



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTICANCERÍGENA DEL COMPUESTO TRIACETATO DE (25*R*)-22-OXOCOLEST- 5-ENO-3 β -16 β ,26-TRIILO, ANÁLOGO DE LA AGLICONA DE LA SAPONINA OSW- 1, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.

**Tesis para obtener el título en
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

AURORA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Directores:

DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ

DRA. MARICRUZ ANAYA RUIZ



Octubre 2018



*A todas las mujeres y familias que han sido víctimas del
cancer de mama.*

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecerle a la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por ser mi alma mater y proporcionarme todo lo que he requerido para mi formación académica y humana.

Gracias al **Centro de Investigación Biomédica de Oriente-IMSS** por ofrecerme todos los recursos necesarios para concluir mi tesis de licenciatura.

Le agradezco al **CONACyT** por el apoyo económico que me ha brindado durante mi estancia universitaria, apostarle a la educación es asegurar el futuro de nuestro país.

Gracias a toda mi **familia** por brindarme todo lo que he necesitado para desarrollarme plenamente como persona y permitirme seguir mis sueños. Gracias **papá y mamá** por siempre preocuparse para que tuviera la mejor educación, porque por ello descubrí desde muy pequeña que lo que más me gusta hacer en este mundo es aprender sobre las curiosidades universo. Gracias a mis **hermanos, Suiza y Martín**, por hacer mi vida más alegre y llena de matices.

Gracias **Iñaki** por ser la persona más dulce y encantadora de este planeta. Nos conocemos hace poco tiempo pero se siente hubiéramos estado juntos toda una vida. Razones para agradecerle tengo muchas, y si hiciera un listado, no solo no voy a acabar, sino que tampoco hallaría el valor para enseñarte mi tesis.

Gracias **Dianayeli y Anayansi** por soñar en grande junto a mí y ser mis compañeras y principales cómplices de batalla durante estos últimos cinco años. Gracias **René, Luis, y Alan**, por escuchar mis problemas existenciales y hacerme reír de ellos. Gracias **Mike** por siempre apoyar mis planes maléficos de conquistar el mundo. Gracias **Iván Lima**, por ser mi confidente y escucharme siempre que lo necesité. Terminar una carrera es un camino muy difícil pero volvería a repetirlo si ustedes están ahí.

Gracias a todos los docentes que me dieron clases durante la carrera, valoré cada palabra.

Gracias a todos los doctores que apoyaron mi estancia de investigación en el **CIBIOR**. Gracias al grupo de investigación de la **Dra. Rosana Pelayo** por aportar tanto a mi trabajo. Gracias **Juan Carlos Baladrán y Dalia Ramírez** por ayudarme con el citómetro siempre que lo necesité, regalarme reactivos y lo más importante ser un ejemplo a seguir e inspirarme para seguir con la ciencia.

Un especial agradecimiento al laboratorio de **Biología Molecular del CIBIOR** por brindarme todas las herramientas, tiempo y regaños para que pudiera concluir mi tesis de licenciatura. Gracias a la **Dra. Lupita** por darme consejos y atención siempre que lo necesité. Gracias a **David, Jonathan, Juan Carlos Atenco, Ángeles y Ana Pao**, por hacer de mis tardes en el laboratorio tiempo tan agradable.

Gracias **Dra. Maricruz Anaya** por permitirme trabajar en su laboratorio y recibirme tan cálidamente como solo usted lo sabe hacer. Gracias a usted el laboratorio se convirtió en mi segunda casa.

Y finalmente quiero hacer un especial agradecimiento al **Dr. Jesús Sandoval** por adoptarme académicamente desde muy pequeña. Sin duda alguna usted ha sido un pilar muy importante en mi crecimiento como investigadora. Le agradezco infinitamente que siempre haya tenido confianza en mí como estudiante y próxima científica. Nunca dudó en mis capacidades aun cuando yo dudé de mi misma. Y sé que así como ha dado todo su esfuerzo para que yo crezca profesionalmente, usted lo ha hecho y lo seguirá haciendo con más estudiantes, por ello le agradezco en nombre de todos por aportar su granito de arena para que este país sea un lugar mejor.

Tabla de contenido

Resumen..... 5

Introducción 6

Marco teórico 6

 Mamas 6

 Anatomía de la mama 6

 Histología de la mama 7

 Cáncer 9

 Cáncer de mama..... 9

 Clasificación del cáncer de mama 9

 Tratamientos para combatir el cáncer de mama 12

 Saponinas esteroidales..... 16

 Saponinas y su actividad biológica en cáncer 17

 OSW-1 17

 BSS4..... 18

Justificación 20

Hipótesis 20

Objetivos 20

Materiales y métodos 21

Resultados y discusión..... 26

 Ensayo de viabilidad por MTT 26

 Procesamiento de confluencia 26

 Ensayo de proliferación 30

 Medición de ciclo celular 32

 Ensayo de clonegenicidad 34

 Microscopía de fluorescencia (PRELIMINAR) 37

Perspectivas futuras 40

Conclusiones 41

Bibliografía 41

Resumen

El objetivo de este proyecto fue la evaluación de la capacidad anticancerígena del compuesto triacetato de (25R)-22-oxocolest-5-eno-3 β , 16 β , 26-triilo (BSS4). Por vez primera se valoró la actividad biológica del compuesto BSS4 en líneas celulares de cáncer. BSS4 es análogo de la aglicona de la saponina OSW-1, la cual ya ha demostrado tener una potente actividad anticancerígena en diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el subtipo de cáncer de mama triple negativo. Este tipo de neoplasia es sin duda relevante globalmente por la inexistencia de un tratamiento eficaz y accesible, además de su rápida progresión y elevado potencial metastásico, siendo usual un mal pronóstico clínico en los pacientes diagnosticados con este tipo de cáncer. Durante las últimas dos décadas se ha desarrollado y aprobado una variedad de agentes para tratar otros tipos de cáncer de mama como el luminal A, luminal B o HER2+, sin embargo se mantienen limitadas las opciones de tratamiento para el cáncer de mama de fenotipo triple negativo. En este trabajo se demostró que el compuesto BSS4 tiene mayor actividad biológica en la línea celular MDA-MB-231 con respecto a la línea celular MCF7, modelos in vitro estándares para el estudio del cáncer de mama invasivo (triple negativo-basal) y no invasivo (luminal A) respectivamente. Aunque quedan incógnitas por responder sobre el mecanismo de acción del compuesto BSS4; no se descarta que sea un candidato viable para coadyuvar en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia más relevante en las mujeres en edad adulta, en México y en el mundo, y se presenta tanto en mujeres pre como postmenopáusicas. Aunque este último grupo es el que sufre el mayor número de casos de cáncer de mama, el grupo de mayor riesgo son las mujeres diagnosticadas a temprana edad (20-40 años), ya que suelen presentar subtipos de cáncer altamente invasivos.

El cáncer de mama triple negativo es un subtipo de cáncer altamente invasivo del tipo basal caracterizado por la ausencia del receptor a estrógenos, receptor de progesterona y el receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2¹⁻³. Este tipo de cáncer suele estar asociado a la mutación de BRCA1 y/o 2³, por lo que suele ser de carácter hereditario y con mayor incidencia en mujeres premenopáusicas⁴. Lamentablemente, y a pesar de los esfuerzos por parte de la comunidad científica, hasta la fecha no existen tratamientos eficaces contra el cáncer de mama triple negativo.

Marco teórico

Mamas

Anatomía de la mama

Las mamas son los elementos superficiales más destacados de la pared anterior del tórax, especialmente en la mujer. Las mamas se componen de tejido glandular y tejido fibroso de soporte integrados en una matriz de tejido graso, junto con vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos. Las glándulas mamarias están situadas en el tejido subcutáneo que recubre los músculos pectorales mayor y menor. El pezón está situado en la prominencia más elevada de la mama, rodeado por un área circular de la piel pigmentada, la areola. El cuerpo de las mamas femeninas se extiende transversalmente desde el borde lateral del esternón hacia la línea axilar media, y verticalmente desde la 2da hasta la 6ta costilla⁵.

La mama está formada por 12-20 lóbulos constituidos por 20-40 lobulillos. Los lobulillos son glándulas tubuloalveolares ramificadas que se drenan por los ductos lactíferos los cuales acarrean la leche hasta el pezón ^{6,7}. En la ilustración 1 se esquematizan los componentes anatómicos del seno.

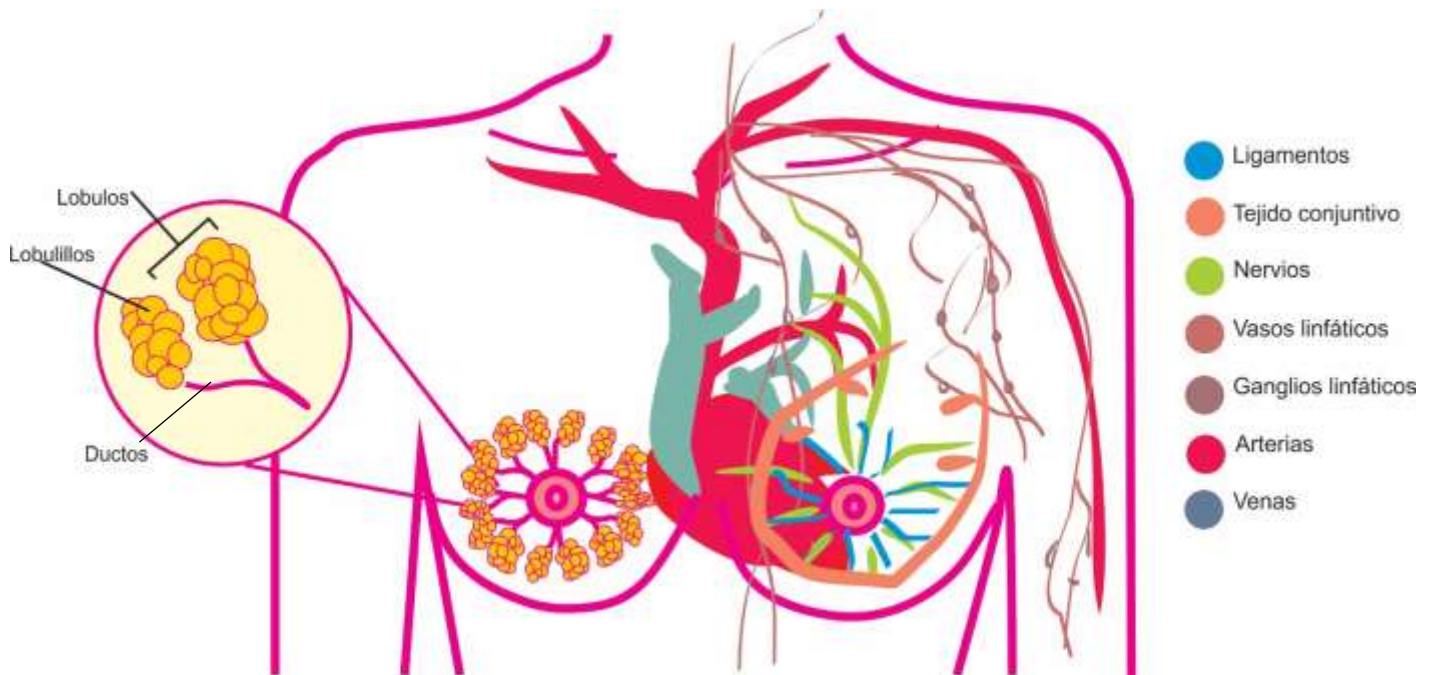


Ilustración 1 Esquema de la anatomía de la mama y los órganos y tejidos adyacentes.

Histología de la mama

El seno tiene dos tipos de células epiteliales, dos tipos de estroma y dos tipos de estructuras principales ^{8,9}. Estas estructuras se esquematizan en la ilustración 2.

1) Parénquima

a) Células epiteliales luminales:

Forman la capa más interna de los ductos y acinos. Tienen forma cuboide/columnar. Usualmente expresan las citokeratinas luminales de bajo peso molecular 7, 8, 18 y 19, E-cadherinas y otras cateninas. Algunas células luminales pueden expresar el receptor de estrógenos (ER) y/o el receptor de progesterona (PR). Los receptores hormonales no se expresan en células normales proliferantes ^{8,9}.

- i) Las células luminales en la unidad terminal ductal son productoras de leche.
- ii) Las células luminales en los ductos largos no son productoras de leche.

b) Células mioepiteliales:

Forman la capa más externa existente entre las células luminales y la membrana basal. Ayudan a mantener la membrana basal y la polaridad de las células luminales, inhiben angiogénesis y ayudan a la contracción para la excreción de leche. Expresan las citokeratinas 5/6, 14 y 17. También pueden expresar algunas citocinas luminales y proteínas de contracción como la calponina, la cadena pesada de la miosina y actina. Además expresan p63, CD10, P-cadherina, S100, y mapsina. La pérdida total de células mioepiteliales está asociada a cáncer invasivo ^{8,9}.

2) Estroma

a) Estroma interlobular: Es el encargado de aportar la mayor parte del volumen del seno. Los componentes celulares son fibroblastos, miofibroblastos, adipocitos, y vasos linfáticos y sanguíneos⁸.

b) Estroma intralobular: Es el encargado de rodear y dar soporte al parénquima mamario.

3) Estructuras

a) Ductos largos: Son las estructuras encargadas de transportar la leche de los lobulillos mamarios hasta el pezón.

b) Unidad terminal ductal-lobular (TDLU por sus siglas en ingles *Terminal Ductal-Lobular Unit*): Es una estructura conformada por células epiteliales organizadas en subunidades estructurales llamadas acinos. Las TDLU producen la leche durante la lactancia; también son la principal fuente de precursores de células cancerosas en la mayoría de los tipos de cáncer de mama¹⁰.

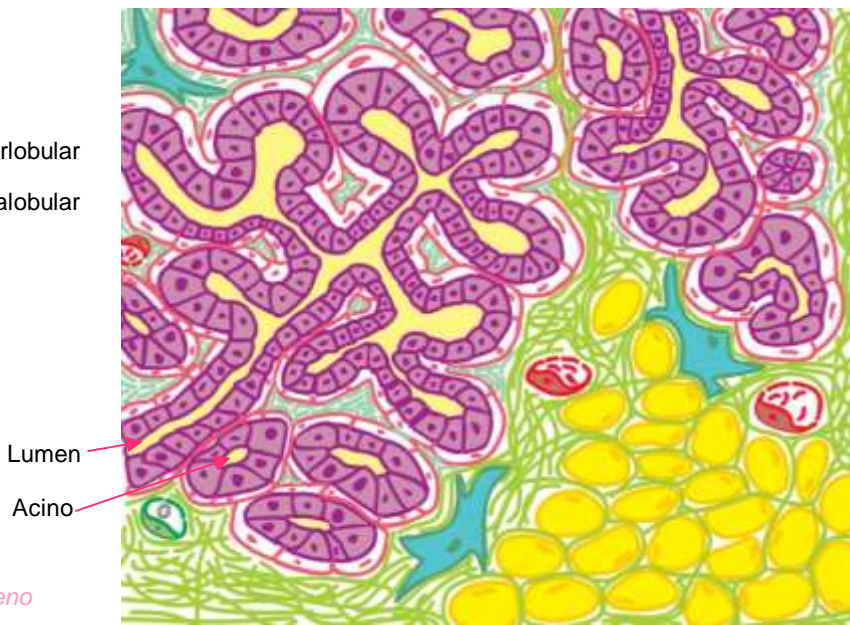
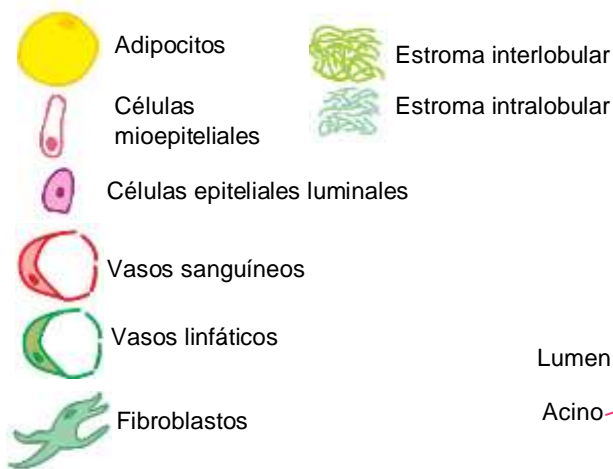


Ilustración 2 Esquema del corte histológico del seno

Cáncer

El cáncer es uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial. Se define como la proliferación rápida, anormal e incontrolada de un linaje celular en particular. En 2015 se convirtió en la principal causa de muerte a nivel mundial provocando 8.8 millones de defunciones, siendo los tipos de cáncer con el mayor número de fallecimientos el cáncer de pulmón, de hígado, colorrectal, de estómago y de mama ¹¹.

Cáncer de mama

De acuerdo con la OMS, el cáncer con mayor prevalencia en mujeres es el de mama ¹². Durante el 2016, en E.U.A., fue el tipo de cáncer con mayor número de casos y el segundo con mayor número de muertes después del cáncer de pulmón ¹³. En México, el panorama no es muy diferente, en el 2014, fue el tipo de cáncer que más se diagnosticó en la población mexicana de 20 años o más, con una prevalencia de 19.4 %. Es la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres mayores de 25 años¹⁴. Se estima que una de cada 8 mexicanas padecerá cáncer con un índice de mortalidad del 2-3% si es diagnosticado de manera oportuna ¹⁵.

Clasificación del cáncer de mama

Según su localización

Esta clasificación se realiza de acuerdo a dos parámetros, el tipo celular del cual surgió el cáncer y de acuerdo a la dispersión del tumor, es decir si se encuentra localizado en un tejido particular (*in situ*) o si es invasivo (también llamado infiltrante) ¹⁶.

Los tipos más comunes de cáncer de mama son los adenocarcinomas, es decir, aquel que empieza en las células glandulares secretoras, esto es en las células epiteliales de los ductos o lóbulos de la mama. De acuerdo a lo anterior podemos clasificarlos de la siguiente manera:

- Carcinoma *in situ* lobular
- Carcinoma *in situ* ductal
- Carcinoma invasivo lobular
- Carcinoma invasivo ductal

Otros tipos de cáncer de mama menos comunes son:

- Cáncer de mama inflamatorio

- Enfermedad de Paget: Cáncer de mama tipo ductal que se extiende al epitelio del pezón.
- Tumor Phyllodes: Es un tumor, generalmente no maligno del tejido conectivo de la mama (estroma).
- Angiosarcoma: Se refiere al tipo de cáncer que inicia con las células que revisten los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos.

Clasificación Tumor Nódulo Metástasis (TNM)

Esta clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) permite estimar la etapa de progresión del tumor. Este sistema es el que se emplea con más frecuencia para clasificar el cáncer de seno y se basa en siete parámetros: extensión o tamaño del tumor (**T**), propagación de las células cancerosas a los ganglios linfáticos adyacentes (**N**), propagación a sitios distantes o metástasis (**M**). El estado del ER y PR (**ER**), (**PR**). Estado del receptor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2) (**HER2**) y grado del cáncer (**G**).

Al valor de **T** se le asigna un valor del 0 al 4 el cual describe de menor a mayor el tamaño del tumor (primario) y el grado de invasión a la piel, pared torácica debajo del seno o tejidos adyacentes.

Al valor de **N** se le asigna un valor del 0 al 3 para indicar si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos al seno

Al valor de **M** se le asigna un valor del 0 al 1 donde 0 significa que no se han detectado células cancerosas en órganos distantes¹⁷.

Clasificación molecular

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea que abarca una serie de entidades biológicamente distintas con características patológicas específicas. Los diferentes subtipos de tumores mamarios tienen diferentes factores de riesgo, manifestación clínica, características histopatológicas y respuesta terapéutica. La caracterización a través de marcadores inmunohistoquímicos, junto con la caracterización clínico-patológica, ha permitido predecir el comportamiento clínico, pronóstico, respuesta y selección del mejor tratamiento¹⁸.

Los marcadores moleculares del cáncer de mama son clasificados conforme a las características primordiales del cáncer reportadas por Weinberg¹⁹. Los marcadores más comúnmente utilizados

para caracterizar el cáncer de mama son aquellos que se han asociado a la promoción y mantenimiento de la proliferación celular.

Clásicamente, el cáncer de mama es subtipificado de acuerdo a la presencia de receptores hormonales y de crecimiento (Tabla 1).

ER es el marcador más importante y prevalente en el cáncer de mama. La presencia de ER en las células cancerosas representa el 75% de todos los casos. Está presente en el 65% de las pacientes menores de 50 años y presente en el 80% de las pacientes mayores a 50 años. En general los tumores ER+ responden a las terapias anti-endócrinas a diferencia de los tumores ER-. El receptor **PR** está presente en el 65-75% de los casos de cáncer de mama. La presencia de PR está asociada a una alta actividad de la señalización mediada por ER, normalmente los tumores PR+ también son ER+. Aproximadamente el 40% de los tumores ER+ son negativos para PR. Los tumores ER+/PR- responden menos a las terapias endócrinas con respecto a los tumores ER+/PR+. La presencia de un solo receptor sugiere una señalización aberrante lo cual contribuye a la resistencia de los anti-endócrinos¹⁸. **HER2** es un receptor de crecimiento con actividad tirosina quinasa que se sobreexpresa en el 20-30% de los casos de cáncer de mama y en el 13-20% de los casos de cáncer ductal invasivo. La sobreexpresión de HER2 está asociado al aumento de la agresividad del tumor, no obstante, responden a ciertos tipos de agentes quimioterapéuticos como la antraciclina; pueden o no responder a terapias anti-endócrinas y no responden ante los taxanos. Los tumores HER2+ en estados avanzados pueden ser tratados con el anticuerpo monoclonal contra HER2, trastuzumad^{18,20}. Otros marcadores de proliferación importantes son el receptor de andrógenos (AR) y KI-67. AR está presente en el 90% de los casos ER+. KI-67 está relacionada directamente con la proliferación celular. De acuerdo a la presencia de los marcadores moleculares mencionados anteriormente el cáncer de mama se clasifica:

- **Luminal A: [ER+/PR+] HER2-**. Usualmente, este tipo de tumores son del tipo ductal poco invasivo. Tienen un buen pronóstico. Aunque no suelen responder a la quimioterapia tradicional tienen una excelente respuesta hacia la terapia endócrina²¹.
- **Luminal B: [ER+/PR+] HER2+**. Este tipo de tumores responde mejor a la quimioterapia tradicional y menos a la terapia endócrina²¹.

- **HER2 sobre-expresado: ER-PR-HER2+.** Antes de la existencia de la terapia con los anticuerpos anti-HER2, este subtipo de cáncer era el más agresivo con el mayor índice de mortalidad. Posterior a la aplicación de la terapia anti-HER2 el pronóstico mejoró considerablemente²¹.
- **Triple negativo: ER-PR-HER2-.** Este subtipo de cáncer, suele ser del tipo basal. Otros subtipos del tipo triple negativo son el cáncer de mama rico en interferón, el metaplásico y el bajo en claudina. Los tumores basales normalmente provienen de las células mioepiteliales, que se caracterizan por la presencia de las citokeratinas: 5/6, 14, 17, 8/18 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1). El 20% de los casos de cáncer de mama causados por la mutación en los genes BCRA1/2 es triple negativo. Actualmente este tipo de tumor tiene el mayor índice de mortalidad y el peor pronóstico clínico. Representa el 10-25% de todos los casos de cáncer de mama^{18,22}.

Tabla 1 Compilación de los subtipos de cáncer de mama y sus características primordiales ¹⁸

Subtipo	Alias	Estatus del biomarcador	Grado	Pronóstico	Prevalencia
Luminal	Luminal A	[ER+/PR+]HER2-KI67-	1/2	Bueno	23.70%
	Luminal B	[ER+/PR+]HER2-KI67+ [ER+/PR+]HER2+KI67+	2/3	Intermedio Malo	38.8% 14%
HER2+	HER2 sobreexpresado	[ER-/PR-]HER2++	2/3	Malo	11.20%
Triple negativo	Basal	[ER-/PR-]HER2- Marcadores basales+	3	Malo	10-25%
Cáncer apócrino	Cáncer apócrino	[ER-/PR-]AR+	2/3	Malo	13.20%

Tratamientos para combatir el cáncer de mama

La terapia seleccionada para tratar a un determinado paciente depende del subtipo de cáncer, la etapa y progresión del mismo. En general los tratamientos se pueden dividir en locales y sistémicos.

Tratamientos locales

Los tratamientos locales son aquellos que tratan el tumor sin afectar al resto del cuerpo. Algunos tipos de terapia local utilizados para el cáncer de mama son:

Cirugía

En la mayoría de los casos, la cirugía es una de las primeras opciones para tratar el cáncer de mama. Dependiendo del tipo de cáncer y la etapa, la cirugía se realizará para distintos propósitos que se enlistan a continuación:

- **Cirugía para extraer cáncer:** A su vez se puede clasificar en dos tipos dependiendo de su naturaleza:
 - *Mastectomía parcial:* También llamada cirugía con conservación de seno, en donde se extirpa la parte del seno que contiene el cáncer junto con tejido normal adyacente. La cantidad extirpada depende del tamaño del tumor, localización y otros factores²³.
 - *Mastectomía:* Es la extirpación total de la mama y en ocasiones tejidos adyacentes.
- **Cirugía para extirpar ganglios linfáticos:** La extirpación de los ganglios adyacentes puede realizarse para determinar si el cáncer se ha extendido, o como parte de la cirugía para extirpar el cáncer²³.

Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento en el que se incide radiación u ondas de alta energía para eliminar las células de cáncer. Al igual que los otros tratamientos la selección de esta terapia variará de acuerdo a parámetros como la edad del paciente, tipo de cáncer y etapa del mismo. Suele aplicarse en conjunto de otros tratamientos, usualmente postquirúrgico²⁴.

Tratamientos sistémicos

Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento en el que se administran agentes químicos para combatir el cáncer. Estos agentes químicos pueden ser administrados vía intravenosa u oral. La quimioterapia puede ser de carácter adyuvante, es decir, postquirúrgico o de carácter neoadyuvante, es decir, antes de la cirugía.

La quimioterapia adyuvante es utilizada para tratar de eliminar células cancerosas remanentes que no hayan sido eliminadas en el procedimiento quirúrgico o para eliminar aquellas células que se hayan propagado a otros tejidos. La quimioterapia neoadyuvante, normalmente es utilizada para disminuir el tamaño del tumor antes de la cirugía. Simultáneamente permite evaluar la respuesta y

sensibilidad del tumor a cierto tipo de agentes químicos además de eliminar cualquier célula cancerosa propagada en otra parte del cuerpo. En casos donde el cáncer de mama es muy avanzado, ya sea por una detección tardía o por recaída, la quimioterapia es utilizada como tratamiento principal²⁵.

Los medicamentos más habituales para tratar el cáncer de mama son:

- **Antraciclinas:** Son antibióticos provenientes de bacterias del género Streptomyces. Las antraciclinas dañan el DNA de las células cancerosas, provocándoles la muerte. Algunos ejemplos de antraciclinas son la daunorrubicina, la doxorrubicina y la epirubicina.
- **Taxanos:** Son fármacos del tipo terpenoide que inhiben la mitosis al interferir con los microtúbulos.
- **5-fluorouracilo:** Es un medicamento de uso tópico que inhibe la síntesis de DNA.
- **Ciclofosfamida:** Es un fármaco que daña el DNA y disminuye la respuesta inmunitaria.
- **Carboplatino:** Es un compuesto químico de coordinación el cual daña el DNA²⁵.

Otros agentes utilizados, principalmente cuando el cáncer se ha propagado o cuando se detecta en etapas tardías son: vinorelbina, capecitabina, gemcitabina, ixabepilona, paclitaxel ligado a albúmina (nab-paclitaxel o Abraxane) y eribulina²⁵.

Terapia hormonal

Este tipo de terapia es utilizada principalmente para tratar los subtipos de cáncer positivos a los receptores hormonales ER y PR. El objetivo de la terapia hormonal es evitar que los respectivos ligandos se unan al receptor para inhibir las señales de proliferación, ya sea disminuyendo los niveles hormonales en sangre o bloqueando al receptor. Algunos de los principales fármacos utilizados son:

- **Tamoxifeno:** Este medicamento bloquea los receptores de estrógeno en las células cancerosas del seno. El tamoxifeno es un modulador selectivo de estrógeno ya que solo bloquea los ER en las células del seno, en otros tejidos ejerce acción de estrógeno¹⁰.
- **Toremifeno:** Es otro modulador selectivo de estrógenos que únicamente bloquea los ER del seno. Únicamente está aprobado para tratar cáncer de mama metastásico ER+. Se administra vía oral¹⁰.

- **Fulvestrant:** Es un medicamento que bloquea y daña los receptores de estrógeno. Se utiliza únicamente para tratar cáncer de mama metastásico en mujeres postmenopáusicas. Se administra vía intramuscular¹⁰.
- **Letrozol, Anastrozol y Exemestano:** Son medicamentos que inhiben la aromatasas bloqueando la síntesis de estrógenos en el tejido adiposo. Se utilizan normalmente en mujeres postmenopáusicas. Se administran vía oral, usualmente como terapia adyuvante junto con el tamoxifeno¹⁰.
- **Supresión ovárica:** En mujeres premenopáusicas se puede acudir a la extirpación de los ovarios para evitar la síntesis de estrógenos o administrar análogos de la hormona liberadora luteinizante para detener la señalización de producción de estrógenos. Algunos medicamentos son: goserelina, y leuprolida¹⁰.

Terapia dirigida

La terapia dirigida es un tipo de tratamiento que usa medicamentos u otras sustancias que actúan de manera específica en una entidad biológica (enzima, receptor, célula, tejido, etc.). La mayoría de las terapias dirigidas son medicamentos de moléculas pequeñas o anticuerpos monoclonales. La principal ventaja de la terapia dirigida es que tiene menos efectos secundarios y suele funcionar incluso cuando los tratamientos convencionales como la quimioterapia o los tratamientos hormonales ya no lo hacen.

Las terapias dirigidas se pueden clasificar en:

- **Dirigidas para cáncer de mama HER++**
 - **Trastuzumab:** Es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado anti HER2, que puede ser utilizado para tratar cáncer de mama en etapa tardía o temprana. También puede ser utilizado como coadyuvante junto con quimioterapia. Se administra vía intravenosa²⁶.
 - **Pertuzumab:** En un anticuerpo monoclonal anti HER2 diseñado para inhibir la unión de la proteína HER2 con otros miembros de la familia HER, especialmente evitando la dimerización con el receptor HER3²⁷.
 - **Ado-trastuzumab-emtansina:** Es un conjugado de un anticuerpo-fármaco, trastuzumab unido por un enlace covalente a DM1, un inhibidor microtubular²⁸.

- **Lapatinib:** Es un fármaco clasificado como un inhibidor de la transducción de señales: inhibidor de la tirosina quinasa, inhibidor de los receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR y HER2. Es utilizado para tratar cáncer de mama HER++ en etapa avanzada o metastásico²⁶.
- **Dirigidas para cáncer de mama con mutaciones en el gen BRCA**
 - **Olaparib:** Es un inhibidor de la polimerasa-1 (PARP-1). Los genes BRCA 1 y 2 que codifican proteínas supresoras de tumor, asociadas a la reparación del DNA. Estos genes están dañados en algunas personas, haciéndolas mucho más propensas a padecer algún tipo de cáncer pero principalmente cáncer de mama y ovario. PARP-1 es una proteína que también participa en la reparación del DNA. Al ser inhibida las células cancerosas suelen morir³.

Es importante destacar que a pesar de existir una amplia cantidad de terapias y tipos de tratamientos no existe aún un esquema que asegure la sobrevivencia de los pacientes. La elección del conjunto de tratamientos y resultado de los mismos dependerá de muchas variables, entre ellas el subtipo de cáncer, la localización del mismo, la edad de la paciente, y principalmente la etapa en la que se haya detectado el tumor.

Saponinas esteroideas

Las saponinas son metabolitos secundarios que se encuentran en gran cantidad de plantas, localizadas en raíz, tallo, hojas, semillas y frutos. Estructuralmente, las saponinas son glicósidos de alto peso molecular que están formados por uno o varios carbohidratos unidos a una aglicona, la cual puede ser un triterpeno o un esteroide. Las saponinas poseen una parte hidrofílica, la cual corresponde a los grupos hidroxilo de los azúcares y una parte hidrofóbica, la aglicona.

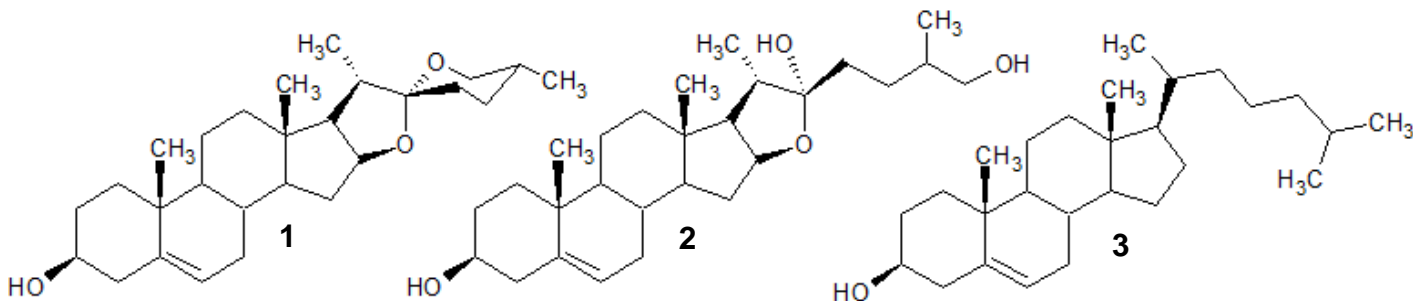


Ilustración 3. Ejemplo de agliconas representativas de las subclases de saponinas esteroideas. 1) Espirostano; 2) Furostanol y 3) Colesterol

La aglicona de las saponinas esteroidales está estructurada por 27 átomos de carbono y se puede clasificar en tres subclases: espirostanos, furostanos y colestanos²⁹ (Ilustración 3).

Saponinas y su actividad biológica en cáncer

Existe una gran variedad de especies vegetales con propiedades biológicas cuyos efectos farmacológicos son producidos en un amplio porcentaje por su contenido en saponinas³⁰. Actualmente las saponinas tienen un extenso número de aplicaciones farmacéuticas, como expectorantes, anti-plaquetarios, antiinflamatorios, antitumorales, antidiabéticos, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios, antihiperlipidémicos, entre otras²⁹.

Investigaciones recientes han encontrado que algunas saponinas tienen actividad anticancerígena en diferentes líneas celulares (Tabla 2). Muchas saponinas inhiben el crecimiento del tumor por arresto del ciclo celular o inducen apoptosis³¹.

Tabla 2. Ejemplos de algunas saponinas con actividad destacada en diferentes tipos de líneas celulares cancerosas.

Saponina	Actividad	Tipo de cáncer (línea celular)
OSW-1	Daño en la membrana mitocondrial, causando la pérdida de potencial transmembranal e incrementando la concentración citosólica de calcio.	Leucemia (ML-1, HL-60), Ovario (SKOV3), Cerebro (U87-MG), Páncreas (AsPC-1), Mama (MCF7, MDA-MB-231).
Avicina	Desfosforila Stat3, inhibe el crecimiento de linfocitos T y promueve apoptosis.	Linfocitos T
Tubeimosina	Causa daños en la mitocondria y daña los ER.	Cérvico uterino (HeLa).
Saikosaponina	Activa la vía de señalización mediada por ERK y la transcripción mediada por P15. Además inhibe la proliferación y disminuye la viabilidad celular. Induce apoptosis bloqueando el ciclo celular en la fase G1.	Mama (MCF7, MDA-MD-231), Pulmón (A549).
Formasina	Retarda el crecimiento del tumor.	Hepatoma de ratón (MH134)
Metil-protogracilina	Actividad citotóxica	En todas las líneas celulares analiadas, desde leucemia hasta tumores sólidos. Principalmente para cáncer de colón (KM12), del sistema nervioso (U251).

OSW-1

El compuesto OSW-1 es una saponina de origen natural de la planta *Ornithogalum saundersiae*³². Desde 1997, cobró un gran interés debido a que presentó una potente actividad anticancerígena en

varias líneas celulares³³. En 1999 se realizó la primera síntesis completa de la molécula con un total de 27 pasos y un rendimiento final del 6%³⁴ y en el 2007 se reportó por última vez la síntesis completa de la molécula por otra ruta con 10 pasos y rendimiento final del 6.4% ³⁵.

En el 2005 se reportó el novedoso mecanismo de acción del compuesto OSW-1 y se probó su efecto en líneas celulares malignas de leucemia, linfoma, ovario, cerebro y páncreas, y no malignas linfocitos, fibroblastos de ovario y astrocitos. Los resultados fueron muy alentadores debido a que las células tumorales presentaron una mayor sensibilidad a la saponina OSW-1. El IC₅₀ reportado por medio de ensayos de MTT fue en promedio para las células malignas de 0.11 nM y para las células no malignas de 3.23 nM ³⁶.

El compuesto OSW-1 fue probado también en líneas celulares de cáncer de mama demostrando también una potente actividad anticancerígena. Para la línea celular MCF7 y MDA-MB-231 obtuvo un IC₅₀ de 7x10⁻⁶ M y 5x10⁻⁷ M respectivamente³⁷.

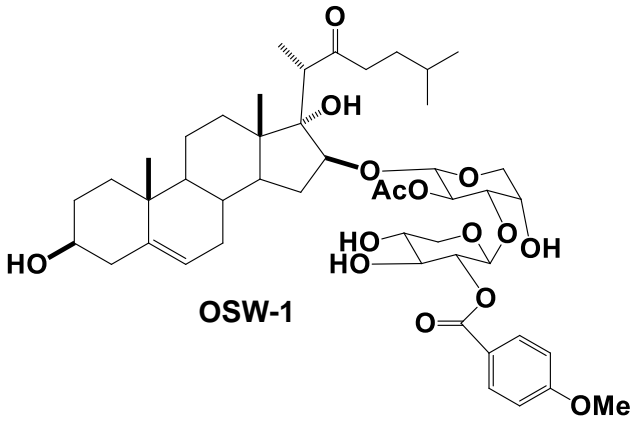


Ilustración 4 Estructura de la saponina OSW-1

BSS4

El compuesto BSS4 (Ilustración 4) es una sapogenina colestánica, análoga a la aglicona de la saponina OSW-1. La síntesis de este compuesto se realiza a partir de la apertura del anillo E de la diosgenina¹⁴.

La reacción de síntesis consiste en disolver 7 mmol de diosgenina en 20 ml de CH₂Cl₂ y 10 ml de Ac₂O (106 mmol) a 0 °C; en seguida, adicionar gota a gota 6 ml de BF₃OEt₂ (48 mmol) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, agregar a la mezcla de reacción 50 ml de agua helada. La fase orgánica se lava cuatro veces con 50 ml de una solución

Justificación

Encontrar un tratamiento efectivo contra el cáncer de mama triple negativo es de gran relevancia debido a que el pronóstico clínico nunca es alentador, suele presentarse en mujeres premenopáusicas, tener recaídas tempranas y metástasis dentro de los primeros 3 años de diagnóstico principalmente en cerebro y pulmones. Las saponinas son fuentes naturales de compuestos esteroidales biológicamente activos. El compuesto OSW-1 demostró en diferentes estudios ser efectivo contra diferentes tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama triple negativo, pero debido a sus bajos rendimientos de síntesis y purificación no es factible aún para uso terapéutico. El compuesto BSS4, análogo de la aglicona de la saponina OSW-1 representa una buena alternativa debido a que se obtienen altos rendimientos a partir de la síntesis de diosgenina, la cual que es una materia prima abundante y de fácil acceso.

Hipótesis

El compuesto BSS4 es una alternativa para el tratamiento de cáncer de mama debido a que presenta una potente actividad anticancerígena como su análogo OSW-1.

Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar la actividad biológica del compuesto BSS4 en líneas celulares de cáncer de mama.

Objetivos específicos:

- Proponer una metodología para la evaluación de la posible actividad anticancerígena del compuesto BSS4 en dos modelos de cáncer de mama *in vitro*: MDA-MB-231 (basal/triple negativo) y MCF7 (luminal A).
- Evaluar el efecto del compuesto BSS4 sobre la viabilidad celular o proliferación de las líneas celulares en estudio.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama, MCF7 y MDA-MB-231 fueron aportadas por el Laboratorio de Biología Celular del CIBIOR-IMSS y con No. de ATCC: HTB-22TM y HTB-26TM respectivamente.

Condiciones de cultivo

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 fueron cultivadas en medio DMEM y RPMI respectivamente, suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico (stock 100X:10000 unidades de penicilina, 10000 µg estreptomina/ml), e incubadas a 37°C a una atmósfera de CO₂ al 5%. Las botellas fueron subcultivadas cuando la confluencia celular llegó a un 80 %. Para esto, las monocapas celulares fueron lavadas con PBS y tratadas con 500 µl de solución de tripsina al 0.05 % y 0.5 mM EDTA. Se incubaron a 37°C durante 5-15 minutos. Posteriormente se inactivó la tripsina con 1 ml de medio suplementado. Se recuperaron las células por centrifugación (2000 rpm por 5 minutos), y se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo nuevo. Finalmente, se adicionó una alícuota con 200 µl de células en botellas de cultivo de 25 cm² con medio nuevo.

Preparación de disolución del compuesto BSS4

El compuesto BSS4 fue proporcionado por el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos naturales de la BUAP. El compuesto BSS4 fue disuelto en etanol absoluto. Se realizó una disolución del compuesto BSS4 en etanol absoluto a una concentración de 10 mg/ml (*stock*). Para preservar se mantuvo en refrigeración a 4°C.

Condiciones de tratamiento

Los ensayos de proliferación se realizaron en placas de cultivo de 96 pozos. Se sembraron 2500 y 3000 células por pozo de las líneas MDA-MB-231 y MCF7 respectivamente en un volumen total de 100 µl por pozo. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se representan en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de los tratamientos

Tratamiento	Especificaciones
Control	Medio suplementado
Vehículo	Medio suplementado más vehículo (Et-OH) proporción 99:1
BSS4	Medio suplementado más la disolución del compuesto BSS4 proporción 99:1 para obtener una concentración final de: 25, 10, 5, y 1 µg/ml (4.6816×10^{-5} , 1.8726×10^{-5} , 9.3632×10^{-6} , 1.8726×10^{-6} Molar)

Determinación de confluencia celular

Las placas de cultivo fueron escaneadas en el IncuCyte-Zoom[®], programado para tomar cuatro fotografías por pozo cada 4 h con el objetivo del microscopio 20X durante 48 h. Al concluir el escáner se efectuó el análisis de las fotografías para determinar la variación del porcentaje de confluencia en el tiempo y obtener una curva de proliferación bajo los diferentes tratamientos.

Ensayo de viabilidad por MTT

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con un volumen final de 100 µl por pozo. Se sembraron 10 mil células en medio convencional suplementado. Una vez adheridas las células, se retiró el medio y se adicionó medio de tratamiento como se describió anteriormente, con la excepción de que dicho medio no estaba suplementado con SFB. Se mantuvo el estímulo por 24 h, al finalizar, a cada pozo con células (más 3 pozos blanco) se le adiciona 37 µl de la solución de trabajo (Tabla 4) y se incuba por 3 h a 37°C. Posteriormente, se adicionó 70 µl de DMSO a cada pozo y se colocaron las placas en un agitador por 15 minutos a 475 rpm. Finalmente las placas se leyeron en un espectrofotómetro a 550 nm y 620 nm. Para calcular la viabilidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$A_{550} - A_{620} = AR$$

$$\frac{ARp - ARb}{ARc} (100) = P$$

Donde *P* representa el porcentaje de viabilidad, AR la absorbancia real, ARc la absorbancia real del control, ARp absorbancia real problema y ARb la absorbancia real del blanco.

Tabla 4. Solución de trabajo para ensayo de MTT

Componente	Porcentaje en la solución
SFB	7%
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio [5 mg/ml]	10%
Antibiótico	1%
PBS	Resto

Ensayo de proliferación

Se realizó una tinción celular con CellTrace® CFSE (carboxifluoresceína) siguiendo las indicaciones del fabricante.

En placas de 24 pozos se sembraron nueve pozos con 25,000 células teñidas con CellTrace® CFSE siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó por triplicado los tratamientos: control, vehículo y BSS4 [10 µg/ml] como se describió anteriormente (Tabla 3). El volumen final por pozo fue de 500 µl. Esto se realizó para analizar estímulo a 24 y 48 h y para cada tipo celular (MDA-MB-231 y MCF7). Al finalizar el tiempo de estímulo, las células fueron leídas en el citómetro de flujo FACSCanto™ II.

Medición del ciclo celular

Para realizar medición del ciclo celular se utilizó el kit APC-BRDU-Flow de BD®

En placas de 24 pozos se sembraron nueve pozos con 25,000 células teñidas las cuales fueron cultivadas por triplicado con los tratamientos: control, vehículo y BSS4 [10 µg/ml] al igual que en los ensayos de proliferación con CFSE. De la misma manera se realizó para analizar tiempos de estímulo de 24 y 48 h para cada tipo celular. Las células fueron tratadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante a excepción del agente intercalante para medir contenido de DNA, el cual fue sustituido por DAPI [5 ng/ml]. Posteriormente las suspensiones celulares fueron leídas en el citómetro de flujo FACSCanto™ II.

Ensayos de clonogenicidad

Este ensayo consiste en evaluar la capacidad de las líneas celulares de recuperar su proliferación y su viabilidad postratamiento. En este caso se evaluó su capacidad proliferativa en el equipo IncuCyte-Zoom® y la viabilidad celular fue medida a través de la tinción con cristal violeta.

El estímulo se mantuvo 48 h y posteriormente fue cambiado por medio control hasta alcanzar las 96 h (Ilustración 6). Se sembraron 12 pozos por cada línea celular con 3 mil células por pozo en placas de 24. Las células fueron tratadas de la misma forma que los experimentos mencionados anteriormente: control, vehículo y BSS4 [10 µg/ml]. Las células fueron analizadas cada 4 h durante 96 h en el IncuCyte-Zoom®. Inmediatamente al terminar el análisis proliferativo, las células fueron fijadas con 500 µl/pozo de una solución fijadora (10% ácido acético/ 10% metanol/ 80% H₂O) durante 5 minutos. A continuación las células se tiñeron con 250 µl/pozo de una solución de cristal violeta (0.4% cristal violeta/ 20% de etanol/ resto H₂O) por 6 minutos. Las células se lavaron cuidadosamente con agua destilada hasta quitar todo el exceso de colorante. Posteriormente se diluyó el colorante con 300 µl/pozo de la solución para diluir (30% de ácido acético en H₂O). Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

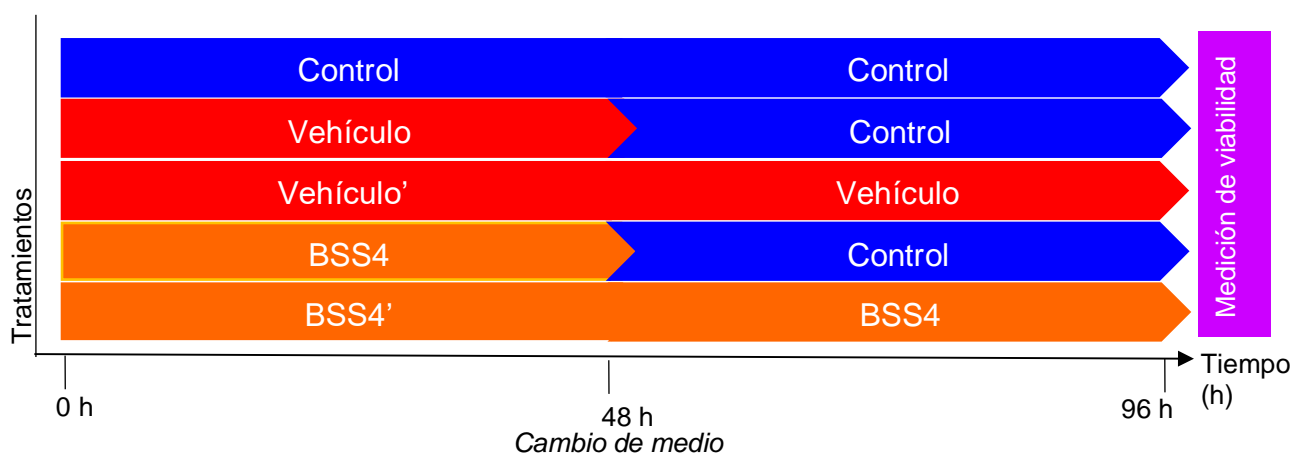


Ilustración 6 Esquema del ensayo de clonogenicidad. Se sembraron por duplicado los tratamientos vehículo y BSS4 para poder contrastar el comportamiento durante las últimas 48 horas de tratamiento problema con respecto al control.

Análisis estadístico

Los datos de citometría de flujo fueron analizados usando el software FlowJo vX.07. El software PRISM® V6.01 fue utilizado para realizar los análisis estadísticos. Las diferencias entre grupos fueron realizadas por pruebas paramétricos para el conjunto de datos obtenidos por citometría y

pruebas no paramétricas el análisis de los demás datos. Se consideraron significativos los valores probabilísticos $P < 0.05$.

Resultados y Discusión

Ensayo de viabilidad por MTT

La viabilidad de las líneas celulares utilizadas no se ve afectada significativamente a las 24 h en ninguno de los tratamientos descritos anteriormente. Las medias de viabilidad son menores en la línea celular MDA-MB-231, lo cual podría indicar una mayor sensibilidad al compuesto BSS4 (Figura 1). Con base en estos resultados se determina que el etanol en proporción 1:99 es inocuo para las líneas celulares MF convirtiéndolo en un vehículo adecuado para el compuesto BSS4.

Determinación de confluencia celular

Siendo la confluencia celular C una variable dependiente del tiempo, es decir, $C(t)$; la variación de esta puede ser descrita por el modelo matemático malthusiano. Este modelo permite describir los cambios en la confluencia celular durante la fase de crecimiento exponencial. Dicho esto la confluencia se comporta según la ecuación:

$$C(t)_i = C_0 e^{kt}$$

Donde $C(t)$ representa la función de la variación de la confluencia con respecto al tiempo, C_0 representa la confluencia inicial, k representa la constante de crecimiento y t el tiempo transcurrido.

Haciendo uso de la primera función, la ecuación que nos permite calcular el tiempo de duplicación de la confluencia es:

$$t_2 = \ln(2)/k$$

Con base en lo anterior y los datos experimentales obtenidos en el equipo IncuCyte-Zoom® (Figura 2.a) se calcularon las constantes del incremento de la confluencia y tiempo de duplicación de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 (Tabla 5).

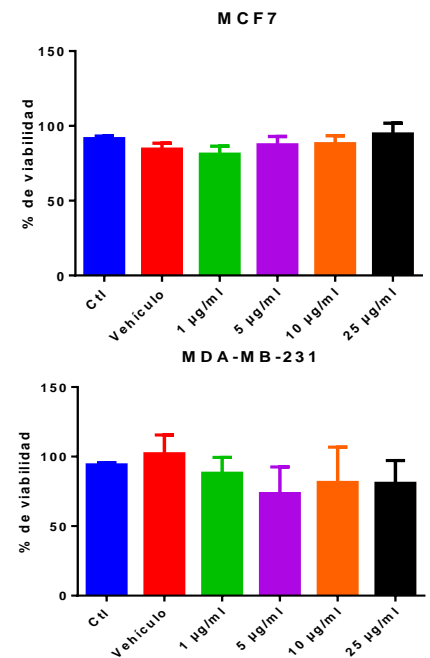


Figura 1. Porcentaje de viabilidad 24 h posteriores al estímulo en medio sin SFB. No hay diferencia significativa.

Tabla 5 Constantes del incremento de la confluencia de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Constante válida solo para la fase de crecimiento exponencial bajo condiciones estándares: 37 °C, 5 % CO₂, medio suplementado con SFB 10 %.

Línea celular	Constante de crecimiento	Tiempo de duplicación de la confluencia (h)	R ²
MCF7	0.0357	19.41	0.99
MDA-MB-231	0.0531	13.05	0.99

Esos datos nos permiten confirmar que la tasa de crecimiento de la línea MCF7 es menor con respecto a la línea celular MDA-MB-231 bajo las condiciones establecidas en el experimento durante la fase de crecimiento exponencial.

En el periodo de 0 a 48 h, $C(t)$ de los tratamientos vehículo y BSS4 [1 µg/ml] de ambas líneas celulares se comportan de la misma manera que su respectivo control. En el caso de los tratamientos BSS4 [25, 10 y 5 µg/ml] posterior a las 24 h, se observa una desaceleración en el incremento de la confluencia celular en ambas líneas celulares; dichos cambios en la confluencia celular no son significativamente diferentes.

Sin embargo, en las fotografías (Figura 2.b) se observan diferencias notables en los cultivos celulares. En la línea MCF7, lo más notable es el cambio de morfología. En el cultivo control, se observa como las células crecen agrupadas y completamente extendidas sin prolongaciones largas a diferencia de los tratamientos BSS4 [25, 10 y 5 µg/ml], en los que observamos el alargamiento de las células.

En la línea MDA-MB-231, a las 48 h no es apreciable un cambio de morfología por medio de este tipo de microscopía pero si es notable la disminución de la población. En el tratamiento control, vehículo y BSS4 [1 µg/ml] las células han proliferado tanto que ya no se logra distinguir entre una célula y otra. Mientras que en los tratamientos BSS4 [25, 10 y 5 µg/ml] todavía se distinguen las células individualmente con una confluencia del 75-80 %.

Con base en lo anterior, afirmamos que el compuesto BSS4 tiene actividad biológica a concentraciones superiores a 5 µg/ml. Es posible que para observar cambios significativos en $C(t)$ de las líneas celulares sea necesaria una exposición más prolongada al compuesto. A partir de esto, también confirmamos que las concentraciones inferiores a 5 µg/ml del compuesto BSS4 y el etanol [1%] son inocuos en estas líneas celulares. Por otra parte, se determinó que no hay diferencias

significativas de $C(t)$ entre los tratamientos BSS4 [25, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$] a las 48 h *post-estímulo*; debido esto los siguientes experimentos se realizaron únicamente con el tratamiento BSS4 a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Es importante destacar que a partir de este experimento no se puede determinar la causa por la cual existe una disminución en la confluencia. El incremento de la confluencia en un cultivo celular está determinado por el número de células iniciales, la tasa de crecimiento y de muerte celular, junto con su fenotipo y capacidad adherente. La variación en cualquiera de estas características puede afectar la confluencia celular. Se hizo la conjetura de que existe una disminución de la capacidad proliferativa de las células debido a que no se observaron células muertas en los cultivos tratados con el compuesto BSS4. Por ello el siguiente experimento fue medir directamente la proliferación celular por medio del ensayo de dilución de CFSE.

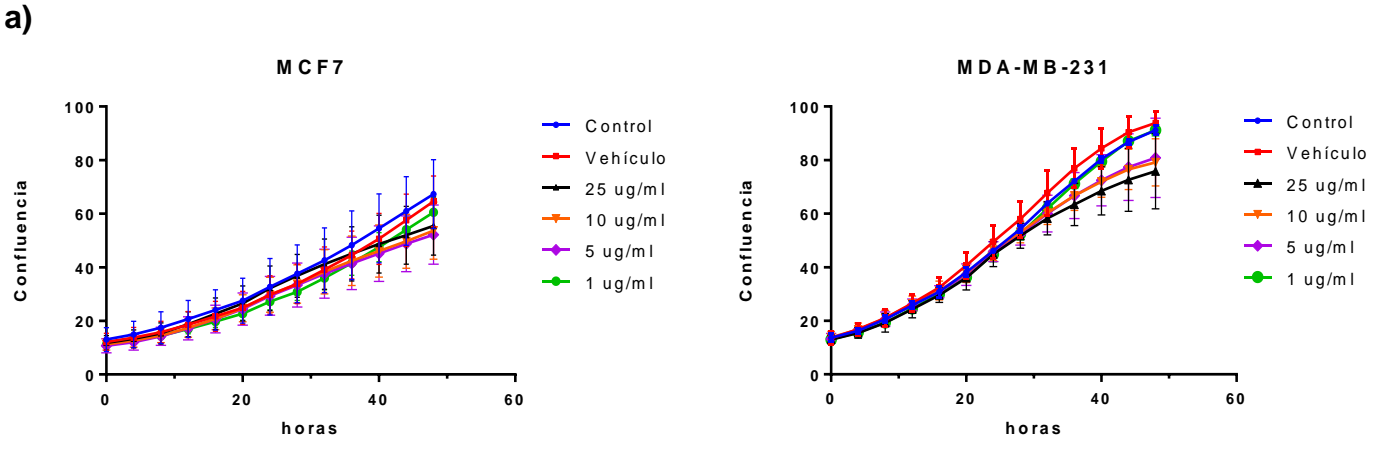


Figura 2. a. Función $C(t)$ obtenida a partir de datos experimentales, la cual describe la variación de la confluencia celular con respecto del tiempo. No hay diferencia significativa entre las confluencias de los tratamientos de las líneas celulares.

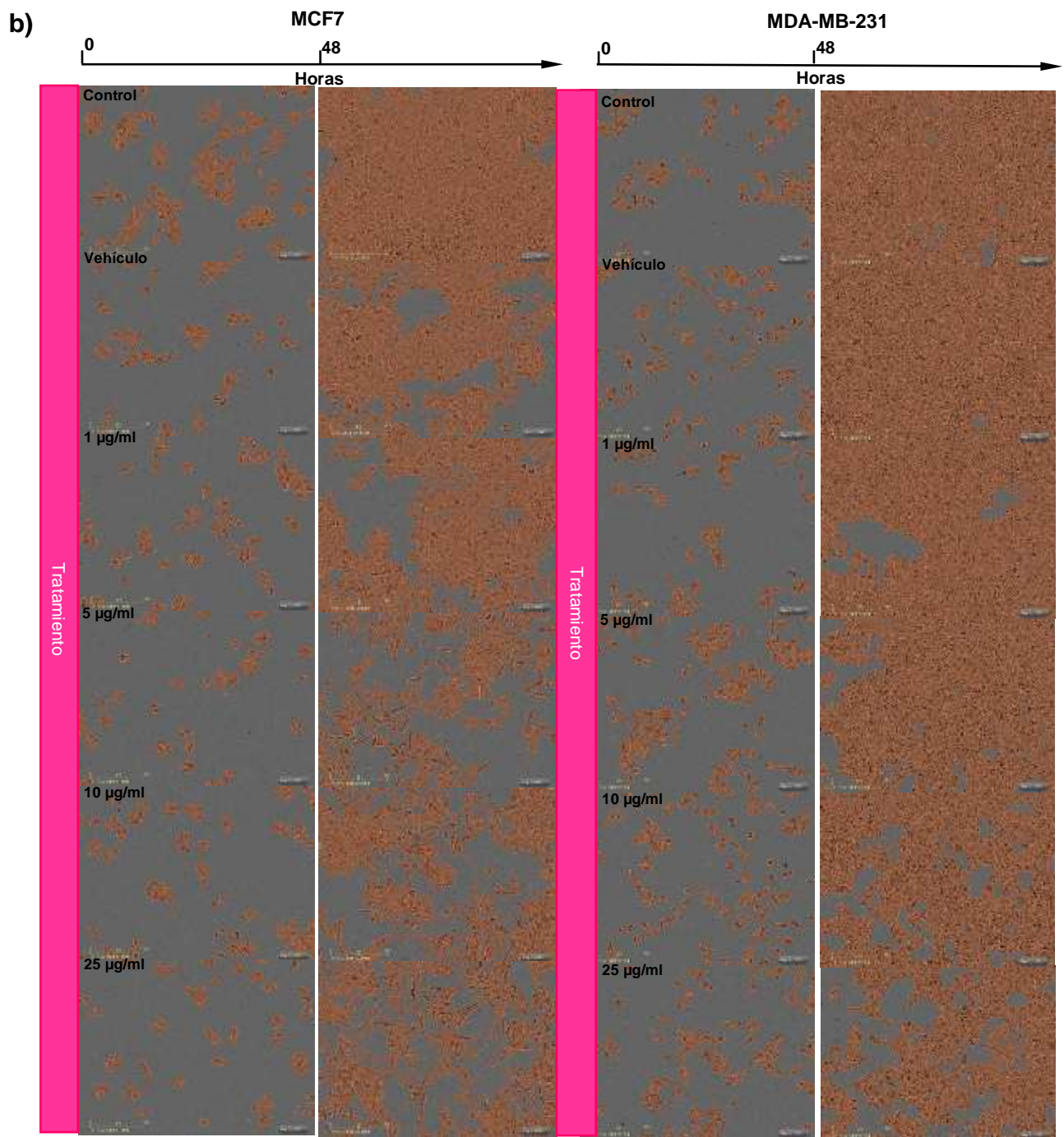


Figura 2. b. Fotografías tomadas por el equipo IncuCyte-Zoom® con el objetivo 20X. Las células se muestran en naranja a las 0 h y 48 h posteriores al estímulo con el tratamiento correspondiente. Los datos de confluencia obtenidos son el porcentaje de área ocupada por las células (en naranja) con respecto al campo visual del equipo.

Ensayo de proliferación

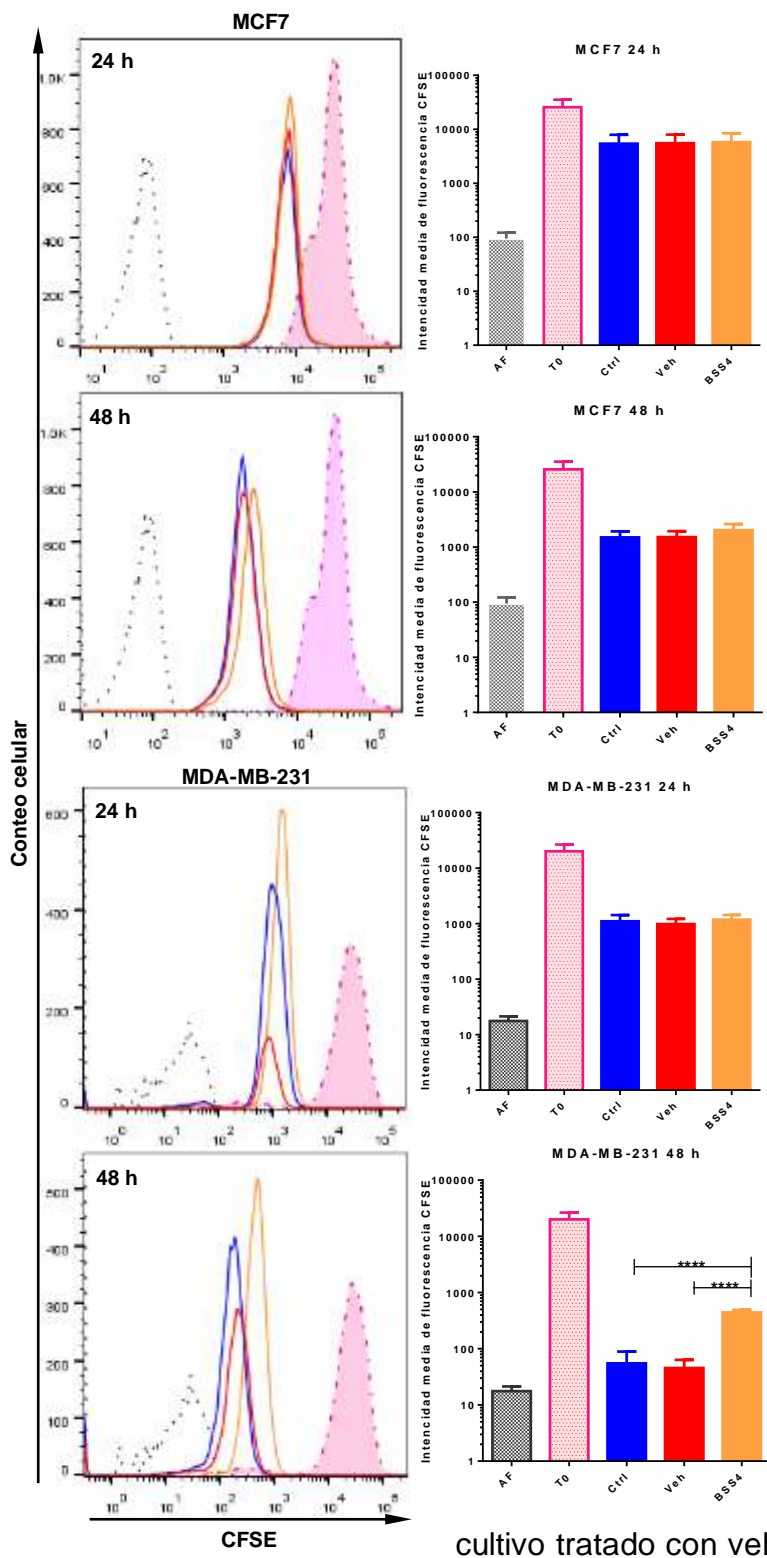


Figura 3. A la izquierda se encuentran los histogramas clasificados según el tiempo del análisis posterior al estímulo (24y 48 h) y el tipo celular. A la derecha las medias de intensidad de fluorescencia. En rosa punteado la fluorescencia al T0, gris punteado la AF, azul tratamiento control, rojo tratamiento vehículo y naranja BSS4 [10 µg/ml]. En la línea celular MDA-MB-231 existe diferencia significativa ($p < 0.0001$) a las 48 h.

CFSE es un fluoróforo que tiñe de manera estable a las células mediante la unión covalente con los grupos amino libres de las proteínas. La intensidad de fluorescencia se va perdiendo proporcionalmente a medida que las células se dividen, es decir, la dilución de fluorescencia dada por CFSE nos permite estimar la tasa proliferativa de los cultivos celulares.

Del lado izquierdo de la figura 3, se encuentran cuatro histogramas, los cuales corresponden a la medición de fluorescencia a las 24 y 48 h posteriores al estímulo con los tratamientos correspondientes de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

En color rosa punteado se indica la intensidad de fluorescencia máxima de las poblaciones celulares de todos los tratamientos al tiempo cero de estímulo (T0). En gris punteado se indica la autofluorescencia (AF) de los cultivos celulares. En azul, se indica la intensidad de fluorescencia del cultivo control, en rojo la intensidad de fluorescencia del cultivo tratado con vehículo y en naranja la del cultivo tratado con

10 µg/ml de BSS4. A la derecha de la figura 3 se encuentran los gráficos con la intensidad media de fluorescencia de los grupos poblacionales de células tratadas a las 24 y 48 posterior al estímulo con el mismo código de colores.

En ambas líneas celulares, no existe diferencia significativa entre la intensidad de fluorescencia de los tratamientos a las 24 h. En el caso de la línea MCF7, este comportamiento se mantiene hasta las 48 h. En la línea MDA-MB-231, si existen diferencias significativas entre el tratamiento BSS4 [10 µg/ml] con el control y vehículo.

La disminución en la intensidad de fluorescencia con respecto del tiempo $F(t)$ de los cultivos celulares es descrito por la ecuación:

$$F(t) = F_0 e^{-wt}$$

Donde $F(t)$ es la función de la intensidad de fluorescencia con respecto del tiempo, F_0 es la intensidad de fluorescencia inicial y w es la constante de disminución de la intensidad de fluorescencia.

Utilizando los datos experimentales obtenidos por citometría de flujo se graficó la intensidad de fluorescencia con respecto del tiempo. Ajustando los datos a una línea de tendencia exponencial se obtuvieron las constantes de disminución de fluorescencia.

Con base en la función anterior y las constantes w obtenidas se calculó el tiempo en que la fluorescencia disminuye su intensidad a la mitad, tiempo teórico en el que las células se dividen (Tabla 7).

$$t_{1/2} = \frac{\ln\left(\frac{1}{2}\right)}{-w}$$

Con base en estos resultados podemos afirmar que el compuesto BSS4 [10 µg/ml] tiene un efecto antiproliferativo en la línea MDA-MB-231. Este efecto solo es visible 48 horas posteriores a la exposición del compuesto.

Tabla 6. Constantes de disminución de la intensidad de fluorescencia en el tiempo de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Tiempo de disminución media de la intensidad de fluorescencia, equiparable al tiempo de división celular.

Línea celular	Tratamiento	Constante w	$t_{1/2}$ de disminución de fluorescencia (h).	R^2
MCF7	Control	0.058	11.950	0.99
	Vehículo	0.058	11.950	0.99
	BSS4 [10 μ g/ml]	0.058	11.950	0.99
MDA-MB-231	Control	0.123	5.635	0.99
	Vehículo	0.127	5.457	0.99
	BSS4 [10 μ g/ml]	0.079	8.774	0.92

Medición de ciclo celular

La inhibición de la proliferación llevarse a cabo por diferentes mecanismos; uno de ellos es el arresto del ciclo celular en alguna de sus fases (mitosis, G1, S, G2, G0). Medir el porcentaje de células que se encuentran en una determinada fase del ciclo celular ayudarnos a vislumbrar de qué forma está actuando el compuesto. Con base en esta premisa realizamos un ensayo de medición del ciclo celular BRDU/contenido de DNA, el cual nos permite distinguir cuatro poblaciones (Tabla 6).

Tabla 7. Evaluación de fases del ciclo celular

Fase del ciclo celular	Incorporación de BRDU	Contenido de DNA (valor relativo)
G0	Negativo	1
G1	Positivo	1
S	Positivo	1.1-1.9
G2/M	Positivo	2

Al observar la figura 4, nuevamente no se observan cambios significativos entre las poblaciones tratadas de la línea celular MCF7 a las 24 ni 48 h. En la línea celular MDA-MB-231, se repite el comportamiento de no efecto significativo a las 24 h después del estímulo, pero sí a las 48 h posteriores. En este caso, se observa un incremento en la población G2/M.

Con base en todo lo anterior corroboramos que es necesaria una exposición mínima de 48 h al compuesto BSS4 [10 μ g/ml] para observar cambios biológicos en la línea MDA-MB-231, los cuales,

parecen indicar que hay inhibición de la proliferación por medio de arresto del ciclo celular en las fases G2/M.

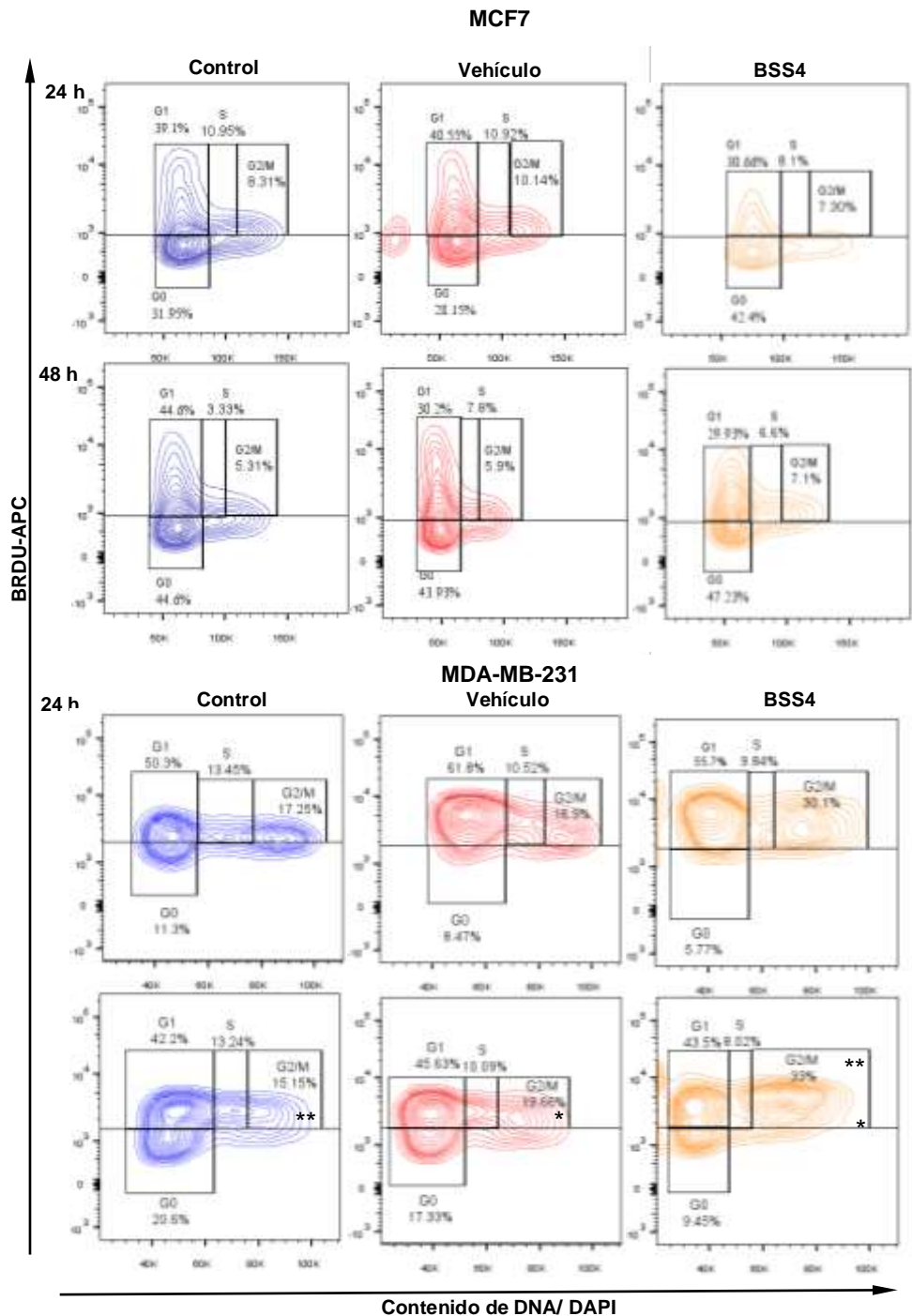


Figura 4. Diagramas tipo "countor-plot" representando la densidad poblacional de eventos celulares con las características descritas en la tabla 6, las cuales permiten subclasificar a las poblaciones en la fase G0, G1, S, G2/M. Únicamente existe diferencia significativa en el porcentaje poblacional de la línea MDA-MB-231 a las 48 h. Control- BSS4 [10 µg/ml] con un valor de $P < 0.05$; y Vehículo- BSS4 [10 µg/ml] con un valor de $P < 0.01$.

Ensayo de clonogenicidad

En este ensayo se evaluó la capacidad de recuperación de ambas líneas celulares posterior a una exposición de 48 h al compuesto BSS4 a una concentración inicial de 10 µg/ml. Simultáneamente se evaluó el efecto en la proliferación y viabilidad celular ante una exposición prolongada de 96 h al compuesto BSS4 con una dosis inicial de 10 µg/ml, esta concentración fue restaurada por medio de un cambio total de medio con compuesto a las 48 h.

Los gráficos de viabilidad celular (Figura 5.b) demuestran que al transcurrir 96 h de exposición al compuesto BSS4 la viabilidad celular de ambas líneas celulares se compromete, disminuyendo la viabilidad a ~55 % de la líneas celular MCF7 y ~27 % de la línea celular MDA-MB-231. Asimismo, la inhibición de la proliferación se mantiene durante las 96 h de exposición (Figura 5.a) disminuyendo el área ocupada por la monocapa celular en un 18.23% y 61.38% con respecto a su control de las líneas celular MFC7 y MDA-MB-231 respectivamente. Con esto también se reafirma que el vehículo no tiene efecto en la confluencia de las líneas celulares utilizadas.

En el gráfico de confluencia de la línea MDA-MB-231 se observa la recuperación de la capacidad proliferativa de las células con secuencia de tratamientos BSS4→Control, con respecto a las células tratadas únicamente con BSS4. En el caso de la línea MCF7 las curvas de proliferación de los tratamientos no son significativamente diferentes, no obstante, también se observa un incremento en la proliferación posterior a la sustitución del tratamiento BSS4 al control.

La viabilidad celular de igual forma se incrementa al cambiar el medio con compuesto BSS4 por el medio control. En el caso de las células MCF7, estas son capaces de recuperarse casi por completo una vez retirado el medio con compuesto, alcanzando una viabilidad del 86.77 %, la cual no es significativamente diferente al control. En el caso de la línea MDA-MB-231 también se incrementa la viabilidad celular al sustituir el medio con compuesto BSS4 por medio control, sin embargo, estadísticamente, la viabilidad al final de este tratamiento no es diferente a la observada en el cultivo con tratamiento mantenido de BSS4 por 96 h.

Lo descrito anteriormente es corroborado con las imágenes registradas por el IncuCyte-Zoom® (Figura 6.a y 6.b) en las que se observó un cambio morfológico. En la secuencia de tratamientos BSS4→BSS4 las células MCF7 adquieren una morfología fusiforme y la conservan las 96 horas. En la secuencia BSS4→Control, las células que presentaban morfología fusiforme recuperan su

aparición fibroblastoide al término del tratamiento. En el caso de la línea celular MDA-MB-231, los cultivos con la secuencia de tratamientos BSS4→BSS4 y BSS4→Control adquieren una morfología fusiforme a partir de las 48 h de tratamiento, la cual se mantiene a lo largo de las horas restantes del experimento. A las 96 h de tratamiento BSS4→BSS4 es evidente la incapacidad proliferativa de las células e incluso se aprecia daño celular y pérdida de la delimitación célula-célula.

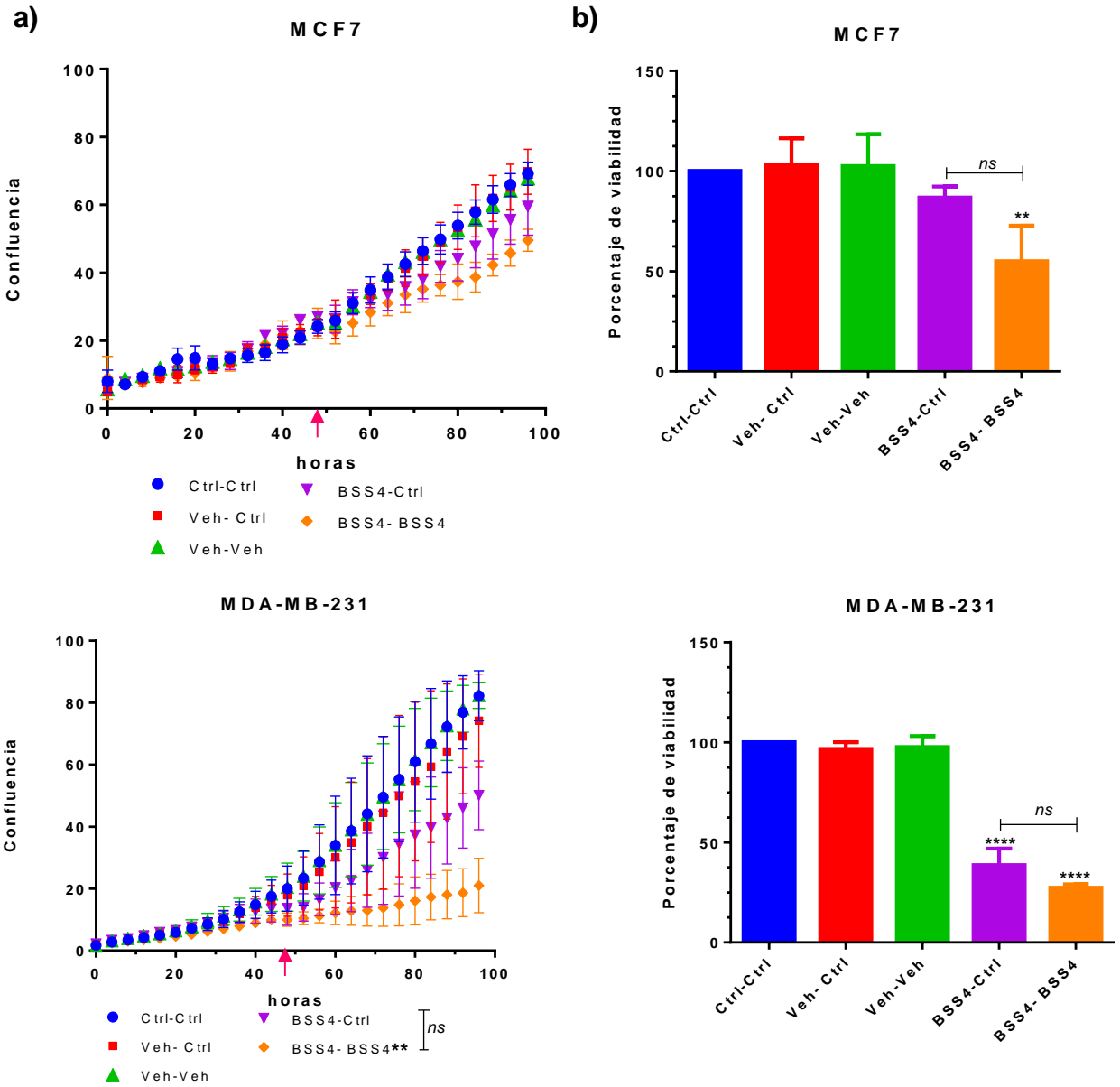


Figura 5. a) Cambio de la confluencia celular con respecto al tiempo. La flecha en rosa indica la hora en que se sustituyó el medio por medio control, medio con vehículo o medio con BSS4 [10 µg/ml]. La confluencia de la serie de tratamientos BSS4→BSS4 tiene diferencia significativa con todos los tratamientos con $P < 0.05$ a excepción del tratamiento BSS4→Control. b) Viabilidad celular al finalizar las 96 h de tratamiento. Donde ** representa diferencia significativa con $P < 0.05$ de la serie de tratamientos BSS4→BSS4 con respecto a los demás tratamientos a excepción del tratamiento BSS4→Control de la línea celular MCF7; Y **** representa una diferencia significativa con $P < 0.0001$ de los tratamientos BSS4→Control y BSS4→BSS4 con respecto a los demás tratamiento.

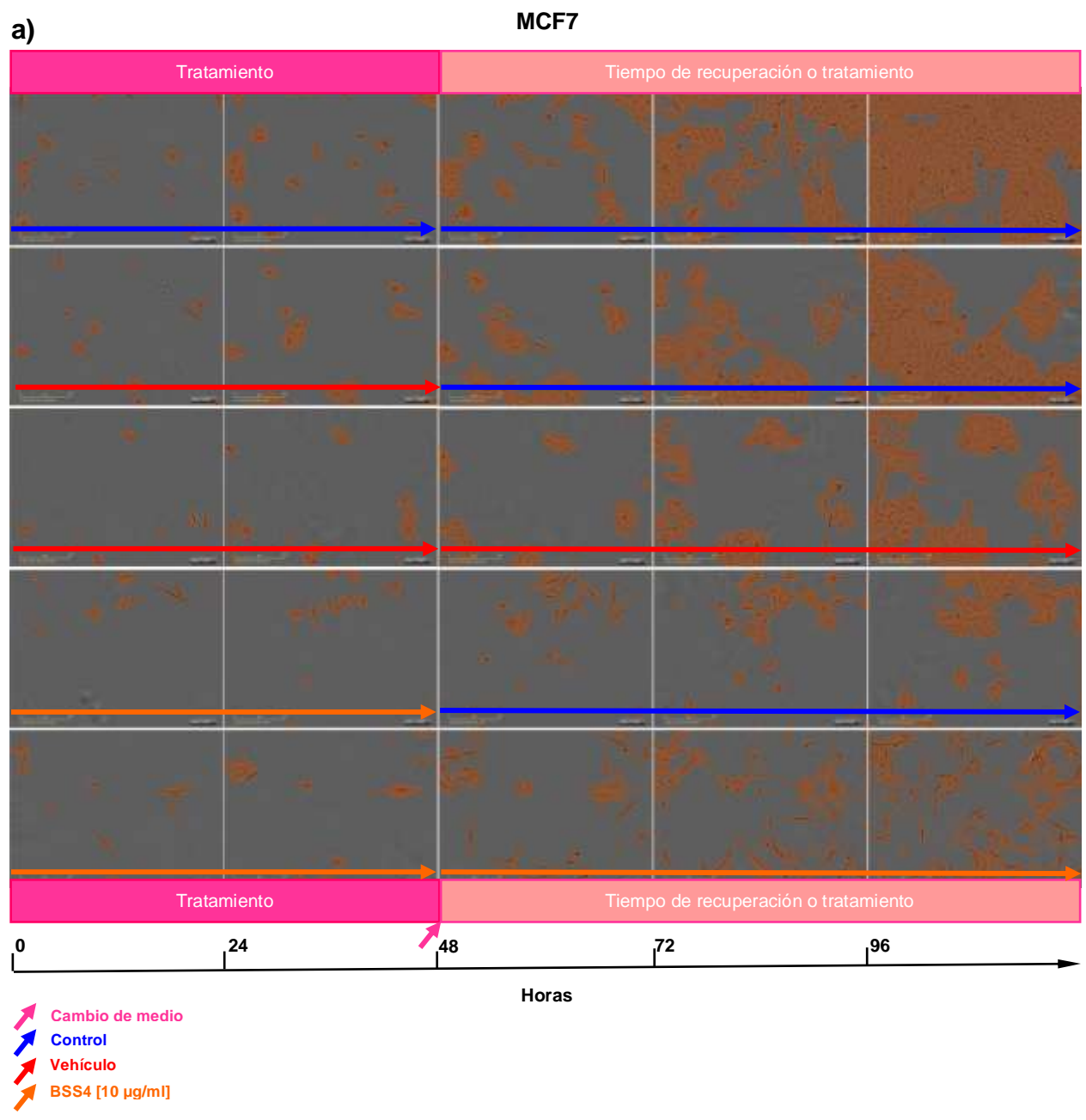


Figura 6. a) Secuencia fotográfica de las secuencias de tratamiento para determinar la capacidad de recuperación de la línea celular MCF7. Las flechas indican el tiempo y tipo de tratamiento utilizado.

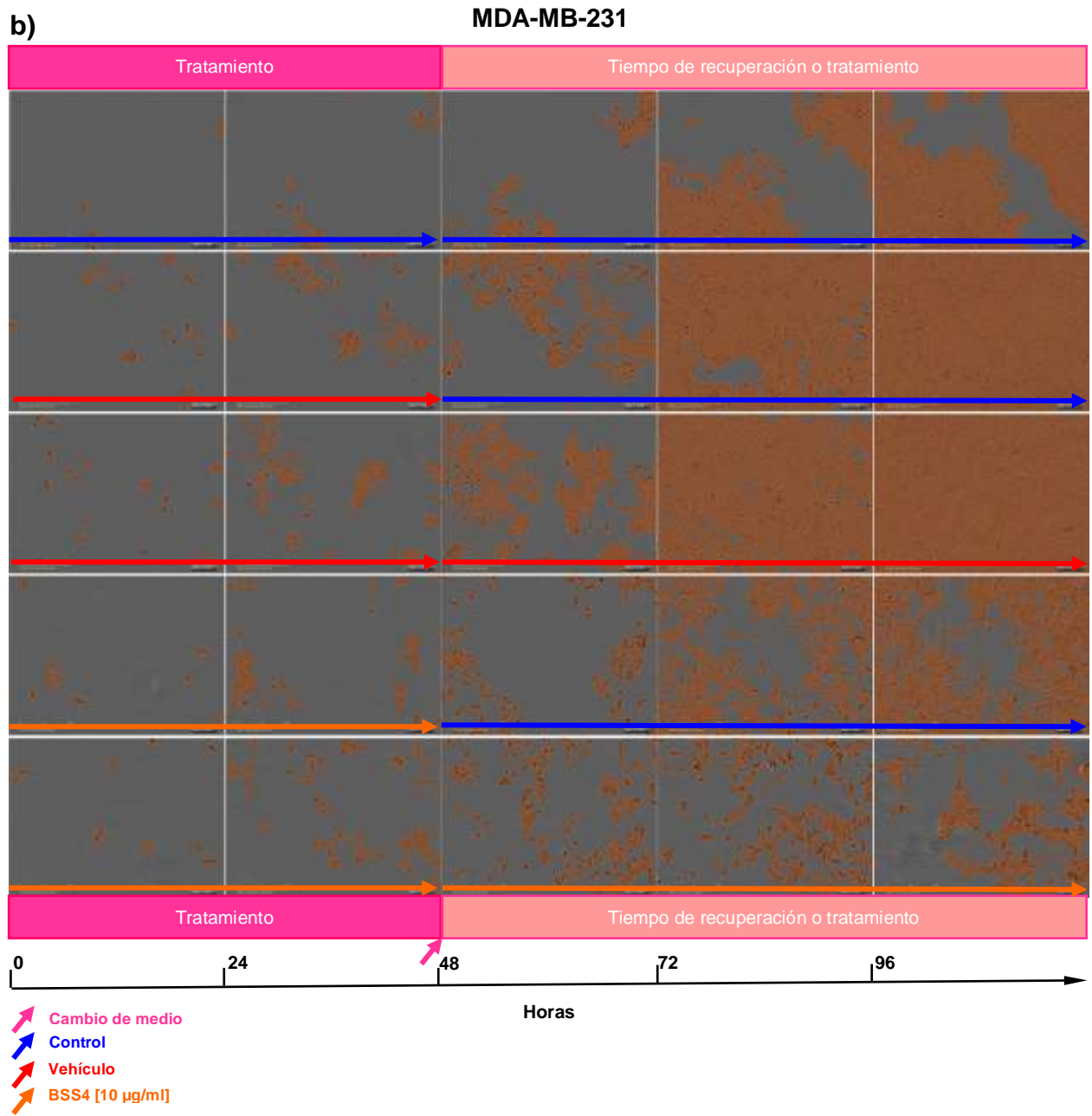


Figura 6. b) Secuencia fotográfica de las secuencias de tratamiento para determinar la capacidad de recuperación de la línea celular MDA-MB-231. Las flechas indican el tiempo y tipo de tratamiento utilizado.

Microscopía de fluorescencia (PRELIMINAR)

Metodología

En placas de 12 pozos y se cultivaron 3 pozos con cubreobjetos previamente colocados con 25 mil células, cada pozo fue tratado con las condiciones descritas en la Tabla 3, con

un volumen final de 1 ml/pozo. Las células MCF7 se incubaron bajo esas condiciones por 48 h y las células MDA-MB-231 por 72 h.

Posteriormente se fijó las células con una disolución de *para*-formaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Ulterior se realizó dos lavados con PBS. En seguida se colocó 200 µl del buffer de permeabilización [Tritón al 0.1 %, 1 % de albúmina, resto PBS] a cada pozo y se incubó durante 30 minutos, al finalizar se realizaron nuevamente dos lavados con PBS. A continuación, a cada pozo se le colocó 200 µl de buffer de bloqueo [Tween al 0.02 %, Albúmina al 0.2 %, glicina al 0.045 %, SFB al 10 %, aforado con PBS] y se dejó en agitación suave por otros 30 minutos. Otra vez se realizó dos lavados con PBS. Posteriormente se adicionó 200 µl de disolución del anticuerpo primario anti- α -tubulina [1:100] y se incubó *overnight* a 4 °C en agitación suave. Al terminar la incubación se lavó rápida y suavemente con PBS-Tween [0.2 %] dos veces. A continuación, se incubó el anticuerpo secundario marcado con Alexa-488 [1:250] durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave, cubierto de la luz. Después se lava 3 veces con PBS-Tween suave y rápidamente. A continuación se agregó 200 µl a cada pozo de una solución de faloidina marcada con Alexa-594 [1:500] más 20 µl de DAPI [5ng/ml] y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavó tres veces con PBS-Tween y se montó cada cubreobjetos en un portaobjetos. Las fotografías fueron tomadas con el microscopio ZEISS® PALM MicroBeam™

Resultados

Se observa en las fotografías (Figura 7.a y 7.b) el cambio morfológico de ambas líneas celulares. En la línea MCF7, en los tratamientos control y vehículo se ven claramente delimitados los microfilamentos de actina y extendidos a lo largo de toda la célula; también se observa mayor concentración de actina en la periferia de las células y los lamelipodios. A diferencia del tratamiento del compuesto BSS4 en el cual ya no se observa ninguna estructura de actina, simplemente se ve toda la superficie celular coloreada de rojo con pequeños huecos, lo cual podría indicarnos una despolimerización de actina. Los núcleos y microtúbulos se observan intactos en todos los tratamientos de la línea MCF7.

Por otro lado, la línea celular MDA-MB-231 lo más notable la disminución drástica de población celular en el tratamiento BSS4. También se observa un gran número de células con prolongaciones largas o células redondeadas. Lo más interesante de estas fotografías es lo que parece la bipartición

o fragmentación del núcleo en casi todas las células. Esto reafirma la idea de que el compuesto BSS4 inhibe la proliferación en la fase G2/M. En este caso los microtúbulos se encuentran intactos en todos los tratamientos.

Es necesario repetir estos experimentos debido a que algunas fotografías están desenfocadas y la tinción de actina en la línea MDA-MB-231 no se realizó correctamente. También es necesario tener un mayor número de n ya que solo se realizó una vez.

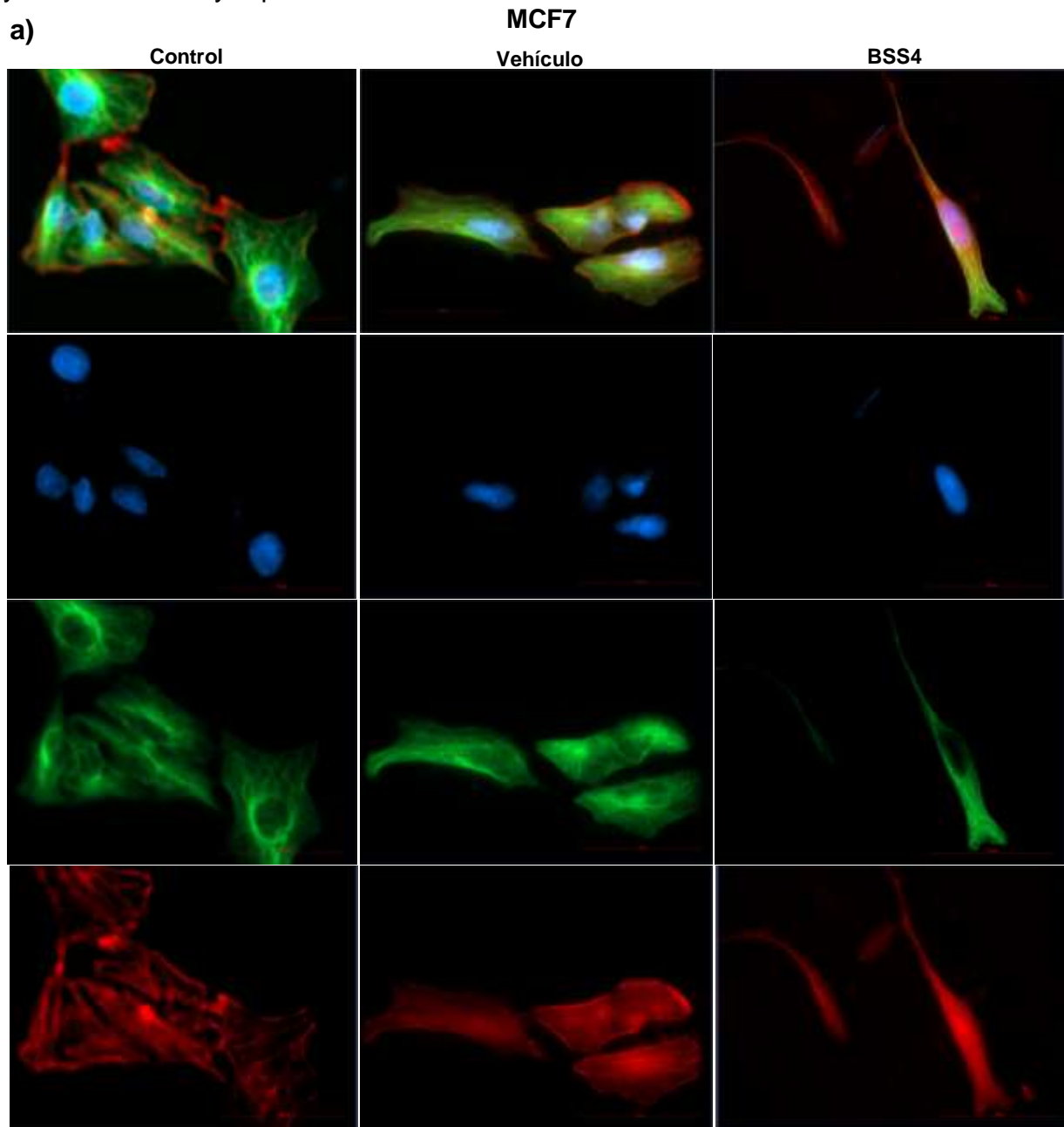


Figura 7. a) Microscopía de fluorescencia tomada con el objetivo 63X. En azul se observan los núcleos; en verde los microtúbulos marcados con anti- α -tubulina y en rojo los filamentos de actina marcados con faloidina. La tinción de actina no se realizó de forma correcta.

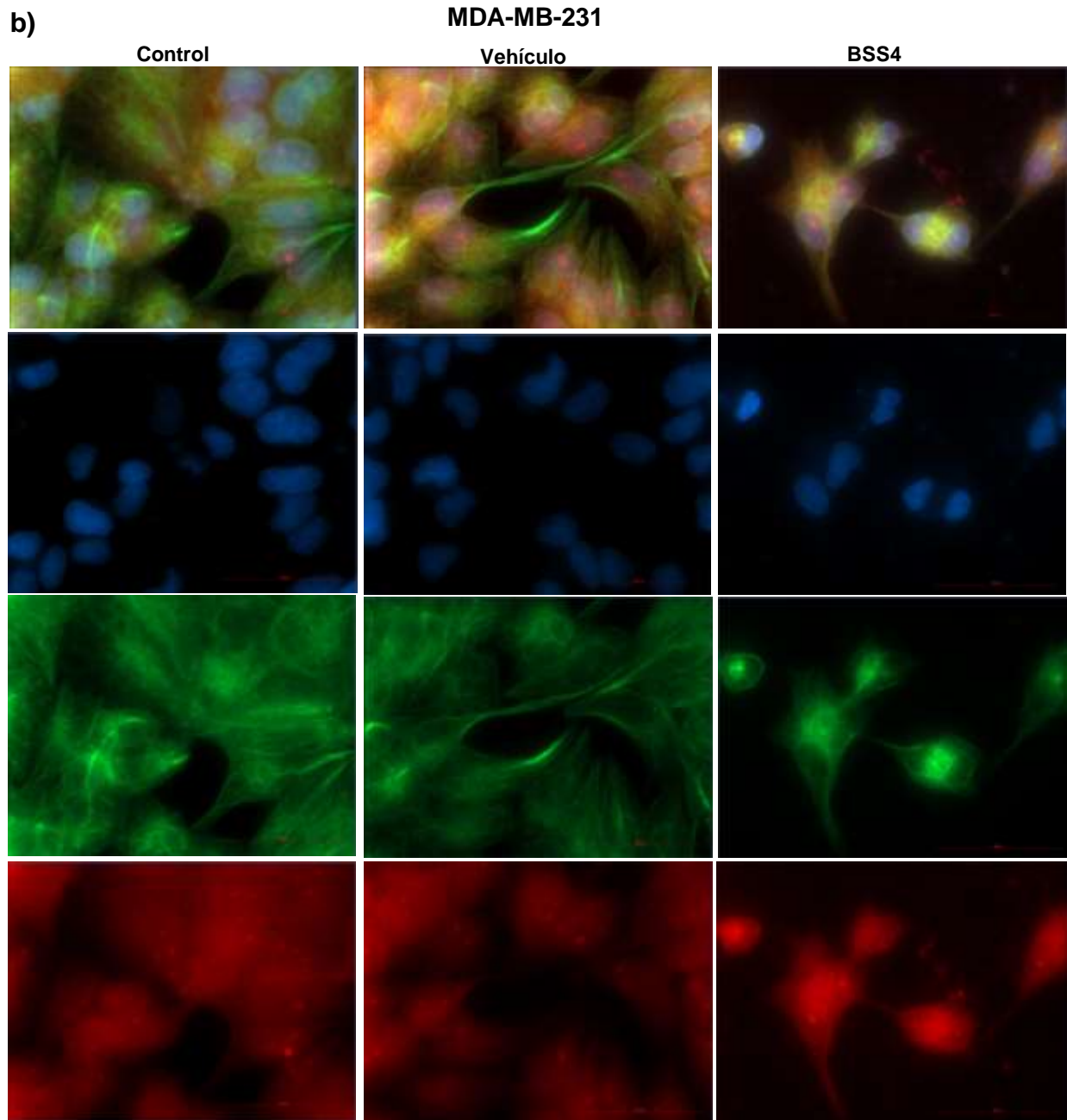


Figura 7. b) Microscopía de fluorescencia tomada con el objetivo 63X. En azul se observan los núcleos; en verde los microtúbulos marcados con anti- α -tubulina y en rojo los filamentos de actina marcados con faloidina. La tinción de actina no se realizó de forma correcta.

Perspectivas futuras

El compuesto BSS4 tiene actividad anticancerígena en la línea celular MDA-MB-231. Es necesario continuar con la investigación debido a que aún quedan muchos aspectos por concretar. Es

necesario hacer un análisis más fino de las fases del ciclo celular utilizando otro marcador como podría serlo KI-67 que nos permita distinguir entre la población en mitosis y la población en fase G2. Otro experimento necesario a futuro es la medición de muerte celular debido a que en etapas tardías de exposición al compuesto la viabilidad celular disminuye considerablemente en ambas líneas celulares. Además de esto es fundamental medir la capacidad migratoria de las células expuestas al compuesto.

Posterior a esto podría proponerse ensayos *in vivo* en algún modelo animal para observar si el compuesto BSS4 es capaz de retrasar la progresión de crecimiento del tumor o inclusive evitar la metástasis.

Conclusiones

El compuesto BSS4 tiene una actividad anticancerígena en la línea celular MDA-MB-231. Inhibe la proliferación, probablemente por arresto del ciclo celular en la fase G2 o de la mitosis.

El tiempo mínimo para observar efecto en las células es de 48 h de exposición al compuesto BSS4 a una concentración mínima de 5 µg/ml.

La línea celular MDA-MB-231 es más sensible al compuesto BSS4 que la línea celular MCF7. Esto nos indica el compuesto BSS4 puede ser un candidato para tratar cáncer de mama subtipo triple negativo.

Bibliografía

1. Wahba, H. A. & El-Hadaad, H. A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Med.* **12**, 106–16 (2015).
2. Zeichner, S. B., Terawaki, H. & Gogineni, K. A Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. **10**, 25–36 (2016).
3. Peshkin, B. N., Alabek, M. L. & Isaacs, C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Dis.* **32**, 25–33 (2010).
4. Zimmer, A. *et al.* Abstract PD6-01: Analysis of breast cancer in young women in the department of defense (DOD) database. *Cancer Res.* **77**, PD6-01-PD6-01 (2017).
5. Moore, K. L., Dalley, A. F. & Argur, A. M. R. in *Anatomía con orientación clínica*. 98–106 (Lippincott Williams & Wilkins, 2010).
6. Pandya, S. & Moore, R. G. Breast development and anatomy. *Clin. Obstet. Gynecol.* **54**, 91–95 (2011).
7. Foundation, N. B. C. Breast Anatomy-National Breast Cancer Foundation. at <<https://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>>
8. in *Normal Breast* (Elsevier Health). at <<https://www.eu.elsevierhealth.com/media/wysiwyg/PDF/Breastchapter.pdf>>
9. Farshid, G. *The Normal Breast and Risk Factors for Breast Cancer. Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* (Published by Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-

386456-7.03201-9

10. Giërach, G. Terminal duct lobular unit involution of the normal breast study. *National Cancer Institute* at <<https://dceg.cancer.gov/research/cancer-types/breast-cancer/tldu-involution-with-komen>>
11. INEGI. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 61/18 2 DE FEBRERO DE 2018 PÁGINA 1/13 "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)" DATOS NACIONALES. (2018). at <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf>
12. OMS | Cáncer de mama: prevención y control. WHO (2014). at <<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>>
13. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
14. INEGI. *Estadística a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama.* (2015). at <<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>>
15. Cáncer de mama, primera causa de muerte entre mexicanas | Excélsior. EXCELSIOR (2017). at <<https://www.excelsior.com.mx/nacional/2017/10/19/1195650>>
16. American Cancer Society. Types of Breast Cancer. at <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>>
17. American Cancer Society. Etapas del cáncer de seno. at <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/etapas-del-cancer-de-seno.html>>
18. Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J. Cancer* **7**, 1281–94 (2016).
19. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
20. Slamon, D. J. *et al.* Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783–792 (2001).
21. Badve, S. S. *et al.* in *AJCC Cancer Staging Manual* 589–634 (Springer, 2017). doi:10.1007/978-3-319-40618-3_48
22. Subik, K. *et al.* The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*. **4**, 35–41 (2010).
23. American Cancer Society. Cirugía para el cáncer de seno. (2017). at <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/cirugia-del-cancer-de-seno.html>>
24. American Cancer Society. Radiación para el cáncer de seno. (2017). at <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/radioterapia-para-el-cancer-de-seno.html>>
25. American Cancer Society. Quimioterapia para el cáncer de seno. (2017). at <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/quimioterapia-para-el-cancer-de-seno.html>>
26. American Cancer Society. Terapia hormonal para el cáncer de seno. Roche at <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-hormonal-para-el-cancer-de-seno.html>>
27. *Pertuzumab: Guía sobre el medicamento, su mecanismo de acción y los datos de los estudios clínicos.* (2013). at <http://www.roche.com.ar/content/dam/roche_argentina/es_AR/imagenes/07/backgrounders/Guia_cancer_mama_pertuzumab.pdf>
28. Roche. ANEXO I FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO *Kadcyla*. at <http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002389/WC500158593.pdf>
29. Escobar-sánchez, M. L., Sánchez-sánchez, L. & Sandoval-ramírez, J. Steroidal Saponins and Cell Death in Cancer.
30. Álvares, L., Marquina, S., Zamilpa, A. & Gonzáles, M. in *Temas Selectos de Química de Productos Naturales* (eds. Delgado, G. & Romo de Vivar, A.) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2015).
31. Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L. & Liu, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* **81**, 703–714 (2010).
32. Kubo, S. *et al.* Acylated cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. *Phytochemistry* **31**, 3969–3973 (1992).
33. Mimaki, Y. *et al.* Cholestane glycosides with potent cytostatic activities on various tumor cells from *Ornithogalum saundersiae* bulbs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 633–636 (1997).
34. Jaiare, N., Ithara, A. & Kumapav, K. Cytotoxic saponin against lung cancer cells from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. *J. Med. Assoc. Thail.* **93**, 192–197 (2010).

35. Jie Xue, Peng Liu, Yanbin Pan, and Guo*, Z. A Total Synthesis of OSW-1. (2007). doi:10.1021/JO7018812
36. Zhou, Y. *et al.* OSW-1: A natural compound with potent anticancer activity and a novel mechanism of action. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1781–1785 (2005).
37. Morzycki, J. W., Wojtkielewicz, A. & Wolczyński, S. Synthesis of analogues of a potent antitumor saponin OSW-1. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 3323–3326 (2004).

Anexos y apéndices