



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER

**EFFECTO DE *Kalanchoe pinnata* EN LA EXPRESIÓN DE
LOS GENES *FTO* Y *HDAC2* EN LA LÍNEA CELULAR DE
CÁNCER DE MAMA MCF-7**

**TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOMEDICINA PRESENTA:**

ANDRÉS FELIPE VARGAS AMAYA

DIRECTOR:

D.C. MARTA ELENA
HERNÁNDEZ CABALLERO

CODIRECTOR:

D.C. CARLOS ROGELIO
ALVIZO RODRÍGUEZ

PUEBLA DE ZARAGOZA, PUEBLA. JULIO, 2023

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I. RESUMEN	6
II. INTRODUCCIÓN	7
II.I. Cáncer de mama	7
II.I.I. Epidemiología.....	7
II.I.II. Tratamientos y novedades terapéuticas	8
II.II. Modificaciones epigenéticas en ácidos nucleicos e histonas	9
II.II.I. Metilación en ADN y ARN.....	9
II.II.II. Papel del gen <i>FTO</i> en el metiloma de la célula	10
II.II.III. Acetilación en histonas	11
II.II.IV. Papel del gen <i>HDAC2</i> en el acetiloma de la célula	12
II.III. Línea celular MCF-7	13
II.III.I. Origen.....	13
II.III.II. Características moleculares.....	13
II.III.III. Aplicaciones en biomedicina.....	14
II.IV. <i>Kalanchoe pinnata</i>	14
II.IV.I. Distribución geográfica.....	14
II.IV.II. Propiedades y usos cotidianos	15
II.IV.III. Tamizaje e investigación farmacológica	16
III. ANTECEDENTES	18
III.I. Efecto antitumoral de <i>K. pinnata</i>	18
III.II. Participación del gen <i>FTO</i> en el metiloma del cáncer de mama	19
III.II.III. Participación del gen <i>HDAC2</i> en el acetiloma del cáncer de mama ..	20

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
V. OBJETIVOS	22
V.I. Objetivo general	22
V.II. Objetivos particulares	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	23
VI.I. Recolección de <i>K. pinnata</i> y preparación del extracto acuoso	23
VI.II. Ensayo de viabilidad celular	23
VI.III. Ensayo de migración celular	24
VI.IV. Ensayo de expresión génica	26
VII. RESULTADOS	28
VII.I. Recolección de <i>K. pinnata</i> y preparación de extracto acuoso	28
VII.II. Viabilidad celular	29
VII.IV. Electroforesis de muestras de ARN en gel de agarosa al 1% y cuantificación por espectrofotometría.....	33
VII.V. Expresión génica.....	34
VIII. DISCUSIÓN.....	37
IX. CONCLUSIONES	40
X. BIBLIOGRAFÍA.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

5mC	5-metilcitosina
BNIP3	Proteína de interacción con Bcl-2 (<i>Bcl-2 interacting protein 3</i>)
CDK	Ciclina dependiente de cinasa (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Transición epitelio-mesénquima (<i>epithelial–mesenchymal transition</i>)
<i>FTO</i>	Proteína asociada a la masa grasa y la obesidad (<i>fat mass and obesity-associated protein</i>)
HATs	Histona acetiltransferasas
<i>HDAC2</i>	Histona desacetilasa 2
HDACs	Histona desacetilasas
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforribosiltransferasa (<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
m6A	N6-metiladenosina
mTOR	Blanco de rapamicina en células de mamífero (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PARP	Poli(ADP)-ribosa polimerasa

PD-L1	Ligando 1 de muerte programada (<i>programmed death-ligand 1</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa (phosphoinositide 3-kinase)
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
TSA	Tricostatina A
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

I. RESUMEN

Durante los últimos años, el cáncer de mama se ha ubicado dentro de las enfermedades con las tasas de mortalidad e incidencia más altas a nivel global en una escala sin precedentes, incitando que la comunidad científica priorice sus investigaciones en hallar nuevos tratamientos más efectivos. La medicina alternativa que muestra interés en aislar moléculas activas de origen vegetal ha llamado la atención de muchos profesionales, con el objetivo de escudriñar el valor farmacológico de estos compuestos para su integración en el tratamiento de padecimientos cuya evolución resulte generalmente fatídica.

El presente trabajo de investigación abordó los efectos que provoca el *Kalanchoe pinnata* en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 mediante tres ensayos con el objetivo de evaluar la migración, la viabilidad y la expresión génica de estas células al ser tratadas con un extracto de la planta en cuestión. En el ensayo de migración, la cicatrización de la herida realizada en la monocapa de células MCF-7 tratadas con extracto de *K. pinnata* se vio ralentizada en comparación con el grupo control. Por otro lado, la viabilidad de las células expuestas al tratamiento se vio notoriamente afectada pues se redujo hasta un 10% cuando la concentración de extracto fue de 105 µg/ml. Finalmente, en el ensayo de expresión génica se encontró que en las células tratadas con extracto el gen *FTO* se ve más expresado que en el grupo control, ocurriendo de la misma forma para el gen *HDAC2*. Sin embargo, la presencia de herida tanto en el grupo control como en el experimental reduce la expresión de ambos genes notoriamente. Los resultados sugieren que existe una clara correlación entre la disminución de la viabilidad, la disfunción de la capacidad migratoria y la alteración de la expresión génica de las células MCF-7 al aplicarles extracto de *K. pinnata*.

II. INTRODUCCIÓN

II.I. Cáncer de mama

II.I.I. Epidemiología

El cáncer de mama presenta índices estadísticos alarmantemente altos a nivel mundial, siendo la causa más común de muerte por cáncer en la población femenina en 140 de 184 países alrededor del mundo (1), por lo que no es de extrañarse la atención que ha cobrado como una emergencia sanitaria de escala global. El grupo etario con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo oscila entre los 40 y 49 años de edad, mientras que en países desarrollados este rango aumenta hasta llegar a mujeres postmenopáusicas (2). Aunque las cifras de incidencia del cáncer son más altas en países de nivel socioeconómico alto, las del cáncer de mama pueden variar dependiendo la raza y etnicidad, como es el caso de la tasa de incidencia de esta enfermedad en África central y Asia del Este que es de 27 por 100,000 habitantes, en comparación con la de Norteamérica que es de 92 por cada 100,000 habitantes (3).

En el caso de Latinoamérica y el Caribe, tan solo en el año 2020 se reportaron 210,000 casos nuevos de cáncer de mama y un total de 57,000 decesos a causa de la enfermedad, por lo que se espera que para el año 2040 estos números incrementen a 309,000 y 92,700, respectivamente (4). En México, el cáncer de mama representa el 25% de todos los casos de cáncer y tiene una mortalidad de 16 por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años (5). Cabe mencionar que la poca disponibilidad de alternativas terapéuticas y de instrumentos de tamizaje en la población latina femenina son factores que contribuyen directamente en la tendencia ascendente de la mortalidad (2).

Ahora bien, es posible distinguir 4 subtipos de cáncer de mama tomando en cuenta sus características moleculares únicas: luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo (6). Los dos primeros son positivos para el receptor de estrógenos (RE), pero solo el tipo luminal A es positivo también para el receptor de progesterona

(RP), siendo ambos los tipos de tumores con mejor pronóstico y los más frecuentes, en un 75-80% de los casos (7). El tipo HER2 positivo, como su nombre lo dice, es únicamente positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), mientras que el tipo triple negativo no cuenta con ninguno de los biomarcadores mencionados, cualidades que les confieren a ambos subtipos una alta agresividad, elevada mortalidad y baja respuesta al tratamiento disponible, aun cuando representan menos del 20% de los casos de tumores de cáncer de mama (8).

II.I.II. Tratamientos y novedades terapéuticas

El esquema terapéutico dirigido a cáncer de mama es multidisciplinario y valora el estadio en el que se encuentra la enfermedad, así como el subtipo de cáncer al que va dirigido (9). Para pacientes en estadios tempranos (I o II), el tratamiento recomendado incluye procedimientos quirúrgicos que pueden ir desde una mastectomía hasta una cirugía de conservación de seno, en conjunto con agentes adyuvantes o neoadyuvantes, como la quimioterapia y la radioterapia (10).

Aparte de estos dos últimos tratamientos sistémicos, la terapia endocrina u hormonal y la inmunoterapia igualmente aparecen en escena pues cada vez son más investigadas en el campo de la oncología, por sus efectos en la mitigación del desarrollo tumoral en diferentes grados de metástasis (11). Se ha reportado que la administración de tamoxifeno (modulador de RE) como terapia hormonal, puede reducir el riesgo de recurrencia de un cáncer de mama positivo a biomarcadores hasta un 50% en un lapso de 5 años (12). Por otra parte, el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a tumores metastásicos, por ejemplo, sacituzumab govitecan para el tipo triple negativo y trastuzumab deruxtecan para el HER2 positivo, es la principal intención de la inmunoterapia (13). Otras terapias con blancos específicos en cáncer de mama con metástasis, y que poco a poco van abriéndose paso en el área, incluyen a los inhibidores de las ciclinas dependientes de cinasa 4 y 6 (CDK 4/6) y de la poli(ADP)-ribosa polimerasa (PARP), que afectan mecanismos implicados en la progresión del ciclo celular y la reparación del ADN, en el orden dado (14). Aunque la gama de opciones terapéuticas es amplia, aún es

necesario asegurar su efectividad, al minimizar la toxicidad que provocan en los pacientes tras su administración, sin mencionar que hacerlos asequibles a las poblaciones más vulnerables debe ser una tarea más que atender.

II.II. Modificaciones epigenéticas en ácidos nucleicos e histonas

II.II.I. Metilación en ADN y ARN

Se ha descrito que la metilación, como la modificación epigenética más abundante y estudiada en ácidos nucleicos, tiene por objetivo regular la expresión génica en varios niveles. En el ADN, el fenómeno más común se concreta con la unión covalente del grupo metilo (-CH₃) en la posición 5 de una citosina (5-metilcitosina o 5mC) seguida de una guanina, nucleótidos que a su vez forman las denominadas islas CpG, las cuales son abundantes en regiones promotoras de genes e incluso en otras donde no necesariamente presentan la 5mC (15). Estos cambios, mediados por las metiltransferasas, ocasionan que ciertos factores de transcripción sean repelidos y que otras proteínas de unión a islas CpG sean atraídas a los sitios metilados para impedir la transcripción, eventos que finalmente promueven el silenciamiento reversible de genes (16).

La metilación en el ARN, por otro lado, resulta ser una modificación postranscripcional que asimismo tiene por función regular la expresión génica, pero a nivel del epitranscriptoma, siendo la N6-metiladenosina (m6A) la modificación química más abundante hallada en el ARNm de la mayoría de los organismos eucarióticos (17). La regulación de m6A y de otros fenómenos de metilación en el ARN tiene un gran impacto en la ejecución de eventos biológicos como la diferenciación y proliferación celulares, la traducción de proteínas, la reparación del ADN e incluso en la transición epitelio-mesénquima (EMT) (18). Aspectos como la maquinaria enzimática involucrada en la metilación del ARN aún no son profundizados del todo, sin embargo, a continuación, se hace mención de un importante componente en la remoción de m6A en este ácido nucleico.

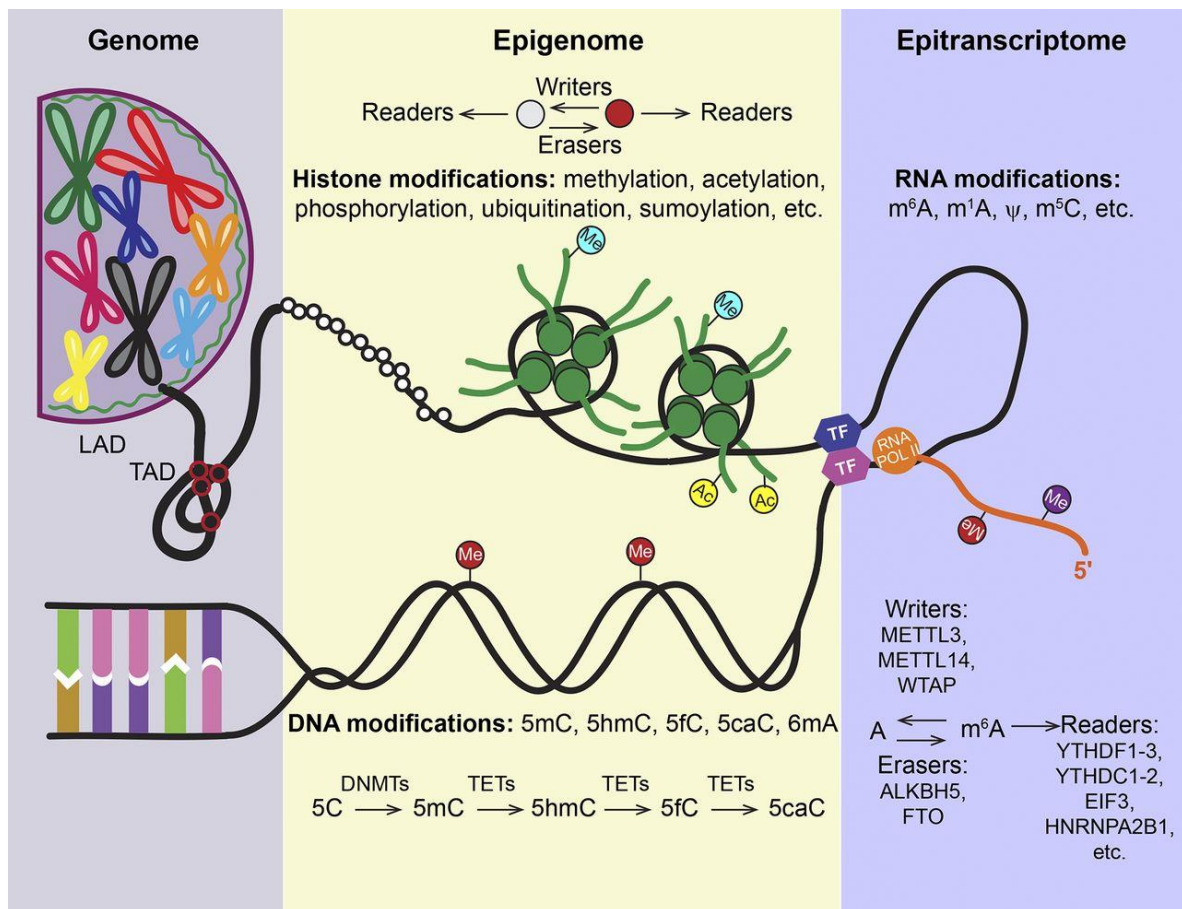


Figura 1. Modificaciones epigenéticas más comunes. La regulación de la expresión génica viene acompañada de cambios epigenéticos en los que se encuentra la metilación a nivel del ADN y del ARN, como la 5mC y la m⁶A respectivamente, involucrando enzimas como metiltransferasas (writers), desmetilasas (erasers) y de reconocimiento (readers) (19).

II.II.II. Papel del gen *FTO* en el metiloma de la célula

El gen *FTO* (proteína asociada a la masa grasa y la obesidad) codifica para una desmetilasa que cataliza la remoción de la modificación m⁶A en el ARN nuclear, por lo que su adecuada regulación, junto con la de su enzima homóloga ALKBH5, es relevante en el epitranscriptoma de la célula (20). *FTO* mantiene una estrecha relación con la obesidad tanto en niños como en adultos, ya que sus polimorfismos pueden alterar directamente los niveles de leptina, adiponectina, grelina, entre otras hormonas relacionadas con la ingesta de alimentos y el metabolismo celular (21). La sobreexpresión de *FTO* conduce a una disminución de la lipólisis y de la oxidación de ácidos grasos, así como un incremento de triglicéridos en el

organismo, haciendo más que evidente el vínculo que mantiene la obesidad y la metilación en genes específicos (22). Aunque la actividad de *FTO* puede ligarse exclusivamente a desordenes metabólicos, también cumple una labor en la tumorigénesis de distintos tipos celulares.

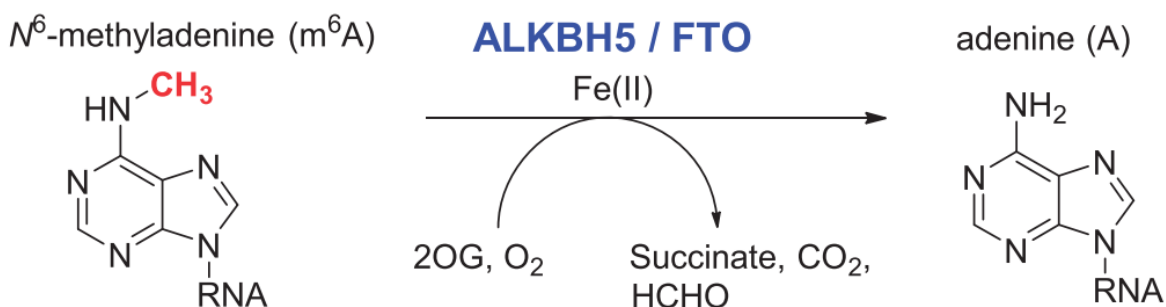


Figura 2. Desmetilación mediada por las enzimas FTO y ALKBH5. Tanto la desmetilasa ALKBH5 como la codificada por *FTO* son capaces de revertir la modificación m6A en el ARN, dependiendo de Fe^{2+} y 2-oxoglutarato para catalizar la reacción (23).

II.II.III. Acetilación en histonas

Las histonas no se escapan de las modificaciones postraduccionales que pueden llegar a experimentar muchas proteínas y estos cambios son determinantes al permitir o impedir el acceso de la maquinaria de transcripción al ADN según sea el caso (15). El nucleosoma, la unidad básica de la cromatina, se encuentra formado por un octámero de histonas (dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) que a su vez incorpora una histona de mas (H1) para facilitar el ensamblado de seis nucleosomas (solenioide) y de este modo es que la cromatina adquiere un grado de compactación elevado (24). La acetilación, catalizada por las histona acetiltransferasas (HATs) y revertida por las histona desacetilasas (HDACs), ocurre en los residuos de lisina de las histonas cuando la activación transcripcional tiene lugar, relajando la cromatina para dar paso a las proteínas de reconocimiento de regiones promotoras en ADN y el resto de la maquinaria enzimática (25). En cambio, la desacetilación en las histonas provoca que las mismas sean metiladas con el fin de reclutar metiltransferasas y eventualmente metilar las zonas expuestas del ADN para iniciar el silenciamiento génico (26).

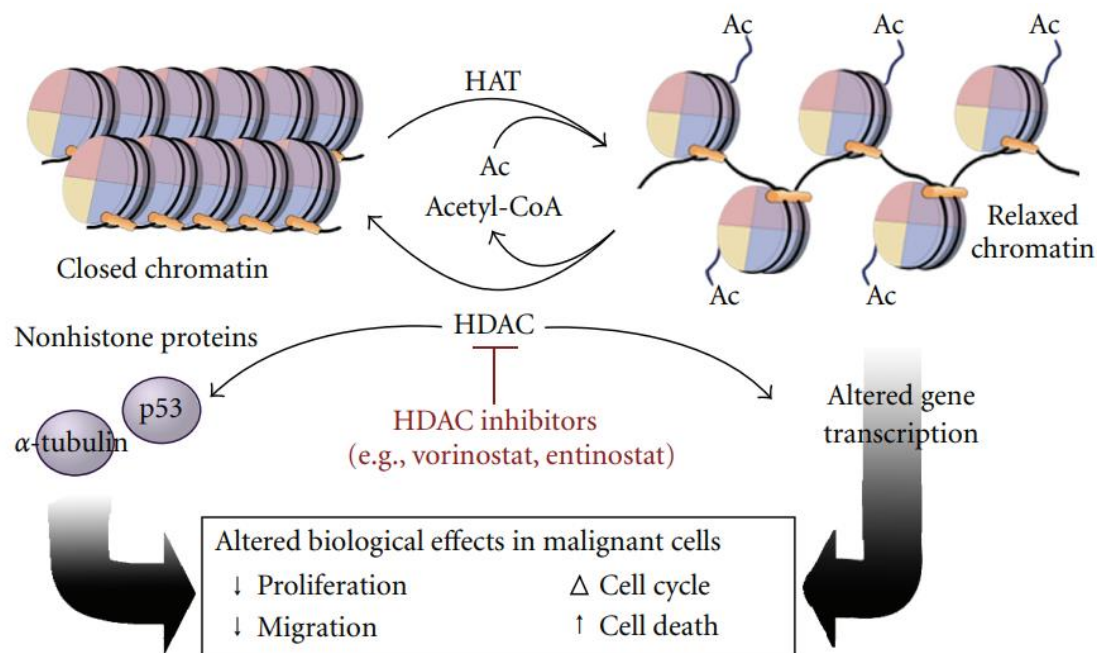


Figura 3. Acetilación como modificación postraduccional en histonas. La acetilación en histonas desempeña una labor importante en la relajación y compactación de la cromatina, repercutiendo en la transcripción selectiva de genes e incluso en el fenotipo de una célula tumoral (27).

II.II.IV. Papel del gen *HDAC2* en el acetiloma de la célula

El gen *HDAC2* codifica para la histona desacetilasa HDAC2 que pertenece a la familia I (expresada en la mayoría de los tejidos) de las HDACs, enzimas que se encargan de remover el grupo acetilo de los residuos de lisina en el extremo N-terminal de las histonas que componen el nucleosoma (28). HDAC2 tiene la capacidad de desacetilar otras proteínas además de las histonas, como el receptor de glucocorticoides cuando se habla de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (29).

Se ha descrito que la baja expresión de esta desacetilasa acarrea efectos como la disminución de la hipertrofia cardíaca y la mitigación de los síntomas cognitivos y motores de la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson (30,31), hechos que enfatizan el alcance de *HDAC2* en el desarrollo enfermedades neurodegenerativas. A decir verdad, alteraciones en la expresión de *HDAC2* pueden aumentar o

disminuir la progresión del carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de colon, y por supuesto, del cáncer de mama (32).

II.III. Línea celular MCF-7

II.III.I. Origen

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se derivó a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente femenina de 69 años de edad que padecía cáncer de mama metastásico (33). El establecimiento de la línea celular fue llevado a cabo por el Dr. Herbert D. Soule y sus colegas en la entonces Fundación del Cáncer de Michigan (MCF, por sus siglas en inglés), de ahí el nombre que se le designó (34).

II.III.II. Características moleculares

Las células MCF-7 pertenecen al subtipo molecular luminal A y son positivas para RE (especialmente el RE α) y RP, además de contar con receptores para andrógenos y glucocorticoides (35). El crecimiento de estas células no solo depende de la disponibilidad de estrógenos, sino que también se ve influenciado por receptores de factores de crecimiento asociados a la membrana plasmática como el HER2 y el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), ambos presentes en la estructura celular (36).

Cabe mencionar que la escasa angiogénesis parece limitar el crecimiento de tumores de células MCF-7, puesto que expresan en muy bajos niveles los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), a pesar de contar con los 4 tipos (A, B, C y D) más los receptores VEGF-R1 y VEGF-R2 (37). Las características propias de epitelio diferenciado que poseen las células MCF-7 están relacionadas tanto con la presencia de β -catenina y E-caderina como con la ausencia de vimentina y fibronectina (38).

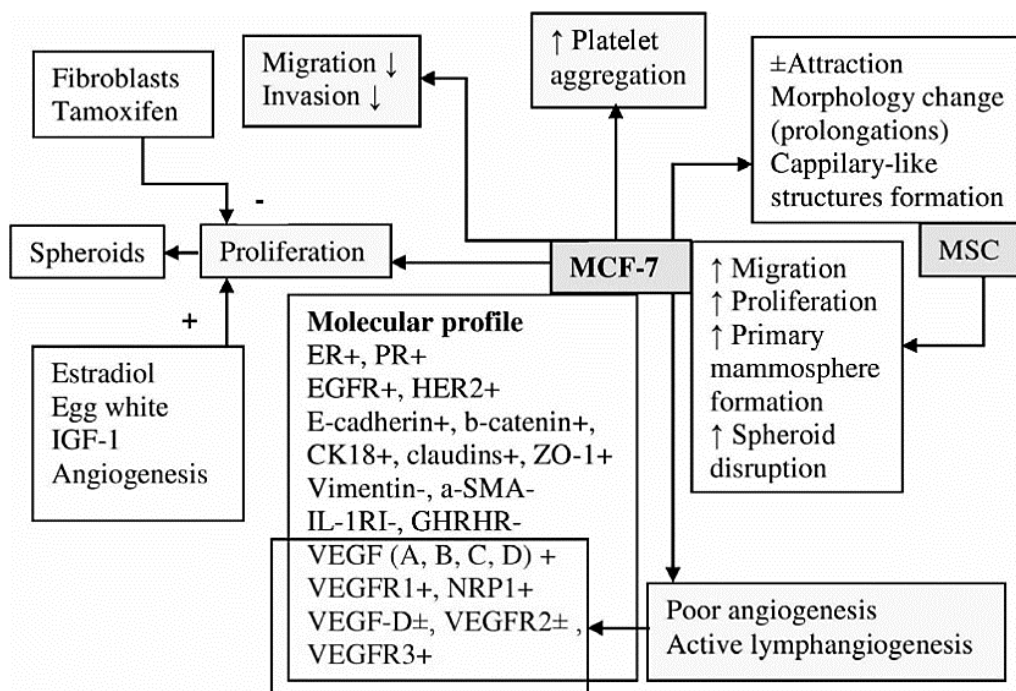


Figura 4. Perfil molecular de la línea celular MCF-7. Se enlistan algunos de los factores de crecimiento y moléculas que interceden en las propiedades tumorales de las células MCF-7, resaltando la interacción que pueden tener con las células madre mesenquimales (MSC) (36).

II.III.III. Aplicaciones en biomedicina

El hecho de que las células MCF-7 sean positivas a todos los biomarcadores que se mencionaron con anterioridad hace que esta línea celular sea una herramienta viable en experimentaciones *in vitro*, siendo el RE el marcador más estudiado (33). Asimismo, tienen la capacidad de generar subpoblaciones con genotipos variados, atributo que se aprovecha para crear variantes de células MCF-7 resistentes a fármacos empleados en quimioterapia o en terapia hormonal, principalmente aquellos dirigidos al RE (39).

II.IV. *Kalanchoe pinnata*

II.IV.I. Distribución geográfica

El género *Kalanchoe*, perteneciente a la familia *Crassulaceae*, comprende alrededor de 1500 especies con una distribución predominantemente en los trópicos de la África continental y Madagascar, de donde originariamente proviene. (40). Aun así,

los climas templados y cálidos le han sido favorables a este género de plantas para extenderse por una gran parte del globo terrestre, introduciéndose en un principio por el sureste de Florida (EU), las Bermudas, las Bahamas y eventualmente en la América tropical (41). Para el caso de *Kalanchoe pinnata*, actualmente se le considera una especie exótica invasora en muchos países incluyendo a México, siendo los bosques tropicales caducifolios y perennifolios además de los bosques mesófilos de montaña su principal hábitat (42).



Figura 5. *Kalanchoe pinnata* (Imagen propia).

II.IV.II. Propiedades y usos cotidianos

La historia de *K. pinnata* en la etnobotánica de muchas culturas ha permanecido vigente mediante los remedios medicinales que se derivan de las propiedades de esta suculenta. Uno de los usos más comunes que tiene esta planta es como agente tópico para tratar quemaduras, dermatitis, abscesos y picaduras de insectos, aunque sus aplicaciones pueden ir más allá al emplearse como antidiarreico, antivomitivo, analgésico, diurético e inclusive como antimicrobiano para mitigar infecciones sistémicas (43). Se ha demostrado que el alcance terapéutico que llega a tener *K. pinnata* se evidencia también en su capacidad para atender los cálculos renales, las úlceras gástricas, la diabetes y el cáncer (44).

En México, esta suculenta también se le conoce por “siempreviva” y dada su distribución en el territorio por la variedad de climas en el mismo, recibe un uso



Figura 6. Estados de México donde se hace uso de *K. pinnata* como planta medicinal. Michoacán, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Chiapas, Tabasco y Yucatán son los estados de la Republica en los que se tiene evidencia de la actividad etnobotánica de *K. pinnata* (42).

medicinal en estados del sur y centro del país, principalmente. Michoacán, Puebla, Veracruz y Oaxaca son algunos de los estados en los que se prepara *K. pinnata* en diferentes presentaciones para aliviar dolencias, como en infusiones, emplastos, macerados o bien con otras decocciones para su ingesta (42).

II.IV.III. Tamizaje e investigación farmacológica

Existe una amplia variedad de estudios que denotan la cantidad de fitoquímicos que es posible identificar en los extractos metanólicos, etanólicos y acuosos procesados a partir de fracciones de *K. pinnata*, y dentro de los cuales encontramos flavonoides (quercitina), ácidos fenólicos (ácido gálico), bufadienólidos, terpenos, alcaloides, cardienólidos, entre otros compuestos de interés (45,46). El hecho de que *K. pinnata* sea rica en minerales y microelementos como zinc, hierro, sodio, fosforo, potasio y calcio, al igual que en vitaminas como ácido ascórbico, fosfoenolpiruvato, fiboblavino, tiamina, entre otras, llama la atención de la comunidad científica para hacer de esta planta una alternativa viable en el tratamiento de enfermedades (47).

Las investigaciones más recientes en torno a *K. pinnata* se enfocan en escudriñar el impacto de sus fitoquímicos. Se sabe que tanto los flavonoides como los ácidos

fenólicos, al ser metabolitos secundarios, cumplen con la actividad antioxidante de la planta al captar radicales libres en procesos de oxidación celular, por lo que su valor terapéutico es de ser reconocido (48). En el caso de los bufadienólidos, sus efectos se demuestran con la inhibición de la activación de virus como el de Epstein-Barr y el VPH, por lo que es importante mencionar que su actividad antiviral es un rasgo más que añadir a la lista (44).

III. ANTECEDENTES

III.I. Efecto antitumoral de *K. pinnata*

Aunque los efectos biológicos de los extractos elaborados a partir de *Kalanchoe blossfeldiana* se encuentran ligeramente más acentuados que los de *K. pinnata* (49), no significa que los fitoquímicos de esta última y de otras especies no puedan ser aprovechados como agentes adyuvantes. Después de todo, hoy en día es posible hallar una gama heterogénea de investigaciones que revelan la acción antitumoral de esta suculenta en diferentes modelos experimentales.

Se ha reportado que los extractos sintetizados a partir de las hojas de *K. pinnata* han probado ser efectivos agentes citotóxicos en distintas líneas celulares de cáncer. De acuerdo a Bogucka-Kocka et al. (50) las fracciones de esta planta pueden inducir una apoptosis que depende de la dosis de extracto aplicado en la línea celular H9 (linfocitos T humanos normales) y J45.01 (leucemia linfoblástica aguda de células T humana), contando con una CI_{50} muy baja en comparación con la de otras especies como *K. daigremontiana*, *K. milloti* y *K. nyikae*. Por otra parte, Afzal et al. (51) describieron en roedores que el extracto acuoso de *K. pinnata* también se ha mostrado provechoso al revertir los niveles de triglicéridos y colesterol a sus valores normales durante una hepatocarcinogénesis inducida por la N-dimetilnitrosamina, un poderoso carcinógeno que se encuentra en el ambiente, demostrando así que las condiciones hiperlipidémicas causadas por la exposición a este compuesto son corregidas por la acción antioxidante de la suculenta.

Lo anterior fundamenta cada vez más la hipótesis de que la actividad antitumoral de *K. pinnata* está fuertemente vinculada con la captación de radicales libres oxidativos y del aumento de la actividad antioxidante, sin embargo, también es oportuno mencionar sus efectos en oncovirus y la detención del progreso tumoral. Como bien se mencionó en el apartado anterior, los componentes bioactivos de *K. pinnata*, especialmente los bufadienólidos, son capaces de reducir la viabilidad de partículas virales oncogénicas, conclusión que se ve respaldada por los mecanismos inhibitorios que desencadenan estas moléculas sobre el factor de transcripción AP1

en la línea celular de cáncer cervical humano HeLa positiva a VPH18, proteína esencial para la expresión de oncogenes en estas células tumorales (52). De la misma forma ocurre con el virus de Epstein-Barr, pues se comprobó que moléculas como la briofilina A y otros bufadienólidos aislados de *K. pinnata* pueden mantener la viabilidad hasta un 100% de la línea celular Raji dada la activación del virus (53).

III.II. Participación del gen *FTO* en el metiloma del cáncer de mama

Hoy en día está más que constatado que la obesidad y el sobrepeso vistos como trastornos alimentarios pueden fungir como uno de muchos factores de riesgo para el desarrollo de neoplasias (54), de modo que es fácil inferir que los genes involucrados en el mantenimiento del peso corporal, como *FTO*, deben ser responsables de favorecer el desarrollo tumoral. Según Liu et al. (55) los niveles de ARNm de *FTO* son notablemente altos en las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231 comparados con los de las células de mama HCC1937, indicando que la sobreexpresión del gen lo convierte en un importante biomarcador en este tipo de tumores. En sí, los subtipos de cáncer de mama positivos para HER-2 (MDA-MB-453 y SKBR3) poseen elevados niveles de *FTO* por encima de líneas celulares como T47D, BT474 y BT549, incluidas MCF-7 y MDA-MB-231 (56).

Los mecanismos moleculares que caracterizan a *FTO* como un oncogén en el cáncer de mama yacen en el aumento del metabolismo energético en estas células, puesto que se estimula la vía de señalización PI3K/AKT además de que la glicólisis se ve favorecida al incrementar la actividad de las enzimas piruvato cinasa y hexocinasa, eventos que llevan a la alza la producción de ATP y consecuentemente la viabilidad del tumor (55). La sobreexpresión de *FTO* también participa en la suspensión de la apoptosis gracias a la inhibición de la BNIP3, una proteína proapoptótica que pertenece a la familia Bcl-2 (57). Estos descubrimientos proponen que *FTO* desempeña una función crucial en el rendimiento energético y el crecimiento celular en el cáncer de mama, lo que hace de este gen un potencial blanco terapéutico.

III.II.III. Participación del gen *HDAC2* en el acetiloma del cáncer de mama

Al igual que en *FTO*, los niveles de expresión de *HDAC2* pueden alterar las condiciones de una célula sana para que adquiriera un fenotipo tumorigénico, y en el cáncer de mama no es la excepción. Es sabido que en pacientes con la enfermedad poseen una mayor expresión de *HDAC2* y que esto se correlaciona con el grado histológico del tumor y la estadificación del cáncer, siendo el de peor pronóstico el más asociado (58). Lo anterior se fundamenta con la investigación de Xu et al. (59) en tumores de cáncer de mama triple negativo, pues se reportó que el knockdown de *HDAC2* en modelos *in vivo* ralentiza el crecimiento celular y la metástasis e incluso reduce la producción del ligando 1 de muerte programada (PD-L1), una proteína de control que se encuentra en la superficie de las células tumorales y que permite la evasión de la respuesta inmune.

Un dato que tomar en cuenta es el que nos proporciona un estudio encabezado por Kamarulzaman et al. (60) en el que se disminuye la expresión de *HDAC2* y del represor transcripcional REST por acción de un antifúngico llamado tricostatina A (TSA), acción que conlleva a que la línea celular MCF-7 adopte un fenotipo más agresivo. Esto se debe a la actividad de esta histona desacetilasa al ejercer un control en la inserción de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.5 y nNav1.5 en la membrana de las células MCF-7, argumentando así que su regulación a la baja se traduce en una alta tumorigénesis. Los hallazgos descritos sugieren que las funciones de *HDAC2* se ven condicionadas por las de otras enzimas o factores de transcripción encontrados en líneas celulares diferentes.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas se ha presenciado un aumento en las tasas epidemiológicas de enfermedades con pobre pronóstico sobre todo en países en vías de desarrollo con poblaciones más vulnerables que otras, perjudicando los sectores de salud pública hasta significar una crisis sanitaria y económica. El cáncer destaca en esta lista por ser un claro ejemplo de este fenómeno, posicionándose como uno de los padecimientos con índices de mortalidad alarmantemente elevados a nivel global.

Dentro de la variedad de tumores malignos más comunes que afectan a la población femenina del mundo, el cáncer de mama se encuentra en primer lugar. La magnitud de la situación se ve acentuada con el transcurso del tiempo pese al avance científico en la medicina moderna. Esto tiene fundamento en reportes del año 2012, los cuales manifiestan que durante ese año fueron registrados 1.67 millones de casos nuevos, que así mismo figuraron como el 25% de todos los casos de cáncer (61). En el año 2020, hubo 2.3 millones de mujeres diagnosticadas con la enfermedad, además de 685,000 muertes contabilizadas globalmente (62). Estos datos hacen de esta patología una emergencia de salud en la mayoría de los países, sin distinguir nivel socioeconómico.

La búsqueda de novedades terapéuticas por parte de la comunidad científica ha abierto una brecha que desde las últimas décadas dio acceso a un amplio catálogo de alternativas para el tratamiento de enfermedades cuyas mortalidades son signo de alarma en la población mundial, sin embargo, no ha sido suficiente para aminorar el número de decesos que cada año se registran a causa del cáncer de mama. La tarea incluso se vio eclipsada por los recientes acontecimientos en relación a la pandemia por COVID-19 y los esfuerzos por erradicar el virus que la provocó. Lo mencionado exige el desarrollo de propuestas sanitarias innovadoras e investigaciones en torno a la prevención de futuras catástrofes, sin descuidar a la oncología a fin de reducir costos tanto materiales como humanos.

V. OBJETIVOS

V.I. Objetivo general

Analizar la actividad biológica del extracto acuoso de *K. pinnata* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

V.II. Objetivos particulares

- Medir la migración celular mediante un ensayo de cicatrización de herida en células MCF-7 al ser tratadas con extracto acuoso de *K. pinnata*.
- Determinar la viabilidad de células MCF-7 a través de un ensayo de MTT al exponerlas a diferentes concentraciones de extracto acuoso de *K. pinnata*
- Cuantificar la expresión de los genes *FTO* y *HDAC2* en células MCF-7 después de ser tratadas con extracto acuoso de *K. pinnata*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.I. Recolección de *K. pinnata* y preparación del extracto acuoso

En los primeros días de trabajo sobre el proyecto, las tareas se enfocaron en la búsqueda bibliográfica para la localización de *Kalanchoe pinnata*, una vez localizada se procedió a su recolección, luego de lo cual se hizo la separación y lavado de las hojas para iniciar el proceso de secado. Luego que las hojas estuvieron completamente secas fueron pulverizadas para obtener el extracto acuoso.

La planta fue llevada a un herbario para su identificación.

VI.II. Ensayo de viabilidad celular

El primer ensayo en llevar a cabo fue el de viabilidad celular y consistió en cultivar células MCF-7 en 24 pozos de una microplaca de 96 pozos. Se optó por esa cantidad de pozos con el fin de aplicar extracto acuoso de *K. pinnata* en 8 concentraciones diferentes y así contar con un triplicado de pocillos por cada

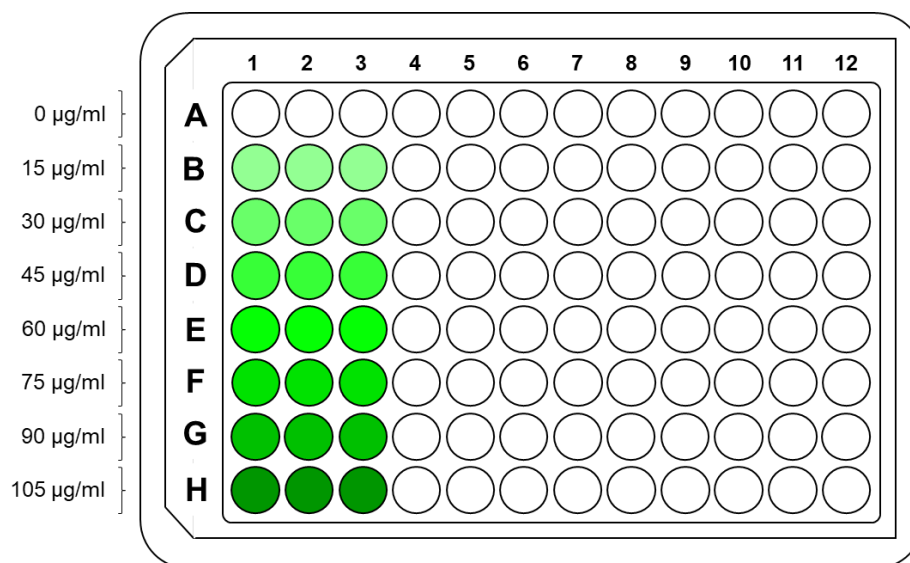


Figura 7. Las concentraciones de extracto con su correspondiente triplicado de pozos se ordenaron de menor a mayor (arriba hacia abajo) para evitar equivocaciones a la hora de pipetear el contenido.

concentración de extracto. La diferencia entre las concentraciones fue de 15 unidades para mantener un buen margen de obtención del CC_{50} y se ordenaron como se ilustra en la figura 7.

Se hicieron los cálculos necesarios para obtener el volumen requerido de la solución stock de extracto que se usaría en la preparación de las 7 concentraciones, teniendo presente la capacidad de un pozo (200 μ l) y un volumen adicional por el error de pipeteo. Del mismo modo, se cuantificó una alícuota de células MCF-7 mediante una cámara de Neubauer a fin de conocer el volumen que se dispondría de una solución concentrada de células para aislar 240,000 de estas y distribuir 10,000 en cada pozo de los 24 ya establecidos para el procedimiento.

Luego de haber sembrado las células satisfactoriamente en medio DMEM suplementado con SBF 5%, se prosiguió con la aplicación del tratamiento en sus diferentes concentraciones, incorporando una nueva alícuota del medio suplementado junto con el volumen de extracto preciso para cada triplicado de pocillos. El cambio de medio se realizó cada 24 h durante 3 días.

En el cuarto día, se preparó una la solución de 0.5 mg/ml de MTT que posteriormente se agregó a los 24 pozos (100 μ l por pocillo) después de haberles retirado el medio. La microplaca se dejó incubando durante 3 horas y media. Tras finalizar el tiempo de incubación, se descartó el contenido de los pozos y se pipetearon 100 μ l por pocillo de una solución de isopropanol al 0.01N de HCl, procurando que los cristales de formazán producidos tras la incubación con el MTT se disolvieran en su mayoría. Se creó un noveno triplicado que contuviera únicamente la solución de isopropanol y HCl para considerar la absorbancia que pudiera arrojar como control negativo. Luego de solubilizar los cristales, la microplaca se introdujo en el espectrofotómetro para analizar las absorbancias que tenía cada triplicado a 590 nm. Los datos se almacenaron en una memoria USB.

VI.III. Ensayo de migración celular

Para el ensayo de migración se cultivaron células MCF-7 en dos placas de 6 pozos con medio DMEM suplementado con SBF al 5% (1.5 ml por pozo). Cuando se

alcanzó una confluencia adecuada se estableció una de las placas como el grupo control y la otra como el grupo experimental en el que se aplicaría la CC_{50} de extracto ya calculada a partir de los datos que midió la espectrofotometría del ensayo anterior.

En los 3 pozos superiores de ambas placas se definieron manualmente las heridas en forma de “#” con ayuda de una punta para pipeta de 200 μ l y una regla para mantener estable la dirección de la punta. El diseño de las heridas se decidió con el propósito de tener más zonas de evidencia de la cicatrización. De esta forma, tanto en el grupo control como en el experimental contaron con pozos con herida y otros intactos, como se muestra en la figura 8.

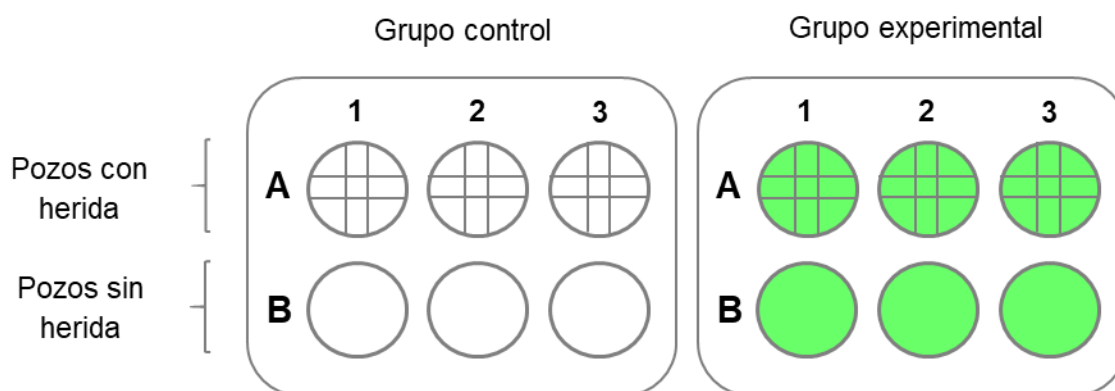


Figura 8. Ubicación de pozos con y sin herida en los grupos control y experimental.

Una vez definidas las heridas, se hizo un enjuague de los pozos con PBS para remover restos celulares que pudieran impedir la visualización de la placa en el microscopio invertido. Inmediatamente se agregó el volumen correspondiente de medio suplementado a los pozos del grupo experimental tomando en cuenta la CC_{50} de extracto, de modo que cada pozo tuviera un volumen final de 1.5 ml. Los pozos del grupo control se cargaron solo de 1.5 ml del mismo medio.

Después de tener ambas placas con sus respectivos volúmenes, se observaron en el microscopio invertido para localizar las zonas con mejor delimitación de las heridas. Se tomaron fotografías de los sitios y las placas fueron colocadas en la incubadora. Cada 24 h se realizó un cambio de medio nuevo y con una nueva

alícuota de extracto en el caso de los pozos del grupo experimental, tomando evidencia fotográfica del proceso de cicatrización en las mismas zonas. El procedimiento se repitió hasta las 72 h.

Las imágenes capturadas durante las 72 h se analizaron con el software ImageJ (Java) (63) a fin de establecer el área de la zona de cicatrización (figura 9). Finalmente, los datos se graficaron para comparar, de ser posible, el cierre gradual de la herida en los grupos control y experimental.

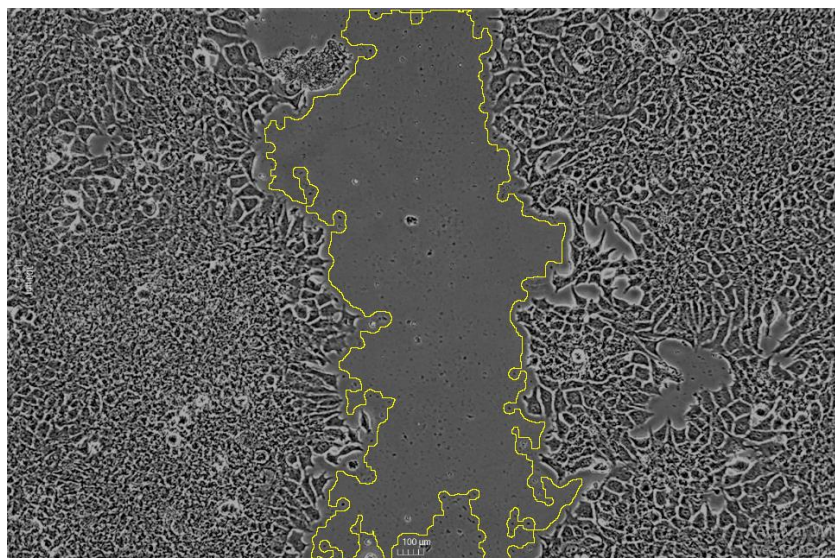


Figura 9. Delimitación de la herida y obtención de su área mediante el software J Image (Java).

VI.IV. Ensayo de expresión génica

El ensayo de expresión génica retomó los grupos control y experimental del ensayo de migración, procediendo con una extracción de ARN de las células de cada uno de los pozos de ambas placas. Se emplearon 500 µl por pozo del reactivo TRIzol (Invitrogen) para despegar las células y el contenido se transfirió a tubos de 1.5 ml, teniendo 12 tubos al final. A partir de este punto se siguió el protocolo de extracción de ARN que proporciona la guía de usuario del reactivo. Cuando se obtuvieron los 12 tubos de ARN eluido en agua libre de ARNasas, se mezcló el contenido que provenía de un mismo triplicado de pozos con células, obteniendo un total de 6 tubos.

Para evaluar la calidad del ARN aislado se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% con las 6 muestras resultantes. Igualmente, se prepararon alícuotas para analizar 1 μ l de las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), incidiendo en datos como la concentración (ng/ μ l) y la relación A260/280.

Tan pronto como se verificó una pureza y concentración óptimas, se realizó la síntesis de ADN complementario a partir de las muestras de ARN utilizando el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) de acuerdo al protocolo del fabricante. Después de obtener el ADN complementario de las 6 muestras, se dio inicio a la cuantificación de la expresión génica relativa mediante una reacción de PCR en tiempo real, empleando una mezcla de 1X SYBR Green, 1 μ l de ADNc y 0.2 μ M de los iniciadores para *FTO* y *HDAC2*. Por cada muestra de ADN complementario se prepararon tres mezclas con iniciador para *FTO* y otras tres para el de *HDAC2*.

Los iniciadores fueron diseñados con la herramienta Primer-BLAST de NCBI y se solicitó su síntesis a la compañía UNIPARTS. La reacción se llevó a cabo en el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems) y se usó *HPRT1* como gen de referencia (gen endógeno).

VII. RESULTADOS

VII.I. Recolección de *K. pinnata* y preparación de extracto acuoso

Gracias a algunos testimonios y a la información recabada en internet, se logró identificar a la planta en cuestión, cerca de las orillas del municipio de Cosautlán de Carvajal, en el estado de Veracruz. Los datos taxonómicos, geográficos y del lugar de recolección fueron recopilados en una ficha técnica, tal y como se ilustra en la figura 10.

Crassulaceae <i>Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.</i> (Stevens et al, 2001) México: Veracruz. Municipio Cosautlán de Carvajal. Localidad Vaquería 19°18'56.5" N, 96°57'28.3" W, 1240 msnm Encontrada a orilla de carretera en suelo rocoso y sembradíos de café, rodeada de bosque bajo tropical perennifolio. Col. A. F. Vargas 12 de diciembre 2021

Figura 10. Ficha técnica del ejemplar de *K. pinnata* recolectado.

Para la identificación taxonómica de la planta, se realizó un montaje con los ejemplares que mejor conservaron las estructuras vegetativas. Para dicha tarea se elaboraron dos prensas con tablas de madera que pudieran ajustarse con tornillos, de tal forma que todos los órganos de la planta se dispusieran ordenadamente y sin sobreponerse (figura 11). Los montajes se trasladaron al Herbario Medicinal del IMSS, ubicado en la CMDX, para la confirmación de la especie.

Una vez confirmada la especie, se dio paso a remover todas las hojas de los ejemplares recolectados para ser lavadas con jabón y posteriormente dejarlas secar



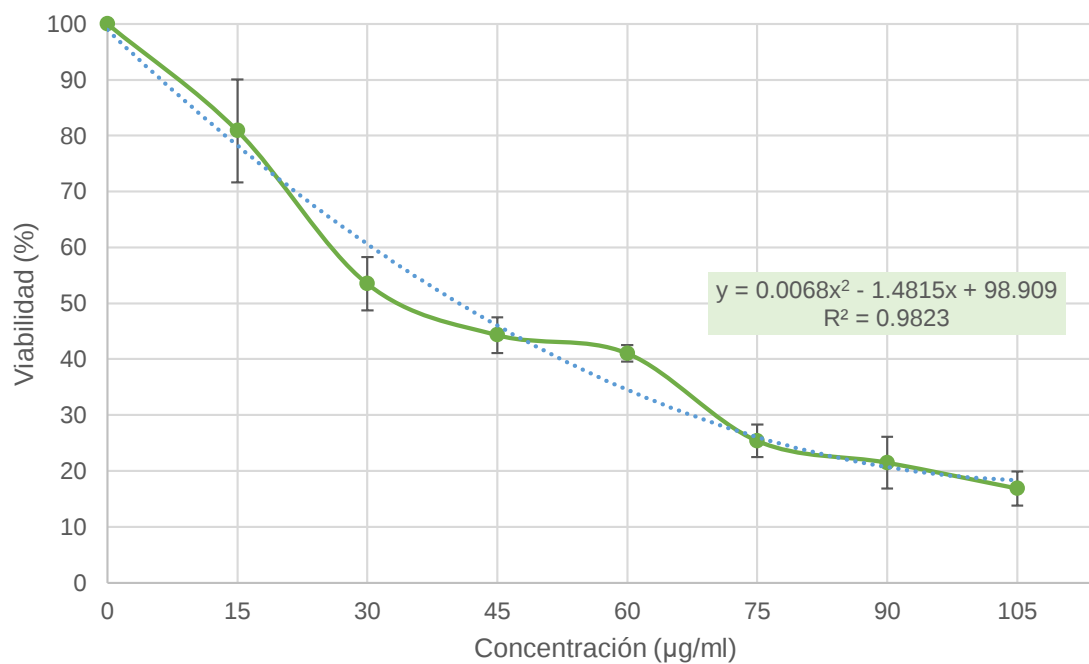
Figura 11. Montaje de *K. pinnata* para su posterior identificación.

a temperatura ambiente a fin de eliminar cualquier resto de agua. Seguido de esto, se indujo el secado completo de las hojas con ayuda de un foco incandescente, hasta que pudieran ser pulverizadas para obtener partículas finas. El procedimiento se llevó a cabo con un mortero y su pistilo para macerar las hojas secas, produciendo 1 g de producto. El sobrante de hojas se almacenó en bolsas de plástico al vacío para evitar su contaminación. El gramo de polvo fino se colocó en una infusión durante 30 minutos con 100 ml de agua destilada hervida, pues la concentración requerida para el extracto es de 10 mg/ml. Pasando este tiempo la mezcla se filtró y esterilizó, finalizando en su conservación a 4°C hasta su uso.

VII.II. Viabilidad celular

Una vez finalizado el experimento para conocer la viabilidad de las células MCF-7 tratadas con el extracto de *K. pinnata* se realizó el análisis estadístico. Los datos de las absorbancias de cada triplicado obtenidos por espectrofotometría fueron promediados y se les restó la media del control negativo, con el fin de obtener valores más precisos. De esta manera, se tomó la absorbancia ajustada del triplicado A como el 100% para calcular el porcentaje del resto de las filas.

Se creó la línea de tendencia polinómica para contar con la ecuación de la misma, como se muestra en la gráfica 1. A partir de esta información se calculó la CC₅₀ se obtuvo un resultado de 40.56 µg/ml.



Gráfica 1. Viabilidad celular en función de la concentración de extracto de *K. pinnata*. El cálculo de la CC₅₀ se obtuvo a partir de la ecuación de la línea de tendencia polinómica que siguen los datos porcentuales de la gráfica.

VII.III. Migración celular

Después de haber cultivado las células hasta alcanzar una confluencia del 70% se realizaron las heridas con una punta de pipeta y se llevó a cabo la captura de las imágenes, tomando como referencia el cierre de la herida en el grupo control. Las fotografías recopiladas durante las 72 h de duración del ensayo fueron comparadas para visualizar la cicatrización de las heridas en ambas placas. En el caso del grupo control, las células MCF-7 se dividieron aceleradamente a tal punto de cerrar la herida casi por completo al término del ensayo, tal como se muestra en la figura 12.

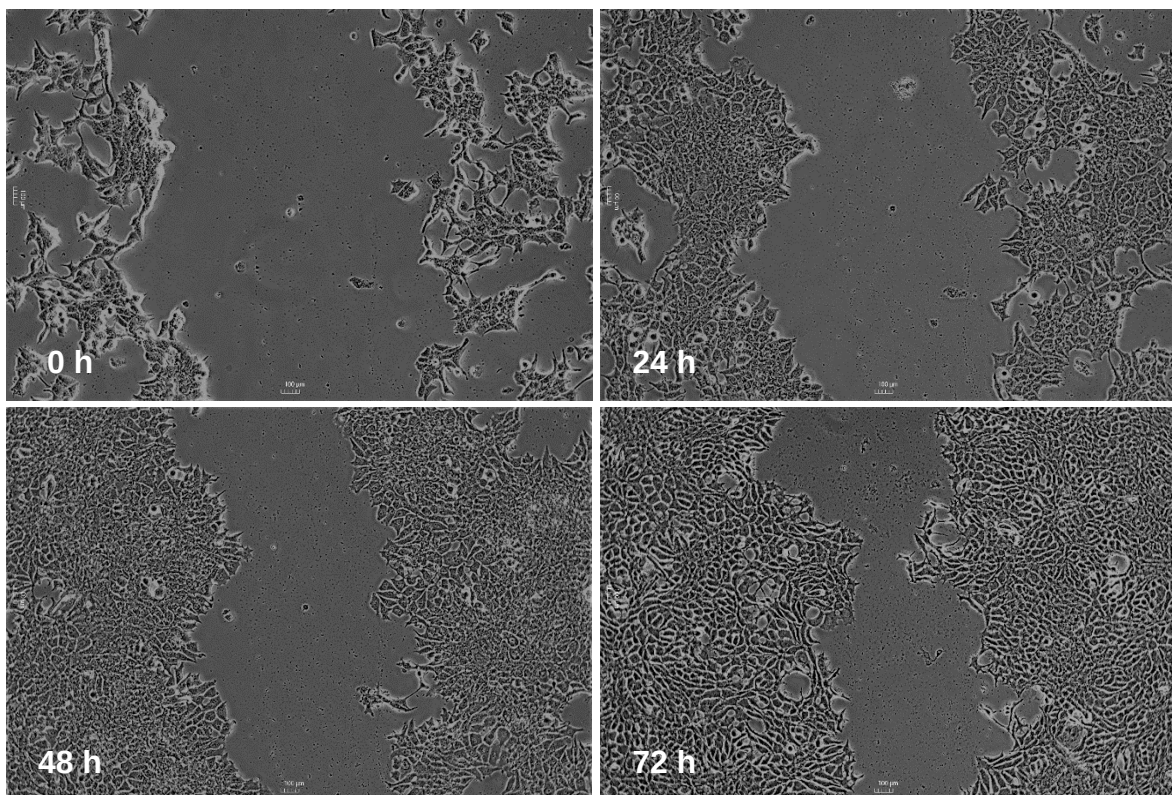


Figura 12. Fotografías de la cicatrización de la herida en el grupo control. El proceso de cicatrización tuvo un progreso rápido y constante, estando ambos extremos de la herida a punto de entrar en contacto.

En cambio, al agregar el extracto de *K. pinnata* en el grupo experimental provocó que las células mantuvieran una tasa de proliferación baja y por consiguiente la cicatrización de la herida se vio interrumpida casi en su totalidad, tal y como se observa en la figura 13. Lo anterior se vio corroborado en la gráfica 2, pues los datos concernientes a las áreas de las heridas en el grupo experimental permanecieron constantes durante las 72 h, mientras que los valores del grupo control descendieron proporcionalmente cada 24 h.

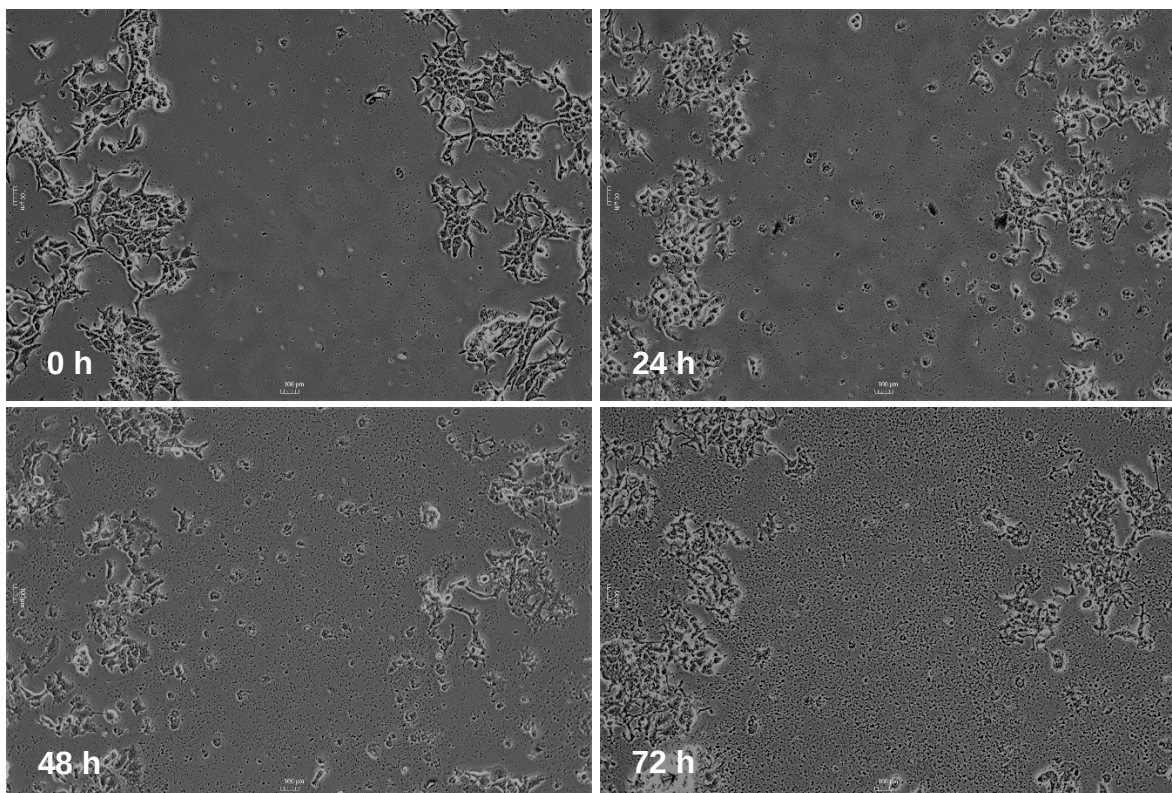
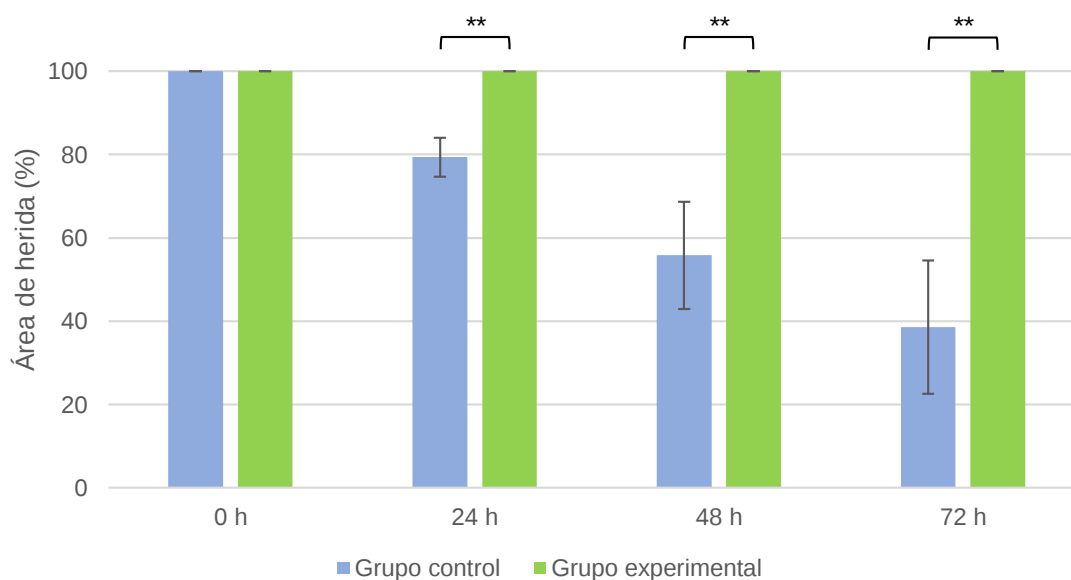


Figura 13. Fotografías de la cicatrización de la herida en el grupo experimental. El extracto de *K. pinnata* impidió la cicatrización de la herida en el grupo experimental, manteniendo constantes las dimensiones de la misma.



Gráfica 2. Cicatrización de heridas en ensayo de migración. La presencia de extracto impidió progreso alguno en la cicatrización de la herida durante las 72 h de duración del ensayo. ** $P < 0.01$

VII.IV. Electroforesis de muestras de ARN en gel de agarosa al 1% y cuantificación por espectrofotometría

Después de llevar a cabo las extracciones de ARN de las células resultantes del ensayo de migración y de haberse corrido en un gel de agarosa al 1%, este último fue observado mediante un transiluminador para evaluar la integridad de las muestras (figura 14). Fue posible distinguir las tres bandas características del ARN en las que se identifican las subunidades 28S, 18S y 5S. El contraste es notorio entre las muestras de los pozos sin extracto y las de aquellos a los que se les aplicó el tratamiento, pues las bandas de las primeras cuentan con mayor intensidad.

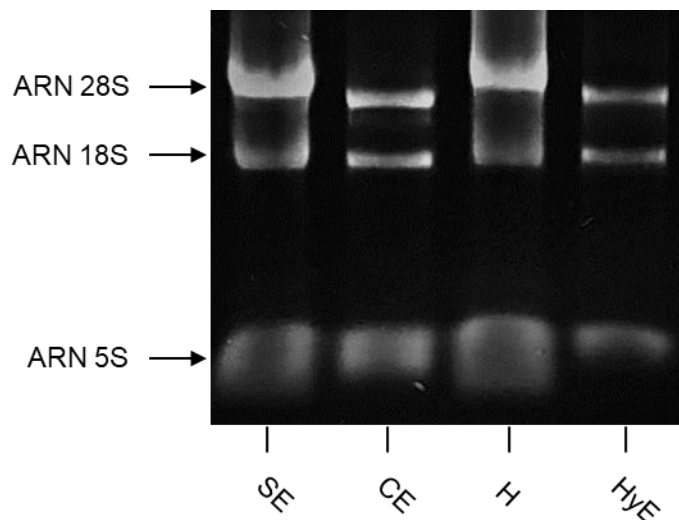


Figura 14. Electroforesis de muestras de ARN de grupos control y experimental. Las bandas de las muestras sin tratamiento de extracto de *K. pinnata* se muestran con mayor intensidad. SE: sin extracto; CE: con extracto; H: herida; HyE: herida y extracto.

La adición de extracto de *K. pinnata* disminuye la concentración del ARN en las muestras. La información recabada por la espectrofotometría refuerza lo anterior planteado al observar que las concentraciones de los ARNs del grupo control se encontraban hasta 10 veces más concentrados que los del grupo tratado con extracto (tabla 1).

Tabla 1. Concentración y relación 260/280 de las muestras de ARN de los grupos control y experimental.

Muestras	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280
Sin extracto (SE)	2555.39	1.99
Con extracto (CE)	281.95	1.89
Herida (H)	2011.49	2.03
Herida y extracto (HyE)	205.83	1.94

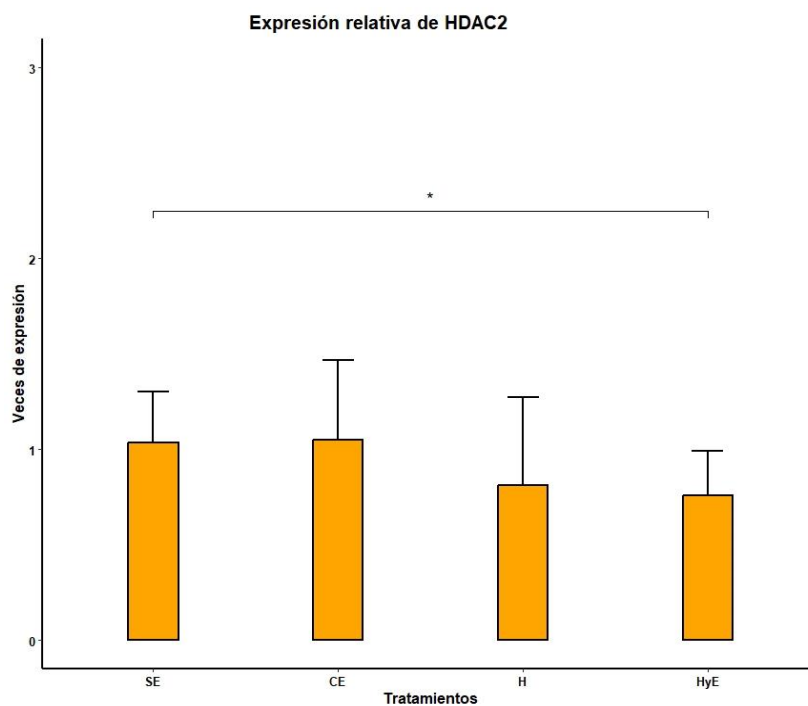
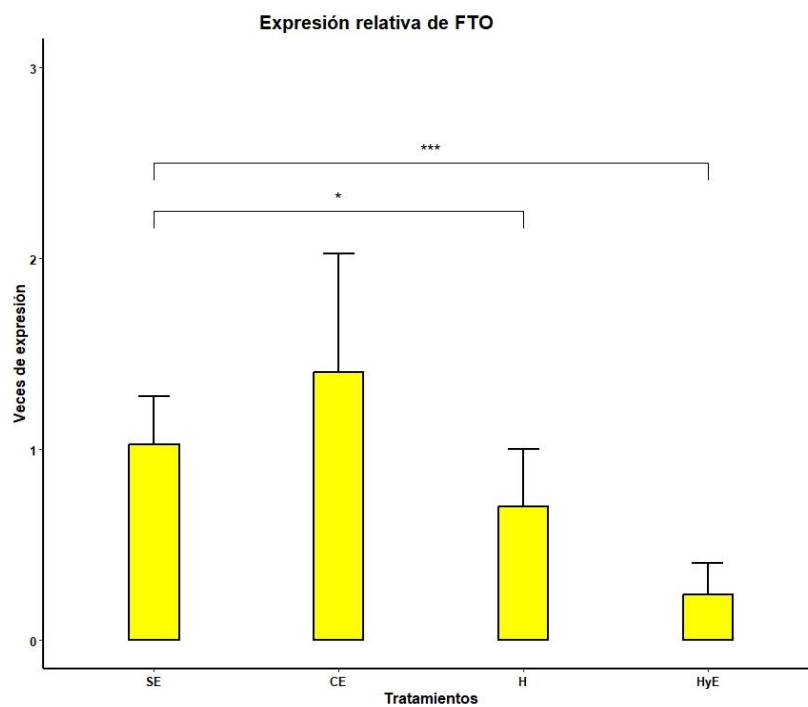
VII.V. Expresión génica

Los iniciadores obtenidos con la herramienta Primer-BLAST de NCBI se describen en la tabla 2. Para *FTO* se obtuvo un fragmento de 132 pb, para *HDAC2* de 185 pb, y para *HPRT1* de 160 pb .

Tabla 2. Iniciadores forward y reverse para *FTO*, *HDAC2* y *HPRT1*.

Gen para el que codifica	Sentido	Secuencia 5'-3'
<i>FTO</i>	Forward	5'-TGG CTC AAC TGG AAG CAC TG-3'
	Reverse	5'-CAG TGA GCG AGG CAA GGA TG-3'
<i>HDAC2</i>	Forward	5'-AGG TCG AAG AAA TGT GGC TG-3'
	Reverse	5'-GTC AAA TTC AGG GGT TGC TG-3'
<i>HPRT1</i>	Forward	5'-GTA ATC CAG CAG GTC AGC AA-3'
	Reverse	5'-TGC TGA GGA TTT GGA AAG GG-3'

Luego de que la reacción de PCR en tiempo real proporcionara los datos necesarios, se procedió a calcular la expresión génica relativa de los genes *FTO* y *HDAC2*. Para esto se empleó el método delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) que utiliza los valores de Ct's procedentes de grupos control y experimental. Los resultados obtenidos en "veces de expresión" (fold changes) se presentan en las gráficas 3 y 4.



Gráficas 3 y 4. Expresión relativa de *FTO* y *HDAC2*. Condiciones como la presencia de herida y la exposición al extracto de *K. pinnata* reducen la expresión de ambos genes. SE: sin extracto; CE: con extracto; H: herida; HyE: herida y extracto. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Los datos graficados prueban que en las células tratadas con extracto la expresión del gen *FTO* se ve más acentuada que en el grupo control; el mismo fenómeno ocurre con el gen *HDAC2*, pero con un cambio mínimo. Sin embargo, la presencia de herida tanto en el grupo control como en el experimental reduce la expresión de ambos genes y más aún cuando se añade el extracto, sobre todo para *FTO*.

VIII. DISCUSIÓN

La familia Crassulaceae comprende cerca de 1,500 especies de las cuales la mayoría cuenta con propiedades medicinales muy diversas y que permanecen vigentes en la herbolaria de muchas culturas (64). El género *Kalanchoe* en particular, engloba un historial etnofarmacológico amplio que actualmente ha cobrado la atención en el campo de la medicina alternativa para integrar los compuestos bioactivos de estas especies en el tratamiento de enfermedades con pronóstico crítico y estadísticas al alza (65). Uno de estos alarmantes padecimientos es el cáncer de mama, pues tan solo en el año 2020 se registraron 2,261,419 casos nuevos, además de 684,996 decesos en el mismo periodo (66), cifras que opacan las de otros tipos de cáncer y que hacen de esta enfermedad una emergencia sanitaria mundial.

La búsqueda de terapias novedosas dirigidas al cáncer de mama ha encaminado numerosas investigaciones en torno a los beneficios de incluir los fitoquímicos de este género de plantas como agentes adyuvantes o neoadyuvantes, por lo que el presente estudio enfocó sus objetivos en describir los efectos potenciales de la especie *Kalanchoe pinnata* para mitigar el fenotipo tumoral de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. A diferencia de las células MDA-MB-231, las MCF-7 adoptan un estado menos agresivo y por lo tanto poseen una capacidad de invasión y de migración inferiores (67), cualidades que fueron consideradas para facilitar el análisis a detalle de las repercusiones del extracto de *K. pinnata*. Otra de las características en las que difieren las dos líneas celulares y que se tomó en cuenta en el estudio es la ausencia de RE en el caso de las células MDA-MB-231, puesto que los resultados obtenidos sobre las células MCF-7 brindan información de interés para los subtipos de cáncer que son positivos a este receptor (35).

Asimismo, el hecho de considerar genes como *FTO* y *HDAC2* para la investigación tiene su importancia en la función que cumplen las enzimas para las que codifican y su relación con el epitranscriptoma de la célula tumoral. Por un lado, la actividad de la desmetilasa codificada por *FTO* permite el mantenimiento del peso corporal al intervenir en la regulación de los niveles de hormonas implicadas en la ingesta de

alimentos, no obstante, su desregulación contribuye al desarrollo de neoplasias como el cáncer de mama (23,55); y, por otro lado, la histona desacetilasa codificada por el gen *HDAC2* cataliza la remoción de grupos acetilo en las histonas y otras proteínas (receptores) cuyas modificaciones postraduccionales determinan el curso de enfermedades crónico degenerativas (30-32), de modo que el cáncer de mama está incluido en la lista.

Tras la exposición a diferentes concentraciones de extracto de *K. pinnata*, la viabilidad de las células MCF-7 se redujo considerablemente conforme ascendía la cantidad de extracto incorporada en el ensayo, demostrando así que existe una fuerte correlación entre la dosis de extracto y el efecto citotóxico sobre las células. Del mismo modo se probó que la migración y la expresión de genes de relevancia oncogénica como *FTO* y *HDAC2*, se ven alteradas notoriamente por la presencia de extracto, dando como resultado una escasa promoción tumoral. De acuerdo a los antecedentes recabados, se conoce que el impacto de los metabolitos presentes en esta suculenta va desde la inhibición de la transducción de señales hasta la inducción de la apoptosis, suprimiendo propiedades como la proliferación, la migración y otros procesos como la invasión y la metástasis (68).

Lo anterior se apoya en los efectos reportados de la quercetina y el kaempferol, flavonoides aislados de *K. pinnata*, que son la detención del ciclo celular en la fase G1 dada la inhibición de la ciclina D1, el gen *p21* y el factor de transcripción Twist (69), y la subexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 al mismo tiempo que la expresión de la proteína proapoptótica BAX (70). Lo último también ocurre con bufadienolidos como la cinobufagina (71), siendo la regulación BAX/Bcl-2 uno de los principales blancos para desencadenar la apoptosis por parte de los fitoquímicos hallados en el tamizaje de esta suculenta.

En cuanto a los ácidos fenólicos encontrados en *K. pinnata*, como el ácido gálico y el ácido cafeico, es sabido que ambos inducen la apoptosis de las células MCF-7 al acentuar la expresión de genes clave como *p53*, *p21* y *Mcl-1* (72). Como caso aislado, el ácido gálico estimula la vía de señalización Fas/FasL para promover la actividad de la caspasa 8, además de aumentar la producción de BAX y de liberar

el citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol (73). Consecuentemente, estos eventos presiden la fase apoptótica en esta línea celular.

La cicatrización de las heridas por parte de las células MCF-7 se vio afectada por la presencia del tratamiento con extracto a medida que transcurrían las horas. Esto puede tener un fundamento en la acción de la quercetina al disminuir los niveles de MUC1, glicoproteína transmembrana que se une a la β -catenina y a los miembros de la familia del EGFR; y de CXRC4, un receptor de alfa-quimiocinas, resultando en una reducción de la capacidad migratoria de las células tumorales de mama, así como en la disminución de la invasión y la metástasis (74). Por otra parte, el kaempferol igualmente obstaculiza la migración celular al inhibir la vía de señalización PI3K/mTOR/MMP, ya que se limita la actividad de proteínas como MMP-2, MMP-9, PI3K, Akt, mTOR y S6K, las cuales están involucradas en este proceso (75).

Los datos arrojados por el ensayo de expresión génica evidenciaron la regulación que ejerce el extracto sobre los niveles de *FTO* y *HDAC2* en las células MCF-7, reduciendo su expresión para ambos casos. Tan solo la quercetina y el kaempferol han probado ser agentes antiobesidad al inducir un efecto inhibitorio en *FTO* y también al reducir la actividad de la lipasa pancreática y la absorción de grasa (76). De hecho, la quercetina administrada junto con otros fármacos como el orlistat muestra una fuerte influencia en la inhibición de *FTO*, incluso interrumpe procesos como la lipogénesis y la adipogénesis una vez que bloquea el receptor de insulina y la expresión del factor de transcripción ligado a la adipogénesis (77).

La baja expresión de *HDAC2* que se observó en los resultados tiene lugar dada la actividad de compuestos derivados del ácido cinámico (ácidos cafeico y p-cumárico) que actúan como inhibidores de esta histona desacetilasa, lo que a su vez aumenta la expresión de otros genes como p21 para inducir la apoptosis como se mencionó anteriormente (78). El kaempferol juega un papel igual de importante en la acetilación de histonas, ya que su presencia en diferentes líneas celulares produce hiperacetilación en estas proteínas, apuntando a un efecto inhibitorio dirigido a *HDAC2* que no depende de genes supresores como p53 (79).

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la actividad antitumoral de los compuestos bioactivos de *K. pinnata* sobre las células MCF-7, manifestándose en una reducción considerable de la viabilidad de las mismas, la detención total de su capacidad migratoria y la disminución de los niveles de expresión de oncogenes como *FTO* y *HDAC2*. Se identificaron los mecanismos de acción de los fitoquímicos de *K. pinnata* y sus efectos en el cáncer de mama a nivel molecular, distinguiendo la función de las vías de señalización implicadas como PI3K/AKT/mTOR y de las proteínas proapoptóticas y de migración como BAX y CXCR4, al igual que los cambios de metilación y acetilación que explican la depleción de ambos genes.

Existen interrogantes que deben ser investigadas más a profundidad respecto al efecto inhibitorio en *FTO* y *HDAC2* que tiene por causa el estrés mecánico ocasionado por la presencia de herida y extracto en el ensayo de migración, puesto que, en vez de inducir un proceso compensatorio para asegurar la viabilidad y migración de las células, se observó el resultado opuesto.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Angahar LT. An overview of breast cancer epidemiology, risk factors, pathophysiology, and cancer risks reduction. *MOJ Biol Med*. 2017; 1(4):92-96.
2. Palmero J, Lassard J, Juárez LA, Medina CA. Cáncer de mama: una visión general. *Acta Médica Grupo Ángeles*. 2021; 19(3):354-360.
3. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2019; 11:151-164.
4. Arzanova E, Mayrovitz HN. The epidemiology of breast cancer. En: H. N. Mayrovitz, editor. *Brisbane: Exon Publications*; 2022. p. 1-19.
5. Arceo-Martínez MT, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, Palomera-Sánchez Z. Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2021; 20(3):101-110.
6. Horvath E. Molecular subtypes of breast cancer – What breast imaging radiologists need to know. *Rev Chil Radiol*. 2021; 27(1):17-26.
7. Alcaide LM, Rodríguez CJ, de Reyes S, Gallart T, Sánchez MT, García J, Torné P. Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. *Cirugía Andaluza*. 2021; 32(2):155-159.
8. Nascimento RG, Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know. *Mastology*. 2020; 30:e20200024.
9. Lukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanislawek A. Breast cancer – Epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies – An updated review. *Cancers*. 2021; 13(17):4287.
10. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Sauer AG, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019; 69(6):438-451.

11. Mutebi M, Anderson BO, Duggan C, Adebamowo C, Argawal G, Ali Z, et al. Breast cancer treatment: a phased approach to implementation. *Cancer*. 2020; 126 Suppl 10:2365-2378.
12. Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of breast cancer therapy. *PET Clin*. 2018; 13(3): 339-354.
13. Efird JT, Jindal C, Biswas T. On the frontiers of breast cancer diagnosis and treatment: current and future directions in a rapidly changing field. *Medicina*. 2022; 58(8): 1026.
14. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *JAMA*. 2019; 321(3):288-300.
15. Cavagnari BM. Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Arch Argent Pediatr*. 2012; 110(2):132-136.
16. Delgado-Calle J, Riancho JA. Papel de la metilación del ADN en la regulación de la osteoclastogénesis. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2012; 4(2):77-81.
17. Traube FR, Carell T. The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation. *RNA Biology*. 2017; 14(9):1099-1107.
18. Zhou Y, Kong Y, Fan W, Tao T, Xiao Q, Li N, Zhu X. Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 131:110731.
19. Yoon K, Vissers C, Ming G, Song H. Epigenetics and epitranscriptomics in temporal patterning of cortical neural progenitor competence. *J Cell Biol*. 2018; 217(6):1901-1914.
20. Yue Y, Liu J, He C. RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev*. 2015; 29:1343-1355.
21. Czogala W, Strojny W, Schab M, Grabowska A, Miklusiak K, Kowalczyk W, et al. *FTO* and *PLAG1* genes expression and *FTO* methylation predict changes in

- circulation levels of adipokines and gastrointestinal peptides in children. *Nutrients*. 2021; 13(10):3585.
22. Patel P, Selvaraju V, Babu JR, Wang X, Geetha T. Racial disparities in methylation of NRF1, *FTO*, and LEPR gene in childhood obesity. *Genes*. 2022; 13(11):2030.
 23. Aik W, Scotti J, Choi H, Gong L, Demetriades M, Schofield CJ, McDonough MA. Structure of human RNA N6-methyladenine demethylase ALKBH5 provides insights into its mechanisms of nucleic acid recognition and demethylation. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(7):4741-4754.
 24. Delgado-Coello, BA. ¿Qué es la epigenética?. *Ciencia*. 2011; 62(1):73-82.
 25. Gujral P, Mahajan V, Lissman A, Ponnampalam A. Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020; 18(1):84.
 26. El-Osta A, Wolffe AP. DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expr*. 2000; 9(1-2):63-75.
 27. Rodd AL, Ververis K, Karagiannis TC. Current and emerging therapeutics for cutaneous T-cell lymphoma: histone deacetylase inhibitors. *Lymphoma*. 2012; 2012(2). <https://doi.org/10.1155/2012/290685>
 28. Luo Y, Jian W, Stavreva D, Fu X, Hager G, Bungert J, et al. Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation. *J Biol Chem*. 2009; 284(50):34901-34910.
 29. Eom GH, Nam YS, Oh JG, Choe N, Min H, Yoo E, et al. Regulation of acetylation of histone deacetylase 2 by p300/CBP-associated factor/histone deacetylase 5 in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2014; 114(7):1133-1143.

30. Gonzalez-Zuñiga M, Contreras PS, Estrada LD, Chamorro D, Villagra A, Zalungo S, et al. c-Abl stabilizes *HDAC2* levels by tyrosine phosphorylation repressing neuronal gene expression in Alzheimer's disease. *Mol Cell*. 2014; 56(1):163-173.
31. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, et al. Histone deacetylase 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev*. 2007; 21(14):1790-1802.
32. Gediya, P, Parikh PK, Vyas VK, Ghate MD. Histone deacetylase 2: a potential therapeutic target for cancer and neurodegenerative disorders. *Eur J Med Chem*. 2021; 216:113332.
33. Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*. 1975; 26(6):785-795.
34. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*. 1997; 57(15):3071-3078.
35. Liao XH, Lu DL, Wang N, Liu LY, Wang Y, Li YQ, et al. Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *FEBS J*. 2014; 281(3):927-942.
36. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res*. 2015; 35(6):3147-3154.
37. Perrot-Applanat M, Di Benedetto M. Autocrine functions of VEGF in breast cancer tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adh Migr*. 2012; 6(6):547-553.
38. Uchino M, Kojima H, Wada K, Imada M, Onoda F, Satofuka H, et al. Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2010; 10:414.

39. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(7):djv073.
40. González PA, López-Pujol J, Gómez-Bellver C. Notas sobre especies de *Kalanchoe* (Crassulacea) ocasionales y naturalizadas en Cuba. *Collectanea Botanica.* 2019; 38:e011.
41. Sandoval MC, Martínez JL. El uso de *Kalanchoe pinnata* (Lam). Pers. en el estado de Veracruz. *Cienc Hombre.* 1994; 16:49-56.
42. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. BDMTM: Siempre viva o tronador. [Internet]. [Consultado 15 Feb 2023]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=siempreviva-tronador>
43. Biswas SK, Chowdhury A, Das J, Hosen SM, Uddin R, Rahaman S. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). *Afr J Pharm Pharmacol.* 2011; 5(10):1258-1262.
44. Rajsekhar PB, Bharani RS, Ramachandran M, Angel KJ, Priya S, Rajsekhar V. The “wonder plant” *Kalanchoe pinnata* (Linn.) Pers.: A review. *JAPS.* 2018; 6(3):151-158.
45. Pereira KMF, Grecco SS, Figueiredo CR, Hosomi JK, Nakamura MU, Lago JHG. Chemical composition and cytotoxicity of *Kalanchoe pinnata* leaves extracts prepared using accelerated system extraction (ASE). *NPC.* 2018; 13(2):163-166.
46. Hernández-Caballero ME, Sierra-Ramírez JA, Villalobos-Valencia R, Seseña-Méndez E. Potential of *Kalanchoe pinnata* as a cancer treatment adjuvant and epigenetic regulator. *Molecules.* 2022; 27(19):6425.
47. Rahman R, Al-Sabahi JN, Ghaffar A, Nadeem F, Umar A. Phytochemical, morphological, botanical, and pharmacological aspects of a medicinal plant: *Kalanchoe pinnata* – A review article. *IJCBS.* 2019; 16:5-10.

48. Báez M, Torres EI, Gruszycki AE, Alba DA, Valenzuela GM, Gruszycki MR. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet y H. Perrier. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2021; 50(1):86-99.
49. Stefanowicz-Hajduk J, Hering A, Gucwa M, Hałasa R, Soluch A, Kowalczyk M, et al. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. *Pharm Biol.* 2020; 58(1):732-740.
50. Bogucka-Kocka A, Zidorn C, Kasprzycka M, Szymczak G, Szewczyk K. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. *SJBS.* 2018; 25(4):622-630.
51. Afzal M, Kazmi I, Anwar F. Antineoplastic potential of *Bryophyllum pinnatum* Lam. on chemically induced hepatocarcinogenesis in rats. *Pharmacognosy Res.* 2013; 5(4):247-253.
52. Mahata S, Maru S, Shukla S, Pandey A, Mugesh G, Das BC, et al. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12:15.
53. Supratman U, Fujita T, Akimaya K, Hayashi H, Murakami A, Koshimizu SK, et al. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* x *tubiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(4):947-949.
54. Kaklamani V, Yi N, Sadim M, Siziopikou K, Zhang K, Xu Y, et al. The role of the fat mass and obesity associated gene (*FTO*) in breast cancer risk. *BMC Med Genet.* 2011; 12:52.
55. Liu Y, Wang R, Zhang L, Li J, Lou K, Shi B. The lipid metabolism gene *FTO* influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett.* 2017; 13(6):4685-4690.

56. Xu Y, Ye S, Zhang N, Zheng S, Liu H, Zhou K, et al. The FTO/miR-181b-3p/ARL5B signaling pathway regulates cell migration and invasion in breast cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2020; 40(10):484-500.
57. Niu Y, Lin Z, Wan A, Chen H, Liang H, Sun L, et al. RNA N6-methyladenosine demethylase *FTO* promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. *Mol Cancer*. 2019; 18(1):46.
58. Garmpis N, Damaskos C, Dimitroulis D, Kouraklis G, Garmpi A, Sarantis P, et al. Clinical significance of the histone deacetylase 2 (HDAC-2) expression in human breast cancer. *J Pers Med*. 2022; 12(10):1672.
59. Xu P, Xiong W, Lin Y, Fan L, Pan H, Li Y. Histone deacetylase 2 knockout suppresses immune escape of triple-negative breast cancer cells via downregulating PD-L1 expression. *Cell Death Dis*. 2021; 12(8):779.
60. Kamarulzaman NS, Dewadas HD, Leow CY, Yaacob NS, Mokhtar NF. The role of REST and *HDAC2* in epigenetic dysregulation of Nav1.5 and nNav1.5 expression in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2017; 17:74.
61. Maffuz-Aziz A, Labastida-Almedrano S, Espejo-Fonseca A, Rodríguez-Cuevas S. Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres de México. *Cirugía y Cirujanos*. 2017; 85(3):201-207.
62. DeSantis C, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson B, Jemal A. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015; 24(10):1495-506.
63. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004; 11(7):36-42.
64. Selvakumari E, Muthukumaran R, Atchaya S, Kowasalya S, Elavarasan N. Ethnopharmacological and phytopharmacological perception on *Kalanchoe* (Crassulaceae) - A comprehensive review. *IJPSR*. 2022; 13(4):1428-1440.

65. Fernandes JM, Cunha LM, Pereira E, Lourenço EMG, Fernandes-Pedrosa MF, Zucolotto SM. *Kalanchoe laciniata* and *Bryophyllum pinnatum*: an update review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Rev Bras Farmacogn*. 2019; 29(4):529-558.
66. World Health Organization. WHO: Estimated number of new cases and deaths in 2020, World, both sexes, all ages. [Internet]. [Consultado 13 Mar 2023]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>
67. Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard L, Petit A, Dulong C, et al. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2013; 13:63.
68. Stefanowicz-Hajduk J, Gucwa M, Hajduk A, Ochocka R. *Kalanchoe blossfeldiana* extract induces cell cycle arrest and necrosis in human cervical cancer cells. *Pharmacog Mag*. 2019; 15(66):527-537.
69. Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram N. Quercetin suppresses Twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2015; 10(10):e0141370.
70. Yi X, Zuo J, Tan C, Xian S, Luo C, Chen S, et al. Kaempferol, a flavonoid compound from *Gynura medica* induced apoptosis and growth inhibition in MCF-7 breast cancer cell. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016; 13(4):210-215.
71. Zhu L, Chen Y, Wei C, Yang X, Cheng J, Yang Z, et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of cinobufagin on human breast cancer MCF-7 cells and its molecular mechanism. *Nat Prod Res*. 2018; 32(4):493-497.
72. Rezaei-Seresht H, Cheshomi H, Falanji F, Movahedi-Motlagh F, Hashemian M, Mireskandari E. Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: an in silico and in vitro study. *Avicenna J Phytomed*. 2019; 9(6):574-586.

73. Wang K, Zhu X, Zhang K, Zhu L, Zhou F. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast cancer carcinoma MCF-7 cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2014; 28(9):387-393.
74. Wang R, Yang L, Li S, Ye D, Yang L, Liu Q, et al. Quercetin inhibits breast cancer stem cells via downregulation of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), chemokine receptor type 4 (CXCR4), mucin 1 (MUC1), and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). *Med Sci Monit*. 2018; 24:412-420.
75. Yang G, Xing J, Aikemu B, Sun J, Zheng M. Kaempferol exhibits a synergistic effect with doxorubicin to inhibit proliferation, migration, and invasion of liver cancer. *Oncol Rep*. 2021; 45(4):32.
76. Hardinsyah H, Gunawan WB, Nurkolis F, Alisaputra D, Kurniawan R, Mayulu N, et al. Antiobesity potencial of mayor metabolites from *Clitoria ternatea* kombucha: untargeted metabolomic profiling and molecular docking simulations. *CRFS*. 2023; 6:100464.
77. Mohammed A, Al-Numair KS, Balakrishnan A. Docking studies on the interaction of flavonoids with fat mass and obesity associated protein. *Pak J Pharm Sci*. 2015; 28(5):1647-1653.
78. Anantharaju PG, Reddy DB, Padukudru MA, Chitturi CMK, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. Induction of colon and cervical cancer cell death by cinnamic acid derivates is mediated through the inhibition of Histone Deacetylases (HDAC). *PLos One*. 2017; 12(11):e0186208.
79. Berger A, Venturelli S, Kallnischkies M, Böcker A, Busch C, Weiland T, et al. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(6):977-985.