

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Determinación del efecto antiproliferativo de incomptina A en un
modelo de cáncer de mama”**

Tesis para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

Presenta:

Biól. Exp. Angel Giovanni Arietta García

Codirectores:

Dra. Rosa María Ordoñez Razo Dr.

Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesor:

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Ciudad de México, Iztapalapa, 18

de junio 2021

Declaración de originalidad

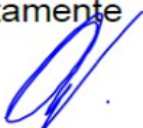
El (La) que suscribe **Angel Giovanni Arietta García**, alumno (a) del posgrado en **Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “**Determinación del efecto anti proliferativo de incompina A en un modelo de cáncer de mama**”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de **maestro** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 11 de junio del 2021.

Atentamente



___Angel Giovanni Arietta García ___

Nombre y firma del alumno

El programa de posgrado de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registro 001481, en Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo consejo con clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 753803

El jurado designado por la Comisión del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobó la Tesis titulada:

“Determinación del efecto antiproliferativo de incomptina A en un modelo de cáncer de mama”

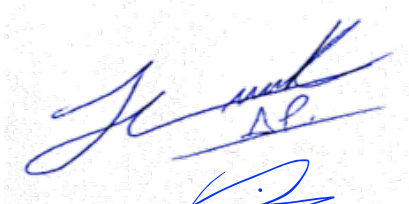
Que presentó:

Biól. Exp. Angel Giovanni Arietta García

El día 18 de junio del 2021

Jurado:


Dr. Julio César Almanza Pérez



Dr. Fernando Calzada Bermejo



Dr. Normand García Hernández



Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera



COMITÉ TUTORAL

Directores:

Dra. Rosa María Ordoñez Razo

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Hospital de Pediatría.

romaorr@yahoo.com.mx

Tel: 56276900 ext. 21941

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Investigador Titular C, Laboratorio de Farmacología. Departamento: Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, CP 09340, CDMX

aaaf@xanum.uam.mx

Asesor:

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Unidad de Investigación Médica en Farmacología. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. CORSE.

fercalber10@gmail.com

Tel: 56276900 ext. 21367

Agradecimientos

- Agradezco a la Dra. Rosa María Ordoñez Razo por su apoyo, asesoría y su confianza. Por brindarme sus conocimientos, consejos y amistad a lo largo de estos años y darme un lugar en su laboratorio desde la licenciatura. Por estar siempre pendiente de mí, tenerme paciencia y por proporcionarme todo lo necesario para culminar exitosamente este proyecto.
- Agradezco al Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar por tenerme la confianza de poder fungir como mi tutor, por su apoyo, por resolver mis dudas y por guiarme a lo largo de este camino.
- Agradezco al Dr. Fernando Calzada Bermejo por su asesoría, por brindarme un espacio en su grupo de trabajo y proporcionarme material para poder elaborar este proyecto. Por tenerme la confianza de trabajar junto a sus alumnos y adentrarme a un nuevo campo de conocimiento.

Dedicatorias

- A mi padre Angel Arietta Velázquez por apoyarme en todos los sentidos a seguir estudiando, por esos sacrificios que alguna vez hizo por mí y sigue haciendo. Por demostrarme que todo es posible con un poco de esfuerzo.
- A mi madre Xóchitl Gabriela García Padilla por guiarme y darme ánimos cada día, por alegrarse de mis logros y por no dejar que me rindiera.
- A mi abuela Etelvina Velázquez Hernández que no pudo verme entrar a la carrera, pero que siempre confió en mí. Te dedico mi maestría.
- A mi tía Quirina del Rocío Arietta Velázquez por estar al pendiente de mis estos años. Por su apoyo y cariño.
- A mis compañeros de maestría por compartir esta experiencia juntos y apoyarnos en este camino.

Resumen

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia y el que provoca más muertes en mujeres a nivel mundial, convirtiéndolo en un problema importante de salud pública. Existen tratamientos para contrarrestar a los distintos fenotipos de cáncer de mama siendo estos los que expresan receptores de hormonas (estrógenos y progesterona), aquellos que expresan receptor de factor de crecimiento epidemial 2 (HER2+), y los denominados tumores mamarios triple negativo (TMTN) que no expresan ningún tipo de receptor. Sin embargo, estos tratamientos han reportado resistencia y distintos efectos secundarios y adversos que afectan la calidad de vida de las pacientes. Además, hasta la fecha no existe un tratamiento dirigido para cualquier tipo de tumor de glándula mamaria, independientemente del estadio en que se encuentre y que carezca de efectos adversos.

Decachaeta incompta (*D. incompta*) es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades gastrointestinales como la diarrea. Estudios farmacológicos del extracto de sus hojas, así como de la lactona sesquiterpénica incomptina A demostraron que poseen actividad anti-amibiana y anti-giardia potente. Además, que se ha reportado que la incomptina A en tratamiento en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* altera la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de glucosa.

Desde hace muchos años se conoce que en el cáncer existe una reprogramación metabólica conocida como “Efecto Warburg” o glucólisis aeróbica en donde las células

cancerosas en comparación a sus contrapartes normales consumen una gran cantidad de glucosa debido al aumento de la expresión de enzimas glucolíticas y de proteínas inhibidoras de la apoptosis, confiriéndoles una ventaja adaptativa y resistencia a la muerte celular. Por esta razón, las enzimas glucolíticas se consideran blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer en general.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto anti proliferativo del extracto de *D. incompta* y de la incomptina A en líneas celulares cancerosas 4T1, MDA-231, T47D, MCF-7 y en la línea no tumorigénica MCF-10A.

Metodología y Resultados

Ensayos *in vitro* con las líneas celulares: El efecto citotóxico de *D. incompta* sobre células de cáncer de mama, se determinó mediante el conteo de la viabilidad celular utilizando la técnica de azul de tripán para cada una de las líneas celulares 4T1, T47D, MDA-231 y MCF-7. Los conteos de células vivas de cada línea fueron realizados a las 24, 48 y 72 horas después de ser tratadas con 25, 50, 75 y 100 µg/ml del extracto y con 5, 7, 9 y 12 µg/ml de la incomptina A. En la línea MCF-10A se realizó el conteo de células 24, 48 y 72 horas después de ser tratadas con 25, 50, 75, 100 y 125 µg/ml del extracto y con 5, 7, 10, 13, 15 y 18 µg/ml de la incomptina A. Tanto el extracto como la incomptina A disminuyeron la viabilidad celular en todas las líneas con respecto a las células sin tratamiento y a las células con DMSO (1%) de forma significativa desde las 24 horas de una manera dependiente de la concentración y del tiempo. Se obtuvieron los valores de IC⁵⁰ del extracto (54.89, 51.51, 44.85, 44.18 y 71.79 µg/ml) y de la incomptina A (6.2, 7.5, 8.3, 6.8 y 13.12 µg/ml) para 4T1, MDA-231, T47D, MCF-

7 y MCF-10A respectivamente. Se determinó el índice de selectividad (IS) y se demostró que el extracto y la incomptina A son selectivos hacia células tumorales y moderadamente tóxicos para las células normales.

Determinación de las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A y estudios *in silico*: Para determinar las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A se utilizaron los servidores de uso libre Molinspiration, SwissADME y ADMETsar. Los resultados arrojaron que la incomptina A tiene buena biodisponibilidad, no inhibe citocromos, no es carcinógeno ni genotóxico. Se realizaron análisis de Docking molecular con este compuesto para enzimas relacionadas con la vía glucolítica mostrando una energía de unión fuerte hacia HIF-1, hexocinasa II, aldolasa, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa.

Conclusión

Se demostró que tanto el extracto de las hojas de *D. incompta* como la incomptina A exhiben un efecto citotóxico sobre las líneas celulares de cáncer mamario 4T1, MDA-231, T47D y MCF-7.

El extracto y la incomptina A mostraron tener cierta selectividad hacia células tumorales dañando en menor medida a las células no tumorigénicas MCF-10A.

La incomptina A tiene los parámetros farmacocinéticos adecuados para cumplir una función farmacológica; estos parámetros se podrían asociar con las características

fisicoquímicas de la incoptina A y podría considerarse para su evaluación futura en modelos *in vivo*.

El análisis *in silico* reveló que la incoptina A tiene la capacidad de unirse a ciertos aminoácidos que se encuentran en sitios activos de las enzimas HIF-1, HXKII, aldolasa, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa; enzimas involucradas en la vía glucolítica y el recambio metabólico en cáncer.

Abstract

Breast cancer is the most diagnosed cancer and the first that causes the most deaths in women worldwide, making it a major public health problem. There are treatments to counteract breast cancer phenotypes, these being those that express hormone receptors (estrogens and progesterone), those that express epidermal growth factor receptor 2 (HER2 +), and the so-called triple negative breast tumors (TMTN) that they do not express any type of receptor. However, these treatments have reported resistance and different side effects and affect the quality of life of patients. In addition, to date there is no targeted treatment for any type of mammary gland tumor, regardless of its stage and without adverse effects.

Decachaeta incompta (*D. incompta*) is a plant used in traditional Mexican medicine to treat gastrointestinal diseases such as diarrhea. Pharmacological studies of the dichloromethane extract from its leaves, as well as the sesquiterpene lactone incomptine A, showed that they have potent anti-amibian and anti-giardia activity. Furthermore, it has been reported that incomptine A in treatment in *Entamoeba histolytica* trophozoites alters the expression of proteins involved in glucose metabolism.

For many years it has been known that in cancer there is a metabolic reprogramming known as the "Warburg Effect" or aerobic glycolysis, where cancer cells, compared to their normal counterparts, consume a large amount of glucose due to the increased expression of glycolytic enzymes and of apoptosis inhibitor proteins, giving them an

adaptive advantage and resistance to cell death. For this reason, glycolytic enzymes are considered therapeutic targets for the treatment of cancer in general.

The present study aimed to evaluate the antiproliferative effect of *D. incompta* extract and incomptine A in cancer cell lines 4T1, MDA-231, T47D, MCF-7 and in the non-tumorigenic line MCF-10A.

Methodology and Results

In vitro tests with cell lines: The cytotoxic effect of *D. incompta* on breast cancer cells was determined by counting the cell viability using the trypan blue technique of each of the 4T1, T47D, MDA-231 and MCF-7 cell lines. Live cell counts of each line were performed at 24, 48 and 72 hours after being treated with 25, 50, 75 and 100 µg/ml of the extract and with 5, 7, 9 and 12 µg/ml of incomptine A. In the MCF-10A line, the cells were counted 24, 48 and 72 hours after being treated with 25, 50, 75, 100 and 125 µg/ml of the extract and with 5, 7, 10, 13, 15 and 18 µg/ml of incomptine A. Both the extract and incomptine A decreased cell viability in all cell lines with respect to cells without treatment and cells with DMSO (1%) in a significant in all cell lines from 24 hours in a concentration and time dependent manner. The IC⁵⁰ values of the extract (54.89, 51.51, 44.85, 44.18 and 71.79 µg/ml) and of incomptine A (6.2, 7.5, 8.3, 6.8 and 13.12 µg/ml) were obtained for 4T1, MDA-231, T47D, MCF-7 and MCF-10A, respectively. The selectivity index (SI) was determined and the extract and incomptine A were shown to be selective towards tumor cells and moderately toxic.

Determination of the physicochemical properties and pharmacokinetic properties of incomptine A and *in silico* analysis: The free-use servers Molinspiration, SwissADME and ADMETsar were used to determine the physicochemical and pharmacokinetic properties of incomptine A. The results showed that incomptine A has good bioavailability, does not inhibit cytochromes, is not carcinogenic or genotoxic. Molecular docking analysis were performed with this compound for enzymes related to the glycolytic pathway showing a strong binding force towards HIF-1, hexokinase II, aldolase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase.

Conclusion

It was shown that both the extract from the leaves of *D. incompta* and incomptine A show cytotoxic effect on the breast cancer cell lines 4T1, MDA-231, T47D and MCF-7.

The extract and incomptine A showed a certain selectivity towards tumor cells, damaging to a lesser extent non-tumorigenic MCF-10A cells.

Incomptine A has adequate pharmacokinetic parameters to fulfill an adequate pharmacological function; These parameters could be associated with the physicochemical characteristics of incomptine A and could be considered for future evaluation in *in vivo* models.

In silico analysis revealed that incomptine A can bind certain amino acids found at active sites of the enzymes HIF-1, HXKII, aldolase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase; enzymes involved in the glycolytic pathway and metabolic turnover in cancer.

ÍNDICE

Resumen.....	vi
Abstract	x
Abreviaturas	xv
1.Introducción	- 1 -
1.1 El cáncer de mama.....	- 1 -
1.1.1 Factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama	- 4 -
1.2 Clasificación del cáncer de mama	- 5 -
1.2.1 Clasificación histológica del cáncer de mama	- 5 -
1.2.2 Estadificación TNM del cáncer de mama	- 6 -
1.2.3. Subtipos moleculares del cáncer de mama	- 7 -
1.3 Tratamiento del cáncer de mama	- 9 -
1.4 Toxicidad de los tratamientos utilizados contra el cáncer mamario.....	- 17 -
1.5 Reprogramación metabólica de la célula cancerosa.....	- 22 -
1.6 Enzimas glucolíticas implicadas en la adaptación de células cancerosas	- 25 -
1.7 Las plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicos.....	- 30 -
1.8 Lactonas sesquiterpénicas.....	- 32 -
1.9 Actividad anticancerígena de las lactonas sesquiterpénicas.....	- 33 -
2. Antecedentes.....	- 35 -
3. Justificación	- 37 -
4. Preguntas de Investigación	- 39 -
5. Hipótesis.....	- 39 -
6. Objetivo General	- 39 -
6.1 Objetivos Particulares	- 40 -
7. Material y Métodos	- 41 -
7.1 Material vegetal.....	- 41 -
7.2 Líneas celulares	- 42 -
7.3 Cultivos Celulares.....	- 42 -
7.4 Análisis de la actividad citotóxica del extracto de <i>D. incompta</i> y de <i>incomptina A</i>	- 43 -
7.4.1 Método de exclusión de azul de tripán.....	- 43 -

7.5 Determinación de las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A	- 43 -
7.6 Análisis <i>In silico</i>	- 44 -
7.7 Western Blot.....	- 45 -
7.8 Análisis Estadístico.....	- 46 -
8.Resultados	- 46 -
8.1 Efectos en la morfología en líneas celulares inducidos por el extracto de <i>D. incompta</i> .	-46 -
8.2 Efecto citotóxico del extracto de <i>D. incompta</i> en células de cáncer de mama y células control.	- 50 -
8.3 Concentración inhibitoria 50 (IC50) e índice de selectividad del extracto de <i>Decachaeta incompta</i> en líneas celulares de cáncer de mama y células control.	- 51 -
8.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A	- 54 -
8.5 Efectos en la morfología celular en líneas celulares inducidos por la incomptina A .-	- 57 -
8.6 Efecto citotóxico de la incomptina A en células de cáncer de mama y células control.	- 60 -
8.7 Concentración inhibitoria 50 (IC50) e índice de selectividad de la incomptina A en líneas celulares de cáncer de mama y células control.	- 62 -
8.8 Análisis <i>in silico</i>	- 63 -
8.9 Western Blot.....	- 67 -
9.Discusión.....	- 68 -
10. Conclusión	- 74 -
11. Perspectivas	- 75 -
12. Referencias.....	- 76 -

Abreviaturas

Akt: proteína cinasa activada por el factor de crecimiento parecido a la insulina 1

ATP: trifosfato de adenosina

Cis: cisplatino

CO₂: dióxido de carbono

DE: desviación estándar

DMEM: medio Eagle's modificado de Dulbecco

Dox: doxorubicina

EGF: factor de crecimiento endotelial

ER: receptor de estrógeno

FBP: fructosa-1,6-bisfosfatasa

FBS: suero fetal bovino

FHS: suero fetal de caballo

FPP: pirofosfato de farnesilo

g: gramo

GADPH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GLUT: transportador de glucosa

h: hora

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HIF-1: factor inductor de hipoxia-1

HK: hexocinasa

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

IC⁵⁰: concentración inhibitoria 50

IS: índice de selectividad

l: litro

LHRH: hormona liberadora de hormona luteinizante

MeOH: metanol

mg: miligramo

ml: mililitro

NF- κ B: factor nuclear kappa B

ng: nanogramo

MA: acetato de megestrol

MCT: transportador de monocarboxilato

MPA: medroxiprogesterona

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PBS: buffer salino de fosfatos

PFK: fosfofructocinasa

PK-M2: piruvato cinasa M2

PGI: fosfoglucoisomerasa

PR: receptor de progesterona

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPMI: medio del instituto Roswell Park Memorial

TPI: triosa fosfato isomerasa

TMTM: tumor mamario triple negativo

SERM: modulador selectivo de receptor de estrógeno

VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje

°C: Celsius

µg: microgramo

µM: micromolar

1.Introducción

1.1 El cáncer de mama

El cáncer se define tradicionalmente como un conjunto de enfermedades provocadas por la acumulación de mutaciones en el material genético de las células; estas mutaciones afectan mecanismos importantes involucrados en la regulación del ciclo celular, lo que puede ocurrir al inhibir la expresión de genes supresores de tumores y promover la activación de oncogenes. Como resultado, las células proliferan de una forma aberrante y descontrolada, formando una neoplasia y adquiriendo la capacidad de invadir y migrar hacia otros tejidos u órganos, lo que se conoce como metástasis. (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las células crecen y se dividen gracias a que poseen puntos de control que rigen el orden, la integridad y la fidelidad de los principales eventos del ciclo celular (Barnum y O'Connell, 2014). Si existe alguna anomalía, como daño al material genético, estos puntos de control detienen el ciclo, activando mecanismos de reparación para solucionar el problema y evitar que este daño sea heredado a las células hijas. Sin embargo, si el daño no puede ser reparado, el organismo opta por la muerte celular programada (apoptosis) para mantener la homeostasis tisular y evitar aberraciones (Pucci et al., 2000). Cuando estos mecanismos son superados por las mutaciones, la célula adquiere diferentes capacidades biológicas que le permiten una mejor adaptación y por consiguiente convertirse en una célula cancerosa.

Las células cancerosas poseen características que las distinguen de otras células. Estas características comprenden: 1) la inestabilidad genómica y mutación, 2) señales de proliferación sostenida, 3) evasión de los mecanismos supresores de crecimiento, 4) inmortalidad replicativa, 5) evasión de la muerte celular (apoptosis), 6) evasión del sistema inmune, 7) inflamación, 8) inducción de la angiogénesis, 9) activación de la invasión y 10) reprogramación energética (Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan y Coussens, 2012). En conjunto, estas características son primordiales para el desarrollo, la progresión y la invasión tumoral, y se han propuesto como blancos terapéuticos para ayudar a detener y contrarrestar esta patología (Figura 1).

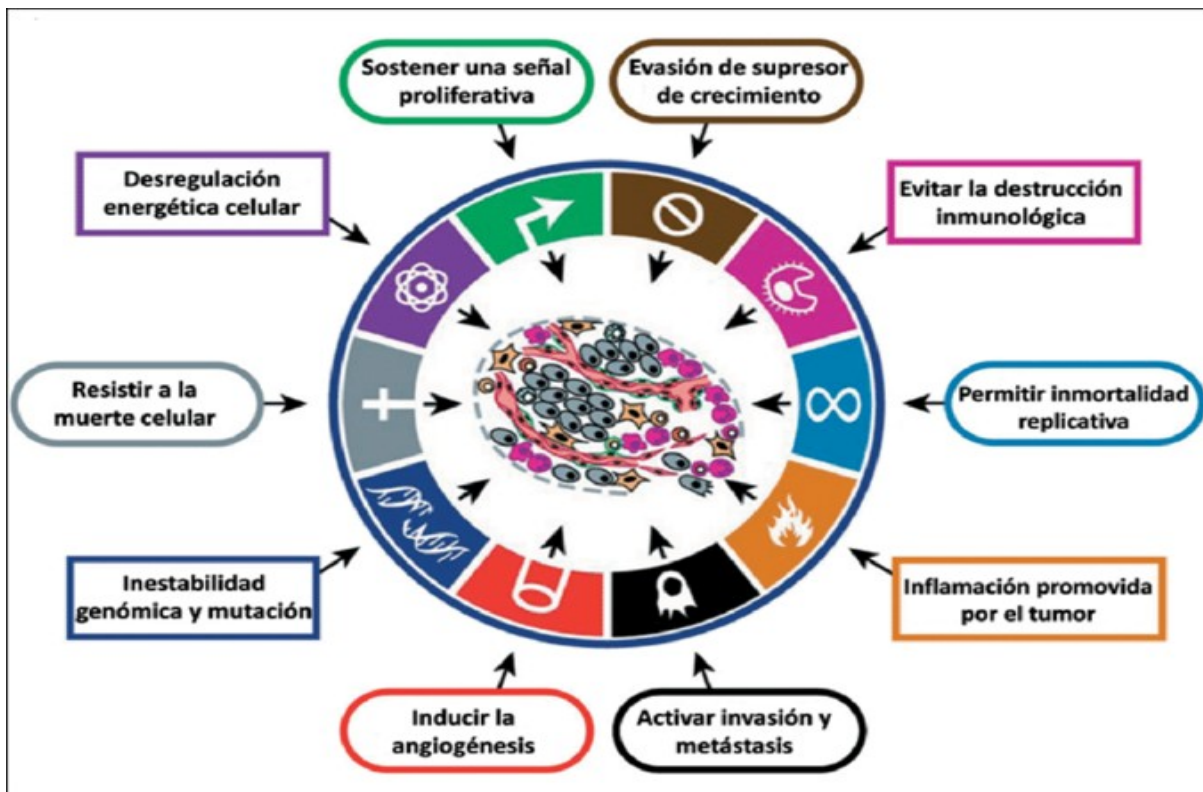


Figura 1. Características distintivas del cáncer (tomado y modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad no transmisible a nivel mundial, presentándose 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de defunciones cada año (Bray et al., 2018). De estos, aproximadamente el 11.8 % pertenecen a mujeres diagnosticadas con cáncer de mama, siendo este el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en mujeres (Ferlay et al., 2019). El cáncer de mama representa 1 de cada 4 cánceres diagnosticados entre las mujeres a nivel mundial, y por primera vez, el año pasado, el cáncer de mama se convirtió en el más diagnosticado, superando al de pulmón con un estimado de 2 millones de casos nuevos (Sung et al., 2021). La Organización Panamericana Sanitaria (OPS) informa que en América Latina se diagnostican 462,000 nuevos casos de cáncer de mama cada año y mueren alrededor de 100,000 mujeres y se estima que para el año 2030 habrá un incremento del 34% en estas cifras (OPS, 2020).

En los últimos años, el cáncer de mama en México ha incrementado tanto en incidencia como en mortalidad en donde la supervivencia a 5 años es del 30-45%. Por su parte, en los países desarrollados puede llegar hasta el 80% (Colditz, 2005). En el año 2014, la principal causa de muerte por neoplasia maligna en México ocurrió en mujeres con cáncer de mama (15.3%), seguido de cáncer cervicouterino (10.4%), cáncer de hígado y vías biliares (8.0%), y cáncer de estómago (7.0%), siendo estos los cánceres con mayor número de defunciones (Noverón y Torres-Domínguez, 2018). Se estima que las proyecciones de muerte por neoplasia maligna seguirán en aumento debido a que la población está envejeciendo y los estilos de vida siguen cambiando, lo que ha

resultado en una elevación de los factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de esta patología (Figura 2).

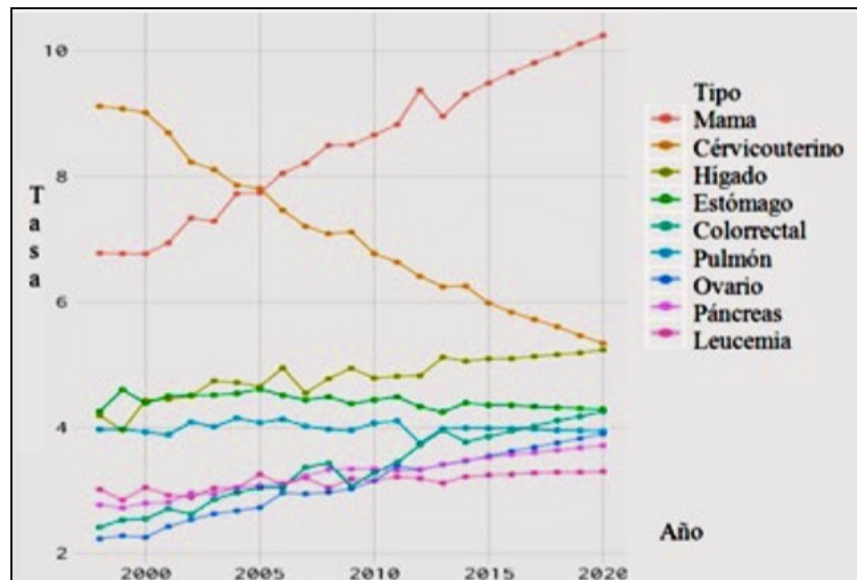


Figura 2. Tasas crudas de mortalidad por neoplasia maligna en mujeres en México. Se observa que la mortalidad por cáncer de mama es la primera causa de muerte y se estima que esta aumentará en los próximos años (tomada y modificada de Noverón y Torres-Domínguez, 2018).

1.1.1 Factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Según el Consenso Mexicano sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario, entre los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, además del género femenino, se encuentran: tener edad mayor a 50 años, contar con un antecedente familiar o personal de cáncer, ser portador/a de mutaciones en genes de susceptibilidad a cáncer de mama (como el gen BCRA1 y BCRA2), tener una vida menstrual mayor de 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 50), nuliparidad, tener hijos después de los 30 años, no amamantar, contar con una densidad mamaria alta, haber estado expuesto a radiaciones ionizantes, la

nuligesta, la terapia de reemplazo hormonal; además de factores relacionados con el estilo de vida, como obesidad (Aguilar et al., 2011), consumo de alcohol, tabaquismo y sedentarismo (Blair et al., 2016).

1.2 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea en la que proliferan células malignas en la glándula mamaria; este cuenta con distintas clasificaciones que dependen de las características morfológicas y biológicas del cáncer, lo cual determina sus diversos tratamientos y manejo interdisciplinario.

1.2.1 Clasificación histológica del cáncer de mama

La glándula mamaria se conforma por lobulillos productores de leche y conductos que conectan a estos lobulillos con el pezón. Estas estructuras son las que resultan afectadas por el cáncer. Por lo tanto, el cáncer de mama puede clasificarse dependiendo del tejido en el que se inicie. En este contexto, el carcinoma ductal es el de mayor prevalencia (70-80%), mientras que el carcinoma lobulillar es el segundo más común (10%) (Figura 3). El resto son los tipos histológicos menos comunes, tales como mucinoso, cribiforme, micropapilar, papilar, tubular, carcinomas medulares, metaplásicos y apocrinos (Tsang y Tse, 2020).

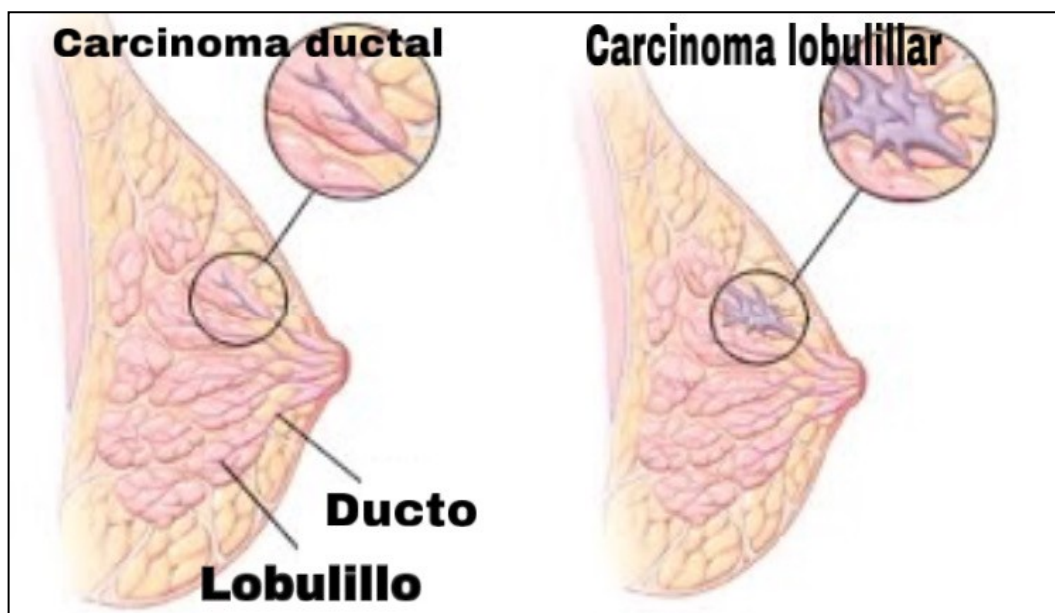


Figura 3. Tipos más frecuentes de cáncer de mama. El carcinoma ductal se caracteriza por la presencia de células anormales en el conducto mamario y es el de mayor prevalencia (70-80%) (izquierda); en el carcinoma lobulillar se forman células anormales en las glándulas que producen leche (lóbulos) y es el segundo más común (10%) (derecha).

1.2.2 Estadificación TNM del cáncer de mama

Los médicos utilizan la estadificación TNM para decidir el tratamiento y ayudar a predecir el pronóstico de un paciente, es decir, la probabilidad de recuperación. Esta clasificación considera el tamaño del tumor primario (T), la invasión a los nódulos linfáticos cercanos (N) y si existe invasión (metástasis) a otros órganos del cuerpo (M).

El estadio suele expresarse con un número entre 0 y IV. El estadio 0 corresponde al cáncer no invasivo que permanece en su ubicación original y el estadio IV al cáncer invasivo que se propaga fuera de la mama hacia otras partes del cuerpo (Tabla 1).

Tabla 1. Estadificación TNM de cáncer de mama (Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario 2017)

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1 (incluye T1 mi)	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1 (incluye T1 mi)	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1 (incluye T1 mi)	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1 (incluye T1 mi)	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.2.3. Subtipos moleculares del cáncer de mama

Mediante el uso de perfiles de expresión génica y de biomarcadores por inmunohistoquímica en tumores mamarios, se han definido diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, basándose en la ausencia o presencia de distintos marcadores; siendo estos: el cáncer de mama luminal A y luminal B (ambos receptores de estrógeno ER y progesterona positivos PR), el cáncer de mama HER-2+ que sobre expresa la proteína HER-2+ (human epidermal growth factor-2) y el cáncer de mama triple negativo (carece de ER, PR y HER-2). Dependiendo de esta clasificación, se optará por distintos tratamientos y manejo interdisciplinario

En la población mexicana la frecuencia de estos subtipos moleculares es del 60% para cáncer de mama con receptores hormonales positivos (cáncer luminal A y cáncer luminal B), el 20.4 % para cáncer de mama HER-2+ y el 23.1% para cáncer de mama triple negativo (CMDTCM; 2019).

Histológicamente los cánceres de mama luminal A son de bajo grado, menor índice de proliferación (dado por la expresión de la proteína KI67) y tienen un mejor pronóstico entre todos los subtipos, a diferencia del triple negativo que suele ser de alto grado y con un alto índice de proliferación, siendo los pacientes con este cáncer los que generalmente tienen un mal pronóstico y recaídas dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico (Tsang y Tse, 2020) (Figura 4). Otro problema es que, a pesar de los esfuerzos realizados para detectar el cáncer de mama oportunamente, todavía es muy frecuente que su detección se lleve a cabo cuando la patología ya se encuentra en estadios avanzados, lo que dificulta el tratamiento y reduce la probabilidad de supervivencia.

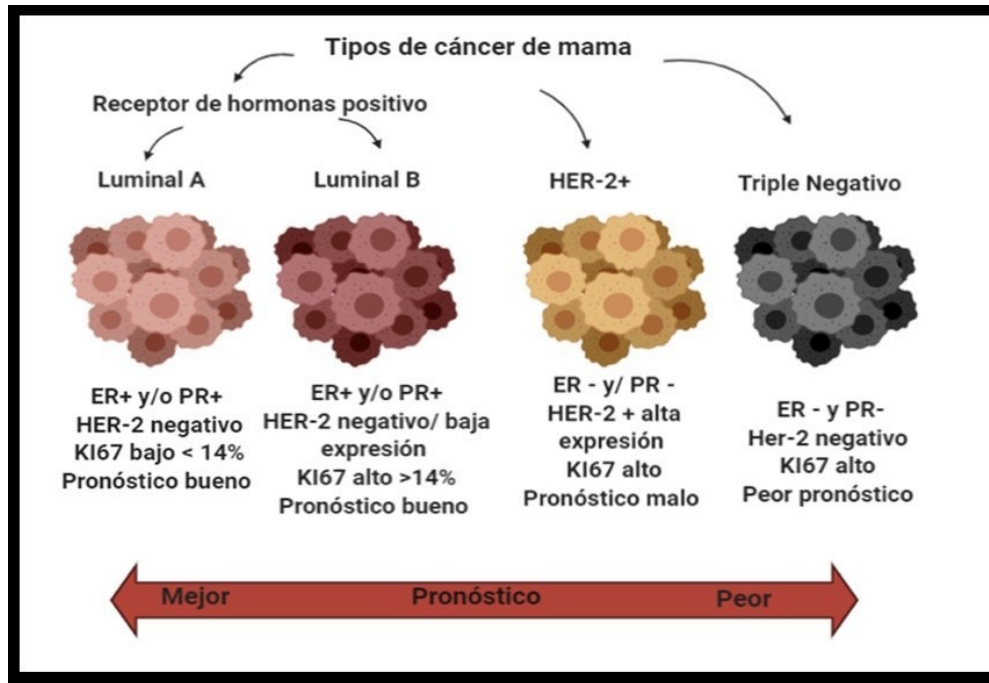


Figura 4. Clasificación molecular del cáncer de mama. El cáncer de mama puede dividirse en tres subtipos moleculares: cáncer de mama receptor de hormonas positivo (luminal A y B) (izquierda), cáncer de mama HER 2+ (centro) y cáncer de mama triple negativo (derecha). Cada uno de estos subtipos cuenta con distintas características que determinan su tratamiento y manejo interdisciplinario.

1.3 Tratamiento del cáncer de mama

En la actualidad, el tratamiento que el médico recomiende para tratar el cáncer dependerá en gran medida del tipo de cáncer, de su localización y del estadio en el que se encuentre. Debido a que el cáncer de mama es una patología heterogénea, el tratamiento debe ser multidisciplinario y de vanguardia por lo que se adecúa para cada paciente. Existen distintas alternativas para tratar el cáncer de mama, y deben considerarse los beneficios contra los posibles riesgos, así como los efectos secundarios con cada uno de los tratamientos. Estas alternativas se dividen tradicionalmente en 2 grandes terapias: 1) La terapia local o regional, que incluye al

tratamiento quirúrgico y la radioterapia, y 2) la terapia sistémica, en la que se incluye la quimioterapia, la hormonoterapia y las terapias blanco (Sánchez et al., 2008).

Las mujeres con cáncer de mama en los primeros estadios pueden recibir tratamiento tanto local como sistémico. La cirugía y la radioterapia son locales y son tratamientos administrados para reducir el riesgo de cáncer recurrente en la mama, en la pared torácica y en los ganglios linfáticos regionales. En algunos casos, estos tratamientos locales pueden prevenir la diseminación del cáncer y reducir su mortalidad. La quimioterapia, la terapia hormonal y las terapias blanco son tratamientos sistémicos que se administran después del tratamiento local para reducir las recurrencias sistémicas y la mortalidad general por cáncer de mama.

Tratamientos locales

El tratamiento local es el que se opta cuando el tumor se encuentra en los primeros estadios (I y II) y se trata el tumor en un sitio específico sin afectar el resto del cuerpo (Rosenberg,2000), sometiéndose principalmente a la cirugía como primera alternativa en las pacientes candidatas.

Según la American Cancer Society, dentro de esta clasificación se incluye:

1. La cirugía conservadora; también conocida como tumorectomía o mastectomía parcial (segmentaría), que es la cirugía en la que se extirpa solamente la parte del seno que tiene cáncer y un poco del tejido circundante; esto con el objetivo de conservar la mama lo mejor posible.

2. La cirugía no conservadora, que se divide en mastectomía total (o simple), mastectomía simple extendida, mastectomía radical y mastectomía radical modificada.

En general, la mastectomía es una cirugía en la que se extirpa una parte o totalmente el seno, incluyendo todo el tejido mamario y en ocasiones otros tejidos cercanos.

Existe un tratamiento complementario a la cirugía, mediante el uso de radioterapia. En este caso, se realizan radiaciones ionizantes en la mama o en la pared torácica para destruir posibles células cancerosas que pudieran haber quedado tras la operación. Este tratamiento se suministra durante 5 a 7 semanas, con una duración diaria de pocos minutos y en combinación con la cirugía, la radioterapia ha contribuido de forma importante a mejoras en el control de la enfermedad y en la calidad de vida de los pacientes (Lluch, 2016).

Terapia sistémica adyuvante

Se le llama adyuvancia a todo tratamiento antineoplásico administrado después de un manejo quirúrgico; sus objetivos son prolongar el periodo libre de enfermedad, reducir las recurrencias locales y sistémicas, y aumentar la supervivencia global. La terapia sistémica preoperatoria (neoadyuvante) y postoperatoria (adyuvante) benefician a muchas mujeres, ya que se puede reducir el tamaño del tumor, el riesgo de cáncer de mama recurrente o de alguna metástasis. En ambas terapias se administran medicamentos mediante vía oral o intravenosa para poder llegar a las células cancerosas; dependiendo del tipo de cáncer de mama, se opta por utilizar distintos

tipos de tratamiento con medicamentos, incluyendo la quimioterapia, la terapia hormonal y las terapias dirigidas o blanco (ACS; 2020).

1. Quimioterapia

La quimioterapia es un conjunto de medicamentos que actúan de distintas maneras y, en forma general, estos medicamentos pueden ayudar a combatir el cáncer de mama al interrumpir el crecimiento y la propagación de las células cancerosas. Se recomienda principalmente para pacientes de alto riesgo, como pacientes con cáncer de mama triple negativo o metastásico. Existen varias opciones de quimioterapia. La quimioterapia estándar general contiene tanto una antraciclina (doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina e idarrubicina,) como un taxano (paclitaxel, docetaxel y cabazitaxel.). Otras quimioterapias pueden contener agentes citotóxicos, como alquilantes, antimetabolitos y agentes derivados del platino (cisplatino y el carboplatino), cuyo objetivo es destruir las células cancerosas, frenando o deteniendo la enfermedad (de Ruijter et al., 2011).

La quimioterapia se administra en ciclos, seguido de un periodo de descanso para permitir que el paciente se recupere de los efectos secundarios que estos medicamentos ocasionan. En los Estados Unidos el régimen común de quimioterapia incluye el tratamiento con doxorubicina y ciclofosfamida durante cuatro ciclos, seguido de cuatro ciclos con paclitaxel (Moo et al., 2018). Otros programas óptimos incluyen el uso de un taxano como paclitaxel semanal por 12 semanas o tres veces a la semana durante cuatro ciclos (Sparano et al., 2008). Si estos regímenes son administrados adecuadamente pueden reducir la recurrencia y la mortalidad por cáncer de mama,

con una mayor magnitud de beneficio en los pacientes con cáncer de mama triple negativo (EBCTCG et al., 2012).

2. Hormonoterapia o terapia hormonal

Debido a que algunos tumores mamarios son afectados por hormonas, como el estrógeno y la progesterona (principales hormonas femeninas responsables del crecimiento mamario), estos expresan una mayor cantidad de receptores hormonales para dirigir su crecimiento. La hormonoterapia utiliza medicamentos que inhiben la síntesis de hormonas o bloquean sistémicamente estos receptores. Esta terapia se utiliza principalmente para tratar cánceres receptores de estrógenos positivos (ER) y/o cánceres receptores de progesterona positivos (PR) (Gibson et al., 2009).

La hormonoterapia se divide en:

- **Tratamientos competitivos:**

1. Moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM's). Estos medicamentos son moduladores que actúan uniéndose competitivamente a los receptores de estrógeno, actuando como agonistas y antagonistas de estrógenos, según el tejido diana (An, 2016), y son utilizados principalmente como tratamiento para controlar y disminuir el cáncer de mama. Tradicionalmente los SERM's son administrados a pacientes posmenopáusicas que hayan sido diagnosticadas con cáncer de mama receptor de hormonas positivos. Los principales SERM's para prevenir o tratar el cáncer de mama son el tamoxifeno, el toremifeno y el raloxifeno (Pinkerton y Thomas, 2014).

2. Progestágenos sintéticos o progestinas. Son medicamentos que poseen una actividad similar a la progesterona y se les han atribuido distintos usos médicos; uno de ellos es como tratamiento paliativo de diversos cánceres, incluyendo el de mama; los utilizados para esta labor son el acetato de medroxiprogesterona (MPA) y acetato de megestrol (MA). El mecanismo de acción propuesto de las progestinas es que interfieren con la reposición del receptor de estrógeno citoplasmático y, aunque no se une a los receptores de estrógeno, se ha demostrado que la progesterona disminuye la cantidad de receptor de estrógeno en el tejido diana, produciendo tasas de respuesta del 14% al 31% en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama metastásico (Blumenschein, 1983).

3. Tratamientos inhibidores de la aromatasa

Los inhibidores de la aromatasa son medicamentos que reducen o detienen la producción de estrógenos teniendo, efectos de regresión tumoral. Esto se logra bloqueando a la enzima aromatasa, que es la enzima responsable de la biosíntesis de los estrógenos. Estos medicamentos son útiles en mujeres que han pasado por la menopausia, aunque también pueden ser utilizados en mujeres premenopáusicas en combinación con supresión ovárica (Figg et al., 2014). Entre los inhibidores de la aromatasa de uso clínico aprobados para tratar el cáncer de mama se incluyen el anastrozol, el exemestano y el letrozol.

Después de la cirugía se puede optar por tratamiento hormonal para tratar pacientes con cáncer receptores de hormonas positivos, recomendando distintos programas que incluyen el uso de un inhibidor de la aromatasa en combinación con el tamoxifeno, lo

que ha mostrado buenos resultados (ACS,2020). Los esquemas más comunes son el uso de terapia endocrina entre 5 a 10 años para evitar la recurrencia del cáncer. Estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con tamoxifeno adyuvante durante 5 años puede reducir el riesgo de recurrencia en casi un 50% durante los años 0-4, con una reducción continua del riesgo de más del 30% en los años 5-9. Después de 5 años de tamoxifeno, se pueden utilizar 5 años adicionales de medicamentos inhibidores de la aromatasa, lo cual puede proporcionar una reducción adicional del 40% del riesgo relativo de recurrencia (Moo et al., 2018). Por lo tanto, la terapia hormonal puede ser altamente beneficiosa al conferir un beneficio adicional entre mayor sea su duración.

4. Supresión ovárica

La supresión ovárica es la eliminación o suspensión de la función de los ovarios. Esta opción permite convertir a mujeres premenopáusicas en posmenopáusicas, permitiendo así el uso de tratamientos hormonales, como los inhibidores de la aromatasa. La supresión ovárica se realiza mediante ooforectomía médica y con medicamentos análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), o agonistas como goserelina, leuprolida, buserelina y triptorelina (Al-Mahmood et al., 2018). Se ha demostrado que la supresión ovárica reduce la recurrencia del cáncer de mama temprano con receptor hormonal positivo en mujeres premenopáusicas, pero se está discutiendo si tiene una ventaja adicional sobre el tamoxifeno (Durrani y Heena, 2020).

3. Terapias dirigidas o terapias blanco.

Una de cada 5 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama presenta una sobreexpresión del factor-2 de crecimiento epidermal (HER-2+), por sus siglas en inglés) y de proteínas cinasas que, en conjunción, contribuyen al desarrollo y el crecimiento tumoral de forma más agresiva. Debido a esto, se han desarrollado diferentes tipos de tratamientos dirigidos cuya función es unirse a estas proteínas con el fin de disminuir la proliferación celular y mejorar el pronóstico del paciente; estos tratamientos se conocen como terapias dirigidas o terapias blanco. Estas terapias se conforman principalmente por anticuerpos monoclonales como el trastuzumab y el pertuzumab, y por medicamentos inhibidores de la cinasa como lapatinib, neratinib, tucatinib, gefitinib, erlotinib, sorafenib, sunitinib y dasatinib, entre otros; aunque se siguen desarrollando medicamentos de última generación que disminuyan los efectos secundarios a corto y largo plazo producidos por estos (Hartmann et al., 2009).

La terapia dirigida lleva una combinación con quimioterapia para tratar cáncer de mama HER-2 ayudando a reducir la recurrencia. En Estados Unidos el régimen para tratar pacientes con cáncer de mama HER-2 en etapas tempranas incluye la combinación de paclitaxel con trastuzumab por 12 semanas, seguida de 9 meses con monoterapia de trastuzumab (Tolaney et al., 2015). Además, existen datos que la combinación de pertuzumab con trastuzumab más quimioterapia mejora el pronóstico en mujeres con cáncer HER-2+ en etapas más avanzadas (Gianni et al., 2012).

1.4 Toxicidad de los tratamientos utilizados contra el cáncer mamario

La detección de cáncer de mama en México frecuentemente ocurre cuando este se encuentra en estadios avanzados. De ahí, que se opte por utilizar tanto terapia local como regional para mejorar el pronóstico de estas mujeres. No obstante, se han reportado distintos efectos adversos a corto y largo plazo derivados de estos tratamientos, por lo que es de suma importancia estar familiarizado con ellos para optimizar el manejo y la calidad de vida de los pacientes.

Efectos adversos de la radioterapia utilizada para tratar el cáncer de mama

La radioterapia es un tratamiento en el que se dirigen altas dosis de rayos X dosis al tejido comprometido para reducir células cancerosas y disminuir el tamaño del tumor; sin embargo, esta también destruye a las células sanas que se encuentran en el área, causando distintos efectos adversos. La radiación en la mama tiene el potencial de afectar negativamente el resultado cosmético a largo plazo de la mama tratada, así como de causar complicaciones graves debido a la dosificación accidental en el corazón, los pulmones y la mama contralateral (Brownlee et al., 2018).

Entre los efectos secundarios y adversos provocados por la radioterapia se incluyen: enrojecimiento de la piel, descamación, hinchazón, cambio de coloración de la mama, cansancio, linfedema, plexopatía braquial, debilitamiento de las costillas, neumonitis, cardiotoxicidad y aumento en la probabilidad de presentar segundos cánceres, como el angiosarcoma (ACS,2020; Shapiro y Recht, 2001).

Efectos adversos producidos por la quimioterapia

La quimioterapia se recomienda principalmente para pacientes de alto riesgo, con cáncer de mama triple negativo o metastásico. En general se administran regímenes que incluyen una combinación de distintos medicamentos que pueden provocar efectos secundarios, dependiendo de la dosis y del tiempo de administración. Además, algunas quimioterapias incluyen agentes citotóxicos cuya principal desventaja es que dañan el ADN, tanto de células sanas como de células cancerosas y, a menudo, resultan en numerosos efectos adversos (de Ruijter et al., 2011). Entre los efectos secundarios más comunes que provoca la quimioterapia se encuentran: caída del cabello, cambios en las uñas, náuseas, vómito, diarrea y fatiga, que se presentan hasta en el 80% de las pacientes tratadas con quimioterapia. En el 30% de los casos persisten por 6 a 12 meses después de la finalización del tratamiento (Bower et al., 2014). Generalmente estos efectos pueden aminorarse o desaparecer al terminar el tratamiento. No obstante, pueden surgir efectos adversos, dependiendo de los medicamentos utilizados en la quimioterapia.

Cardiotoxicidad

Algunos medicamentos como la doxorubicina, la epirubicina, la adriamicina u otras antraciclinas han sido asociadas con daño al corazón. La cardiotoxicidad a corto plazo está establecida en distintos ensayos clínicos. De los pacientes tratados con cuatro ciclos de doxorubicina y ciclofosfamida, aproximadamente el 17% pueden desarrollar enfermedad cardíaca asintomática. Otra complicación más grave provocada por el uso de antraciclinas es la insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, con una incidencia

del 5-48% dependiendo de la dosis acumulada de antraciclinas que, por lo general, no es reversible (Pinder et al., 2007).

Neuropatía

Los medicamentos utilizados en la quimioterapia causan neuropatía sensorial y motora en las extremidades, provocando síntomas como entumecimiento, debilidad, dolor, sensibilidad a los cambios de temperatura y hormigueo. La neuropatía suele ir de leve a moderada, dependiendo de la dosis individual, la dosis acumulada y el programa de administración (Shapiro y Recht, 2001; ACS, 2020).

Disfunción cognitiva

Ensayos preliminares sugieren que la disfunción cognitiva se presenta a mediano y largo plazo después de la quimioterapia adyuvante. La incidencia de daño cognitivo secundario a quimioterapia es de 20% a 30%. Existen reportes que señalan que del 17% al 75% de las mujeres sufren cambios cognitivos a causa del tratamiento instituido y probablemente también por el impacto del diagnóstico; por lo tanto, en pacientes con deterioro cognitivo persistente, la evaluación neurocognitiva es fundamental (Azim et al., 2011).

Aumento de riesgo de desarrollar leucemia y síndrome mielodisplásico

En raras ocasiones el tratamiento con quimioterapia puede provocar algunas leucemias como cáncer secundario en mujeres de edad avanzada, siendo la leucemia mielógena aguda el tipo más común de leucemia relacionada con el tratamiento. También existen casos de leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica y

síndrome mielodisplásico después de 5-7 años de tratamiento con agentes alquilantes (Patt et al., 2007). Además, se ha reportado que existe un incremento del riesgo de neoplasias hematológicas secundarias con la administración de inhibidores de la topoisomerasa II, incluidas antraciclinas, debido a que las translocaciones cromosómicas son una complicación del tratamiento (Felix, 2001).

Efectos adversos producidos por la terapia endocrina

En mujeres diagnosticadas con cáncer de mama receptor de hormonas positivo, algunas hormonas como la progesterona y el estrógeno son críticas para la iniciación y progresión del tumor (Dowsett, 2003), por lo que se utilizan dos clases de tratamientos farmacológicos: los moduladores selectivos de receptores de estrógeno como el tamoxifeno (mujeres pre y postmenopáusicas) y los inhibidores de la aromatasa, como el anastrozol, el letrozol y el exemestano (mujeres postmenopáusicas).

Existen síntomas menopáusicos inducidos por el tratamiento hormonal, los cuales incluyen bochornos, sudoraciones nocturnas, resequedad vaginal y atrofia, incontinencia, dispareunia, insomnio, irritabilidad, artralgias y fatiga), llegándose a presentar en el 40% de las mujeres tratadas (Moo et al., 2018; Consenso Mexicano sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario, 2019). En particular, medicamentos como el tamoxifeno y otros moduladores selectivos provocan aumento del dolor tumoral u óseo, sofocos, náusea, fatiga, cambios de humor, depresión, dolor de cabeza, adelgazamiento del cabello, estreñimiento, piel seca, pérdida de libido e incremento del riesgo de padecer trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y

cánceres uterinos (Hernandez et al., 2009). Los medicamentos inhibidores de la aromatasa suelen causar menos efectos secundarios graves que el tamoxifeno. No causan cánceres de útero y en pocas ocasiones provocan coágulos sanguíneos (ACS, 2020). Sin embargo, si pueden provocar dolor muscular y en articulaciones, acelerar la desmineralización de los huesos que aumenta el riesgo de padecer osteoporosis y otros síntomas musculoesqueléticos (Dowsett, 2003; Smith y Dowsett, 2003).

Efectos adversos de los medicamentos dirigidos a HER-2+ (terapia dirigida)

Aunque los medicamentos dirigidos a HER-2+ suelen ser poco agresivos, algunos pueden ser letales cuando se combinan con quimioterapia, llegando a provocar cardiotoxicidad durante o después del tratamiento. Por ello, es recomendable que el médico verifique la función cardíaca de las pacientes antes de iniciar con el tratamiento. Los anticuerpos monoclonales y conjugados de anticuerpos como trastuzumab, pertuzumab y lapatinib imatinib, neratinib y sunitinib pueden provocar erupción de la piel, diarrea grave, náuseas, fatiga (Moy y Goss, 2007), foliculitis, paroniquia, crecimiento del vello facial, eritema facial, diversas formas de alopecia frontal, anemia, trombopenia, neutropenia, problemas hepáticos, problemas gastrointestinales e hipertiroidismo. También se está debatiendo la toxicidad cardíaca con insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes que reciben tratamiento con imatinib y sunitinib (Hartmann et al., 2009), debido a que el riesgo de problemas cardíacos es mayor cuando estos medicamentos se administran con medicamentos de quimioterapia que también pueden causar daño al corazón, como la doxorubicina y la epirubicina.

Los efectos secundarios a corto y largo plazo que pueden presentarse por el uso de tratamientos contra el cáncer de mama aún se están estudiando con la finalidad de comprender cómo afectan la calidad de vida de las pacientes con cáncer mamario. Cabe subrayar también que estos tratamientos llegan a alcanzar un precio elevado, que aumenta dependiendo del estadio en el que se encuentre el tumor, sin mencionar que estos deben administrarse por un lapso prolongado para que surtan efecto, lo que incrementa considerablemente el gasto para el sistema de salud y para el mismo paciente (González-Robledo et al., 2015). Ante este panorama, en los últimos años se ha buscado desarrollar tratamientos novedosos dirigidos para cualquier tipo de tumor de glándula mamaria, que sean eficaces independientemente de los receptores moleculares que exprese o del estadio en el que el tumor se encuentre, que sean más económicos y presenten menos efectos adversos.

1.5 Reprogramación metabólica de la célula cancerosa

La mayoría de las células dependen de la fosforilación oxidativa que ocurre en la mitocondria para la obtención de energía. No obstante, las células en proliferación constante o en condiciones adversas como la disminución de oxígeno (hipoxia) optan por una vía de obtención de energía menos eficiente denominada glucólisis anaerobia, en donde el piruvato generado en la glucólisis es convertido a lactato (Reiter et al., 2019).

En las células cancerosas existen sellos distintivos que les permiten ventajas adaptativas; una de ellas es la reprogramación metabólica conocida como “Efecto

Warburg” o glucólisis aeróbica. Esta evidencia surge a partir de las observaciones del Dr. Otto Warburg que descubrió y reportó que las células cancerosas en comparación a sus contrapartes normales consumen una gran cantidad de glucosa y liberan lactato al medio, generando energía mediante la glucólisis y no a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial, aun y cuando exista presencia de oxígeno (Warburg, 1925) (Figura 5).

La glucólisis produce menor energía por glucosa que la fosforilación oxidativa realizada en la mitocondria. Sin embargo, la glucólisis aeróbica en las células cancerosas ocurre de 10 a 100 veces más rápido, lo que genera una cantidad de energía mayor que la oxidación completa de la glucosa en la mitocondria (Shestov et al., 2014). Los beneficios propuestos para esta reprogramación metabólica en cáncer es que el efecto Warburg soporta los requerimientos biosintéticos de la proliferación descontrolada, permitiendo la síntesis de novo de nucleótidos, proteínas y lípidos provenientes de múltiples vías ramificadas que emanan de la glucólisis (Vander Heiden et al., 2009).

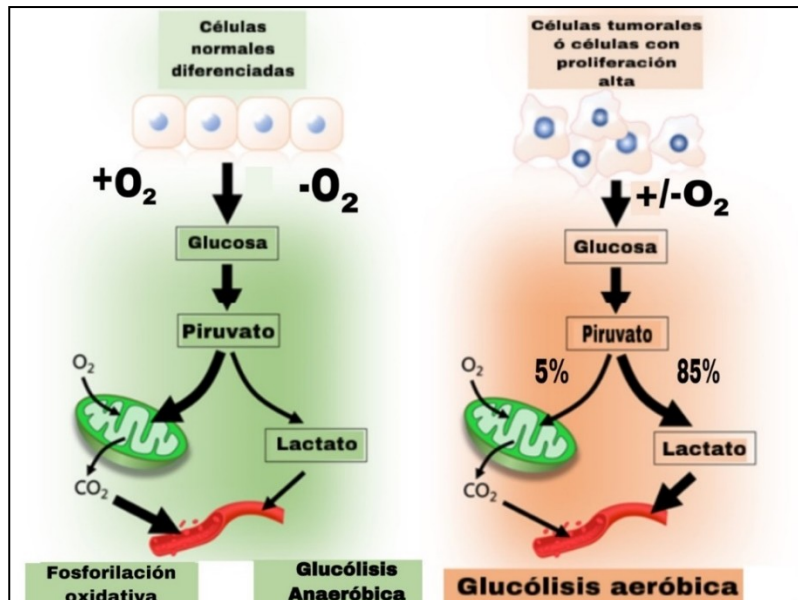


Figura 5. Efecto Warburg. La glucólisis es un mecanismo de obtención de energía utilizado por células normales y la mayoría de las células tumorales. Las células normales metabolizan la glucosa a piruvato mediante 10 reacciones catalizadas enzimáticamente. Una vez que la glucosa se degrada a piruvato puede seguir 2 vías distintas: en condiciones aeróbicas el piruvato ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y finalmente a la fosforilación oxidativa en la mitocondria para obtener 36 moléculas de ATP; en condiciones anaeróbicas el piruvato se convierte a lactato, produciendo 2 moléculas de ATP (izquierda). Algunas células con proliferación alta y la mayoría de las células cancerosas utilizan la vía anaeróbica de conversión de piruvato a lactato, oxidando la glucosa en presencia o en ausencia de O_2 , lo que se denomina efecto Warburg (derecha) (Tomado y modificado de Reiter et al., 2019).

Otra ventaja brindada a las células cancerosas es la liberación elevada de lactato al medio extracelular, que disminuye el pH y acidifica el microambiente, confiriéndole resistencia a la apoptosis, a la privación de nutrientes, a la radioterapia y a la quimioterapia (De Milito et al., 2012). Se ha propuesto que el efecto Warburg confiere funciones de señalización celular para la generación y modulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del estado de la cromatina (Liberti y Locasale, 2016) (Figura 6).

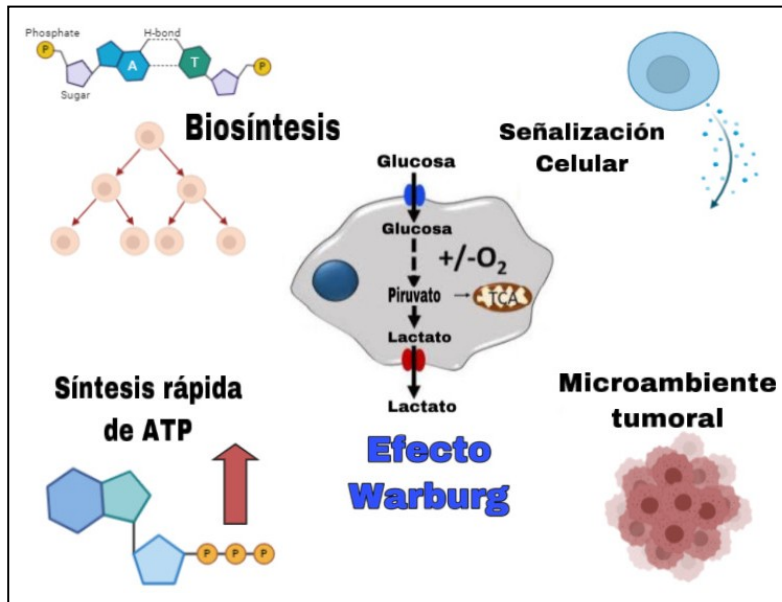


Figura 6. Ventajas adaptativas del efecto Warburg sobre las células cancerosas. Se ha descrito que la reprogramación metabólica del cáncer conlleva beneficios a estas células al generar una síntesis rápida y en mayor cantidad de ATP, un soporte de los requerimientos biosintéticos de las tasas de proliferación alta, la generación de un microambiente tumoral ácido que les provee resistencia a la apoptosis, privación de nutrientes, y a los tratamientos tradicionales, como la radioterapia y la quimioterapia. Se ha reportado que existe una señalización celular para la generación y modulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del estado de la cromatina.

1.6 Enzimas glucolíticas implicadas en la adaptación de células cancerosas

La glucólisis es un mecanismo de obtención de energía celular a partir de la degradación de la glucosa, producida por una serie de 10 reacciones catalizadas por sus enzimas correspondientes (Figura 7). En líneas celulares y tumores está ampliamente documentado que existe una sobreexpresión de genes y enzimas involucradas en la glucólisis. Esto, debido principalmente a la activación de diversas vías de señalización, como el factor inductor de hipoxia 1 (HIF-1), un factor de transcripción clave para las respuestas a niveles bajos de oxígeno, regulando diferentes respuestas celulares, como la proliferación, supervivencia, eritropoyesis y angiogénesis. En células cancerosas aumenta la expresión de enzimas glucolíticas y

de proteínas inhibidores de la apoptosis (Lambert et al., 2010). Otros factores de transcripción, como c-Myc, NF- κ B y varios genes supresores de tumores y oncogenes, de igual manera se encuentran involucrados en la atenuación de la función mitocondrial y en la promoción del recambio glucolítico (Lincet e Icard, 2015; Yu et al., 2017; Londhe et al., 2018). En relación de las proteínas de membrana, las glicoproteínas integrales de membrana que transportan glucosa (GLUT), en especial GLUT-1, facilitan el consumo basal de glucosa en distintos tipos celulares y existen muchos reportes de su sobreexpresión en distintos tipos de cáncer (Brown y Wahl, 1993; Grabellus et al., 2012; Reinicke et al., 2012), lo que explicaría el mayor consumo de glucosa en estas células.

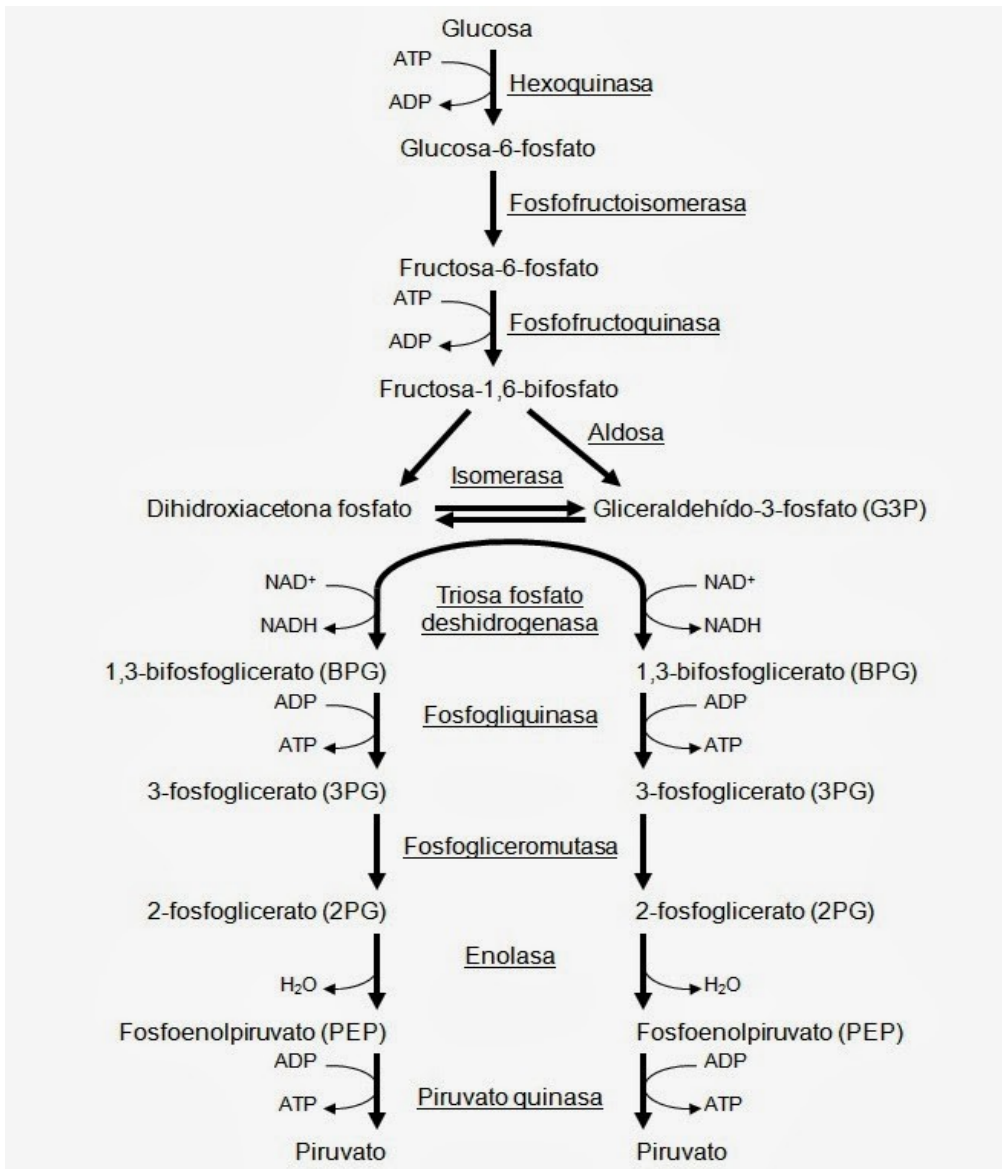


Figura 7. Glucólisis: reacciones y enzimas implicadas.

Muchas enzimas glucolíticas tienen distintas funciones en varios procesos no glucolíticos que permiten a las células cancerosas adaptarse a sus demandas y conferirles una mejor adaptación (Figura 8). Enzimas como las de la familia hexocinasa (HK), que consta de cuatro isoenzimas (HK1, HK2, HK3 y glucocinasa), estructuralmente similares, aunque desde el punto de vista funcional solamente HK1 y HK2 son similares. Estas enzimas poseen distintas funciones celulares, pero

principalmente intervienen en el metabolismo celular, fosforilando la glucosa y catalizando así la primera reacción de la glucólisis. En varios tipos de cáncer y en algunas metástasis, la HK2 se encuentra sobre expresada al ser comparada con tejidos normales y se ha asociado con un mal pronóstico (Palmieri et al., 2009).

Otros estudios indican que las células cancerosas altamente malignas emplean a la HK2 para asegurar su supervivencia durante cambios abruptos en el estado fisiológico/metabólico y protegerlas contra la muerte celular; esto ocurre cuando la HK2 se une al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) de la membrana externa mitocondrial, inhibiendo la liberación del citocromo c inducida por Bax y así prevenir la apoptosis (Pedersen et al., 2002; Abu-Hamad et al., 2008; Shoshan-Barmatz et al., 2015). De manera similar, la fosfoglucoisomerasa (PGI) y el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) y la fructosa bifosfato (FBP) poseen un efecto antiapoptótico al activar las vías de supervivencia como la vía AKT, y juegan un rol crucial en el mantenimiento del balance celular redox, protegiendo a las células cancerosas de radicales libres o de ROS (Xing et al., 2004; Lincet e Icard, 2015). La isoforma de la piruvato cinasa M2 (PK-M2) está envuelta en la regulación de la biosíntesis de ácidos nucleicos y lípidos, y tiene una participación importante en la progresión tumoral (Wu y Le, 2013). Otros roles importantes son los de las enzimas fosfofructocinasa (PFK) y la enzima fosfato triosa isomerasa (TPI), que participan en la activación del ciclo celular, y enzimas como la aldolasa que promueven la transición epitelio-mesénquima (Lincet e Icard, 2015).

El lactato es un metabolito clave para las células cancerosas y ha sido relacionado con distintos procesos del desarrollo tumoral. Por ejemplo, se ha estudiado la relación entre el incremento en la producción de lactato con la motilidad e invasividad celular, el escape inmunológico y la radio y quimio resistencia (Hirschhaeuser et al., 2011). En el efecto Warburg la glucólisis anaerobia se encuentra favorecida por el incremento de la actividad metabólica de la isoforma A del lactato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de piruvato a lactato, reduciendo la fosforilación oxidativa. La exportación e importación del piruvato se da a través de transportadores, específicamente de transportadores de monocarboxilato (MCT). En cáncer la sobreactividad de la lactato deshidrogenasa y de los transportadores de piruvato contribuyen al balance ácido, al microambiente tumoral y a la quimio resistencia, así como a la invasión y la metástasis (Ganapathy-Kanniappan y Geschwind, 2013).

Por todo lo anterior, se ha propuesto a las enzimas glucolíticas como un blanco terapéutico antitumoral para la inducción farmacológica de la muerte celular por apoptosis, al suprimir al efecto Warburg.

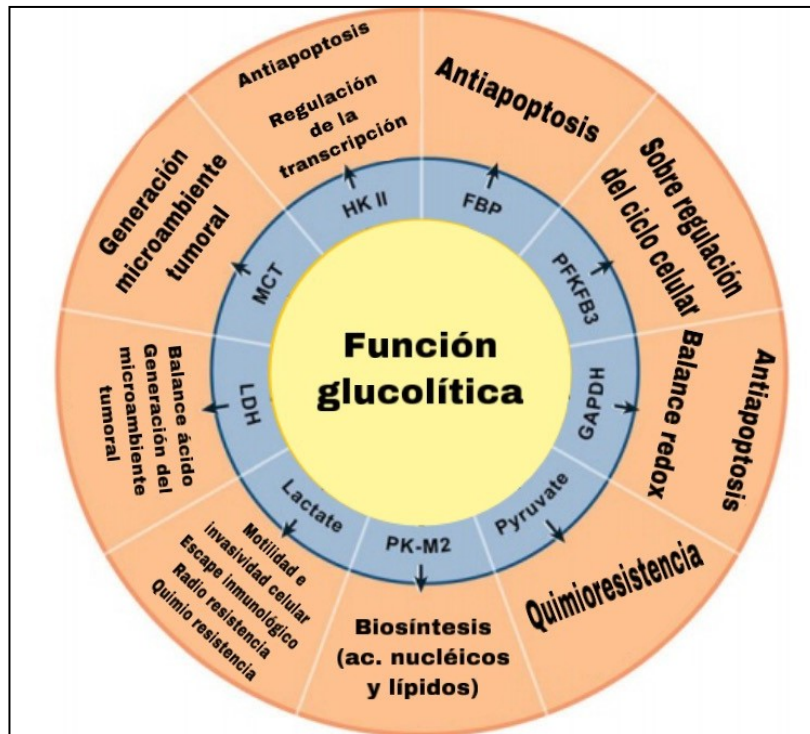


Figura 8. Enzimas glucolíticas implicadas en procesos no glucolíticos. Muchas enzimas de la glucólisis se encuentran sobre expresadas en cáncer y confieren una ventaja adaptativa a estas células (en los recuadros rojos). Estas enzimas se han propuesto como un blanco terapéutico potencial para la generación de nuevos tratamientos dirigidos contra el cáncer (HK II: hexocinasa II, FBP: fructosa bifosfato, PFKFB3: fosfofructocinasa-FB3, GA3PDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, PK-M2: piruvato cinasa-M2, LDH: lactato deshidrogenasa, MCT: transportadores de monocarboxilato. (Modificado de Ganapathy y Geschwind, 2013).

1.7 Las plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicos

Desde la época antigua el ser humano consume y utiliza productos naturales, principalmente plantas, para aliviar o disminuir algunos síntomas o enfermedades que padecían. Al basarse en la observación y experiencia obtuvieron amplio conocimiento que se transfirió a sus descendientes y que ha ido evolucionando hasta convertirse en la medicina tradicional contemporánea.

La OMS reconoce y define a la medicina tradicional como el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias

indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2020). Aunque no existen datos precisos, se estima que más del 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales y que gran parte de los tratamientos que se utilizan actualmente contienen algún extracto obtenido de plantas o de sus principios activos (Bermúdez et al., 2005). En cuanto a los tratamientos utilizados para tratar algún tipo de cáncer, la mayoría provienen de aislados de plantas medicinales; de estos, entre el 44-60% provienen de origen natural o se han derivado de ellos: 24% son productos naturales, 11% son de origen vegetal y 9% son versiones sintéticas de los naturales (Hostettmann et al., 2000; Cragg y Newman, 2005; Díaz García et al., 2011). Por lo tanto, el uso y conservación de plantas medicinales constituye un recurso valioso en los sistemas de salud de varios países en vía de desarrollo.

Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos (compuestos bioactivos) que les sirven como defensa al ataque de insectos y para adaptarse a las condiciones ambientales. Estos compuestos son clasificados en metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos) y en metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos, alcaloides, etc.) (Vélez et al., 2014; Ruiz y Suarez, 2015), siendo estos últimos los utilizados para el descubrimiento y desarrollo de medicamentos. Dentro de los metabolitos secundarios, los terpenos conforman el grupo más abundante, registrándose hasta la fecha más de 46,000 compuestos.

1.8 Lactonas sesquiterpénicas

Los sesquiterpenoides es un grupo particular de terpenos. Son compuestos incoloros y lipofílicos, su biosíntesis en plantas ocurre en el retículo endoplasmático y se originan de tres unidades de isopreno, produciéndose a través de pirofosfato de farnesilo (FPP) (Yu & Utsumi, 2009). A pesar de la evidente diversidad en su estructura y función, todos los sesquiterpenos constan de un esqueleto de 15 carbonos y por lo menos un anillo lactónico, y si bien su estructura es diversa, la mayoría de las formas funcionales son cíclicas, describiéndose a la fecha más de 200 sesquiterpenos diferentes con gran diversidad estructural (Pérez-Urria & García, 2009; Ruiz y Suarez, 2015).

Un grupo particular de sesquiterpenoides, conocidos como lactonas sesquiterpénicas, han llamado la atención debido a que existen varios reportes en los que se les ha atribuido actividad farmacológica, como propiedades antimicrobianas, citotóxicas, antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, antifúngicas y anticancerígenas (Babaei et al., 2018). Estas propiedades se le atribuyen principalmente a la estructura α -metileno- γ -lactona, que es un anillo que contiene oxígeno con función carbonilo; como consecuencia, posee un gran poder alquilante que actúa sobre los factores de transcripción y las enzimas del cuerpo humano, provocando cambios estéricos y químicos en la diana, y afectando su capacidad para funcionar adecuadamente (Chadwick et al., 2013).

1.9 Actividad anticancerígena de las lactonas sesquiterpénicas

Debido a que las lactonas sesquiterpénicas han mostrado actividades anticancerígenas importantes, se han propuesto varios mecanismos de acción, entre los que destacan la posibilidad de inhibir el crecimiento tumoral a través de cambios en el equilibrio redox de las células (Babaei et al., 2018) y la expresión de factores involucrados en los ciclos celulares, así como aumento de factores relacionados con la apoptosis y reducción de factores antiapoptóticos, de metástasis y de invasión celular, la producción de ROS, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el subsecuente efecto sobre las vías de señalización en las células (Hamzeloo-Moghadam et al., 2015). Esto ha sido confirmado por distintos autores que han utilizado cultivos celulares de cáncer, destacando cáncer de ovario (Choi y Ahn 2009; Yang et al., 2011), cáncer de pulmón (Zhang et al, 2009), linfomas (Li et al., 2013), leucemias (Zhang et al, 2012), cáncer de hígado (Hsu et al., 2009) y cáncer de mama (Fallahian et al. 2015; Hamzeloo-Moghadam et al., 2015; Yang et al., 2016), entre otros, que han reportado resultados como predictores de actividad antitumoral de las lactonas sesquiterpénicas.

Lactonas sesquiterpénicas, como la partenolida, han sido mencionadas en diversos estudios y es de las más estudiadas con potencial para el tratamiento del cáncer, debido a su actividad citotóxica. Se ha reportado que aumenta la sensibilidad celular a medicamentos utilizados en la quimioterapia e inhiben la migración e invasión celular, estimulando distintos estímulos pro apoptóticos (Chadwick et al, 2013; deGraffenried et al., 2004). La costunalida e isodeoxielefantofina, de igual manera,

han mostrado resultados alentadores al arrestar el ciclo celular, producir ROS y suprimir la vía NF-kB, importante para la promoción del cáncer (Roy y Manikkam, 2015; Verma et al., 2019). A la fecha estos mecanismos se conocen muy bien y existe amplia documentación acerca de ellos; no obstante, no se ha profundizado en cómo las lactonas sesquiterpénicas podrían alterar el metabolismo glucolítico de las células de cáncer, ya que esta es una capacidad que distingue a las células comprometidas de las normales y se le considera un blanco terapéutico de interés.

Una de las primeras observaciones sobre este tema ocurrió en 1978, cuando la lactona helenanina suprimió algunas enzimas de la glucólisis de células de carcinoma de ascitis de Ehrlich-Lette, específicamente la hexocinasa, la fosfofructocinasa y la aldolasa (Hall et al., 1978). Otro ejemplo es la dimetilaminomicheliolida, que puede alterar la glucólisis aeróbica al activar irreversiblemente la enzima piruvato cinasa M2 y la disminución de la glucosa 6 fosfato y lactato que, en consecuencia, suprime la proliferación de células de glioblastoma (Guo et al., 2019). Por lo tanto, las lactonas sesquiterpénicas representan agentes terapéuticos potenciales dirigidos a las enzimas glucolíticas contra distintos tipos de cánceres.

2. Antecedentes

En México la medicina tradicional ha estado presente desde la antigüedad, cuando nuestros antepasados utilizaban diversos productos naturales, entre ellos, algunas partes de plantas como las hojas, raíces, semillas y frutos para combatir distintos síntomas y enfermedades que padecían. Hoy en día, las plantas se siguen utilizando en varios estados del país. En particular, en Oaxaca, Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Estado de México, Jalisco y Puebla, la planta conocida comúnmente como “el Solecito” se utiliza para tratar infecciones gastrointestinales (Calzada et al., 2009). Su nombre científico es *Decachaeta incompta* (DC.) R.M. King y H. Rob (Figura 9), y forma parte de la familia Asteraceae (Koc et al., 2015).

Extractos de las hojas de *Decachaeta incompta* llevaron al aislamiento de cuatro lactonas sesquiterpénicas tipo heliangólidas, a las que se denominó incomptinas A (Misky et al., 1987), B (Misky et al., 1985), C (De Luengo et al., 1986) y D (Alvarado et al., 1979). El extracto y las incomptinas mostraron propiedades anti-giardia, antiprotozoaria, antibacterial y antipropulsiva (Guerrero et al. 1994; Calzada et al. 2009; Calzada et al., 2020). De ellas, la incomptina A mostró mayor actividad antiprotozoaria, seguida de las incomptinas C, D, y B (Bautista et al., 2012). De ahí que a la incomptina A se le ha prestado mayor atención (Figura 10).

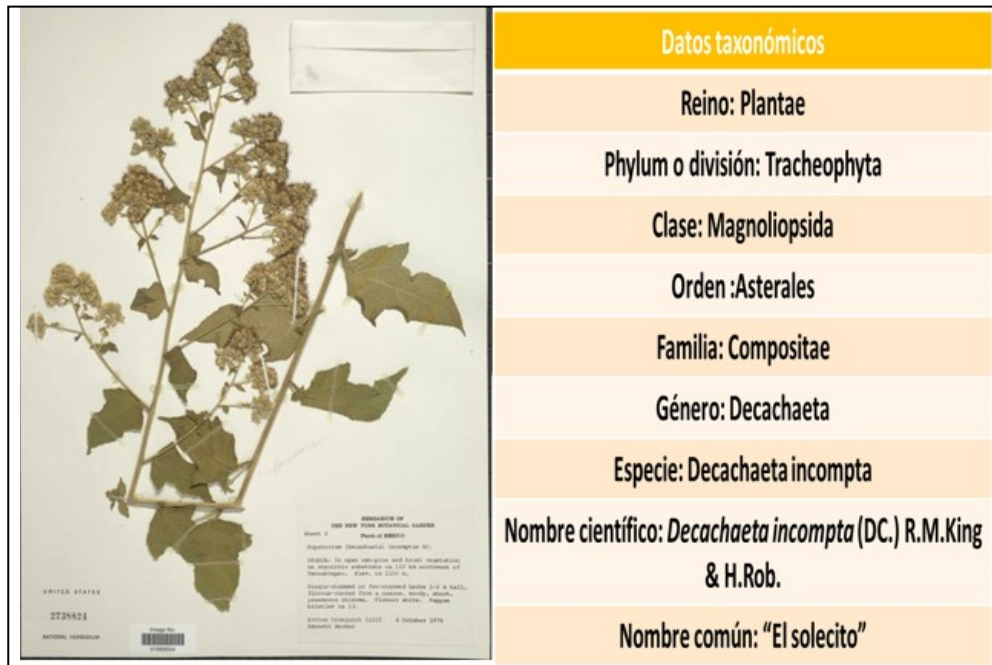


Figura 9. *Decachaeta incompta* (DC.) R.M.King y H.Rob y sus datos taxonómicos

Estudios fitoquímicos posteriores demostraron que la incomptina A posee actividad anti-amiba y anti-giardia potente (Calzada et al., 2009), lo que podría explicar su efecto anti-diarreico. En 2013, otro estudio reportó que la incomptina A en tratamiento en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* altera la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de glucosa. En particular, tres enzimas glucolíticas, la enolasa, la aldolasa y el piruvato sintasa fueron disminuidas, sugiriendo que la incomptina A altera la vía glucolítica (Velázquez-Domínguez et al., 2013). Estas observaciones dirigieron a utilizar a la incomptina A en estudios de células cancerosas, debido a que estas células utilizan a la glucólisis como principal fuente de energía.

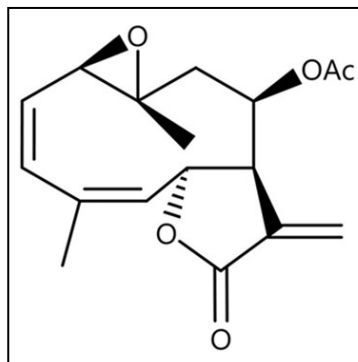


Figura 10. Estructura de la incompitina A.

Posteriormente, resultados preliminares demostraron que la incompitina A regula la expresión de NF- κ B en cáncer, vía involucrada en la proliferación y supervivencia celular. También se observó que la incompitina A presenta mayor especificidad hacia las células tumorales que a las normales y presenta menos efectos adversos que otros compuestos usados en la terapia del cáncer (Pérez-Calzada et al., 2013). Por todo lo anterior, además de que su obtención podría ser de bajo costo, consideramos que es de suma importancia evaluar a la incompitina A como molécula anti proliferativa en células cancerosas de mama.

3. Justificación

El cáncer se considera como un problema de salud pública mundial. En particular, el cáncer de mama provoca un elevado número de muertes y representa el 23% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados cada año (Castrezana, 2017). Hoy en día, debido a que los tratamientos actuales son muy limitados y presentan distintos efectos adversos, tanto la incidencia como la mortalidad siguen aumentando y, a pesar de los esfuerzos realizados para detectar el cáncer de mama oportunamente, todavía es muy frecuente que su detección se haga cuando la patología se encuentra en estadios avanzados. Además, hasta la fecha no existe un tratamiento dirigido para cualquier

tipo de tumor de glándula mamaria, independientemente del estadio en que se encuentre y que carezca de efectos adversos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas moléculas que tengan propiedades anti proliferativas que propicien el desarrollo de nuevos tratamientos para este cáncer es un tema prioritario.

En este contexto se han realizado investigaciones tendientes a buscar nuevos compuestos capaces de detener el cáncer de mama en sus etapas iniciales, con menores efectos adversos y costos más accesibles para el sistema de salud. En esta búsqueda, históricamente los compuestos naturales son considerados como buenos candidatos. En particular, resultan de interés para el presente trabajo las lactonas sesquiterpénicas, las cuales han sido reportadas con actividades antitumorales y anti metastásicas (Ruiz y Suarez, 2015).

México es un país cuenta con una gran variedad de plantas que se utilizan en la medicina tradicional y son de interés farmacológico; una de ellas es “el solecito”, *Decachaeta incompta*, una planta que se utiliza para tratar problemas gastrointestinales en estados del sur de la República. Del extracto de las hojas de esta planta se han aislado distintas lactonas sesquiterpénicas, una de ellas es la incomptina A, que ha mostrado la capacidad para reducir el metabolismo de glucosa en trofozoítos mediante la alteración de la expresión de proteínas de la vía glucolítica (Velázquez-Domínguez et al., 2013), además de que se sabe que regula la expresión de NF- κ B en células tumorales.

En el presente estudio, se plantea determinar el efecto anti proliferativo del extracto de *D. incompta*, así como de su lactona sesquiterpénica incomptina A en líneas celulares

de cáncer de mama; analizando si las modificaciones en el metabolismo de la glucosa son las responsables de disminuir la proliferación celular y detener el desarrollo del cáncer. La incompina A representa un compuesto alternativo para el tratamiento del cáncer de mama. Esta investigación también pretende sentar las bases para la investigación de compuestos de origen vegetal con actividad antitumoral en México, aprovechando la biodiversidad vegetal del país y así vincular el área agrícola con la investigación médica y farmacéutica.

4. Preguntas de Investigación

¿Tendrá el extracto de *D. incompta* y la incompina A un efecto anti proliferativo en distintas líneas celulares de cáncer mama?

¿El tratamiento con el extracto y la incompina A alterarán la expresión de enzimas de la vía glucolítica y como consecuencia, disminuirá la viabilidad celular y detendrá el desarrollo del cáncer?

5. Hipótesis

El extracto de *D. incompta* y la incompina A tienen un efecto anti proliferativo en las líneas celulares de cáncer de mama al disminuir la expresión de enzimas glucolíticas provocando la muerte celular.

6. Objetivo General

Explorar el papel anti proliferativo del extracto de *D. incompta* y de la incompina A en líneas celulares de cáncer de mama.

6.1 Objetivos Particulares

- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC^{50}) del extracto de *D. incompta* en las líneas celulares de cáncer de mama 4T1, T47D, MCF-7, MDA-231 y en la línea de mama no tumorigénica MCF-10A.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A y realizar estudios de modelado molecular del metabolismo de la glucosa.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC^{50}) de la incomptina A en las líneas celulares de cáncer de mama 4T1, T47D, MCF-7, MDA-231, y en la línea de mama normal MCF-10A.
- Analizar la participación del extracto y de la incomptina A en la expresión de las enzimas HIF-1, hexocinasa II, piruvato cinasa, aldolasa y enolasa implicadas en el metabolismo celular de cáncer de mama.

7. Material y Métodos

7.1 Material vegetal

Se recolectaron especímenes de *Decachaeta incompta* en el estado de Oaxaca, México (16 ° 36'00"N, 95 ° 59'00"O), fueron identificados por un taxonomista del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y depositados en el Herbario institucional IMSSM con número de baucher (15311). El extracto de las hojas de *D. incompta* y la incomptina A fueron obtenidos y donados por el Dr. Fernando Calzada Bermejo, jefe de la Unidad en Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades 2° piso CORSE del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

30 g de hojas de *Decachaeta incompta* fueron secadas y trituradas hasta obtener un polvo fino, dando un rendimiento de 25 g. El material vegetal se extrajo por percolación a temperatura ambiente con diclorometano (350 ml). Después de la filtración, los extractos se combinaron y se evaporaron al vacío para producir 2,0 g de residuo rojo (Calzada et al., 2009).

Para la purificación de la incomptina A se utilizaron 2 gramos del extracto que fueron sometidos a columna de cromatografía (gel de sílice G, 20 g, malla 70-230, Merck) con un paso gradiente de hexano y diclorometano-MeOH para obtener 109 mg de incomptina A, la cual fue identificada por resonancia magnética nuclear y por cromatografía en capa fina.

7.2 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (epitelial, cáncer de mama luminal A), T47D (epitelial, cáncer de mama luminal A), MDA-231 (epitelial, cáncer de mama triple negativo), 4T1 (epitelial, cáncer de mama triple negativo) y la línea celular de mama normal MCF-10A, adquiridas del banco del ATCC a través de distribuidores exclusivos.

7.3 Cultivos Celulares

Las líneas celulares 4T1 y T47D fueron mantenidas en medio RPMI-1640 con 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Las líneas MDA-231 y MCF-7 fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico. Finalmente, la línea de mama no tumorigénica MCF-10A fue mantenida en medio DMEM/F12 suplementado con 5% de suero fetal de caballo (FHS), 10 µg/ml de insulina, 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 20 ng/ml de factor de crecimiento endotelial (EGF) y 1% de antibiótico. Todas las líneas células se incubaron en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂.

Para obtener la densidad celular necesaria para los ensayos, las células fueron lavadas con PBS-1x y el medio era cambiado diariamente hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80%.

7.4 Análisis de la actividad citotóxica del extracto de *D. incompta* y de incomptina A.

7.4.1 Método de exclusión de azul de tripán.

Una vez que las líneas celulares alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80%, estas fueron cosechadas. Se sembraron 1×10^5 células/pozo en placas de 48 pozos dejándolas incubar por 24 h. El extracto y la incomptina A fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%. Las líneas celulares 4T1, T47D, MDA-231 y MCF-7 fueron tratadas con distintas concentraciones del extracto (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$) y de incomptina A (5, 7, 9, 12 $\mu\text{g/ml}$), mientras que la línea no tumorigénica MCF-10 A fue tratada con concentraciones del extracto (25, 50, 75, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$) y de incomptina A (5, 7, 10, 13, 15 y 18 $\mu\text{g/ml}$). Se utilizó DMSO (1%) como control negativo y los fármacos estándar doxorrubicina y cisplatino como control positivo. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas, teñidas con azul de tripán y contadas después de 24 h del tratamiento para calcular las concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) utilizando un modelo de regresión no lineal a partir del porcentaje de células muertas para cada una de las concentraciones evaluadas mediante el software GraphPad Prism 8.

7.5 Determinación de las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A.

Existen distintos programas de acceso libre que son utilizados para determinar si una molécula posee cierto potencial farmacológico y los posibles riesgos toxicológicos para el consumo humano. La estructura bidimensional y tridimensional de la incomptina A se obtuvo de Pubchem CID 118707242. El sistema simplificado de entrada de línea de

entrada molecular (SMILES) de la incoptina A fue utilizado en los softwares Molinspiration, SwissAdme y ADMETSar para evaluar las propiedades fisicoquímicas de la incoptina A.

7.6 Análisis *In silico*

Los análisis *in silico* se realizaron con el programa AutoDock versión 4.2.6. Se utilizaron proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico cuyas estructuras cristalizadas fueron obtenidas de Protein Data Bank (PDB) siendo las siguientes: 1H2M para HIF-1 α , 2NZT para hexocinasa II, 4G1N para piruvato cinasa M2, 2ALD para aldolasa, 2PSN para enolasa y 1I10 para lactato deshidrogenasa. Como comprobación, se realizó un acoplamiento molecular de la enzima lactato deshidrogenasa contra su ligando cocrystalizado oxamato (CID: 974).

Las proteínas fueron preparadas para el acoplamiento molecular removiendo todas las moléculas de agua y los heteroátomos. La estructura de la incoptina A se obtuvo de Pubchem con CID118707242 y se realizó la minimización energética del ligando utilizando el software Avogadro 2 1.90.0. Los cálculos del Docking molecular fueron conducidos con AutoDock versión 4.2.6., en donde se automatizó el Docking dentro del sitio de unión a ligando de la proteína rígida. Todas las moléculas de agua fueron retiradas de la estructura cristalográfica y todos los átomos de hidrógeno fueron adicionados. Tanto para las proteínas como para los ligandos se les asignaron cargas, mientras que los hidrógenos no polares fueron alineados. El programa auxiliar Autogrid se utilizó para generar los mapas de grid. Cada grid realizado fue centrado en las coordenadas cristalográficas para abarcar toda la superficie de la proteína y buscar los

distintos sitios de unión a ligando. Las dimensiones del grid fueron 120 x 120 x 120 puntos. Se aplicó el algoritmo genético Lamarckiano como criterio de búsqueda de mejores conformaciones de acoplamiento; el número de corridas fue de 10. Después del Docking molecular, todas las posibles conformaciones de acoplamiento fueron rankeadas por la menor energía, representada por un valor de ΔG : Kcal/mol.

7.7 Western Blot

Para evaluar si el extracto de *D. incompta* y la incomptina A modifican la expresión de enzimas glucolíticas en células cancerosas se utilizaron las líneas celulares 4T1, T47D, MCF7, MDA-231 y MCF10A bajo las siguientes condiciones: células sin tratamiento, células con DMSO (1%), células con la IC⁵⁰ de extracto e incomptina A correspondiente para cada línea celular. Las células fueron incubadas durante 24 h y posteriormente se extrajo la proteína total para los ensayos de Western blot. Las proteínas obtenidas se cuantificaron en Nanodrop; se utilizaron 30 μ g de proteína total para cargar en cada pozo y fueron sometidas a una separación de proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida. Después de la electroforesis en gel, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon en amortiguador de bloqueo (leche descremada al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos primarios anti-HIF-1, anti-hexocinasa II, anti-piruvato cinasa, anti-aldolasa anti-enolasa y anti-tubulina (control de carga). Las membranas se lavaron en PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante

durante 1 h y se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente se realizó el revelado de los geles para analizar la expresión de cada una de las proteínas.

7.8 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los valores se representaron como la media \pm desviación estándar (DE). Los resultados entre los grupos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.

8.Resultados

8.1 Efectos en la morfología en líneas celulares inducidos por el extracto de *D. incompta*.

Para obtener evidencia acerca del efecto citotóxico del extracto de *D. incompta* se decidió observar el efecto en la morfología de las células al utilizar distintas concentraciones del extracto durante 24 h de incubación. La citotoxicidad se asocia con cambios morfológicos, como la disminución de la densidad celular, pérdida de la morfología celular y pérdida de la adherencia.

La línea celular cancerosa MDA-231 y la línea no tumorigénica MCF-10A fueron tratadas con DMSO (1%) como control negativo y con concentraciones del extracto (25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$). En las células MDA-231 las modificaciones morfológicas se aprecian a partir de la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ del extracto diclorometano, donde se aprecia una disminución aparente en la densidad celular con respecto al grupo control.

En 50 y 75 $\mu\text{g/ml}$ del extracto se observa una disminución en la densidad celular aún mayor; además, se presentan cambios como pérdida de la adherencia y una morfología redondeada y más pequeña, lo que podría indicar estrés o muerte celular. Finalmente, en la concentración más elevada (100 $\mu\text{g/ml}$) prácticamente todas las células murieron (Figura 11).

Para determinar qué tan tóxico sería el extracto para líneas no tumorigénicas, decidimos observar el efecto del extracto sobre la morfología de la línea MCF-10A. Se utilizaron concentraciones ascendentes del extracto (25, 50, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron durante 24 h. En la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ no se observan cambios aparentes en la densidad y morfología en las células con respecto al grupo control. En la concentración 50 $\mu\text{g/ml}$ se percibe una ligera disminución en la densidad celular, a diferencia de la línea tumorigénica MDA-231, donde la misma concentración tuvo un mayor efecto dañino. En concentraciones altas del extracto diclorometano (100 y 125 $\mu\text{g/ml}$) se observa un mayor número de células con morfología redonda y aparentemente estresadas o muertas, pero se perciben aún células con adherencia y morfología normal (Figura 12).

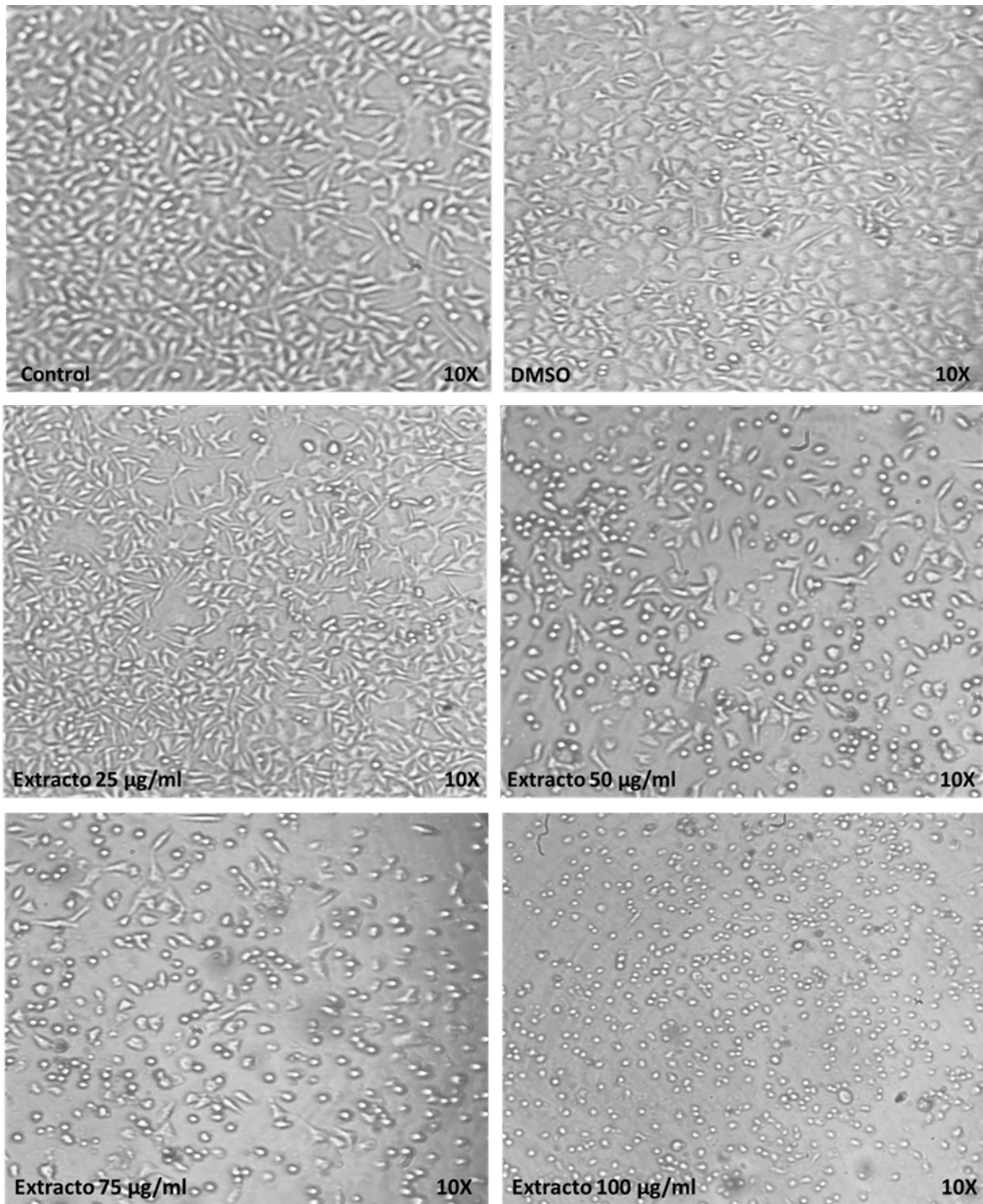


Figura 11. Morfología de la línea celular MDA-231 bajo tratamiento de distintas concentraciones del extracto de *D. incompta* (25,50 75 y 100 µg/ml). Las líneas celulares fueron tratadas por 24 h. Se utilizó DMSO (1%) como control negativo.

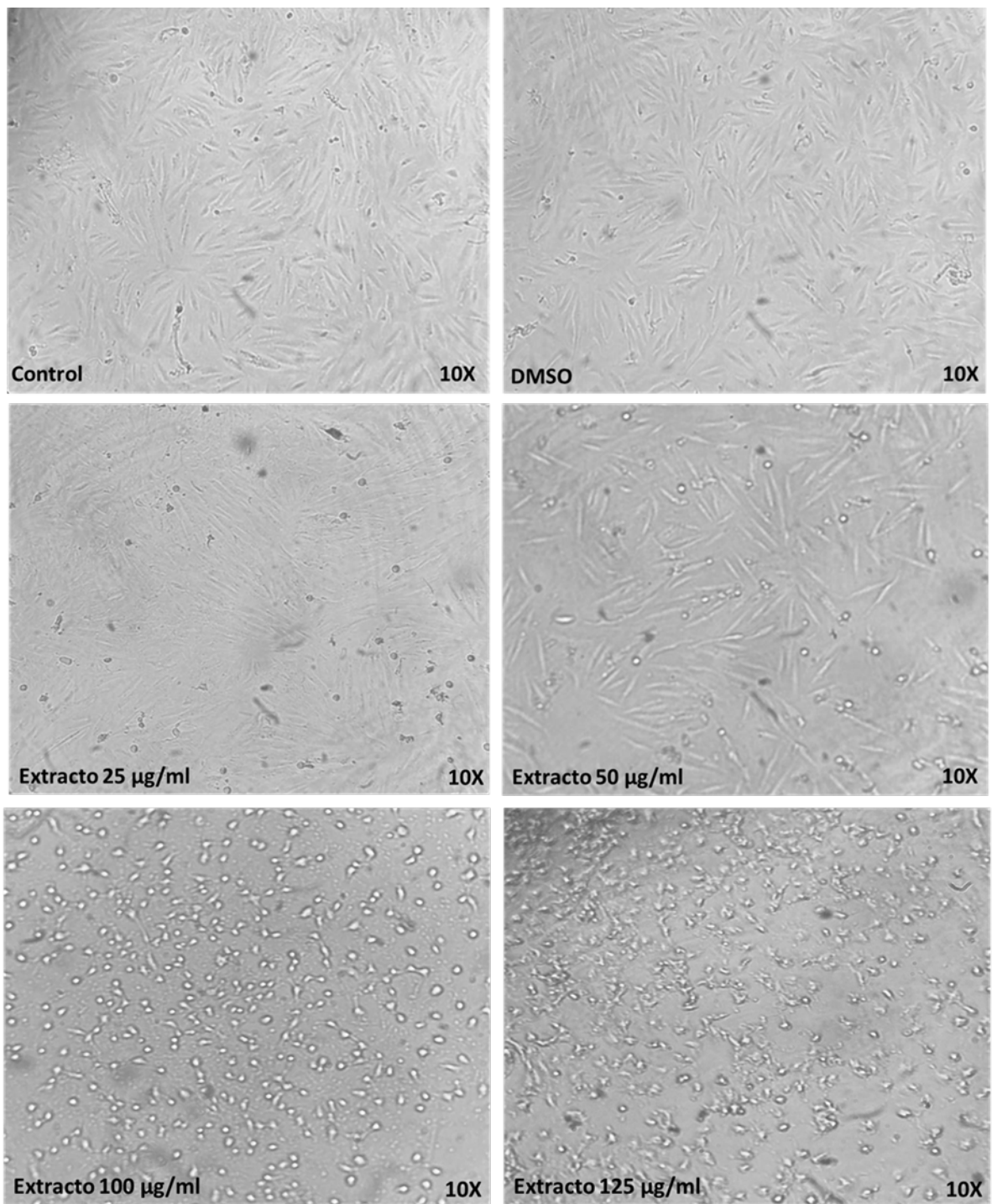


Figura 12. Morfología de la línea de mama no tumorigénica MCF-10A bajo tratamiento de distintas concentraciones del extracto de *D. incompta* (25,50,100 y 125 µg/ml). Las líneas celulares fueron tratadas por 24 h. Se utilizó DMSO (1%) como control negativo.

8.2 Efecto citotóxico del extracto de *D. incompta* en células de cáncer de mama y células control.

El efecto citotóxico de *D. incompta* sobre células de cáncer de mama, fue determinado mediante el conteo de la viabilidad celular de cada una de las líneas 4T1, T47D, MDA-231 y MCF-7. Los conteos de células vivas fueron realizados a las 24, 48 y 72 h después de ser tratadas con 25, 50, 75 y 100 µg/ml del extracto. El extracto de *D. incompta* disminuyó la viabilidad celular con respecto a las células sin tratamiento y a las células con DMSO (1%) de forma significativa en todas las líneas celulares desde las 24 h de una manera dependiente de la concentración y del tiempo (Figura 12) y disminuyendo considerablemente a 48 y 72 hrs (Datos no mostrados). El tratamiento con 25 y 50 µg/ml del extracto redujo la viabilidad celular un 20% y 35% en incubación de 24 horas en células 4T1; la viabilidad celular de esta línea disminuyó más de la mitad con tratamiento de 75 µg/ml en el mismo tiempo de exposición, disminuyendo la viabilidad aproximadamente en 78% de la población y se redujo a más del 90% con 100 µg/ml (Figura 12A). El tratamiento con las mismas concentraciones disminuyó la viabilidad un 13%, 55%, 80 % y 95% en células MDA-MB-231 (Figura 12B). Al utilizar líneas celulares de cáncer de mama luminal A se observó que las mismas concentraciones del extracto tuvieron un mayor efecto citotóxico al reducir la viabilidad celular un 40 % en la línea T47D con 25 µg/ml; las concentraciones 50, 75 y 100 µg/ml redujeron un 60%, 80% y 95% respectivamente (Figura 12C). En cuanto a células MCF-7 la viabilidad disminuyó un 46 % con 25 µg/ml; 67% con 50 µg/ml, 85% con 75 µg/ml y 90% con 100 µg/ml (Figura 12D).

Debido a que los tratamientos actuales contra el cáncer de mama dañan tanto a células normales como cancerosas se evaluó el efecto del extracto diclorometano sobre la línea no tumorigénica de mama MCF-10A. Estas células se expusieron a concentraciones de extracto (25, 50, 75, 100 y 125 µg/ml) a 24, 48 y 72 h. de incubación mostrando un efecto citotóxico menor sobre ellas (Figura 12E). El tratamiento con 25 µg/ml no tuvo una diferencia significativa en la viabilidad con respecto a las células sin tratamiento y las células con DMSO. La concentración 50 µg/ml mostró una disminución del 40% y se observó que estas células mantuvieron aproximadamente el 20% de su población en concentraciones elevadas de 125 µg/ml. Lo que sugiere la especificidad citotóxica del extracto contra las células cancerosas y un efecto moderadamente tóxico sobre células normales.

8.3 Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) e índice de selectividad del extracto de *Decachaeta incompta* en líneas celulares de cáncer de mama y células control.

Los resultados obtenidos del conteo de la viabilidad celular para cada línea fueron utilizados para obtener los valores de IC₅₀ (Tabla 2). El extracto tuvo citotoxicidad más alta en la línea MCF-7 con un valor de IC₅₀ de 40.7 µg/ml. La línea T47D obtuvo un valor IC₅₀ de 44.83 µg/ml, seguido de la línea MDA-231 con IC₅₀ de 51.12 µg/ml y la línea 4T1 con IC₅₀ de 54.89 µg/ml. La línea de mama no tumorigénica MCF-10A tuvo citotoxicidad más baja comparada con células tumorales, con valor IC₅₀ de 71.79 µg/ml. Con estos valores, realizamos estudios de selectividad utilizando los valores de IC₅₀ y de acuerdo con la Ecuación 1. Obteniendo el índice de selectividad del extracto hacia

células tumorales, con valores mayores a 1 (Tabla 3). Según Omonike et al., (2017), valores entre 1 y 10 se puede considerar como selectivo y moderadamente tóxico.

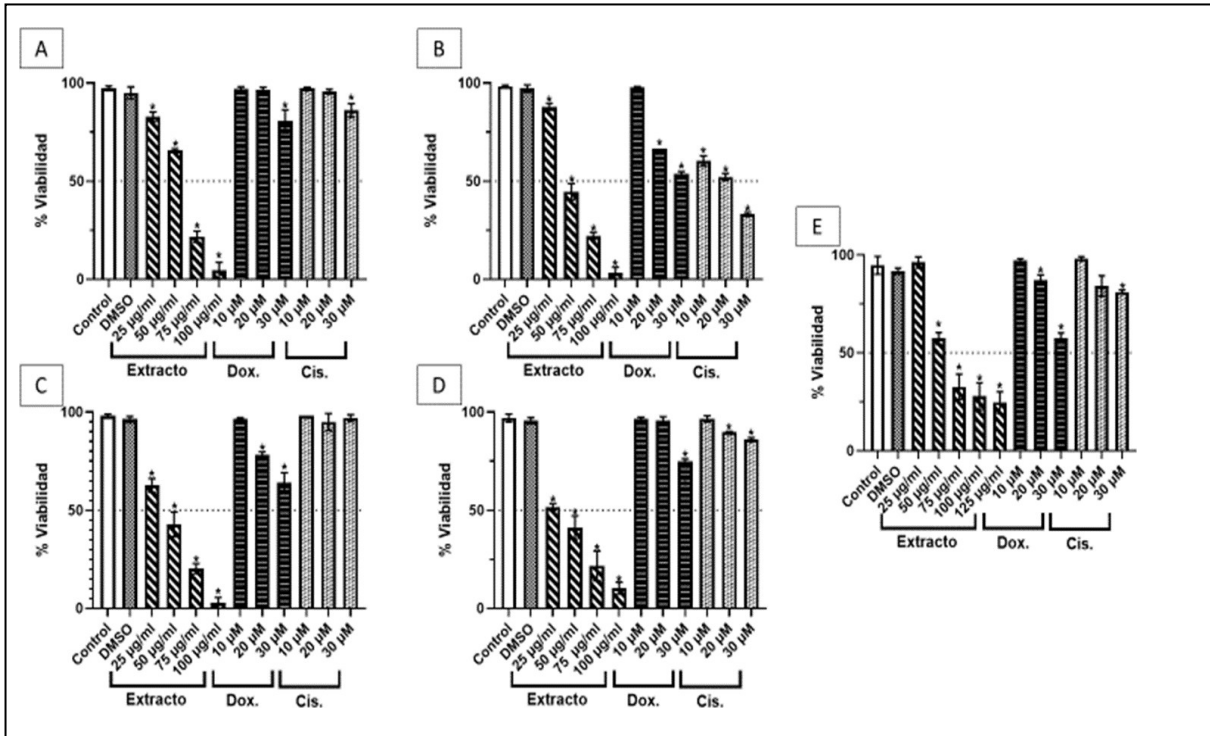


Figura 12. Efecto citotóxico del extracto de *D. incompta* sobre células de cáncer mamario 4T1 (A), MDA-231 (B), T47D (C), MCF-7 (D) y la línea de mama no tumorigénica MCF-10A (E) a 24 h de tratamiento. El porcentaje de viabilidad celular se determinó mediante la tinción azul de tripán. Los resultados se expresan como porcentaje de control (media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes con $n = 3$). (*) Muestra el nivel de significancia en comparación con el grupo control. $P < 0.05$. Doxo (doxorubicina), Cis (cisplatino).

Tabla 2. Valores IC⁵⁰ a 24 h del extracto de *D. incompta* sobre líneas de cáncer de mama y la línea no tumorigénica origen normal MCF-10A.

Línea celular	Subtipo molecular	IC ⁵⁰ (µg/ml)
4T1	(Murino) Triple negativo	54.89±0.4968
MDA-231	Triple negativo	51.51±0.2255
T47D	Luminal A	44.83±1.399
MCF-7	Luminal A	44.18±2.315
MCF-10A	Epitelial no tumorigénica	71.79±1.885

Ecuación 1. Calcular el índice de selectividad de las células tumorales

$$IS = \frac{IC^{50} MCF10A}{IC^{50} CÉLULA TUMORAL}$$

Tabla 3. Índice selectividad a partir de IC⁵⁰ del extracto de *D. incompta* sobre líneas celulares de cáncer de mama.

Tratamiento	Índice de selectividad			
<i>Extracto diclorometano D. incompta</i>	4T1	MDA-231	T47D	MCF-7
	1.30	1.39	1.60	1.62

8.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A

Una vez que observamos que el extracto de *D. incompta* tuvo actividad citotóxica; el siguiente paso fue analizar uno de sus componentes, el cual podría ser el principal responsable de esta actividad. La incomptina A es una de las lactonas sesquiterpénicas que compone al extracto y es la que tiene mayor actividad antiprotozoaria y antibacterial (Calzada et al.,2009).

Se conoce que muchos compuestos activos no llegan a estudios clínicos debido a que sus propiedades farmacocinéticas no son las adecuadas o muestran cierto grado de toxicidad. Para determinar si la incomptina A puede ser un compuesto químico con actividad farmacológica viable y que no provoque efectos adversos se utilizaron distintos servidores de uso libre: Molinspiration, SwissADME y ADMETsar. Para determinar las capacidades farmacocinéticas de los compuestos, los servidores se basan en distintas propiedades fisicoquímicas, como son: el peso molecular, la solubilidad, entre otros; y un parámetro importante es que cumplan con las Reglas de Lipinsky, que describe propiedades moleculares importantes para la farmacocinética de un fármaco en el cuerpo humano, incluida su absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad ("ADMET"). Los resultados muestran que la incomptina A es un compuesto con una absorción gastrointestinal alta y es permeable en la barrera hematoencefálica, lo que indica que posee una buena biodisponibilidad y distribución en el organismo. De igual manera, estos servidores muestran que la incomptina A no es sustrato de glicoproteína-P, siendo este un resultado importante ya que se ha

asociado a una reducción en la eficacia de distintos medicamentos. En cuanto a la toxicidad, uno de los factores más importantes es analizar la interacción con citocromos, los cuales se encargan del procesamiento químico de xenobióticos. La incompitina A no muestra interacción con citocromos por lo que no se le considera tóxico, no es carcinógeno, ni mutagénico y, en cuanto a la toxicidad oral aguda, se clasifica como clase III, que se considera ligeramente tóxico de acuerdo con el Sistema Armonizado Globalmente (GSH) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Tabla.4). Estos resultados son alentadores ya que sugieren que la incompitina A podría utilizarse en modelos *in vivo*.

Tabla 4. Análisis *in silico* farmacéutico y toxicoinformático de la incomptina A.

Propiedades fisicoquímicas
Peso molecular: 304.34 g/mol logp: 1.62 # donadores de h: 0 # aceptores de h: 5 # enlaces rotables: 2
Farmacocinética
Absorción gastrointestinal: alta Permeabilidad de la barrera hematoencefálica: si Sustrato de p-gp (glicoproteína p). no inhibición: cyp1a2: no inhibición cyp2c19: no inhibición cyp2c9: no inhibición cyp2d6: no inhibición cyp3a4. no
Toxicidad
Carcinógeno: no Test ames (mutágeno): no toxicidad aguda: clase III

8.5 Efectos en la morfología celular en líneas celulares inducidos por la incomptina A

Se incubaron células cancerosas MDA-231 y las células no tumorigénicas MCF-10 A con DMSO (1%) como control negativo y con concentraciones ascendentes de incomptina A por un periodo de incubación de 24 horas.

La línea MDA-231 fue tratada con concentraciones de incomptina A (5, 7, 9 y 12 $\mu\text{g/ml}$). Las células sufrieron modificaciones morfológicas a partir de 7 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A donde la densidad celular con respecto al grupo control disminuyó de forma aparente y aproximadamente la mitad de la población presenta cambio en su morfología sugiriendo muerte celular. Las mismas células tratadas con 9 $\mu\text{g/ml}$ presentaron muerte en aproximadamente el 70% de su población y finalmente en 12 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina todas las células se encuentran muertas (Figura 13).

Las células MCF-10 A tratadas con incomptina A tuvieron mayor resistencia al tratamiento, ya que se tuvo que utilizar concentraciones mayores para apreciar el efecto citotóxico en ellas (5, 10, 13 y 18 $\mu\text{g/ml}$).

Se observan cambios morfológicos en estas células a partir de la concentración 10 $\mu\text{g/ml}$; al incubar con 13 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A esto se vuelve más aparente, ya que la mayoría de las células muestran un cambio en su morfología normal y ha disminuido su densidad. Finalmente, esto se vuelve más evidente en concentraciones altas de incomptina A, ya que al incubar estas células con una 18 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas más del 90% de las células se encuentran muertas (Figura 14). Sin embargo, aún hay presencia de células vivas.

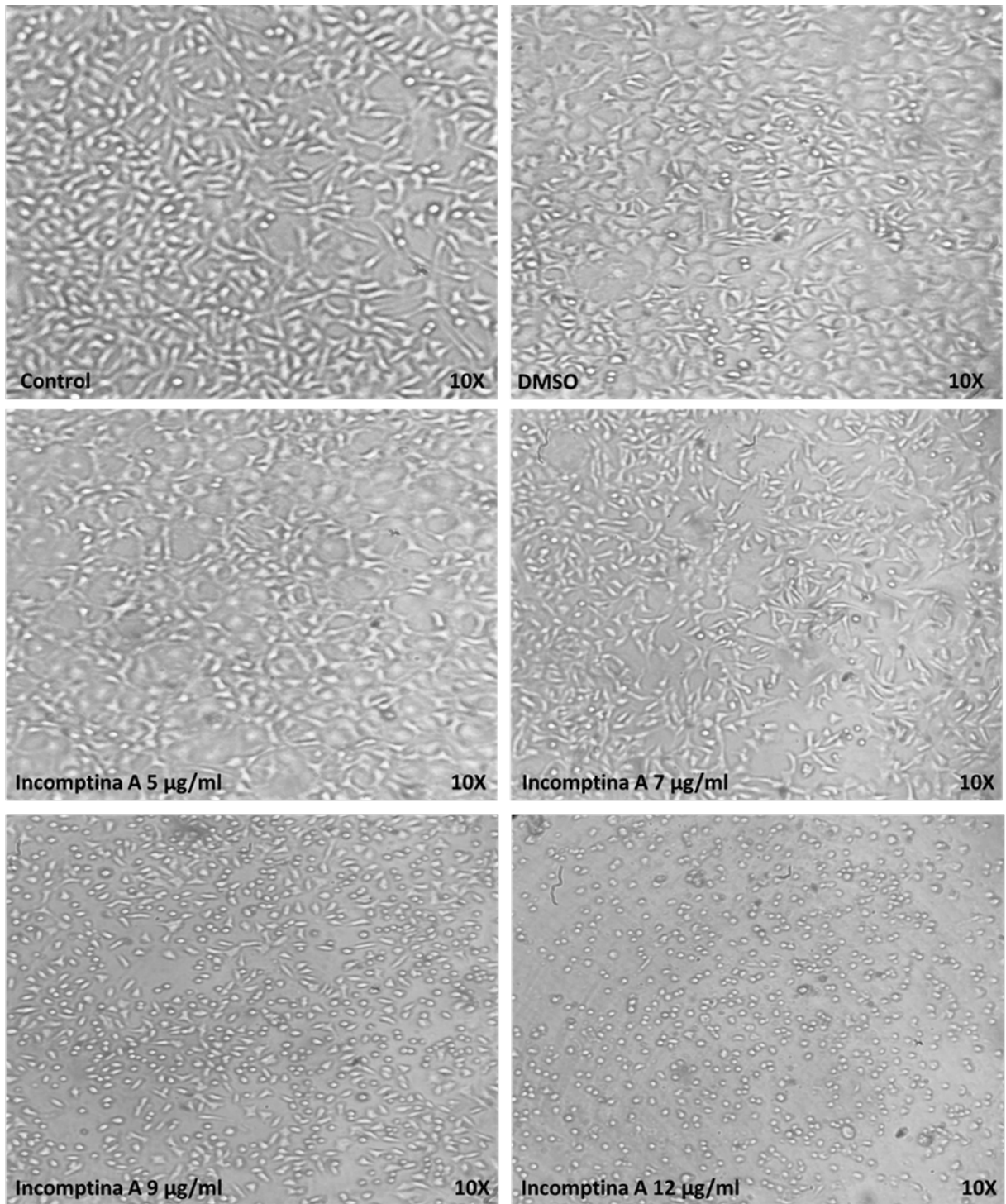


Figura 13. Morfología de la línea celular MDA-231 inducidos por distintas concentraciones de incomptina A (5,7,9 y 12 µg/ml). Las líneas celulares fueron tratadas por 24 h. Se utilizó DMSO (1%) como control negativo.

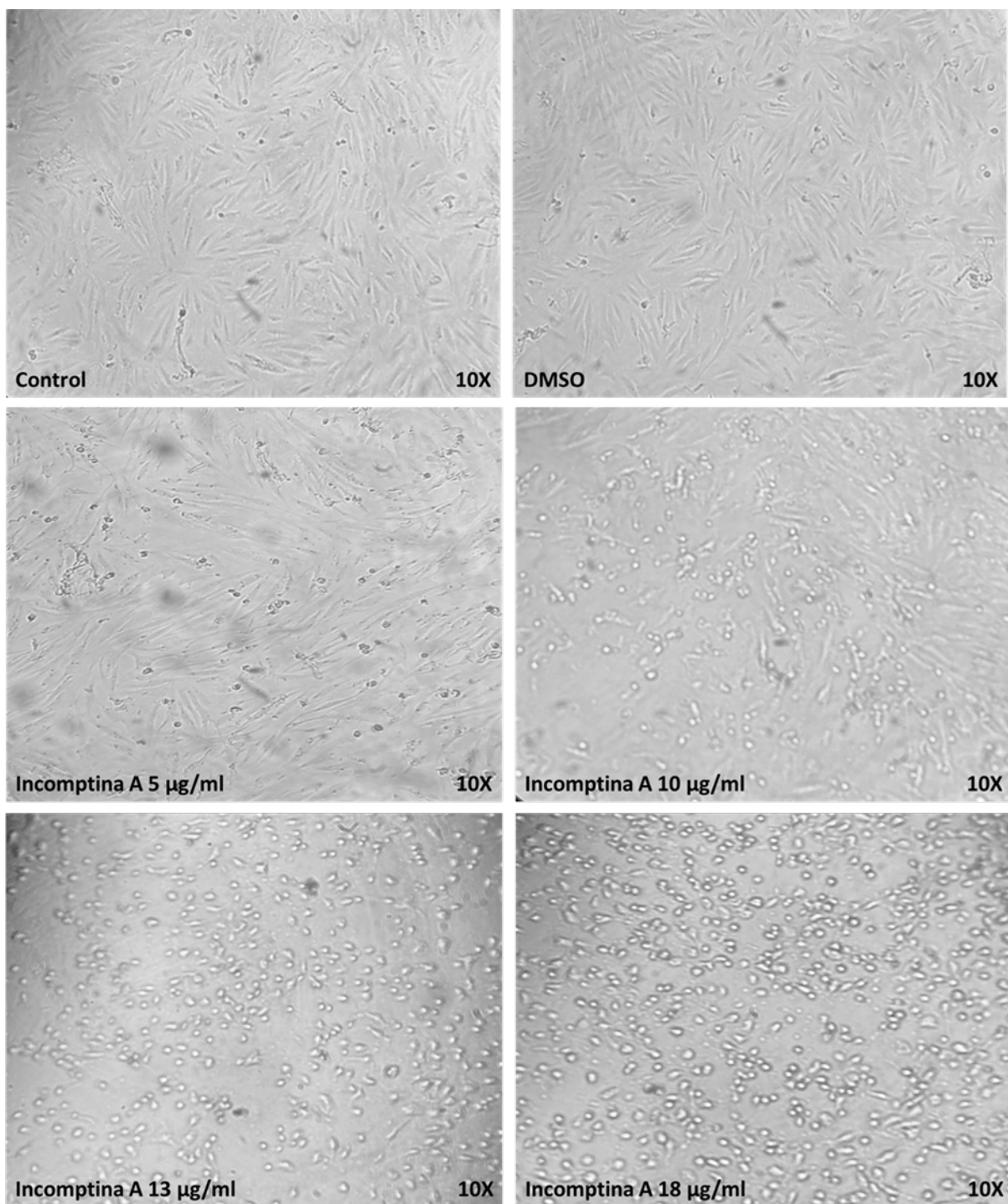


Figura 14. Morfología de la línea de mama no tumorigénica MCF-10A inducidos por distintas concentraciones de la incomptina A (5,10,13 y 18 µg/ml). Las líneas celulares fueron tratadas por 24 h. Se utilizó DMSO (1%) como control negativo.

8.6 Efecto citotóxico de la incomptina A en células de cáncer de mama y células control.

Para determinar el efecto citotóxico de la incomptina A sobre células de cáncer de mama, se realizó el conteo de la viabilidad celular de las líneas celulares 4T1, T47D, MDA-231 y MCF-7. Los conteos de células vivas de cada línea fueron realizados a las 24, 48 y 72 h después de ser tratadas con 5, 7, 9 y 12 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A. El tratamiento con incomptina A disminuyó la viabilidad celular con respecto a las células sin tratamiento y a las células con DMSO (1%) de forma significativa en todas las líneas celulares desde las 24 h de una manera dependiente de la concentración y del tiempo (Figura 15) y disminuyendo considerablemente a 48 y 72 h (Datos no mostrados).

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con incomptina A durante 24 h utilizando una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ redujo un 35% la viabilidad celular en las células 4T1, aproximadamente un 60% con 7 $\mu\text{g/ml}$, 75% con 9 $\mu\text{g/ml}$ y más del 90% con una concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15A). La línea MDA-231 redujo su viabilidad celular 15% con 5 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A, 40% con 7 $\mu\text{g/ml}$, 65% con 9 $\mu\text{g/ml}$ y casi el 100% con 12 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15B). En la línea T47D la viabilidad celular disminuyó un 17% con 5 $\mu\text{g/ml}$, 33% con 7 $\mu\text{g/ml}$, 60% con 9 $\mu\text{g/ml}$ y 85% con 12 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A (Figura 15C). En la línea celular MCF-7 se redujo la viabilidad celular 30%, 50%, 70%, y 90% con concentraciones de 5, 7, 9 y 12 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A respectivamente (Figura 15D).

Para evaluar la toxicidad de la incomptina A en células normales, tratamos con distintas concentraciones de incomptina A (5, 7, 10, 13, 15 y 18 $\mu\text{g/ml}$) a la línea de mama no tumorigénica MCF-10A, observando que la concentración 5 $\mu\text{g/ml}$ redujo el 10% la viabilidad celular, 7 $\mu\text{g/ml}$ el 18%, 10 $\mu\text{g/ml}$ el 25%, 13 $\mu\text{g/ml}$ el 50 %, 15 $\mu\text{g/ml}$ el 65% y finalmente 18 $\mu\text{g/ml}$ de incomptina A disminuyeron en un 75% la viabilidad de esta línea celular (Figura 15E).

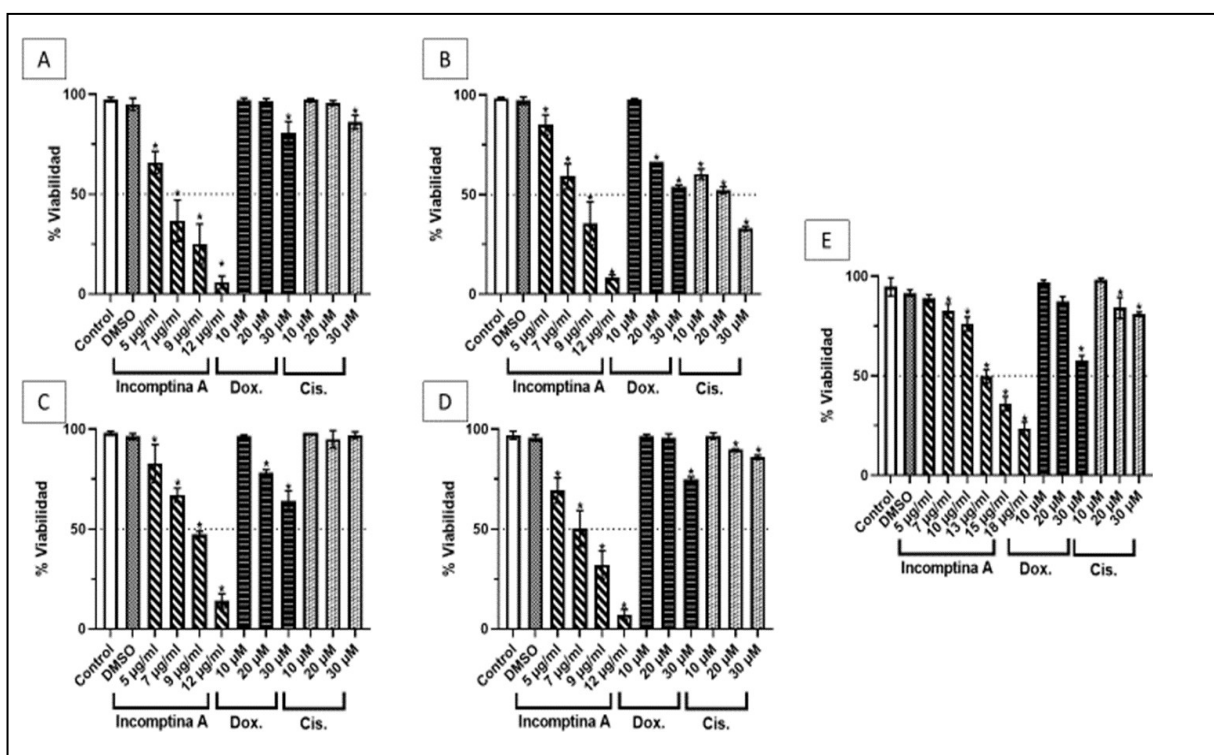


Figura 15. Efecto citotóxico de incomptina A sobre células de cáncer mamario 4T1 (A), MDA-231 (B), T47D (C), MCF-7 (D) y la línea de mama no tumorigénica MCF-10 A (E) a 24 h de tratamiento. El porcentaje de viabilidad celular se determinó mediante la tinción azul de tripán. Los resultados se expresan como porcentaje de control (media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes con $n = 3$). (*) Muestra el nivel de significancia en comparación con el grupo control. $P < 0.05$. Doxo (doxorubicina), Cis (cisplatino).

8.7 Concentración inhibitoria 50 (*+\$%) e índice de selectividad de la incomptina A en líneas celulares de cáncer de mama y células control.

Con los resultados obtenidos del efecto citotóxico de la incomptina A sobre distintas líneas celulares obtuvimos mediante regresión lineal los valores de IC^{50} para cada línea (Tabla 5). El tratamiento con la incomptina A tuvo mayor citotoxicidad en las células 4T1 con un valor de IC^{50} de 6.209 $\mu\text{g/ml}$, seguido por la línea MCF-7 con 6.844 $\mu\text{g/ml}$, MDA-231 con 7.58 $\mu\text{g/ml}$ y T47D con 8.331 $\mu\text{g/ml}$. La línea MCF-10A tuvo un menor efecto citotóxico hacia la incomptina A con un valor de IC^{50} de 13.12. Con estos valores se calculó el índice de selectividad para cada línea celular cancerosa (Tabla 6).

Tabla 5. Valores IC^{50} a 24 h de la incomptina A sobre líneas de cáncer de mama y la línea no tumorigénica origen normal MCF-10 A.

Línea celular	Subtipo molecular	IC^{50} ($\mu\text{g/ml}$)
4T1	(Murino) Triple negativo	6.209±0.3796
MDA-231	Triple negativo	7.58±0.2502
T47D	Luminal A	8.331±0.08508
MCF-7	Luminal A	6.844±0.2493
MCF-10 A	Epitelial no tumorigénica	13.12±0.3536

Tabla 6. Índice selectividad a partir de IC⁵⁰ de la incomptina A sobre líneas celulares de cáncer de mama.

Tratamiento	Índice de selectividad			
Incomptina A	4T1	MDA-231	T47D	MCF-7
	2.11	1.73	1.57	1.91

8.8 Análisis *in silico*

Respecto al análisis *in silico*, la incomptina A mostró interacciones mediante puentes de hidrógeno hacía la mayoría de las enzimas analizadas (Figura 16), incomptina A mostró una energía de unión denotada por ΔG de -5.15 Kcal/mol con interacción a HIF-1 con 1 puente de hidrógeno (Figura 16A), -6.93 Kcal/mol con interacción a hexocinasa II con 3 puentes de hidrógeno (Figura 16B), -7.52 Kcal/mol interactuando con aldolasa mediante 3 puentes de hidrógeno (Figura 16C), -4.44 Kcal/mol con enolasa sin ninguna interacción (Figura 16D), -4.21 Kcal/mol con la piruvato cinasa con dos puentes de hidrógeno (Figura 16E) y finalmente -7.0 Kcal/mol con la lactato deshidrogenasa con 2 puentes de hidrógeno (Figura 16F). El oxamato (control positivo para lactato deshidrogenasa) mostró una energía de unión denotada por ΔG de -5.79 Kcal/mol mostrando 7 interacciones mediante puentes de hidrógeno (Figura 17). Tanto

la incoptina A como el oxamato comparten unión a los aminoácidos Arg105 y Thr247, aminoácidos cercanos al sitio activo de LDH.

En la tabla 7 se muestran las interacciones con aminoácidos de la incoptina A hacia las enzimas propuestas, así como la longitud de enlace a cada uno.

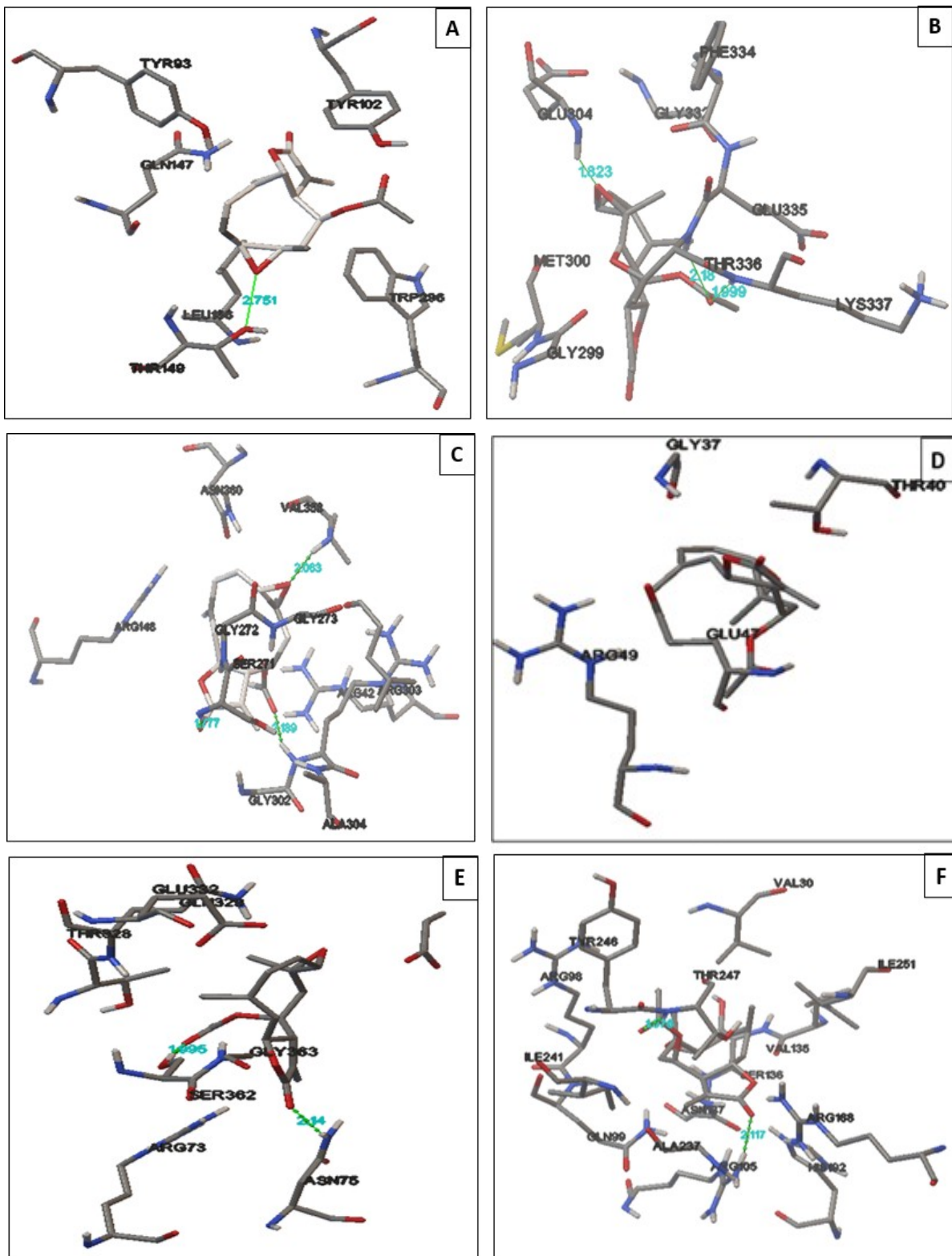


Figura 16. Modelamiento *in silico* de acoplamiento molecular de la incoptina A con HIF-1 α (A), hexocinasa II (B), aldolasa (C), enolasa (D), piruvato cinasa M2 (E) y lactato deshidrogenasa (F).

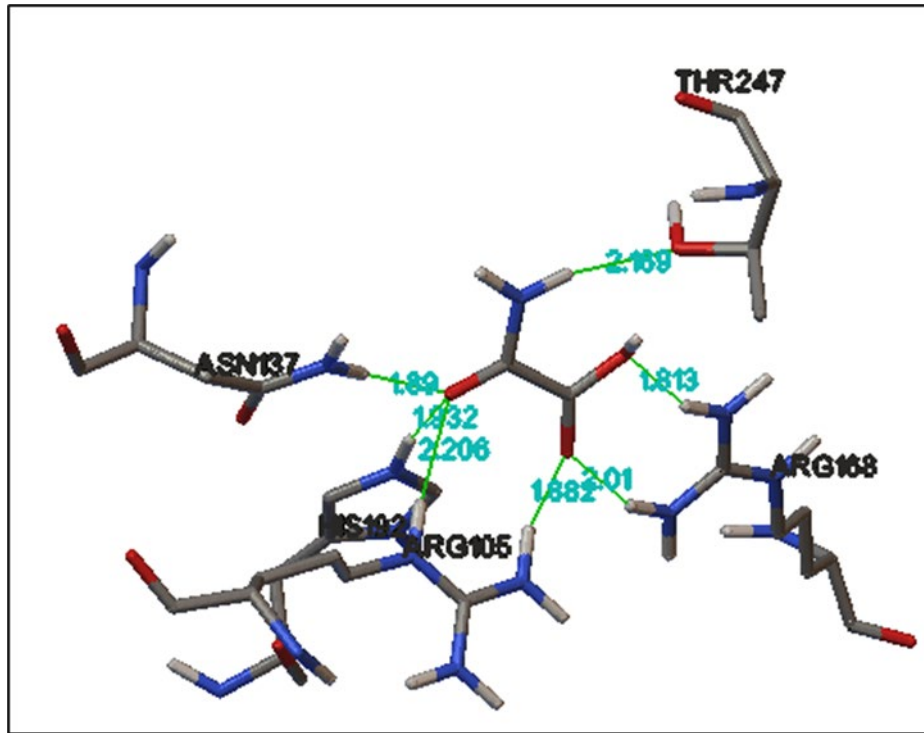


Figura 17. Interacción del oxamato (control positivo) con la enzima lactato deshidrogenasa.

Tabla 7. Resultados de acoplamiento molecular de enzimas glucolíticas contra incoptina A.

PROTEÍNA	PDB ID	ENERGÍA DE UNIÓN ΔG (KCAL/MOL)	INTERACCIÓN CON AMINOÁCIDOS	# PUENTES DE HIDRÓGENO	LONGITUD DE ENLACE
HIF-1 α	1H2M	-5.15	Try93, Try102, Gln147, Thr149 , Leu186, Trp296.	1	2.751
Hexocinasa II	2N2T	-6.93	Gly299, Met300, Glu304 , Gly332, Phe334, Glu335, Thr336 , Lys337	3	1.823 2.18 1.999
Aldolasa	2ALD	-7.52	Arg42, Arg148, Ser271 , Gly272, Gly273, Gly302, Arg303 , Ala304, Val358 , Asn360	3	1.777 2.189 2.063
Enolasa	2PSN	-4.44	Gly37, Thr40, Glu47, Arg49	0	----
Piruvato cinasa M2	4G1N	-4.21	Arg73, Asn75 , Thr328, Gln329, Glu332, Ser 362 , Gly363,	2	2.14 1.995
Lactato deshidrogenasa	1110	-7.0	Val30, Arg98, Gln99, Arg105 , Val135, Ser136, Asn137, Arg168, His192, Ala237, Ile241, Tyr246, Thr247 , Ile251	2	2.117 1.876
Lactato deshidrogenasa/ Oxamato	1110	-5.79	Arg105 , Asn137 , ARG168 , His192 , Thr247	7	1.882 2.206 1.89 1.932 2.01 1.813 2.169

8.9 Western Blot

Una vez que se estandarizó la técnica de Western blot se realizó el análisis de la expresión de β -tubulina como control de carga en las líneas MCF-10A y MCF-7 a 24 h de incubación con los tratamientos de extracto e incomptina A. Se observan diferencias en la cantidad de proteínas en cada pozo lo cual será ajustado mediante densitometría. (Figura 18). Con este resultado se iniciarán los ensayos de Western blot para todas las proteínas en estudio.

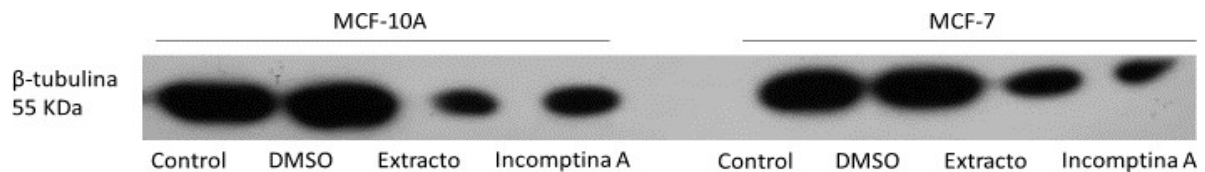


Figura 18. Western blot de las líneas celulares MCF-10A y MCF-7. Se muestra el Western blot de 30 μ g de proteína total de cada una de las líneas MCF-10A y MCF-7 para verificar la cantidad de proteínas mediante el anticuerpo β -tubulina utilizado como control de carga. En los carriles se muestra las células control (sin tratamiento), las células con DMSO (1%), las células con tratamiento con el extracto de *D. incompta* y las células con el tratamiento con la incomptina A sobre la cantidad de proteína en la línea.

9. Discusión

Durante años, la medicina tradicional ha sido la principal fuente de tratamiento médico en los países en desarrollo y hoy en día, varios estudios han identificado especies de plantas que han demostrado propiedades farmacológicas de interés (Greenwell, M., y Rahman, P. K., 2015). Algunas plantas como las de la familia Asteraceae se consideran fuentes importantes de agentes quimiopreventivos debido a su alto contenido de compuestos como alcaloides, polifenoles y terpenos (Bader et al., 2018). En este estudio se evaluó el efecto citotóxico del extracto de las hojas de *Decachaeta incompta* y de la incomptina A. *D. incompta* es una planta perteneciente a la familia Asteraceae y es utilizada en la medicina tradicional mexicana.

El método de exclusión de azul tripán se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular y sirve para calcular el valor de IC⁵⁰ a partir de las curvas de respuesta a la dosis para cada línea celular (Kumar et al., 2014). De acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer (NCI por sus siglas en inglés) para que un compuesto puro sea considerado como citotóxico debe presentar un IC⁵⁰ menor a 4 µg/ml, mientras que para extractos crudos el IC⁵⁰ de éstos debe estar por debajo de 20 µg/ml (Geran et al., 1972). Sin embargo, otros autores han llegado a considerar que este valor puede estar por debajo de los 100 µg/ml (Estrada et al., 2013).

En este trabajo se utilizaron distintas líneas de cáncer de mama para determinar si el extracto de las hojas de *D. incompta* y la lactona sesquiterpénica incomptina A poseen un efecto citotóxico sobre ellas, siendo estas células de cáncer de mama triple negativo (4T1 y MDA-231), cáncer tipo luminal (T47D y MCF7) y la línea de mama no

tumorigénica MCF-10A ya que, cada tipo de tumor tiene una clasificación diferente y dependiendo de esta, se opta por distintos tratamientos y manejo interdisciplinario (Al-Thoubaity, 2019). Demostramos, que el extracto tiene un efecto citotóxico de una forma dependiente de la dosis sobre todas las líneas cancerosas presentando un efecto citotóxico mayor en las líneas celulares de cáncer de mama luminal MCF-7 y T47D con valores de IC^{50} similares de 44.18 y 44.83 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Mientras que en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo se obtuvieron valores de IC^{50} de 51.51 $\mu\text{g/ml}$ para la línea MDA-231 y de 54.89 $\mu\text{g/ml}$ para la línea 4T1; esto podría deberse a que el cáncer de mama luminal es el cáncer de menor agresividad y de mejor pronóstico ya que no tiene una alta tasa de proliferación como los tumores triples negativo (Xiaofeng et al., 2017). Si bien, ninguna línea celular obtuvo un valor de IC^{50} menor a 20 $\mu\text{g/ml}$, todas obtuvieron un IC^{50} menor a 100 $\mu\text{g/ml}$. Por lo que este extracto podría ser considerado con potencial citotóxico según (Estrada et al., 2013). En cuanto a la línea celular no tumorigénica MCF-10A el extracto obtuvo un valor de IC^{50} de 71.79 $\mu\text{g/ml}$, valor citotóxico menor en comparación con las células tumorales, sugiriendo que el extracto tiene cierta especificidad hacia las células de cáncer que hacia las que no son, esto se observa en las Figuras 11 y 12, en donde las células MDA-231 soportan concentraciones del extracto menores a los 100 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la línea MCF-10A soporta concentraciones de hasta 125 $\mu\text{g/ml}$.

Un fármaco anticáncer ideal debe poder matar a las células cancerosas, pero no debería afectar a las células normales. La evaluación del índice de selectividad (IS) para cualquier investigación sobre drogas a base de hierbas y / o compuestos aislados

es muy crucial para determinar si se pueden continuar con los trabajos adicionales (Gunawan et al., 2021). Nosotros determinamos el índice de selectividad a partir del valor IC^{50} de la línea MCF-10A (71.79 $\mu\text{g/ml}$). Para estudios *in vitro*, un valor de IS menor que 1 se clasifica como no selectivo (tóxico), entre 1 y 10 es débilmente selectivo y un IS superior a 10 se considera seguro (no tóxico) (Omonike et al., 2017). Nuestros resultados de IS obtenidos a partir de los valores IC^{50} del extracto para las líneas celulares fueron mayores a 1 y menores a 10, lo que indica que el extracto posee cierta selectividad hacia las células de cáncer y es moderadamente tóxico para las células normales.

En estudios fitoquímicos de *Decachaeta incompta* ocupando 27 g de partes aéreas secas producen 2 g de extracto puro; que a su vez contienen 109 mg de incomptina A y 588 mg de incomptina B. Decidimos utilizar la incomptina A para este estudio ya que es la lactona sesquiterpénica más activa de ambas (Calzada et al., 2009).

El primer paso fue determinar si las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de la incomptina A son las adecuadas para su posterior uso en modelos *in vivo*, ya que se conoce que muchos compuestos activos no llegan a estudios clínicos debido a que sus propiedades farmacocinéticas no son las adecuadas o muestran cierto grado de toxicidad. Los resultados mostrados en la Tabla 4. muestran un análisis *in silico* farmacéutico y toxicoinformático sugiriendo que esta molécula tendría una buena biodisponibilidad y no sería peligroso para el ser humano ya que posee toxicidad oral aguda obtuvo clase III que de acuerdo con el Sistema Armonizado Globalmente (GSH) y la Organización Mundial de la Salud, 2011) se

considera como moderadamente tóxico al consumir dosis altas por lo que es viable para su posterior estudio.

La incompina A, al igual que el extracto, mostró actividad citotóxica sobre todas las líneas celulares de una manera dependiente de la dosis como se observa en la figura 15; los valores de IC^{50} de la incompina A, aunque no son menores a 4 $\mu\text{g/ml}$ como indica el NIH, todos fueron menores a 10 $\mu\text{g/ml}$ siendo esto un valor aceptable. En cuanto a la selectividad de la incompina A; las figuras 13 y 14 muestran claramente como las células de cáncer tienen mayor alteración en cuanto a la viabilidad, morfología y densidad celular, con respecto a las células no tumorales y esto es confirmado en la tabla 6 donde todos los valores de IS se encuentran entre 1 y 10 mostrando selectividad hacia cáncer (Omonike et al.,2017).

Desde hace varios años se conoce que el cáncer posee características distintivas que le confieren una ventaja adaptativa sobre sus contrapartes normales. Una de ellas es la reprogramación metabólica en donde las células cancerosas consumen grandes cantidades de glucosa obteniendo lactato como producto final en un proceso conocido como glucólisis aeróbica (Warburg,1925).

La reprogramación metabólica del cáncer es una de las características más estudiadas y recientemente varios investigadores proponen que el cáncer no solo es una enfermedad genética si no también una enfermedad metabólica en donde las vías de señalización oncogénicas participan en la regulación de la energía y el anabolismo para soportar la proliferación acelerada del cáncer (Wishart, 2015).

En cáncer de mama, se ha observado que esta reprogramación metabólica puede afectar la tumorigénesis y la progresión dando un peor pronóstico (Long et al., 2016). Esto, debido principalmente que en células cancerosas se activan factores de transcripción que aumentan la expresión de enzimas glucolíticas y de proteínas inhibidores de la apoptosis; que de igual manera se encuentran involucrados en la atenuación de la función mitocondrial y en la promoción del recambio glucolítico (Lambert et al., 2010; Lincet e lcard, 2015; Yu et al., 2017; Londhe et al., 2018). Por lo anterior, la inhibición del metabolismo de la célula tumoral y específicamente las enzimas de la vía glucolítica se han propuesto como blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad.

El análisis *in silico* utilizando a la incomptina A en interacción con enzimas relacionadas con la vía glucolítica sugieren que esta molécula es capaz de unirse a ciertos aminoácidos que se encuentran en sitios activos de las enzimas HIF-1, HXKII, aldolasa, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa; estos resultados son persistentes con lo reportado con Velázquez-Domínguez et al., (2013) donde se mostró la capacidad de la incomptina para reducir el metabolismo de glucosa en trofozoítos mediante la alteración de la expresión de proteínas de la vía glucolítica, siendo una de ellas la aldolasa, la cual obtuvo la energía de unión más alta a la incomptina con respecto a las demás enzimas estudiadas con un ΔG de -7.52 Kcal/mol.

En el estudio de western blot se observaron diferentes intensidades de las bandas para el anticuerpo β -tubulina, esto podría deberse a que al momento de la cuantificación pudo haber error o al momento de desnaturalizar hubiese habido evaporación de la

muestra. Respecto a las demás líneas celulares y la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo de glucosa ya no se llevaron a cabo debido a falta de tiempo, pero se realizarán posteriormente.

Este estudio abre el panorama sobre el posible papel citotóxico del extracto y en específico de la incomptina A sobre las células tumorales. Por lo tanto, es necesario conducir hacia futuras investigaciones sobre el efecto de dichas lactonas en modelos *in vivo* y posteriormente en estudios clínicos para desarrollar nuevos tratamientos contra el cáncer de mama.

10. Conclusión

- Tanto el extracto de las hojas de *D. incompta* como la incomptina A exhiben un efecto citotóxico sobre las líneas celulares de cáncer mamario 4T1, MDA-231, T47D y MCF-7.
- El extracto y la incomptina A tienen selectividad hacia células tumorales dañando en menor medida a las células no tumorigénicas MCF-10 A
- El análisis *in silico* reveló que la incomptina A cumple con los parámetros farmacocinéticos adecuados para cumplir una función farmacológica; como una buena biodisponibilidad, no es carcinógeno ni genotóxico. También se mostró que la incomptina A tiene la capacidad de unirse a ciertos aminoácidos que se encuentran en sitios activos de las enzimas HIF-1, HXKII, aldolasa, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa; enzimas involucradas en la vía glucolítica y el recambio metabólico en cáncer.

11. Perspectivas

- Concluir los ensayos de proteómica (Western blot) en células tratadas con el extracto y la incoptina A con el fin de evaluar si existe modificación en la expresión de enzimas glucolíticas.
- Determinar el tipo de muerte celular provocado por el extracto y la incoptina A en las líneas celulares de cáncer de mama.
- Determinar la toxicidad del extracto y la incoptina A en un modelo *in vivo*.
- Analizar el efecto de inhibición del crecimiento tumoral de la incoptina A en un modelo de cáncer de mama.
- Definir la participación de la incoptina A en el metabolismo glucolítico de tumores de cáncer de mamario.

12. Referencias

1. Abu-Hamad S, Zaid H, Israelson A, Nahon E y Shoshan-Barmatz V. (2008). Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: Mapping the site of binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13482-13490.
2. Aguilar M, González E, García A, Álvarez J, Padilla C, Guisado R y Rizo M. (2011). Obesidad y su implicación en el cáncer de mama. *Nutrición Hospitalaria*. 26. 899-903.
3. Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko O, y Minko T. (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: Challenges and treatment options. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(5), 1483-1507.
4. Al-Thoubaity, F. K. (2019). Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of medicine and surgery*. 49, 44–48.
5. Alvarado S, Ciccio J, Calzada J. (1979). Thieleanine, a new guaianolide from *Decachaeta thieleana*. *Phytochemistry*. 18: 330
6. American Cancer Society (ACS). (2020) [Internet] [citado el 14/08/2020]. Recuperado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento.html>
7. An K. (2016). Selective Estrogen Receptor Modulators. *Asian Spine Journal*, 10(4), 787-791.

8. Azim H, Azanbuja E, Colozza M, Bines J, Piccart M. (2011). Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Annals of Oncology*. 22 (9) 1939-1947.
9. Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y Aziz S. (2018). Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 106 239–246.
10. Bader A, Abdallah Q, Abdelhady M, Tommasi N, Malafronte N, Shaheen U, Bkhaitan M y Cotugno R. (2019). Cytotoxicity of some plants of the Asteraceae family: Antiproliferative activity of *Psiadia punctulata* root sesquiterpenes. *Records of Natural Products*. 13. 10.25135/rnp.113.18.10.969.
11. Barnum K y O'Connell M. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. En E. Noguchi & M. C. Gadaleta (Eds.), *Cell Cycle Control*. Vol. 1170, pp. 29-40. Springer New York.
12. Bautista E, Calzada F, Yopez-Mulia L, Chavez-Soto M y Ortega A. (2012). Incomptines C and D, Two Heliangolides from *Decachaeta incompta* and their Antiprotozoal Activity. *Planta Medica*. 78: 1698–1701.
13. Bermúdez A, Oliveira M, Velázquez D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 30 (8) 453-459.
14. Blair C, Robien K, Inoue-Choi M, Rahn W y Lazovich D. (2016). Physical inactivity and risk of poor quality of life among elderly cancer survivors compared to women without cancer: The Iowa Women's Health Study. *Journal of Cancer Survivorship: Research and Practice*, 10(1), 103-112.

15. Blumenschein G. (1983). The role of progestins in the treatment of breast cancer. *Seminars in Oncology*, 10(4 Suppl 4), 7-10.
16. Bower J, Bak K, Berger A, Breitbart W, Escalante C, Ganz P, Schnipper H, Lacchetti C, Ligibel J, Lyman G, Ogaily M, Pirl W, Jacobsen P y American Society of Clinical Oncology. (2014). Detección, evaluación y manejo de la fatiga en adultos sobrevivientes de cáncer: una adaptación de la guía de práctica clínica de la American Society of Clinical oncology. *Revista de oncología clínica: revista oficial de la Sociedad Americana de Oncología Clínica*. 32 (17) 1840-1850.
17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L y Jemal A. Global cancer statistics (2018): GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6) 394-424.
18. Brownlee Z, Garg R, Listo M, Zavitsanos P, Wazer D y Huber K. (2018). Late complications of radiation therapy for breast cancer: Evolution in techniques and risk over time. *Gland Surgery*, 7(4), 371-378
19. Brown R y Wahl R. (1993). Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer*, 72(10), 2979-2985.
20. Calzada F, Yépez L, Tapia A y Ortega A. (2009). Antiprotozoal and antibacterial properties of *Decachaeta incompta*. *Revista Latinoamericana de Química*. 37. 97-103.

21. Calzada F, Valdés M, Barbosa E, Velázquez C y Bautista E. (2020). Evaluation of antipropulsive activity of *Decachaeta incompta* (DC) King and Robinson and its sesquiterpene lactones on induced hyperperistalsis in rats. *Pharmacognocny Magazine*;16: S272-5.
22. Castrezana C. (2017). Geografía del cáncer de mama en México. *Investigaciones Geográficas*. 93. 1-18.
23. Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F y Wagstaff C. (2013). Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (6) 12780-12805.
24. Colditz G. (2005). Epidemiology and Prevention of Breast Cancer, *Journal Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*.14 (4) 768-72.
25. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario (CMDTCM). Séptima revisión. (2017). Colima. *Gaceta Mexicana de Oncología*.38-41.
26. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario (CMDTCM). Octava revisión. (2019). Colima. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 35-36.
27. Choi E y Ahn W. (2009). "Antiproliferative effects of dehydrocostuslactone through cell cycle arrest and apoptosis in human ovarian cancer SK-OV-3 cells". *International Journal of Molecular Medicine* 23.2: 211-216.
28. Cragg G y Newman D. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100 72-79.

29. DeGraffenried L, Chandrasekar B, Friedrichs W, Donzis E, Silva J, Hidalgo M, Freeman J y Weiss G. (2004). NF-kappa B inhibition markedly enhances sensitivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 15(6), 885-890.
30. De Milito A, Marino M y Fais S. (2012). A rationale for the use of proton pump inhibitors as antineoplastic agents. *Current Pharmaceutical Design*. 18 1395–1406.
31. De Ruijter T, Veeck J, de Hoon J, van Engeland M y Tjan-Heijnen V. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 137 (2) 183-192.
32. De Luengo D, Misky M, Gage D y Mabry T. (1986). 7 α -hydroxy-sesquiterpene lactones from *Decachaeta ovatifolia*. *Phytochemistry*. 25: 1917–1922.
33. Díaz A, Rodríguez H y Scull R. (2011). Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. *Revista Cubana de Farmacia*. 45 (1) 101-108.
34. Dowsett M. (2003). Origin and characteristics of adverse events in aromatase inhibition therapy for breast cancer. *Seminars in Oncology*, 30, 58-69.
35. Durrani S y Heena H. (2020). Controversies regarding ovarian suppression and infertility in early-stage breast cancer. *Cancer Management and Research*, Volume 12, 813-817.
36. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan H, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C,

- Wang Y, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M y Pritchard K. (2012). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet (London, England)*, 379(9814), 432-444.
37. Estrada N, López J, Márquez D, Martínez A y Márquez M. (2013). Evaluación citotóxica de fracciones de esponjas marinas del Caribe Colombiano. *Revista de la Facultad de Ciencias; Sede Medellín*, 2(1): 35-51.
38. Fallahian F, Aghaei M, Mohammad H y Hamzeloo-Moghadam M. (2016). Molecular mechanism of apoptosis induction by Gaillardin, a sesquiterpene lactone, in breast cancer cell lines. *Cell Biology and Toxicology*. 31, 295-305.
39. Felix C. (2001). Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Medical and Pediatric Oncology*, 36(5), 525-535.
40. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D, Piñeros M, Znaor A y Bray F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953.
41. Figg W, Cook K y Clarke R. (2014). Aromatase inhibitor plus ovarian suppression as adjuvant therapy in premenopausal women with breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 15(12), 1586-1587.
42. Ganapathy-Kanniappan S y Geschwind J. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects. *Molecular Cancer*, 12(1), 152.

43. Geran R, Greenberg N, McDonald M, Shumacher A y Abbot B. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*; 3: 1-103.
44. Gianni L, Pienkowski T, Im Y, Roman L., Tseng L, Liu M, Lluch A, Staroslawska E, de la Haba-Rodriguez J, Im S, Pedrini J, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, Szado T, Ratnayake J, Ross G y Valagussa P. (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 13(1), 25-32.
45. Gibson L, Dawson C, Lawrence D y Bliss J. (2007). Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 66 (10) 5216-23.
46. González-Robledo M, Wong R, Ornelas H, y Knaul F. (2015). Costs of breast cancer care in Mexico: Analysis of two insurance coverage scenarios. *Ecancermedicalscience*, 9, 587.
47. Grabellus F, Nagarajah J, Bockisch A, Schmid K y Sheu S. (2012). Glucose transporter 1 expression, tumor proliferation, and iodine/glucose uptake in thyroid cancer with emphasis on poorly differentiated thyroid carcinoma. *Clinical Nuclear Medicine*, 37(2), 121-127.
48. Greenwell M y Rahman P. (2015). Medicinal Plants: Their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(10), 4103–4112.

49. Guo J, Xue Q, Liu K, Ge W, Liu W, Wang J y Li J. (2019). Dimethylaminomicheliolide (DMAMCL) suppresses the proliferation of glioblastoma cells via targeting pyruvate kinase 2 (PKM2) and rewriting aerobic glycolysis. *Frontiers in Oncology*, 9. 993.
50. Guerrero C, Taboada J, Díaz J, Oliva A y Ortega A. (1994). Incomptinas A y B dos heliangolidas aisladas de *Decachaeta incompta*. Estudio preliminar de las actividades biológicas de incomptina B. *Revista Latinoamericana de Química* 1994;23(4):142-147.
51. Gunawan I, Galih S y Farida S. (2021). Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research, Editor(s): Abdulrahman A. Al-Majed, *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Academic Press, 46, 273-307.
52. Hall I, Lee K y Elgebaly S. (1978). Antitumor Agents XXVII: Effects of Helenalin on anaerobic and aerobic metabolism of ehrlich ascites cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 67(4), 552–554.
53. Hamzeloo-Moghadam M, Aghaei M, Fallahian F, Jafari S, Dolati M, Abdolmohammadi M, Hajiahmadi S y Esmaeili S. (2015). Britannin, a sesquiterpene lactone, inhibits proliferation and induces apoptosis through the mitochondrial signaling pathway in human breast cancer cells. *Tumor Biology*. 36 (2): 1191-8.
54. Hanahan D y Coussens L. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322.

55. Hanahan D y Weinberg R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
56. Hanahan D y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
57. Hartmann J, Haap M, Kopp H y Lipp H. (2009). Inhibidores de la tirosina quinasa: una revisión sobre farmacología, metabolismo y efectos secundarios. *Current Drug Metabolism*. 10 (5) 470–481.
58. Hernandez R, Sorensen H, Pedersen L, Jacobsen J y Lash T. (2009). Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: A Danish population-based cohort study. *Cancer*. 115 (19) 4442-4449.
59. Hirschhaeuser F, Sattler U y Mueller-Klieser W. (2011). Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research*, 71(22), 6921-6925.
60. Hostettmann K, Marston N, Ndjuko K y Wolfender J. (2000). The potential of African plants as a source of drugs. *Current Organic Chemistry*. 4, 973-1010.
61. Hsu Y, Wu L. y Kuo P. (2009). Dehydrocostuslactone, a medicinal plant-derived sesquiterpene lactone, induces apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in liver cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 329 (2), 808–819.
62. Koc S, Isgor B, Isgor Y, Shomali M e Yildirim O. (2015). The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical Biology*. 53(5) 746-751.

63. Kumar N, Ramakrishnaiah H y Krishna V. (2014). Cytotoxic activity of *Broussonetia papyrifera*(L.) vent on MCF-7, HeLa and HepG2 cell lines. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6.
64. Lambert C., Roy M, Robitaille G, Richard D y Bonnet S. (2010). HIF-1 inhibition decreases systemic vascular remodelling diseases by promoting apoptosis through a hexokinase 2-dependent mechanism. Cardiovascular Research, 88(1), 196-204.
65. Li X, Yang X, Liu Y, Gong N, Yao W, Chen P y Wang H. (2013). Japonicone A suppresses growth of Burkitt lymphoma cells through its effect on NF- κ B. Clinical Cancer Research. 19(11), 2917–2928.
66. Liberti M y Locasale J. (2016). The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? Trends in Biochemical Sciences. 41(3), 211–218.
67. Lincet H e Icard P. (2015). How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? Oncogene. 34, 3751–3759.
68. Lluch H. (2016). Nuevos retos en el tratamiento y la investigación del cáncer de mama. Medicina y Seguridad del Trabajo. 62 (Supl. extra), 113-115.
69. Londhe P, Yu P, Ijiri Y, Ladner K, Fenger J y London C (2018). Classical NF- κ B metabolically reprograms sarcoma cells through regulation of hexokinase 2. Frontiers in Oncology, 8,104
70. Long J, Li X, y Zhang F. (2016). Targeting metabolism in breast cancer: How far we can go? World J Clin Oncol. 7(1):122–30.
71. Misky M, De Luengo D y Mabry T. (1987). Guaiane sesquiterpenes from *Decachaeta scabrella*. Phytochemistry 1987; 26: 199–200.

72. Misky M, Gage D y Mabry T. (1985). Quercetagenin 6,7,4-trimethyl ether and 3-sulphate from *Decachaeta haenkeana*. *Phytochemistry*. 24:3078–3080.
73. Moo T, Sanford R, Dang C y Morrow M. (2018). Overview of breast cancer therapy. *PET Clinics*, 13(3), 339-354.
74. Moy B y Goss P. (2007). Lapatinib-associated toxicity and practical management recommendations. *The Oncologist*. 12(7) 756-765.
75. Noverón N y Torres-Domínguez J. (2018). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual* Vol. 8, Núm. 1. 9-15.
76. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020) Recuperado de: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
77. Organización Panamericana Sanitaria/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Perfiles de país sobre cáncer, (2020). Washington D.C. 2020
Recuperado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5041:2011-breast-cancer&Itemid=3639&lang=es#:~:text=Cada%20a%C3%B1o%20en%20las%20Am%C3%A9ricas,un%2034%25%20en%20las%20Am%C3%A9ricas.
78. Patt D, Duan Z, Fang S, Hortobagyi G y Giordano S. (2007). Acute myeloid leukemia after adjuvant breast cancer therapy in older women: understanding the risk. *Journal of Clinical Oncology*. 25 (25) 3871-3876.
79. Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve S, Hua E, Bronder J, Weil R. (2009). Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association

- between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Molecular Cancer Research*. 7: 1438–1445.
80. Pedersen P, Mathupala S, Rempel A, Geschwind J y Ko Y. (2002). Mitochondrial bound type II hexokinase: A key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1555(1-3), 14-20.
81. Pérez-Urria C y Ávalos G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*. 2 (3) 119-145.
82. Pérez-Calzada H. (2013). Efecto de inhibición ganglionar causado por los productos de la planta medicinal *Dechacaeta incompta* (DC) R.M. King y H. Rob en ratones de la cepa Balb-c. Tesis licenciatura. Universidad Tomminaga Nakamoto. Ciudad de México.
83. Pinder M, Duan Z, Goodwin J, Hortobagyi G y Giordano S. (2007). Congestive heart failure in older women treated with adjuvant anthracycline chemotherapy for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 25(25), 3808-3815.
84. Pinkerton J y Thomas S. (2014). Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 142-154.
85. Pucci B, Kasten M y Giordano A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2(4), 291-299.
86. Reinicke K, Sotomayor P, Cisterna P, Delgado C, Nualart F y Godoy A. (2012). Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in benign and malignant human prostate tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2), 553-562

87. Reiter R, Sharma R, Ma Q, Rosales-Corral S, Acuna-Castroviejo D y Escames G. (2019). Inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase: A proposed mechanism by which melatonin causes cancer cells to overcome cytosolic glycolysis, reduce tumor biomass and reverse insensitivity to chemotherapy. *Melatonin Research*, 2(3), 105-119.
88. Rosenberg S. (2000). Principios de tratamiento del cáncer: cirugía oncológica. *Cáncer. Principios y Práctica de Oncología*. 5ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana y Arán Ediciones, pp. 295-306.
89. Roy A y Manikkam R. (2015). Cytotoxic impact of costunolide isolated from *Costus speciosus* on breast cancer via differential regulation of cell cycle-an *in-vitro* and *in-silico* Approach. *Phytotherapy Research: PTR*, 29(10), 1532-1539.
90. Ruiz-Reyes, Enrique, & Suarez, Margarita. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 46(1).
91. Sánchez R, Schneider E, Martínez R y Fonfach Z. (2008). Cáncer de mama. Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales. *Cuadernos de Cirugía*. 22 55–63.
92. Shapiro C y Recht A. (2001). Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(26), 1997-2008.
93. Shestov A, Liu X, Ser Z, Cluntun A, Hung Y, Huang L, Kim D, Le A, Yellen G, Albeck J, Locasale JW (2014). Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife*. 2014 Jul 9;3: e03342.

94. Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, Krelin Y, Tripathi S (2015). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1848(10 Pt B), 2547-2575.
95. Smith I y Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 348 (24), 2431-2442.
96. Sparano J, Wang M, Martino S, Jones V, Perez E, Saphner T, Wolff A, Sledge G, Wood W y Davidson N. (2008). Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(16), 1663-1671.
97. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A y Bray F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, caac.21660.
98. Tolaney S, Barry W, Dang C, Yardley D, Moy B, Marcom P, Albain K, Rugo H, Ellis M, Shapira I, Wolff A, Carey L, Overmoyer B, Partridge A, Guo H, Hudis C, Krop I, Burstein H y Winer E. (2015). Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(2), 134-141.
99. Tsang J y Tse G. (2020). Molecular classification of breast cancer: Advances in anatomic pathology, 27(1), 27-35.
100. United Nations (ONU) (2011) Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS) Fourth revised edition. New York and Geneva.

101. Vander H, Cantley L y Thompson C. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029-1033.
102. Velázquez-Domínguez J, Marchat L, López-Camarillo C, Mendoza-Hernández G, Sánchez-Espíndola E, Calzada F y Ramírez-Moreno E. (2013). Effect of the sesquiterpene lactone incomptine A in the energy metabolism of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*. 135 (3) 503-510.
103. Vélez O, Campos-Gaona R y Sanchez-Guerrero H. (2014). Use of plant secondary metabolites to reduce ruminal methanogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17 (3).489-499
104. Verma S, Rai V, Awasthee N, Dhasmana A, Rajalaksmi D, Nair M y Gupta S. (2019). Isodeoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone induces ROS generation, suppresses NF- κ B activation, modulates LncRNA expression and exhibit activities against breast cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 17980.
105. Warburg O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*. 9, 148–163
106. Wishart D. (2015). Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? *EBioMedicine* 2(6):478–9.
107. Wu S y Le H. (2013). Dual roles of PKM2 in cancer metabolism. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 45(1), 27-35.
108. Xing C, LaPorte J, Barbay J y Myers A. (2004). Identification of GAPDH as a protein target of the saframycin antiproliferative agents. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 101(16), 5862-5866

109. Yang Y, Kim J, Lee K y Choi J. (2011). La costunolida induce la apoptosis en las células de cáncer de ovario humano resistentes al platino al generar especies reactivas de oxígeno. *Oncología Ginecológica*. 123 (3), 588–596.

110. Yang B, Zhao Y, Lou C y Zhao H. (2016). Eupalinolide O, a novel sesquiterpene lactone from *Eupatorium lindleyanum* DC., induces cell cycle arrest and apoptosis in human MDA-MB-468 breast cancer cells. *Oncology Reports*. 36(5), 2807–2813.

111. Yu L, Chen X, Sun X, Wang L y Chen S. (2017). The glycolytic switch in tumors: How many players are involved? *Journal of Cancer*. 8(17), 3430–3440.

112. Yu F y Utsumi R. (2009). Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(18), 3043-3052.

113. Zhang Y, Zhou L y Ng K. (2009). Sesquiterpene lactones from *Ixeris sonchifolia* hance and their cytotoxicities on A549 human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Asian Natural Products Research*. 11(4), 294–298.

114. Zhang Q, Lu Y, Ding Y, Zhai J, Ji Q, Ma W y Chen Y. (2012). Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(20), 8757–8769.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00231

Matrícula: 2192802423

Determinación del efecto antiproliferativo de incompitina A en un modelo de cáncer de mama.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 18 del mes de junio del año 2021 PORVÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA
DR. NORMAND GARCIA HERNANDEZ
DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: ANGEL GIOVANNI ARIETTA GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ANGEL GIOVANNI ARIETTA GARCIA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

VOCAL

DR. NORMAND GARCIA HERNANDEZ

SECRETARIO

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO