BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

ESTUDIO DEL EFECTO QUE EJERCE EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) SOBRE LA QUIMIORRESISTENCIA EN LA LÍNEA TUMORAL MDA-MB 231

Tesis presentada para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

Por

Q.F.B. Scarlett Gallardo Arriaga

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. Eduardo Monjaraz Guzmán

Noviembre 2017

“Haz lo que sientas en tu corazón para estar bien, serás criticado de todos modos.

Te reprocharán si lo haces y te reprocharán si no lo haces”

Eleanor Roosevelt

“Ni yo, ni nadie puede recorrer ese camino por ti,

Debes transitarlo por ti mismo.

No está lejos. Está al alcance.

Quizá ya has estado en él desde que naciste sin saberlo.

Quizá está en todas partes, en el mar y en la tierra.”

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado como becaria de maestría 708538.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa III. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Eréndira por ser el principal motor para seguir esforzándome y cumplir mis sueños, gracias por tu apoyo incondicional, consejos, paciencia, esfuerzos; siempre has estado ahí, presente, apoyándome en todas las cosas y potenciando mis cualidades para que yo pueda convertirme en la persona que soy ahora. Fuiste paciente en todo momento, y lo eres hoy en día, sobre todo en aquellos momentos en los que ni yo me soportaba. Gracias por el ser maravilloso que eres y la mejor mamá que pudiera llegar a tener, te amo.

A mis abuelos Gloria y Domingo, gracias por ser pilares importantes en mi vida, al criarme, educarme, guiarme a ser mejor cada día, me enseñaron que lo más importante que siempre voy a tener será mi familia.

Cada día llego más lejos en la vida y debo reconocer que nada de esto sería posible sin el apoyo incondicional de mi familia. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco a ustedes mi hermosa familia, los amo.

A mi tío Jesús Arriaga, gracias por tu inmenso cariño, conocimientos y convivencias que he tenido. En mis momentos más felices has estado a mi lado compartiendo mi felicidad; en los momentos difíciles me has acompañado brindándome consuelo y tu incondicional apoyo. Agradezco de corazón todo lo que haces por mí.

Día a día conocemos nuevas personas e intentamos tomar lo mejor de ellas y sin duda alguna, tomé muchas cosas de ti, parte de la persona en que me he convertido te corresponde a ti y te estoy muy agradecida, eres una persona especial, nos faltan muchas cosas por lograr y sin importar lo que pase, siempre desearé que seas feliz, Héctor Delgado.

A mis mejores amigos: Daniela Rubio Lucía Ramos, Perla Zapata, Mireya Contreras y Eduardo Agüero por brindarme su amistad y confianza en todos estos años, han sabido apoyarme cuando lo he necesitado, gracias por estar en mi vida y aportar algo valioso en ella.

Al DC Eduardo Monjaraz Guzmán, quien se ha tomado el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos, especialmente en el área de la ciencia y me ha ofrecido conocimientos para lograr mis metas y lo que me proponga.

A los miembros del comité revisor: Dra. María Rosa Padrós, Dra. Citlalli Gamboa y Dr. Fabián Galindo por los conocimientos compartidos a lo largo de esta formación de maestría y por el tiempo brindado en la revisión del presente trabajo de tesis.

A mis ex compañeros de maestría: Evelyn Aparicio, Gerardo Castro y Rubén Avalos por las convivencias que he pasado a su lado y por enseñarme que al otro lado del país puedo hacer grandes amigos; y a pesar de la distancia sé que puedo contar con ustedes.

A todos los integrantes del laboratorio de Neuroendocrinología por la amistad y el apoyo brindado: Aarón, Cecilia, Eliud, Guadalupe, Juan, Julieta, Karina, Mariana, Miriam, Max, Selene, Zuleima y en especial Alain por tu incondicional amistad, la confianza otorgada y recuerda que, aunque ya no estemos cerca, siempre estaré para ti. Les deseo a todos mucho éxito en su camino.

Índice

Índice de abreviaturas **1**

Resumen **4**

INTRODUCCIÓN ***6***

Cáncer **6**

Cáncer en el mundo 7

Cáncer en México 8

Cáncer de mama **10**

Incidencia de Cáncer de mama 11

Patogénesis 15

Signos y síntomas 17

Factores de riesgo 17

Estructura de la mama 19

Tratamiento 20

Quimioterapia 21

A) Doxorubicina 24

B) Flavona 27

Quimiorresistencia 28

Transportadores ABC **37**

ABCG2 40

Factores de Crecimiento **42**

Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) 43

Receptor a EGF 44

Vías de señalización del EGF 47

JUSTIFICACIÓN **50**

HIPÓTESIS **50**

OBJETIVO GENERAL **50**

OBJETIVOS PARTICULARES **51**

METODOLOGÍA **52**

Modelo Celular MDA-MB 231 ..... **52**

Cultivo de línea celular **53**

Tratamiento de la línea celular MDA-MB-231 ..... **54**

Ensayo de expresión génica **55**

a) Extracción de ARN total 55

b) Cuantificación de RNA 56

c) Síntesis de ADNc (RT) 57

d) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 58
Electroforesis 61
Densitometría 61
Ensayo de Proliferación 62
Ensayo de MTT 62
Bloqueo de actividad de ABCG2 63
Análisis estadístico 64
RESULTADOS 65
DISCUSIÓN 84
CONCLUSIONES 88
BIBLIOGRAFÍA 89

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
ABC	Proteína de unión al ATP
ABCG2	Proteína de unión al ATP subfamilia G miembro 2
ABCB1	Proteína de unión al ATP subfamilia B miembro 1
ABCC1	Proteína de unión al ATP subfamilia C miembro 1
ACS	Sociedad Americana contra el Cáncer
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico complementario
AECC	Asociación Española Contra el Cáncer
AR	Anfiregulina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCRA1	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1
BCRA2	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2
BCRP	Proteína Resistente en Cáncer de mama
BrEt	Bromuro de Etidio
CaM	Cáncer de mama
CCC	Carcinoma renal de Células Claras
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CENETEC	Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud
CENAVECE	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
CONAPO	Consejo Nacional de Población

CSG	Consejo de Salubridad General
DOF	Diario Oficial de la Federación
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor al Factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptor a Estrógenos
EREG	Epiregulina
et al	del latín et alii, significa “y otros”
FBS	Suero Fetal Bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GF	Factores de crecimiento
HCl	Ácido clorhídrico
HER/neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HIF-1	Factor 1 inducible de hipoxia
HT-29	Línea celular de adenocarcinoma humano de colon
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
kDa	Kilo Daltons (Unidad de masa atómica)
MDA-MB 231	Línea celular tumoral de cáncer de mama
MDR	Multirresistencia a fármacos (del inglés Multidrugs Resistance)
MDR1	Proteína 1 de multirresistencia a fármacos
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MXR	Mitoxantrona resistente
NBD	Sitio de unión a nucleótido

NCBI	Centro Nacional para la Informática Biotecnológica
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pgp	P glicoproteína
pH	Potencial de hidrógeno
PR	Receptor a Progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción inversa
SPPS	Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud
SSA	Secretaría de Salud
TAE	Buffer Tris, Ácido acético, EDTA
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TM	Transmembranal
TMD	Dominio Transmembranal
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer

Resumen

El cáncer, en los últimos años se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad.

Una de las principales razones por las cuales el cáncer aumenta la tasa de mortalidad, es debido a que los pacientes llegan a desarrollar el fenómeno de quimiorresistencia, la cual está asociada a diferentes mecanismos en los que las células tumorales dejan de ser sensibles a la acción de fármacos citotóxicos; entre los mecanismos de quimiorresistencia destacan los transportadores ABC.

Las células provenientes de cáncer de mama triple negativo, sobreexpresan el receptor a EGF, y muestran quimiorresistencia a diferentes fármacos oncológicos, condiciones asociadas positivamente al grado de malignidad con presentan los tumores.

En el presente trabajo decidimos investigar si existe una relación entre la activación del receptor a EGF y la quimiorresistencia, y si ésta se debía a su vez, a un incremento en la expresión funcional del transportador ABCG2, utilizando como modelo experimental la línea celular MDA-MB 231, proveniente de cáncer de mama triple negativo.

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de EGF induce un incremento en la quimiorresistencia de las células a Doxorubicina, y que este efecto era prevenido cuando las células se trataban además con Ko-143, un antagonista del transportador ABCG2, sugiriendo la participación de este transportador en el fenómeno de quimiorresistencia, incluso se observó que las células MDA-MB 231 aumenta su nivel de expresión del ARNm que codifica para ABCG2 cuando son estimuladas con EGF.

Este trabajo proporciona la primera evidencia de que la presencia de EGF induce quimiorresistencia en células tumorales, proponiendo al receptor a EGF como un blanco farmacológico para reducir su potencial metastásico.

Abstract

The cancer in the last decades has become one of the main public health problems worldwide, as it represents a major cause of morbidity and mortality.

One of the main reasons why cancer increases the mortality rate is because patients develop the phenomenon of chemoresistance, which is associated with different mechanisms in which tumor cells are no longer sensitive to action cytotoxic drugs, among the mechanisms of chemoresistance are the ABC transporters.

The cells from triple negative breast cancer, overexpress the EGF receptor, and show chemoresistance to different oncological drugs, conditions positively associated with the degree of malignancy present in the tumors.

In the present work we decided to investigate whether there is a relationship between EGFR activation and chemoresistance, and if this was due in turn an increase in the functional expression of the transporter ABCG2, using the MDA-MB 231 cell line as an experimental model, from triple negative breast cancer.

The results showed that the presence of EGF induces an increase in the chemoresistance of the cells to doxorubin, and this effect was prevented when the cells were also treated with Ko-143, transporter ABCG2 antagonist, suggesting the participation of this transporter in the chemoresistance phenomenon, it was even observed that the cells MDA-MB 231 increase her level of mRNA encoding for ABCG2 when are stimulated with EGF.

This work provides the first evidence of that the presence of EGF induces chemoresistance on the tumor cells, proposing to EGFR like a pharmacologic target to reduce his metastasic potential.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer en los últimos años se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, ya que representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población adulta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cáncer es un término genérico empleado para designar a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. (OMS, 2015). La palabra cáncer se le atribuye a Hipócrates desde el *Corpus Hippocraticum*, donde menciona unas lesiones ulcerosas crónicas, algunas veces endurecidas, que se desarrollan progresivamente y sin control expandiéndose por los tejidos semejando las patas de un cangrejo, por lo que las denominó con la palabra griega "*καρκινος*" dándole un significado técnico a la palabra griega cangrejo que se escribe igual. De allí, el término pasa al latín como "cáncer" como ambos significados (Salaverry, 2013).

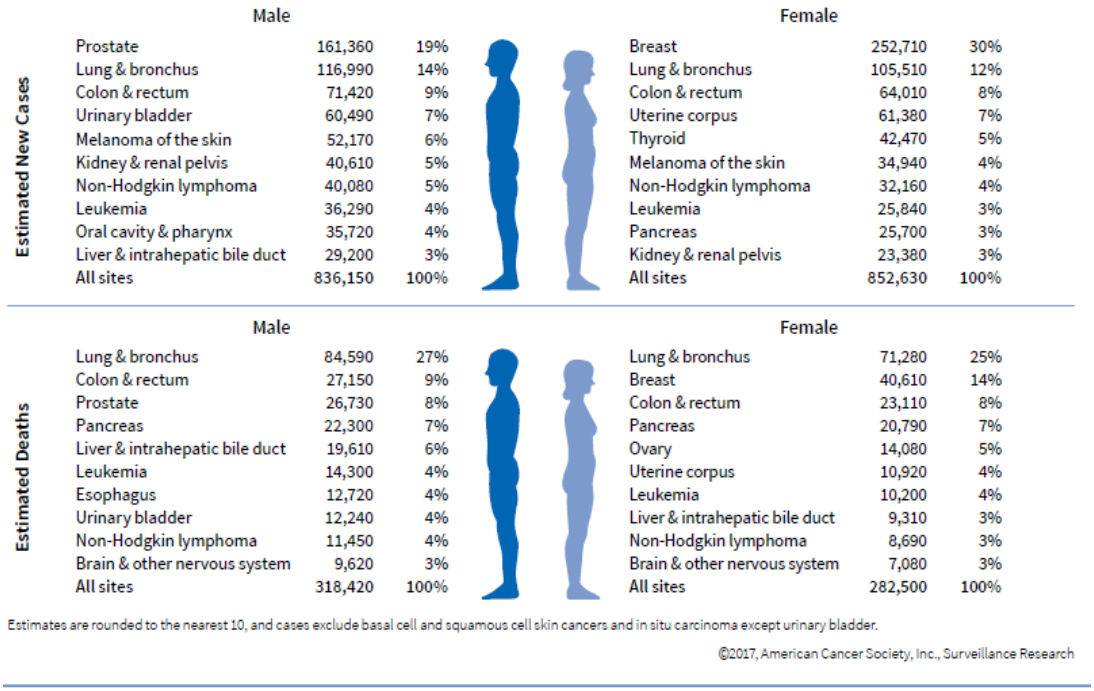
En condiciones fisiológicas, las células humanas crecen y proliferan para formar nuevas células a medida que el cuerpo las requiera. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las remplazan (NCI, 2016). El cáncer se origina cuando ocurren cambios en un grupo de células normales dentro del cuerpo conduciendo al crecimiento y proliferación incontrolable que causa un bulto llamado tumor. Si no se tratan, los tumores pueden crecer y extenderse en el tejido normal circundante, que puede invadir tejidos adyacentes o propagarse a otros órganos del cuerpo, proceso conocido como metástasis (OMS, 2015). Al invadir nuevo tejido, continúan dividiéndose y creciendo, llamándosele a dicha condición cáncer metastásico (NCI, 2013).

Cáncer en el mundo

En 2012, la OMS señaló que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago (OMS, 2015; INEGI, 2017).

La historia natural del desarrollo y progresión del cáncer, está en función del tipo celular que lo origina, por ejemplo, el 90 % de todos los casos de cáncer son de tipo epitelial. Los tipos de cáncer que presentan una alta tasa de morbilidad y mortalidad son (Figura 1):

- Cáncer de próstata
- Cáncer de pulmón
- Cáncer de colon
- Cáncer de vejiga
- Cáncer de mama
- Cáncer cervicouterino
- Cáncer de tiroides
- Melanoma
- Cáncer de riñón



Estimated New Cases	Male			Female		
	Prostate	161,360	19%	Breast	252,710	30%
	Lung & bronchus	116,990	14%	Lung & bronchus	105,510	12%
	Colon & rectum	71,420	9%	Colon & rectum	64,010	8%
	Urinary bladder	60,490	7%	Uterine corpus	61,380	7%
	Melanoma of the skin	52,170	6%	Thyroid	42,470	5%
	Kidney & renal pelvis	40,610	5%	Melanoma of the skin	34,940	4%
	Non-Hodgkin lymphoma	40,080	5%	Non-Hodgkin lymphoma	32,160	4%
	Leukemia	36,290	4%	Leukemia	25,840	3%
	Oral cavity & pharynx	35,720	4%	Pancreas	25,700	3%
	Liver & intrahepatic bile duct	29,200	3%	Kidney & renal pelvis	23,380	3%
	All sites	836,150	100%	All sites	852,630	100%

Estimated Deaths	Male			Female		
	Lung & bronchus	84,590	27%	Lung & bronchus	71,280	25%
	Colon & rectum	27,150	9%	Breast	40,610	14%
	Prostate	26,730	8%	Colon & rectum	23,110	8%
	Pancreas	22,300	7%	Pancreas	20,790	7%
	Liver & intrahepatic bile duct	19,610	6%	Ovary	14,080	5%
	Leukemia	14,300	4%	Uterine corpus	10,920	4%
	Esophagus	12,720	4%	Leukemia	10,200	4%
	Urinary bladder	12,240	4%	Liver & intrahepatic bile duct	9,310	3%
	Non-Hodgkin lymphoma	11,450	4%	Non-Hodgkin lymphoma	8,690	3%
	Brain & other nervous system	9,620	3%	Brain & other nervous system	7,080	3%
	All sites	318,420	100%	All sites	282,500	100%

Estimates are rounded to the nearest 10, and cases exclude basal cell and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

©2017, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

Figura 1. Estimaciones de nuevos casos de cáncer y muertes relacionadas a cada tipo de cáncer. Cancer Facts and Figures 2017. American Cancer Society, Inc., Survellance Research.

Cáncer en México

En México, según datos de la OMS en su apartado de Perfiles Oncológicos de los Países de 2014, registró que las principales neoplasias que causan muerte en la población mexicana masculina mayores de 20 años son de próstata (17 %), tráquea, bronquios y pulmones (11.7 %) y estómago (9.2 %); mientras que en las mujeres de este mismo grupo de edad, en glándula mamaria (15.8 %), cervicouterino (12.0 %) e hígado (7.9%) (Figura 2).

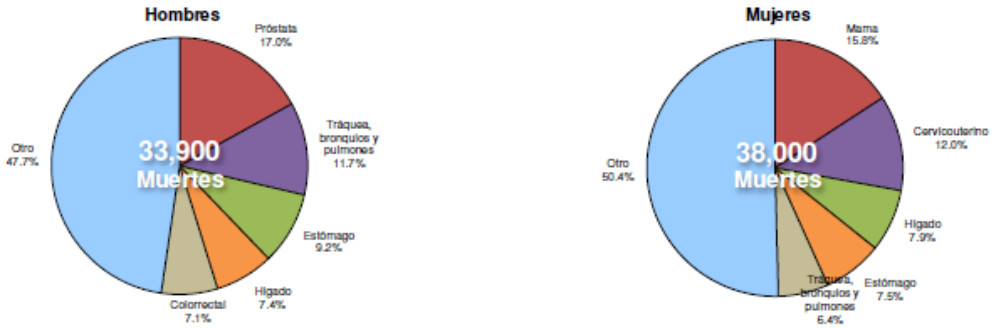


Figura 2. Porcentaje de la distribución de la mortalidad por cáncer en la población mexicana de 20 años y más según sexo, 2014. Se observa que para mujeres el 15.8 % corresponden a los casos de cáncer de mama (OMS, 2014).

En el año 2014 se han detectado en la población mexicana más de 128,000 casos de cáncer, siendo los más comunes los que se presentan en la Figura 3:

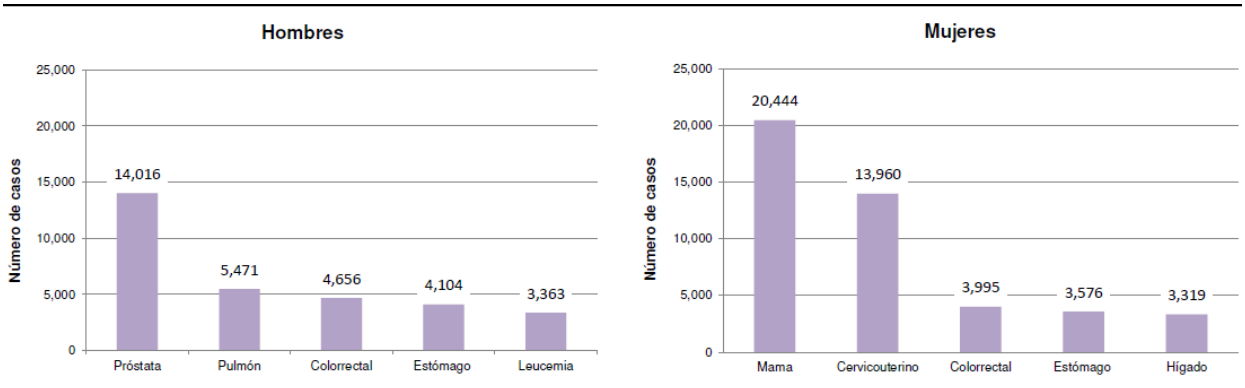


Figura 3. Incidencia de cáncer en la población mexicana de 20 años y más según sexo, 2014. Se observa que para la población masculina el primer lugar en incidencia lo ocupa el cáncer de

próstata; mientras que en la población femenina lo ocupa el cáncer de mama con un número de 20,444 nuevos casos (OMS, 2014).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es un padecimiento de alta incidencia y se ubica como la tercera causa de muerte solo después de la diabetes y de las enfermedades hipertensivas. Se estima que cada año de detectan 128 mil nuevos casos (Secretaria de Salud (SSA), Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS), 2013).

Durante el año 2014 se observó que dos de cada diez casos de cáncer en varones de 20 años y más se deben a tumor maligno en órganos digestivos, mientras que, en las mujeres del mismo grupo de edad, tres de cada diez mujeres con cáncer padecen de tumor maligno de mama, siendo las principales neoplasias malignas para cada sexo para la población adulta del país, seguido del cáncer en órganos genitales (11.4% en varones y 17.6 % en mujeres) (Figura 4) (INEGI, 2017).

Tanto en la distribución de la mortalidad y en la incidencia debida a cáncer en el país para la población femenina (Figura 1 y 2), el cáncer de mama es tipo de tumor que ocupa el 2° y 1°er lugar respectivamente, debido a su alta relevancia en los últimos años, el presento proyecto se enfocó en el cáncer de mama.

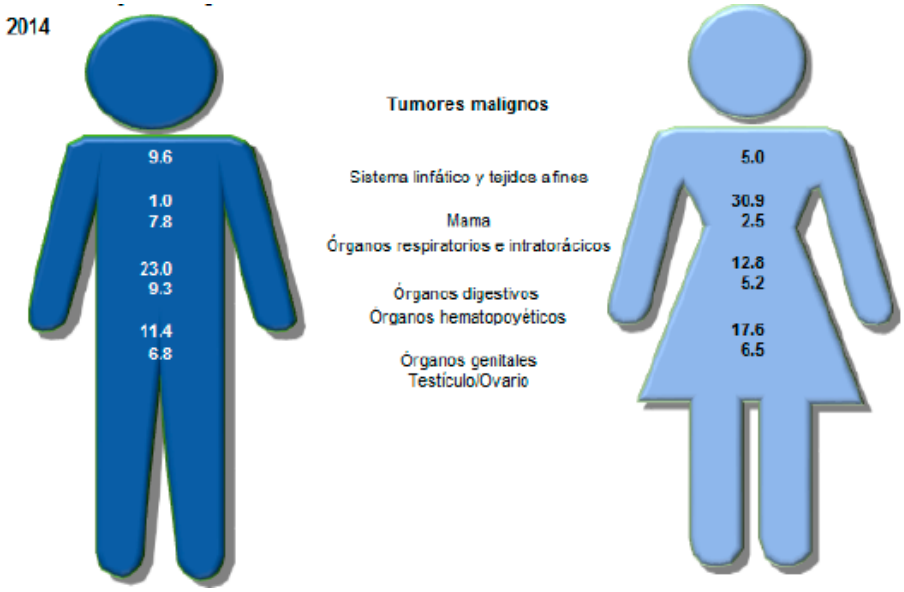


Figura 4. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población de mayores de 20 años según sexo, 2014. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud. Se observa que para mujeres mayores de 20 años el 30.9 % corresponde a los casos de cáncer de mama. (INEGI, 2016. SSA, 2016).

Cáncer de mama

A nivel mundial se estima que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y hay 458,000 decesos por esta causa, siendo el tipo de cáncer de mayor incidencia entre las mujeres (OMS, 2015). Por su ocurrencia, así como por la importancia del diagnóstico temprano, es que se ha puesto énfasis en la sensibilización hacia esta enfermedad. (INEGI, 2015).

La incidencia es muy variable en todo el mundo, pero es en los países de bajos ingresos donde ocurre la mayoría de los decesos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, debido a la falta de acceso a servicios de salud y a la poca sensibilización para la detección temprana (OMS, 2015).

El cáncer de mama, al igual que otros tipos de cáncer, se origina por la mutación de células, las cuales crecen de forma anormal y desordenada, y se pueden diseminar a otras partes del cuerpo. Debido a la estructura de las mamas, glándulas donde se produce la leche materna, este tipo de cáncer generalmente se desarrolla en los conductos lactíferos (carcinoma ductal) o en los lobulillos (carcinoma lobulillar) (CENETEC, 2009; SSA, 2009; Medline Plus 2015; INEGI, 2016). A nivel mundial, el cáncer de mama es el más común entre las mujeres y representa el 16% del total de los casos de cáncer para esta población (OMS, 2016).

En 2014, del total de casos de cáncer diagnosticados en la población mexicana de 20 años y más, el de mama es el de mayor presencia con 19.4 %. Por sexo, el tumor maligno de mama en los hombres generalmente se detecta en aquellos de 60 a 70 años y se diagnostican en cada año menos de 100 casos por lo cual sólo representa el 1% del total de casos de cáncer, con una relación femenino-masculino de 144

mujeres por cada hombre, por lo cual, se desmiente la creencia de que esta enfermedad sea exclusiva de las mujeres (INEGI, 2016; NOM-041-SSAA2-2011); por otra parte, 3 de cada 10 mujeres de 20 años y más con cáncer, tienen cáncer de mama, lo que lo ubica en el primer lugar de los tumores malignos para este grupo poblacional (Figura 5).

Tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Total	**100.0**	**100.0**	**100.0**
Mama	19.4	1.0	30.9
Órganos digestivos	16.7	23.0	12.8
Órganos genitales (masculinos o femeninos)	15.2	11.4	17.6
Órganos hematopoyéticos	6.8	9.4	5.2
Células germinales (testículo u ovario)	6.6	6.8	6.5
Tejido linfático y afines	6.8	9.6	5.0
Órganos respiratorios e intratorácicos	4.5	7.8	2.5
Vías urinarias	3.9	6.7	2.1
Otros tumores malignos[a]	20.1	24.3	17.4

Figura 5. Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más por tumores malignos según sexo en 2014. Para los hombres, el cáncer de mama (1%) y tumor de testículo no son una de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación; por otro lado, en la población femenina el cáncer de mama es la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos con un 30.9 %. Se utilizó la Clasificación Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la salud. Nota: [a]. Incluye las neoplasias de labio, cavidad bucal y faringe; huesos y cartílagos articulares; melanoma y otros tumores de la piel; tejidos mesoteliales y tejidos blandos; tumores malignos del ojo, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central; glándula tiroides y otras glándulas endócrinas. SSA (2016). Base de Egresos Hospitalarios 2014.

Incidencia de Cáncer de mama

Respecto a la incidencia del tumor maligno de mama a nivel mundial, se observa que las tasas varían por regiones, pero la tasa normalizada por edad para América del Norte es de 99.4 casos nuevos por cada 100,000 personas (OMS, 2016). En México, para el año 2015, la incidencia de tumor maligno de mama entre la población de 20 años y más es de 14.80 casos nuevos por cada 100,000 personas, observándose una ligera disminución en comparación del año previo, en que la tasa era de 15.39 casos nuevos (INEGI, 2016).

Por sexo, de igual forma se observa una ligera disminución de los casos nuevos de cáncer de mama del año 2014 al 2015. Así, la incidencia entre las mujeres de 20 años y más paso de 28.75 a 27.90 por cada 100,000 pacientes, mientras que en los varones, fue de 0.64 a 0.33 (Figura 6) (INEGI, 2016).

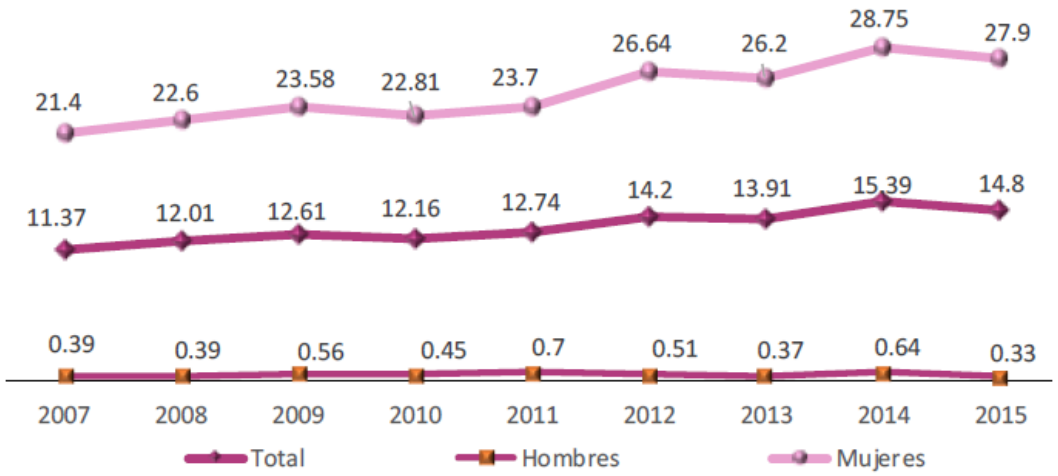


Figura 6. Incidencia de tumor maligno de mama en población de 20 años y más por sexo. Serie anual de 2007 a 2015 por cada 100 000 habitantes. Cabe señalar que el dato de 2014 para las mujeres es el más alto del periodo con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres mayores de 20 años (Para 2007 a 2009; SSA, CENAVECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2014; y CONAPO (2008). Proyecciones de la Población de México 2005-2050. Procesó INEGI. Para 2010 a 2015; SSA, CENAVECE (2016). Anuarios de Morbilidad 1984-2015; y CONAPO (2016). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI).

En el país, para 2015, se observa un incremento de la incidencia de tumor maligno de mama con la edad para ambos sexos. En las mujeres, la incidencia alcanza su punto máximo en las del grupo de 60 a 64 años (68.05 por cada 100,000 mujeres de ese grupo de edad), y posteriormente desciende en el grupo de 65 y más años; mientras que el mayor incremento se observa entre las mujeres de 25 a 44 años y aquellas de 45 a 49 años, ya que los casos nuevos pasan de 13 a 50 (por casa 100,000 mujeres de su grupo de edad, respectivamente) (Figura 7).

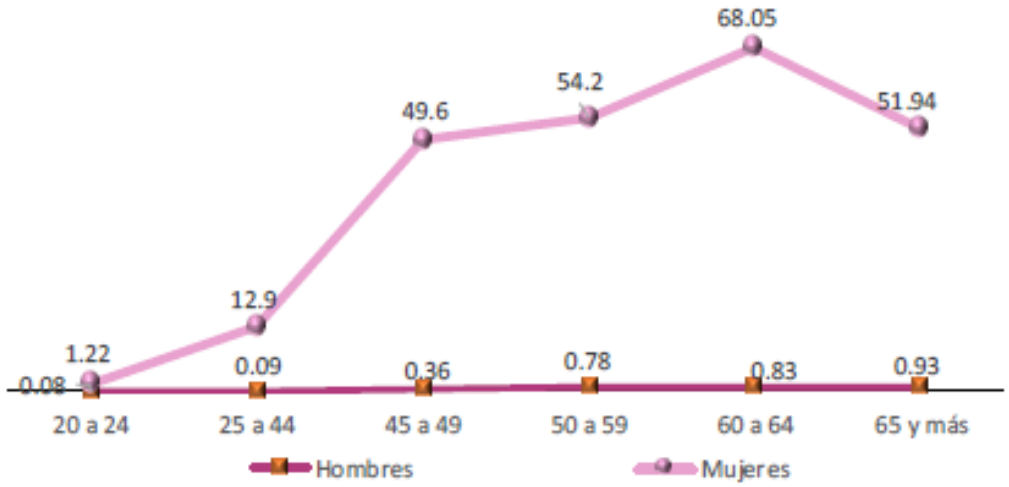


Figura 7. Incidencia de tumor maligno de mama en población de 20 años y más por grupo de edad según sexo, en 2015. (Por 100 000 habitantes de cada grupo de edad). Se observó un aumento en los casos nuevos de tumores malignos de mama hasta antes de los 64 años conforme se incrementa con la edad; en mujeres, el grupo de 60 a 64 años se concentra el mayor número de casos nuevos (68.05 por cada 100 000 habitantes de ese grupo de edad). Así mismo en mujeres, destaca el incremento que se da a partir de los 45 años, ya que la incidencia pasa de 12.9 (por cada 100 000 mujeres de 25 a 44 años de edad) a 49.6 (en el grupo de 45 a 49 años). (CENAVECE (2016). Anuarios de Morbilidad 1984-2015; y CONAPO (2016). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI.

Cabe señalar que la incidencia no es homogénea a lo largo de todo el territorio nacional. En 2015, se observa que el cáncer de mama tiene mayor incidencia en los estados de Colima, Campeche y Aguascalientes (101.08, 97.60 y 96.85 casos nuevos por cada 100 000 mujeres de 20 y más años, respectivamente), mientras que en el otro extremo, se encuentran los estados de Tlaxcala (8.41), Guerrero (6.82) y Chiapas (4.94), con menos de 10 casos nuevos por cada 100 000 mujeres durante el año señalado (Figura 8) (INEGI, 2016).

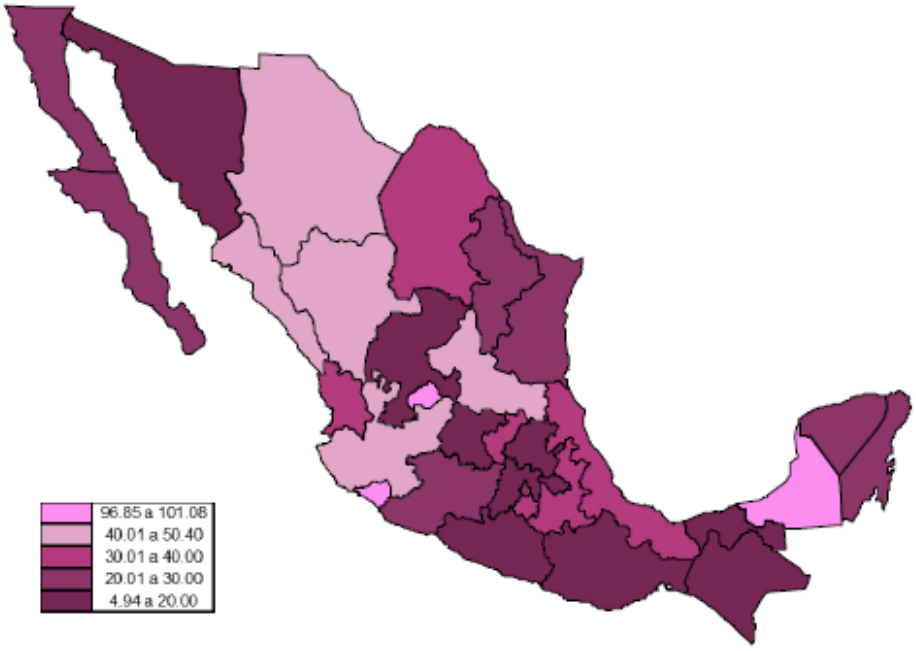


Figura 8. Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más por entidad federativa por cada 100 000 mujeres en 2015. Existe una gran alternancia con valores que van desde 4.94 por cada 100 000 en el caso de Chiapas hasta 101.08 casos por cada 100 000 mujeres mayores de 20 años en el caso de Colima. Sin embargo, la falta de acceso a la detección temprano también sugiere que existe un gran número de casos no detectados. CENAVECE (2016). Anuarios de Morbilidad 1984-2015; y CONAPO (2016). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI.

Por otro lado, aunque la tasa de mortalidad del cáncer de mama se ha mantenido relativamente estable durante los últimos años, actualmente representa la segunda causa de mortalidad en las mujeres mayores de 20 años.

Por entidad federativa, para el análisis de la mortalidad por cáncer de mama, en el 2014 se encontró que los estados de Chihuahua, Nuevo León y Ciudad de México tienen más de 20 fallecimientos a causa de esta enfermedad por cada 100 000 de 20 y más años de edad (25. 91, 22.40 y 21.41, respectivamente), siendo Campeche la entidad con la tasa más baja (5.86 muertes por cada 100 000 mujeres del mismo grupo de edad), le siguen Oaxaca y Quintana Roo, con menos de 10 muertes a causa del cáncer de mama por casa 100 000 mujeres (Figura 9) (INEGI, 2016). Se estima que la incidencia y la mortalidad seguirán aumentando de manera importante debido al envejecimiento poblacional, a los cambios en los patrones reproductivos, a una mayor prevalencia de los factores de riesgo y a los problemas para el acceso

oportuno a la detección, el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuados (NOM-041-SSA2-2011).

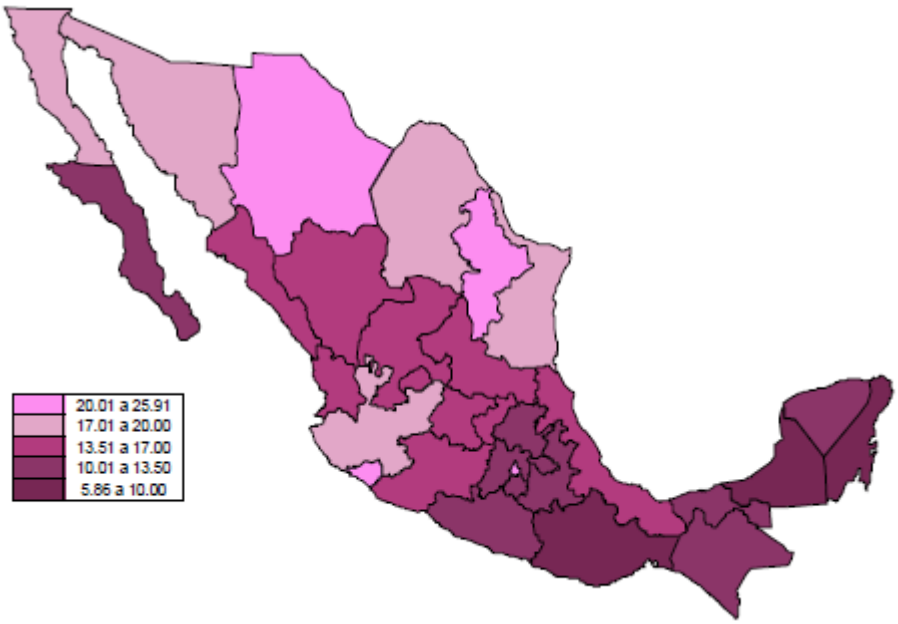


Figura 9. Tasa de mortalidad de cáncer de mama por cada 100 000 mujeres mayores de 20 años por entidad federativa en 2014. Con excepción de la Ciudad de México, la región norte del país es donde se concentran las tasas más altas de mortalidad observada. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud. Estadísticas de Mortalidad. Base de Datos; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI. Nota: se excluyen defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.

Patogénesis

Se estima que del total de casos de cáncer de mama el 95% son carcinomas. Estos tipos de cáncer se originan en las células que revisten los órganos y los tejidos (células epiteliales). Los cánceres de seno son a menudo un tipo de carcinoma llamado adenocarcinoma, que se origina en las células que producen glándulas.

Si el cáncer de mama se ha propagado o no se clasifican como:

- Cáncer *in situ*, los cuales no se han propagado.

- Cáncer invasivo o infiltrante, cuando se han propagado al tejido circundante de la mama. (ACS, 2017).

Considerando *in situ* e invasivo; ambos pueden ser ductales o lobulares, el primero se mantiene confinado al epitelio sin invasión a la membrana basal, cuando se expande más allá de la membrana basal el cáncer se considera invasivo, es en este estadio donde se desarrolla metástasis (Richie & Swanson, 2003).

La clasificación clínica del cáncer de mama se basa en el tamaño o en la infiltración local del tumor, la afectación de ganglios linfáticos y presencia de metástasis (Edge & Compton, 2010). Con herramientas como la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fluorescente se han determinado 3 subtipos de cáncer de mama:

1) Receptor hormonal positivo: la cual pueden expresar uno o ambos receptores de estrógeno y progesterona, responsivos a terapia hormonal, que reducen los niveles de estrógeno o bloquean los receptores de estrógenos; éste tipo de cáncer suele tener un mejor pronóstico a corto plazo. El cáncer de mama de tipo receptores hormonales positivos son más comunes en mujeres después de la menopausia (ACS, 2017).
2) Positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano: algunas mujeres tienen tumores de mama con niveles más altos de la proteína HER2. La HER2/neu es una proteína que promueve el crecimiento en el exterior de todas las células mamarias. Estos cánceres tienden a crecer y propagarse más rápidamente que los otros tipos de cáncer de mama; también puede presentarse en cánceres que sean positivos a hormonas.
3) Triple negativo(TNBC): se caracterizan por que las células neoplásicas carecen de receptores a estrógeno y progesterona, así como también por la ausencia de sobreexpresar el receptor HER2. Son HER2-, ER- y PR-negativos. El cáncer de mama triple negativo crece y se propaga más rápidamente que la mayoría de los otros tipos de cáncer de mama (ACS, 2017). Presenta un comportamiento agresivo, son frecuentes las recaídas con metástasis a otros tejidos, con una alta tasa de mortalidad en comparación con otros tipos de cáncer de mama (Anders & Carey, 2009).

Esta patología representa del 10-15% del total de casos de cáncer de mama, pero tienden a presentarse en mujeres más jóvenes en la pre-menopausia y en mujeres hispanas o con origen africano (ACS, 2017; Carey et al., 2006). Con respecto a la susceptibilidad genética se ha descrito que las mujeres que portan mutaciones en BCRA1 tienen más de un 50% de probabilidad de desarrollar cáncer de mama triple negativo (Zhang et al., 2012). Debido a ser triple negativo la terapia hormonal no es útil, tampoco son útiles los medicamentos dirigidos a HER2 (ACS, 2017). No obstante, la quimioterapia es el tratamiento estándar para este tipo de neoplasia, a pesar de su curso agresivo, el cáncer de mama triple negativo es sensible a los fármacos citotóxicos, el porcentaje de pacientes que presenta una respuesta completa después del tratamiento con quimioterapia (antraciclinas o taxanos) reforzado con adyuvantes o neoadyuvantes (sales de platino) es de 30-45% (Brewster et al., 2014).

Signos y síntomas

El síntoma más común es de cáncer de mama es la aparición de un nódulo en la mama que previamente no existía, dolor en la mama en la palpación, cambio de tamaño, irregularidades en el contorno, menor movilidad de una de las mamas al levantar los brazos, cambios en el pezón como puede ser la retracción del mismo (hundimiento), aparición de un nódulo en la axila, otros síntomas menos comunes incluyen cambios persistentes en la mama como crecimiento, hinchazón, sensibilidad, irritación de la piel, enrojecimiento y anormalidades del pezón o secreción anormal espontánea (AECC, 2017; Cancer facts & figures ACS, 2017).

Factores de riesgo

Un factor de riesgo es todo lo que afecta su probabilidad de contraer una enfermedad, como el cáncer. Los factores de riesgo de desarrollo del cáncer de

mama se distinguen en cuatro grandes grupos: 1) biológicos, 2) iatrogénicos o ambientales, 3) de historia reproductiva y 4) de estilos de vida. Los primeros no son modificables; los segundos escapan al control de la población, los del tercer grupo se asocian a beneficios en la salud reproductiva, y los del cuarto grupo son modificables y se enfocan a promover las conductas favorables a la salud que disminuyan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. (NOM-041-SSA2-2011).

Entre los factores de riesgo biológicos se encuentran: pertenecer al género femenino, el envejecimiento, historia personal o familiar de cáncer de mama en madre, hijas o hermanas; antecedentes de hallazgos de hiperplasia ductal atípica, carcinoma lobulillar *in situ* por biopsia; vida menstrual de más de 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años); mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2.

De los factores iatrogénicos o ambientales están la exposición a radiaciones ionizantes principalmente durante la adolescencia, así como el tratamiento con radioterapia en tórax.

Factores reproductivos que incrementan el riesgo incluyen largo uso de anticonceptivos orales, nuliparidad, haber tenido el primer hijo después de los 30 años, altas concentraciones de uso combinado de hormonas durante la menopausia o post menopausia por más de cinco años; así como también largo historial de menstruación.

Factores relacionados con el estilo de vida y que son potencialmente modificables y se han asociado con el incremento de padecer cáncer de mamá: alimentación rica en carbohidratos y baja en fibra, dieta rica en grasas tanto animales como ácidos grasos trans, obesidad (principalmente en la postmenopausia), inactividad física y abuso del alcohol (consumo de alcohol mayor a 15 g/día). En adición, estudios recientes han sugerido que fumar a largo plazo también puede aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama, particularmente entre mujeres que empezaron a fumar antes de su primer embarazo, interrupción de los patrones del sueño, como trabajos

por la noche también están asociados como un riesgo (NOM-041-SSA2-2011; ACS, 2017).

Otro tipo de clasificación de los factores de riesgo son los modificables (que están relacionados con el estilo de vida) y los no modificables que incluyen el envejecimiento, antecedentes de cáncer de mama o de ovario en la familia, ancestros judíos Ashkenazi, mutaciones hereditarias de los genes BRCA1, BRCA2 u otros genes susceptibles a cáncer de mama; ciertas condiciones benignas de la mama (como hiperplasia atípica); historial de carcinoma ductal o lobulillar in situ; exposición a altas dosis de radiación en el pecho a temprana edad; alta densidad de tejido mamario; y diabetes tipo 2 (independiente de la obesidad). Otro factor de riesgo no modificable es la etnicidad; en América de Norte y Europa del norte se encuentra la mayor incidencia, mientras que en países de Asia y África presentan la menor incidencia (ACS 2017). Se han asociado factores con una disminución del riesgo de padecer cáncer de mama como son: la condición de lactancia por al menos un año, regular actividad física y mantenimiento de un peso corporal saludable.

Por otro lado, el cáncer de mama en hombres se asocia con exposición a radiaciones, obesidad, altas concentraciones de estrógenos en la sangre producto de la cirrosis o el síndrome de Klinefelter (trastorno genético caracterizado por la presencia de uno o más cromosomas X extra) y por antecedentes heredofamiliares de mutaciones en el gen BRCA2 (NOM-041-SSA2-2011; NCI, 2014; ACS 2017).

Estructura de la mama

La mama está constituida por múltiples lóbulos y lobulillos dónde se produce la leche. Los lóbulos y lobulillos están unidos por una serie de tubos denominados ductor o conductos galactóforos que conducen la leche hacia el pezón. También contiene vasos sanguíneos cuya función es proporcionar sangre a la glándula y vasos linfáticos, que son los encargados de recoger la linfa. Los vasos linfáticos confluyen en pequeñas formaciones redondeadas denominadas ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos más cercanos a la mama se encuentran en la axila y a ambos lados del esternón (hueso situado en la parte anterior del tórax) (Figura 10). La glándula está rodeada de tejido graso que proporciona consistencia y volumen a la mama. Desde el nacimiento hasta la edad adulta, las mamas sufren más cambio que ningún otro influjo de las hormonas femeninas (estrógenos y progesterona), las mamas crecen durante la pubertad y se ven influenciadas en la edad reproductiva por los ciclos menstruales. En la menopausia, los niveles descienden y gran parte de la glándula mamaria se atrofia y es sustituida por grasa (AECC,2017).

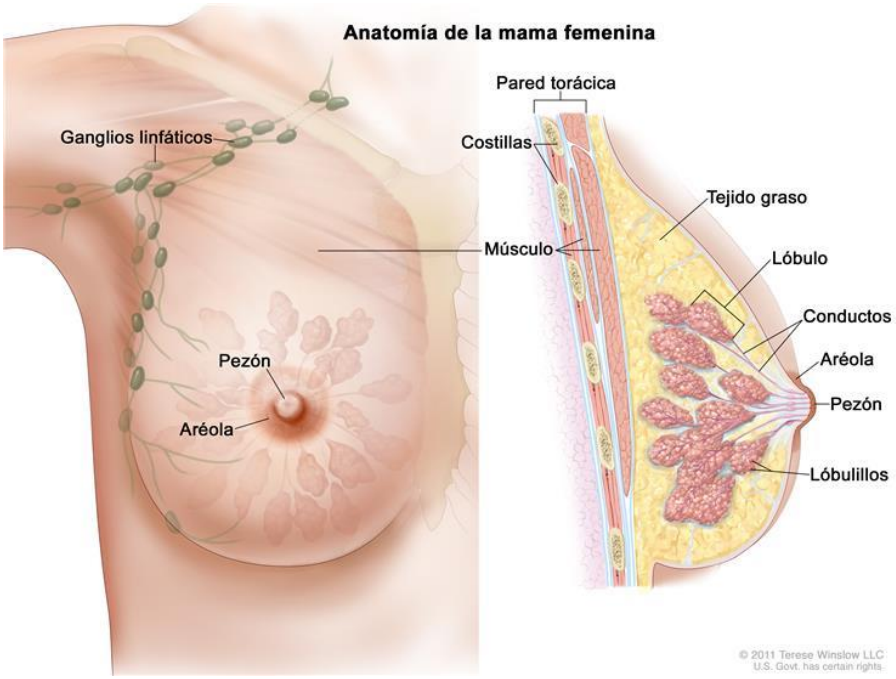


Figura 10. Anatomía de la mama femenina. Se muestran el pezón, la areola, los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos, los conductos y otras partes de la mama (NCI, 2017).

Tratamiento

Las decisiones terapéuticas del cáncer de mama se deben formular de acuerdo con la etapa clínica, reporte histopatológico, condiciones generales de salud de la paciente, su estado hormonal, considerando el respeto a sus derechos y su libre decisión.

Los métodos terapéuticos que en la actualidad se emplean para tratar el cáncer de mama según la NOM-041- SSA2-2011 son:

- Cirugía
- Radioterapia
- Quimioterapia
- Terapia hormonal
- Biológicos

De ellos, la cirugía y la radioterapia tienen una acción local o locorregional; en la quimioterapia, la terapia hormonal y los tratamientos biológicos, la acción es sistemática. Sin embargo, ante un diagnóstico de cáncer avanzado, cuando se ha diseminado la enfermedad a otros órganos, generalmente pulmones, hígado, huesos y cerebro (metástasis), la atención se concentra en el tratamiento paliativo, con el cual se busca brindar alivio mediante el manejo del dolor, y tratando de mantener la mejor calidad de vida y dignidad para la persona. (Komen, 2017).

Quimioterapia

El cáncer conforme va desarrollándose y progresando, aumenta la probabilidad de inducir metástasis, por lo que se requiere administrar tratamientos combinados y agresivos, como la quimioterapia y radioterapia con el objetivo principal de inducir la muerte de la célula tumoral (Gasparini, 1993; Sánchez & Benítez, 2015).

La quimioterapia es el tratamiento contra células tumorales el cual puede administrarse por vía intravenosa o por vía oral. Con la finalidad de destruir las células tumorales mediante el empleo de una gran variedad de fármacos, que se denominan antineoplásicos o quimioterapias. Los tumores malignos se caracterizan por estar formados por células cuyos mecanismos reguladores de la división se han alterado, por esto son capaces de multiplicarse descontroladamente e invadir y afectar órganos vecinos. Dado que durante la división, la célula es más frágil a cualquier modificación que pudiera surgir en su entorno, en esta fase actúa la

quimioterapia, alterando la división de las células tumorales e impidiendo su multiplicación y por tanto destruyéndolas. Con el tiempo esto se traduce en una disminución o desaparición del tumor maligno (CENETEC, 2005).

Los fármacos viajan a través del torrente sanguíneo para llegar a las células tumorales en la mayor parte del cuerpo. La quimioterapia se recomienda generalmente para todas las mujeres con cáncer de mama invasivo cuyo tumor es negativo para los receptores de hormonas y para las mujeres con receptores hormonales positivos que podrían beneficiarse adicionalmente de la quimioterapia junto con su terapia hormonal.

La quimioterapia se administra en ciclos, con cada periodo de tratamiento seguido de un periodo de recuperación de los efectos adversos a estos fármacos. El tratamiento suele durar varios meses. Existen diferentes situaciones en las que la quimioterapia puede ser prescrita:

- Después de la cirugía (quimioterapia adyuvante): Se suele prescribir cuando los pacientes ya no presentan evidencia de cáncer después de la cirugía, la cual es llamada terapia adyuvante, ésta es usada para las células que pueden haber quedado atrás pero que no se pueden ver incluso en las pruebas de imagen aún después de la cirugía; si se les permite crecer, pueden establecer tumores en otros lugares del cuerpo. La terapia adyuvante después de una cirugía de mama o mastectomía reduce el riesgo de que el cáncer de mama regrese (ACS, 2017).
- Antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante): En términos de supervivencia no hay diferencia entre obtener la quimioterapia antes o después de la cirugía. Pero la quimioterapia neoadyuvante tiene dos beneficios; primero, la quimioterapia puede reducir el tamaño del tumor de modo que pueda ser eliminado con una cirugía menos extensa, se utiliza a menudo para tratar los cánceres que son demasiados grandes para ser extirpados quirúrgicamente. Además, al dar quimioterapia antes de que el tumor se elimine, los médicos pueden ver mejor cómo responde el cáncer (ACS, 2017).

- Quimioterapia concomitante: Se administra de forma simultánea a otro tratamiento, generalmente de radioterapia, permite mejorar la eficacia del tratamiento. Actualmente, se están usando muchas combinaciones y no está claro que una sola combinación sea claramente la mejor. Aunque las combinaciones de fármacos se usan a menudo para tratar el cáncer de mama en etapas tempranas, cuando la enfermedad va avanzada se trata más a menudo con fármacos de quimioterapia individuales. (ACS, 2017; CENETEC, 2005).

Para el cáncer de mama avanzado, la quimioterapia también se puede utilizar como tratamiento principal para las mujeres cuyo cáncer se ha diseminado fuera del área de la mama y las axilas, ya sea cuando se diagnostica o después de los tratamientos iniciales (ACS, 2017).

El cáncer conforme va desarrollándose y progresando, aumenta la probabilidad de inducir metástasis, por lo que se requiere administrar tratamientos combinados y agresivos, como la quimioterapia y radioterapia con el objetivo principal de inducir la muerte de las células tumorales (Gasparini, 1993; Sánchez & Benítez, 2015).

En base al Cuadro básico y catálogo de medicamentos del Consejo de Salubridad General (CSG) los fármacos oncológicos prescritos para el cáncer de mama son:

- Anastrozol
- Bevacizumab
- Capecitabina
- Docetaxel
- Doxorubicina
- Epirubicina
- Exemestano
- Fluorouracilo
- Fulvestrant
- Goserelina
- Idarubicina
- Ifosfamida
- Lapanatinib
- Letrozol
- Megestrol
- Melfalán
- Metotrexato
- Mitomicina
- Mitoxantrona
- Paclitaxel
- Pertuzumab
- Tamoxifeno
- Tiotepa
- Trastuzumab

- Trastuzumab emtansina
- Vinblastina
- Vinorelbina

Uno o más fármacos que se dirigen a HER2 pueden usarse con quimioterapia para tumores que son HER2-positivos. La quimioterapia adyuvante o neoadyuvante suele administrarse durante un total de 3 a 6 meses, dependiendo de los fármacos a utilizar. El tratamiento puede ser más largo para el cáncer de mama avanzado y se basa en lo bien que está funcionando y qué efectos secundarios tienen (ACS, 2017).

A) Doxorubicina

La doxorubicina es un antibiótico perteneciente de la familia de las antracicilinas derivado de la actinobacteria *Streptomyces peucetius*, utilizado como agente quimioterapéutico para el tratamiento de una gran variedad de tipos de cáncer. Se han descrito dos mecanismos de acción que ejerce doxorubicina en las células tanto tumorales como normales.

- Intercalación: debido a la estructura planar, encaja entre las bases de ADN lo cual da cambios topológicos que implican la inhibición la síntesis del ADN y, secundariamente, de ARN y proteínas (Thorn et al., 2011).
- Inhibidor de la Topoisomerasa II: inhibe la actividad de la topoisomerasa II lo que provoca la formación de complejos ternarios ADN-enzima-antraciclina, que conduce a la ruptura del ADN. La formación de radicales libres interviene en la ruptura del ADN tiene un efecto alquilante y de peroxidación de los lípidos celulares también alteración de las membranas celulares mediante la unión a determinadas proteínas y fosfolípidos, activación de la proteína quinasa C que interviene en la inhibición de la transducción de señales originados a nivel de la membrana. Inducción de la apoptosis. Debido a su mecanismo de acción, induce un arresto en G2 de la fase del ciclo celular, así como durante la fase S. (Thorn et al., 2011; PR, Vademecum, 2014).

La doxorubicina también forma radicales libre de oxígeno, dando como resultado una citotoxicidad secundaria a la peroxidación lipídica de los lípidos de la membrana celular; la formación de radicales libres de oxígeno también contribuye a la toxicidad de los antibióticos antraciclínicos (NCBI, 2017). Está compuesto por un anillo tetracíclico plano (anillos a, b, c y d) y por cadenas laterales variables que incluyen un aminoazúcar. Los anillos centrales (b y c) poseen grupos quinona e hidroquinona que actúan como donantes o receptores de electrones y son capaces de formar radicales libres (Figura 11) (NCBI, 2017).

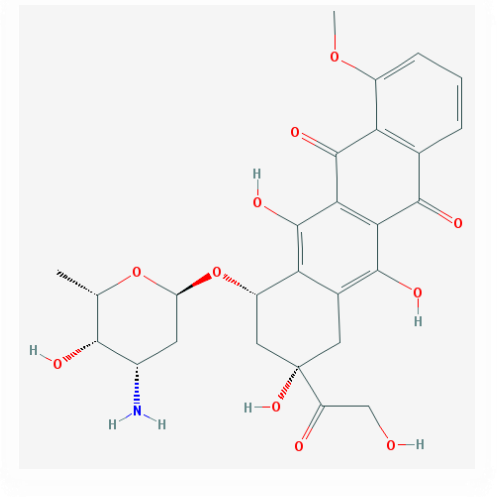


Figura 11. Estructura química de la doxorubicina. Compuesto utilizado para el tratamiento de algunos padecimientos entre los cuáles se incluye el cáncer de mama. (NCBI, 2017).

A continuación, se enlistan los padecimientos para los cuáles se suelen prescribir la doxorubicina en base al Cuadro básico y catálogo de medicamentos del Consejo de Salubridad General (CSG).

- Leucemia linfóblástica aguda
- Leucemia mieloblástica aguda
- Cáncer de mama
- Cáncer de pulmón
- Cáncer de estómago
- Cáncer de ovario
- Cáncer de vejiga
- Cáncer de tiroides
- Enfermedad de Hodgkin
- Neuroblastomas
- Linfoma no Hodgkin

- Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA, resistente a otros tratamientos

Por otro lado, los compuestos de origen natural, como los flavonoides se han descrito que tienen propiedades antioxidantes; estudios recientes han empezado a proponer también que presentan actividad antiproliferativa (Williams, Spencer & Rice-Evans, 2004) sin saber hasta el momento el mecanismo exacto en pueden inducir apoptosis.

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal, son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, se derivan del metabolismo secundario de plantas y juegan un importante papel en varios procesos biológicos (Singh, et al. 2014), se encuentran en las plantas alimenticias y se clasifican según su estructura química, los flavonoides más estudiados son Flavonoles, Flavonas, Flavanonas, Isoflavonas, Catequinas, Antocianinas y Chalconas (Peterson & Dwyer, 1998).

Se han descrito para los flavonoides propiedades antioxidante, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales y antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Álvarez & Orallo, 2003).

Se han identificado alrededor de 4000 flavonoides muchos de los cuales se encuentran en frutas y verduras (Erhart et al., 2005). A continuación, se presentan los flavonoides más comúnmente encontrados en los alimentos (Tabla 1):

Subclase de flavonoide	Ejemplo de compuesto	Principal fuente alimenticia
Flavonoles	Quercetina Kaempferol Myricertina	Cebollas, brócoli, té, varias frutas.
Flavonas	Luteolina Apigenina Tangeritina	Hierbas (especialmente perejil), apio, manzanilla.
Flavanonas	Narigenina Hesperetina	Frutas cítricas incluyendo naranjas y uvas.
Isoflavonas	Genisteina Daidzeina Glyciteina	Productos de soya, incluyendo productos fermentados, tofu,
Antocianinas	Cynaidina Delfinindina Malvidina	Bayas de colores y otras frutas, especialmente arándanos, grosellas negras y moras azules.

Catequinas	Epicatequinas Epigalocatequina	Cacao o chocolate negro, manzanas, uvas, vino tinto y té verde.

Tabla 1. Clasificación de flavonoides y sus principales fuentes de obtención. Hui, C., Qi, X., Qianyong, Z., Xiaoli, P., Jundong, Z., & Mantian, M. (2013). Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PloS one*, *8*(1), e54318.

Estudios epidemiológicos sostienen que el consumo de frutas frescas y vegetales (fuentes importantes de flavonoides) tiene un efecto protector contra el cáncer, la enfermedad cardíaca, la enfermedad coronaria y la apoplejía, así como un efecto positivo para la salud en general (Álvarez & Orallo, 2003). Estos compuestos naturales han demostrado suprimir o bloquear la progresión del cáncer (Yang et al., 2012; Russo et al., 2012). Los mecanismos de acción y las posibles moléculas diana de los flavonoides continúan siendo objeto de investigación, pueden participar en la expresión de proteínas, así como en su actividad catalítica de una amplia gama de enzimas (Álvarez & Orallo, 2003), poseen actividades antioxidantes, afectan en la progresión del ciclo celular y alteran la expresión de genes y proteínas (Erhart et al., 2005).

La mayoría de su actividad biológica ha sido atribuida a sus propiedades antioxidantes, ya sea a través de sus capacidades reductoras o a través de sus posibles influencias sobre el estado redox intracelular. (Williams et al., 2004). Algunos estudios sugieren que los flavonoides tienen beneficios biológicos, como el efecto antioxidante, antiinflamatorio y actividad antitumoral (Hui et al., 2010).

De manera particular, el presente proyecto se enfocó en la utilización de la subfamilia flavona para ver sus efectos sobre la línea celular MDA-MB 231.

B) Flavona

La fórmula molecular de flavona es $C_{15}H_{10}O_2$, la cual tiene un esqueleto de 3 anillos C6-C3-C6 y los anillos se denominan A-, C- y B- respectivamente (Figura 12). Las

flavonas tienen 3 grupos funcionales que incluyen hidroxilo, carbonilo y el doble enlace conjugado (Singh, Kaur & Silakari, 2014).

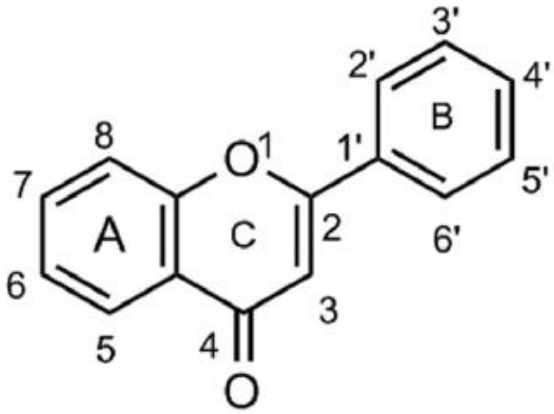


Figura 12. Estructura básica de la flavona. Se muestra el esqueleto de la flavona la cual puede ser sustituida por diferentes grupos funcionales. Se muestran los anillos y las posiciones de los carbonos (Singh, Kaur & Silakari, 2014).

La flavona se encuentra muchos granos, así como también en el eneldo; en la línea celular HT-29, proveniente de adenocarcinoma humano de colon, inhibe la proliferación celular de manera dependiente de la concentración. (Middleton Jr, E., & Kandaswami, C. 1994). De la subfamilia de las flavonas, la quercetina ha sido ampliamente estudiada por presentar efectos antiproliferativos (Csokay et al., 1997. Kuo 1996).

Quimiorresistencia

El problema más difícil que enfrenta la quimioterapia sistémica es el desarrollo de quimiorresistencia que presentan las neoplasias más avanzadas, lo cual limita e impide el efecto terapéutico (Dalton W, 1993; Lehnert M, 1996; Chu & DeVita, 2001; Sánchez-Suárez 2006). La mayor parte de los pacientes con tumores que

responden inicialmente a la quimioterapia, presentan recaídas en su evolución, llegan a ser insensibles al tratamiento por la adquisición de la resistencia adquirida a múltiples fármacos antineoplásicos (MDR). (Skubitz,1990; Astudillo-de la Vega, et al., 2010).

Desde 2000, Hannahan & Weinberg mostraron 6 características del cáncer, en la cuales se incluye la resistencia a la muerte celular (Figura 13), aunque otros autores habían descrito que las células llegan a desarrollar resistencia a los tratamientos antineoplásicos, éste no se había incluido antes como una de las características propias del cáncer.

Figura 13. Características del cáncer. En el 2000 se propusieron seis características distintivas en las que se incluyó la resistencia a la muerte celular. Posteriormente en 2011 se describieron los cuatro restantes que engloban las características del cáncer en la cual ha habido un progreso hacia la compresión de los mecanismos que involucran a cada uno de ellas. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.

La quimioterapia en muchos casos fracasa porque el tumor presenta mecanismos de resistencia a las drogas administradas (resistencia innata), o los desarrolla una vez iniciado el tratamiento (resistencia adquirida). (Astudillo-de la Vega, et al., 2010). Sin embargo, no fue hasta 1973 que se demostró por primera vez que un factor

importante en la resistencia de las células tumorales era la disminución de la acumulación de los fármacos (Figura 14) (Modok et al., 2006).

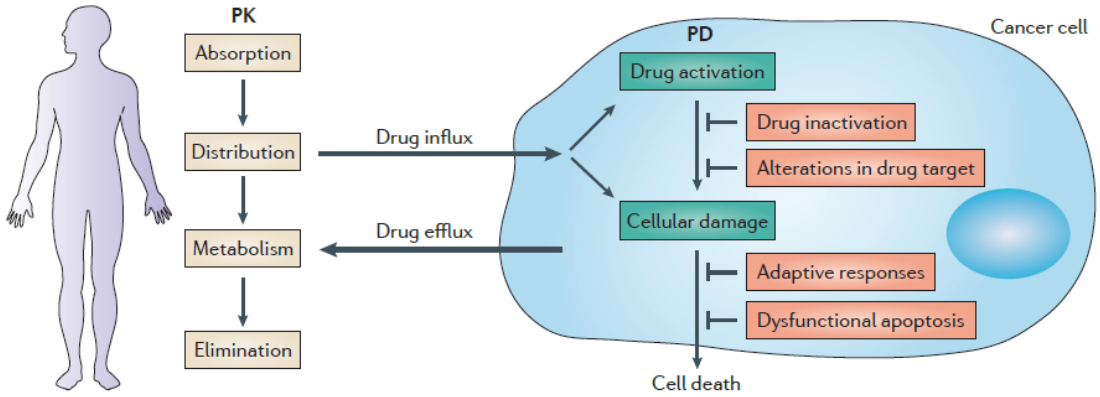


Figura 14. Principios generales de la resistencia a fármacos. Los factores farmacocinéticos como la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco (ADME) limitan la cantidad de fármaco administrado sistémicamente que llega al tumor. En el tumor, los efectos del fármaco sobre la célula tumoral se denominan colectivamente sus propiedades farmacodinámicas. La actividad antitumoral de un fármaco puede estar limitada por la entrada insuficiente de fármacos o un exceso de flujo hacia fuera de la célula, inactivación o falta de activación del fármaco, activación de las respuestas adaptativas y falta de inducción de la muerte celular debido a la apoptosis disfuncional. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer*, *13*(10), 714.

La siguiente tabla (2) muestra los tumores sólidos que regularmente presentan quimiorresistencia a diferentes tipos de quimioterapias.

Agente citotóxico	Tipo de cáncer
Antimetabolitos (5-FU, metotrexato, gemcitabina y citarabina)	Cáncer de mama Cáncer colon-rectal Cáncer pancreático Cáncer gástrico Cáncer de cabeza y cuello Cáncer ovárico Linfoma Leucemia
Compuestos de platino (cisplatino, oxaliplatino)	Cáncer ovárico Cáncer de testículo Sarcoma

	Linfoma Carcinoma de pulmón de células pequeñas
Inhibidores de la Topoisomerasa I (irinotecan)	Cáncer colon-rectal Carcinoma de pulmón de células pequeñas
Inhibidores de la Topoisomerasa II (doxorubicina, etopósido)	Sarcoma de Kaposi Sarcoma de Ewing Cáncer de pulmón Cáncer de mama Cáncer de testículo Linfoma Leucemia Glioblastoma
Estabilizadores del microtubulo (paclitaxel, vinorelbina)	Cáncer de pulmón Cáncer ovárico Cáncer de mama Cáncer de cabeza y cuello Sarcoma de Kaposi

Tabla 2. Resumen de los tumores resistentes a algunos agentes quimioterapéuticos. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer*, *13*(10), 714.

Desafortunadamente, los cánceres de mama con frecuencia se convierten resistentes a la quimioterapia debido a la aparición de variantes celulares resistentes a los fármacos antineoplásicos (Bush & Li, 2002). Aunque la administración de quimioterapia contra el cáncer de mama ha mostrado en términos generales resultados satisfactorios, el desarrollo de la condición de quimiorresistencia tumoral sigue siendo un gran obstáculo. Algunos tumores, son intrínsecamente resistentes a ciertos medicamentos, mientras que otros pueden adquirir resistencia después del tratamiento (LaPensee et al., 2009).

Los fármacos citotóxicos que con más frecuencia se han asociado con MDR son hidrobóficos, productos naturales anfipáticos como los taxanos (paclitaxel, docetaxel), antimetabolitos (metotrexato, fluorouracilo, citarabina, 5-azacytosina, 6-mercaptopurina y gemcitabina), antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina y epirubicina), epipodofilotoxinas (etoposido y teniposido), topotecan, dactinomicina y

mitomicina C (Ambudkar et al., 1999; Krishna & Mayer 2000; Stavrovskaya 2000; Thomas & Coley, 2003).

Se han descrito algunos mecanismos pleiotrópicos de resistencia a múltiples fármacos entre los cuáles podemos mencionar:

1) **Disminución en la capacidad de absorción del fármaco**

A pesar de los factores farmacéuticos, el principal obstáculo que impide que un fármaco alcance el compartimiento intracelular es la membrana plasmática. Los agentes terapéuticos pueden entrar a las células por difusión pasiva, endocitosis o por transporte facilitado (Gillet & Gottesman, 2012).

2) **Incremento del metabolismo del fármaco**

Una vez dentro del compartimiento intracelular, las enzimas que metabolizan a los fármacos son la segunda línea de la resistencia celular. Este proceso involucra tres fases: Fase I o metabolismo oxidativo, está mediada principalmente por las enzimas del citocromo P450 y las epóxido hidrolasas. Los fármacos pueden conjugarse con enzimas de fase II como las GST, UGT, SULT y NATS, estos metabolitos conjugados son entonces expulsados por transportadores, que pueden ser considerados como fase III del metabolismo del fármaco (Gillet & Gottesman, 2012).

3) **Secuestro del fármaco**

Los fármacos pueden ser atrapados en organelos subcelulares tales como los lisosomas y endosomas a través de ATP7A/B, ABCA3 o ABCB5 y luego expulsarse de la célula (Gillet & Gottesman, 2012).

4) **Mecanismos activados después de la entrada al núcleo (alterar los blancos terapéuticos)**

Los antineoplásico basados en la estrategia de profármaco evaden los anteriores mecanismos, entran en el núcleo donde encuentran otros mecanismos de resistencia. Estos profármacos pueden ser transferidos a través de proteínas “vault”

al citoplasma y ser secuestradas en vesículas intracelulares o expulsadas de la célula a través de un transportador dependiente de ATP (Gillet & Gottesman, 2012).

5) Desacople de la vía apoptótica

La interrupción de las vías apoptóticas es un obstáculo importante para el éxito de la quimioterapia. Como supresor de tumores, p53 puede inducir la detención del ciclo celular, con lo que se frena lo proliferación y se activan mecanismos de reparación o de apoptosis; sin embargo, en condiciones tumorales p53 se encuentra altamente mutada y la vía apoptótica se ve alterada (Bush & Li, 2002). La proteína p53 es un factor clave en la inducción de la apoptosis en respuesta a la radioterapia y la quimioterapia, además el 50% de los tumores expresan la mutación en esta proteína. En condiciones fisiológicas normales esta proteína se activa en respuesta a diferentes lesiones celulares; dando como resultado la detención del ciclo celular y la apoptosis. La activación de p53 está mediada por diferentes mecanismos celulares tales como agentes dañinos del ADN, nucleótidos alterados, cambios en el potencial redox, interrupción del huso mitótico. Por lo que la mayoría de los agentes citostáticos tienen que ser activadores de p53. Cuando p53 se encuentra mutado, las células son menos propensas a iniciar la apoptosis y más resistentes a los daños al ADN, como la inducida por los fármacos quimioterapéuticos. De hecho, la presencia de un funcionamiento anormal de p53 es un hallazgo común en MDR de las células tumorales. Estudios realizados en el NCI reveló una correlación positiva entre el estado del p53 y la sensibilidad de las células tumorales a los fármacos citotóxicos. Las células que contienen p53 mutante son a menudo más resistentes a agentes quimioterapéuticos que las células que contienen el “wild type” (tipo salvaje) de p53 (O´Connor et al., 1997).

6) Microambiente tumoral

Las células tumorales están expuestas a condiciones de estrés como inadecuada vascularización en tumores sólidos grandes, privación de glucosa, hipoxia y bajo pH

pueden contribuir a subclonas selectivas que disminuyen el potencial apoptótico y por lo tanto conducir a la resistencia a fármacos antitumorales (Fodale et al., 2011).

Hipoxia puede regular la expresión de numerosos genes ligados a MDR tales como los transportadores ABC, la familia de genes Bcl2, glutatión, etc. principalmente a través de la activación del factor de transcripción HIF-1. El cual puede disminuir la efectividad de los agentes quimioterapéuticos que requieren oxidación para convertirse en citotóxicos o aumenta la citotoxicidad de otros agentes que deben sufrir reducción para formar especies citotóxicas activas (Gillet & Gottesman, 2012).

Un pH bajo en el dominio extracelular provoca la protonación y la neutralización de agentes quimioterapéuticos básicos que les impiden entrar en las células diana y que explican su función citotóxica (Fais, 2010).

7) Vías de transducción de señales

Las células tumorales han alterado las vías de transducción de señales a través de receptores de integrina, receptores de factores de crecimiento, receptores tipo *Frizzled,* estas vías alteradas pueden conducir al bloqueo de la apoptosis y la expresión de genes vinculados con MDR, como los involucrados en la reparación del DNA y bombas transportadoras. Además, las células tumorales a menudo muestran anormalidades cromosómicas que pueden conducir a la sobreexpresión de genes antiapoptóticos (Gillet & Gottesman, 2012).

8) Expulsión del fármaco

Una disminución de la acumulación intracelular del fármaco puede resultar por la disminución en la entrada o también por un aumento en la capacidad de expulsión del fármaco de las células. Debido a que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos pueden entrar a la célula por difusión pasiva a través de la membrana plasmática, se ha considerado que la expulsión del fármaco es el principal mecanismo implicado en la reducción de la acumulación de quimioterapéuticos en las células tumorales (Gatti & Zunino, 2005).

El incremento de la expulsión de fármacos es a menudo responsable de una mayor resistencia la quimioterapia y frecuentemente se deben a una mayor expresión de las proteínas transportadoras de casete de unión a ATP (transportadores ABC) (Gottesman M, et all., 2002). Este tipo de resistencia puede afectar una gamma de quimioterapéuticos con diferentes mecanismos de acción y se denomina resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Wilson T, et al., 2006). La sobreexpresión de los transportadores de membrana causa un incremento en el flujo de salida y en la disminución en la acumulación intracelular de fármacos que conducen multirresistencia a fármacos (MDR) (Mo & Zhang, 2012).

9) Alteración de los puntos de control del ciclo celular

Las células responden al daño hacia el ADN al activar los puntos de seguridad que finalmente bloquean la actividad de las CDK y, en consecuencia, causa un paro en la progresión de ciclo celular. Las células eucariotas activan un conjunto de proteínas de punto de control que inducen rápidamente al paro del ciclo celular para evitar la replicación del ADN dañado antes de que se complete la reparación (Gatti & Zunino, 2005).

La quimiorresistencia mediada por el ciclo celular se describe como una insensibilidad relativa a agentes específicos de fase del ciclo celular; este fenómeno es relevante en aquellas combinaciones que implican taxanos, dado que el paclitaxel es un fármaco específico de la fase M, se podría sugerir que los agentes que detienen a las células antes de entrar en la fase M del ciclo celular antagonizarían los efectos del paclitaxel (Gatti & Zunino, 2005).

En la siguiente imagen se pueden observar los mecanismos de quimiorresistencia más estudiados (Figura 15), siguiendo la orientación de las manecillas del reloj:

1. Disminución en la capacidad de absorción del fármaco.
2. Aumentar la velocidad de la degradación metabólica de los fármacos.
3. Los blancos terapéuticos ya no son expresados.
4. Hay un desacople en la vía apoptótica.

5. La célula tumoral altera los puntos de control del ciclo celular, aumentando su capacidad proliferativa.
6. La salida del fármaco citotóxico que había ingresado a la célula y es mediado por la actividad de un transportador dependiente de ATP que va en contra del gradiente de concentración (los transportadores ABC).

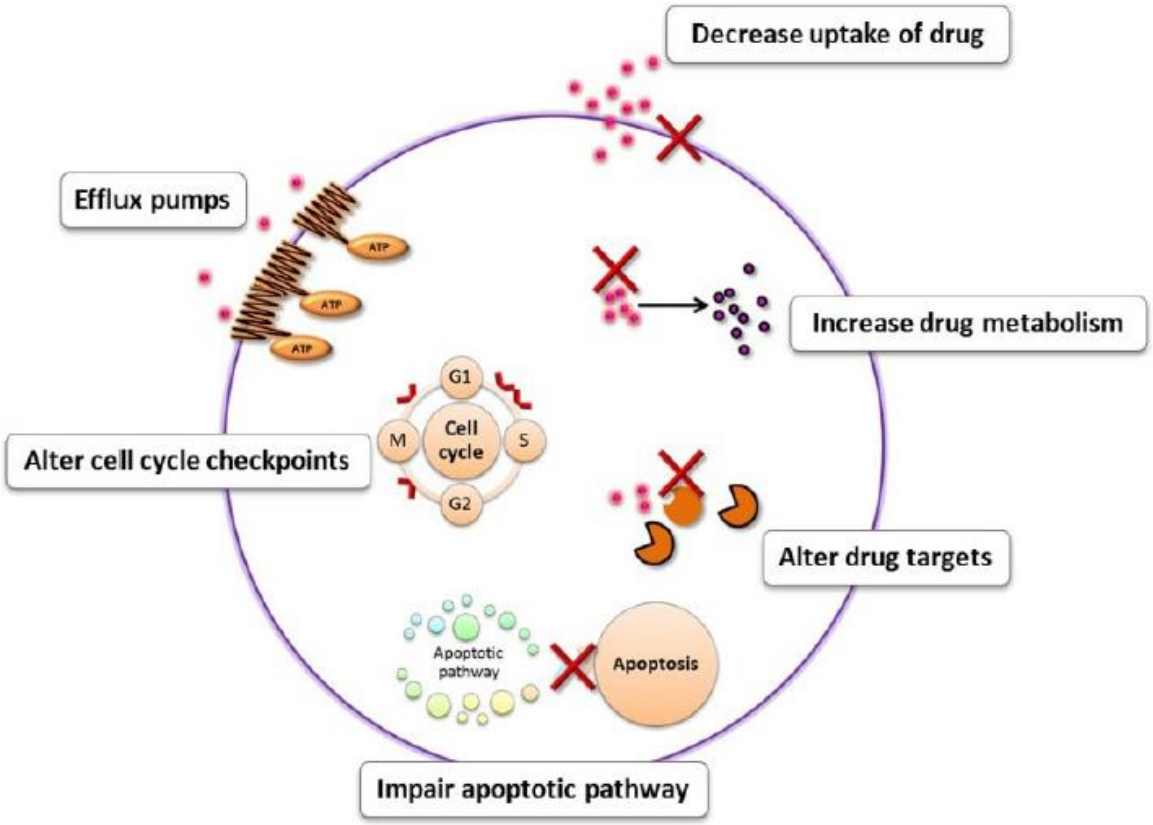


Figura 15. Mecanismos de multirresistencia a fármacos. Las células tumorales pueden desarrollar resistencia a múltiples fármacos por diversos motivos tal como se describe. Chai, S., To, K. K., & Lin, G. (2010). Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chinese medicine*, *5*(1), 26.

La expulsión del fármaco fuera de la célula es probablemente el mecanismo de resistencia más estudiado, y está relacionado con la acción de ciertas proteínas transportadoras ABC localizadas en la membrana plasmática de las células tumorales (Sánchez & Benítez, 2015).

Transportadores ABC

La familia de proteínas conservadas evolutivamente de los transportadores ABC está presente en casi todos los organismos vivos, desde procariotas a mamíferos. Los transportadores ABC son llamados así debido a sus siglas en inglés de ATP-Binding Cassette, que significa casete de unión a ATP, la cual es, una unidad de proteína globular de 200-250 aminoácidos a la cual puede unirse e hidrolizarse el ATP (Szakacs et al, 2008); estos transportadores presentan las siguientes características: son proteínas unidas a la membrana, constituidos por una combinación de dominios, incluyendo del lado citoplasmático el sitio de unión a ATP (ABC) y las regiones transmembranales (TMD). De manera general, los transportadores ABC contienen un mínimo de 2 unidades ABC y 2 TMD (Szakacs et al, 2008). Sus TMD están compuestos en la mayoría de los casos por 6 hélices que se extienden en la membrana y los sitios que interactúan con los sustratos transportados probablemente se encuentran localizados dentro de los TMD (Szakacs et al, 2008). Todas las proteínas de la familia ABC contienen al menos 3 secuencias peptídicas características: las secuencias de proteínas “Walker A y B”, la presencia de dominios transmembranales y los sitios de unión a ATP. (Cervenak et al., 2006).

Estos transportadores son responsables de transportar a través de la membrana celular una amplia gama de compuestos en contra su gradiente de concentración con gasto de energía (Borst & Elferink, 2002). El mecanismo de acción que hasta ahora se ha propuesto es que después de la hidrólisis de ATP, ocurre un cambio conformacional dentro de los TMD responsables del movimiento de sustratos a través de la membrana (Szakacs et al., 2008).

En los mamíferos, especialmente en los roedores y humanos, los sustratos típicos de los transportadores ABC incluyen: aminoácidos, vitaminas, lípidos, esteroles, sales biliares, péptidos, nucleótidos, iones, toxinas y fármacos oncológicos (Borst, & Elferink, 2002; Lagas, J, et al., 2009; Vlaming et al., 2009; Franke et al., 2010; Klaassen & Aleksunes, 2010; Tamaki et al., 2011; Pluchino et al. 2012; Borst & Schinkel, 2013; Hayashi & Sugiyama, 2013).

El genoma humano codifica 48 proteínas ABC las cuales pueden agruparse en 7 subfamilias de la A hasta la G (Figura 14) que pueden estar expresadas en tanto en células normales como en células tumorales (Leonard et al., 2003).

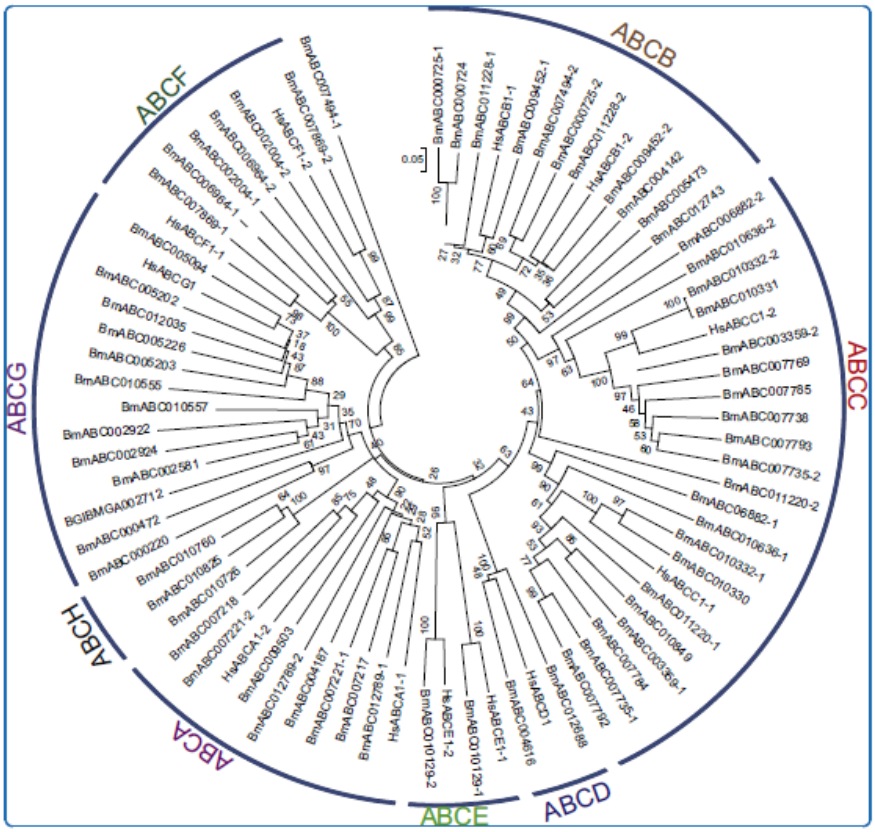


Figura 16. Árbol filogenético de los transportadores ABC. El árbol filogenético se construyó utilizando una técnica de unión vecina para analizar las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a nucleótidos. Las subfamilias de A-G se encuentran en el genoma humano. La octava subfamilia (H) se definió tras el análisis del genoma de la mosca de la fruta, *Bombyx mori* de la cual hay 51 genes para ABC (Liu et al., 2011).

Fueron llamadas proteínas resistentes a múltiples fármacos por su importante papel, reconocido hace más de 30 años, en la resistencia contra el cáncer (Szakacs et al, 2008). Un importante número de enfermedades genéticas humanas se han relacionado con defectos en los genes que codifican para los transportadores ABC (Riordan, 1999); y una causa principal del fracaso de la quimioterapia es la resistencia de las células tumorales contra los fármacos citotóxicos, y una forma principal de esta resistencia puede ser debida al aumento en la expresión de las

proteínas transportadoras ABC (Cervenak et al., 2006). Por ejemplo, la expresión del gene de los transportadores ABC, como el ABCC1 en la línea celular CCC ha sido asociada por la resistencia a cisplatino, etopósido y mitomicina C. (Itamochi et al., 2002).

En el humano, se han descrito hasta el momento tres tipos principales de proteínas responsables de la quimiorresistencia que presentan algunos tipos celulares normales y tumorales: a) ABCB (ABCB1/MDR1/P-glycoprotein); b) ABCC (ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2), y c) ABCG (ABCG2/MXR/BCRP) (Sarkadi et al. 2006). Los transportadores del tipo ABCB1, ABCC1 y ABCG2 han sido ampliamente estudiados en relación con la resistencia que ofrecen a fármacos oncológicos. (Dean & Allikmets, 2001), a continuación (Figura 17) se muestran las estructuras de estas tres proteínas, en las cuales se observan sus segmentos transmembranales y sus sitios de unión a ATP los cuales les confieren la capacidad de expulsar los fármacos antineoplásicos.

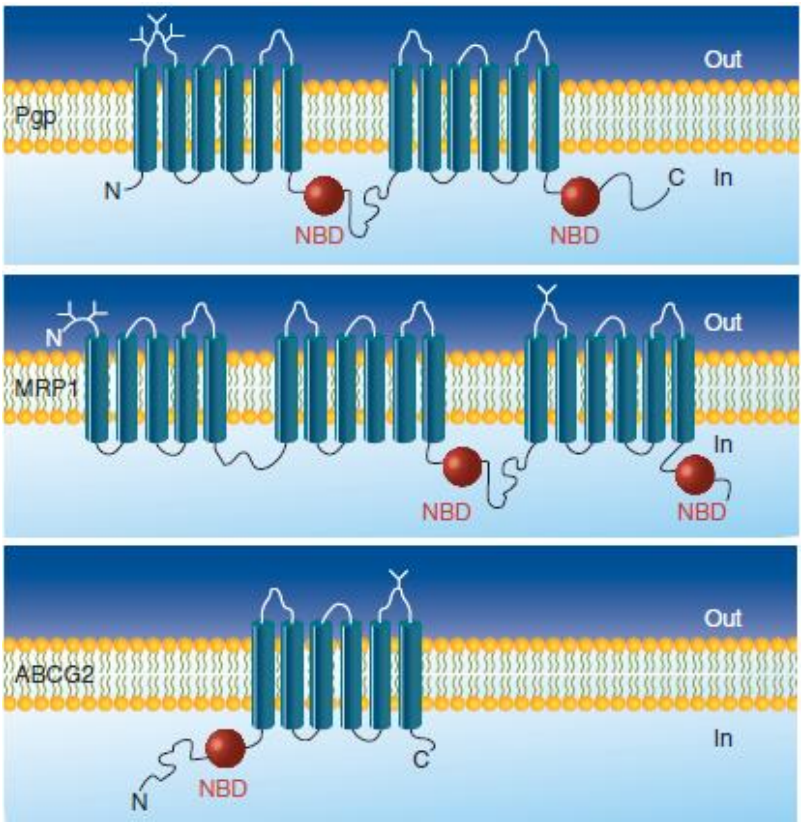


Figura 17. Topología propuesta de los transportadores de membrana de la familia ABC. El transportador Pgp es un transportador completo con 12 segmentos transmembranales y dos sitios citoplasmáticos de NBD, que surgió de una duplicación de genes. Las porciones amino y carboxilo terminal se encuentran dentro del lado citoplasmático y el primer loop extracelular contiene 3 sitios de glicosilación (Zhang & Ling, 1991). La topología de MRP1 es similar a la de Pgp pero posee un dominio amino terminal adicional con cinco segmentos TM de los cuales su función es desconocida (Hipfner et al., 1997). El ABCG2 es conocido como un medio transportador y se ha propuesto que funciona como un homodímero para ser un transportador funcional. Sharom, F. J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance.

ABCG2

El transportador ABCG2 es una proteína de 72 kDa que fue descubierta por primera vez en 1998 en la línea celular de cáncer de mama resistente a múltiples fármacos: MCF-7/AdrVp. (Doyle et al., 1998). Los transportadores ABCG2 contienen dos tipos de dominios estructurales: el dominio hidrofóbico de membrana (MSD) que contiene 6 α-hélices transmembranales y un dominio de unión de nucleótidos intracelular N-terminal (NBD). (Özvegy, 2001; Haimeur et al., 2004; Wang et al., 2008).

El ABCG2 fisiológicamente se encuentra distribuido en diferentes tejidos del cuerpo humano incluyendo sincitiotrofoblastos de la placenta, en las membranas caniculares del hígado, en endotelio cerebral y en células madre (Allen &Schinkel 2002), en riñón, en colon, en células epiteliales del intestino (Malierpaard et al., 2001, Cervenak et al., 2006), y, en conductos y lobulillos de tejido mamario donde se bombean una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos de la célula. (Maliepaard et al., 2001; Leslie et al., 2005; Sarkadi et al., 2006; Hardwick et al., 2007). En los epitelios polarizados el ABCG2 se encuentra expresado hacia el lado apical de la membrana, por ejemplo, en la membrana canalicular biliar de los hepatocitos (Malierpaard et al., 2001, Cervenak et al., 2006).

La distribución tisular de ABCG2 sugiere que su función fisiológica principal puede estar implicado en la regulación de la absorción intestinal y la secreción biliar de xenobióticos potencialmente tóxicos (Scharenberg et al., 2002; Kim et al., 2002; Cervenak et al., 2006). También tiene una participación importante en la barrera placentaria y en la barrera hematoencefálica. (Scharenberg et al., 2002; Kim et al., 2002; Cervenak et al., 2006). De manera particular, ABCG2 también está presente en varias células madre; donde ésta proteína es un marcador de las células SP (side

population) que representan a las células madres pluripotentes. (Scharenberg et al., 2002, Kim et al., 2002, Cervenak et al., 2006). El ABCG2 probablemente forma un homodímero activo para su funcionamiento de transportador (Varadi et al., 2003, Cervenak et al., 2006).

El ABCG2 tiene el potencial de contribuir a la resistencia a fármacos en las células tumorales; está sobreexpresado en varias líneas celulares para mostrar resistencia a fármacos, es un transportador de alta capacidad con gran especificidad de sustratos. Los sustratos transportados incluyen fármacos citotóxicos, toxinas y carcinógenos, así como también compuestos endógenos. (Abbott, 2003; Schinkel & Jonker, 2003).

La sobreexpresión del transportador ABCG2, también conocido como proteína resistente en el cáncer de mama (BCRP), ha sido considerada la principal causa de la quimiorresistencia que presentan las células tumorales provenientes de cáncer de mama (Abbott, 2003; Schinkel & Jonker, 2003). La expresión de este medio transportador fue inicialmente relacionada con la resistencia a mitoxantrona (Ross et al., 1999), posteriormente se ha asociado con resistencia a las camptotecinas (Allen et al., 2003), elevada resistencia a las antraciclinas (mitoxantrone, daunorrubicina, doxorubicina), metotrexato (Volk et al., 2002), etopósido (Gatti & Zunino, 2005) y a los inhibidores de la topoisomerasa I (Maliepaard et al, 1999; Ross, 1999; Tan, 2000). La proteína ABCG2 puede transportar fármacos hidrofóbicos, compuestos anionicos y fármacos conjugados (Sarkadi et al, 2006). Se cree que la quimiorresistencia puede ser revertida al inhibir el eflujo de los fármacos (Chai, S., To, K. K., & Lin, G. 2010).

Se desconoce hasta el momento que señal o señales extracelulares presentes en el microambiente tumoral son las responsable de su expresión. Por otro lado, los factores de crecimiento están relacionados en exacerbar el potencial metastásico de las células tumorales incrementando su tasa proliferativa, migratoria, invasiva y reduciendo su capacidad apoptótica.

Factores de Crecimiento

Bajo condiciones fisiológicas, las células reciben señales de destino a partir de los tejidos de su entorno, principalmente en la forma de Factores de Crecimiento (GF) polipeptídicos (Witsh et al.,2010). Las células químicamente transformadas, así como también células derivadas de tumores humanos con frecuencia secretan GF´s, los cuales son responsables de la autoestimulación del crecimiento (Waterfield et al.,1982).

Los factores de crecimiento relacionan a la célula con su medio externo (extracelular) y son capaces de modificar características tanto de la propia célula que los sintetiza como de las células vecinas que distinta estirpe, participando en regulaciones autocrinas y paracrinas (Martínez-Carpio, 2003). Una de las funciones de los factores de crecimiento es estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis. También intervienen en el mantenimiento de la supervivencia celular, estimulan la migración y diferenciación celular y la apoptosis (Witsch et al., 2010). Los factores de crecimiento y sus receptores han sido implicado en diversas etapas de la progresión del cáncer (Wesche et al., 2011) y pueden ser secretados por las mismas células tumorales y por las células del estroma que rodean al tumor (Said & Williams, 2009).

Entre los más estudiados destacan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante-α (TGF-α), el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las interleucinas 2 y 3 (IL-2, IL-3), los factores de crecimiento insulinoides tipos I y II (IGF-I. IGF-II), la somastotatina, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) entre otros. Algunos son ubicuos e imprescindibles para la supervivencia de cualquier célula y pueden medirse en el suero a concentraciones del orden de 10^{-9} a 10^{-11} M (Martinez-Carpio, 2003).

Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos que mantiene su estructura tridimensional por tres puentes disulfuro (Figura 18) (Carpenter G, 1979), el gen que codifica para el EGF en humanos se localiza en el cromosoma 4. (Brissenden JE et al, 1985). La función básica de este factor de crecimiento es el estimular el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia celular (Herbst, 2004). Se une a los receptores de la superficie celular con actividad tirosin cinasa intrínseca (Carpenter and Cohen, 1979).

El EGF fue descubierto en 1961 por Stanley Cohen y Rita Levi-Montalcini en extractos de la glándula submaxilar de ratón. Cuando este factor, extraído de dicha glándula, se inyectaba al ratón recién nacido, se producía una apertura precoz de los párpados y una erupción prematura de los incisivos. El análisis histopatológico de los párpados mostraba una hiperplasia y queratinización de la epidermis, motivo por el cual se le denominó “factor de crecimiento epidérmico” (Cohen, 1961).

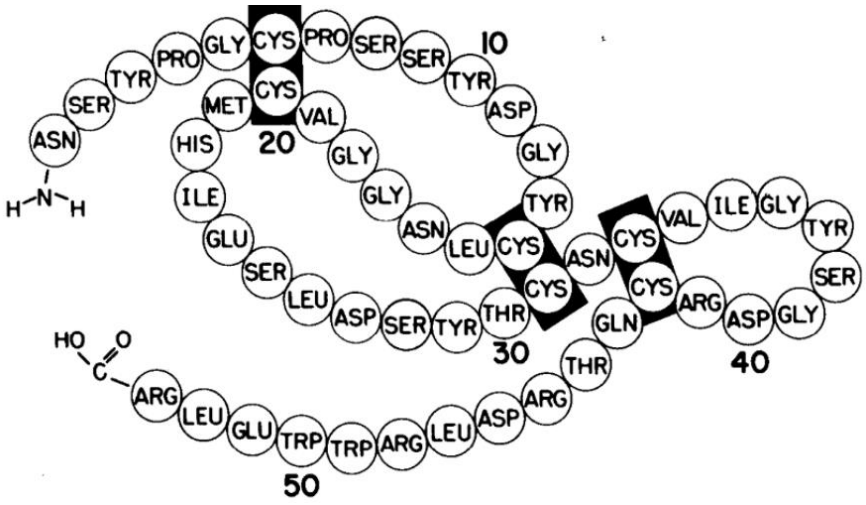


Figura 18. Secuencia de aminoácidos del EGF señalando los tres puentes disulfuro Savage, C. R., Hash, J. H., & Cohen, S. (1973). Epidermal growth factor location of disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(22), 7669-7672.

Sus principales lugares de síntesis son las glándulas salivares y el riñón (Rall et al., 1985), pero se ha detectado actividad transcripcional (EGF ARNm) en células mamarias, macrófagos, páncreas, intestino delgado y muchos otros tejidos; y se ha

cuantificado por métodos inmunoquímicos en la mayoría de los fluidos biológicos y en el plasma (Hirata et al., 1980).

Actualmente se acepta que el gen del EGF se traduce en un precursor de transmembrana de 1217 aminoácidos y que la secuencia del EGF maduro (53 aminoácidos) es liberada mediante un proceso proteolítico, la cual es un relativamente lenta y consta de dos etapas; primero se produce una escisión sobre los residuos de alanina o valina más próximos al extremo carboxilo terminal del péptido maduro (Pandiella & Massague, 1991) y luego una segundo proteólisis sobre el residuo de valina del extremo carboxilo terminal del lado citoplasmática, que se supone permitiría un control intracelular sobre la liberación del EGF maduro al medio (Brigman, Lindquist & Derynck, 1987).

La acción del EGF es mitogénica en la mayoría de los casos (Martínez-Carpio, 1999) aunque se ha observado que en ciertas líneas celulares, como en el caso de las líneas triple negativo de cáncer de mama parece correlacionarse inversamente con el número de EGFR que expresan en su membrana, que a su vez en las líneas mamarias, se correlaciona con la facultad de poder prescindir de estrógenos y experimentar un crecimiento autónomo incontrolado (Martínez-Carpio et al., 1998; Martínez-Carpio et al., 1999).

Receptor a EGF

Una familia de proteínas receptoras transmembranales con actividad intrínseca de tirosina cinasa cuya proteína principal es el receptor a EGF (EGFR, también llamado HER-1 (receptor EGF humano) y c-erbB1); fue el primer receptor descrito por poseer actividad tirosina cinasa y el primero en ser secuenciado (Wells 1999). En humanos, hay cuatro tipos de receptores EGFR: EGFR (ErB-1), HER2/neu (ErB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4) (Schlessinger, 2002). Los ligandos conocidos para el EGFR incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF-α), la anfiregulina (AR), la epiregulina (EREG) y la heparina

ligada a EGF (HB-EGF) (Sibilia et al., 2007), en la figura 19 se pueden observar algunos ligandos del EGFR, así como otros tipos de EGFR.

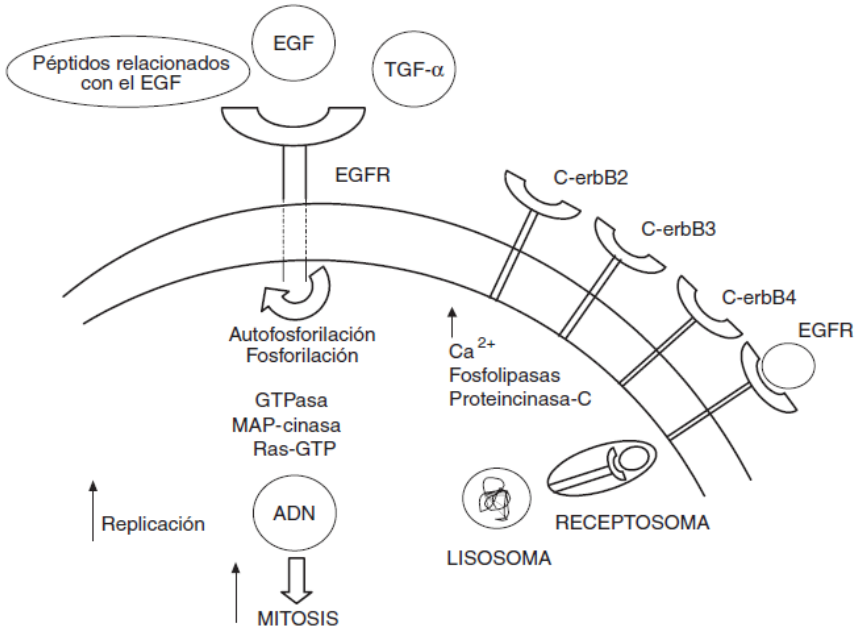


Figura 19. Receptor del EGF (EGFR) y sus ligandos en la fisiología celular. Martínez-Carpio, P. A. (2003). El factor de crecimiento epidérmico cuarenta años después de su descubrimiento: de la bioquímica a la clínica. *Endocrinología y Nutrición*, *50*(8), 334-344.

El receptor para EGF (EGFR) es una glucoproteína de 170 kDa, formada por una sola cadena de aminoácidos, codificada el gen *c-erbB1* ubicado en el brazo corto del cromosoma 7 (Tsui & Farral, 1991). Esta proteína consta de un solo segmento transmembranal, el extremo amino terminal localizado en el dominio extracelular posee el sitio de unión específico para EGF, y del lado carboxilo terminal, en el dominio intracelular posee actividad intrínseca de tirosina cinasa (Hernandez-Sotomayor & Carpenter. 1992).

La unión del ligando hace que el EGFR forme dímeros, la cual puede ser mediante una completa homodimerización y/o heterodimerización (Kruser & Wheeler, 2010), lo cual permite a los dos dominios citoplasmáticos fosforilarse uno al otro, esta

fosforilación cruzada se denomina autofosforilación porque se produce dentro del receptor dimérico; es decir, el EGF induce un cambio conformación en el dominio extracelular que induce la dimerización del receptor (Martínez-Carpio, 2003).

La activación del receptor tiene lugar la activación de cascadas de señalización específicas que conducen a la activación de vías como PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK/Erk y STAT (Kruser & Wheeler, 2010). La unión del ligando al receptor inicia un complejo programa de activación, incrementándose al calcio citosólico y, finalmente, la síntesis de ADN, el crecimiento y proliferación celular (Martínez-Carpio, 2003).

Casi todas las células en los mamíferos expresan EGFR, a excepción de algunas células sanguíneas diferenciadas de la serie blanca; así como también se encuentra en tejidos mamarios normales y tumorales, en líneas celulares de cáncer de mama observándose una sobreexpresión de EGFR en células tumorales con respecto a las células normales, pudiéndose considerar bajo ciertas condiciones como un marcador molecular que indique el grado de malignidad del tumor (Martinez-Carpio, 2003).

Se sabe que la sobreexpresión del receptor a EGF es capaz de generar un fenotipo tumoral que involucra un aumento en la proliferación celular y evasión de la apoptosis (Hardy KM, 2010). Numerosos estudios han reportado la activación de EGFR como un mecanismo de quimiorresistencia (Holohan et al., 2013). La activación de la vía de señalización EGFR/c-erbB2/MAPK se ha relacionado recientemente no sólo en la activación directa del crecimiento celular, sino que también en el desarrollo de la resistencia contra la terapia hormonal en el cáncer de mama (Britton et al., 2006). Se ha encontrado la sobreexpresión de EGFR principalmente en tumores de cabeza y cuello, seguidos por el carcinoma de células pancreáticas y de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y glioblastomas (Salomon et al., 1995; Nicholson et al., 2001; Sharma et al., 2007).

Una de las más importantes vías de señalización involucradas en el desarrollo de quimiorresitencia es la vía PI3K/Akt. La activación de esta vía ocurre a través del

EGFR, interleucinas y otras proteínas involucradas en la supervivencia celular. La activación de PI3K conduce al reclutamiento del receptor en la membrana celular y la consiguiente producción de fosfo inositil 3 fosfato. Este segundo mensajero es responsable de la translocación de Akt a la membrana celular y de la mediante participación de Grb2/SOS, IRS-1 y Shc, causa la activación de Ras y, en consecuencia, la vía Raf/MEK/Erk (Grandage et al., 2005). Se ha identificado que ERBB3 (también conocido como HER3) y la cascada de señalización a través de la vía PI3K-Akt como un importante mecanismo de resistencia adaptativa a terapias dirigidas contra EGFR in vitro e in vivo (Sergina et al., 2007; Wheeler et al., 2008). Este mecanismo se ha denominado “bypass oncogénico” porque el fármaco primario permanece inalterado y continúa inhibido, pero una cinasa alternativa se activa debido a un bucle de retroalimentación adaptativa o una mutación genética (Holohan et al., 2013). En células de cáncer ovárico, ha sido asociado una sobreexpresión de EGFR con un mal pronóstico en estas células ya que fue detectado por medio de inmunohistoquimica en un 61 % de los tumores CCC (Carcinoma renal de Células Claras) (Fujimura et al., 2002).

La sobreexpresión del EGFR que se encuentra tanto en tejidos tumorales como en líneas celulares de cáncer de mama se relaciona de modo inverso al número de receptores estrogénicos en el mismo tumor, esto se ha asociado a un peor pronóstico y menor supervivencia en el caso de cáncer de mama, entre otras cosas por la falta de respuesta a la terapia hormonal (Rajkumar & Gullick, 1994). En general, los tumores que sobreexpresan el EGFR muestran in vivo una menor respuesta a la radioterapia y menor apoptosis (Martínez-Carpio, 2003).

Vías de señalización del EGF

En las células tumorales la unión de un factor de crecimiento con su receptor promueve la activación de diversas cascadas de señalización intracelulares que controlan procesos celulares vitales como la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular (Wesche et al., 2011). Los procesos de fosforilación de tirosina son muy rápidos, y por ellos estos cortos eventos señal

deben convertirse en señales más duraderas. Esto se consigue a través de la fosforilaciones de residuos de serina y treonina, en que intervienen las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos). Cuando la MAP-cinasa se encuentra activada fosforila algunas proteínas reguladoras de genes (Prigent & Lemoine, 1992; Alberts & Lewis, 1997; Martínez-Carpio, 1999).

Cuando el EGF se une a su receptor, se internaliza el complejo y ambos son degradados en los lisosomas (Chen et al., 1989), lo que conlleva a un descenso en la concentración de los receptores de EGF en la superficie celular, como resultado, la concentración del ligando señal en el medio extracelular regula el número de moléculas de receptor complementario en la superficie de la célula diana (Figura 20) (Alberts & Lewis, 1997).

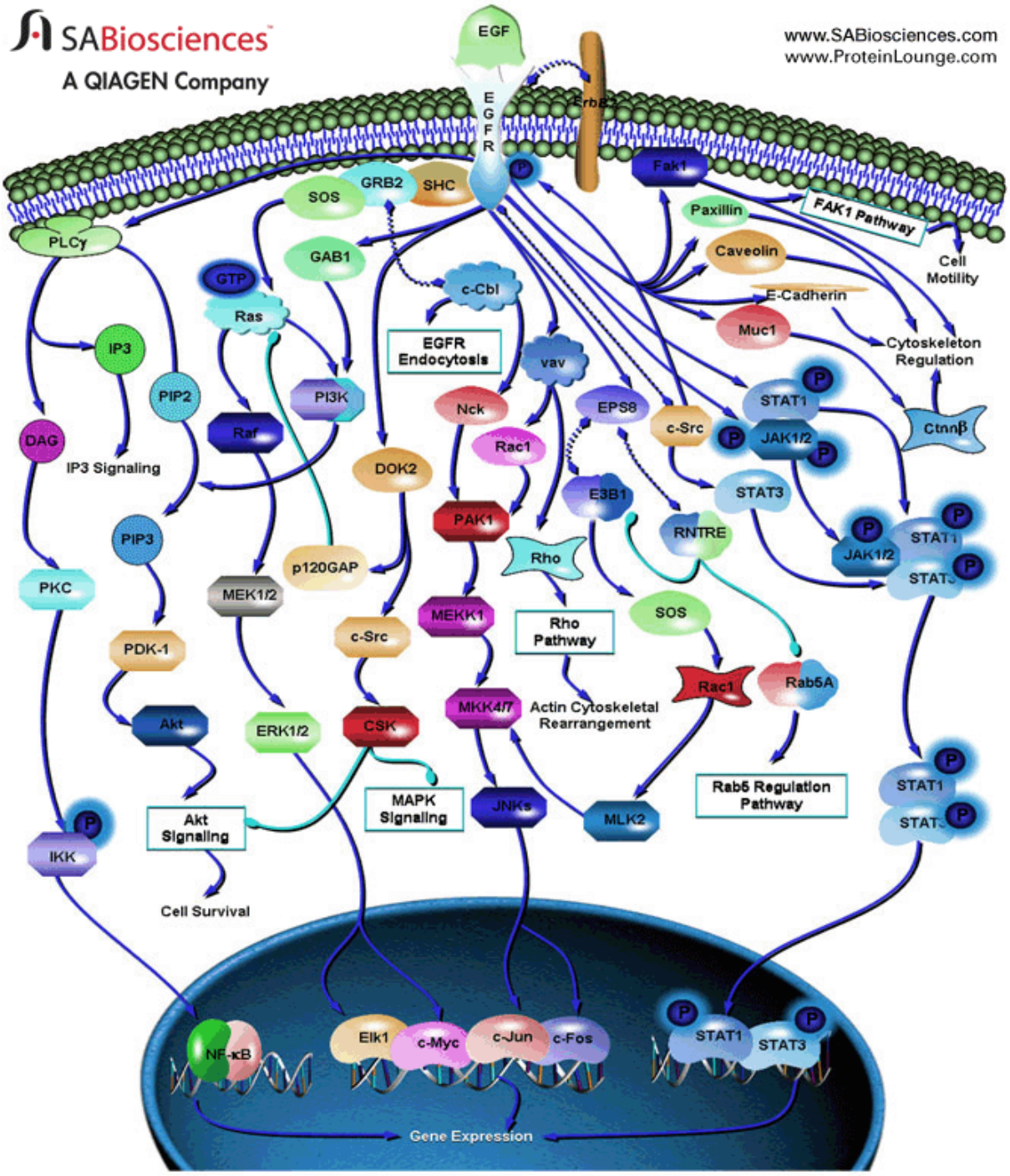


Figura 20. Vías de señalización del EGF. La vía MAPK es conocida como la vía canónica. El EGF una vez que se une a su receptor se dimeriza, después se endocita para desencadenar diferentes vías de señalización que inducen a la expresión de genes. SABIOSCIENCES a QIAGEN Company. (2000-2012). EGF pathway. EU. QIAGEN. Recuperado de http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=EGF_Pathway

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes y una de las primeras causas de muerte por cáncer (McGuire, 1992). Conforme el cáncer de mama va desarrollándose y progresando, las células tumorales comienzan a presentar quimiorresistencia, reduciendo de manera importante la efectividad terapéutica de la quimioterapia, aumentando con esto la probabilidad del desarrollo de metástasis y por consiguiente la muerte del paciente.

Diversas evidencias muestran que la expresión del transportador ABCG2 está relacionada positivamente con el grado de quimiorresistencia que presentan las células tumorales a los fármacos antineoplásicos. Se desconoce hasta el momento que mensajero o mensajeros extracelulares presentes en el microambiente tumoral son los responsables de la expresión del transportador ABCG2. Hay evidencias experimentales que muestran que el EGF estimula el crecimiento tumoral e inhibe la apoptosis, por lo que analizamos en el presente proyecto el probable papel que pudiera estar ejerciendo el EGF como inductor de la quimiorresistencia que presentan las células tumorales mediante un aumento en los niveles de expresión del transportador ABCG2.

HIPÓTESIS

El Factor de Crecimiento Epidérmico exacerba la quimiorresistencia en las células MDA-MB 231 incrementando los niveles de expresión del transportador ABCG2.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que ejerce Factor de Crecimiento Epidérmico sobre la quimiorresistencia en la línea celular MDA-MB-231, mediante la expresión funcional del transportador ABCG2.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del EGF sobre el nivel de expresión del transportador ABCG2 en la línea celular MDA-MB 231.

2. Analizar si el efecto del EGF sobre la quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 depende de la concentración y la duración del tratamiento.

3. Determinar si el pre-tratamiento con EGF modifica la citotoxicidad de la doxorubicina y flavona en las células MDA-MB 231, como una medida indirecta de la quimiorresistencia.

4. Investigar si la quimiorresistencia inducida por EGF en las células MDA-MB 231 depende del funcionamiento del transportador ABCG2.

5. Proponer un modelo hipotético que explique el efecto del EGF sobre la quimiorresistencia.

METODOLOGÍA

Para el presento proyecto se empleó la línea celular MDA-MB 231, la cual es comercial y se adquirió a la empresa American Type Culture Collection (ATCC) de los Estados Unidos de América.

Modelo Celular MDA-MB 231

Las células tumorales MDA-MB 231, son una línea celular de cáncer de mama, altamente metastásica, obtenidas de una efusión pleural de una paciente caucásica de 51 años de edad en 1973 en el Centro de Cáncer M.D. Anderson, la cual ha sido clasificada por la ATCC como triple negativo al no poseer receptor de estrógeno (ER-), receptor de progesterona (PR-) y receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 (HER2-).

Tienen un fenotipo invasivo, sus células son fusiformes por lo que es un buen indicador de la transformación y tumorigenicidad. Ha sido utilizado como modelo de tumores xenográficos en ratón ya que *in vitro* ha demostrado una alta capacidad invasiva, además *in vivo* es útil para los modelos experimentales de metástasis al introducirse directamente en circulación. Es ampliamente usada como herramienta en la investigación preclínica de agentes quimioterapéuticos. Su morfología celular es de tipo mesénquimal, por ello, los cultivos confluentes no rebasan las $5\text{-}6X10^6$ células en una superficie de 80 cm^2 (Figura 21).

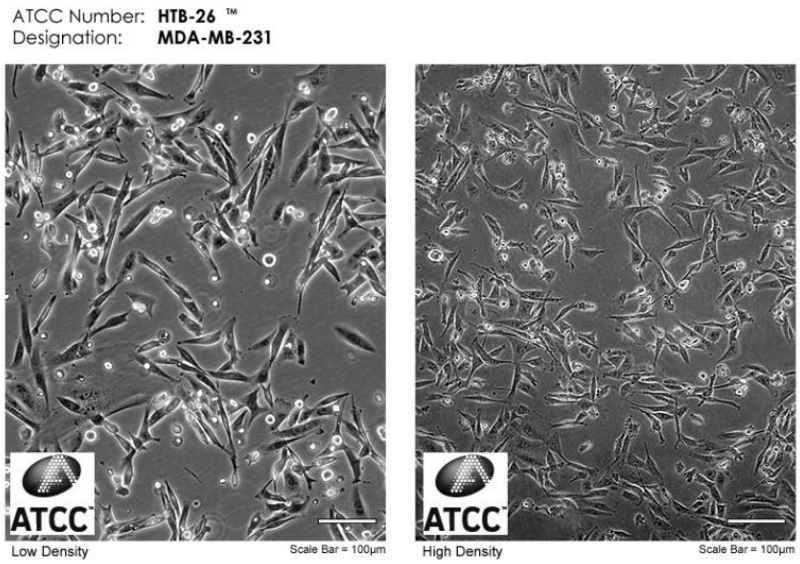


Figura 21. Morfología en cultivo de la línea celular MDA-MB-231. Microfotografías de las células en cultivo (barra de calibración corresponde a 100µm) con morfología fusiforme, presentan una confluencia diferencial. Imagen de lado izquierda muestra células de baja densidad. Imagen de lado derecha muestra células de alta densidad.

Cultivo de línea celular

Cuando se realizó el cultivo de la línea celular MDA-MB-231, el criovial madre fue descongelado a baño maría por 90 segundos a 35°C, después, el contenido celular fue resuspendido con medio de cultivo Advanced-DMEM (1X), suplementado con 3% con (FBS), 1% de L-Glutamina, 1% de mezcla de antimicótico-antibiótico (25 µg/mL de anfotericina B, 10,000 µg/mL de estreptomicina y 10,000 unidades/mL de penicilina), esto fue realizado en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Posteriormente, el contenido fue sembrado en un matraz de cultivo de poliestireno de 25 cm^2 de superficie, se incubó a 37°C con un 95% de humedad y un 5% de CO_2 con medio de cultivo que fue renovado cada 72 horas. Según el comportamiento del crecimiento de las células, el matraz de cultivo fue sometido a un proceso de tripsinización el cual consistió en: retirar el medio de cultivo, después realizar dos lavados consecutivos con 2 mL de buffer de fosfatos (PBS 1X) estéril. Con el fin de despegar las células de la superficie del matraz se le añadió 2 mL de Tripsina-EDTA

al 0.25% (Sigma-Aldrich, EUA); después de haber pasado 5 minutos de reposo, se adicionaron 4 mL de medio de cultivo y se resuspendió mecánicamente con ayuda de una pipeta. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 mL y fue centrifugada 1500 rpm durante 5 minutos; por último, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 4mL de medio de cultivo a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre en nuevos matraces y sembrar placas para cada uno de los experimentos programados.

Para los ensayos de proliferación y expresión génica, se utilizaron cultivos en placas de seis pozos a las cuales se les adicionaron 2 mL de medio de cultivo por pozo y 50 µL de la suspensión celular. Las células crecieron formando una monocapa y, una vez alcanzada la confluencia deseada (60-70%), se iniciaron los tratamientos a diferentes concentraciones de EGF, empleando en cada serie experimental un pozo para la condición control, es decir, sin recibir tratamiento. Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron placas de 96 pozos en los que fueron sembradas 5,000 células por pozo y éstas fueron incubadas por 148 horas con sus respectivos tratamientos.

Tratamiento de la línea celular MDA-MB-231

El EGF ejerce su función a través de la unión a su receptor específico, EGFR el cual se encuentra en la membrana de las células MDA-MB-231 sobreexpresado. Para determinar si este factor de crecimiento aumenta la quimiorresistencia en las células tumorales, las células fueron sembradas en placas de 6 pozos (35mm), utilizando el medio de cultivo Advanced-DMEM, suplementado con 3% con (FBS), 1% de L-Glutamina, 1% de mezcla de antimicótico-antibiótico. Una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento, las células se mantuvieron en la presencia de EGF recombinante humano (500 µg Prepotech, USA) por 48 horas a diferentes concentraciones las cuales fueron 0, 10, 50, 100, 250 y 500 ng/mL para determinar los niveles de expresión del transportador ABCG2 en las diferentes concentraciones durante un tratamiento de 48 horas.

Para los ensayos de citotoxicidad se eligieron las tres mejores concentraciones que pudieran ser efectivas para conferir quimiorresistencia en la línea celular MDA-MB 231.

Ensayo de expresión génica

Para evaluar los niveles de expresión de ARNm que codifican para ABCG2, ABCC1, β-actina y Ki-67 se realizaron ensayos de expresión génica. Esta técnica consta de 4 pasos, extracción de ARN total y posterior cuantificación; seguida de la síntesis de ADNc a partir del ARN total extraído (transcripción reversa); posteriormente amplificación del ADNc (reacción en cadena de la polimerasa); por último, separación electroforética de los amplicones y análisis densitométrico.

a) Extracción de ARN total

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos y se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar, alcanzaron la confluencia esperada del 60-70%, se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento con EGF a diferentes concentraciones. Al terminar las 48 horas de tratamiento, se procedió a realizar la extracción de ARN total empleando el kit comercial Quick-RNA^{TM} MiniPrep de Zymo Research, siguiendo las indicaciones del fabricante. El principio de extracción de ARN total por este método se fundamenta en fenómenos de adsorción reversible de ácidos nucleicos a una membrana de sílica especialmente tratada para este fin en presencia de una alta concentración de agente caotrópicos.

Se aspiró el medio de cultivo de cada pozo en la placa y se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS 1X no estéril. Al terminar los lavados, a cada pozo se le agregó 350 µL de Buffer de Lisis y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente para la clarificación, el lisado celular de cada pozo fue transferido a una columna de filtración para homogeneizarlo y reducir su viscosidad,

favoreciendo su paso a través de la columna de unión de ácidos nucleicos. Las columnas fueron centrifugadas a 16 000 rpm durante 3 minutos. En el tubo colector de cada condición, se agregaron 350 µL de alcohol etílico al 100% y se llevaron a vortex. La mezcla del filtrado y el alcohol etílico se transfirieron a una segunda columna contenida en otro tubo colector la cual fue centrifugada a 16 000 rpm durante 3 minutos. Con el objetivo de purificar el ARN, las condiciones fueron sometidas a lavados independientes con las soluciones del kit en el siguiente orden: se agregaron a cada condición 400 µL de RNA Prep Buffer en la columna y se llevó a centrifugar a 16 000 rpm por 3 minutos, se desechó el líquido precipitado. Posteriormente, se agregaron 700 µL de RNA Wash Buffer y se llevó a centrifugar a 16 000 rpm por 3 minutos, de nuevo, se desecha el líquido precipitado. Por último, el ARN es eluído de la columna utilizando 40 µL de agua libre de DNasa/RNasa-Free Water, las muestras fueron reposadas durante 5 minutos a temperatura ambiente y se llevó a centrifugar a 16 000 rpm. El ARN eluído es muy sensible a cualquier traza de RNAasas presentes en el ambiente o material de trabajo, por lo cual debe mantenerse congelado a -20°C.

b) Cuantificación de RNA

La cuantificación de la concentración se fundamenta en la capacidad de los ácidos nucleicos para absorber la luz ultravioleta a longitudes de ondas específicas. La absorbancia máxima de soluciones de ARN es de 260 nm y para soluciones de proteínas absorben a 280 nm. De esta forma, la estimación del cociente 260/280 nos proporciona una estimación del grado de pureza del ARN. Se cuantificó la concentración y calidad mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro “Biophotometer (Eppendorf)”. Para ello, se realizó una dilución del 4 µL de la muestra con 196 µL de agua estéril para obtener un volumen final de 200 µL; la concentración fue evaluada a una longitud de onda de 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda

entre 260 nm y 280 nm (A260 / A280). El valor del cociente debe ubicarse en el rango de 1.6-2.0 para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad.

c) Síntesis de ADNc (RT)

Un ADN complementario (ADNc) puede ser sintetizado in vitro a partir del ARN mensajero o de ARN total utilizando la enzima transcriptasa reversa, la cual es un ADN polimerasa dependiente de ARN. El ADNc obtenido es de doble cadena y es más estable que el ARN molde. A partir del ARN total extraído y purificado se procedió a la síntesis de Acido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) por medio de Retrotranscripción Inversa (RT), la cual se llevó a cabo empleando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*, siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. El kit permite retrotranscribir entre 0.2 y 2 µg de ARN total en un volumen final de 20 µL.

Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) el cual, contenía los reactivos indicados en la siguiente tabla (3).

Reactivo	Volumen
Buffert TR	4 µL
dNTP´s	1 µL
Iniciadores Aleatorios	2 µL
Transcriptasa Reversa (MultiScribe™)	0.5 µL
Total:	7.5 µL

Tabla 3. Contenido del tubo de reacción para la retrotranscripción según el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosistem).

Para obtener el ADNc es necesario partir de 2 µg de ARN, por lo tanto, se calculó el volumen de muestra necesario en la mezcla de reacción. Para determinar el volumen de la muestra de ARN y de agua que se utilizó para tubo de reacción, se

calcula mediante una regla de tres de tal forma que cada uno de ellos contenga 2 µg de ARN.

CONDICIÓN	**CONCENTRACIÓN DE ARN**
"X"	X µg ⟶ 1000 µL
	2 µg ⟶ x = Volumen de muestra requerido

Para realizar el protocolo de síntesis de ADNc se empleó el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) el cuál consistió en: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C. 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C (Figura 22), para ser almacenados en refrigeración hasta su empleo.

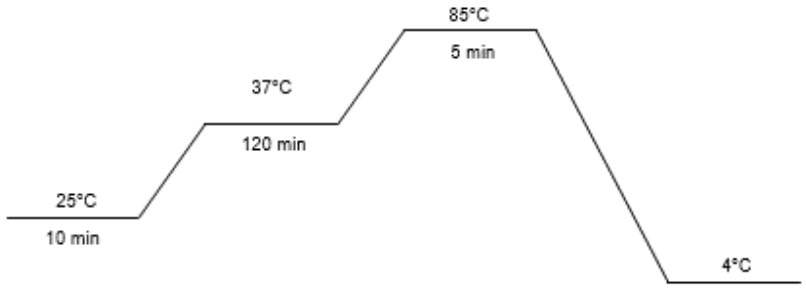


Figura 22. Esquema del proceso de la transcripción reversa necesario para la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario. Se observa en detalle las concentraciones y las temperaturas a utilizar.

d) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADNc fue amplificado mediante PCR, utilizando primers específicos. Debido a que el ADNc es de hebra simple, los ciclos iniciales de PCR correspondieron a una amplificación lineal, la amplificación exponencial a partir de ambos primers ocurre cuando se ha acumulado suficiente número de copias de la hebra complementaria. El ADNc obtenido se amplificó utilizando el protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual, es semicuantitativa, con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) que codifica los diversos elementos de

interés utilizando los oligonucleótidos específicos (Tabla 4) para las proteínas presentes en nuestro modelo de trabajo, las células MDA-MB-231.

Primer	Dirección	Secuencia	Tm (C)	bp
EGFR	Forward	ATAGTCGCCCAAAGTTCCGTGAGT	60.3	588
EGFR	Reverse	CAGGCTAATTTGGTGGCTGCCTTTT	60.3	588
ABCG2	Forward	CACCTCCTTCTGTCATCAACTC	62.7	712
ABCG2	Reverse	AGATCGATGCCCTGCTTTAC	63.1	712
b-actina	Forward	CAAAGACCTGTACGCCAACAC	64.4	218
b-actina	Reverse	CATACTCCTGCTTGCTGATCC	63.7	218
ki-67	Forward	AGTACCAGGAGGTGAGGATAAA	60.4	415
ki-67	Reverse	CTGCACTGGAGTTCCCATAAA	63.9	415
ABCB1	Forward	TCTGGACAAGCACTGAAAGATAA	62.6	461
ABCB1	Reverse	GTCGGGTGGGATAGTTGAATAC	63.2	461

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa. Se reporta la dirección, secuencia, temperatura de alineamiento, así como el tamaño esperado del amplicon.

Se empleó la enzima *Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific*), se prepararon tubos de reacción completando un volumen final de 20 µL como se detalla en la siguiente tabla (5).

Reactivo	Volumen
Dream Taq	10 µL
Primer Forward	1 µL
Primer Reverse	1 µL
Agua	4 µL
ADNc	4 µL
	Total: 20 µL

Tabla 5. Contenido del tubo de reacción para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Finalmente, estos componentes se mezclaron en vortex suavemente para su posterior centrifugación por un corto periodo de tiempo para depositar los componentes de la reacción en el fondo del tubo. Se colocaron los tubos en el termociclador y se procedió con el programa correspondiente. El protocolo PCR, como el fundamento de la técnica lo establece, es una técnica para amplificar una

secuencia de ADN, generando millones de copias la cual, consistió en las siguientes fases (Figura 23):

- Inicio: Este paso consistió en llevar la reacción hasta una temperatura de 94°C que se mantuvo durante 5 minutos.
- Desnaturalización del ADNc: En esta etapa se logró al calentar las muestras a 94°C durante 30 segundos.
- Alineación: La temperatura descendió de tal manera que los oligonucleótidos “Forward” y “Reverse” se alinearon con sus secuencias complementarias, la temperatura requerida dependió de la temperatura de alineamiento específica para cada oligonucleótido. La duración de esta etapa fue de 30 segundos.
- Extensión: La temperatura aumentó hasta 72°C por un minuto para permitir que la enzima *Taq polimerasa* se uniera a cada iniciador y así, sintetizar una nueva cadena de ADNc.
- Elongación: Se llevó a cabo a una temperatura de 72°C durante 10 minutos. Con esto se aseguró que ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.
- Conservación: En este paso se disminuyó la temperatura a 4°C durante un tiempo indefinido para conservar los productos de la reacción amplificados de PCR.

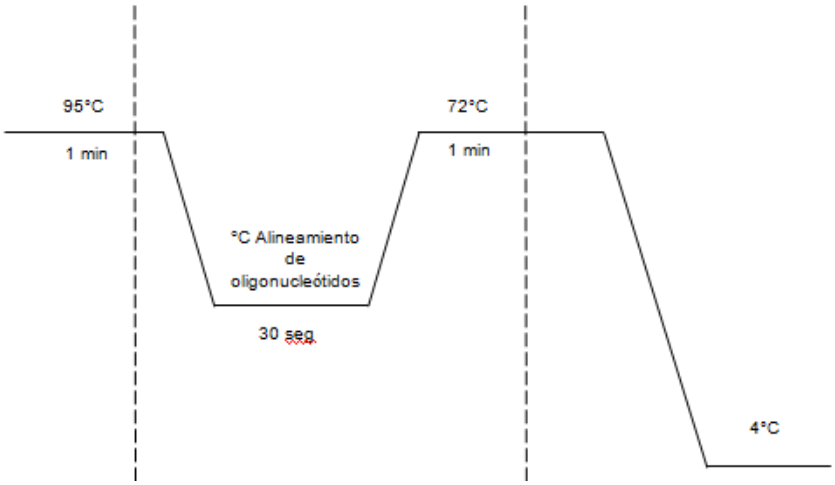


Figura 23. Esquema del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa. Se observa en detalle las concentraciones y las temperaturas a utilizar, las PCR fueron realizadas a 40 ciclos.

Electroforesis

Una vez concluida la reacción PCR, se procedió a la separación electroforética de los productos dependiendo de su peso molecular. Los productos de PCR amplificados fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (BrEt).

Para la preparación del gel se disolvieron 600 mg de agarosa en 50 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, dicha solución fue calentada durante 1:30 minutos, posteriormente se añadió 4 µL de BrEt el cual fue vertido en la cámara de electroforesis dejándose gelificar durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron empleando el patrón de ADN comercial *6x DNA Loading (Thermo Scientific).*

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE a una intensidad de 65 Volts durante 80 minutos. Los corrimientos fueron observaron bajo luz ultravioleta. Finalmente, se obtuvieron tres micrografías de cada uno de los geles en fotodocumentador con luz UV *ChemiDoc (Bio-Rad).* Los geles correspondientes a cada serie experimental se corrieron por duplicado.

Densitometría

Después de haber obtenido las micrografías se realizó el análisis densitométrico de forma cuantitativa el grado de intensidad de las bandas obtenidas en las imágenes obtenidas utilizando el software ImageJ expresando su valor en pixeles para concluir con el análisis estadístico correspondiente.

Ensayo de Proliferación

Con el fin de evaluar la proliferación celular en las células MDA-MB-231 después del tratamiento con EGF y Flavona, se empleó el método directo de conteo celular. El cual utiliza el principio Coulter de la detección de partículas basada en la impedancia para contar cada célula de la muestra. A medida que las células fluyen a través de la abertura en el sensor, la resistencia aumenta y, por la ley de Ohm, este aumento en la resistencia provoca un aumento subsiguiente en la tensión. Los cambios de voltaje se registran como picos con cada celda que pasa.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez alcanzada una confluencia del 80% se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento con EGF y Flavona a diferentes concentraciones por 48 horas, a las 24 horas despúes se realizó recambio de medio de cultivo y de los compuestos utilizados. Al haber cumplido las 48 horas de tratamiento la placa se retiró de la incubadora; posteriormente a cada pozo de la placa se le hicieron 2 lavados consecutivos con PBS 1X, luego se adicionó 500 µL de Tripsina-EDTA no estéril y se dejó reposar de 10 a 15 minutos en agitador de placas; después de haber transcurrido este tiempo se adicionó 1.5 mL de PBS 1X; el contenido de la placa fue resuspendido, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se realizó el conteo celular con un citómetro de flujo portátil (*SCEPTER ™ 2.0 Cell Counter (Millipore)).* El valor calculado fue expresado como el número de células por mL de solución.

Ensayo de MTT

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que nos permitió evaluar la capacidad de quimiorresistencia que pueden presentan las células MDA-MB-231 al ser tratadas con Doxorubicina o Flavona cuando éstas han sido pretratadas con EGF.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se considera que la acción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato

deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimientos subcelulares, las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT a formazán. El MTT es un sustrato amarillo pálido que es escindido por células vivas para producir formazán que es de color violeta, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas puede ser usado para ensayos de proliferación o de citotoxicidad.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de 6 pozos, al alcanzar un aproximado de 70% de confluencia se dio inicio al tratamiento con diferentes concentraciones desde 0, 100, 250 y 500 ng/mL de EGF durante 48 horas. Al haberse cumplido el tiempo con la exposición de EGF exógeno, las células fueron tripsinizadas siguiendo el protocolo anteriormente descrito, y se procedió al posterior sembrado en una placa de 96 pozos a una densidad de 5,000 células/pozo manteniendo la condición de la exposición con EGF; 48 horas después de ser sembradas las células en la placa de 96 pozos, se procedió adicionar las sustancias citotóxicas: Doxorubicina o Flavona, así como también el mantenimiento de EGF durante todo el tratamiento.

Después de 48 horas con el tratamiento citotóxico, se recambió el medio de cultivo y a cada pozo se le adicionaron 10 µL de reactivo MTT, se incubó por 4 horas más. Al haber transcurrido este tiempo, el medio de cultivo con MTT fue retirado y se agregaron 100 µL de Isopropanol con HCl 0.1N a cada pozo, posteriormente se llevó a un espectrofotómetro para ser leído a 570 nm. Los resultados se obtuvieron en unidades de Absorbancia para después ser analizados y ser mostrados como porcentaje de supervivencia celular.

Bloqueo de actividad de ABCG2

Para asegurar que la quimiorresistencia que estaban presentando las células MDA-MB-231 era debida al transportador ABCG2, procedimos a bloquear su actividad utilizando el inhibidor específico Ko-143 para ABCG2.

Las células MDA-MB 231 fueron sembradas, pretratadas, tripsinizadas y tratadas siguiendo el protocolo escrito anteriormente, al inicio del tratamiento con los compuestos citotóxicos, se le añadió 1 µM de Ko-143 durante 48 horas con el fin de inhibir al transportador ABCG2. Después se continuó con el protocolo de MTT, para ser leído en un espectrofotómetro a 570 nm. Los resultados se obtuvieron en unidades de Absorbancia para después ser analizados y ser mostrados como porcentaje de supervivencia celular.

Análisis estadístico

Una vez concluida la fase de experimental del proyecto, se realizó el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software SigmaPlot en su versión 11.0.

Se empleó la prueba *t* de Student para muestras independientes comparando las medias (X) de los grupos de los datos obtenidos para cada placa de cultivo y se determinó si entre esos parámetros las diferencias fueron estadísticamente significativas o si sólo fueron diferencias aleatorias, considerando un valor de significancia para $*p<0.05$, $**p<0.01$ y $***p<0.001$. Las gráficas representativas de cada experimento muestran el valor promedio de los ensayos realizados de manera independiente ± el error estándar.

RESULTADOS

El EGF incrementa la supervivencia de la línea celular MDA-MB 231

El EGF estimula la proliferación y supervivencia en diversos tipos celulares, tanto normales como tumorales, por lo que se decidió investigar de manera inicial si la presencia de EGF en el medio de cultivo alteraba la supervivencia de las células MDA-MB 231, quienes expresan el receptor a EGF, para lo cual se realizaron ensayos de MTT. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con EGF a diferentes concentraciones (100, 250 y 500 ng/ml) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento se evaluó por espectrofotometría la cantidad formazan generada en cada condición experimental. El EGF induce un aumento en la supervivencia celular, a una concentración de 100 ng/ml, hay un incremento del 14.25 %, a la concentración de 250 ng/ml, se eleva un 23.41%, y a una mayor concentración, 500 ng/ml, se presenta un aumento del 18.35%, todos ellos con respecto a la condición control (Figura 24).

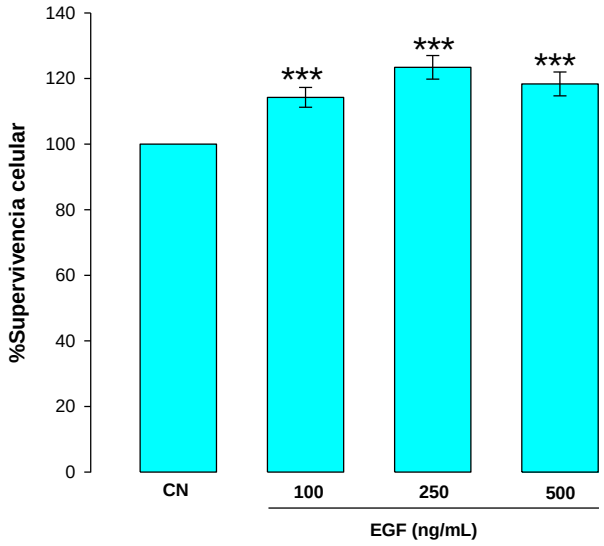


Figura 24. El tratamiento con diferentes concentraciones (100, 250 y 500ng/mL) de EGF inducen un aumento en la proliferación celular, medida indirecta de la supervivencia celular. Se sembraron células en placas de 96 pozos y se utilizó la técnica de MTT para detectar cambios que pudiera estar ejerciendo el EGF sobre la línea celular MDA-MB 231. Se aprecia el incremento de la supervivencia celular, la cual se traduce en que el EGF aumenta la proliferación celular. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de dieciocho experimentos independientes; (*** $p<0.001$).

Doxorubicina tiene un efecto citotóxico en la línea celular MDA-MB 231

La Doxorubicina es ampliamente utilizada para el tratamiento del cáncer, incluyendo el de mama. Se ha observado que tratamientos prolongados de doxorubicina inducen quimiorresistencia en las células tumorales, reduciendo la efectividad de la quimioterapia. Las células tumorales provenientes de estadios más avanzados de cáncer presentan una mayor quimiorresistencia, que en células tumorales de los estadios iniciales de la enfermad. Las células MDA-MB 231, representantes del cáncer de mama triple negativo, presentan quimiorresistencia, por lo que se decidió evaluar su efecto sobre la quimiosensibilidad a Doxorubicina. Las células fueron tratadas con Doxorubicina a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 μM) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se evaluó al igual que en el experimento anterior por espectrofotometría, la cantidad de sal de formazan formada en cada condición experimental. La Doxorubicina reduce la supervivencia celular de manera dosis-dependiente; a una concentración de 1 μM hay una disminución del 26.86%; a la concentración de 5 μM, es mayor el efecto inhibitorio, alcanzando un valor del 47.93 %; y a una mayor concentración, 10 μM, se presenta el mayor efecto citotóxico de la Doxorubicina en las células MDA-MB 231, reduciendo hasta un 73.79% la supervivencia celular con respecto a la condición control (Figura 25).

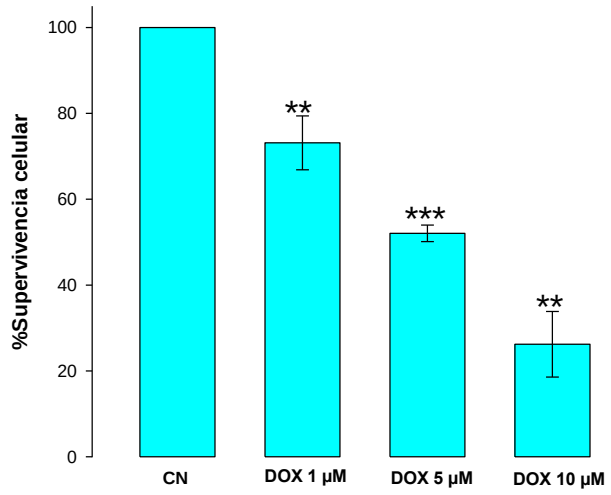


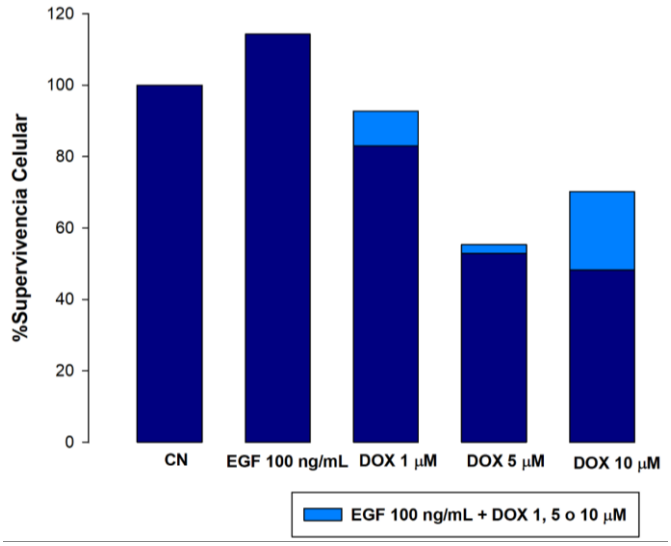
Figura 25. La doxorubicina disminuye la supervivencia celular de las células MDA-MB 231. Las células se trataron durante 48 horas en placas de 96 pozos y se utilizó la técnica de MTT para

detectar la supervivencia celular. Se observa una reducción de la supervivencia celular ser tratadas con una dosis baja, una dosis media y una dosis alta para contemplar los porcentajes de supervivencia. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de dieciocho experimentos independientes; (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

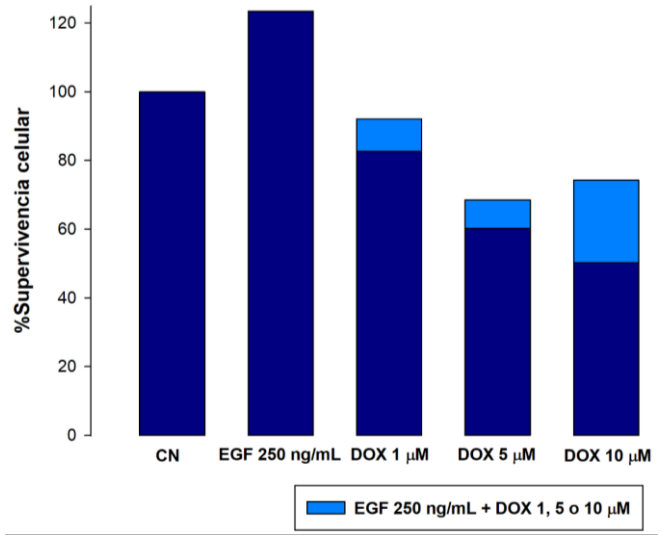
EGF reduce el efecto citotóxico de la Doxorubicina en las células MDA-MB 231

Con el fin de investigar si el EGF, además de estimular la supervivencia de las células tumorales, es capaz de inducir quimiorresistencia en las células MDA-MB 231, se decidió pretratar a las células por 48 horas con tres diferentes concentraciones con EGF (100, 250 y 500 ng/ml), al finalizar el pretratamiento, se mantuvo la presencia de EGF otras 72 horas junto con tres concentraciones de Doxorubicina (1, 5 y 10 μM) con el fin de evaluar su efecto citotóxico. En la Figura 26 se observa un aumento de la supervivencia celular cuando la línea MDA-MB 231 es tratada con EGF en presencia de Doxorubicina. Este incremento en la supervivencia celular se traduce como un aumento de la quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 inducido por EGF al efecto tóxico de la Doxorubicina, dicho en otras palabras, la presencia de EGF reduce la qumiosensibilidad de las células MDA-MB 231 a la Doxorubicina. Observándose el mayor efecto de supervivencia en las células tratadas con 500 ng/ml de EGF y 10 μM de Doxorubicina, hay un incremento del 28.75% de quimiorresistencia con respecto a la condición donde solamente hay 10 μM de Doxorubicina.

A)


%Supervivencia Celular
120
100
80
60
40
20
0
CN
EGF 100 ng/mL
DOX 1 μM
DOX 5 μM
DOX 10 μM
EGF 100 ng/mL + DOX 1, 5 o 10 μM

B)


%Supervivencia celular
120
100
80
60
40
20
0
CN
EGF 250 ng/mL
DOX 1 μM
DOX 5 μM
DOX 10 μM
EGF 250 ng/mL + DOX 1, 5 o 10 μM

C)

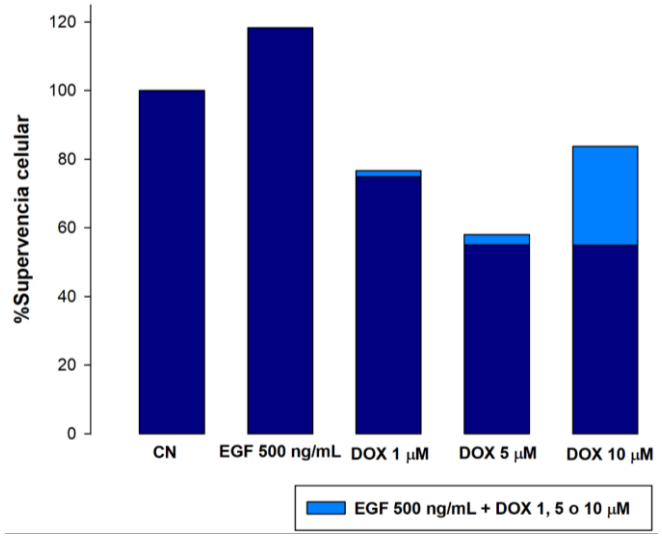

%Supervencia celular
120
100
80
60
40
20
0
CN
EGF 500 ng/mL
DOX 1 μM
DOX 5 μM
DOX 10 μM
EGF 500 ng/mL + DOX 1, 5 o 10 μM

Figura 26. El tratamiento continuo con EGF confiere quimiorresistencia en las células MDA-MB 231. Las barras de color azul marino representan la supervivencia de las células en condiciones control, en tratamiento únicamente con EGF (100, 250 y 500 ng/mL (según gráfica)) y con doxorubicina a 1, 5 y 10 µM como agente citotóxico. Las porciones celestes de las barras representan el tratamiento combinado de EGF + doxorubicina, las cuales se interpretan como quimiorresistencia (medida indirecta de la supervivencia celular). **A)** Se observa un aumento de la supervivencia celular cuando la línea MDA-MB 231 es tratada por 144 horas con EGF 100 ng/mL y con doxorubicina (1,5 y 10 µM) durante 48 horas. Los porcentajes de quimiorresistencia que superan a la curva dosis efecto de doxorubicina son de: 9.79, 2.44 y 21.95 % respectivamente, siendo la condición de EGF 100 ng/mL + doxorubicina 10 µM la que presentó el valor más elevado de supervivencia celular. **B)** De igual manera se observa que a la concentración de EGF 250 ng/mL las células llegan desarrollar quimiorresistencia cuando son combinadas con doxorubicina a las mismas concentraciones antes descritas; presentando porcentajes de supervivencia de 9.49, 8.23 y 24.00 % respectivamente, destacando que la condición de EGF 250 ng/mL + doxorubicina 10 µM fue la que obtuvo la mayor quimiorresistencia. **C)** Células tratadas con EGF 500 ng/mL en combinación con doxorubicina presentan los porcentajes de quimiorresistencia de 1.78, 3.00 y 28.75 % respectivamente; siendo la condición de EGF 500 ng/mL + doxorubicina 10 µM la que presenta la mayor quimiorresistencia reportada en estos experimentos, se observa que en **A)**, **B)** y **C)** se encuentran los mayores porcentajes de supervivencia celular en la condición de EGF (100, 250 o 500 ng/mL) + doxorubicina 10 µM. Los resultados se representan como el promedio de dieciocho experimentos independientes.

Expresión del transportador ABCG2 en la línea celular MDA-MB 231

La presencia del transportador ABCG2 en células tumorales, está relacionada positivamente con su capacidad de quimiorresistencia. Las células provenientes de cáncer de mama expresan el transportador ABCG2, siendo su nivel de expresión directamente proporcional al grado de malignidad del tumor. En base a esto, determinamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para el transportador ABCG2 tanto a nivel basal como en presencia de EGF 200 ng/ml por 48 horas. Ensayos de RT-PCR muestran que la línea tumoral MDA-MB 231 expresa el ARNm para dicho transportador en la condición control, observándose un significativo incremento en la intensidad de la banda cuando las células fueron tratadas con EGF, lo cual nos permite sugerir que el EGF induce la expresión del ARNm que codifica para el transportador ABCG2 (Figura 27).

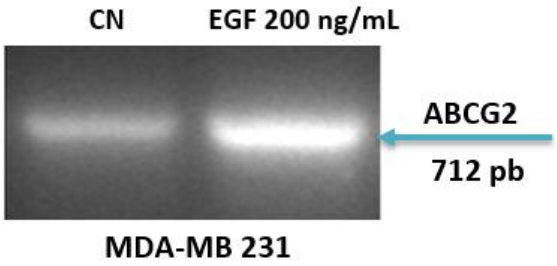


Figura 27. Expresión del transportador ABCG2 a nivel de ARNm en las células MDA-MB 231. El gel obtenido muestra una banda de 712 pares de bases que corresponde al transportador ABCG2. Las células MDA-MB 231 fueron cultivadas y mantenidas en medio completo hasta alcanzar una confluencia del 70% y se inició el tratamiento con EGF 200 ng/mL durante 48 horas. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN total, la síntesis de ADN complementario (cDNA) y la Reacción en Cadena la Polimerasa (PCR). El gel de agarosa al 1.2% fue teñido con bromuro de etidio y digitalizado mediante un fotodocumentador con luz UV. Se observa que en la condición control hay una ligera banda de ABCG2 y en la condición tratada con EGF 200 ng/mL se ve un aumento en la intensidad de la banda del mismo transportador.

EGF promueve el aumento en los niveles de expresión del ARNm para el transportador ABCG2

Los factores de crecimiento están relacionados con el aumento del potencial metastásico de las células tumorales, el Factor de Crecimiento Epidérmico es uno de muchos factores que se encuentra en el microambiente tumoral. Una vez que observamos que el EGF induce un aumento en el nivel de expresión del ARNm que codifica para el transportador ABCG2 a una concentración fija, decidimos investigar si el efecto del EGF es dependiente de la concentración utilizada. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 48 horas a diferentes concentraciones de EGF (0, 10, 50, 100, 250 y 500 ng/ml). Una vez finalizado el tratamiento, se aisló el ARN total y se sometió a ensayos de RT-PCR para evaluar los niveles de expresión del transportador ABCG2. La Figura 28 muestra los resultados obtenidos, donde se observa que no hay una dependencia clara de la expresión de ABCG2 con la concentración utilizada de EGF, hay una alta variabilidad en cada una de las condiciones experimentales.

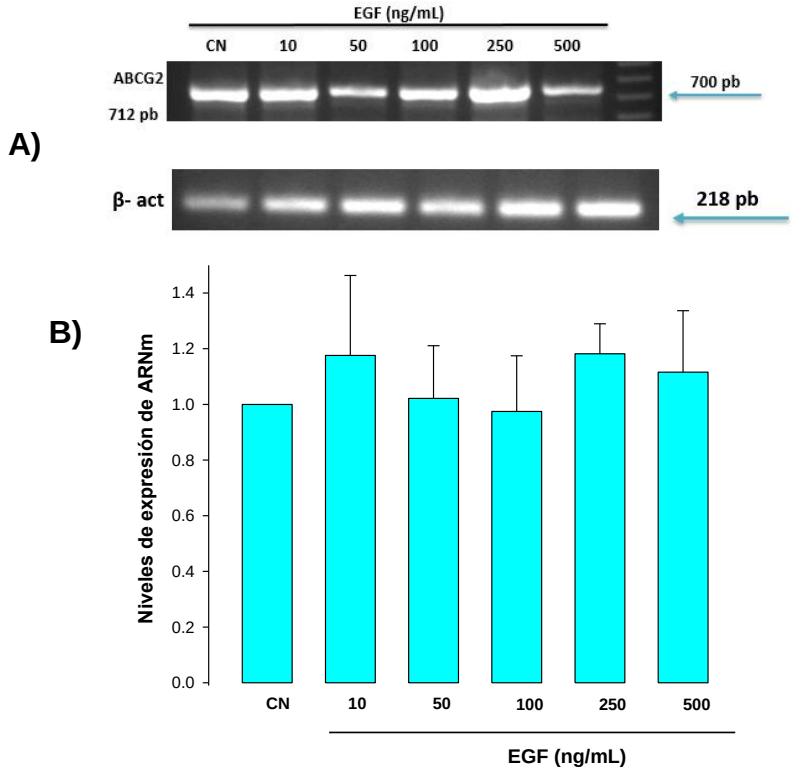


Figura 28. Las células MDA-MB 231 expresar el ARNm para el transportador ABCG2 al ser tratadas con diferentes concentraciones de EGF. A) Mediante la extracción de ARNm, seguido de la RT-PCR se identificó la presencia del ARNm que codifica para ABCG2, así como un aumento en la intensidad de las bandas cuando las células MDA-MB 231 son tratadas con EGF a diferentes concentraciones durante 48 horas, la máxima intensidad de las bandas se encuentra al tratamiento con EGF 250 ng/mL. **B)** Gráficas representativas de las densitometrías de RT-PCR para ABCG2. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes normalizados con respecto a β-actina expresados como unidades arbitrarias (UA).

Las células MDA-MB 231 no expresan el transportador ABCB1

La quimiorresistencia desarrollada por diversas células tumorales es explicada al menos parcialmente, por un incremento en la expresión de transportadores de la familia ABC, entre los que destacan ABCB1 y ABCG2. El ABCG2 está ampliamente expresado en cáncer de mama, de ovario y glioblastoma, mientras que el ABCB1 en cáncer de próstata e hígado. Se propuso investigar sí las células MDA-MB 231, además de expresar el transportador ABCG2, pudieran estar expresando el transportador ABCB1, y si era así, investigar si su nivel de expresión era regulado por EGF. Las células fueron cultivadas y mantenidas en condición control y en

presencia de EGF 500 ng/mL. Ensayos de RT-PCR muestran que las células MDA-MB 231 control y tratadas, no expresan el ARNm que codifica para el transportador ABCB1 (Figura 29), sugiriendo que la quimiorresistencia inducida por EGF era responsabilidad únicamente del transportador ABCG2 en la línea MDA-MB231.

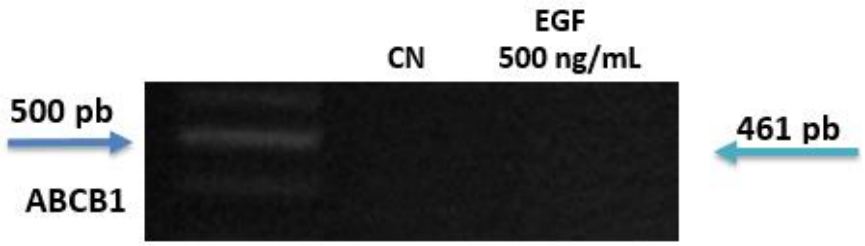


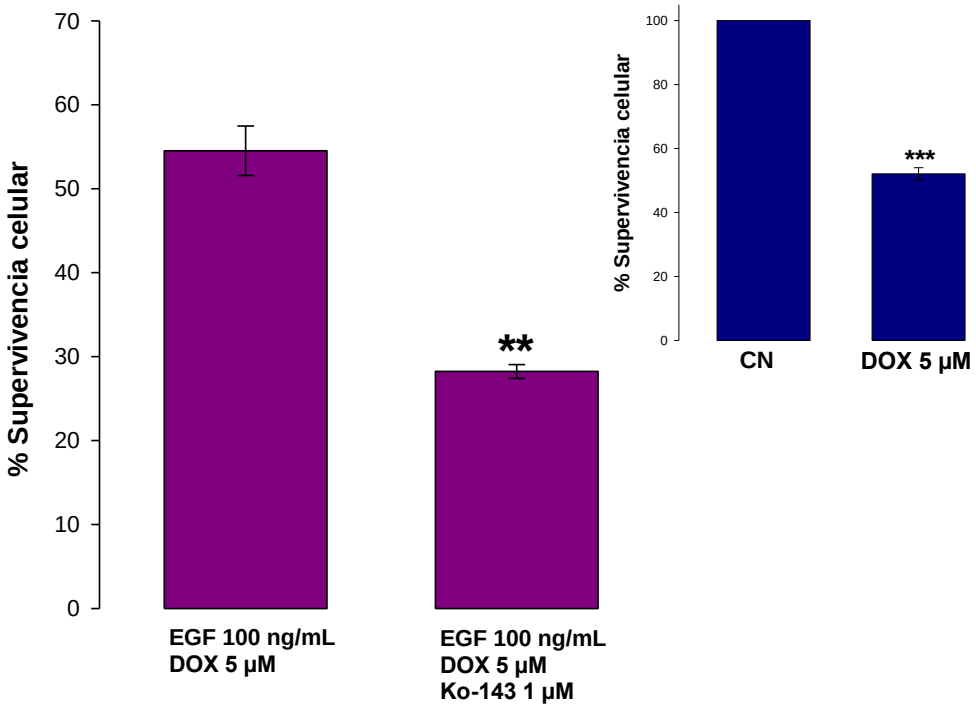
Figura 29. Ausencia del transportador ABCB1 a nivel de ARNm en las células MDA-MB 231. El gel obtenido no muestra las bandas esperadas de 461 pares de bases que corresponden para el ARNm que codifica para el transportador ABCB1. Las células MDA-MB 231 fueron cultivadas y mantenidas en medio completo hasta alcanzar una confluencia del 70% y se inició el tratamiento con EGF 500 ng/mL durante 48 horas. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN total, la síntesis de ADN complementario seguido de la RT-PCR. El gel de agarosa al 1.2% fue teñido con bromuro de etidio y digitalizado mediante un fotodocumentador con luz UV. Se observa que en las condiciones control y tratada con EGF 500 ng/mL no hay bandas que correspondan para este transportador.

El bloqueo de la actividad del trasportador ABCG2 revierte la quimiorresistencia inducida por EGF en la línea tumoral MDA-MB 231

Hasta el momento se ha demostrado que el EGF induce quimiorresistencia en las células MDA-MB 231, incrementa los niveles de expresión del ARNm que codifica para ABCG2, proteína asociada a la quimiorresistencia, con estos resultados previos, se decidió evaluar la relevancia funcional del transportador ABCG2 para la condición de quimiorresistencia, para lo cual se bloqueó la actividad del transportador ABCG2 con un antagonista específico (Ko-143) en células MDA-MB 231 tratadas con EGF y en presencia de Doxorubicina. Se realizaron ensayos de supervivencia utilizando células tratadas con EGF a 100, 250 y 500 ng/mL por 96 horas, donde las últimas 48 horas de tratamiento se mantuvieron las células además en presencia de 5 μM de Doxorubicina. La Figura 30 muestra de manera clara que el bloqueo de la actividad del transportador ABCG2 por Ko-143 reduce la

quimiorresistencia a Doxorubicina inducida por EGF, presentándose una reducción significativa de aproximadamente el 28% en la supervivencia celular en cada una de las concentraciones utilizadas (100, 250 y 500 ng/ml). Estos resultados demuestran que al bloquear la actividad del transportador ABCG2, se ve reducida de manera significativa la quimiorresistencia a Doxorubicina que presentan las células MDA-MB 231 cuando son estimuladas con EGF.

A)



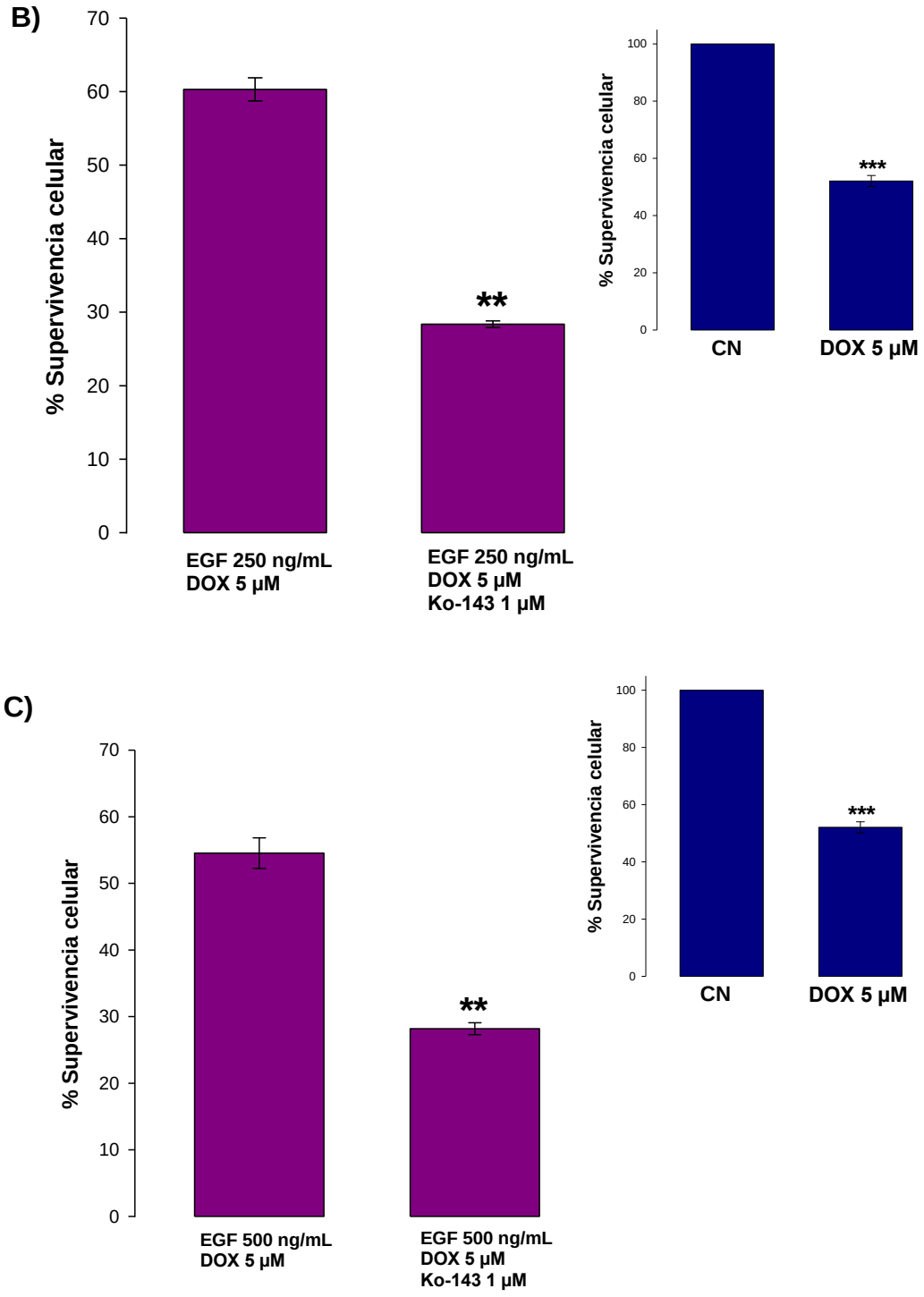


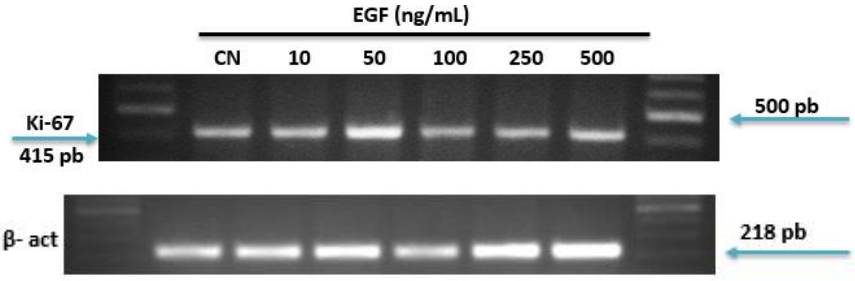
Figura 30. El Ko-143 revierte el fenómeno de quimiorresistencia que es conferido a las células MDA-MB 231 cuando son tratadas con EGF. Se muestran en forma de insertos gráficas de color azul marino que representan el efecto que ejerce el tratamiento por 48 horas con doxorubicina 5 µM el cual disminuye la supervivencia celular en un 52% con respecto a la condición control. **A)** Se observa que en la condición con EGF 100 ng/mL + doxorubicina 5 µM hay un 54.5 % de supervivencia celular y en la condición de EGF 100 ng/mL + doxorubicina 5 µM + Ko-143 1 µM hay un descenso significativo de la supervivencia celular (28.2 %). **B)** De igual manera se encuentra que

en la condición tratada con EGF 250 ng/mL + doxorubicina 5 µM + Ko-143 1 µM hay una reducción de la supervivencia celular en comparación con la condición que solo presenta EGF + doxorubicina mostrando valores de 28.4 y 60.3 % respectivamente. **C)** Finalmente se observa que en la condición EGF 500 ng/mL + doxorubicina 5 µM muestra un 54.5 % de supervivencia celular mientras que en la condición de EGF + doxorubicina + Ko-143 1 µM hay 28.1%. Este descenso en la supervivencia celular de las condiciones tratadas con el Ko-143 indican que al utilizar un inhibidor específico del ABCG2 se bloquea su actividad y no se observa el efecto la quimiorresistencia. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes; (** p<0.01, *** p<0.001).

EGF estimula la proliferación de las células MDA-MB 231

Entre las propiedades inductivas que tiene el EGF sobre las células tumorales, es estimular su proliferación, por lo que se decidió evaluar si el EGF es capaz de regular el nivel de expresión del ARNm que codifica para la proteína Ki-67, la cual es un marcador nuclear asociado positivamente a la proliferación celular. Las células MDA- MB 231 fueron tratadas con EGF a las concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 ng/mL durante 48 horas, se aisló el ARN total y se sometió a ensayos de RT-PCR. Los resultados obtenidos del ensayo se muestran en la Figura 31, donde se observa una clara tendencia estimulatoria del EGF sobre el nivel de expresión del ARNm para Ki-67, a las diferentes concentraciones empleadas de EGF, sugiriendo un efecto dosis-dependiente.

A)



B)

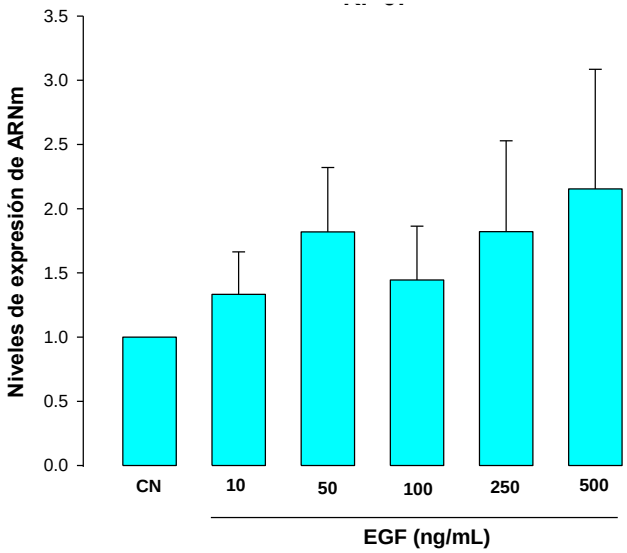


Figura 31. El EGF induce cambios en los niveles de expresión de Ki-67 en las células MDA-MB 231. A) Ensayos de RT-PCR muestra los niveles de expresión de ARNm que codifica para Ki-67 tras ser tratadas las células con EGF en condiciones de cultivo estándar, se observa un incremento en la intensidad de las bandas al aumentar la concentración de EGF. **B)** Gráficas representativas de las densitometrías de RT-PCR para Ki-67, se observa que al aumentar las concentraciones de EGF hay un aumento de los niveles de expresión siendo la concentración de 500 ng/mL de EGF la que presenta el mayor incremento, sin embargo, no son resultados estadísticamente significativos. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes normalizados con respecto a β-actina expresados como unidades arbitrarias (UA).

Flavona disminuye la proliferación en las células MDA-MB 231

Los flavonoides son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias; recientemente se les han atribuido propiedades antineoplásicas. Con el fin de evaluar si la flavona ejerce un efecto citotóxico en las células MDA-MB 231, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de flavona (100, 250, 500, 750 y 1000 μM) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se tomaron microfotografías de cada condición experimental, para posteriormente realizar el conteo celular en un citómetro de flujo portátil. Las microfotografías de la Figura 32A muestran claramente que la flavona reduce la población celular de manera dosis dependiente. El gráfico del conteo celular (Figura 32B) ilustra el efecto citotóxico que ejerce la flavona sobre las células MDA-MB 231, y que a la concentración mínima que utilizamos de 100 μM, ya se observa un efecto inhibitorio del 64.03 %

con respecto a la condición control sobre la proliferación celular. Concentraciones superiores de flavona reducen la proliferación celular en un 11.82 % aproximadamente.

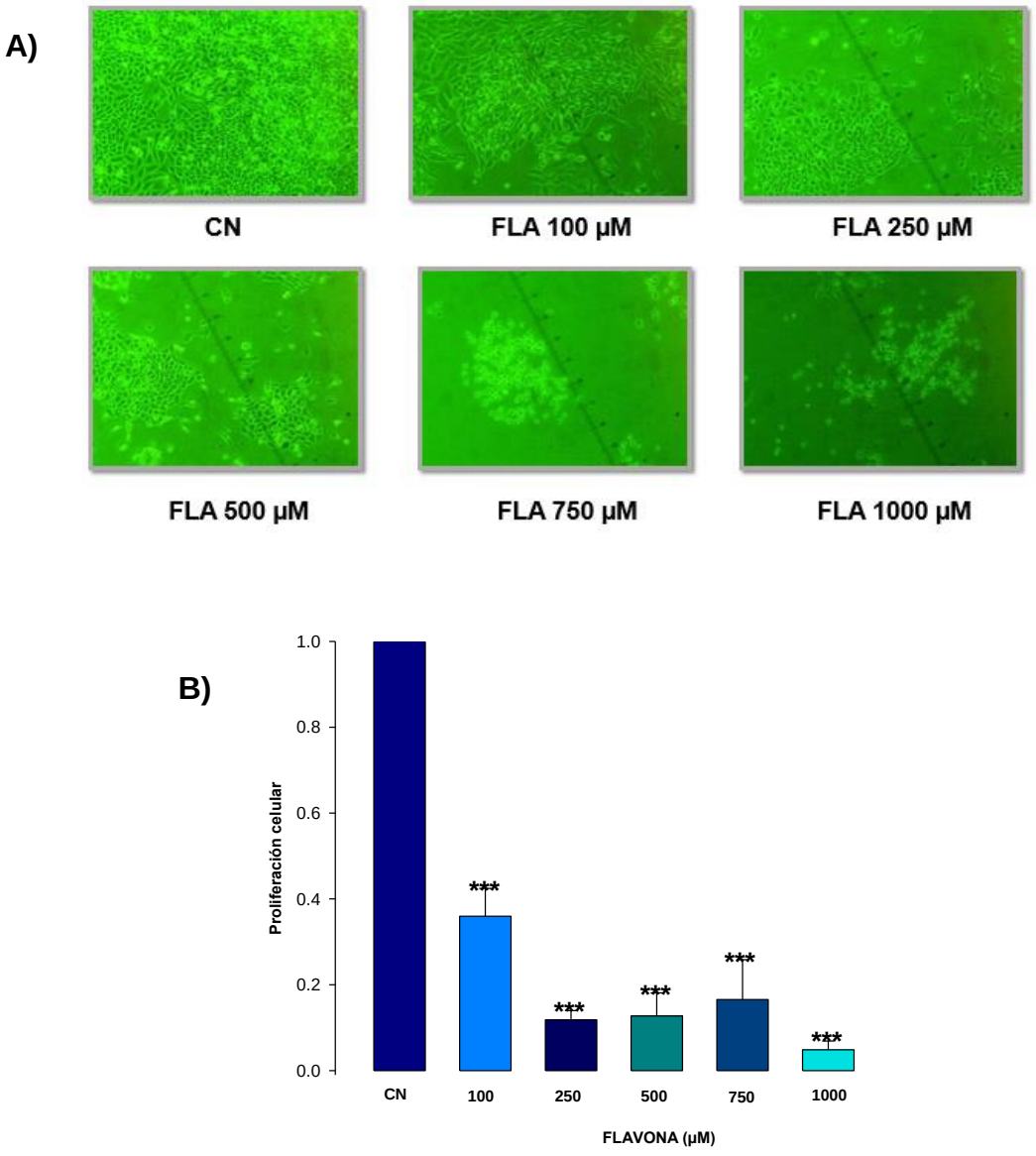


Figura 32. Flavona a diferentes concentraciones disminuye la proliferación celular en la línea tumoral MDA-MB 231. A) Microfotografías 10x muestran la disminución de las células en cada una de las condiciones al ir aumentando la concentración con flavona (100, 250, 500, 750 y 100 µM) durante 48 horas como inductor de la apoptosis. **B)** Gráfica que muestra el efecto de flavona sobre la proliferación celular. El tratamiento con flavona a diferentes concentraciones durante 48 horas reduce de manera significativa la proliferación celular utilizando la técnica de conteo celular con la metodología antes descrita. Las células muestran diferencias en su capacidad proliferativa con respecto a las células de la condición control. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de cuatro experimentos independientes; (*** $p<0.001$).

Flavona reduce la supervivencia de las células MDA-MB 231

Una vez que se corroboró que la flavona tiene efectos antiproliferativos, decidimos evaluar su efecto a concentraciones menores de 100 μM con el fin de encontrar su IC_{50}, para realizar ensayos de supervivencia celular. Se realizó una curva dosis-efecto de flavona utilizando las concentraciones de 50, 75 y 100 μM por 48 horas, y se evalúo la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT. La supervivencia de las células MDA-MB 231 en presencia de bajas concentraciones de flavona, sufren una reducción máxima del 18.95 % con respecto a la condición control (Figura 33).

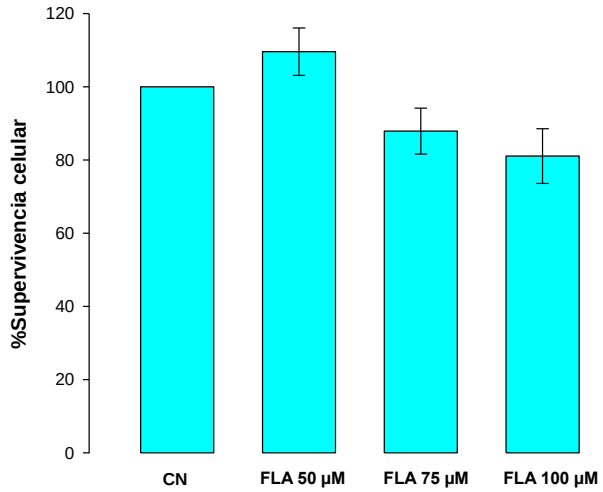
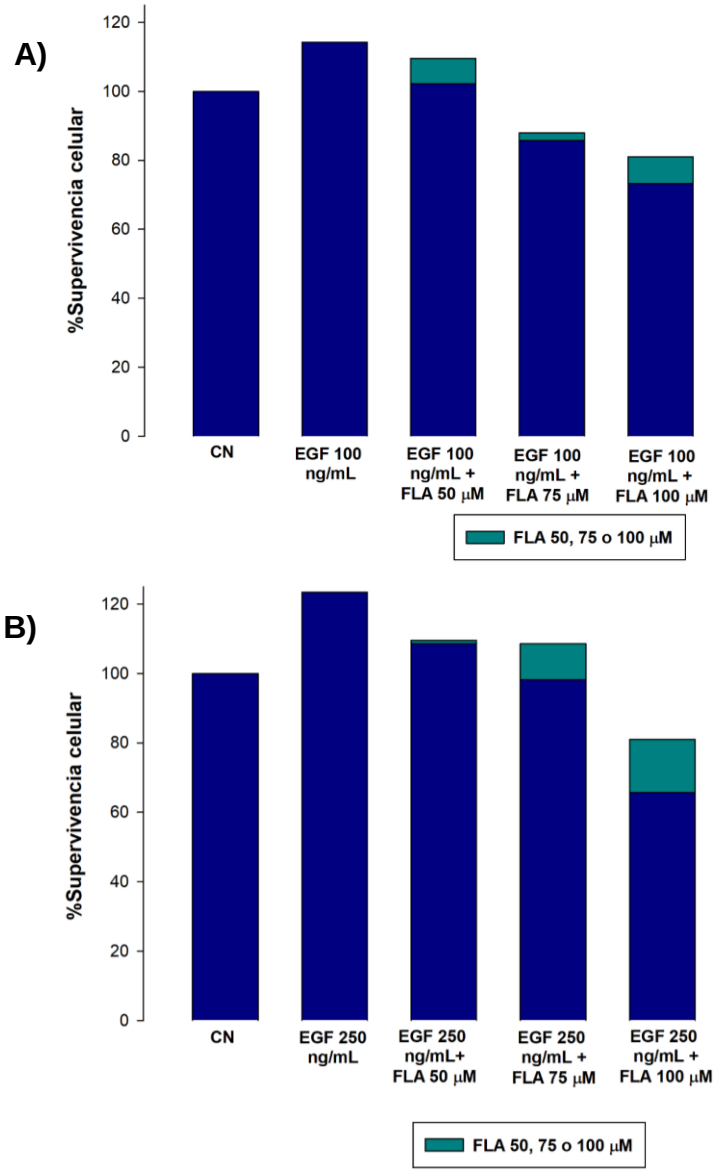


Figura 33. La flavona induce cambios en la supervivencia celular de las células MDA-MB 231. Las células se trataron durante 48 horas en placas de 96 pozos y se utilizó la técnica de MTT para detectar la supervivencia celular. Se observa que a una concentración de flavona 50 μM flavona se aprecia un aumento de la supervivencia celular en un 9.5% con respecto a la condición control, mientras que en las condiciones tratadas con 75 y 100 μM hay un 87.8 y 81 % de supervivencia celular respectivamente, se aprecia una disminución de la supervivencia celular con estas 75 y 100 μM. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de dieciocho experimentos independientes.

Flavona reduce la quimiorresistencia inducida por EGF en la línea celular MDA-MB 231

El efecto citotóxico de doxorubicina se ve reducido cuando las células MDA-MB 231 son tratadas con EGF, es decir, el EGF mejora la supervivencia celular en presencia de doxorubicina. En este sentido, se quiso evaluar efecto de la combinación de EGF con flavona sobre la supervivencia de las células MDA-MB 231. Se observó un efecto contrario al obtenido en la condición de doxorubicina, ya que la combinación del factor de crecimiento (100, 250 y 500 ng/ml) y el compuesto natural (50, 75 y 100 μM) reduce el porcentaje de supervivencia celular en nuestro modelo experimental (Figura 34).



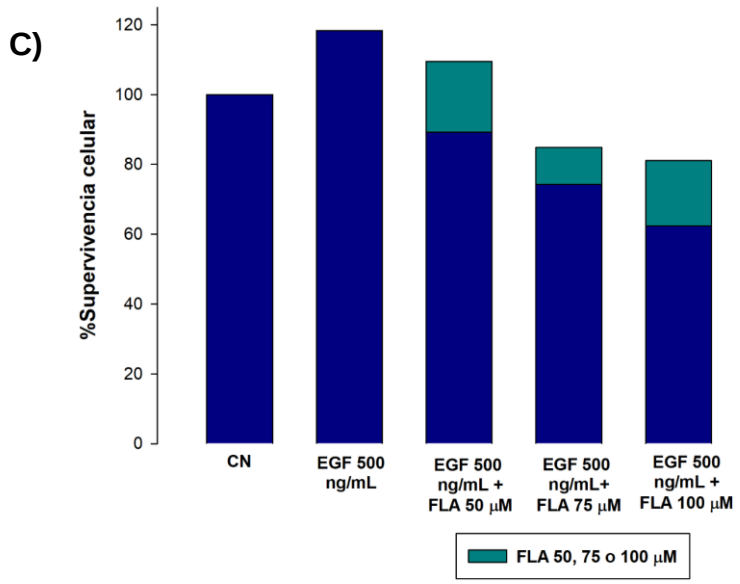
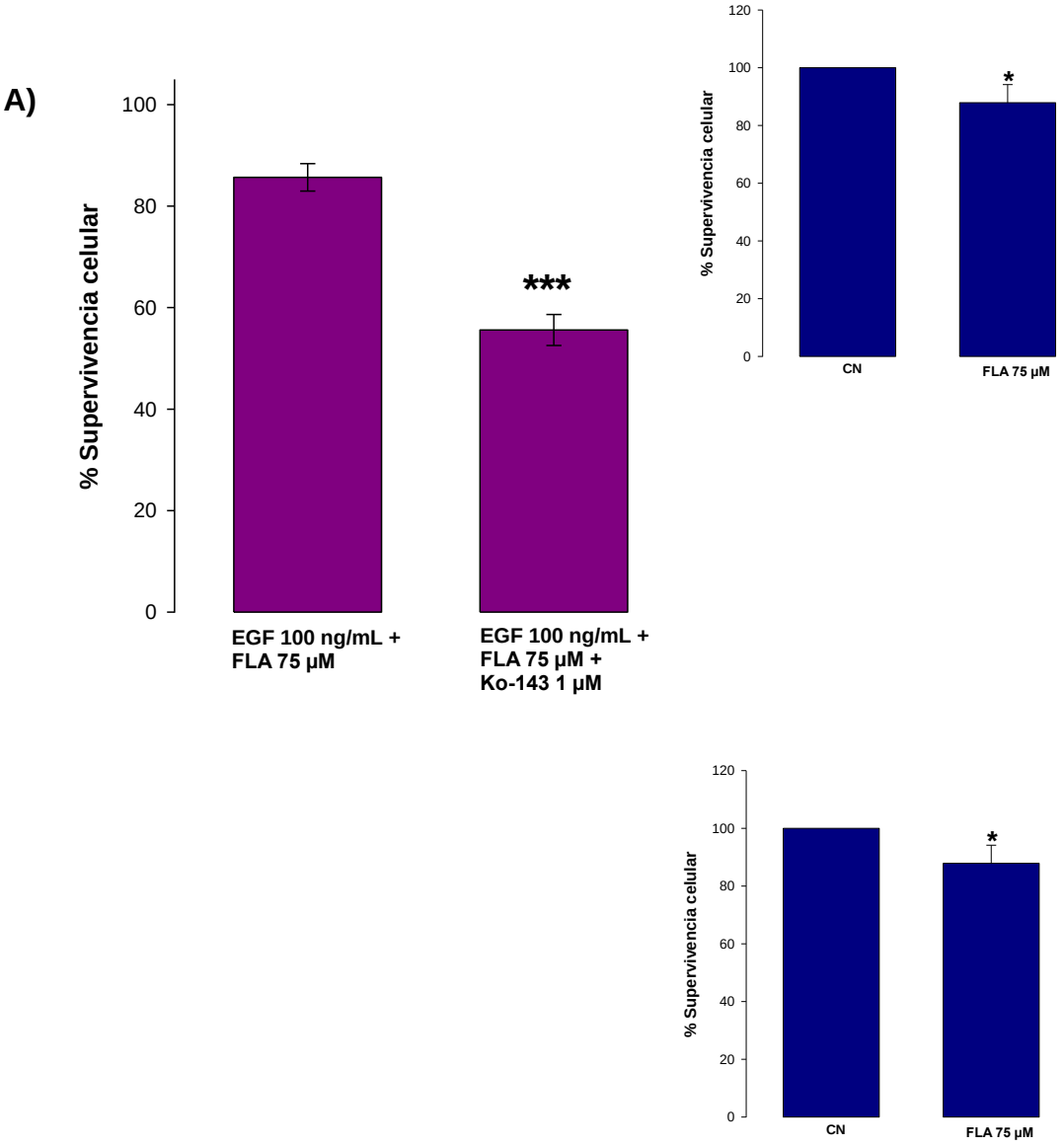


Figura 34. Efecto del EGF y flavona sobre la quimiorresistencia en las células MDA-MB 231. Las primeras dos barras de color azul marino representan el porcentaje de la supervivencia celular en condiciones control y con EGF en sus diferentes concentraciones (100, 250 y 500 ng/mL), las siguientes tres barras de color azul marino representan el tratamiento combinado de EGF + flavona (50, 75 o 100 µM). Las barras celestes pertenecen a las condiciones en donde únicamente se dio tratamiento con flavona en las concentraciones antes mencionadas. **A)** Se observa una disminución de la supervivencia celular de las MDA-MB 231 al ser tratadas las células con 100 ng/mL de EGF + flavona, los porcentajes de disminución de la supervivencia celular son de 7.35, 2.21 y 7.76 % respectivamente. **B)** El mismo fenómeno se presenta en las condiciones de EGF 250 ng/mL+ flavona observándose una reducción aún mayor de 1, 10.3 y 15.3 % de supervivencia celular**. C)** Para la condición de EGF 500 ng/mL + flavona se aprecia que al igual que las condiciones anteriores, que el EGF no aumenta la supervivencia celular en nuestro modelo celular, y presentándose una reducción de la supervivencia celular de 20.3, 10.6 y 18.7 % respectivamente. Se puede destacar que en **A)** y **B)** las combinaciones de EGF (100 y 250 ng/mL) respectivamente con flavona 100 µM son las condiciones con el más bajo porcentaje de supervivencia celular con 73.3 y 65.7% respectivamente, pero de manera particular en **C)** la condición de EGF 500 ng/mL + flavona 50 µM es la que tiene la menor supervivencia celular con 89.2 % comparado contra el tratamiento únicamente de flavona 50 µM con 109.5%. Los resultados se representan como el promedio de dieciocho experimentos independientes.

El bloqueo de la actividad de ABCG2 reduce la supervivencia de las células MDA-MB 231 cuando son mantenidas en presencia de EGF y Flavona

De igual manera como se realizó con Doxorubicina, se bloqueó la actividad del transportador ABCG2 en presencia de EGF y Flavona, con el fin de evaluar si la supervivencia celular es mediada por esta proteína. Se realizaron ensayos de MTT

utilizando células tratadas con EGF a 100, 250 y 500 ng/mL con una concentración fija de Flavona de 75 µM y 1 µM Ko-143 (inhibidor específico del ABCG2). La Figura 35 muestra que al bloquear la actividad del transportador ABCG2 se reduce aún más la supervivencia de las células MDA-MB 231 que son mantenidas en presencia de EGF y Flavona (Figura 35).



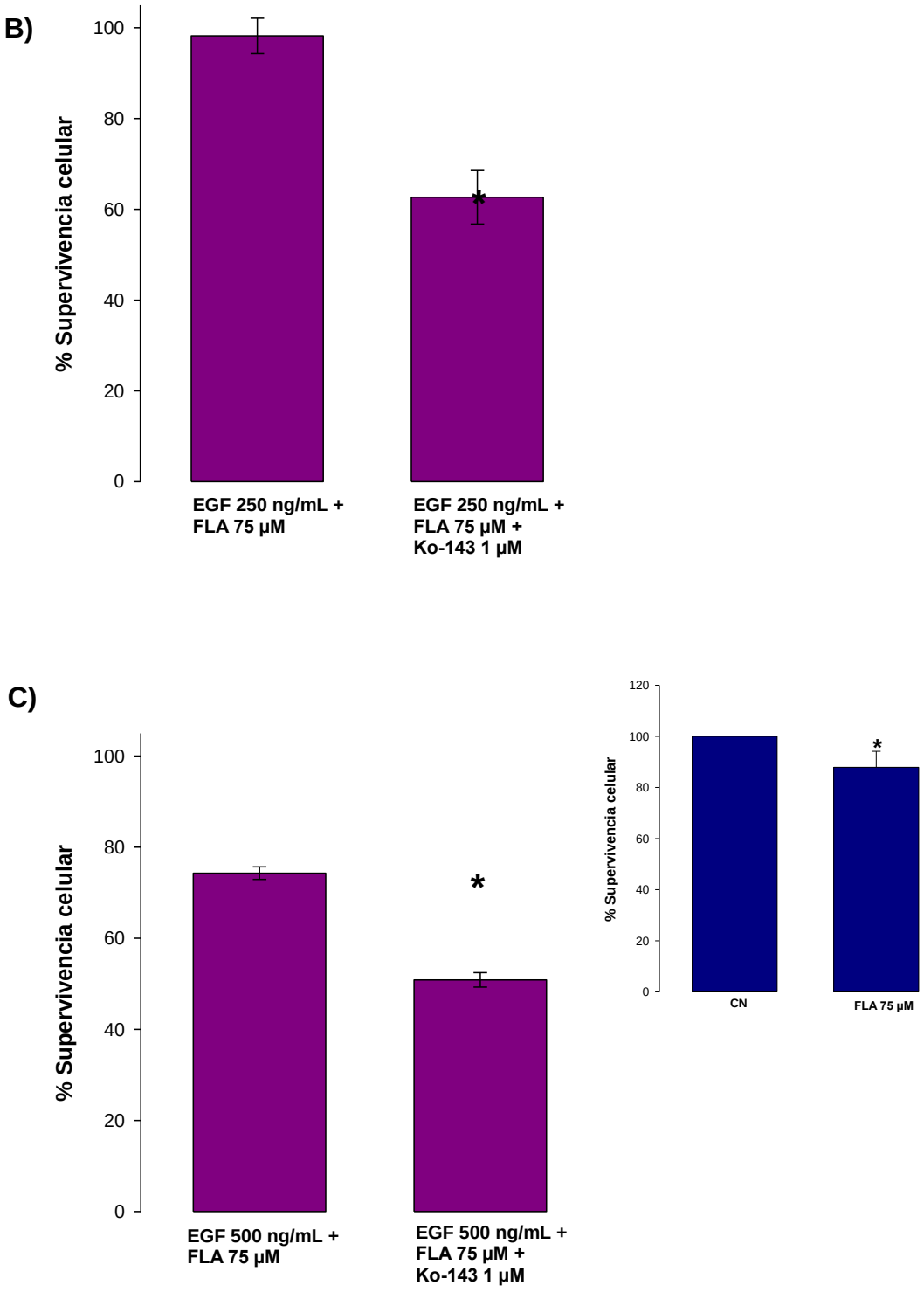


Figura 35. El Ko-143 disminuye el porcentaje de la proliferación celular de las células MDA-MB 231 debido al bloqueo del transportador ABCG2. Se muestran en forma de insertos, gráficas de color azul marino que representan el efecto que ejerce el tratamiento por 48 horas con flavona 75 µM el cual disminuye la supervivencia celular en un 12% con respecto a la condición control. **A)** Se

observa que en la condición con EGF 100 ng/mL + flavona 75 µM hay un 85.6 % de supervivencia celular y en la condición de EGF 100 ng/mL + flavona 75 µM + Ko-143 1 µM hay un descenso significativo de la supervivencia celular (55.5%). **B)** De igual manera se encuentra que en la condición tratada con EGF 250 ng/mL + flavona 75 µM + Ko-143 1 µM hay una reducción de la supervivencia celular en comparación con la condición que solo presenta EGF + flavona mostrando valores de 62.67 y 98.21 % respectivamente. **C)** Finalmente se observa que en la condición EGF 500 ng/mL + flavona 75 µM muestra un 74.29 % de supervivencia celular mientras que en la condición de EGF + flavona + Ko-143 1 µM hay 50.85 %. Este descenso en la supervivencia celular de las condiciones tratadas con el Ko-143 indican que al utilizar un inhibidor específico del ABCG2 se bloquea su actividad y no se observa el efecto la quimiorresistencia. Los resultados se representan como el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes; (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

DISCUSIÓN

El cáncer de mama triple negativo representa del 10 al 15% del total de casos de cáncer de mama que presentan las mujeres a nivel mundial. Es el tipo de cáncer de mama más agresivo, se presenta en mujeres relativamente jóvenes, entre 25 y 40 años de edad, y su periodo de sobrevida es menor a los 5 años. Las células tumorales provenientes de este tipo de cáncer no expresan el receptor a estrógenos, a progesterona y HER2, lo cual imposibilita el uso de tratamientos hormonales y farmacológicos para su tratamiento. Hasta el momento no existe un tratamiento efectivo para el manejo del cáncer de mama triple negativo. Una característica adicional que presentan estas células, es que conforme progresa el cáncer, las células desarrollan quimiorresistencia a los agentes farmacológicos de uso común para su tratamiento, de ahí la baja efectividad que presenta la quimioterapia en los diferentes tipos de cáncer. Se han descrito hasta el momento 9 probables mecanismos responsables de la quimiorresistencia (Fodale et al., 2011), sobresaliendo entre ellos, la sobreexpresión del transportador ABCG2, el cual expulsa de la célula múltiples fármacos oncológicos previniendo su actividad citotóxica (Britton et al., 2012; Wang et al., 2014). En el presente trabajo, determinamos de manera inicial que nuestro modelo experimental de cáncer de mama triple negativo, la línea celular MDA-MB 231, expresa el ARNm que codifica para el transportador ABCG2, al igual como lo reportó recientemente Sha y colaboradores (Sha et al., 2017).

Este es el primer reporte en la literatura donde se demuestra de manera directa que el EGF induce un aumento en la expresión del transportador ABCG2, ya que trabajos previos solamente habían mostrado que la reducción en la expresión del transportador ABCG2 pudiera ser lograda solamente a través del bloqueo inespecífico del receptor a EGF (Liu et al., 2015); o de la cascada de señalización ERK1/2 activada por un receptor a tirosina cinasa (de Boussac et al., 2012).

El EGF es una de las señales extracelulares que comúnmente está presente en el microambiente tumoral de cáncer de mama, proponiéndose que contribuye a la

metástasis, el EGF al unirse a su receptor específico, EGFR, estimula la proliferación y migración celular (Islam & Resat, 2017). El EGF presente en el tumor proviene principalmente de los macrófagos, aunque trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que las propias células MDA-MB 231 son capaces de expresar el ARNm que codifica para EGF, lo cual implicaría un efecto autocrino y paracrino, para favorecer la progresión tumoral (González-González L., 2013). El nivel de expresión de EGFR se ha relacionado positivamente con la malignidad de los tumores sólidos; en el caso particular de cáncer de mama, los cánceres denominados triple negativos (TNBC) sobreexpresan EGFR, lo que siguiere la participación de la vía de señalización de EGFR en el desarrollo y progresión del cáncer (Masuda et al., 2012).

En nuestro modelo celular MDA-MB 231, observamos al igual que varios grupos de investigación, que la presencia crónica de EGF induce un incremento en la supervivencia celular, siendo este efecto dosis-dependiente (Bhowmik et al., 2013; Wu et al., 2016; Wang et al., 2017). Además, demostramos también por primera vez, que el efecto citotóxico que ejerce la doxorubicina sobre las células MDA-MB 231, se ve reducido cuando las células son tratadas previamente con EGF, lo que nos sugiere que el EGF es un factor extracelular que no solamente estimula la proliferación y migración celular, sino también exacerba la capacidad de quimiorresistencia de las células de cáncer de mama triple negativo, contribuyendo de esta manera en la progresión tumoral.

La quimiorresistencia puede deberse a una alteración del metabolismo del fármaco oncológico, un trastorno de la señalización de las vías intracelulares, la interferencia entre diferentes receptores de la membrana, la modificación de la señalización apoptótica, así como una interferencia en el ciclo celular (Fodale et al., 2011). Particularmente se ha investigado la participación de transportadores de membrana de la familia ABC como elementos responsables de la quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer. Particularmente en el caso del cáncer de mama, se ha observado la expresión de dos proteínas transportadoras pertenecientes a la familia ABC (ABCB1 y ABCG2) que están involucradas en la quimiorresistencia (Chang et

al., 2017; Zhou et al., 2015; Kalalinia et al., 2014). Exploramos en las células MDA-MB 231 los niveles de expresión del ARNm de estas dos proteínas, observando solamente la presencia de ABCG2. A partir de estas evidencias, investigamos si el nivel de expresión de la proteína ABCG2 es afectado por la presencia de EGF, experimentos de RT-PCR de punto final muestran que efectivamente, el EGF induce un incremento en los niveles de expresión de ABCG2. Este resultado es apoyado por Meyer zu Schwabedissen y colaboradores, quienes observaron que al tratar las células MCF-7, que proviene de cáncer de mama responsivo a estrógenos, con EGF y activar la vía de señalización MAPKs, se inducia un efecto estimulatorio sobre la expresión de la proteína ABCG2 (Meyer zu Schwabedissen et al., 2006).

Procedimos a continuación investigar si la quimiorresistencia a doxorubicina inducida por el pretratamiento con EGF, se debe al menos en parte al funcionamiento de la proteína transportadora ABCG2, para lo cual utilizamos Ko-143, inhibidor específico de ABCG2 (Burger et al., 2004). La presencia de Ko-143 hace que las células MDA-MB 231 recuperen su sensibilidad al efecto citotóxico de la Doxorubicina, aún en presencia de EGF. El grupo de Palasuberniam, utilizando este mismo fármaco, es capaz de reducir la quimiorresistencia de las células TNBC al efecto citotóxico de la Doxorubicina (Palasuberniam et al., 2015). En el cáncer endometrial, se ha observado una regresión de la quimiorresistencia a la Doxorubicina cuando se altera la vía de señalización PI3K/Akt (Chaudhry & Asselin 2009).

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos. Diversos datos experimentales han demostrado la acción antiproliferativa y anticarcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides (Birt et al., 2001). En nuestro modelo experimental demostramos que altas concentraciones de flavona inducen muerte celular, desconociendo el mecanismo molecular involucrado. Incluso, al evaluar si el pretratamiento con EGF es capaz de inducir quimiorresistencia a Flavona en las células MDA-MB 231, tal y como lo observamos

para la Doxorubicina, los resultados obtenidos fueron negativos, sugiriendo que el mecanismo a través del cual la Doxorubicina induce la muerte celular es diferente a la vía que utiliza la Flavona, y que esta vía interfiere con la vía de señalización activada por la unión EGF-EGFR, de ahí que no se observe efecto del EGF en presencia de Flavona. Lin y colaboradores en el 2015 mostraron que la Flavona interrumpe una de las vías de señalización del EGFR, la vía dependiente de Akt (Lin et al., 2015).

La caracterización de los mecanismos y alteraciones que ocurren en las vías de supervivencia que conducen a la evasión de la apoptosis en respuesta a los fármacos citotóxicos es útil para identificar nuevos objetivos terapéuticos que podrían guiar a un mejor tratamiento. El diseño de fármacos basados en la estructura podría proporcionar la mayor oportunidad para desarrollar inhibidores altamente específicos y potentes de las bombas transportadoras (Modok et al., 2006).

CONCLUSIONES

Los datos experimentales presentados en esta tesis nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

1. La presencia crónica de EGF incrementa la supervivencia de la línea celular MDA-MB 231, siendo este efecto dosis dependiente.

2. El efecto citotóxico de la doxorubicina sobre las células MDA-MB 231, se ve reducido de manera significativa cuando las células son pretratadas con EGF.

3. Las células MDA-MB 231 expresan el ARNm que codifica para el transportador ABCG2, proteína relacionada con la quimiorresistencia.

4. La presencia de EGF induce un aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para ABCG2.

5. El incremento observado en la capacidad de quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 a la doxorubicina cuando estas son pretratadas con EGF, se debe al menos en parte a un incremento en la expresión funcional del transportador ABCG2.

6. El efecto citotóxico de la flavona sobre las células MDA-MB 231, no resulta afectado cuando las células son pretratadas con EGF.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, B. L. (2003). ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematological oncology*, *21*(3), 115-130.

ALBERT, B., BRAY, D., & LEWIS, J. (1997). RAFF, M,; ROBERTS, K. e WATSON, JD "Biologia Molecular da Célula". Trad. Amauri B. Simonetti et al, 3.

Allen, J. D., & Schinkel, A. H. (2002). Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) 1 supported in part by Dutch Cancer Society Grants NKI 97-1433 and NKI 97-1434 (to AHS). 1. Molecular Cancer Therapeutics, 1(6), 427-434.

Allen, J. D., Van Dort, S. C., Buitelaar, M., van Tellingen, O., & Schinkel, A. H. (2003). Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. Cancer Research, 63(6), 1339-1344.

Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). [Bioquímica] Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Offarm: Farmacia y Sociedad, 22(10), 130-140.

American Cancer Society. (2017). Cancer facts & figures 2017. Woonsocket, R. I.: American Cancer Society. Recuperado de https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html el 01 de octubre de 2017.

American Cancer Society. (2017). Cancer facts & figures 2017. Woonsocket, R. I.: American Cancer Society. Recuperado de https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/comprension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/estado-de-her2-del-cancer-de-seno.html el 12 de julio de 2017.

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annual review of pharmacology and toxicology, 39(1), 361-398.

Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. Clinical breast cancer, 9, S73-S81.

Asociación Española Contra el Cáncer. (2017). Cáncer de mama. Síntomas. España. AECC. Recuperado de https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/sintomas.aspx

Astudillo-de la Vega, H., Erika, R. G., Jorge, M. C., & Francisco, O. C. (2010). El papel de la quimiorresistencia en los tumores sólidos. Clinical case, 9(3), 117.

Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. The Journal of nutrition, 133(10), 3248S-3254S.

Bhowmik A, Das N, Pal U, Mandal M, Bhattacharya S, Sarkar M, Jaisankar P, Maiti NC, Ghosh MK. 2013. 2,2'-diphenyl-3,3'-diindolylmethane: a potent compound induces apoptosis in breast cancer cells by inhibiting EGFR pathway. PLoS One 8:e59798.

Birt DF, Hendrich S y Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther 90:157-177.

Brewster, A. M., Chavez-MacGregor, M., & Brown, P. (2014). Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry. The Lancet Oncology, 15(13), e625-e634.

Britton, D. J., Hutcheson, I. R., Knowlden, J. M., Barrow, D., Giles, M., McClelland, R. A., ... & Nicholson, R. I. (2006). Bidirectional cross talk between ERα and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. Breast cancer research and treatment, 96(2), 131-146.

Britton KM, Eyre R, Harvey IJ, Stemke-Hale K, Browell D, Lennard TW, Meeson AP. (2012). Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. Cancer Lett. 323:97-105.

Bringman, T. S., Lindquist, P. B., & Derynck, R. (1987). Different transforming growth factor-α species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. Cell, 48(3), 429-440.

Borst, P., & Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. Annual review of biochemistry, 71(1), 537-592.

Borst, P., & Schinkel, A. H. (2013). P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals. The Journal of clinical investigation, 123(10), 4131.

Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. 2004. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. Blood 104:2940-2942.

Bush, J. A., & Li, G. (2002). Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. International journal of cancer, 98(3), 323-330.

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., ... & Deming, S. L. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. Jama, 295(21), 2492-2502.

Carpenter, G., & Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. Annual review of biochemistry, 48(1), 193-216.

Cervenak, J., Andrikovics, H., Özvegy-Laczka, C., Tordai, A., Német, K., Váradi, A., & Sarkadi, B. (2006). The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. Cancer letters, 234(1), 62-72.

Chai, S., To, K. K., & Lin, G. (2010). Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. Chinese medicine, 5(1), 26.

Chang FW, Fan HC, Liu JM, Fan TP, Jing J, Yang CL, Hsu RJ. 2017. Estrogen Enhances the Expression of the Multidrug Transporter Gene ABCG2-Increasing Drug Resistance of Breast Cancer Cells through Estrogen Receptors. Int J Mol Sci 18(1).

Chaudhry, P., & Asselin, E. (2009). Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. Endocrine-related cancer, 16(2), 363-380.

Chen, W. S., Lazar, C. S., Lund, K. A., Welsh, J. B., Chang, C. P., Walton, G. M., ... & Rosenfeld, M. G. (1989). Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. Cell, 59(1), 33-43.

Chu, E., & DeVita, V. T. (2001). Principles of cancer management: chemotherapy. Cancer, Principles and Practice of Oncology, 6th Edition. Editado por VT DeVita, S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincont Company, Philadelphia, 289-386.

Chun, O. K., Lee, S. G., Wang, Y., Vance, T., & Song, W. O. (2012). Estimated flavonoid intake of the elderly in the United States and around the world. Journal of nutrition in gerontology and geriatrics, 31(3), 190-205.

Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. Journal of Biological Chemistry, 237(5), 1555-1562.

Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., & Olah, E. (1997). Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. Life Sciences, 60(24), 2157-2163.

Dalton, W. S. (1993). Overcoming the Multidrug-Resistant Phenotype: Cancer, Principles and Practice of Oncology. Overcoming the Multidrug-Resistant Phenotype: Cancer, Principles and Practice of Oncology.

De Boussac H, Orbán TI, Várady G, Tihanyi B, Bacquet C, Brózik A, Váradi A, Sarkadi B, Arányi T. 2012. Stimulus-induced expression of the ABCG2 multidrug transporter in HepG2 hepatocarcinoma model cells involves the ERK1/2 cascade and alternative promoters. Biochem Biophys Res Commun 426:172-176.

Dean, M., & Allikmets, R. (2001). Complete characterization of the human ABC gene family. Journal of bioenergetics and biomembranes, 33(6), 475-479.

Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(26), 15665-15670.

Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Annals of surgical oncology, 17(6), 1471-1474.

Erhart, L. M., Lankat-Buttgereit, B., Schmidt, H., Wenzel, U., Daniel, H., & Göke, R. (2005). Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. Apoptosis, 10(3), 611-617.

Fais, S. (2010). Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism. Journal of internal medicine, 267(5), 515-525.

Fodale, V., Pierobon, M., Liotta, L., & Petricoin, E. (2011). Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance?. The Cancer Journal, 17(2), 89-95.

Franke, R. M., Gardner, E. R., & Sparreboom, A. (2010). Pharmacogenetics of drug transporters. Current pharmaceutical design, 16(2), 220-230.

Fujimura, M., Hidaka, T., & Saito, S. (2002). Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor by ZD1839 decreases the growth and invasion of ovarian clear cell adenocarcinoma cells. Clinical Cancer Research, 8(7), 2448-2454.

Gasparini, G., Pozza, F., & Harris, A. L. (1993). Evaluating the Potential Usefulness of New Prognostic and Predictive Indicators on Node-Negative Breast Cancer Patients. Journal of the National Cancer Institute, 85(15), 1206-1219.

Gatti, L., & Zunino, F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. Chemosensitivity: Volume II: In VIVO Models, Imaging, and Molecular Regulators, 127-148.

Gillet, J. P., & Gottesman, M. M. (2012). Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1. Drug Resistance Updates, 15(1), 2-4.

Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nature reviews. Cancer, 2(1), 48.

Grandage, V. L., Gale, R. E., Linch, D. C., & Khwaja, A. (2005). PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kB, MAPkinase and p53 pathways. Leukemia, 19(4), 586.

Haimeur, A. G. R. G. S. P., Conseil, G., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2004). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. Current drug metabolism, 5(1), 21-53.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144(5), 646-674.

Hardwick, L. J. A., Velamakanni, S., & Veen, H. W. (2007). The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). British journal of pharmacology, 151(2), 163-174.

Hardy, K. M., Booth, B. W., Hendrix, M. J., Salomon, D. S., & Strizzi, L. (2010). ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 15(2), 191-199.

Hayashi, H., & Sugiyama, Y. (2013). Bile salt export pump (BSEP/ABCB11): trafficking and sorting disturbances. Curr Mol Pharmacol, 6(2), 95-103.

Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology.International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 59(2), S21-S26.

Hernandez-Sotomayor, S. T., & Carpenter, G. (1992). Epidermal growth factor receptor: elements of intracellular communication. The Journal of membrane biology, 128(2), 81-89.

Hipfner, D. R., Almquist, K. C., Leslie, E. M., Gerlach, J. H., Grant, C. E., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (1997). Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP) A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH2 terminus. Journal of Biological Chemistry, 272(38), 23623-23630.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nature reviews. Cancer, 13(10), 714.

Hui, C., Bin, Y., Xiaoping, Y., Long, Y., Chunye, C., Mantian, M., & Wenhua, L. (2010). Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. Nutrition and cancer, 62(8), 1128-1136.

Islam T, Resat H. 2017. Quantitative investigation of MDA-MB-231 breast cancer cell motility: dependence on epidermal growth factor concentration and its gradient. Mol Biosyst 13:2069-2082.

Itamochi, H., Kigawa, J., Sultana, H., Iba, T., Akeshima, R., Kamazawa, S., ... & Terakawa, N. (2002). Sensitivity to anticancer agents and resistance mechanisms in clear cell carcinoma of the ovary. Cancer Science, 93(6), 723-728.

Kalalinia F, Elahian F, Mosaffa F, Behravan J. 2014. Celecoxib Up Regulates the Expression of Drug Efflux Transporter ABCG2 in Breast Cancer Cell Lines. Iran J Pharm Res 13:1393-1401.

Kim, M., Turnquist, H., Jackson, J., Sgagias, M., Yan, Y., Gong, M., ... & Cowan, K. (2002). The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. Clinical Cancer Research, 8(1), 22-28.

Klaassen, C. D., & Aleksunes, L. M. (2010). Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. Pharmacological reviews,62(1), 1-96.

Komen G. Susan. The Susan G. Komen Breast Cancer Foundation. Recuperado el 20 de julio 2017 https://ww5.komen.org/BreastCancer/TreatmentIntroduction.html

Krishna, R., & Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 11(4), 265-283.

Kruser, T. J., & Wheeler, D. L. (2010). Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. Experimental cell research, 316(7), 1083-1100.

Kuo, S. M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. Cancer letters, 110(1-2), 41-48.

Lagas, J. S., Vlaming, M. L., & Schinkel, A. H. (2009). Pharmacokinetic assessment of multiple ATP-binding cassette transporters: the power of combination knockout mice. Molecular interventions, 9(3), 136.

Lehnert, M. (1996). Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. European Journal of Cancer, 32(6), 912-920.

Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicology and applied pharmacology, 204(3), 216-237.

Leonard, G. D., Fojo, T., & Bates, S. E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. The oncologist, 8(5), 411-424.

Lin, C. H., Chang, C. Y., Lee, K. R., Lin, H. J., Chen, T. H., & Wan, L. (2015). Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway. BMC cancer, 15(1), 958.

Liu, S., Zhou, S., Tian, L., Guo, E., Luan, Y., Zhang, J., & Li, S. (2011). Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, Bombyx mori. BMC genomics, 12(1), 491.

Liu B, Guo Z, Dong H, Daofeng T, Cai Q, Ji B, Zhang S, Wu L, Wang J, Wang L, Zhu X, Liu Y, Chen Q. (2015). LRIG1, human EGFR inhibitor, reverses multidrug resistance through modulation of ABCB1 and ABCG2. Brain Res 1611:93-100.

Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., de Jong, L. A., Pluim, D., van Waardenburg, R. C., Ruevekamp-Helmers, M. C., ... & Schellens, J. H. (1999). Overexpression of

the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. Cancer Research, 59(18), 4559-4563.

Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., ... & Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. Cancer research, 61(8), 3458-3464.

Martinez-Carpio, P. A. (1999). Secrecion constitutiva y regulada del factor de crecimiento epidermico (EGF) y del factor transformante del crecimiento-β1 (TGF-β1) en cultivos de la linea celular MDA-MB-231 [tesis doctoral]. Publicaciones Universidad de Barcelona, Barcelona.

Martínez-Carpio, P. A., Mur, C., Fernández-Montolí, M. E., Ramon, J. M. A., Rosel, P., & Navarro, M. A. (1999). Secretion and dual regulation between epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 cell line in 42-hour-long cultures. Cancer letters, 147(1-2), 25-29.

Martínez-Carpio, P. A. (2003). El factor de crecimiento epidérmico cuarenta años después de su descubrimiento: de la bioquímica a la clínica. Endocrinología y Nutrición, 50(8), 334-344.

Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. 2012. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 136:331-345.

Medical News Today - What is Cancer? Recuperado el 21 de Enero de 2017 http://www.medicalnewstoday.com/info/cancer-oncology

Meyer zu Schwabedissen HE, Grube M, Dreisbach A, Jedlitschky G, Meissner K, Linnemann K, Fusch C, Ritter CA, Völker U, Kroemer HK. 2006. Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). Drug Metab Dispos 34:524-533

Middleton Jr, E., & Kandaswami, C. (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. The flavonoids. London: Chapman and Hall.

Mo, W., & Zhang, J. T. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. International journal of biochemistry and molecular biology, 3(1), 1.

Modok, S., Mellor, H. R., & Callaghan, R. (2006). Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. Current opinion in pharmacology, 6(4), 350-354.

Mur, C., Martínez-Carpio, P. A., Fernández-Montolí, M. E., Ramon, J. M., Rosel, P., & Navarro, M. A. (1998). GROWTH OF MDA-MB-231 CELL LINE: DIFFERENT EFFECTS OF TGF-β1, EGF AND ESTRADIOL DEPENDING ON THE LENGTH OF EXPOSURE. Cell biology international, 22(9-10), 679-684.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=31703, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703 (accessed Sept. 30, 2017).

National Cancer Institute. Available from: http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/BRCA

Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., & Harper, M. 2. (2001). EGFR and cancer prognosis. European journal of cancer, 37, 9-15.

NOM-041-SSA2-2011, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud, 09 de junio de 2011. [documento en internet]. [consultado el 14 de julio de 2013]. Disponible en internet en: http://www.spps.gob.mx/images/stories/SPPS/Docs/nom/NOM-041-SSA2-2011.pdf

O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., ... & Friend, S. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. Cancer research, 57(19), 4285-4300.

Özvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., & Sarkadi, B. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. Biochemical and biophysical research communications, 285(1), 111-117.

Palasuberniam, P., Yang, X., Kraus, D., Jones, P., Myers, K. A., & Chen, B. (2015). ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. Scientific reports, 5.

Pandiella, A., & Massague, J. (1991). Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(5), 1726-1730.

Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. Journal of the American Dietetic Association, 98(6), 677-685.

Pluchino, K. M., Hall, M. D., Goldsborough, A. S., Callaghan, R., & Gottesman, M. M. (2012). Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. Drug Resistance Updates, 15(1), 98-105.

Prigent, S. A., & Lemoine, N. R. (1992). The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. Progress in growth factor research, 4(1), 1-24.

P.R. Vademecum, (2014), Vademecum. CDMX. Recuperado el 27 de septiembre de 2017. http://mx.prvademecum.com/droga.php?droga=912

Rajkumar, T., & Gullick, W. J. (1994). The type I growth factor receptors in human breast cancer. Breast cancer research and treatment, 29(1), 3-9.

Rall, L. B., Scott, J., Bell, G. I., Crawford, R. J., Penschow, J. D., Niall, H. D., & Coghlan, J. P. (1985). Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. Nature, 313(5999), 228-231.

Richie, R. C., & Swanson, J. O. (2003). Breast cancer: a review of the literature. JOURNAL OF INSURANCE MEDICINE-NEW YORK THEN DENVER--, 35(2), 85-101.

Riordan, J. R. (1999). Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. The American Journal of Human Genetics, 64(6), 1499-1504.

Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., ... & Doyle, L. A. (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. Journal of the National Cancer Institute, 91(5), 429-433.

Ross, D. D., Karp, J. E., Chen, T. T., & Doyle, L. A. (2000). Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. Blood, 96(1), 365-368.

Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual review of Nutrition, 22(1), 19-34.

Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. Biochemical pharmacology, 83(1), 6-15.

Said NA, Williams ED. Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis. Cell Tissues Organs 2011;193:85–97.

Salaverry, O. (2013). La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 30(1), 137-141.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Critical reviews in oncology/hematology, 19(3), 183-232.

Sánchez-Suárez, P., & Bentiez-Bibriesca, L. (2006). Procesos biomoleculares de la Resistencia a drogas. Cancerolgía, 1, 187-199.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., & Váradi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiological reviews, 86(4), 1179-1236.

Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. Blood, 99(2), 507-512.

Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Advanced drug delivery reviews, 55(1), 3-29.

Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell, 110(6), 669-672.

Secretaría de Salud, Subsecretaría de Innovación y Calidad. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC), 30 junio 2005, Guía de Equipamiento Unidad de Radioterapia y Quimioterapia. Recuperado el 24 de Mayo de 2017. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/biomedica/guias_equipamiento/QuimioRadio.pdf

Sergina, N. V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K. M., & Moasser, M. M. (2007). Escape from HER family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase inactive HER3. Nature, 445(7126), 437.

Sha S, Yuan D, Liu Y, Han B, Zhong N. (2017). Targeting long non-coding RNA DANCR inhibits triple negative breast cancer progression. Biol Open 6:1310-1316.

Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., & Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nature reviews. Cancer, 7(3), 169.

Sharom, F. J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance.

Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B. M., Natarajan, A., Hecking, M., & Holcmann, M. (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. Differentiation, 75(9), 770-787.

Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. European journal of medicinal chemistry, 84, 206-239.

Skubitz, K. M. (1990). P-glycoprotein and Multidrug Resistance. American journal of clinical pathology, 93(1), 156-157.

Stavrovskaya, A. A. (2000). Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. BIOCHEMISTRY C/C OF BIOKHIMIIA, 65(1), 95-106.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., & Váradi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiological reviews, 86(4), 1179-1236.

Szakacs, G., Varadi, A., Özvegy-Laczka, C., & Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). Drug discovery today, 13(9), 379-393.

Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. Essays in biochemistry, 50(1), 209-232.

Tan, B., Piwnica-Worms, D., & Ratner, L. (2000). Multidrug resistance transporters and modulation. Current opinion in oncology, 12(5), 450-458.

Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. Cancer control, 10(2), 159-159.

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenetics and genomics, 21(7), 440.

Trebunova, M., Laputkova, G., Slaba, E., Lacjakova, K., & Verebova, A. (2012). Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. Anticancer research, 32(7), 2849-2854.

Tsui L-C, Farrall M. (1991). Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 7. In:Human Gene Mapping 11. Cytogenetics and Cell Genetics, 58: 337-81.

Varadi, A., Tusnady, G., & Sarkadi, B. (2003). Membrane topology of the human ABC transporter proteins. ABC Proteins: From Bacteria to Man, Academic Press, Amsterdam, 37-46.

Vlaming, M. L., Lagas, J. S., & Schinkel, A. H. (2009). Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. Advanced drug delivery reviews, 61(1), 14-25.

Volk, E. L., Farley, K. M., Wu, Y., Li, F., Robey, R. W., & Schneider, E. (2002). Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. Cancer research, 62(17), 5035-5040.

Wang, H., Lee, E. W., Cai, X., Ni, Z., Zhou, L., & Mao, Q. (2008). Membrane Topology of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Determined by Epitope Insertion and Immunofluorescence†. Biochemistry,47(52), 13778-13787.

Wang Y, Deng W, Zhang Y, Sun S, Zhao S, Chen Y, Zhao X, Liu L, Du J. 2017. MICAL2 promotes breast cancer cell migration by maintaining epidermal growth factor receptor (EGFR) stability and EGFR/P38 signalling activation. Acta Physiol (Oxf) [Epub ahead of print].

Wang Z, Wang N, Li W, Liu P, Chen Q, Situ H, Zhong S, Guo L, Lin Y, Shen J, Chen J. 2014. Caveolin-1 mediates chemoresistance in breast cancer stem cells via β-catenin/ABCG2 signaling pathway. Carcinogenesis 35:2346-2356.

Waterfield, M. D., Scrace, G. T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, Å., ... & Deuel, T. F. (1982). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. Nature, 304(5921), 35-39.

Wells, A. (1999). EGF receptor. The international journal of biochemistry & cell biology, 31(6), 637-643.

Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Armstrong, E. A., Benavente, S., ... & Harari, P. M. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. Oncogene, 27(28), 3944.

Wesche J, Haglund K, Haugsten E. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. Biochem. J 2011;437:199–213.

Wilson, T. R., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2006). Chemoresistance in solid tumours. Annals of Oncology, 17(suppl_10), x315-x324.

Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C. (2004). Serial review: Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. Free Radical Biology and Medicine, 36(7), 838-849.

Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. Physiology, 25(2), 85-101.

Wu J, Liu S, Fan Z, Zhang L, Tian Y, Yang R. 2016. A novel and selective inhibitor of PKC ζ potently inhibits human breast cancer metastasis in vitro and in mice.Tumour Biol 37:8391-8401.

Yang, P. M., Tseng, H. H., Peng, C. W., Chen, W. S., & Chiu, S. J. (2012). Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. International journal of oncology, 40(2), 469-478.

Zhang, J. T., & Ling, V. (1991). Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation. Journal of Biological Chemistry, 266(27), 18224-18232.

Zhou Q, Ye M, Lu Y, Zhang H, Chen Q, Huang S, Su S. 2015. Curcumin Improves the Tumoricidal Effect of Mitomycin C by Suppressing ABCG2 Expression in Stem Cell-Like Breast Cancer Cells. PLoS One 10:e0136694.