



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Papel de los extractos de crucíferas sobre la  
proliferación y muerte de líneas celulares de  
cáncer de mama

Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA

PRESENTA:  
Lilian Álvarez Domínguez

DIRECTOR (A)  
Dra. Paola Maycotte González

Co- DIRECTOR (A)  
Dra. Fabiola Domínguez Avilés

Junio 2023



## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Paola Maycotte González titular del laboratorio de Biología Celular II y la codirección de la Dra. Fabiola Domínguez Avilés titular del laboratorio de Biotecnología en Productos Naturales del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro social, a quienes agradezco la oportunidad brindada para desarrollar este trabajo.

Gracias por sus conocimientos compartidos, su apoyo y orientación durante este proceso.

Este trabajo contó con la colaboración del Dr. Diego Moreno, del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) perteneciente al Consejo Superior de Investigadores Científicas en Murcia, España.

A mis compañeros del Laboratorio, Alin, Karen, Benito, Lupita, Fernanda, Minuet y Adrián por su apoyo fundamental en la retroalimentación, agradezco sus comentarios constructivos en los seminarios, por acompañarme en este proceso, fue una grata experiencia trabajar con ustedes.

A mis amigas que tuve la dicha de conocer en la Facultad, Mariana y Diana, muchas gracias, sin ustedes esta etapa no hubiera sido tan amena, agradezco cada consejo y palabra de aliento, por su apoyo incondicional y siempre impulsarme por seguir con mis ideales. Su compañía en este proceso es invaluable.

Agradezco a la Dra. Rosa Andrés Hernández, catedrática de la FCB-BUAP, por siempre contar con su apoyo y orientación en el transcurso de la carrera.

## ***Dedicatoria***

*Este proyecto va dedicado a mi familia, en especial a mis padres Liliana y Charlie, que me han apoyado en este largo viaje, me han orientado a no darme por vencido, y a salir adelante a pesar de la pausa.*

*Gracias por sostenerme y estar conmigo en mi segundo primero paso, lleno de amor y esperanza.*

*A mi hermano Carlos que es mi compañero incondicional, gracias por tu confianza y sentirme tan orgullosa de ti.*

*A mis abuelos Noé, Irma y Malena que siempre han sido mi ejemplo a seguir, gracias por su amor incondicional hacia mi persona, por siempre exhortarme a ser la mejor.*

*En especial a mi abuelo Noé quien me apoyo en todo el proceso de ingreso a la FCB y desde el cielo me seguirá apoyando e iluminando mi camino.*

*Muchos de mis logros se los debo a ustedes.*

# Índice

**Resumen9**

**Introducción10**

**1.- Cáncer10**

**2.- Cáncer de mama10**

2.1.- Epidemiología11

2.2.-Factores de riesgo11

2.3.- Subtipos de cáncer de mama13

2.4.- Tratamientos y avances médicos15

**3.- Alimentos funcionales16**

3.1.- Fitoquímica de crucíferas17

3.2.- Crucíferas y cáncer17

3.3.- Glucosinolatos17

**Justificación24**

**Hipótesis24**

**Objetivos25**

**Material y metodología26**

1.- Extractos de crucíferas26

2.- Líneas celulares27

3.- Proliferación celular28

4.- Muerte celular29

5.-Análisis estadístico29

**Resultados30**

**Discusión49**

**Conclusión53**

**Bibliografía54**

## Anexos56

# Índice de figuras y tablas

<b>FIGURA 1.- INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA.</b> .....	12
<b>FIGURA 2.- HIDRÓLISIS DE LOS GLUCOSINOLATOS</b> .....	19
<b>FIGURA 3.- GRÁFICAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON TX BRA.</b> .....	30
<b>FIGURA 4.- IMÁGENES DE PROLIFERACIÓN A LAS 48 HORAS EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CM CON TX BRA, ASÍ</b> .....	31
<b>FIGURA 5.- CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LAS LÍNEA CELULAR MCF-10A</b> .....	32
<b>FIGURA 6.- CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7.</b> .....	33
<b>FIGURA 7.- PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA MDA-MB-468</b> .....	34
<b>FIGURA 8.- GRÁFICAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON TX BRA 2,</b> .....	36
<b>FIGURA 9 .- IMÁGENES DE PROLIFERACIÓN CON TX DE BRA EN LAS CONCENTRACIONES ALTAS</b> .....	37
<b>FIGURA 10.- GRÁFICAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON TX CHE</b> .....	39
<b>FIGURA 11.- IMÁGENES DE PROLIFERACIÓN A LAS 48 HORAS CON TX DE CHE</b> ..	40
<b>FIGURA 12.- PRUEBA DE MUERTE CELULAR CON YP CON TX DE BRA</b> <small>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</small>	
<b>FIGURA 13.- PRUEBA DE MUERTE CELULAR CON YP CON TX DE BRA 2</b> .....	43
<b>FIGURA 14.- PRUEBA DE MUERTE CELULAR CON YP CON TX DE CHE A LAS 72 HORAS DEL TRATAMIENTO</b> .....	44



**TABLA 1.- CONCENTRACIONES DE ITC E INDOL.....27**

## Resumen

El cáncer se caracteriza por la multiplicación rápida de células, debido a la alteración de mecanismos de división y muerte celular. Entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de mama (CM), es en la actualidad, un foco de interés en el área de investigación debido a su alta tasa de mortalidad. Esta alteración puede iniciarse en distintos tejidos mamarios como ductos y lobulillos. Desde el 2016 el CM ocupa el primer lugar en México como causa de muerte en mujeres y la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo cataloga como el cáncer con mayor incidencia a nivel mundial en la población femenina. El CM puede desarrollarse por factores no modificables como los factores genéticos y los factores modificables que están relacionados con el estilo de vida y medio ambiente. Se han establecido diversas áreas de investigación en la búsqueda de nuevas terapias con el uso de fitoquímicos, donde la familia de las Brassicaceae ha demostrado propiedades anticancerígenas debido a la presencia de sus compuestos bioactivos, como los glucosinolatos y sus derivados como Sulforafano (SFN), Iberina (IBN) e Indol-3-carbinol (I3C).

En el presente trabajo, se estudió la actividad de dos extractos de crucíferas (extracto de brotes de *Brassica oleracea var italiana* (BrA) y extracto de hoja de *Brassica oleracea var Capitata* (CHE) con dosis diferentes de SFN, IBN e I3C sobre la proliferación y muerte de líneas células de enfermedad fibroblástica (MCF-10A ) y de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468). Ambos extractos evaluados disminuyeron la proliferación celular en las 4 líneas celulares estudiadas, mientras que el extracto de CHE además indujo muerte celular a las concentraciones más altas utilizadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los extractos de crucíferas actúan como un modulador en la proliferación y muerte en las células de cáncer de mama, debido a la presencia de sus compuestos bioactivos, por lo que se podrían considerar como una posible terapia contra esta enfermedad. Sin embargo, su efecto citotóxico sobre la línea celular no tumorigénica sugiere que los extractos podrían ser tóxicos y causar efectos no dirigidos a las células de cáncer, por lo que se sugiere continuar con estudios de toxicidad.

# Introducción

## 1.- Cáncer

El cáncer se caracteriza por la multiplicación rápida de células, debido a la alteración de los mecanismos de división y muerte celular, generando el desarrollo de tumores o masas anormales en cualquier parte del organismo que puede propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (Osorio, et al 2020). Estas entidades llamadas cáncer resultan de la acumulación de mutaciones, alteraciones cromosómicas y epigenéticas que promueven un aumento en la tasa proliferativa y daño celular (Vieira, 2008).

Las células cancerosas se diferencian de las células sanas debido a los cambios moleculares, muchos de los cuales están vinculados con la reprogramación metabólica (Guido, 2008). El metabolismo del cáncer es una de las áreas de investigación más antiguas en la biología celular (DeBerardinis, 2016), y una adaptación crucial en las células cancerosas, es el aumento en la glucólisis aeróbica conocido como el efecto Warburg (Wu, 2020)

## 2.- Cáncer de mama

Existe una diversidad de tipos de cáncer que en la actualidad son focos de interés en el área de investigación, entre ellos encontramos al cáncer de mama (CM) que se define como una proliferación celular maligna que puede iniciarse en distintos tejidos mamarios: ductos (90%) y lobulillos (10%) (Dahdouh, 2017). Se presenta como la neoplasia con mayor incidencia en la población femenina y la principal causa de muerte. Entre el 5% y 6% de las pacientes con CM tienen enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico (Alvarez-Lopez, 2020), y aunado a la persistencia de esta neoplasia presenta el peor pronóstico en la población femenil (Vargas, 2021).

## 2.1.- Epidemiología

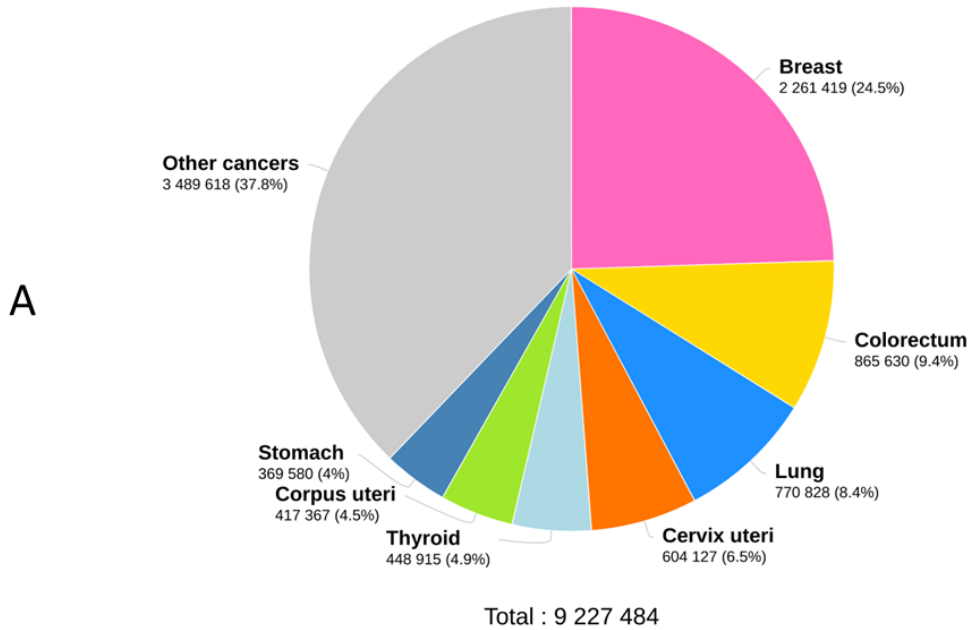
Para el año 2020 se presentaron más de 2,2 millones de casos y alrededor de 685 000 mujeres fallecieron como consecuencia de esta neoplasia (OMS, 2021). Desde el año 2006 el CM ocupa el primer lugar en México como causa de muerte por cáncer en mujeres, con un aumento notorio en las últimas 5 décadas (Grajales EG, 2014). El registro de casos por parte de la OMS (figura 1), nos indica un porcentaje de incidencia en la población femenina a nivel mundial con un porcentaje de 24.5% por arriba del cáncer colorrectal colocándose como el cáncer con mayor incidencia en mujeres de diferentes edades. En el caso de México el porcentaje de incidencia reportado en 2020 es 28.2%. Si la mortalidad anual mundial consiguiera reducirse en un 2.5 % entre 2020 y 2040, se evitarían 2.5 millones de muertes anuales por CM (OMS, 2021). Además, se calcula que las tasas de mortalidad irán en aumento a nivel mundial, llegando a un número estimado de 1.04 millones de muertes a causa de esta neoplasia en las mujeres a distintas edades (GLOBOCAN, 2020). (figura 1A, Anexos).

## 2.2.-Factores de riesgo

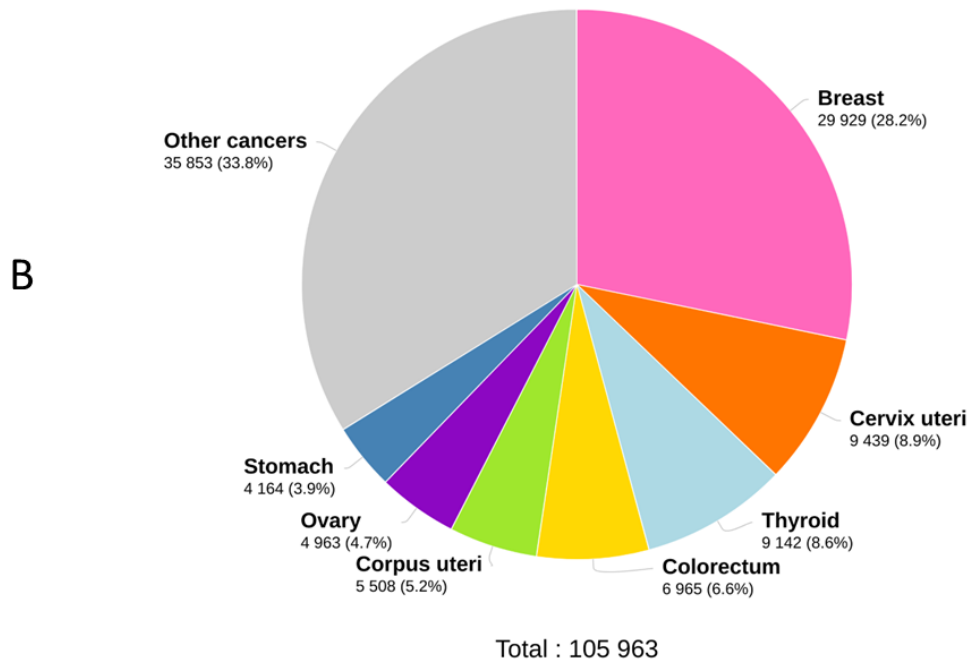
Los mecanismos precisos por los que inicia el cáncer aún no están claros (Khadijeh Barzaman, 2020), la enfermedad puede desarrollarse por factores genéticos y hormonales (no modificables) y el estilo de vida (modificables). Los primeros incluyen la menarca temprana y los factores genéticos como: edad, raza y antecedentes familiares (Osorio Bazar Niurka, 2020). Se calcula que del 5% al 10% de los carcinomas de mama son hereditarios, en su mayoría atribuidos a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. (Vieira, 2008).

Por parte del estilo de vida, que son los factores de riesgo modificables para el desarrollo de CM se encuentran los relacionados con el medio ambiente o estilos de vida como: una mala alimentación, la exposición a derivados del humo del cigarro como benzoapireno y nitrosamina, y una deficiente actividad física (Osorio Bazar Niurka, 2020).

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, females, all ages



Estimated number of new cases in 2020, Mexico, females, all ages



**Figura 1.- Incidencia del cáncer de mama.** A Incidencia del cáncer a nivel mundial en la población femenina de diversas edades y el cáncer de mama representa el mayor porcentaje con 24.5%. B Incidencia del cáncer en la población femenil en México en diversas edades, situando al cáncer de mama en primer lugar con una incidencia del 28.2%. Datos obtenidos de GLOBOCAN 2020.

Existe una relación entre la obesidad y el riesgo de desarrollar CM hormonal en mujeres posmenopáusicas (Mayer Zaharia, 2013). Además, la creciente incidencia del cáncer de mama durante el siglo 20 se ha relacionado con una exposición prolongada de las mujeres a diversos factores de riesgo, como una exposición prolongada a estrógenos endógenos, como la terapia hormonal sustitutiva, al envejecimiento de la población, el sedentarismo, el consumo de alcohol, la obesidad y a una exposición a la radiación. (J.A.Merino Bonilla, 2017). Estos factores modificables son el principal impulsor de las diferencias observadas en la incidencia del cáncer de mama (Dominika Kuran, 2020).

### 2.3.- Subtipos de cáncer de mama

En la literatura podemos encontrar diferentes clasificaciones del cáncer de mama según sea el autor y la técnica utilizada para llevar a cabo esta subdivisión, en la práctica clínica la detección y clasificación del CM se realiza por la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) que se basa en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo para determinar la expresión de biomarcadores (Soler & Haab, 2018). Con lo anterior el CM se podría clasificar en tres grupos: CM expresando receptores hormonales, receptores a estrógenos (RE+) y/o receptores a progesterona (RP+), CM que expresa HER2+ (factor de crecimiento epidermal tipo 2) y CM triple negativo (CTN, RE-, PR- y HER2-), esta clasificación por IHQ no refleja la heterogeneidad de los tumores basados en su comportamiento biológico (Irigoyen MA, 2011) pero se ha utilizado con éxito para identificar subtipos de CM y dar un tratamiento dirigido.

Debido al fácil acceso y bajo costo de la prueba IHQ se usa su clasificación en la toma de decisiones para la terapia clínica, observando que son más frecuentes las pacientes con CM RE+/RP+, las cuales se presentan significativamente con un menor tamaño tumoral (Valle-Solís AE, 2019).

En la clasificación molecular podemos encontrar diferencias al momento de realizar la división de los subtipos de CM, algunos autores reflejan 4 subtipos, así como otros

realizan la clasificación de 5 subtipos. Para realizar la clasificación los biomarcadores que se utilizan en la actualidad, en la clínica se incluye la determinación del receptor de estrógeno alfa, progestina receptores de progesterona, sobreexpresión de HER2 y el nivel de expresión del marcador de proliferación celular Ki67 (Lamb CA, 2019).

La clasificación molecular del cáncer de mama en 5 subtipos es: luminal A, luminal B, basal, enriquecido con HER2 y normal (Alvarez-Lopez, 2020), el examen del estado de los marcadores del tejido tumoral para determinar el subtipo molecular es un aspecto rutinario (Ross, 2021). Los subtipos luminales se caracterizan por la expresión de receptores de estrógenos (RE+) y/o receptores de progesterona (RP+), la clasificación de los subtipos luminal A y B se basa en diferencias en la expresión génica relacionadas a una mayor proliferación del subtipo luminal B y su correlación con la IHQ no es completa (Alvarez-Lopez, 2020) pero existen aproximaciones utilizando RE, RP, HER2 y/o Ki67 que permiten la identificación del subtipo luminal B (Lamb CA, 2019). Estos carcinomas pueden tratarse con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa (Irigoyen, 2011). El subtipo luminal A presenta receptores hormonales positivos, una baja tasa de proliferación y un buen pronóstico (Almagro, 2016), responden a la terapia con anti-estrógenos (Vieira, 2008), y este subtipo de cáncer representa más del 50% de los canceres de mama y tienden a afectar el hueso (Bonilla, 2017).

Los luminales B suelen tener también receptores positivos (RE+ y HER2+), una alta tasa proliferativa (Almagro, 2016), su incidencia es del 15% y la metástasis tiene predilección por el hueso, cerebro, hígado y pulmón (Bonilla, 2017).

Los basales son con frecuencia triple negativos (Almagro, 2016), cuyo fenotipo es RE-/RP- y HER-. Se caracterizan por la expresión de varios genes expresados en células progenitoras o basales, este perfil está vinculado a mutaciones genéticas en BRCA1 (Vieira, 2008), y representa el 12-27% de CM (Bonilla, 2017). Este subtipo de cáncer constituye un desafío debido a su difícil diagnóstico y tratamiento (Zaharia, 2013), debido a que no existe una terapia dirigida de base molecular, siendo una de las prioridades en

la investigación actual (Indré J., 2019).

Los enriquecidos en HER2 presentan un fenotipo RE- y HER2+ (Vieira, 2008), tienen un pronóstico peor que el de los luminales A (Almagro, 2016), presentan buenas respuestas a los fármacos que bloqueen la actividad de HER2, como el anticuerpo monoclonal trastuzumab en un 50% (Vieira, 2008).

#### 2.4.- Tratamientos y avances médicos

Los avances tecnológicos y la atención en la salud han permitido detectar la enfermedad en una etapa temprana y comenzar con un tratamiento (Ovando, 2020), por lo que el porvenir de las pacientes diagnosticadas ha mejorado por el diagnóstico precoz y el empleo de terapias adyuvantes (Almagro, 2016). A pesar de los avances médicos es necesario conocer los métodos preventivos básicos como la autoexploración mamaria, la mamografía y ecografía, con el fin de identificar cambios en la mama (Kuran, 2020).

El tratamiento del cáncer ha centrado la atención en una parte considerable de las investigaciones científicas la mejora de los tratamientos sistémicos durante las últimas décadas (Bonilla, 2017). Como cada cáncer se desarrolla y evoluciona de una manera única, tienen una sensibilidad distinta a determinados agentes cancerígenos (Guerra, 2017). Debido a que el CM es clínicamente heterogéneo debido a la presencia de una población de células tumorales heterogéneas que se derivan del subconjunto de células madre cancerosas (Geng, 2014), que gobiernan compartimientos que incluyen invasión, metástasis y resistencia (Barzaman, 2020), los enfoques en la búsqueda de nuevos tratamientos con el fin de contrarrestar el CM son multidisciplinarios y es una de las áreas de investigación con mayor importancia debido a esta heterogeneidad.

Al ser una de las neoplasias con mayor interés y que afecta a la población femenina a nivel global, diversas áreas de investigación se han enfocado en la búsqueda de nuevas terapias con el fin de combatir el cáncer de mama. Uno de los focos de investigación que se ha desarrollado en los últimos años es la aplicación de productos naturales. Al

respecto se han realizado diversos estudios donde se evalúa la manipulación de micronutrientes en la dieta, los cuales pueden tener un efecto protector para el CM (Grajales, 2014).

### **3.- Alimentos funcionales**

En la última década se describió como alimentos funcionales a aquellos productos alimentarios naturales que proporcionan un beneficio más allá del valor nutricional, que afectan a las funciones fisiológicas de un modo medible en términos de prevención de enfermedades o promoción de la salud. Estos alimentos funcionales contienen uno o más componentes que pueden ser tanto macronutrientes como micronutrientes, que afectan positivamente determinadas funciones del organismo por lo cual son las dianas principales en la investigación en la promoción de la salud (Ross, 2001). Dentro de esta creciente masa de investigación podemos encontrar diferentes enfoques, como el estudio de la quimioprevención, el cual es un método en el que utilizan agentes naturales o artificiales con el fin de revertir o disminuir la formación de una enfermedad crónico-generativa (Kapusta-Duch, 2012) y las terapias adyuvantes, que son un tratamiento que se administra junto con el tratamiento primario para disminuir el riesgo de que el cáncer vuelva (NIH, 2022).

Dentro de la quimioprevención encontramos tres tipos, la quimioprevención primaria, que es una estrategia en la que intervienen a personas sanas y se basa en el uso de inhibidores del cáncer en la etapa inicial. La quimioprevención secundaria se describe como una estrategia anti-progresión del tumor, y por último la quimioprevención terciaria está diseñada para prevenir la recaída de la enfermedad (Kuran, 2020).

La presencia de fitoquímicos en los productos naturales les confiere un valor distintivo en la búsqueda de nuevas terapias ya que estos pueden actuar a diferentes niveles, previniendo el estrés oxidativo, activando enzimas de desintoxicación, disminuyendo el riesgo de desarrollar cánceres, así como reduciendo la proliferación de células cancerosas. (Kuran, 2020)

### 3.1.- Fitoquímica de crucíferas

Entre los agentes naturales podemos encontrar una variedad de especímenes como las hortalizas, dentro de este grupo la familia *Brassicaceae* tiene una amplia distribución a nivel mundial (Ramirez, 2020) y es una de las familias con una enorme importancia económica. Dentro de los géneros que pertenecen a este grupo, el género *Brassica* es el más importante dentro de esta familia (Kapusta-Duch, 2012). El valor de las verduras crucíferas en la prevención del cáncer se está evaluando ampliamente, Fahey y col en 1997 fueron los primeros en introducir las propiedades anticancerígenas (Nandini, 2020) de estos ejemplares.

### 3.2.- Crucíferas y cáncer

Una de las características de las verduras crucíferas, a las que se les atribuye una parte de sus propiedades anticancerígenas, es la presencia de varios tipos de metabolitos secundarios. Un claro ejemplo son los flavonoides, que tienen propiedades relacionadas contra el cáncer (Ramirez, 2020) y que han sido evaluados en otros estudios, debido a su potente actividad antioxidante y otras propiedades fisicoquímicas (Kapusta-Duch, 2012), otros metabolitos secundarios presentes en estas verduras son los carotenoides y la vitamina C (Nandini, 2020) que llegan a presentar propiedades anticancerígenas. Un grupo de metabolitos secundarios que ha tomado relevancia en los últimos años, son los Glucosinolatos (GLS) (Jadhav, 2007), compuestos que contienen azufre y se encuentran en altas cantidades en las verduras crucíferas y pueden ser hidrolizados a compuestos bioactivos (Cabia, 2017).

### 3.3.- Glucosinolatos

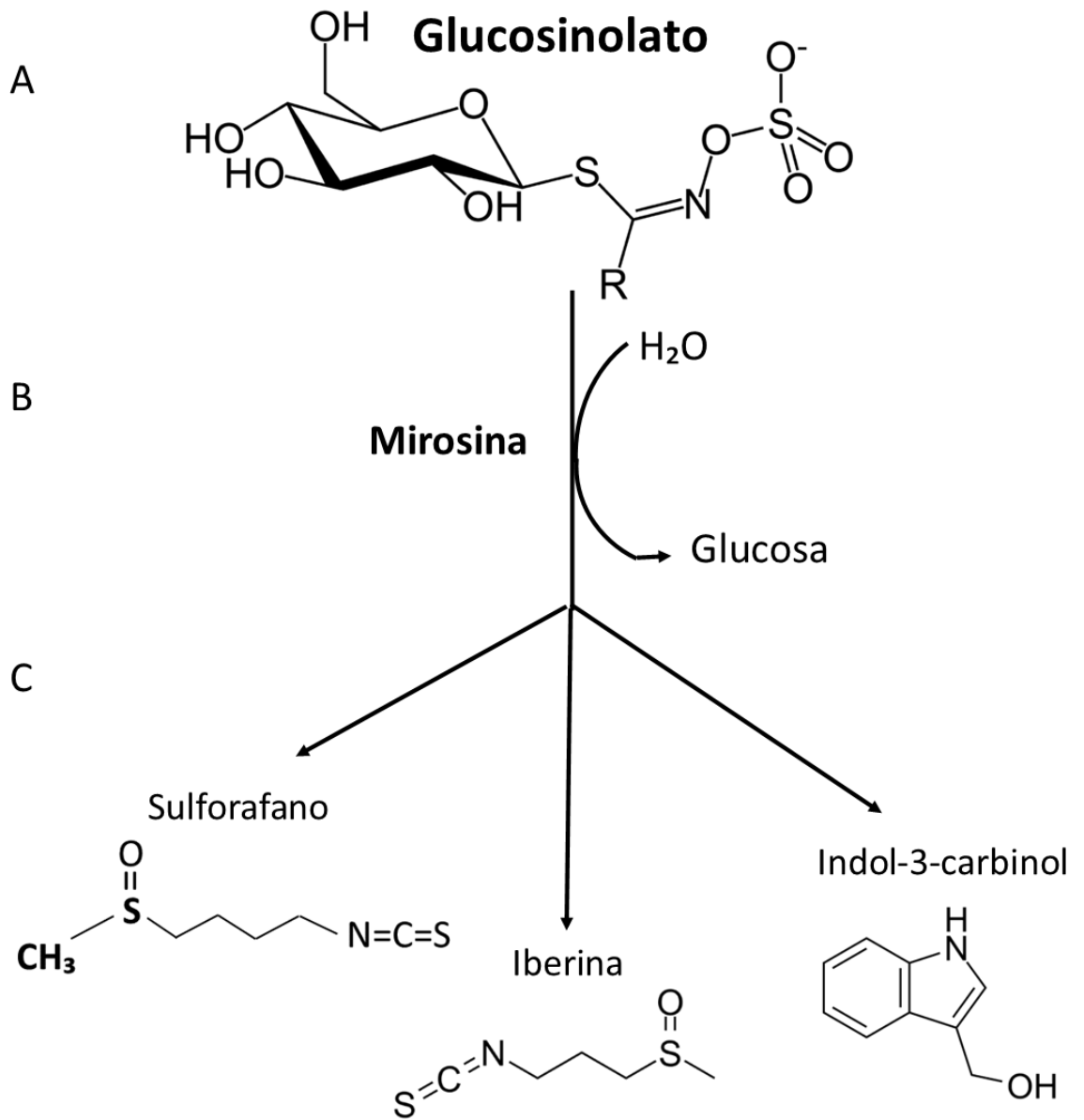
Para obtener estos compuestos bioactivos los GLS pasan por una hidrólisis. En el ambiente, esto ocurre como un mecanismo defensivo de la planta frente a patógenos o insectos. El GLS y la mirosina, una enzima que forma parte en la obtención de los compuestos bioactivos, se liberan de diferentes orgánulos subcelulares (Yang, 2016) y

tras la liberación de los GLS, estos se hidrolizan por la acción de la mirosina (Kapusta-Duch, 2012), y se forman numerosos productos de degradación, dependiendo de diferentes factores como el pH, la temperatura (Ramirez, 2020), y la formación no solo depende de la mirosina sino también de la proteína epitoespecificadora, figura 2 (Nandini, 2020). Los productos de la hidrólisis pasan por un reordenamiento químico generando Isotiocianatos (ITC), indoles, tiocianatos, nitrilos y oxazolidinetonas (Insa, 2013). En el presente estudio nos enfocaremos a dos grupos: los isotiocianatos e indoles.

Los isotiocianatos se derivan de sus precursores Glucofarina y Glucoiberina obteniendo Sulforafano (SFN) e Iberina (IBN) respectivamente (Wang W, 2005), los ITC son inductores de enzimas de fase 2, tales como glutatión-s- transferasas, que están involucradas en la detoxificación de algunos carcinógenos (Dahdouh, 2017), inhibición de las enzimas activadoras de carcinógeno de fase I, inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis. (Jadhav, 2007), por lo que son importantes debido a sus efectos quimiopreventivos.

Los ITC no solo se han probado en el cáncer de mama, también se han puesto a prueba en otros tipos de cáncer, como el cáncer de hígado, en donde se reportó que los ITC indujeron la muerte celular tanto apoptótica como necrótica, así como niveles de ROS intracelular actuando como prooxidantes (Piman, 2019).

Varios estudios que se han llevado a cabo informan que los ITC inducen la detención celular en la fase G o G/M dependiendo de las diferentes vías de señalización y un agente anti proliferativo del cáncer de mama (Jadhav, 2007); (Wang, 2005). Además, son capaces de eliminar radicales libres o aumentar la barrera antioxidante celular endógena por la activación del factor nuclear 2 (Nrf2) (Kapusta-Duch, 2012).



**Figura 2.- Hidrólisis de los Glucosinolatos** A. Estructura general de los Glucosinolatos los cuales pasan por un proceso de hidrolisis B por la enzima mirosina. C Los productos finales de la hidrolisis son isotiocianatos (Sulforafano e Iberina) e Indoles (Inole3-carbinol).

Nrf2 es un factor de transcripción que está implicado en la respuesta al estrés ambiental que se mantiene en reposo en el citoplasma unido a Keap1 (Yang, 2016), la activación de Nrf2 por los ITC se han demostrado por diversos estudios para detallar el mecanismo o la vía de señalación por la cual los ITC actúan en esta activación. Algunos estudios actuales han informado que la inducción de Nrf2 por los ITC se debe a una activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases) MAPK/ERK después del tratamiento con ITC (Nandini, 2020), aumentando ERK 1/2 fosforilado y a su vez la fosforilación de Nrf2 (Insa, 2013). Cuando Nrf2 es fosforilado este se libera del complejo Keap 1 translocándose al núcleo, uniéndose a secuencias de Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE) e induciendo la transcripción de sus genes diana de la maquinaria de detoxificación, como NADPH: quinona oxidoreductasa y proteínas antioxidantes (Yang, 2016).

Así, en las células cancerosas, se observa un mecanismo de aumento en su capacidad antioxidante mediante la activación de Nrf2. Cuando sucede una inactivación de este factor de transcripción en las células cancerosas, esto permite la acumulación de cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ROS) a niveles que inician la toxicidad y reduce la tumorigénesis (DeBerardinis, 2016).

El SFN es uno de los ITC más estudiados en relación con el cáncer, se han descrito diferentes mecanismos de acción en su actividad quimiopreventiva in vitro y en modelos animales en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Nandini, 2020), por lo que su mecanismo de acción es multidireccional contribuyendo a las estrategias de quimiopreención y manteniendo la homeostasis en el cuerpo (Dominika, 2020). Dentro de los estudios de quimiopreención, se ha evaluado a SFN como inhibidor de la carcinogénesis experimental (Yang, 2016), y en la modulación de algunas enzimas del citocromo p450 implicadas en el metabolismo de xenobióticos (Yang, 2016).

Se ha demostrado que SFN induce apoptosis celular mediada por mitocondrias (Nandini, 2020) y en la regulación de las vías de las caspasas (Cabia, 2017). Asimismo, induce la

detención del ciclo celular y actúa como antioxidante reduciendo el estrés oxidativo (Nandini, 2020). Estudios anteriores mencionan que otra de las características que presenta SFN ante el cáncer es la re-expresión de genes supresores de tumores de las células cancerosas (Nandini, 2020), del mismo modo se ha demostrado que la senescencia en las células de cáncer de mama puede estar mediada por cambios epigenéticos a consecuencia del tratamiento con SFN (Lewinska, 2017).

IBN es otro de los ITC que encontramos en las crucíferas, presenta características que le confieren propiedades quimiopreventivas muy similares a SFN como un aumento en la actividad de glutatión-s-transferasas demostrando efectos protectores en la carcinogénesis química (Jadhav, 2007). Dentro de los estudios realizados en donde evaluaron IBN en diferentes patologías, IBN demostró una fuerte inhibición del crecimiento en células de neuroblastoma (Jadhav, 2007). También se ha descrito una inducción de muerte celular por IBN provocado por la activación de la cascada de caspasas causando una muerte por apoptosis (Piman, 2019).

La descomposición enzimática de la Glucobrasicina por la mirosina produce indoles, entre ellos encontramos al Indol-3-carbinol (I3C) (Thomson, 2016). Estos no han sido estudiados con tanto detalle como los ITC, pero estudios previos mencionan que el I3C se ha asociado con un sinergismo con medicamentos enfocados en el tratamiento de CM, promoviendo una menor tasa de crecimiento tumoral (Cabia, 2017). Dentro de las características que le confieren la actividad quimiopreventiva contra el cáncer de mama, I3C presenta efectos en la inducción de apoptosis celular, producción de radicales libres y la liberación del citocromo C (Kapusta-Duch, 2012). De igual forma I3C suprime la proliferación de varias líneas celulares dirigiéndose a vías de señalización que rigen la homeostasis hormonal (Wengab, 2008). La evidencia con respecto a la inducción de la apoptosis inducida por I3C nos indica la presencia de la inactivación de Akt y su efector corriente abajo el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), este último actúa como un importante factor de transcripción que puede regular genes que tienen que ver con la supervivencia en las células cancerosas (Wengab, 2008).

Uno de los mecanismos que lleva a cabo el I3C y que llama la atención con respecto a la quimioprevención del cáncer, es su funcionamiento como un regulador de los estrógenos al inhibir la señalización de RE alfa ( $RE\alpha$ ), comportándose como un regulador negativo en la señalización en células tumorales (Weng, 2008). Una de las vías más estudiadas en el papel quimiopreventivo de I3C es la activación del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) que regula al alza la expresión de las enzimas de fase I CYP1A1 (Miembro 1 de la subfamilia del citocromo P450) que son las responsables del metabolismo de xenobióticos y las enzimas de fase II las encargadas de la conjugación de los mismos, esto se ha reportado en modelos celulares de cáncer de próstata y mama. En esta regulación está implicada la inhibición de la activación de carcinógenos químicos (Weng, 2008) demostrado ser un potente quimiopreventivo primario.

Nuevas evidencias mencionan que I3C sufre una condensación catalizada por el ácido y dependiente del pH transformándose en un oligómero como 3,3'-diindolilmetano (DIM) (Thomson, 2016). En un estudio previo, I3C, así como su derivado DIM indujeron respuestas al estrés del retículo endoplasmático donde destacan el vínculo entre el estrés del retículo endoplasmático y una regulación positiva en la expresión de genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 en células de cáncer de mama (Weng, 2008).

Estudios específicos en la aplicación de DIM arrojan que al igual que su precursor, este puede estimular las vías de desintoxicación celular, y presenta un comportamiento similar a los ITC mediando la respuesta de Nrf2 que induce una respuesta antioxidante significativa (Thomson, 2016). Se encontró una relación en la señalización de AhR y Nrf2 aumentando la desintoxicación y la reducción de la señalización inflamatoria (Thomson, 2016) demostrando que I3C, así como DIM muestran eficiencia en la modulación de la carcinogénesis en las etapas de iniciación.

Debido a los mecanismos que se han reportado en las vías de modulación de la carcinogénesis tanto en modelos de cáncer de mama como en otros tipos de cáncer para el consumo de las verduras crucíferas, ha surgido el desarrollo de alimentos funcionales

como suplementos alimenticios comerciales, los cuales aún no están aprobados por la Administración de alimentos y medicamentos (FDA) (Nandin, 2020). Para el desarrollo de estos alimentos funcionales es necesario el desarrollo de pruebas científicas sobre los procesos de evaluación funcional como toxicológicas (Ramirez, 2020), las pruebas y ensayos en el consumo de estos suplementos son escasos por lo cual no existe evidencia de los beneficios, así como de los efectos secundarios que podrían causar en una persona sana como en una mujer diagnosticada con CM.

## **Justificación**

EL cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la población femenina, considerándose un problema de salud pública por la alta tasa epidemiológica y por ser la primera causa de muerte. Los factores de riesgo que se han reportado en el desarrollo de esta neoplasia, así como el poco acceso a las terapias dirigidas, son una limitante en el combate contra esta enfermedad por lo que se prevé que su incidencia y por consiguiente su mortalidad irán en incremento. La búsqueda de nuevas terapias que permitan detener el crecimiento de las células cancerosas o prevenir su desarrollo es importante para la lucha contra esta neoplasia.

En el presente trabajo de investigación, se presenta un estudio sobre el uso de productos bioactivos procedentes de Crucíferas con el fin de estudiar los procesos de proliferación y muerte celular en líneas celulares de cáncer de mama y su posible futura aplicación como terapia para esta enfermedad.

## **Hipótesis**

La proliferación y muerte de las células de cáncer de mama humano se verán afectadas con la adición de extractos de crucíferas.

# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar el papel de los extractos de Crucíferas en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB 231, y MDA-MB 468 y una línea no tumorigénica MCF-10A

## Objetivos particulares

- 1) Evaluar en un modelo *in vitro* la proliferación de células de cáncer de mama en presencia de dos extractos de crucíferas: Extracto etanólico de hoja *Brassica oleracea var. Capitata* y extracto acuoso de brotes de *Brassica oleracea var. italiana*.
- 2) Evaluar la muerte en un modelo *in vitro* de células de cáncer de mama en presencia de un tratamiento con extracto etanólico de hoja *Brassica oleracea var. Capitata* y extracto acuoso de brotes de *Brassica oleracea var. italiana*.

# Material y metodología

En el presente proyecto se identificó el papel de los extractos de crucíferas en la proliferación y muerte en un modelo *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama y una línea no tumorigénica.

## 1.- Extractos de crucíferas

Los extractos empleados fueron obtenidos en colaboración con el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) Murcia, España, y el laboratorio de biotecnología de Productos Naturales del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) IMSS. Los extractos se obtuvieron a partir de brotes de *Brasica oleracea* var italiana (BrA y la hoja de *Brassica oleracea* var. Capitata. (CHE)

### 1.1 Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos se realizaron cultivos en un invernadero de la CEBAS-CSIC Finca experimental La Matanza (Murcia, España), posterior a la germinación las condiciones de crecimiento fueron controladas en una cámara de crecimiento con una temperatura y ciclos controlados. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido hasta su liofilización.

### 1.2 Determinación de glucosinolatos

El polvo liofilizado se extrajo de 1.5 ml de solución al 70% MeOH por 30 minutos a una temperatura de 70°C. Cada muestra se analizó en un sistema de HPLC, para la posterior determinación de glucosinolatos con el método LC-MS previamente descrito (Martinez-Sanchez 2006) y cuantificando, usando sinigrina que es un glucosinolato como estándar. La obtención de los extractos, así como la determinación de glucosinolatos se realizaron en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, en Murcia, España (Domínguez-Perles, 2010).

## A. BrA

El liofilizado de brotes de *B.oleracea* Italiana fue suspendido en agua en una concentración de 0.1g/mL, con el fin de obtener una mezcla homogénea como nuestra solución madre (SM). Al obtener una mezcla homogénea se realizaron 3 ciclos de centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos eliminando así los residuos posibles. Como último paso se realizó un filtrado de jeringa de 0.22um obteniendo una solución estéril.

## B. CHE

El liofilizado de hojas pertenecientes a *B. oleracea var. Capitata* fue suspendido en etanol a una concentración de 0.1gr/ml (SM). Debido a los pigmentos presentes y la consistencia del extracto se optó por realizar una sonicación en baño maría por 10 minutos a 26°C y 60 KHz, posterior se realizó 3 ciclos de centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos eliminando el sedimento. Con el fin de obtener una disminución de los pigmentos presentes se realizó un filtrado al vacío con una membrana de nitrocelulosa. Como último paso se realizó el filtrado para la esterilidad de nuestro extracto con filtro de jeringa de 0.22 um.

SM de los extractos fue preparada el día de su uso, así como la solución de trabajo (ST) que se obtiene de la suspensión de SM en medio de cultivo suplementado con Suero bovino fetal (SBF) al 10%.

## 2.- Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas de cáncer de mama humano MCF-7 que presenta un receptor a ER+, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 triple negativo, y MCF-10A no tumorigénica como nuestro control, fueron cultivadas con medios suplementados (Tabla 1, Anexos) y se mantuvieron en una incubadora en condiciones de 37°C y CO<sub>2</sub>.

Las líneas celulares fueron un regalo del laboratorio del Dr. Andrew Thorburn de la Universidad de Colorado, Denver. Se adquirieron del cell culture core de la universidad y se encontraban tipificadas contra líneas celulares del ATCC. Se descongelaron y no se

utilizaron por más de 6 meses.

### 3.- Proliferación celular

Para la prueba de proliferación celular, las líneas celulares antes mencionadas se sembraron en placas de 96 pozos con 100µL de medio de cultivo suplementado correspondiente, posterior a las 24 horas se retiró el medio de cultivo para agregar 150 µL de medio con las diferentes concentraciones de BrA y CHE por un lapso de 72 horas.

	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	150µg/mL	1mg/mL	2.5mg/mL	5mg/mL	15mg/mL
<b><i>B. oleracea italiana</i></b>								
<b>(BrA)</b>								
Sulforafano (µM)	53.6	13.4	268	804	5360	13400	26800	80400
Iberina (nM)	1.59	3.98	7.92	23.76	159.2	398	796	2388
Indol-3-carbinol (µM)	0.88	2.2	4.41	13.24	88.3	220.75	441.5	1324
<b><i>B. oleracea capitata</i></b>								
<b>(CHE)</b>								
Sulforafano (nM)	159	397.5	795	2385				
Iberina (µM)	12.45	31.125	62.25	186.75				
Indol-3-carbinol (nM)	219	547.5	1095	3285				

Tabla 1- Concentraciones de ITC e Indol presentes en los extractos BrA y CHE

Las concentraciones utilizadas se obtuvieron a partir de la ST, teniendo en nuestras soluciones las siguientes concentraciones de los compuestos de SFN, IBN e I3C (**Error! Reference source not found.**). Se realizaron lecturas cada 4 horas por una duración de 72 horas con la ayuda de un equipo de microcopia en tiempo real Incucyte® ZOOM, que permite hacer una aproximación de la proliferación de las células presentes con una máscara de confluencia que permite abarcar el área de la célula a partir de fotografías con un objetivo de 20x, obteniendo un porcentaje de la confluencia total. (Figura 2A, Anexos).

#### **4.- Muerte celular**

Se trataron las líneas celulares de cáncer de mama con las concentraciones de BrA y CHE durante 72 horas. Posterior de las 72 horas, las células se tiñeron con 10  $\mu$ L de Yoduro de propidio (YP) al 1x dejándolas reposar 10 minutos antes de realizar una lectura en el software del equipo Incucyte, que nos permite realizar una lectura de fluorescencia en rojo.

Se evaluó la confluencia en el canal de fluorescencia rojo para calcular el porcentaje de confluencia de células que presentan muerte celular. Las gráficas muestran la confluencia de muerte celular (rojo) como fracción del total de la confluencia celular.

#### **5.-Análisis estadístico**

Para los análisis de proliferación celular, los promedios  $\pm$  el error estándar (SE) se calcularon en una n=3, la significancia estadística se evaluó usando GraphPad Prism 9 usando ANOVA de 2 vías y la prueba de Dunnett para una prueba de comparaciones múltiples.

Para los experimentos de muerte celular, los valores medios  $\pm$  la desviación estándar (SD) se calcularon en una n=2 independientes, la significancia estadística se evaluó usando GraphPad Prism 9 usando ANOVA de 1 vía y la prueba de Dunnett. Para todos los análisis se aceptó un  $p < 0.05$  como un nivel de probabilidad significativo.

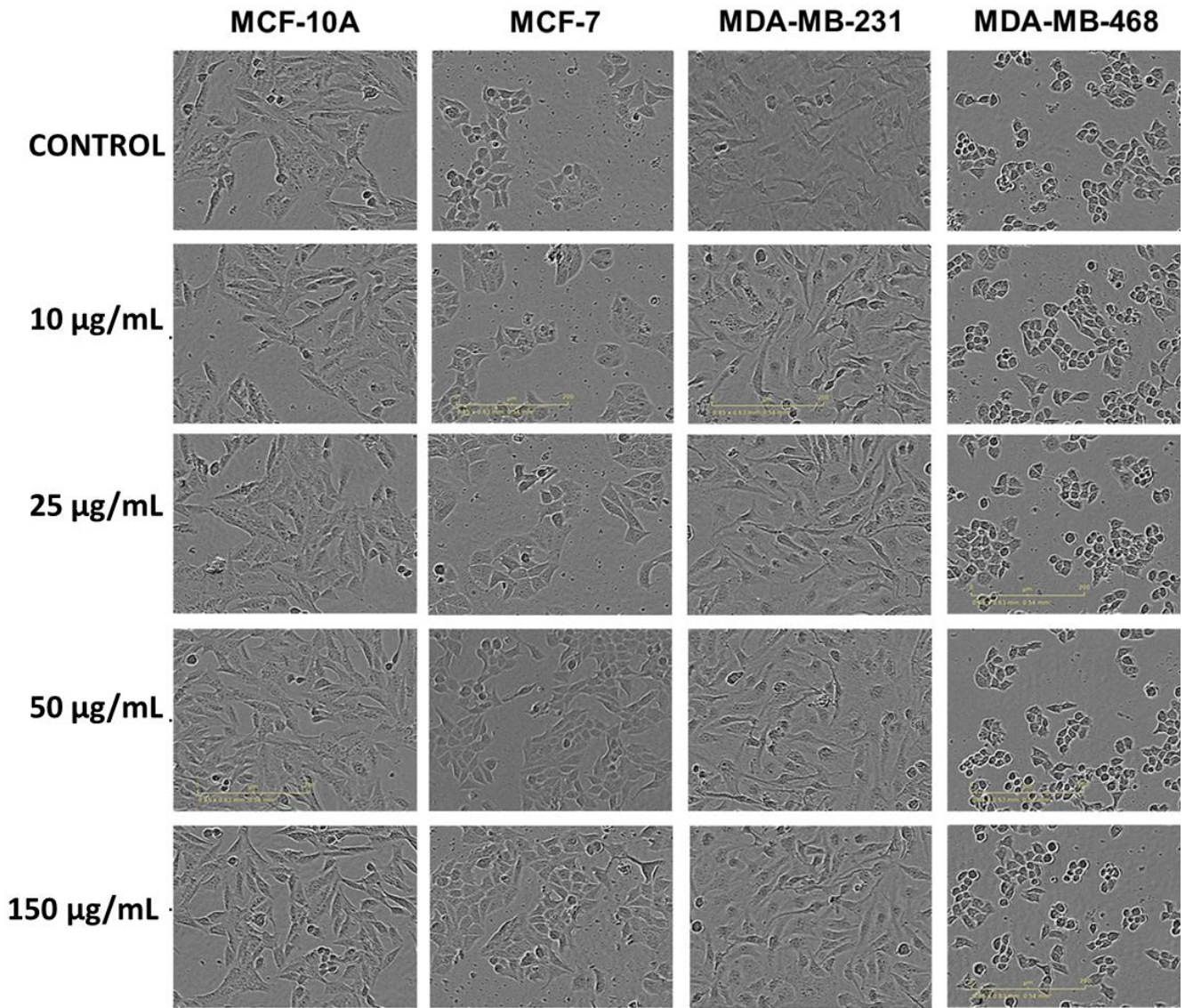
# Resultados

## Efecto de las crucíferas en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.

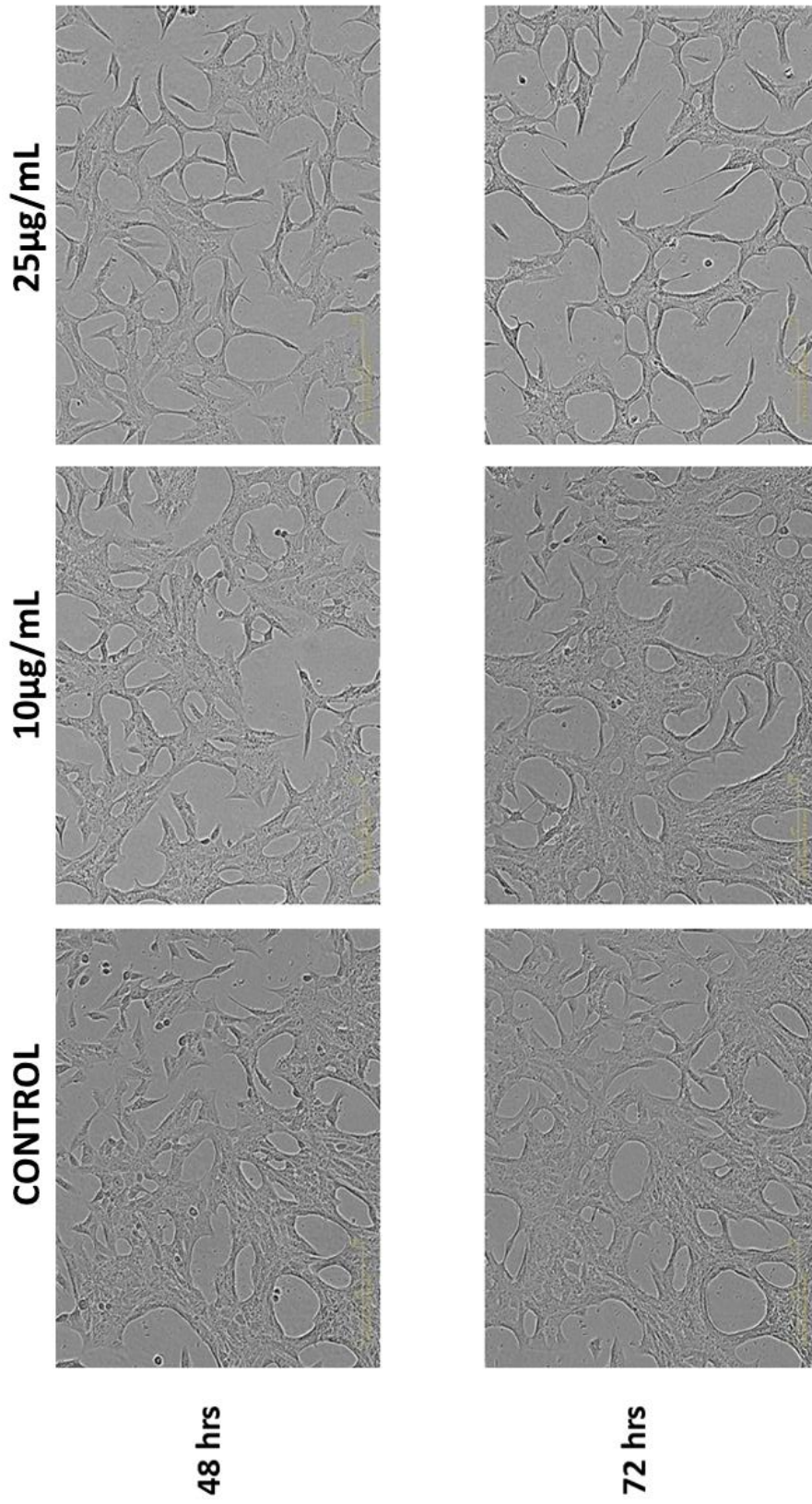
Debido a que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea se evaluaron los extractos en tres líneas celulares de cáncer de mama y una línea no tumorigénica como control. Se evaluaron dos líneas de CTN (MDA-MB-231 y MDA-MB-468), una línea positiva al RE+ (MCF-7) y una línea no tumorigénica como nuestro control (MCF-10A) con el fin de observar el papel biológico que puedan tener los extractos en diferentes subtipos de cáncer en relación con la proliferación celular.

De acuerdo con la información proporcionada por el Laboratorio de Edafología del CEBAS-CSIC se detectaron tres compuestos bioactivos en los extractos de crucíferas, SFN, IBN e I3C que son nuestro punto de interés.

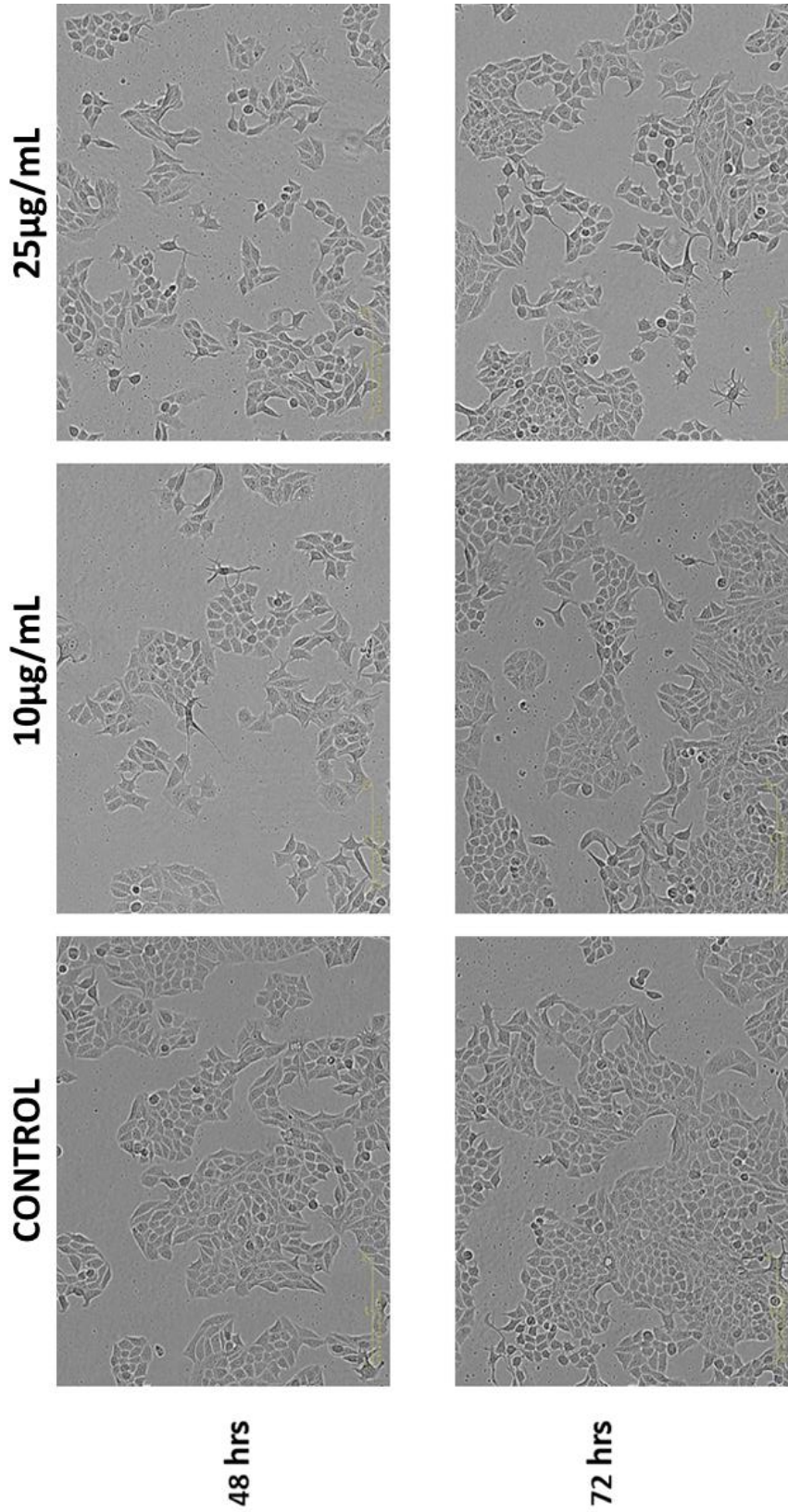
Estos compuestos fueron probados en nuestras líneas celulares observándose lo siguiente, a las 48 horas después de la aplicación del tratamiento con BrA no se observaron cambios morfológicos de las células a las diferentes concentraciones (Figura 3) con excepción de las líneas MCF-10A (Figura 4) y MCF-7 (Figura 5), donde se observó una aparente elongación de las células, lo que podría sugerir un cambio epitelio – mesenquimal, a partir de las 48 horas en las concentraciones de 10µg/mL y 25µg/mL. Este alargamiento de ambas líneas celulares fue más evidente en la concentración de 25µg/mL, específicamente en la línea MCF-10A en la cual las células toman una forma más fina respecto a su morfología normal. Para corroborar esto, es necesario realizar un Western-blot contra proteínas relacionadas al epitelio y la mesénquima a futuro y confirmar o descartar este posible efecto en ambas líneas celulares.



**Figura 3.- imágenes de Proliferación a las 48 horas en las líneas celulares de CM y la línea no tumorigénica con tratamiento de BrA en concentraciones bajas**

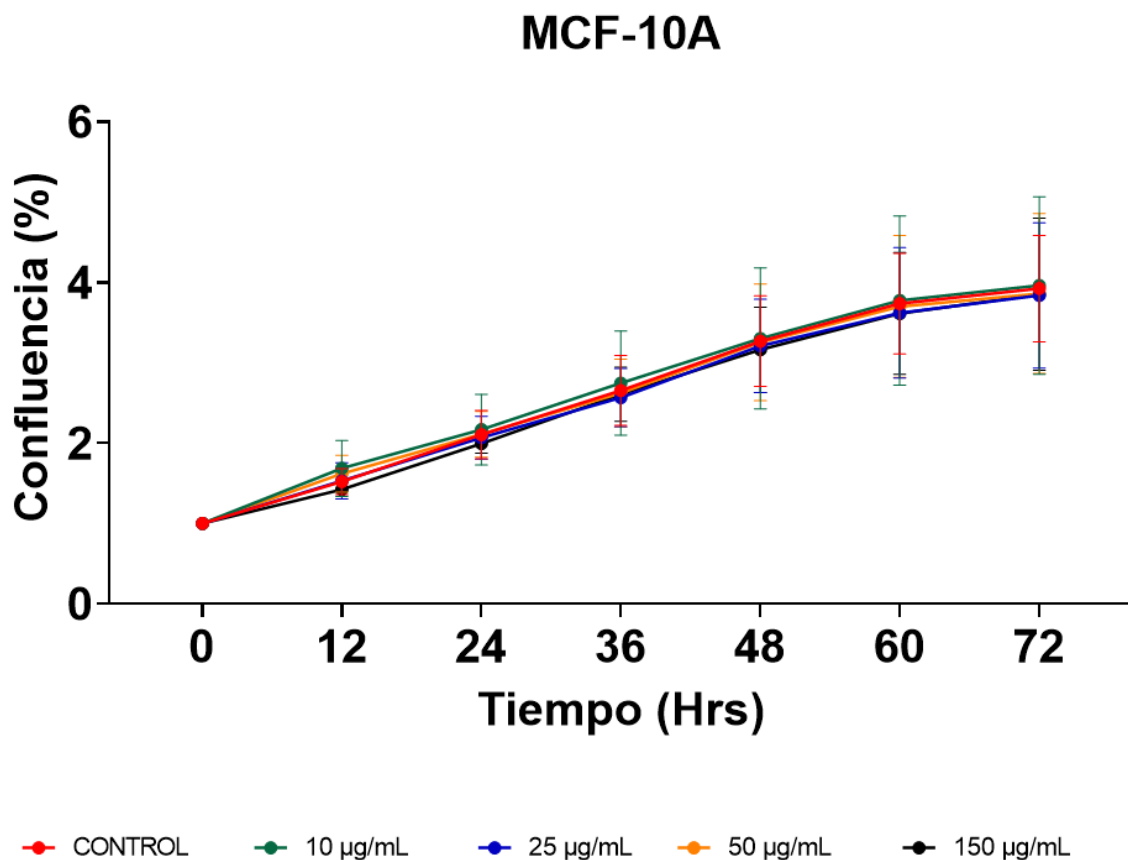


**Figura 4.- Cambios morfológicos en la línea celular MCF-10A con tratamiento de BrA a 48 y 72 horas en las concentraciones de 10µg/mL y 25µg/mL**



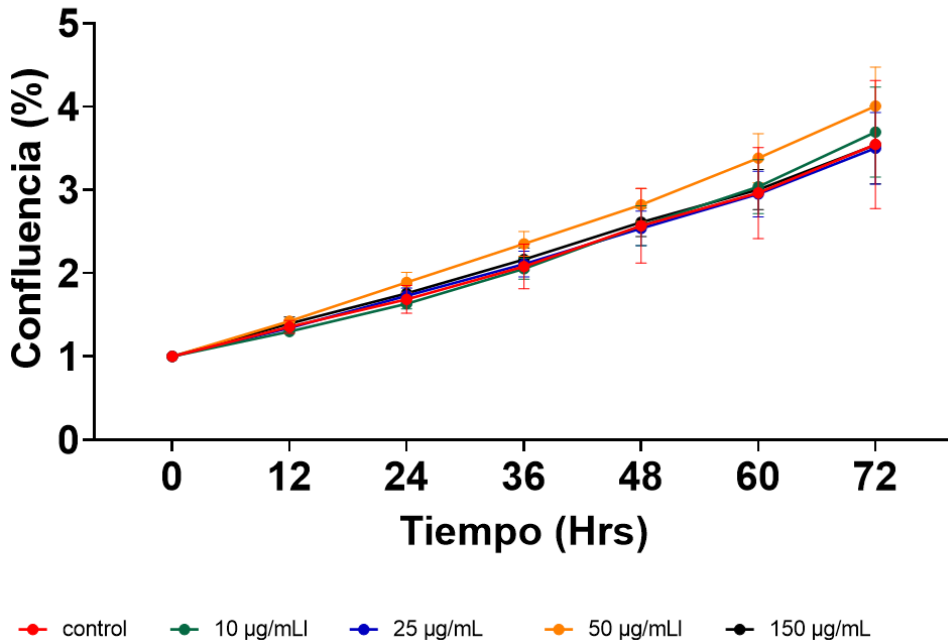
**Figura 5.- Cambio morfológicos de la línea celular MCF-7 con tratamiento de BrA a 48 y 72 horas en las concentraciones de 10µg/mL y 25µg/mL**

Calculando el porcentaje de confluencia de las células durante las 72 horas los resultados de la actividad de las concentraciones de BrA en las células mamarias humanas control MCF-10A, no mostraron diferencia significativa a concentraciones bajas (10 µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 150µg/mL) (Grafica 1) así como en las líneas MCF-7 (Grafica 2) y MDA-MB-231 (Grafica 3). En contraste, sobre la línea celular MDA-MB-468 si mostró diferencia significativa en la proliferación a las 72 horas a la concentración de 150µg/mL ( $p= 0.0060^{**}$ ) (Grafica 4)., por lo que las células mamarias MDA-MB-468 fueron sensibles a esta concentración, en las fotografías que se obtuvieron se puede visualizar la disminución en la proliferación (figura 6).



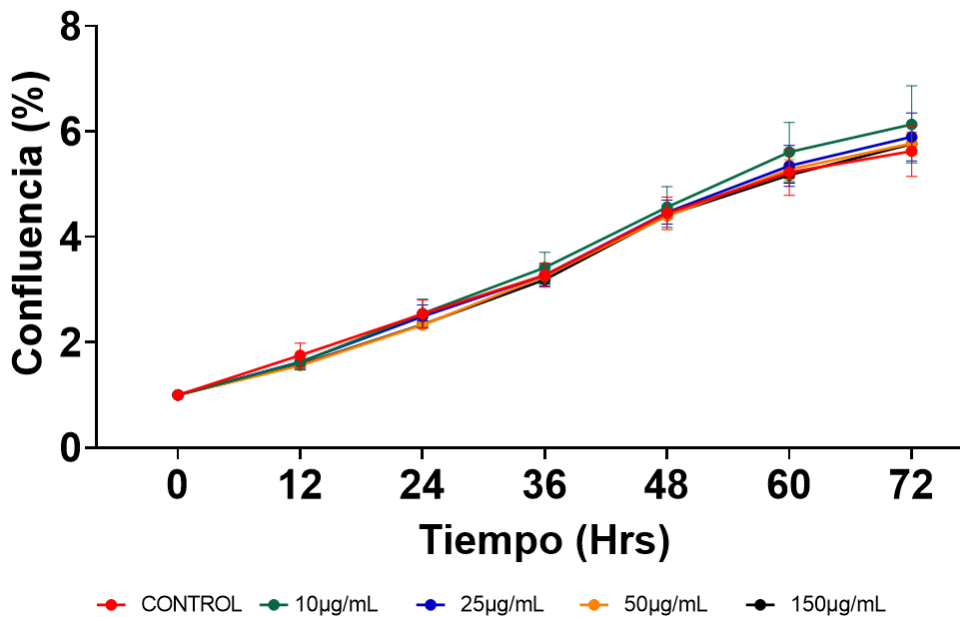
**Grafica 1.-Grafica de Proliferación celular con tratamiento de BrA, la línea control MCF-10ª no mostro ninguna diferencia significativa en ninguna de las concentraciones.**

## MCF-7



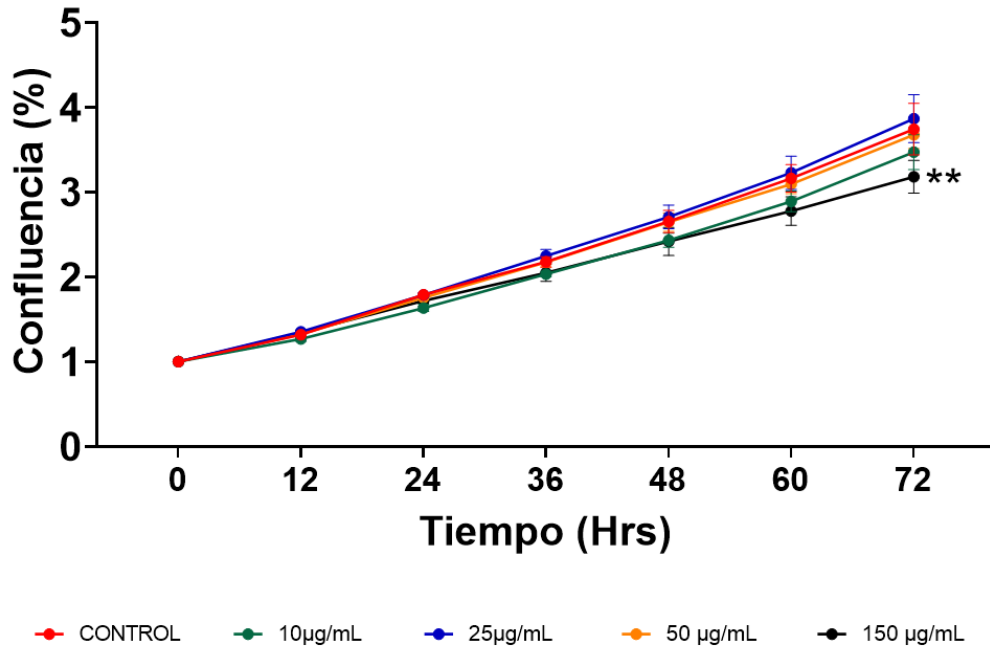
**Grafica 2.- Grafica de Proliferación celular con tratamiento de BrA, la línea celular MCF-7 (RE+) no mostro ninguna diferencia significativa en las concentraciones empleadas.**

## MDA-MB-231

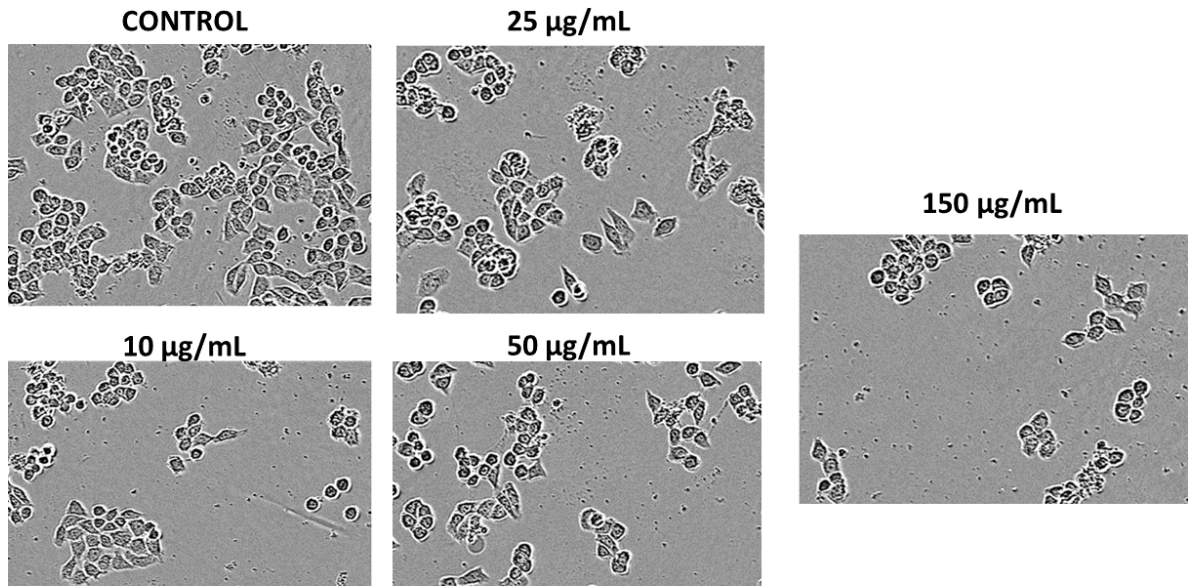


**Grafica 3.- Grafica de proliferación celular con tratamiento e BrA, la línea celular MDA-MB-231 (CTN) no mostro ninguna diferencia significativa en las concentraciones empleadas.**

## MDA-MB-468



**Grafica 4.- Grafica de proliferación celular con tratamiento de BrA en la línea células MDA-MB-468 (CTN) la cual mostro diferencia significativa respecto a su control a las 72 horas en la concentración de 150µg/mL ( $p=0.0060^{**}$ )**



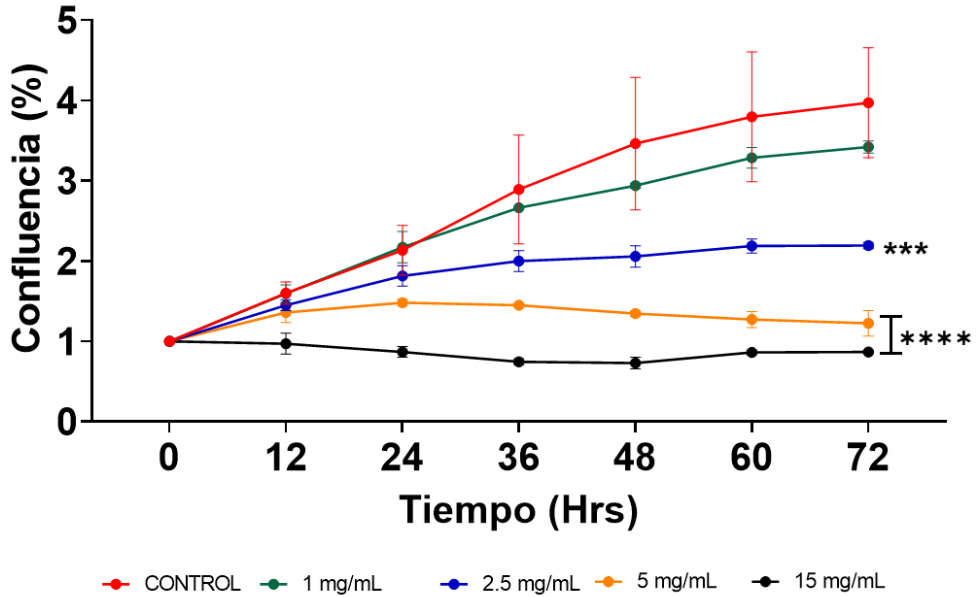
**Figura 6.- proliferación celular de la línea celular MDA-MB-468 a las 72 horas en las concentraciones bajas en las cuales si mostraron diferencia significativa respecto al control.**

En las concentraciones altas (1mg/mL, 2.5mg/mL, 5mg/mL y 15mg/mL) se observaron diferencias en la proliferación celular en todas las líneas celulares estudiadas. En la línea MCF-10A (control) se observó una disminución en la proliferación a partir de las 24 horas en la concentración de 15mg/mL ( $p= 0.0084^{***}$ ), y a las 48 horas en la concentración de 2.5mg/mL ( $p=0.0032^{**}$ ) respecto a su control. La concentración de 1mg/mL no mostró diferencias en la proliferación celular, por lo que las células son más susceptibles a las concentraciones altas inhibiendo la proliferación celular y causando muerte celular. (Grafica 5)

En la línea celular MCF-7 se observó una disminución en la proliferación a las 24 horas en las concentraciones de 5mg/mL ( $p= 0.0051^{**}$ ) y 15mg/mL ( $p= 0.0006^{***}$ ), en la concentración de 2.5mg/mL se presentaron diferencias ( $p= 0.0192^*$ ) a las 36 horas, y por último la concentración de 1mg/mL presentó una diferencia significativa ( $p= <0.0001^{****}$ ) a las 72 horas de su aplicación (Grafica 6).

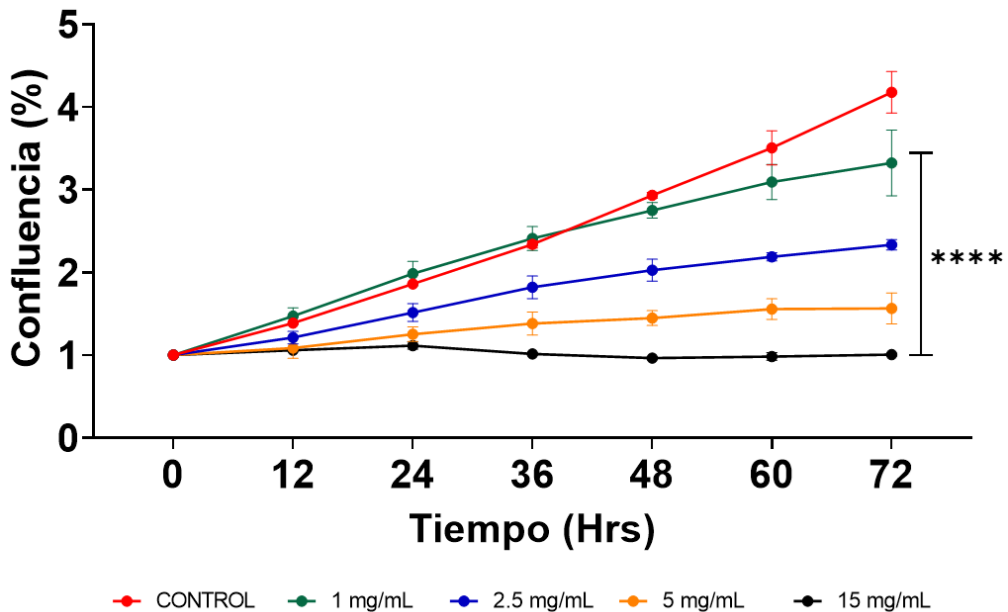
En las líneas celulares CTN, BrA indujo una inhibición de la proliferación celular. En la línea MDA-MB-231, en la concentración de 15mg/mL se observaron diferencias significativas con respecto al control ( $p= 0.0274^*$ ) a las 12 horas del tratamiento, a las 24 horas a la concentración de 5mg/mL ( $p= 0.0008^{***}$ ), a las 36 horas con la concentración de 2.5mg/mL ( $p= 0.0041$ ), y con la concentración de 1mg/mL sólo se observaron diferencias a las 72 horas ( $p= 0.0063^{**}$ ) (Grafica 7). En la línea MDA-MB-468, la inhibición en la proliferación celular se pudo observar a partir de las 12 horas en la concentración de 15mg/mL ( $p= 0.038^*$ ), a las 24 horas las concentraciones de 2.5mg/mL ( $p= 0.0100^*$ ) y 5mg/mL ( $p= <0.0001^{****}$ ) inhibieron la proliferación celular, y la concentración de 1mg/mL ( $p= 0.0031^{**}$ ) a las 36 horas. Al llegar a las 72 horas, la proliferación celular presentaba diferencias respecto a su control en todas las concentraciones estudiadas (Grafica 8).

## MCF-10A



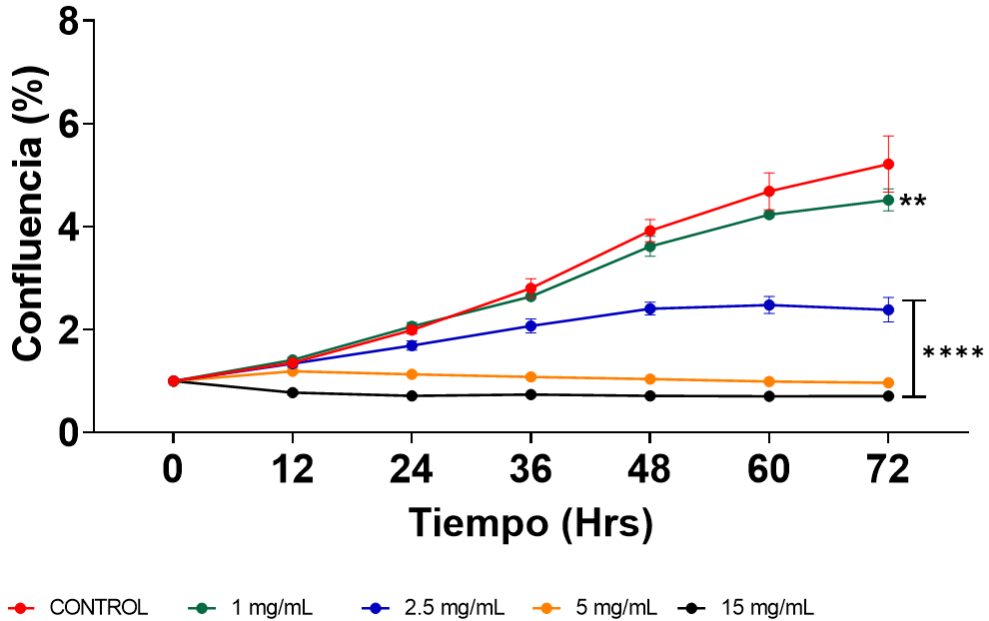
**Grafica 5.- Grafica de proliferación celular de la línea MCF-10A con tratamiento de BrA en las concentraciones altas en donde podemos ver las diferencias significativas en las concentraciones, 15mg/mL ( $p= 0.0084^{***}$ ) a partir de las 24 horas.**

## MCF-7



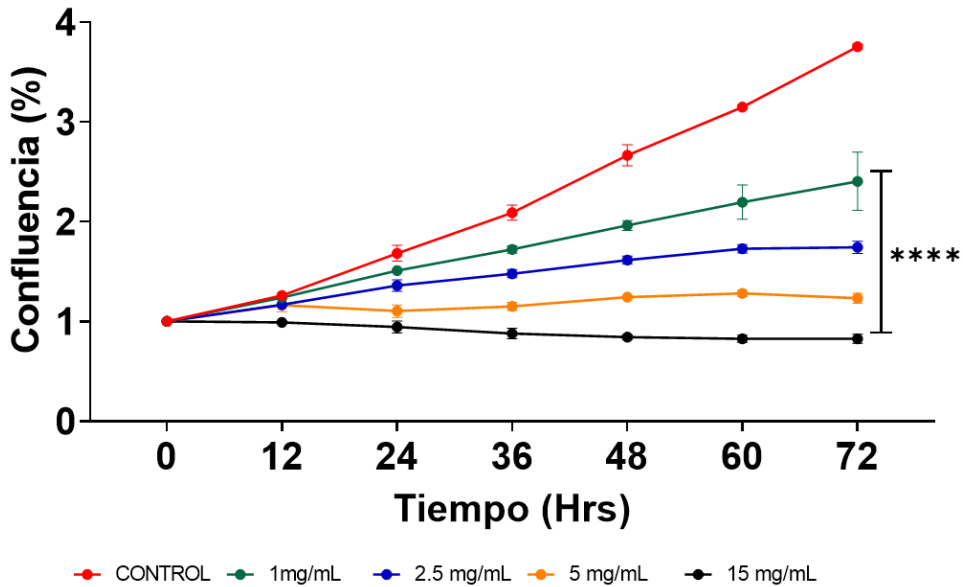
**Grafica 6.- Grafica proliferación celular de la línea MCF-7 con tratamiento de BrA en concentraciones altas, en las cuales se observaron diferencias significativas a partir de las 24 horas en la concentración de 15mg/mL ( $p= 0.0006^{***}$ ).**

### MDA-MB-231



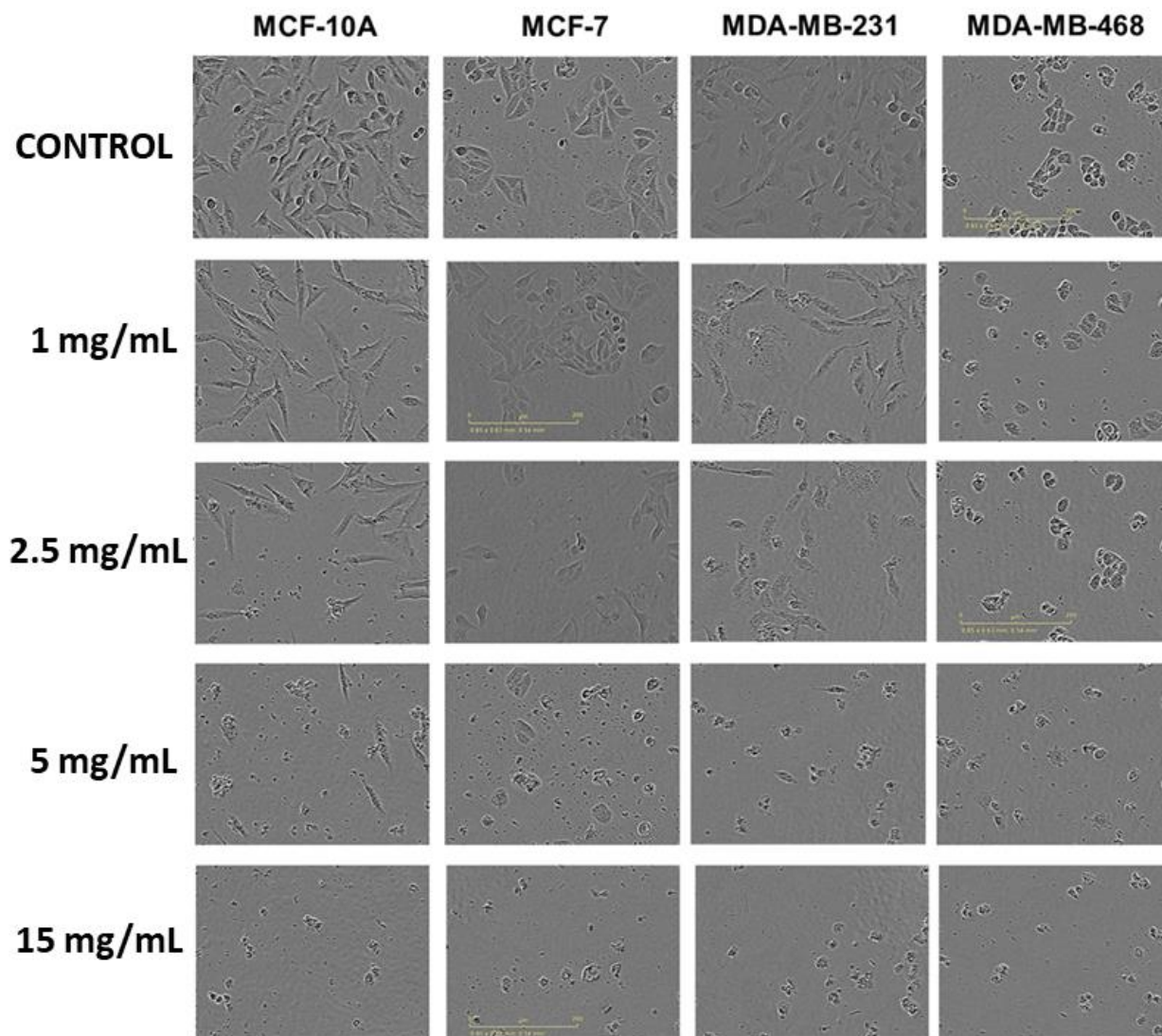
Grafica 7.- Grafica de proliferación celular de la línea MDA-MB-231 en con el tratamiento de BrA en las concentraciones altas, en esta línea celular se observaron cambios a partir de las 12 horas en la concentración de 15mg/mL ( $p=0.0274$ ).

### MDA-MB-468



Grafica 8.- Grafica de proliferación línea celular MDA-MB-468 con el tratamiento de BrA en altas concentraciones, se observó diferencia significativa a las 12 en la concentración de 15mg/mL ( $p=0.038^*$ )

Como se muestra en las fotografías de la figura 7, el tratamiento con concentraciones altas de BrA causó una disminución en la proliferación celular de las 4 líneas celulares, así como la muerte celular de ellas. La línea celular MDA-MB-468 fue la más sensible al tratamiento con BrA a diferentes concentraciones. Las concentraciones de 5mg/mL y 15mg/mL son las que presentan un efecto inhibitorio temprano en las células.



**Figura 7.- imágenes de la proliferación de las líneas celulares con tratamiento de BrA en concentraciones altas a las 48 horas.**

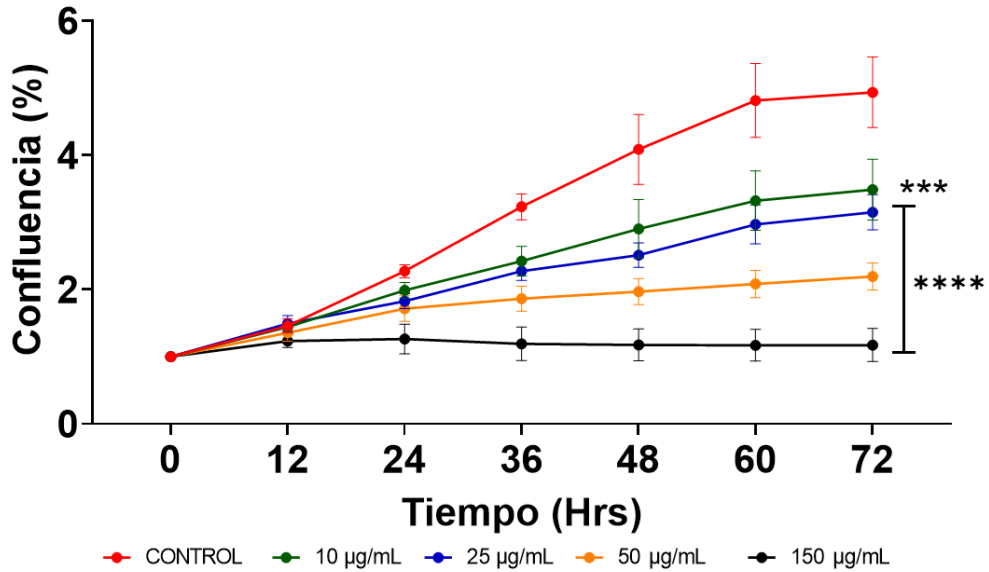
Al igual que con el tratamiento con BrA, el papel del tratamiento de CHE; en la línea celular MCF-10A no fue el esperado, CHE causó una inhibición en la proliferación celular a las 24 horas en la concentración de 150µg/mL ( $p= 0.0237^*$ ), a las 36 horas 25µg/mL ( $p= 0.034^*$ ) y 5µg/mL ( $p= 0.0012^{**}$ ), la concentración más baja 10µg/mL ( $p= 0.0061^{**}$ ) mostró diferencias hasta las 48 horas de su aplicación (Grafica 9). En la línea celular MCF-7, se observó la inhibición de la proliferación celular a partir de las 36 horas de su aplicación en la concentración de 150µg/mL ( $p= 0.0004^{***}$ ), a las 48 horas, la proliferación disminuyó a las concentraciones de 25µg/mL ( $p= 0.0004^*$ ) y 50µg/mL ( $p= 0.0043^{**}$ ) y a las 60 horas en la concentración de 10µg/mL ( $p= 0.0042^{**}$ ) (Grafica 10).

En las líneas celulares CTN, el comportamiento de la proliferación fue similar a las demás líneas celulares. En la línea MDA-MB-231 a las 24 horas la concentración de 10µg/mL ( $p= 0.0090^{**}$ ) indujo una disminución en la proliferación celular, a las 36 horas las concentraciones de 25µg/mL ( $p= 0.0212^*$ ) y 50µg/ml ( $0.0005^{***}$ ) y a las 48 horas en 10µg/mL ( $p= 0.0175^*$ ). (Grafica 11)

En la línea MDA-MB-468 la inhibición de la proliferación celular se presentó desde las 12 horas a la concentración de 150µg/mL ( $p= 0.0007^{***}$ ) y a las 24 horas en las contracciones de 10µg/mL ( $p= 0.0020^{**}$ ), 25µg/ml y 50µg/mL ( $p= <0.0001^{****}$ ) (Grafica 12).

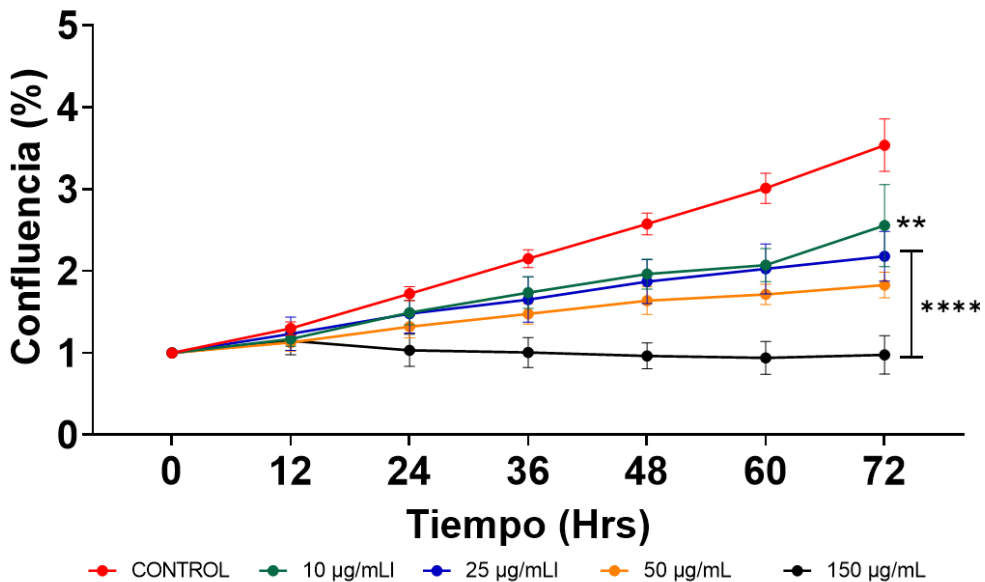
Al observar las imágenes obtenidas a las 48 horas de las líneas celulares corroboramos la inhibición de la proliferación celular con el extracto de CHE a diferentes concentraciones y tiempo, nuevamente la línea celular MDA-MB-468 fue más susceptibles a estos tratamientos (Figura\*).

## MCF-10A



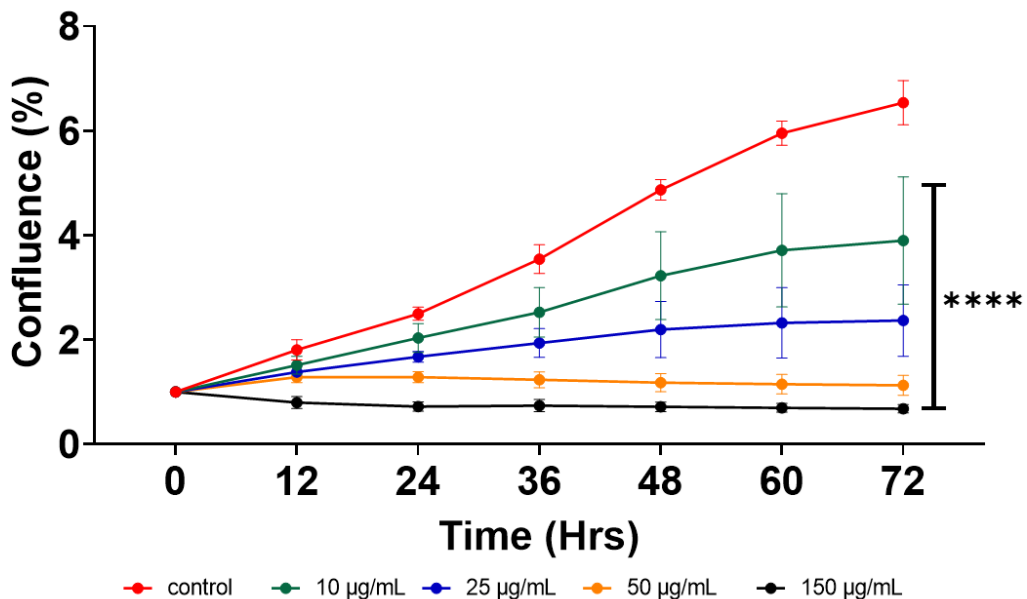
Grafica 9.- Grafica de proliferación de la línea MCF-10A con tratamiento de CHE en el cual las 4 concentraciones mostraron diferencia significativa, la concentración de 15mg/mL ( $p=0.0237^*$ ) a las primeras 12 horas demostró diferencias.

## MCF-7



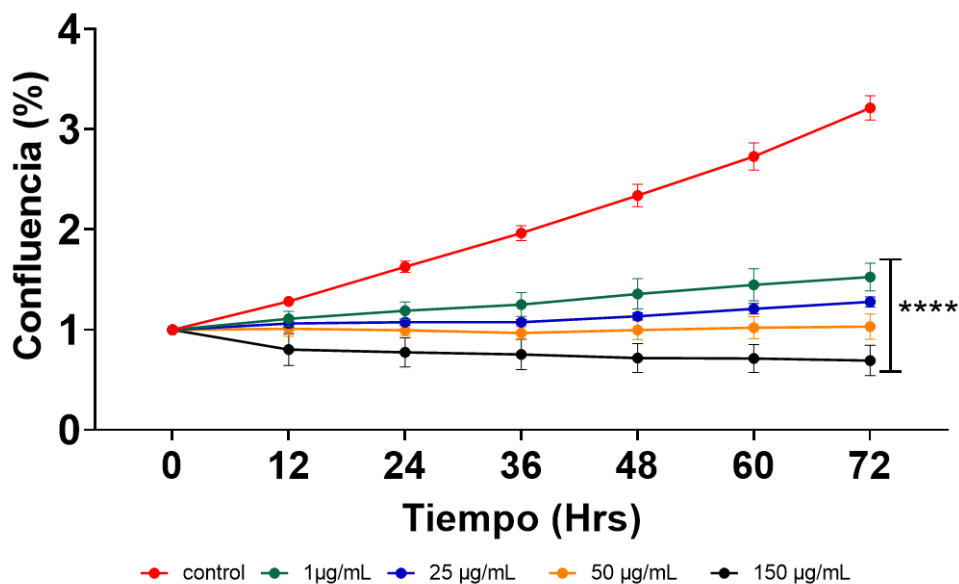
Grafica 10.- Grafica de proliferación de la línea MCF-7 con tratamiento de CHE, todas las concentraciones mostraron diferencias un cuanto al control. El primero en mostrar diferencia fue la concentración de 15mg/mL ( $p=0.00004^*$ ) a las 36 horas.

## MDA-MB-231

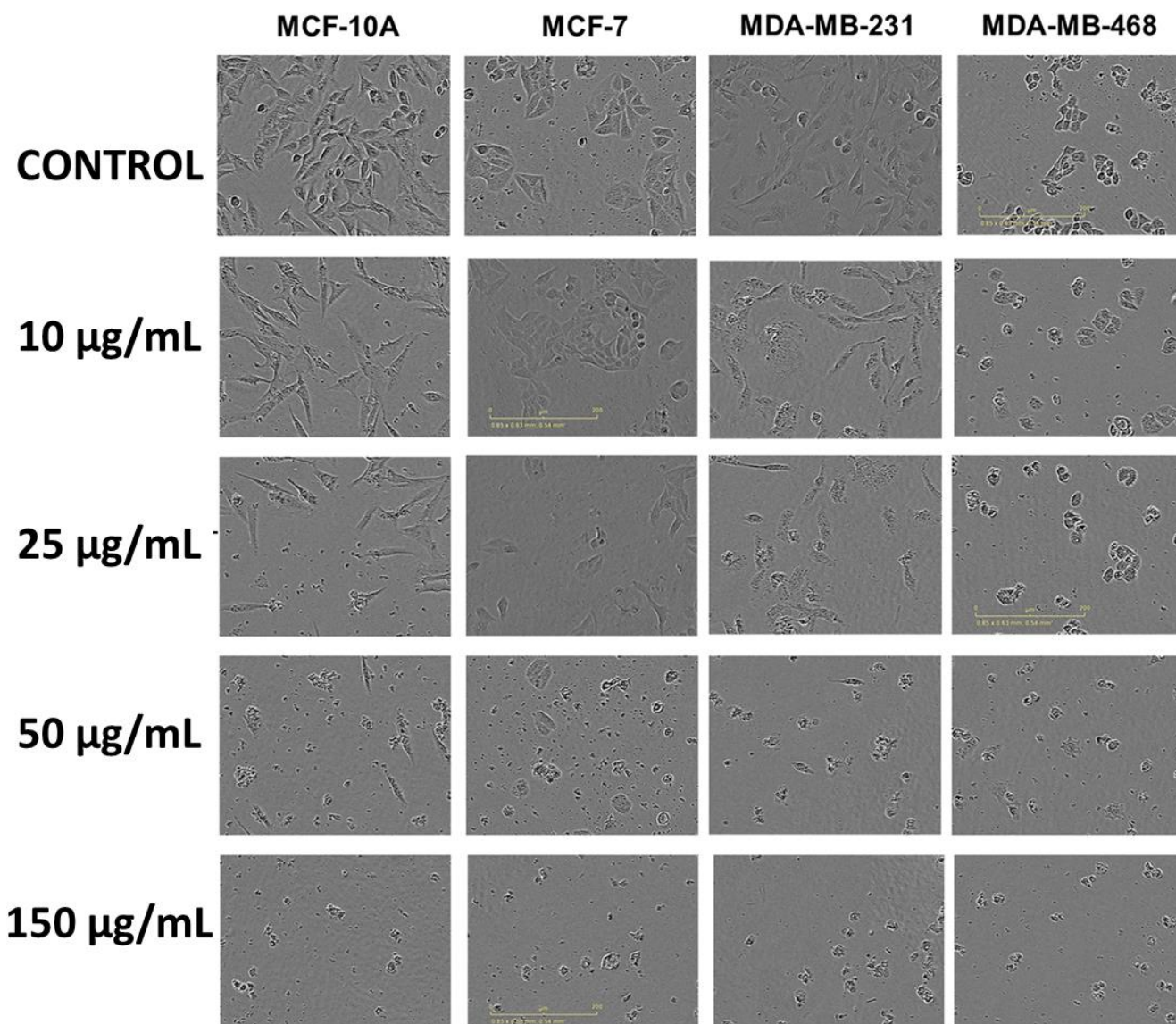


Grafica 11.- Grafica de proliferación de la line MDA-MB-231 con tratamiento de CHE, todas las concentraciones mostraron diferencias un cuanto al control. El primero en mostrar diferencia fue la concentración de 15mg/mL ( $p=0.0090^*$ ) a las 24 horas.

## MDA-MB-468



Grafica 12.- Grafica de proliferación de la line MDA-MB-468 con tratamiento de CHE, todas las concentraciones mostraron diferencias un cuanto al control. El primero en mostrar diferencia fue la concentración de 15mg/mL ( $p=0.0007^{***}$ ) a las 12 horas



**Figura 8.- imágenes de la proliferación de las lines celulares con tratamiento de CHE en concentraciones altas a las 48 horas.**

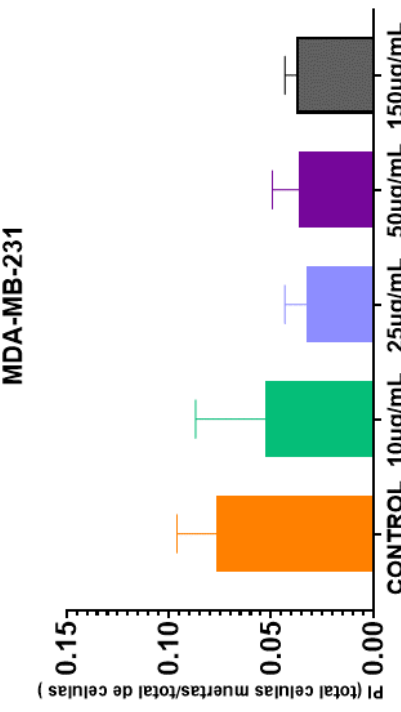
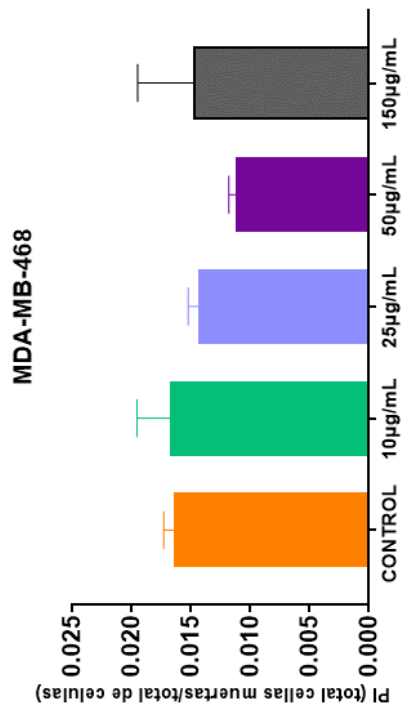
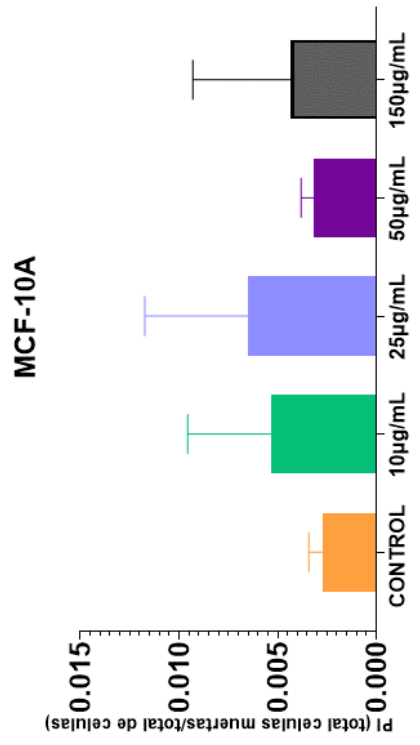
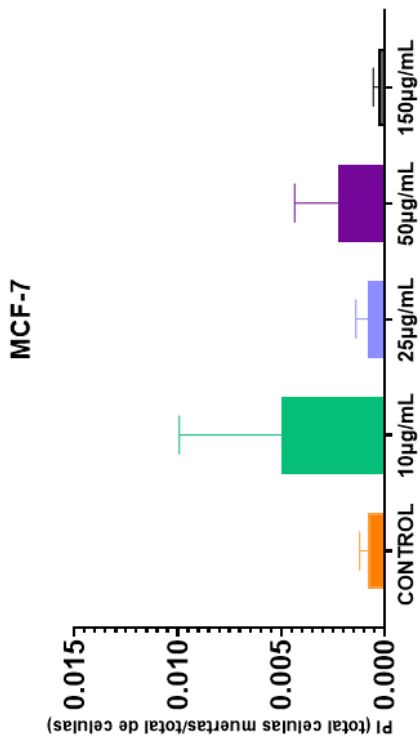
## **Muerte celular inducida por extractos de crucíferas**

Los extractos aplicados demostraron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células de cáncer, por lo que se realizó una prueba de muerte celular con YP al 1x para corroborar si las células morían como respuesta al tratamiento a las 72 horas de la aplicación.

La tinción con YP a las 72 horas en las líneas celulares con las concentraciones de 10µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 150µg/mL de BrA, no mostraron diferencia significativa respecto al control. En la línea MDA-MB-468 se esperaba que mostrara alguna diferencia significativa en la concentración de 0.15ug/mL, debido a que en la prueba de proliferación celular demostró diferencia significativa a las 72 horas. (Figura 9). En el caso de las concentraciones de BrA restantes (0.1ug/mL, 0.25ug/mL, 0.5ug/mL y 1.5 ug/mL) no demostraron diferencias significativas respecto al control (Figura 10), sin embargo, esta diferencia no fue evidente, probablemente por el bajo número de repeticiones y la alta desviación estándar. Queda por hacer más repeticiones de estos experimentos

Con el extracto CHE, las líneas celulares MCF-10A, MCF-7, y MDA-MB-231 no mostraron diferencia significativa con su control, mientras que la línea MDA-MB-468 si mostró diferencia significativa respecto a su control en la concentración de 0.15ug/mL (0.0073\*\*). (Figura 11)

Los resultados no fueron los esperados, debido a que la proliferación celular disminuyó y en las imágenes obtenidas se logró observar morfología sugerente de muerte celular en las células, este resultado puede deberse al tiempo en que fue realizado la prueba. Se propone realizar esta prueba a un tiempo de 24 y 48 horas de la aplicación del tratamiento para lograr identificar a las células muertas antes de que se despeguen del plato.



*Figura 9.- Prueba de muerte celular teñida con YP, tratamiento con BrA en las primeras 24 concentraciones (10µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 150µg/mL) las cuales no demostraron diferencia significativa*

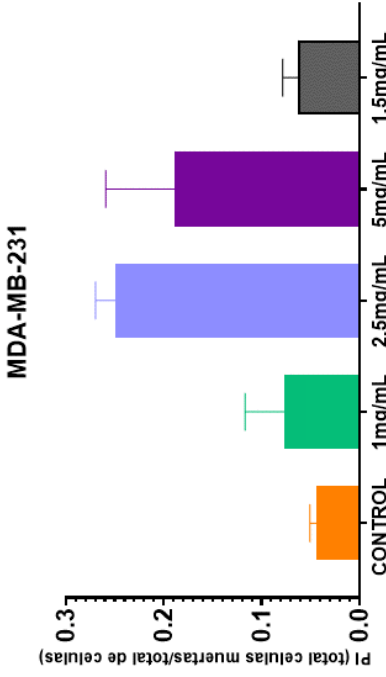
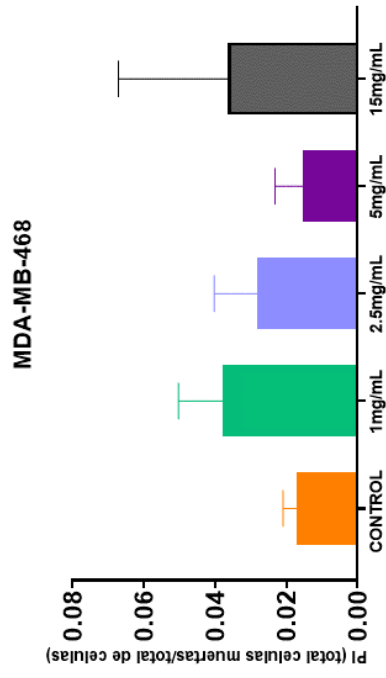
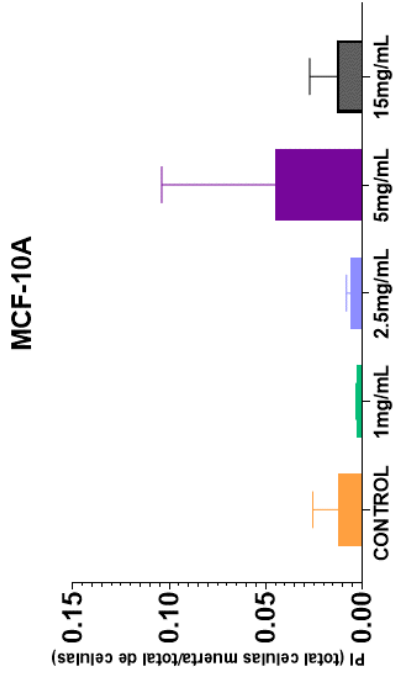
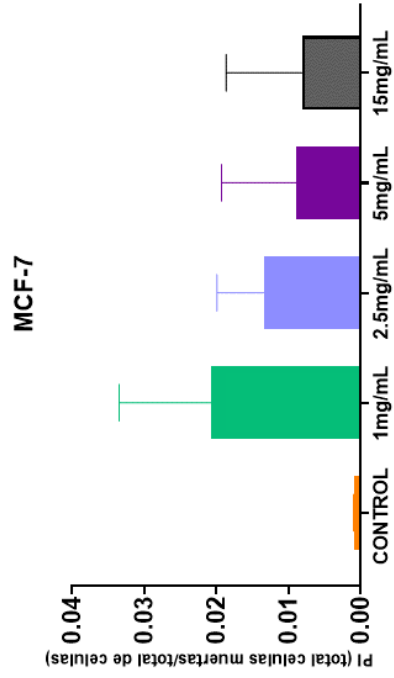


Figura 10.-Figura 9.- Prueba de muerte celular teñida con BrA en concentraciones (1mg/mL, 2.5mg/mL, 5mg/mL y 15mg/mL) las cuales no demostraron diferencia significativa

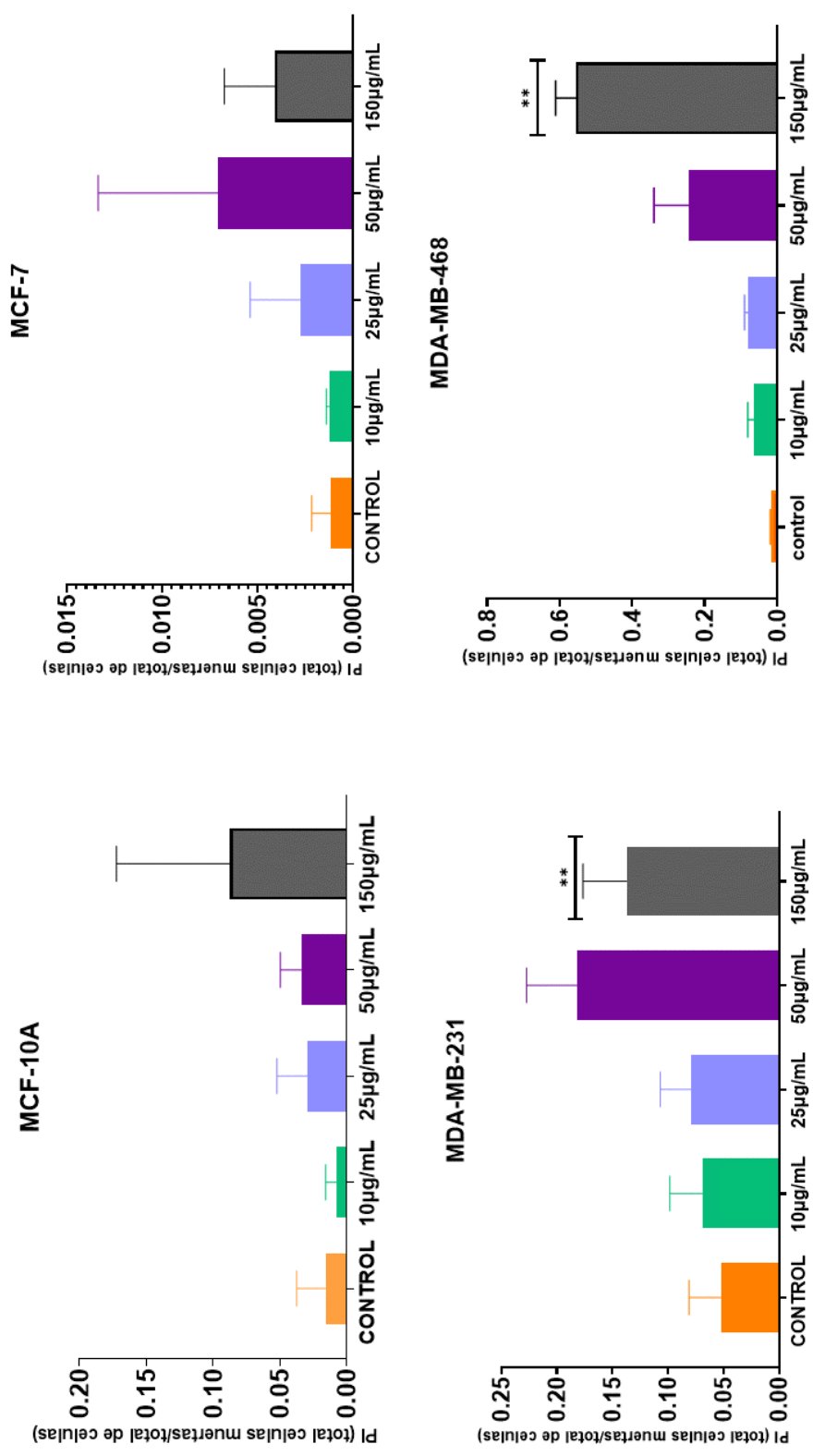


Figura 11.- Prueba de muerte celular teñida con YP, tratamiento con CHE en las concentraciones de 10µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 150µg/mL. Las líneas células MCF-10<sup>a</sup> y MCF-7 no mostraron diferencia significativa, en cambio las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231 mostraron diferencia significativa en la concentración de 150µg/mL respecto a su control.

## Discusión

La necesidad de encontrar nuevos enfoques en el combate contra el cáncer de mama nos ha llevado a evaluar el papel de los extractos de crucíferas en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, y tras el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se ha demostrado el papel anti proliferativo de dichos extractos a diferentes concentraciones en un lapso determinado, de manera que parece existir un efecto dosis dependiente. Del mismo modo, se ha demostrado que los extractos pueden causar muerte celular en algunas de las concentraciones utilizadas y, a pesar de que esto no pudo cuantificarse por el ensayo de muerte, probablemente por el bajo número de repeticiones y la alta desviación estándar, queda por hacer más repeticiones de estos experimentos, la morfología de las células si sugiere inducción de muerte celular por los extractos. En este estudio se observó que la línea celular triple negativo MDA-MB-468 presenta una mayor sensibilidad a ambos extractos en comparación con las demás líneas empleadas.

El extracto de BrA indujo una disminución en la proliferación celular en las 4 líneas celulares a diferentes concentraciones y tiempo, a las 24 horas se observaron cambios significativos en las líneas celulares MCF-10A (15 ug/mL), MCF-7 (5 ug/mL, 15 ug/mL) y en las células triple negativo MDA-MB-231 (5 ug/mL) y MDA-MB-468 (2.5 ug/mL y 5 ug/mL). A las 48 horas se observaron cambios en otras concentraciones, en MCF-10A (2.5 ug/mL), MCF-7 (2.5 ug/mL), MDA-MB-231(2.5 ug/mL), MDA-MB-468 (1.0 ug/mL). Por último, a las 72 horas en la línea MCF-7 (1 ug/mL), MDA-MB-231( 1 ug/mL) y MDA-MB-468 (0.15ug/mL). Cada línea celular se comportó de diferente manera en las concentraciones usadas y en tiempos de respuesta diferente, logrando observar que las células CTN MDA-MB-468 fueron más susceptibles presentando una inhibición en la proliferación celular antes de las 24 horas de tratamiento. No se esperaba que la línea control presentara cambios significativos. Diversos estudios se han enfocado en los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de crucíferas, para el caso de BrA se ha detallado en estudios previos el efecto anti

proliferativo que ejerce en células cancerígenas intestinales y hepáticas, principalmente por la presencia de SFN (1.6 – 3.2  $\mu\text{mol/L}$ ) (Baenas, 2017), también se ha demostrado que los brotes de brócoli pueden modificar las vías epigenéticas en células de cáncer de mama (Nandini, 2020).

Del mismo modo se han hecho comparaciones entre los compuestos aislados en los que nos enfocamos y el extracto de brotes de brócoli, ya que podemos encontrar otros compuestos bioactivos presentes que pueden actuar de forma sinérgica en el extracto, se cree que pueden estar presentes diversos mecanismos de acción por el cual se lleva a cabo la inhibición en la proliferación celular (Baenas, 2017). Las razones de como estos sinergismos pueden estar actuando o interfieren en las vías de señalización de las células no han sido muy explorados, por lo que se requiere de más prueba de biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos activos.

También hemos informado sobre la actividad anti proliferativa que presenta el extracto CHE del cual tenemos 4 concentraciones que fueron aplicados a nuestras líneas celulares, estos tratamientos demostraron diferencias significativas a partir de las 12 horas del tratamiento en la línea MDA-MB-468 (0.15  $\mu\text{g/mL}$ ), a las 24 horas en las líneas MCF-10A (0.15  $\mu\text{g/mL}$ ), y MDA-MB-231 (0.15  $\mu\text{g/mL}$ ). Después de las 36 horas las concentraciones de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$  y 0.10  $\mu\text{g/mL}$  mostraron diferencias significativas en todas las líneas celulares. Estos resultados tienen similitudes con estudios previos en melanoma, en los cuales trataron de demostrar el potencial de los ITC e Indoles como un anticancerígeno (Mitsiogianni, 2020). Al poner en comparativa nuestros resultados podemos ver estas similitudes con resultados ya publicados, encontrando la inhibición del crecimiento celular en melanoma, siendo dependiente de la concentración y el tiempo del tratamiento con estos fitoquímicos (Mitsiogianni, 2020).

Ambos extractos causaron inhibición en la proliferación celular, los cuales tienen presencia de los compuestos bioactivos que son nuestro punto de interés (SFN, IBN, I3C). Estudios ya publicados han puesto a prueba a estos compuestos por separado y se han señalado los mecanismos por los cuales pueden actuar en las células

cancerígenas. Por ejemplo, se identificó al SFN como un modulador epigenético en líneas celulares de cáncer de mama interviniendo en la tasa de crecimiento tumoral (Ramirez, 2020). IBN también ha demostrado una fuerte inhibición del crecimiento dependiente del tiempo a una concentración de 25  $\mu$ M en células de cáncer de colon (Jadhav, 2007), en el caso de I3C se ha registrado su disminución en la viabilidad celular luego de un tratamiento por 24 horas en una dosis de 1 mM en líneas celulares de cáncer colorrectal (Megna, 2016). Al encontrar en nuestros extractos diferencias en la molaridad de SFN, IBN e I3C y estos han sido reportados en la inhibición de la proliferación celular, no podemos determinar cuál es el responsable del efecto observado. Pero cabe mencionar que el extracto de CHE en las concentraciones más bajas utilizadas presenta una mayor inhibición que BrA, y presenta mayor concentración de I3C, sugiriendo a este compuesto como responsable de la mayor toxicidad observada. Estas observaciones quedan por demostrarse utilizando los compuestos aislados.

Hasta donde sabemos este es uno de los pocos o casi nulos estudios en donde se demuestra el papel de los extractos de crucíferas en líneas celulares no tumorigénica (MFC-10A) en comparación con 3 líneas de cáncer de mama. Debido a los resultados que obtuvimos debemos mencionar la importancia de los resultados en la línea no tumorigénica, ya que los resultados no fueron los esperados, especialmente en el caso del extracto de CHE, la inhibición en la proliferación celular fue evidente desde concentraciones bajas, por lo que se necesita llevar a cabo estudios a futuro y evaluar si los extractos son citotóxicos en células normales del organismo.

Finalmente al observar las imágenes de las células durante el tratamiento con nuestros extractos observamos que pareciera que estos causaban muerte celular en las líneas celulares en algunas de las concentraciones empleadas, específicamente después de las 36 horas del tratamiento, al realizar una prueba con YP a las 72 horas del tratamiento, sin embargo no se observaron diferencias significativas, a excepción de las células MDA-MB-468 (0.15  $\mu$ g/mL) con el extracto CHE, al no obtener los resultados esperados se sugiere que es debido al tiempo de la prueba, al realizarlo a las 72 horas las células

mueras se desprenden y no son teñidas con YP y no pueden ser cuantificadas. Sabemos que la muerte celular por SFN, IBN e I3C ha sido reportada en estudios anteriores. La actividad proapoptótica de SFN fue evidente en células MDA-MB-231 y MCF-7 (5-20uM), lo que sugiere una acción específica en células de cáncer de mama (Lewinska, 2017), IBN (10uM) también induce eficazmente una población apoptótica después de 24 horas en células del colon (Jadhav, 2007). El I3C es un agonista de AhR en múltiples líneas celulares indujo una inducción de la actividad apoptótica dependiente de la dosis (Megna, 2016), por lo que nuestros resultados no son consistentes con lo reportado con anterioridad y se sugiere realizar esta prueba a un tiempo de 24 a 48 horas de tratamiento.

Es importante tener en cuenta el método de extracción por el cual se obtuvieron los compuestos, y el solvente utilizado, la mayoría de los GLS no siempre darán lugar a su perfil de ITC o Indol debido a las condiciones empleadas y la hidrólisis que puede llegar a afectar los resultados (Ramirez, 2020). Entre los factores que pueden interferir en los resultados es el pH, en un escenario de un pH ácido se favorecerá la producción de un nitrilo que es menos bioactivo (Yang, 2016). Teniendo en cuenta esto y otros factores que pueden interferir en los resultados obtenidos, es importante estandarizar la metodología por la cual se puede llevar a cabo la obtención y aplicación de estos extractos.

## Conclusión

Las líneas celulares de cáncer de mama presentaron una inhibición en la proliferación celular dosis dependiente, siendo las células MDA-MB-468 (triple negativo) que presentaron mayor sensibilidad a los extractos BrA y CHE. Estos resultados sugieren que la familia de las crucíferas presenta compuestos bioactivos que pueden actuar como un posible tratamiento al cáncer de mama.

El extracto de CHE presenta mayor respuesta en la inhibición de la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de mama a partir de concentraciones más bajas en comparación con el extracto de BrA, el cual presenta inhibición a partir de concentraciones más altas.

Las líneas celulares de cáncer de mama presentaron diferencias significativas en la disminución de la viabilidad inducida por los tratamientos con los extractos de modo que será interesante comparar los datos obtenidos con los compuestos aislados de interés con el fin de identificar al compuesto(s) responsable(s) de la inhibición en la proliferación celular, y al mismo tiempo inferir si existe un sinergismo en estos compuestos o si otros compuestos bioactivos son los responsables de dicho resultado

Las líneas celulares de cáncer de mama a excepción de la línea MDA-MB-468, no presentaron diferencias significativas en la prueba de muerte celular. Debido a la metodología utilizada será necesario e interesante realizar un ensayo más de esta prueba a un tiempo de tratamiento diferente, y determinar si existe un potencial inductor de muerte de los extractos en las células de cáncer de mama.

# Bibliografía

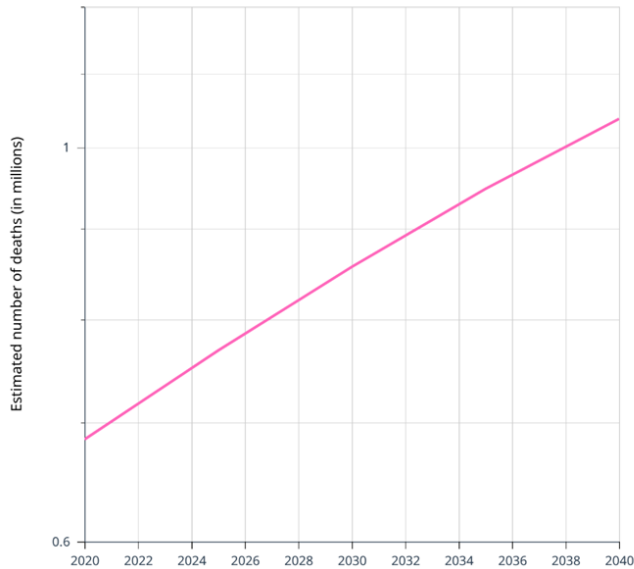
- Alvarez-Lopez, S. B.-M.-S.-G. (2020). Review of concepts in therapeutic decision-making in HER2-negative luminal metastatic breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 1364-1377.
- DeBerardinis, R. J. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances Oncology*, 1-18.
- Domínguez-Perles, R. &.B.-V. (2010). Broccoli-Derived By-Products-A Promising Source of Bioactive Ingredients. *Journal of food science*, 383-392.
- Dominika Kuran, A. P. (2020). Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs? *Nutrientes* .
- Elena Almagro, C. S. (2016). Factores pronósticos en el cáncer de mama en estadio inicial. *Medicina Clínica*, 167-171.
- Emily Ross, g. j.-B. (2021). Capas de diagnóstico: relatos de pacientes sobre la clasificación del cáncer de mama en la era molecular. *Ciencias Sociales y Medicina*.
- Flora Guerra, A. A. (2017). Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 686-699.
- Geng SQ, A. A. (2014). Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. *Cancer Lett*, 1-7.
- GLOBOCAN. (2020). *Cancer Tomorrow* .
- Grajales EG, C. C. (2014). Factores de riesgo para el cáncer de mama en México: estudios en poblaciones Mexicanas y México-Americanas. *Revista CES Salud Pública*, 50-58.
- Guido Kroemer, J. P. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 472-482.
- Indré J., V. P. (2019). Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sciences*.
- Insa M.A. Ernst, K. P. (2013). Synthesis and Nrf2-inducing activity of the isothiocyanates iberiverin, iberin and cheirolin. *Pharmacological Research*, 155-162.
- Irigoyen MA, G. F. (2011). Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 219-233.
- J.A.Merino Bonilla, M. T. (2017). Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiología*, 368-379.
- Jadhav U, E. R. (2007). iberin induces cell cycle arrest and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Med*, 353-361.
- Jing-Ru Weng, C.-H. T.-S. (2008). Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Letters*, 153-163.
- Kapusta-Duch J, K. A. (2012). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 389-395.
- Khadijeh Barzaman, J. K.-K. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 1567-5769.
- Lamb CA, V. S. (2019). Hormone receptors in breast cancer: more than estrogen receptors. *Medicina (B Aires)*, 540-545.
- Lewinska A, A.-G. J. (2017). Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. *Theranostics*, 3461-3477.
- Mayer Zaharia, H. G. (2013). CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO: UNA. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 649-656.
- Megna, B. W. (2016). Indole-3-carbinol induces tumor cell death: function follows form. *The Journal of*

*surgical research*, 47-54.

- Melina Mitsiogianni, D. T. (2020). Sulforaphane and Iberin are potent epigenetic modulators of histone acetylation and methylation in malignant melanoma. *European Journal of Nutrition*.
- N. Baenas, D. M.-V. (2017). Estudio de la bioactividad in vitro e in vivo de brotes de brocoli ricos en glucosinolatos/isotiocianatos. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de METodos, Modelazion y Simulacion* , 69-78.
- Nandini D B, R. R. (2020). Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention!! Role in cancer prevention and therapy. *J Oral Maxillofac Patho*, 405.
- NIH. (2022). Terapia adyuvante . Diccionario del Instituto Nacioanl del Cáncer.
- OMS. (26 de Marzo de 2021). *Organizacion Mundial de la Salud*. Obtenido de Cancer de mama : <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Osorio Bazar Niurka, B. H. (2020). Factores de riesgo asociados al cáncer de mama. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 11-47.
- Piman P, N. W. (2019). Alyssin and Iberin in Cruciferous Vegetables Exert Anticancer Activity in HepG2 by Increasing Intracellular Reactive Oxygen Species and Tubulin Depolymerization. *Biomolecules & Therapeutics*, 540-552.
- Ramirez D, A.-V. A. (2020). Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives. . *International journal of molecular sciences*.
- Ross, E. (2001). Introduccion a los alimentos funcionales . *Medicina Clinica* , 617-619.
- Sandra Vargas, M. V. (2021). Diagnosis and characterization of breast cancer in humans :A review. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* , 436-444.
- Sergio Dahdouh Cabia, L. M. (2017). Revisión de la evidencia científica sobre el papel de compuestos bioactivos. *Revista Española de Nutricion Comunitaria*, 73-85.
- Severino Ovando, Á. d. (2020). *Epidemiología del cáncer de mama en el Hospital de Especialidades de Puebla CMN Gral. de División Manuel Ávila Camacho, durante 2013 a 2017*. Puebla : RIAA.
- Soler, M. d., & Haab, G. A. (2018). *Guía de inmunohistoquímica para técnicos*. Buenos Aires.
- Thomson CA, H. E. (2016). Chemopreventive properties of 3,3'-diindolylmethane in breast cancer: evidence from experimental and human studies. *Nutr Rev*, 432-443.
- Valle-Solís AE, M.-A. A.-P.-J.-V.-S.-C. (2019). Supervivencia en cáncer de mama por subtipo mediante inmunohistoquímica: Un estudio retrospectivo. *Gac Med Mex*, 50-55.
- Vieira, D. D. (2008). Breast cancer: New concepts in classification. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 42-47.
- Wang W, W. S. (2005). Sulforaphane, erucin, and iberin up-regulate thioredoxin reductase 1 expression in human MCF-7 cells. *J Agric Food Chem*, 1417-1421.
- Wu, Z. W. (2020). Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 631-646.
- Yang L, P. D. (2016). . Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. *Semin Oncol*, 146-153.

# Anexos

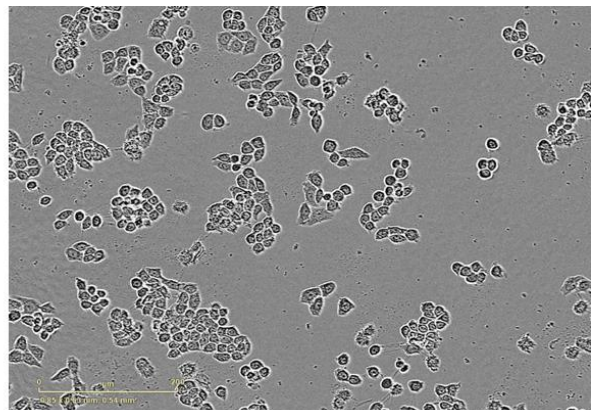
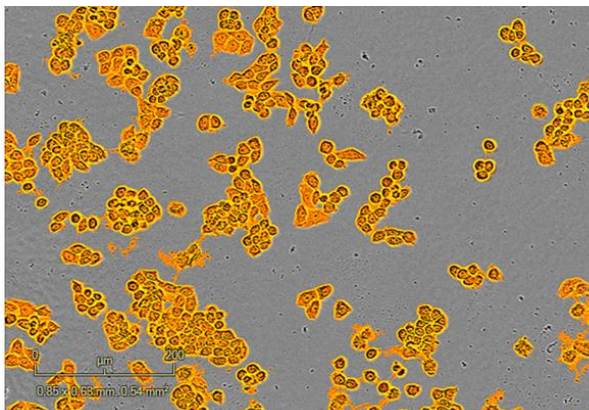
**Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Females, age [0-85+]**  
Africa + Latin America and Caribbean + Northern America + Europe + Oceania + Asia



CANCERTOMORROW | IARC - All Rights Reserved 2022 - Data version: 2020

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

**Figura 1A.- Mortalidad del Cáncer de mama.** Proyección de la mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial estimando 1.04 millones de muertes a causa de esta neoplasia para el año 2040 en la población femenina. Datos obtenidos de GLOBOCAN 2020



**Figura 2A.- Mascara de confluencia.-** Abarca el área de las células permitiendo la cuantificación en un equipo de microscopia en tiempo real Incucyte ZOOM.

LINEAS CELULARES	MEDIOS DE CULTIVO
<b>MFC10-A</b>	DMEM/F12 1LT, Suero de Caballo 5%, Hidrocortisona 0.5ug/mL, Insulina 10ug/mL, EGF 20ng/mL, Toxina colérica 100ng/mL
<b>MCF-7</b>	MEM 1LT, Insulina 10ug/mL, Suero bovino fetal SBF 10%
<b>MDA-MB-231</b> <b>MDA-MB-468</b>	DMEM/F12 1LT, SBF 10%

**Tabla 1.- Medios de Cultivo.**