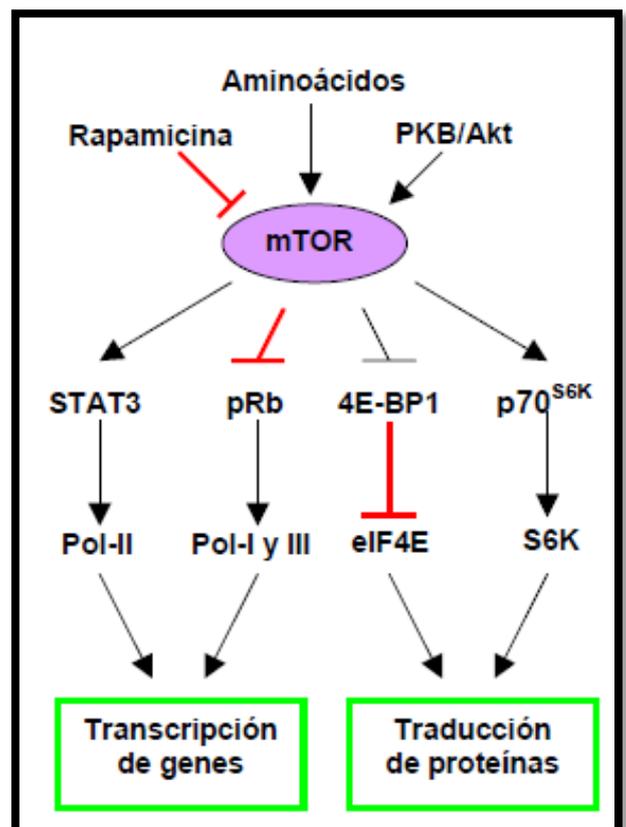


Figura 5. AUTOFAGIA: complejo mTOR y su implicación.

Fuente: (Modificado de Herrero, 2008).

- AMPK: conocida como Adenina Monofosfato Quinasa, es un complejo proteico que se inicia mediante el incremento de AMP/ATP, llevándose a cabo tres procesos diferentes: activación de la enzima fosforilada, impulso para la fosforilación de treonina 172 por una quinasa y la inhibición de la fosforilación de treonina 172 por fosfatasas. AMPK se



conjugadoras (E2) respectivamente; cuando estas se unifican las proteínas Atg12 y Atg5 interceptan a Atg16 conformando un complejo indispensable para la formación del autofagosoma y la elongación. **2)** la asociación entre MAPLC3/Atg8 a la fosfatidiletanolamida mediante Atg4, Atg7 y Atg3 permiten la interacción con la vesícula del autofagosoma y continuar hacia el proceso de degradación (Figura 7), la forma lipidada de MAPLC3-II, es el más marcador específico para la formación autofagosoma y, más en general, para la ocurrencia de la autofagia.(Gatica, 2012; Herrero, 2008).

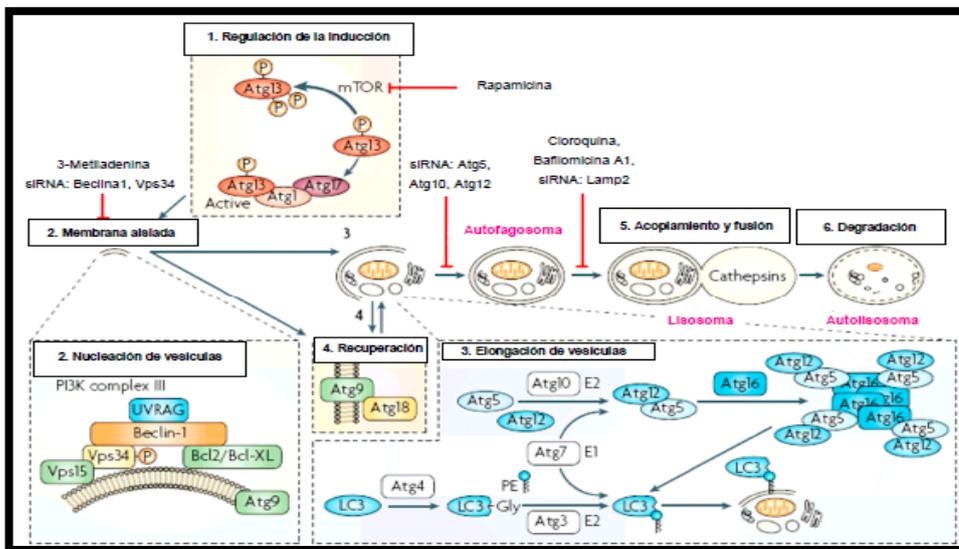


Figura 7: AUTOFAGIA: Mecanismos moleculares de regulación y etapas de la autofagia.  
Fuente: (Herrero, 2008).

Durante el cáncer, la autofagia puede actuar en la primera etapa de metástasis como un supresor por la limitación de necrosis tumoral, contribuyendo a la disminución de la invasión de células cancerosas hacia otros tejidos. Sin embargo, en estadios avanzados de metástasis, la autofagia promueve la supervivencia celular y la formación de metástasis en sitios diferentes (Aredia et al., 2012).

### 1.4.3 Necroptosis.

El término necroptosis se refiere a la muerte celular por necrosis programada, este tipo de muerte mantiene características similares a la necrosis ya que se presenta inflamación celular, deterioro de mitocondrias, permeabilización de la membrana plasmática y la posterior liberación del contenido al espacio extracelular generando inflamación del tejido adyacente (Baeza, 2014). La Necroptosis es promovida por la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), receptores de células T, receptores tipo Toll, agentes del metabolismo celular, genotóxicos y anticancerígenos (Su et al., 2015). La necroptosis se

encuentra regulada por la actividad del Receptor de Proteínquinasa 1 (RIPK1) y Receptor de Proteínquinasa 3 (RIPK3) que en unión a la caspasa-8 inhibida terminan ejecutando la muerte de la célula (Remijisen et al., 2014). Los miembros de la familia de TNF son poderosas proteínas que inducen necroptosis, TNF conforma un complejo proteico denominado necrosoma que está constituido por las proteínas RIPK-1, RIPK-3, MLKL, FADD, Caspasa-8 y FLICE (Remijisen et al., 2014; Su et al., 2015). Durante la formación del necrosoma se encuentran tres puntos de control (Figura 8): **1)** el E3 ligasa y el inhibidor de apoptosis celular cIAP1 y cIAP2 promueven la ubiquitinación de RIPK-1 que bloquea a la necroptosis mediante NF- $\kappa$ B dependiente o independiente. **2)** Cuando se activa la Caspasa-8 se separa e inhibe las actividades de RIPK-1, RIPK-3 y CYLD donde RIPK-1 y RIPK-2 pierden sus capacidades de fosforilación. **3)** En este punto de control la limitación de RIPK-1 y RIPK-3 se da por la inhibición de la Caspasa-8 o de FADD donde MLKL se fosforila por RIPK-3 y es incorporado al necrosoma (Christofferson et al., 2012; Su et al., 2015).

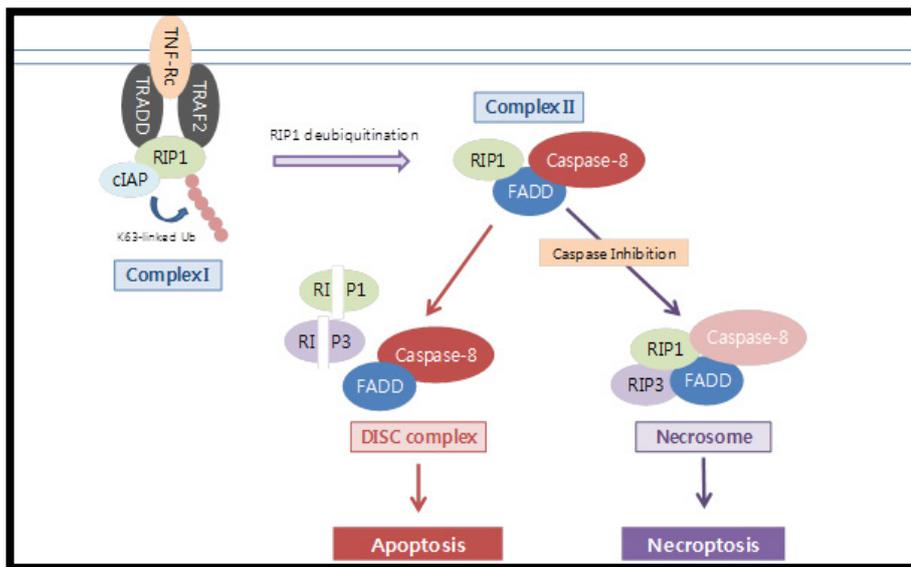


Figura 8: NECROPTOSIS: mecanismos de punto de control durante el proceso necroptótico.

Fuente: (University., 2012)

#### 1.4.4 Senescencia

Este tipo de proceso se refiere al estado permanente de la célula cuando ésta no responde a señales exógenas o endógenas, es decir, el crecimiento celular se reduce paulatinamente hasta perder irreversiblemente la capacidad de proliferación. Las células senescentes por un lado contribuyen a la eliminación de células dañadas y por otro pueden causar la pérdida de la proliferación imposibilitando la regeneración de tejidos y llevando finalmente a la

muerte de la célula. Esto mantiene relación con el envejecimiento, ya que los telómeros se acortan cada vez que la célula se divide e incluso debido a los daños que el ADN recibe, lo cual conlleva a la detención del ciclo celular. La senescencia ha sido considerada como un proceso predominante en las células cancerígenas contribuyendo como un mecanismo de defensa contra la progresión del cáncer (Cueva, 2014; Zhao, Chen, & Qu, 2016).

#### **1.4.5 Catástrofe mitótica**

El término hace referencia a un tipo de muerte celular que se produce cuando la célula entra prematura o indebidamente en mitosis, este proceso puede darse durante o después de la mitosis siendo un mecanismo de oncosupresión para la célula, éste hecho puede producir alteraciones morfológicas, principalmente la despolarización de los microtúbulos. La catástrofe mitótica puede llevarse a cabo cuando la célula no está en la capacidad de detener el ciclo celular en fase G<sub>2</sub> y por lo tanto entra en mitosis antes que la reparación de ADN se haya dado con éxito. Finalmente la célula puede presentar una morfología necrótica o apoptótica (Baeza, 2014; Cueva, 2014).

#### **1.4.6 Oncosis.**

Su término se deriva del griego *onkos* que significa “hinchazón” este tipo de muerte se caracteriza por presentar un aumento en el tamaño de la célula debido a la excesiva permeabilidad y la escasa integridad de la membrana citoplasmática, teniendo en común la muerte por “necroptosis” debido a la acumulación de Na<sup>+</sup> en el citoplasma provocando un incremento del volumen celular y formando a la vez vesículas en la membrana que inducen a su destrucción (Baeza, 2014; Cueva, 2014; Toro, 2006).

#### **1.4.7 Piroptosis.**

“*Pyroptosis*” proviene del griego *Pyro* que significa “fuego” y *Ptoxis* “caer”; denominándose “la caída del fuego”, este significado hace referencia al mecanismo de respuesta inmunitaria donde se ven inmersos procesos de señalización química pro-inflamatorios dando como resultado fiebre e inflamación que conllevan a la lisis celular y la expulsión del contenido citoplasmático al espacio extracelular (Baeza, 2014). Esta ruta de muerte es dependiente de caspasa-1 ya que no se encuentra implicada en la muerte celular por apoptosis y cuya función es ser la proteína precursora de las citoquinas inflamatorias. Si la célula muere por esta vía el núcleo presentará condensación de la cromatina y fragmentación de ADN y en la membrana se verán protuberancias redondeadas que luego causarían la rotura completa de la membrana celular dejando libre el contenido

citoplasmático. La piroptosis se da principalmente en las células que están implicadas en la inflamación como los macrófagos (Baeza, 2014; Toro, 2006).

### **1.5 Medicina tradicional: una alternativa anticancerígena.**

En la actualidad la ciencia muestra importantes avances en cuanto a terapias anticancerígenas químicas u hormonales las cuales mantienen costos elevados teniendo muchas de las veces resultados desfavorables para los pacientes; sin embargo, las investigaciones de vanguardia presentan progresos en cuanto al desarrollo de fármacos de origen natural teniendo como objetivo principal la terapia anticancerígena (Velazques, 2013). La medicina tradicional se conoce a nivel mundial basándose principalmente en los conocimientos, creencias, habilidades y experiencias aplicadas para emitir un diagnóstico, prevención o tratamiento para cierta enfermedad en donde se emplean productos extraídos de toda la plantas, partes de ellas (hojas, flores, tallos, frutos) o bien la extracción de compuestos activos o metabolitos. Se estima que cerca del 80% de la población a nivel mundial emplea este tipo de medicina para el cuidado de su salud (Scovassi & Guamán, 2013).

Los productos de origen natural son de mucha importancia ya que cumplen un sinnúmero de funciones biológicas que sirven como terapia para tratar determinadas dolencias o como modelos para sintetizar sustancias nuevas bioactivas. En la actualidad, la síntesis orgánica junto con la química de productos naturales se encargan del desarrollo de nuevas moléculas de bajo peso molecular con actividad farmacológica; obteniendo de éste modo alrededor del 60% de fármacos a partir de extractos naturales (Ravelo & Braun, 2009).

El descubrimiento de fármacos de origen natural cumple un rol importante en todos los ámbitos de la salud; sin embargo, en la actualidad uno de los principales propósitos de la medicina tradicional es encontrar tratamientos específicos y eficaces contra el cáncer teniendo en cuenta como dianas terapéuticas únicamente las células cancerosas y no las células normales (Cueva, 2014). encontrándose entre los fármacos conocidos a los alcaloides de la vinca, paclitaxel, campotensina, etopósido y tenipósido, sin embargo estos antineoplásicos aun no logran ser específicos en el tratamiento, por lo que se requiere conocer los mecanismos del ciclo y muerte celular para crear tratamientos definidos y adaptados a nivel molecular (Velazques, 2013).

### 1.5.1 Moléculas de origen natural contra el cáncer de mama.

Debido a los factores de riesgo, el cáncer de mama continúa siendo un problema de salud importante ya que año tras año causa miles de muertes en todo el mundo. En la actualidad, existen varios estudios realizados con moléculas de origen natural que muestran eficacia contra el cáncer de mama, teniendo entre las que podemos mencionar:

- 1) Daidzen: es un compuesto derivado de las isoflavonas que ha sido motivo de estudio por su contenido de Fitoestrógeno el cual es un compuesto fenólico que se asemeja al estradiol producido en los mamíferos, este compuesto se encuentra en la soja y frutos secos; molecularmente interviene en el ciclo celular por detención de la fase G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> promoviendo así la apoptosis (Jin, Zhang, Kang, Wang, & Zhao, 2010). Otros derivados de las isoflavonas son la genisteína y gliciteína, que del mismo modo se encuentran principalmente en la soja y actúan sobre células de cáncer de mama (Tobin, Kalupahana, & Kulka, 2012).
- 2) Curcumina: es un polifenol derivado de la especie *Cúrcuma longa*, la cual ha sido estudiada por su actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama ya que brinda un efecto regulador sobre el ciclo celular, inactivando la capacidad de la telomerasa, alterando la estructura del huso mitótico, disminuyendo la expresión de Ciclina D1 y CDK4 e induciendo apoptosis. De esta manera el compuesto puede inhibir la metástasis y evitar la progresión del cáncer (Tobin et al., 2012).
- 3) Plumbagina: constituye un derivado de la especie *Drosera sp.* y *Plumbago sp.* que muestra actividad antineoplásica en varios tipos de cáncer mediante la inducción de apoptosis por activación de caspasas, demostrando a la vez que en cáncer de mama promueve la muerte celular por sobreexpresión de HER2 (Choene et al., 2012).

### 1.5.2 Aislamiento y actividad biológica de la molécula “[*(e)* -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acrilóil) -2-metil-2h-cromen-2-il) butan-2-ona]”.

El término chalcona procede del griego “Chalcos” que significa bronce. Las chalconas son llamadas cetonas aromáticas y comparten un patrón estructural conformado por 1, 3-difenil-2-propen-1-ona, cuya síntesis se da por la condensación de un aldehído con una cetona mediante la reacción de Claisen-Schmidt. Los flavonoides son polifenoles que tras isomerización pueden dar lugar a la formación de compuestos como las chalconas, los cuales se emplean en diversos estudios por su importante actividad antifúngica, antiinflamatoria, antidepresiva y anticancerígena (Ramirez et al., 2012).

Un género importante en cuanto al contenido de chalconas es el *Azorella* ya que tiene alrededor de 70 especies principalmente en América Central, oeste de América del Sur y en las islas del Océano Antártico, la mayor parte de las especies se encuentran en las montañas chilenas, éstas son utilizadas en la medicina tradicional como tratamientos para el asma, resfriados, heridas, bronquitis y enfermedades inflamatorias (Quesada et al., 2013). Las especies son reconocidas por la producción de diterpenoides y esqueletos azorellanos cuyas estructuras son importantes por sus actividades biológicas como antiprotozoario, antiviral, espermicida, citotóxico, analgésico, antiinflamatorio, antituberculoso y antihiperlipémico (Molina-Salinas et al., 2010).

Recientemente, San-Martín et al., (2015) describieron el aislamiento y caracterización de una nueva chalcona obtenida de la especie *Azorella madreporica* destacada por ser fuente de diterpenos activos. El proceso se lo realizó empleando el extracto hexánico en una columna de sílice obteniendo como producto 15 mg del nuevo compuesto denominado [(E)-4-(5-hidroxi-6-(3-(4-hidroxifenil)acriloil)-2-metil-2H-cromen-2-il)butan-2-ona] (NChal), (Figura 9) logrando como resultados del análisis biológico: inactividad sobre bacterias, ensayo de radicales libres DPPH con una  $IC_{50}$  correspondiente a  $17.2 \pm 1.5$  g/ml, y análisis antitumoral en donde el compuesto presentó, a través del ensayo MTS, la capacidad de disminuir la proliferación de células de cáncer de colon, de mama y de próstata (San-Martín et al., 2015). Con éste estudio se ha podido destacar la capacidad de la nueva molécula para contrarrestar ciertos tipos de cáncer promoviendo así el análisis de nuevos fitofármacos frente a dianas específicas como posibles tratamientos antitumorales.

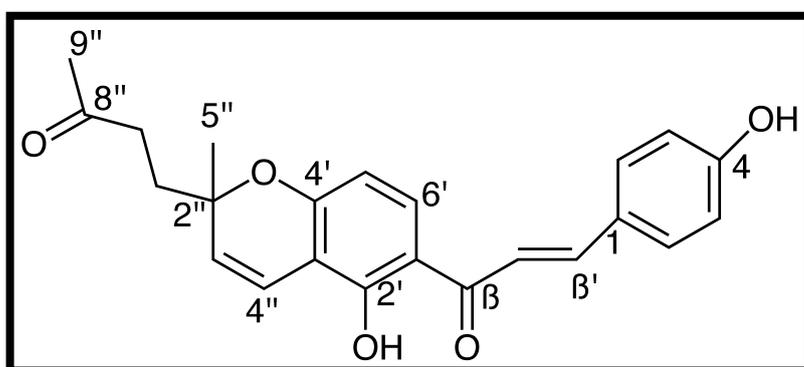


Figura 9: ESTRUCTURA DEL COMPUESTO: [(E)-4-(5-hidroxi-6-(3-(4-hidroxifenil)acriloil)-2-metil-2H-cromen-2-il)butan-2-ona]

Fuente: (San-Martín et al., 2015)

## **CAPÍTULO II FIN DEL PROYECTO.**

## **2.1 Objetivo general del proyecto.**

Determinar la activación por la molécula de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular, tales como puntos de control de crecimiento y proliferación celular, regulación de ADN y muerte celular.

## **2.2 Objetivos específicos del proyecto.**

- Describir la capacidad del metabolito [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acriloil) -2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona] como antitumoral en células de cáncer de mama.
- Demostrar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama expuestas al metabolito [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acriloil) -2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona] en diferentes dosis mediante la técnica de Western Blot.

### **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.**

### **3.1 Molécula de estudio.**

Para la ejecución de los ensayos se empleó la molécula denominada [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3-(4-hidroxifenil) acriloil) -2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona] (NChal); la cual fue aislada y donada por el Dr. Aurelio San-Martín de la Facultad de Ciencias del Departamento de Química de la Universidad Santiago de Chile. La molécula fue disuelta a una concentración Stock de 10.000  $\mu\text{M}$  en dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenada a 8°C.

### **3.2 Cultivo celular.**

Se utilizó la línea celular MCF-7, que corresponde a cáncer de mama como modelo biológico. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (GIBCO), y 1% de Antibiótico-Antimicótico (100 U/ml de Penicilina G, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Estreptomina y 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Amphotericina B) (GIBCO). Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda y  $\text{CO}_2$  al 5%. El tiempo de replicación celular es de 24 horas.

### **3.3 Extracción y cuantificación de proteínas.**

Para la realización del ensayo se partió del cultivo celular con una confluencia del 80%, y se sembró  $5 \times 10^5$  células en cajas de 25  $\text{cm}^2$  en medio RPMI-1640 suplementado. Se incubó por 24 h, correspondientes a un ciclo de replicación, aplicando subsecuentemente el tratamiento con la molécula NChal a las concentraciones de 12.5, 18.75 y 37.5  $\mu\text{M}$ , además de un respectivo control negativo (células sin tratamiento) y se incubó por 24 h adicionales. Transcurrido éste tiempo, en cadena de frío, se recolectó el medio de cultivo en un tubo de 15mL (A) y se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 r.p.m., seguidamente se lavó las cajas con 2mL de PBS frío y se repitió este proceso por dos veces. Se les añadió 2mL de PBS con inhibidores de proteasas a las células (10  $\mu\text{L}$  de PMSF 100mM, por cada 1mL) y se recolectó por raspado las células en un tubo de 15 mL (B). Luego se añadió una vez más 1mL de PBS con inhibidores proteasas a la caja de cultivo, volviendo a raspar para recolectarlo en el tubo B correspondiente, repitiendo una vez más este proceso. Seguidamente se centrifugaron los tubos A y B a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Tanto del tubo A y B, luego del último lavado se resuspendió con 500  $\mu\text{L}$  de PBS con los inhibidores y fueron recolectados a un microtubo de 1.5 mL. Los tubos fueron centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Se adicionó el buffer de lisis (RIPA con los inhibidores 1mL por cada 10.000.000 de células) de acuerdo al número de células encontradas por caja. Seguidamente se dejó en agitación los microtubos durante 15 min a 4°C y se alicuotó los extractos proteicos a una temperatura de -80 °C hasta su posterior uso (Inc. Bio-Rad Laboratories., 2000).

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método de Bradford; donde, en una placa de 96 pocillos se usó por cada pocillo 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra más 145  $\mu\text{L}$  de reactivo Bradford, se

mantuvo durante 15 minutos en oscuridad para luego cuantificar las proteínas mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm y un tiempo de agitación de 15 segundos, determinando de esta manera la concentración de proteína al emplear en cada ensayo.

### **3.4 Western Blot.**

Se utilizó una concentración de 30 µg de proteína, la cual se separó mediante SDS-PAGE (SDS-Poliacrilamide gel electrophoresis). Se preparó una gel a un porcentaje del 5% como concentrador y al 12 % y 15 % (dependiendo del tamaño de la proteína de análisis) como separador, dejando un tiempo de corrida inicial de 15 minutos a 100 V y 65 mA de de 100 V, 35 mA y 180 minutos (aproximadamente). Luego del proceso de corrida, se transfirió el gel a una membrana de PVDF (polivinilideno) formando un “sándwich” y dejando sobre el buffer correspondiente correr a 4°C en las condiciones de 100 V, 360 mA y 60 minutos. Una vez terminada la transferencia se comprobó el proceso mediante la tinción de la membrana con colorante rojo Ponceu SIGMA, luego se lavó con TBS-TWEEN 1x para eliminar restos del colorante y se procedió al bloqueo de la membrana con leche semidescremada Svelty NESTLÉ al 5% por 60 minutos.

Pasado el tiempo de bloqueo se lavó la membrana con TBS-TWEEN 1X y se procedió a incubar con el anticuerpo primario a temperaturas de 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y se lavó la membrana con TBS-TWEEN 1x 3 veces durante 5 minutos y con TBS 1X dos veces por 10 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario específico de cada proteína disuelto en leche Svelty (NESTLÉ) al 5% durante 2 horas protegido totalmente de la luz. Posteriormente se procedió a lavar la membrana con TBS-TWEEN 1X durante 5min por 3 veces y TBS1X durante 10 min por 2 ocasiones. Inmediatamente se realizó el revelado (en completa oscuridad) con Quimioluminiscente Luminata Crescendo Western HRP substrate (MERCK MILLIPORE). La señal quimioluminiscente de las proteínas junto con el sustrato fue capturada en una película de revelado correspondiente.

*Visualizar los anticuerpos empleados en el Anexo 1.*

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS**

Mediante la extracción y cuantificación de proteínas a partir de células de cáncer de mama MCF-7 se desarrolló el análisis proteico mediante Western Blot, donde podemos observar que NChal aplicada a dosis de 12.5, 18.75 y 37.5  $\mu\text{M}$  por 24 horas de tratamiento fue capaz de modular la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la muerte y control del ciclo celular. Con ello se pudo descartar la muerte celular por apoptosis ya que, como se muestra en la Figura 10, las proteínas que juntas conforman un complejo BAX/BCL-2 se encuentran en equilibrio debido a que, por un lado ni BAX se incrementa y ni BCL-2 disminuye en su expresión con respecto al control negativo y dosis aplicadas en ambos casos, por lo que el mecanismo de apoptosis no se activa con el respectivo tratamiento. En el caso de la expresión de la proteína MAPLC-3  $\beta/\alpha$  con respecto al control se presenta un incremento de bandas en relación a las dosis aplicadas, dando como resultado la muerte celular por autofagia (Figura 10).

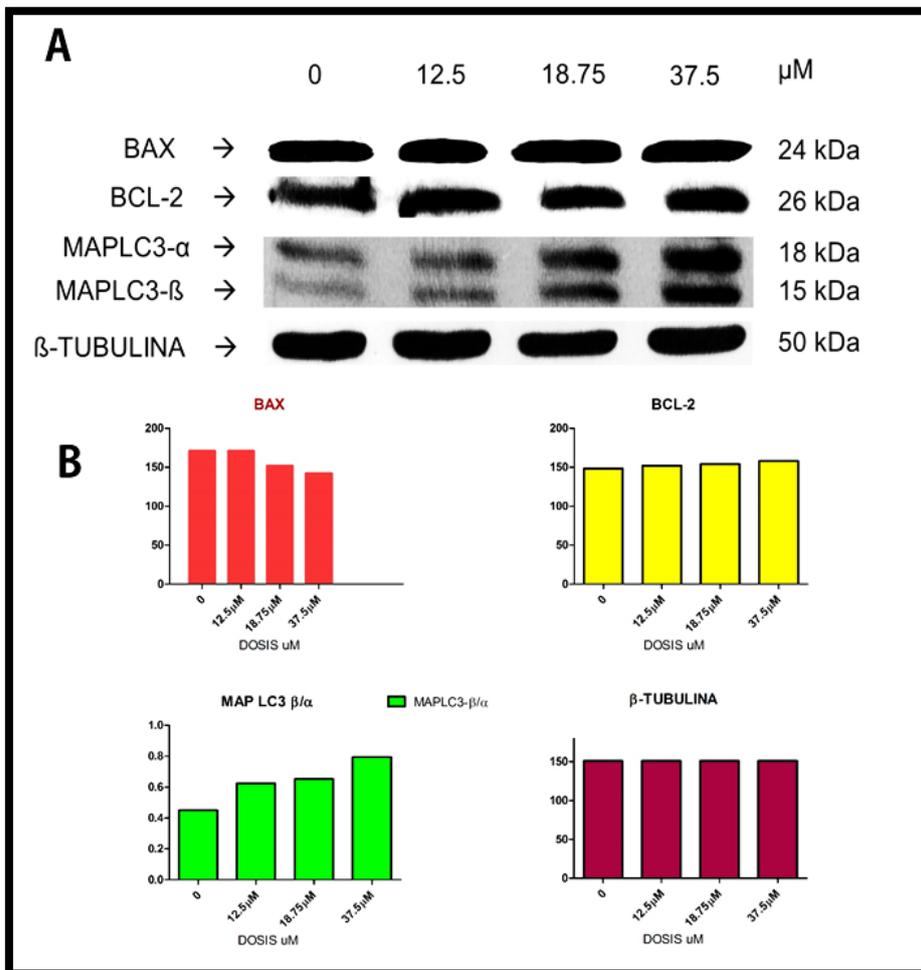


Figura 10: Proteínas BAX, BCL-2, MAPLC-3  $\beta/\alpha$ . A: Proteínas separadas por un gel 12-15% de SDS-PAGE seguida de Western Blot con los anticuerpos indicados contra BAX, BCL-2, MAPLC-3  $\beta/\alpha$ . Se utilizó  $\beta$ -tubulina como control de carga para los extractos celulares totales. B: Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-DiGit Blot Scanner.

Fuente: Autor.

Por otra parte, en la Figura 11 se muestra la modulación de ciertas proteínas de la familia de p53, donde se puede denotar que las células cumplen un proceso dependiente de p73 como regulador de muerte celular.

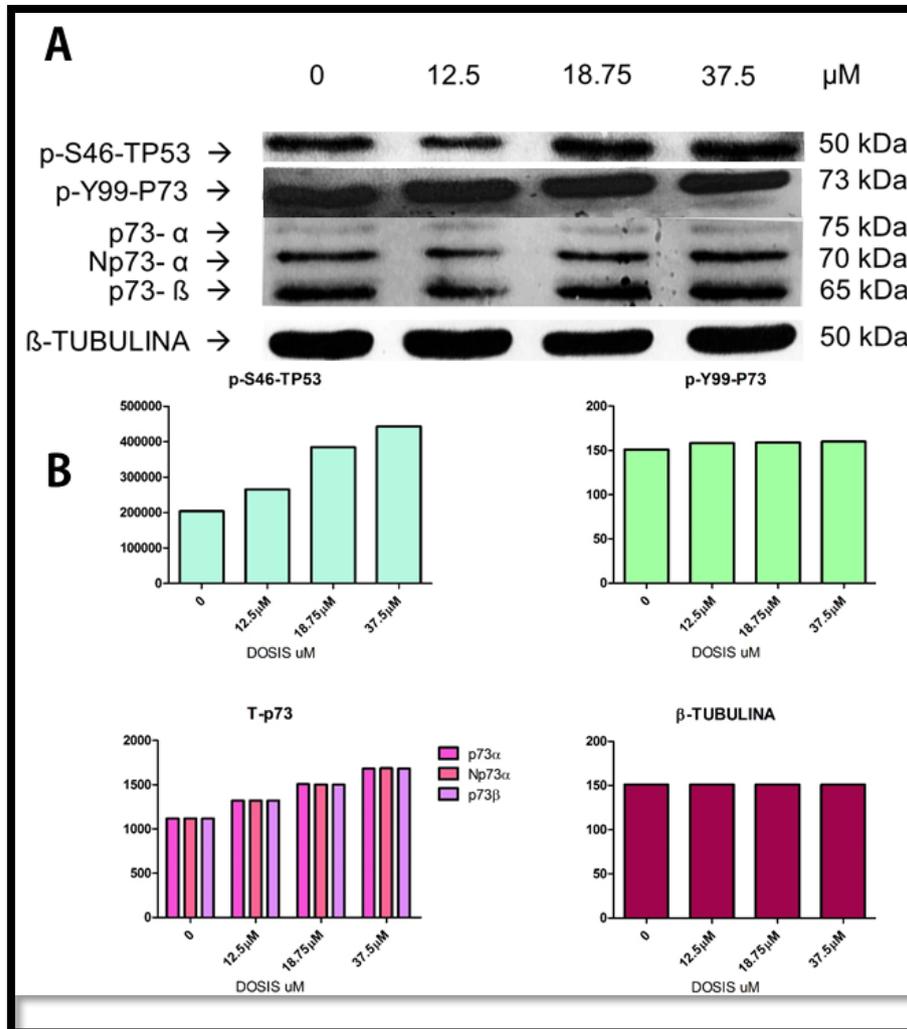


Figura 11: Proteínas p-S46-Tp53, p-Y99-P73, Tp73. A: Proteínas separadas por un gel 12-15% de SDS-PAGE seguida de Western Blot con los anticuerpos indicados contra p-S46-Tp53, p-Y99-P73, Tp73 (p73α, Np73 α, p73β). Se utilizó β-tubulina como control de carga para los extractos celulares totales. B: Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-DiGit Blot Scanner.

Fuente: Autor.

En la Figura 12 se muestra claramente que NChal induce la expresión y aumento de las proteínas reguladoras de muerte por necroptosis como son RIPK-1 y RIPK-3, así como el incremento de la proteína reguladora del ciclo celular CDKN1A (p21), revelando que las células de cáncer de mama tratadas con NChal toman como ruta principal de muerte celular la vía de necroptosis manteniendo una respuesta dosis-dependiente; por otro lado, la

determinación de Caspasa-8 muestra que las células expuestas a NChal son capaces de expresar y activar varias proteínas a la vez de una misma ruta de muerte celular.

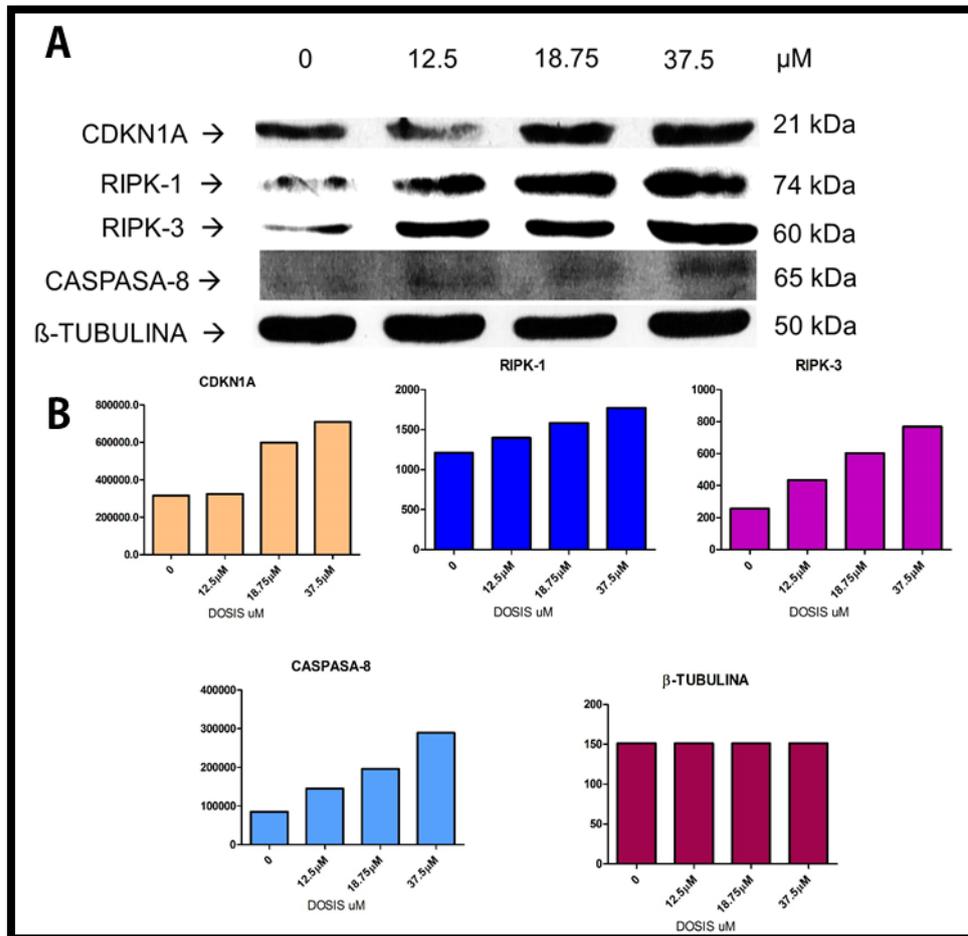


Figura 12: Proteínas CDKN1-A, RIPK-1, RIPK-3 y Caspasa-8 A: Proteínas separadas por un gel 12-15% de SDS-PAGE seguida de Western Blot con los anticuerpos indicados contra CDKN1-A, RIPK-1, RIPK-3 y Caspasa-8. Se utilizó β-tubulina como control de carga para los extractos celulares totales.

B: Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-DiGit Blot Scanner.

Fuente: Autor.

Finalmente, en la Figura 13, se observa que NChal no produce roturas en el ADN ni daño genotóxico debido a que las proteínas del núcleo celular como las histonas (γH2AX y p-S139-γ-H2A.X) presentan un ligero incremento respecto a la dosis aplicadas, confirmando que la molécula podría inducir la reparación del material genético dañado en la línea tumoral y verificando que no causa alteraciones en el núcleo celular.

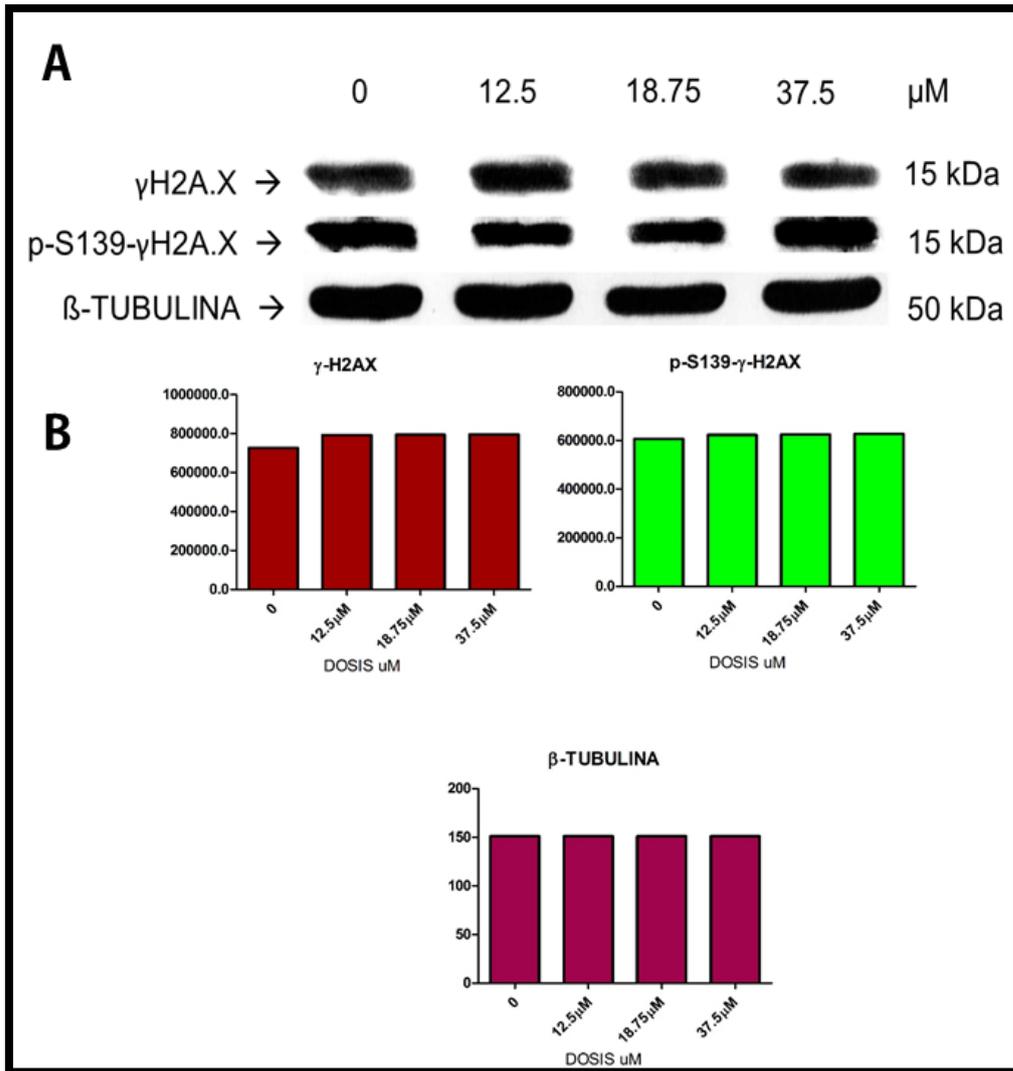


Figura 13: Proteínas  $\gamma\text{-H2AX}$  & p-S139- $\gamma\text{-H2AX}$ . A: Proteínas separadas por un gel 12-15% de SDS-PAGE seguida de Western Blot con los anticuerpos indicados contra  $\gamma\text{-H2AX}$  & p-S139- $\gamma\text{-H2AX}$ . Se utilizó  $\beta\text{-tubulina}$  como control de carga para los extractos celulares totales. B: Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-DiGit Blot Scanner.

Fuente: Autor.

## **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

Las chalconas presentan un potencial anticancerígeno interesante relacionando su estructura-actividad, determinando que la conformación molecular contribuye relativamente a la citotoxicidad de la moléculas frente a dianas celulares como quinasas, catepsinas, topoisomerasas, entre otros (Zhou et al., 2016).

Partiendo del aislamiento y caracterización de NChal en el año 2015 y debido a la actividad biológica que ha presentado frente a células de cáncer de mama se analizó a nivel proteico qué rutas de muerte estarían cursando las células frente al tratamiento con la nueva molécula. Como se muestra en la Figura 10, BAX, proteína encargada de la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación al citoplasma de citocromo c para la ejecución de apoptosis (Youle & Strasser, 2008), en ésta no se determina un aumento de bandas con relación al control de carga y dosis aplicadas. En antagonismo a ello, se encuentra Bcl-2 cuya función se centra en el bloqueo de la apoptosis debido a que inhibe la formación de los poros mitocondriales y la liberación de citocromo c (Jordán, 2003; Rossé et al., 1998; Youle & Strasser, 2008), por lo que en nuestro resultado esta proteína no presenta mayores cambios de expresión, determinando por ende que el complejo regulador de apoptosis conformado por BAX/BCL-2 no se encuentra alterado en las células de cáncer de mama expuestas a NChal mostrando que la apoptosis no es opción como muerte celular. Según Rozmer & Perjési, 2016, la Isoliquiritigenina, un derivado de las chalconas, tras ensayos de citometría de flujo, mostró la capacidad de inducir apoptosis y causar la detención del ciclo celular mediante un mecanismo controlado por la familia de p53 en células MCF-7. Permitiéndonos deducir que NChal actúa de manera diferente a otras chalconas reportadas.

En la Figura 10 se observa también el resultado de la expresión de MAPLC-3  $\beta/\alpha$  una proteína reguladora del proceso de autofagia que una vez activada su forma lipidada es un marcador específico para la formación del autofagosoma y desencadenar por consiguiente la autofagia de la célula (Aredia et al., 2012). En nuestro trabajo, la forma lipidada de MAPLC-3  $\beta/\alpha$  presentó un incremento de la expresión a las dosis aplicadas, señalando que las células MCF-7 frente al tratamiento responden a la activación de la ruta de muerte autofágica. Hasta la actualidad no se ha reportado aún que los compuestos derivados de las chalconas puedan inducir la expresión de proteínas implicadas en autofagia. Estos resultados nos permiten decir que probablemente la molécula NChal está contribuyendo a que las células MCF-7 activen a MAPLC-3  $\beta/\alpha$  con la finalidad de no producir autofagia sino de permitir la supervivencia de la célula, esto debido a que se ha descrito que en condiciones de estrés la formación de

autofagosomas en las células se lleva a cabo no solo para la pérdida de viabilidad sino para que la célula sobreviva (Rahman et al., 2016).

En la Figura 11, se muestra el resultado de la expresión proteica inducida por NChal en los miembros de la familia de p53. Los miembros de esta familia intervienen en la regulación de la homeostasis metabólica y son de gran importancia en la inhibición de la carcinogénesis (Berkers et al., 2013). p53 se encuentra en niveles bajos en la célula y en respuesta a daños en el ADN, estrés u oxidación, se activa para impedir la progresión del ciclo celular e inducir la senescencia de la célula o a su vez apoptosis; estas funciones están relacionadas en gran parte con la fosforilación de p53 en la serina 46 (Ser46), ya que como resultado su forma fosforilada puede activar selectivamente otros genes tanto apoptóticos y no-apoptóticos (Pietsch, Sykes, McMahon, & Murphy, 2008). En nuestro estudio (Figura 11) la forma fosforilada de p53 y p73, junto con sus isoformas, incrementan de acuerdo a las dosis aplicadas de tratamiento, por lo que la molécula en estudio está en la capacidad de activar esta familia de proteínas no como desencadenantes de muerte por apoptosis, sino como reguladores del ciclo celular. De hecho, varios autores describen que estas proteínas pueden regular la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular; y a la vez, pueden regular negativamente las funciones de cada uno (Collavin, Lunardi, & Del Sal, 2010; Pietsch et al., 2008), como es el caso de p73 cuya sobreexpresión en nuestro caso de acuerdo a las dosis, regula la baja actividad de p53 y reduce su capacidad pro-apoptótica, ocasionando que las células tomen otras rutas de muerte como es la autofagia; ya que, según Sharif et al., 2015 p73 es capaz de modular la autofagia en las células de cáncer de mama independientemente de la activación de p53.

Como se muestra en la Figura 12, las células MCF-7 expuestas a dosis crecientes de NChal también son capaces de expresar proteínas inmersas en el ciclo celular y muerte por necroptosis. Por un lado tenemos a p21, que regula negativaente la progresión del ciclo celular y cuya sobreexpresión conlleva a la detención del ciclo en las fases G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e incluso en fase S luego de presentarse daños en el ADN. p21 está regulada a nivel transcripcional por procesos dependientes e independientes de la familia de p53 (Cueva, 2014). Por otra parte, la expresión y activación de las proteínas RIPK-1, RIPK-3 y Caspasa-8 conllevan a las células a morir mediante el mecanismo de necroptosis. RIPK-1 y RIPK-3 interactúan entre sí cuando son estimuladas con un tratamiento necroptótico, conduciendo a la célula hacia la muerte. En la Figura 12 se puede ver la expresión de las proteínas p21, RIPK-1, RIPK-3 y Caspasa-8 presentando un incremento de bandas y cuantificación en relación a las dosis aplicadas; en cada caso, manteniendo una respuesta dosis-dependiente. Estas evidencias nos permiten corroborar en nuestro estudio que las células MCF-7 luego de 24 horas de tratamiento con

NChal son capaces de inducir la expresión de proteínas de muerte celular necroptótica y de detener del ciclo celular.

En el presente año, según varios autores, se ha demostrado también que derivados de las chalconas como Licocalcona A, Isoliquiritigenina, Xantohumol y Dehydrocycloanthohumol son capaces de inducir en las células MCF-7 efectos citotóxicos, antiproliferativos e inhibidores del ciclo celular; confiriéndoles a estas moléculas características quimioterapéuticas, determinando que las chalconas podrían presentar un gran potencial anticancerígeno, principalmente sobre el el cáncer de mama (Zhou et al., 2016).

En la actualidad no existen datos de la expresión de proteínas nucleares, como las histonas, a causa de los derivados de chalconas analizadas, desconociendo por lo tanto si las moléculas causan o no daño genotóxico especialmente en células tumorales de mama (Qi, Zhang, Baller, & Voytas, 2016; Rozmer & Perjési, 2016; Zhou et al., 2016). Debido a ello, en nuestro trabajo se analizó los efectos del tratamiento con NChal en proteínas nucleares como histonas:  $\gamma$ H2AX y su fosforilación p-S139-HISTONA-H2A.X (Figura 13), donde se pudo observar que NChal es capaz de inducir la expresión de las histonas, permitiéndole que la célula responda al daño inducido en el ADN activando los mecanismos de reparación.

Se puede afirmar finalmente que el fenotipo de muerte que presentan las células MCF-7 inducidas por NChal está relacionado con la vía necroptótica, detención del ciclo celular y autofagia, debido al incremento de las proteínas reguladoras de estas tres diferentes vías como son RIPK-1, RIPK-3, p21, p73 y MAPLC-3  $\beta/\alpha$ . De esta manera deducimos que nuestros análisis comprueban que la molécula NChal, aislada de *Azorella madreporica*, aplicada a dosis de 12.5, 18.75 y 37.5  $\mu$ M, es capaz de inhibir el crecimiento en la línea celular MCF-7 induciendo la muerte celular por necroptosis y autofagia, además de intervenir en la detención del ciclo celular demostrando su actividad citotóxica y genotóxica por medio de un proceso regulado por p73 manteniendo relación dosis-dependiente en cada caso. Estos resultados son comparables con estudios actuales donde se describe que algunas chalconas son capaces de activar las proteínas relacionadas con la necroptosis y autofagia; siendo responsables de la supresión de la apoptosis y así conformar un sesgo de necroptosis (Chen, Yu, & Zhang, 2016). De este modo se puede determinar que NChal es una molécula efectivamente activa y con la capacidad de ser un posible fitofármaco específico para el tratamiento del cáncer de mama.

## CONCLUSIONES

NChal obtenida a partir de la especie *Azorella madreporica* es capaz de: inducir la muerte de la línea celular MCF-7 mediante necroptosis y autofagia, así como bloquear la progresión del ciclo celular por un mecanismo de regulación dependiente de p73 manteniendo una relación dosis-respuesta.

NChal es una molécula activa capaz de provocar efectos citotóxicos y genotóxicos en las células MCF-7, siendo un compuesto natural efectivo para contrarrestar el cáncer de mama por sus actividades antiproliferativas.

## BIBLIOGRAFÍA:

- America Cancer Society. (2014a). Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos, 40. Retrieved from <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036792.pdf>
- America Cancer Society. (2014b). What are genes ? Gene mutations. *National Society of Genetic Counselors (NSGC)*, 10.
- American Cancer Society. (2015). Cancer Facts & Figures 2015. *Cancer Facts & Figures 2015*, 1–9. <http://doi.org/10.1097/01.NNR.0000289503.22414.79>
- Aredia, F., Guamán Ortiz, L. M., Giansanti, V., & Scovassi, A. I. (2012). Autophagy and Cancer. *Cells*, 1(4), 520–534. <http://doi.org/10.3390/cells1030520>
- Baeza, R. (2014). Diecinueve Formas De Morir Las Células.
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumor Biology*, 35(5), 3981–3995. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-1649-y>
- Baker, Marc and Diaz, S. (2013). PROTOONCOGENES, ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR (Un enfoque evolutivo), 1–15.
- Berkers, C. R., Maddocks, O. D. K., Cheung, E. C., Mor, I., & Vousden, K. H. (2013). Metabolic Regulation by p53 Family Members. *Cell Metabolism*, 18(5), 617–633. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.019>
- Bravo, L., Cabrera, A., & Siguencia, C. (2014). Características clínicas y radiológicas de las mujeres de 40 años que se realizaron mamografía de screening en el Instituto del Cáncer SOLCA Cuenca, durante el periodo 2006-2011., 1–64.
- Chen, D., Yu, J., & Zhang, L. (2016). Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1865(2), 228–236. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003>
- Choene, M., Mthembu, N., Dlamini, Z., Mokgotho, M., Wachira, J., & Motadi, L. (2012). Breast cancer : Small molecules targeting apoptosis , a prospective approach to safe scientific success, 2012(November), 833–844. <http://doi.org/10.4236/abb.2012.37104>
- Christofferson, D. E., Li, Y., Hitomi, J., Zhou, W., Upperman, C., Zhu, H., ... Yuan, J. (2012). A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF $\alpha$  production. *Cell Death and Disease*,

- 3(6), e320. <http://doi.org/10.1038/cddis.2012.64>
- Collavin, L., Lunardi, A., & Del Sal, G. (2010). P53-Family Proteins and Their Regulators: Hubs and Spokes in Tumor Suppression. *Cell Death Differ*, 17(6), 901–911. <http://doi.org/cdd201035> [pii]r10.1038/cdd.2010.35
- Criollo, A. (2009). Regulación de la autofagia por el receptor del inositol trisfosfato ( IP 3 R ).
- Cueva, R. (2014). *Estudio de tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina en las células de Astrocitoma Cerebral (D-384)*.
- García Cornejo, C., Gamarra Cabezas, E., & Layana, D. (2005). Cáncer de Mama y Genes BCRA1 y BCRA2. *Medicina (Guayaquil)*, 10 (2), 156–158. Retrieved from <http://rmedicina.ucsg.edu.ec/archivo/10.2/RM.10.2.10.pdf>
- Gatica, D. (2012). *PAPEL DE HERP EN LA DEGRADACIÓN DE BECLIN-1 MEDIANTE EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA*. Universidad de Chile.
- Guaman Ortiz, L. M. (2012). Chronicles of a Silent Death : Apoptosis. *Research in Cell Biology*, 1(1), 1–7. <http://doi.org/10.5923/j.cellbiology.20120101.01>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hancock, J. F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(5), 373–84. <http://doi.org/10.1038/nrm1105>
- Herrero, G. (2008). *MECANISMOS MOLECULARES DE INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA POR TRAIL EN CÉLULAS EPITELIALES DE MAMA Y SU RELACIÓN CON APOPTOSIS Y TRANSFORMACIÓN ONCOGÉNICA*.
- Hyland, K. (2008). Tumor Suppressor Genes and Oncogenes : Genes that Prevent and Cause Cancer. *Molecular Biology of the Cell; 5th Edition, Garland Science*, Chapter 20; Cancer, pp.1230–1256.
- Inc. Bio-Rad Laboratories. (2000). No Title.
- 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. *Annals of Oncology*, 21(2), 263–268. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdp499>
- Jordán, J. (2003). Apoptosis : muerte celular programada. *Apoptosis*, 22(4), 253–275. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.009>
- Lizarbe Iracheta, M. A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 101(2), 1–33.

- Maldonado, A. C. (2010). *MECANISMOS MOLECULARES DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR PRIVACION DE GLUCOSA*.
- Meza, J., Montaña, A., & Aguayo, Á. (2006). Las Bases Moleculares del Cáncer. *Acta Universitaria*, 16(1), 40–49.
- Molina-Salinas, G. M., Bórquez, J., Ardiles, A., Said-Fernández, S., Loyola, L. A., Yampuc, A., ... Peñafra-Rodríguez, L. M. (2010). Bioactive metabolites from the Andean flora. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Phytochemistry Reviews*, 9(2), 271–278. <http://doi.org/10.1007/s11101-010-9162-4>
- Montenegro, D. M. (2013). Influencia de los factores de riesgo de cancer de mama en las pacientes atendidas en la Sociedad Oncológica de Lucha Contra el Cáncer-Loja durante el periodo 2000-2007., 110.
- Moruno, J. F. (2010). *Regulación de la degradación intracelular de proteínas por glucosa*.
- Pérez, M. O., & Peña, C. M. M. (2011). Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *Iatreia*, 24(4), 389–401.
- Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B., & Murphy, M. E. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*, 27(50), 6507–6521. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.315>
- Qi, Y., Zhang, Y., Baller, J. A., & Voytas, D. F. (2016). Histone H2AX and the small RNA pathway modulate both non-homologous end-joining and homologous recombination in plants. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 783, 9–14. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.12.002>
- Quesada, L., Gutierrez, M., Astudillo, L., San-Martin, A., Fuentes, E., Palomo, I., & Ailillo, P. (2013). Determination of antibacterial, antioxidant, antiplatelet and inhibition of cholinesterase activities from the methanolic extracts of Azorella species (Apiaceae). *Bol. Latinoam. Caribe ...*, 12(1), 99–107. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=722512&indexSearch=ID>
- Rahman, M. A., Bishayee, K., Habib, K., Sadra, A., & Huh, S.-O. (2016). 18 $\alpha$ -Glycyrrhetic acid lethality for neuroblastoma cells via de-regulating the Beclin-1/Bcl-2 complex and inducing apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 117, 97–112. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.08.006>
- Rajasekharan, S., & Raman, T. (2013). Ras and Ras mutations in cancer. *Open Life Sciences*, 8(7), 609–624. <http://doi.org/10.2478/s11535-013-0158-5>

- Ramirez, E., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A., & Silva, S. (2012). Synthesis and biological activity of chalcones.
- Ravelo, Á. G., & Braun, A. E. (2009). Relevancia De Los Productos Naturales En El Descubrimiento De Nuevos Fármacos En El S. Xxi. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 103(2), 409–419.
- Remijnsen, Q., Goossens, V., Grootjans, S., Van den Haute, C., Vanlangenakker, N., Dondelinger, Y., ... Vandenaabeele, P. (2014). Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis*, 5(1), e1004. <http://doi.org/10.1038/cddis.2013.531>
- Ríos, M. de los A., & Hernández, M. (2001). Los genes ssupresores de tumores y el cáncer. *Revista Cubana de Oncología*, 17(1), 65–71. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Instituto+Nacional+de+Oncolog?a+y+Radiobiolog?a#0>
- Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., ... Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391(6666), 496–499. <http://doi.org/10.1038/35160>
- Rozmer, Z., & Perjési, P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 15(1), 87–120. <http://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8>
- San-Martín, A., Donoso, V., Leiva, S., Bacho, M., Núñez, S., Gutierrez, M., ... Cazar, M.-E. (2015). Molecular Docking Studies of the Antitumoral Activity and Characterization of New Chalcone, 1–7.
- Scovassi, I., & Guamán, L. M. (2013). Traditional Medicine: An Ancient Remedy Rediscovered. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 02(1), 2–4. <http://doi.org/10.4172/2167-0501.1000110>
- Sharif, T., Ahn, D.-G., Liu, R.-Z., Pringle, E., Martell, E., Dai, C., ... Lee, P. W. K. (2015). The NAD<sup>+</sup> salvage pathway modulates cancer cell viability via p73. *Cell Death and Differentiation*, 1–12. <http://doi.org/10.1038/cdd.2015.134>
- SOLCA-Guayaquil. Registro de Tumores, 2010. (2010). SOLCA-Registro de Tumores.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14(1), 48. <http://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
- Tobin, G., Kalupahana, R., & Kulka, M. (2012). Plant Based Natural Products and Breast Cancer : Considering Multi-Faceted Disease Aspects , Past Successes , and Promising Future Interventions, 30–40. <http://doi.org/10.5772/55794>

- Toro, G. De. (2006). Muerte celular programada . Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Apoptosis*, (3), 1–6.
- University., L. de la senescencia y la tumorigénesis de Y. (2012). La muerte celular y el cáncer. Retrieved from [http://lts.yonsei.ac.kr/research/re\\_01.html](http://lts.yonsei.ac.kr/research/re_01.html)
- Velazques, G. (2013). "Determinación del efecto citostático de la Dehidroclodina en células de Astrocitoma Cerebral (D-384), 58.
- World Health Organization. (2007). Cancer Control: Knowledge Into Action : WHO Guide for Effective Programmes, Volume 2, 48. [http://doi.org/ISBN: 92 4 154734 5](http://doi.org/ISBN:9241547345)
- World Health Organization. (2012). No Title. Retrieved from <http://www.who.int/cancer/es/>
- Youlden, D., Cramb, S., Dunn, N., Muller, J., Pyke, C., & Baade, P. (2012). The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *ELSEVIER*, 36(3), 237–348. <http://doi.org/doi:10.1016/j.canep.2012.02.007>
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59. <http://doi.org/10.1038/nrm2308>
- Zhao, M., Chen, L., & Qu, H. (2016). CSGene: a literature-based database for cell senescence genes and its application to identify critical cell aging pathways and associated diseases. *Cell Death and Disease*, 7(1), e2053. <http://doi.org/10.1038/cddis.2015.414>
- Zhou, B., Yu, X., Zhuang, C., Villalta, P., Lin, Y., & Lu, J. (2016). Unambiguous Identification of  $\beta$ -Tubulin as the Direct Cellular Target Responsible for the Cytotoxicity of Chalcone by Photoaffinity Labeling, 1–11. <http://doi.org/10.1002/cmdc.201600150>

**ANEXOS:**

Anexo 1: tabla de descripción de anticuerpos empleados para Western Blot.

<b>ANTICUERPOS EMPLEADOS</b>					
<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Anticuerpo Secundario Anti-Rabbit (A.R) Anti-Mouse (A.M)</b>	<b>Codigo</b>	<b>Peso Molecular (Kda)</b>	<b>Dilucion Recomendada</b>	<b>Casa Comercial</b>
<b>p21 (CDKN1A)</b>	A.M	Sc- 817	21	1:200	<b><u>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</u></b>
<b>p-Y99-TP53</b>	A.R	Sc- 101764	50	1:200	<b><u>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</u></b>
<b>TP73</b>	A.R	Sc-7957	73	1:200	<b><u>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</u></b>
<b>p-S46-TP73</b>	A.R	Sc- 101769	73	1:200	<b><u>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</u></b>
<b>Bax</b>	A.R	Sc- 526	24	1:200	<b><u>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</u></b>
<b>Bcl-2</b>	A.R	Sc-783	26	1:200	<b><u>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</u></b>

<b>MAP LC3 <math>\alpha</math> /<math>\beta</math></b>	A.R	Sc- 292354	$\alpha$ = 15 – 18 $\beta$ = 15	1:200	<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>
<b>CASPASA-8</b>	A.M	Sc-7272	55		<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>
<b><math>\beta</math>- TUBULINA</b>	A.M	Sc- 5274	50	1:200	<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>
<b><math>\gamma</math>H2A.X</b>	A.D	Sc- 54606	15	1:200	<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>
<b>p-S139- HISTONA- <math>\gamma</math>H2A.X</b>	A.R	Sc- 101696	15	1:200	<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>
<b>RIPK-1</b>	A.R	Sc-7881	74	1:200	<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>
<b>RIPK-3</b>	A.M	Sc- 374639	60	1:100	<b><u>Santa Cruz</u> <u>Biotechnology,</u> <u>Inc.</u></b>

Fuente: Autor